

乳制品检测整体解决方案



序言

乳制品，指的是使用牛乳或羊乳及其加工制品为主要原料，加入或不加入适量的维生素、矿物质和其他辅料，使用法律法规及标准规定所要求的条件，加工制作的产品。乳制品包括液体乳（巴氏杀菌乳、灭菌乳、调制乳、发酵乳），乳粉（全脂乳粉、脱脂乳粉、部分脱脂乳粉、调制乳粉、牛初乳粉），及其他乳制品等等。

近年来，中国乳制品行业可谓经历了非同寻常的时期，在保持较快发展的同时，也经受住了严峻的考验，一度成为众人关注的焦点。中国乳制品行业从 1998 年开始进入高速增长阶段，然而 2008 年爆发的三聚氰胺事件对乳制品行业带来了致命打击，随后又爆出的奶粉性早熟事件，再一次影响了国内消费者的消费信心。不过，随着国家对乳制品行业的整顿以及乳制品企业对产品质量安全意识的强化，促使消费者信心重拾，中国乳制品行业逐步步入正轨。2016 年 8 月，中国奶业协会首次发布了《中国奶业质量报告》，其中提到：2009 年以来，农业部共抽检生鲜乳样品 15.1 万批次，抽查对象覆盖所有奶站，监测指标涵盖所有违禁添加物。监测数据显示，近两年国内生鲜乳抽检合格率达 99% 以上，多项质检指标优于美国甚至欧盟标准，三聚氰胺等违禁添加物检测合格率连续 7 年保持 100%，这些都意味着目前国内奶业生产和乳制品质量安全处于历史最好是近期。2016 年 3 月 15 日，国家食品药品监管总局审议通过并发布《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》，其标准和体系要求更加严格，被称为“最严奶粉新政”。

乳制品检测难点主要是：品种多、含量低、基质干扰严重。因此分析方法的灵敏度和选择性成为乳制品中有害物质分析的首要要求。目前国标和行标中主要分析技术有气相色谱质谱联用法、高效液相色谱质谱联用法等等。这些分析技术可以对痕量物质进行快速定性、定量分析，为构建乳制品质量安全体系提供重要保障。

岛津公司作为全球著名的分析仪器厂商，自 1875 年创业以来，始终秉承创始人岛津源藏的创业宗旨“以科学技术向社会做贡献”，不断钻研领先时代、满足社会需求的科学技术。针对近年来日益严格的乳制品质量安全问题，岛津分析中心精心汇编了这本《乳制品检测整体解决方案》，希望能对乳制品领域的检测工作有所帮助。

岛津企业管理（中国）有限公司

分析中心

目 录

序 言

国内外乳制品相关法规及标准概况.....	1
1. 乳制品中农残兽残检测.....	8
1.1 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的 17 种激素残留.....	9
1.2 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定奶粉中的 7 种糖皮质激素.....	27
1.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的 8 种镇定剂残留.....	34
1.4 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的 6 种 β -内酰胺类抗生素残留.....	43
1.5 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的 4 种大环内酯类抗生素残留.....	51
1.6 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的 14 种喹诺酮类抗生素残留.....	66
1.7 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物的残留量.....	79
1.8 超高效液相色谱三重四极杆质谱测定乳制品中呋喃苯烯酸钠残留量.....	85
1.9 GPC-GC-MS/MS 联用法测定奶粉中有机氯农药含量.....	91
2. 乳制品中非法添加和滥用物质检测.....	96
2.1 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定奶粉中的双氰胺残留.....	97
2.2 超高效液相色谱三重四极杆质谱测定乳制品中舒巴坦的含量.....	102
2.3 超高效液相色谱测定牛奶中的青霉素分解剂—— β -内酰胺酶.....	112
2.4 柱后衍生高效液相色谱法测定乳制品中皮革水解蛋白.....	116
2.5 离子色谱法测定乳制品中硫氰酸根离子含量.....	124
3. 乳制品中无机元素检测.....	128
3.1 石墨炉原子吸收法测定奶粉中的铅、铬元素.....	129
3.2 氢化物发生原子吸收法测定奶粉及饲料中汞的含量.....	132
3.3 ICP-AES 法测定奶粉中的 8 种无机元素.....	135
3.4 ICPMS-2030 分析奶粉中的营养元素及有害元素.....	140
4. 乳制品中风险物质检测.....	143
4.1 气相色谱单四极杆质谱联用法 测定牛奶中 16 种邻苯二甲酸酯类含量.....	144
4.2 气相色谱三重四极杆质谱联用法 测定奶粉中 19 种邻苯二甲酸酯类化合物.....	151
4.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定奶粉中的壬基酚.....	158
4.4 GCMS-TQ8040 应用于食品和动物饲料中二恶英(PCDD/Fs)检测.....	163
4.5 气相色谱质谱联用法检测奶粉中四种雌激素.....	172
4.6 LCMS-8045 测定牛奶中 5 种雌激素含量.....	176

5. 乳制品中营养物质检测	182
5.1 高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中维生素 A 的含量	183
5.2 高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中维生素 E 的含量	186
5.3 高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中维生素 B1 的含量	189
5.4 高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中牛磺酸的含量	192
5.5 应用高效液相色谱—串联质谱法测定婴幼儿配方食品和乳粉中的乳清蛋白	195
5.6 应用高效液相色谱—串联质谱法测定婴幼儿配方食品和乳粉中的乳铁蛋白	202
5.7 利用 Perfinity iDP 和 LCMS-8060 联用构建 α -酪蛋白的定量分析方法	208
6. 乳制品掺假鉴别	214
6.1 应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定羊奶粉中牛奶粉的掺伪	215
6.2 超高效液相色谱—串联质谱法测定山羊全脂奶粉产品中山羊奶粉和奶牛奶粉成分的含量	219



SHIMADZU
Excellence in Science

国内外乳制品相关法规及标准概况

（一）乳制品问题事件背景介绍：

近年来，针对乳制品质量问题的报道层出不穷：

2004年，安徽阜阳“劣质奶粉”事件，导致中国消费者对乳品安全的严重关注。安徽阜阳农村100多名婴儿，出现发育不良现象（大头娃娃）。原因是使用的97%婴儿奶粉的蛋白质含量严重不足（2%左右），而标准要求蛋白质含量应不低于10%，导致婴幼儿营养不良。

2006年，共计10万公斤同一美国品牌的3批奶粉被连续检出亚硝酸盐含量超标而被北京市出入境检验检疫局退运处理。

2008年，三鹿牌“毒奶粉”事件，三鹿多批次婴幼儿奶粉受到三聚氰胺污染，进行大规模召回。该事件是一次影响重大的乳品质量安全事件，造成婴幼儿肾结石等疾病。“事件”涉及面广，轰动国内外。石家庄三鹿乳业集团破产，中国乳业受到重创。

2009年，皮革水解蛋白事件。皮革水解物主要成分是皮革水解蛋白，而劣质水解蛋白的生产原料主要来自制革工厂的边角废料。制革边角废料中含有重铬酸钾和重铬酸钠。用这种原料生产水解蛋白，重铬酸钾和重铬酸钠就被带入产品中，被人体吸收。这些物质在体内无法分解，还会慢慢积累，可导致中毒，使关节疏松肿大，甚至造成儿童死亡。

2010年，武汉三名女婴疑似出现性早熟，乳房开始发育，雌激素水平竟已达到成年女性的水平。在经过医院的一番诊疗之后，家长质疑，三人长期食用的同一品牌奶粉就是罪魁祸首。后来虽经权威部门出面澄清与该奶粉无关，但也引发了人们对于奶粉中激素问题的担忧。

2011年，国家质检总局公布了近期对200种液体乳产品质量的抽查结果。其中，某些产品被检出黄曲霉毒素M1超标140%。

2012年，有媒体报道称，湖南省信用建设促进会在近期的食品行业声誉监测工作中监测到一条有关某些洋品牌婴儿配方奶粉添加香兰素的信息。之后该会委托相关部门检测，这些洋品牌的一阶段婴幼儿奶粉均被检测出香兰素，被判不合格。后来，该检测中心承认，其检测报告存在失误，“本批次检测样品的结果均为无效”。

2013年1月，新西兰初级产业部(MPI)宣布，该国牛奶和奶粉中发现存在低毒的化学物质双氰胺残留，新西兰政府已经下令禁止含有双氰胺的奶制品销售和出口。据报道，为了保持草场的肥沃，防止肥料的副产品硝酸盐流入河流和湖泊，并减少温室气体的排放，新西兰农民会在牧场喷洒双氰胺，由于牧草含有双氰胺，造成奶牛摄食牧草后，在牛奶中有残留。

2013年8月，新西兰初级产业部(MPI)宣布，新西兰乳制品巨头恒天然集团旗下部分产品

可能含有肉毒杆菌毒素。可能受污染的产品被用于婴儿配方奶粉和运动饮料的生产。国家质检总局要求进口商立即召回可能受污染产品，并要求各地检验检疫机构进一步加强新西兰输华乳制品的检验监管。

以上乳品事件，有些是确有其事，有些是虚惊一场。但不管怎么说，都说明乳品的质量安全问题已经越来越引起人们的重视，而且重要程度已经到了刻不容缓的地步。

（二）国内外乳制品相关法规及标准概况

（1）中国

由于三鹿牌婴幼儿奶粉事件给婴幼儿的生命健康造成了重大危害，给我国乳制品行业带来了严重影响。2008年10月，经国务院第二十八次常务会议通过，批准执行《乳品质量安全监督管理条例》。该条例一是明确标准的制定部门。条例规定，生鲜乳和乳制品应当符合乳品质量安全国家标准。乳品质量安全国家标准由卫生部组织制定。二是对标准的及时完善、修订作了规范。条例规定，卫生部应当根据疾病信息和监督管理部门的监督管理信息等对发现添加或者可能添加到乳品中的非食品用化学物质和其他可能危害人体健康的物质，立即组织进行风险评估，采取相应的监测、检测和监督措施，并根据风险监测和风险评估的结果及时组织修订标准。三是规范标准的内容。条例规定，乳品质量安全国家标准应当包括乳品中的致病性微生物、农药残留、兽药残留、重金属以及其他危害人体健康物质的限量规定，乳品生产经营过程的卫生要求，通用的乳品检验方法与规程，与乳品安全有关的质量要求，以及其他需要制定为乳品质量安全国家标准的内容。

2010年2月，第一届食品安全国家标准审评委员会审议通过了66项乳品安全国家标准，并于2010年3月26日由卫生部批准公布了《生乳》(GB19301-2010)等66项新乳品安全国家标准。新的乳品安全国家标准包括乳品产品标准15项、生产规范2项、检验方法标准49项。《乳品安全国家标准》是按照《食品安全法》对食品安全标准的几条原则制定的。一是关于致病微生物、农药残留、兽药残留、重金属、污染物以及其它危害人体健康物质的限量规定。二是食品添加剂的品种、使用范围和用量。三是专供婴幼儿以及其它特殊人群的主辅食品营养成分的要求。四是对与食品安全、营养有关的标识和说明书的要求。五是食品生产经营过程中的卫生要求。六是与食品有关的质量要求。七是食品检验方法与规程。八是其它需要制定为食品安全标准的内容。

为切实加强乳制品质量安全工作，国家质检总局于2010年组织修订了《企业生产婴幼儿配方乳粉许可条件审查细则》和《企业生产乳制品许可条件审查细则》。根据《国务院办公厅关于

进一步加强乳品质量安全工作的通知》规定，现行所有获得乳制品及婴幼儿配方乳粉生产许可的企业，应当在提交能够证明其满足《乳制品工业产业政策》规定相关文书的基础上，按照质检总局公布的相关规章和规范性文件要求，于 2010 年 12 月 31 日之前重新提出生产许可申请。从 2011 年 3 月 1 日起，凡未重新获得生产许可的，依法停止生产乳制品及婴幼儿配方乳粉等产品。

（2）美国

美国被认为是世界上乳品供应最安全的国家之一，民众对乳品放心度普遍较高。在联邦政府监管机构之间以及州和地方政府间建立相互补充、相互依赖和相互协调的合作伙伴关系，同时配备一整套完善的乳制品质量安全法律、法规和标准。这些因素综合起来，便为美国乳制品质量安全提供了全面、系统和有效的监管机制和监管依据。美国涉及乳品监管的机构非常复杂，主要机构达 20 多个，而其中最主要的有美国联邦卫生与人类服务部所属的食品和药品监督管理局（FDA）、美国农业部所属的动植物卫生检验局（APHIS）、市场服务局（AMS），以及美国联邦环境保护署（EPA）等。

美国的乳制品质量安全法律体系主要由联邦法律、联邦技术法规、自愿性标准和行业规范 4 部分组成。联邦法律和联邦技术法规由农业部、卫生与公共服务部、环境保护局，以及由联邦政府授权的其他机构共同制定，强制性执行。自愿性标准是美国乳品质量标准的主体，由农业部农业市场局、民间团体、协会和组织等制定，自愿采纳和执行。行业规范则由行业协会制定，指导行业实施科学生产和管理。这 4 级体系层次分明，并相互协调配合，为美国乳制品的质量与安全提供有力的技术支撑和保障。

（3）日本

日本乳制品安全相关的法律主要包括《食品卫生法》、《食品安全基本法》和《关于农林物质标准化及质量标识正确化法律》等，此外还有《兽医诊断法》、《饲料安全法》、《消费品安全法》等。在涉及到乳品的技术法规方面主要有《乳与乳制品成分标准》和肯定列表制度。前者对原料乳及乳品质量成分和微生物要求及配套检验方法等方面进行了具体而系统的规定。而后者规定食品中农业化学品含量不得超过日本制定的最大残留限量标准，对未制定最大残留限量标准的农业化学品，其在食品中的含量不得超过“一律标准”。即 0.01 mg/kg。

乳品的相关限量标准有：《食品、食品添加剂等的规格和标准》、《食品中农药、兽药、饲料添加剂残留检测方法》等。

（三）我国乳制品中相关物质限量标准及检验方法

(1) 有毒物质、农药及兽药残留

表1 乳品中有毒物质限量及检验标准

物质	乳品类别	限量 (mg/kg)	检验方法
铅	生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、发酵乳、调制乳	0.05	GB/T 5009.12-2003
	乳粉、非脱盐乳清粉	0.5	
	其他乳制品	0.3	
总汞	生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、调制乳、发酵乳	0.01	GB/T 5009.17-2003
总砷	生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、调制乳、发酵乳	0.1	GB/T 5009.11-2003
	乳粉	0.5	
铬	生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、调制乳、发酵乳	0.3	GB/T 5009.123-2003
	乳粉	2	
亚硝酸盐	生乳	0.4	GB 5009.33 -2003
	乳粉	2	
黄曲霉毒素 M1	乳基婴儿配方食品	0.0005	GB 5009.24-2003

表2 乳制品中农药、兽药残留检测标准

检验方法	标准名称	相关检测仪器
GB/T 21312-2007	动物源性食品中 14 种喹诺酮类药物残留检测方法	LCMSMS
GB/T 21316-2007	动物源性食品中磺胺类药物残留量检测方法	LCMSMS
GB/T 21981-2008	动物源食品中激素多残留检测方法	LCMSMS
GB/T 22965-2008	牛奶和奶粉中 12 种 β -兴奋剂残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22966-2008	牛奶和奶粉中 16 种磺胺类药物残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22967-2008	牛奶和奶粉中 β -雌二醇残留量的测定	GCMS
GB/T 22968-2008	牛奶和奶粉中伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22968-2008	牛奶和奶粉中伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22969-2008	奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22971-2008	牛奶和奶粉中安乃近代谢物残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22972-2008	牛奶和奶粉中噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、	LCMSMS

	苯硫氨酯残留量的测定	
GB/T 22973-2008	牛奶和奶粉中醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22974-2008	牛奶和奶粉中氮氨基吡啶残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22975-2008	牛奶和奶粉中阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林和双氯西林残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22976-2008	牛奶和奶粉中 α -群勃龙、 β -群勃龙、19-乙烯去甲睾酮和 epi-19-乙烯去甲睾酮残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22977-2008	牛奶和奶粉中保泰松残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22978-2008	牛奶和奶粉中地塞米松残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22979-2008	牛奶和奶粉中啶酰菌胺残留量的测定	GCMS
GB/T 22980-2008	牛奶和奶粉中氟胺烟酸残留量的测定	LC
GB/T 22981-2008	牛奶和奶粉中杆菌肽残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22982-2008	牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑及其代谢物残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22983-2008	牛奶和奶粉中六种聚醚类抗生素残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22984-2008	牛奶和奶粉中卡巴氧和唑乙醇代谢物残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22985-2008	牛奶和奶粉中恩诺沙星、达氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、二氟沙星和麻保沙星残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22987-2008	牛奶和奶粉中呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮代谢物残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22988-2008	牛奶和奶粉中螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米卡星、红霉素、泰乐菌素残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22989-2008	牛奶和奶粉中头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢喹肟残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22991-2008	牛奶和奶粉中维吉尼霉素残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22992-2008	牛奶和奶粉中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22993-2008	牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定	LCMSMS
GB/T 22994-2008	牛奶和奶粉中左旋咪唑残留量的测定	LCMSMS
GB/T 23210-2008	牛奶和奶粉中 511 种农药及相关化学品残留量的测定	GCMS
GB/T 23211-2008	牛奶和奶粉中 493 种农药及相关化学品残留量的测定	LCMSMS
SN/T 2912-2011	出口乳及乳制品中多种拟除虫菊酯农药残留量的检测方法	GCMS

(2) 非法添加物

表3 乳制品中非法添加物

非法添加物	检验方法
三聚氰胺	GB/T 22388-2008
硫氰酸钠	未指定

革皮水解物	未指定
β -内酰胺酶	未指定
工业用火碱	未指定

(3) 营养成分（婴儿配方食品）

表4 维生素指标

营养素	单位	每100 kJ		每100 kcal		检验方法
		最小值	最大值	最小值	最大值	
维生素 A	μg	14	43	59	180	GB 5413.9
维生素 D	μg	0.25	0.6	1.05	2.51	GB 5413.9
维生素 E	mg	0.12	1.2	0.5	5.02	GB 5413.9
维生素 K	μg	1	6.5	4.2	27.2	GB 5413.10
维生素 B1	μg	14	72	59	301	GB 5413.11
维生素 B2	μg	19	119	80	498	GB 5413.12
烟酸（烟酰胺）	μg	70	360	293	1506	GB 5413.13
维生素 B6	μg	8.5	45	35.6	188.3	GB 5413.14
维生素 B12	μg	0.025	0.36	0.105	1.506	GB 5413.15
泛酸	μg	96	478	402	2000	GB 5413.16
叶酸	μg	2.5	12	10.5	50.2	GB 5413.17
维生素 C	mg	2.5	17	10.5	71.1	GB 5413.18
生物素	μg	0.4	2.4	1.5	10.0	GB 5413.19

表5 矿物质指标

无机元素	单位	每100 kJ		每100 kcal		检验方法
		最小值	最大值	最小值	最大值	
钠	mg	5	14	21	59	GB 5413.21
钾	mg	14	43	59	180	GB 5413.21
铜	μg	8.5	29	35.6	121.3	GB 5413.21
镁	mg	1.2	3.6	5	15.1	GB 5413.21
铁	mg	0.10	0.36	0.42	1.51	GB 5413.21
锌	mg	0.12	0.36	0.5	1.51	GB 5413.21
锰	μg	1.2	24	5	100.4	GB 5413.21
钙	mg	12	35	50	146	GB 5413.21
磷	mg	6	24	25	100	GB 5413.22
碘	μg	2.5	14	10.5	58.6	GB 5413.23
硒	μg	0.48	1.9	2.01	7.95	GB 5413.24

表6 可选择性成分指标

营养素	单位	每100 kJ		每100 kcal		检验方法
		最小值	最大值	最小值	最大值	
胆碱	mg	1.7	12	7.1	50.2	GB/T 5413.20
肌醇	mg	1	9.5	4.2	39.7	GB 5413.25
牛磺酸	mg	-	3	-	13	GB 5413.26
左旋肉碱	mg	0.3	-	1.3	-	-
二十二碳六烯酸	%总脂肪酸	-	0.5	-	0.5	GB 5413.27
二十碳四烯酸	%总脂肪酸	-	1	-	1	GB 5413.27

表7 氨基酸指标

氨基酸	指标	
	mg/g N	mg/100 kcal
胱氨酸	80	24.1
组氨酸	120	36.1
异亮氨酸	300	90.2
亮氨酸	540	162.4
赖氨酸	350	105.3
蛋氨酸	65	19.6
苯丙氨酸	180	54.1
苏氨酸	250	75.2
色氨酸	110	33.1
酪氨酸	200	60.2
缬氨酸	310	93.2

乳制品中农残兽残检测



SHIMADZU
Excellence in Science

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法

测定牛奶中的17种激素残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中 17 种激素残留的分析方法。牛奶基质经样品前处理后,用超高效液相色谱 LC-30A 分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定性定量分析。17 种激素在各自的标准溶液浓度范围内具有良好的线性相关性,相关系数在 0.9974-0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样进行精密度实验,17 种激素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.0102%~0.161%和 0.563%~6.55%之间,仪器精密度良好。采取牛奶基质加标的方法计算回收率进行方法验证,17 种激素的回收率范围为 61.00%~110.9%,方法定量限范围为 0.14~0.97 $\mu\text{g}/\text{kg}$,可以满足牛奶中激素类药物的检测需求。

关键词: 激素 牛奶 固相萃取 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

近年来国内发生的奶粉疑致“婴儿性早熟”事件成为继 2008 年三聚氰胺事件以来乳制品行业面临的又一重大食品安全事件。奶粉事件危机频出,严重挫伤了消费者对国内奶粉质量的信心和奶粉业的发展。从利益、动机的角度而言,商家虽然不会在奶粉加工过程中添加激素,但是在原料奶生产环节,养殖户为了提高奶牛产奶量,滥用抗生素和激素等不法行为却可能发生。奶粉中除了含有内源性孕激素、雌性激素与雄性激素外,其他所有化学合成类激素均属于禁用药物。2002 年我国农业部第 235 号公告中已禁止使用乙烯雌酚、醋酸甲孕酮、甲基睾丸酮、群勃龙、玉米赤霉醇等化学合成类激素物质,并规定这些化合物在动物性食品中不得检出。同时欧盟第 96/22/EC 指令,美国药物管理局(FDA)也禁止在食品源性动物中使用激素类药物。

本文在结合国家标准 GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》基础上,采用固相萃取进行净化,超高效液相色谱进行分离,三重四极杆进行定性和定量,成功地建立了固相萃取与串联质谱联用测定牛奶中 17 种激素的分析方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 2.0 mmI.D.×75mmL.,2.2μm

流动相：A—0.1%甲酸水溶液，B—甲醇，A/B=50%/50%（V/V）

流速：0.4 mL/min

洗脱方式：梯度洗脱，见表 1

进样体积：5 μL

柱温：40℃

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
8	Pumps	Pump BConc.	64
11	Pumps	Pump B Conc.	64
12.5	Pumps	Pump B Conc.	100
14.5	Pumps	Pump B Conc.	100
15	Pumps	Pump B Conc.	50
20	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：30 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2. MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
雄烯二酮	287.1	97.0*	-15.0	-25.0	-20.0
	287.1	109.2	-15.0	-25.0	-23.0
勃地酮	287.1	121.1*	-26.0	-25.0	-26.0
	287.1	135.1	-26.0	-15.0	-15.0
达那唑	338.3	148.2*	-26.0	-30.0	-16.0
	338.3	120.0	-26.0	-35.0	-24.0
氟甲睾酮	337.2	241.2*	-13.0	-25.0	-18.0
	337.2	131.0	-13.0	-35.0	-28.0
睾酮	289.3	97.0*	-25.0	-25.0	-20.0
	289.3	109.1	-25.0	-25.0	-22.0
甲睾酮	303.3	109.2*	-25.0	-30.0	-21.0
	303.3	97.2	-25.0	-25.0	-19.0
美雄酮	301.3	121.2*	-26.0	-25.0	-13.0
	301.3	149.2	-26.0	-15.0	-16.0
诺龙	275.1	109.1*	-13.0	-30.0	-22.0
	275.1	257.2	-13.0	-15.0	-20.0
去甲雄烯二酮	273.1	109.2*	-10.0	-25.0	-23.0
	273.1	197.1	-10.0	-20.0	-15.0
群勃龙	271.2	253.2*	-27.0	-20.0	-19.0
	271.2	199.1	-27.0	-25.0	-15.0
乙酸甲地孕酮	385.1	267.2*	-23.0	-20.0	-20.0
	385.1	325.2	-23.0	-15.0	-25.0
甲羟孕酮	345.3	123.0*	-13.0	-25.0	-13.0
	345.3	97.2	-13.0	-25.0	-19.0
甲羟孕酮乙酸酯	387.3	123.0*	-15.0	-30.0	-13.0

	387.3	327.3	-15.0	-10.0	-25.0
甲基炔诺酮	313.3	109.2*	-12.0	-35.0	-24.0
	313.3	245.2	-12.0	-25.0	-18.0
氯地孕酮乙酸酯	405.1	345.2*	-24.0	-15.0	-18.0
	405.1	309.2	-24.0	-20.0	-23.0
炔诺酮	299.1	109.1*	-19.0	-35.0	-22.0
	299.1	91.2	-19.0	-25.0	-11.0
孕酮	315.2	97.2*	-12.0	-25.0	-20.0
	315.2	109.0	-12.0	-30.0	-21.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

将浓度各为 100 mg/L 的 17 种激素，用超纯水依次稀释至 1000 $\mu\text{g/L}$ 的混合标样。将 1000 $\mu\text{g/L}$ 的 17 种激素混合标样，用超纯水逐级稀释成不同浓度点的标准工作液用于建立标准曲线，线性浓度点见表 3。

表 3. 17 种激素的线性浓度点 ($\mu\text{g/L}$)

化合物名称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6	浓度 7
去甲雄烯二酮	1	2	4	10	20	50	100
群勃龙	1	2	4	10	20	50	100
勃地酮	1	2	4	10	20	50	100
诺龙	1	2	4	10	20	50	100
雄烯二酮	1	2	4	10	20	50	100
美雄酮	1	2	4	10	20	50	100
睾酮	1	2	4	10	20	50	100
甲睾酮	1	2	4	10	20	50	100
甲羟孕酮	1	2	4	10	20	50	100
乙酸甲地孕酮	1	2	4	10	20	50	100
甲羟孕酮乙酸酯	1	2	4	10	20	50	100
孕酮	1	2	4	10	20	50	100

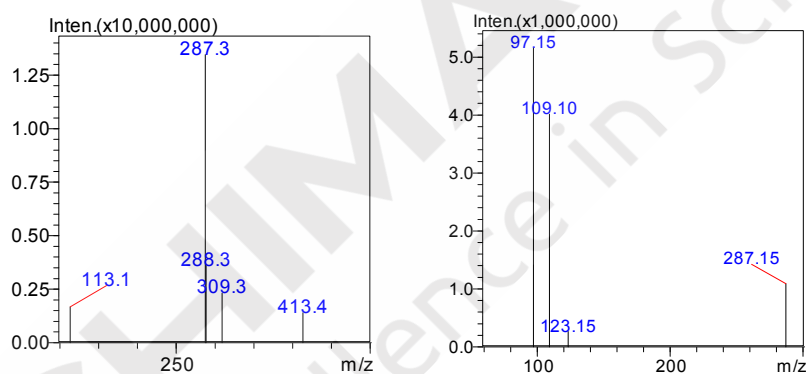
炔诺酮	5	10	20	50	100	250	500
甲基炔诺酮	5	10	20	50	100	250	500
氯地孕酮乙酸酯	5	10	20	50	100	250	500
氟甲睾酮	10	20	40	100	200	500	1000
达那唑	10	20	40	100	200	500	1000

1.3.2 样品前处理方法

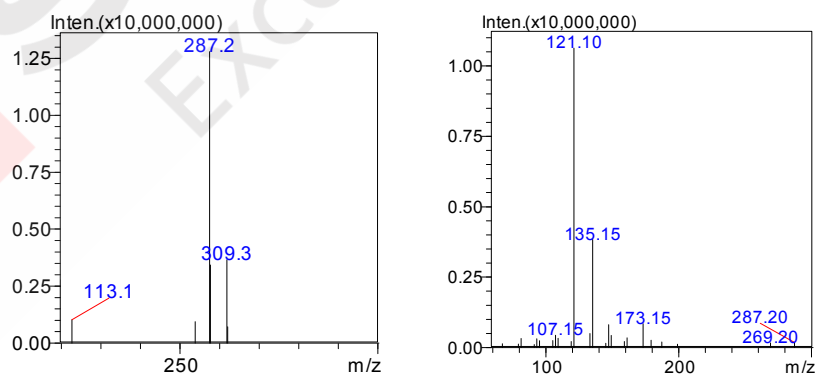
牛奶基质样品的前处理参照 GB/T 21981-2008 《动物源性食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》进行处理。

2. 结果讨论

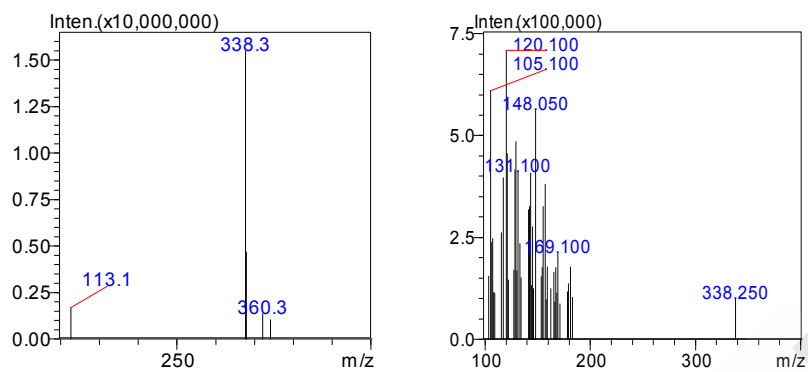
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



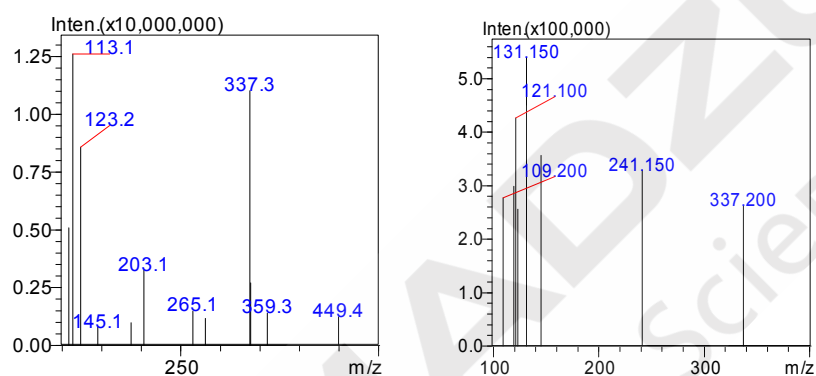
1. 雄烯二酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-22V）（右图）



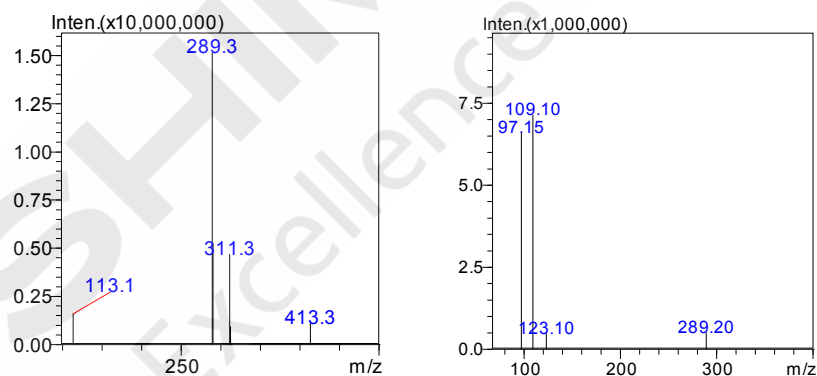
2. 勃地酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-21V）（右图）



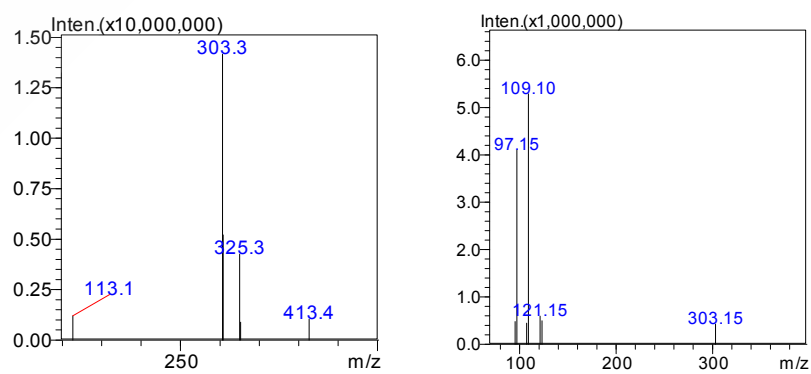
3. 达那唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-40V）（右图）



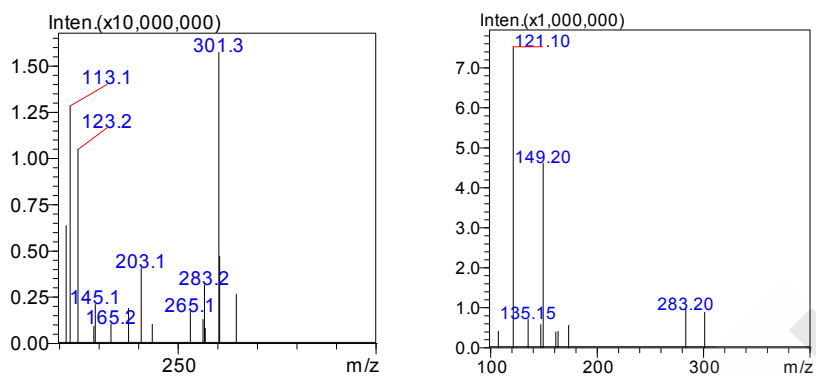
4. 氟甲萘酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-32V）（右图）



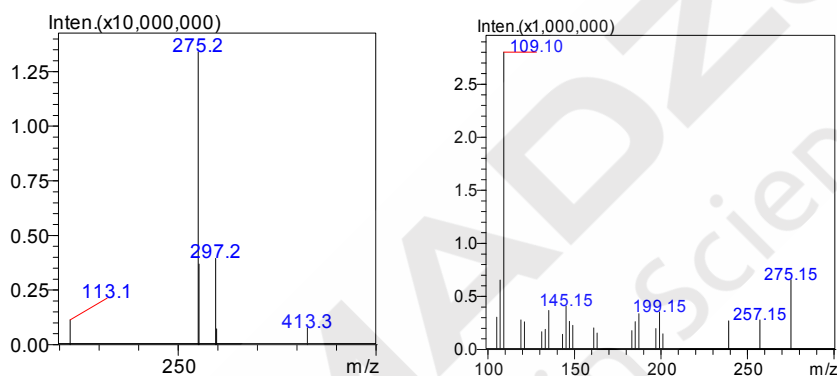
5. 萘酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



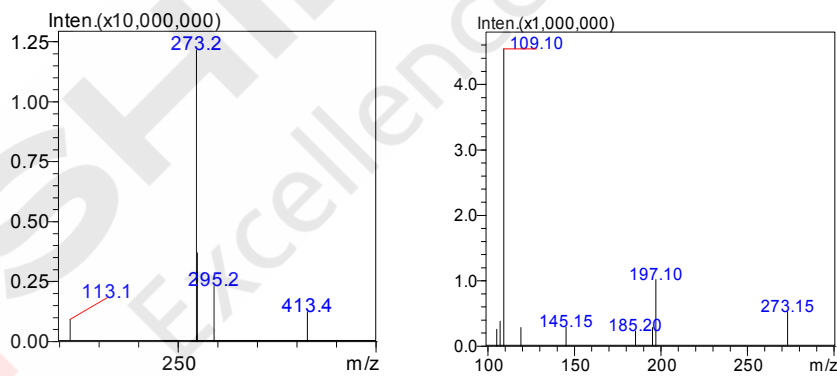
6. 甲萘酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-26V）（右图）



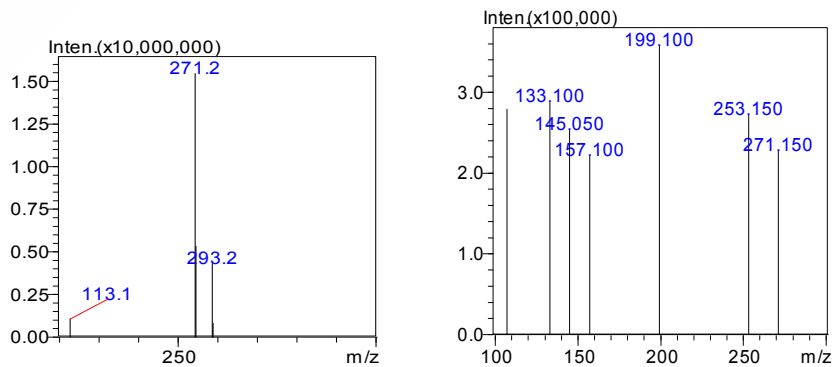
7. 美雄酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-18V）（右图）



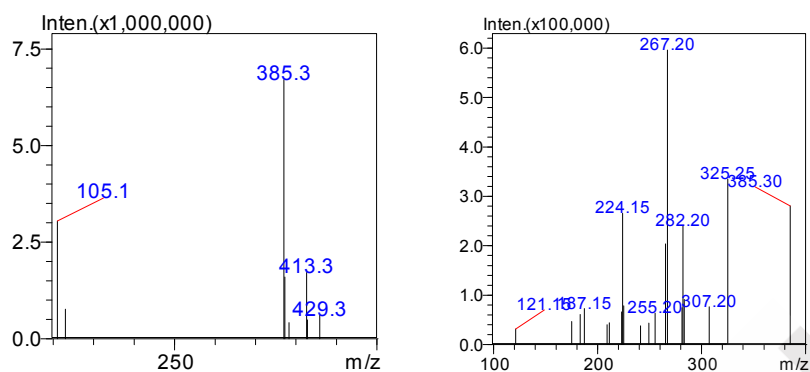
8. 诺龙的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-24V）（右图）



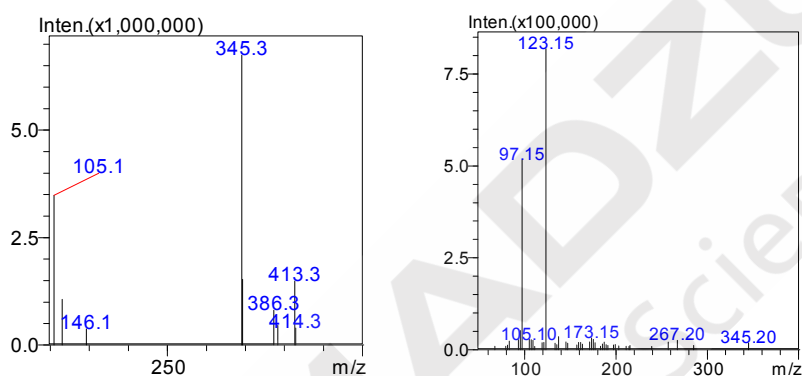
9. 去甲雄烯二酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



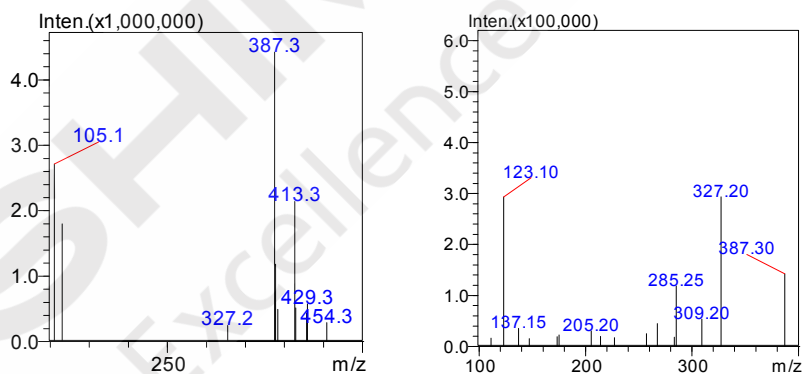
10. 群勃龙的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-30V）（右图）



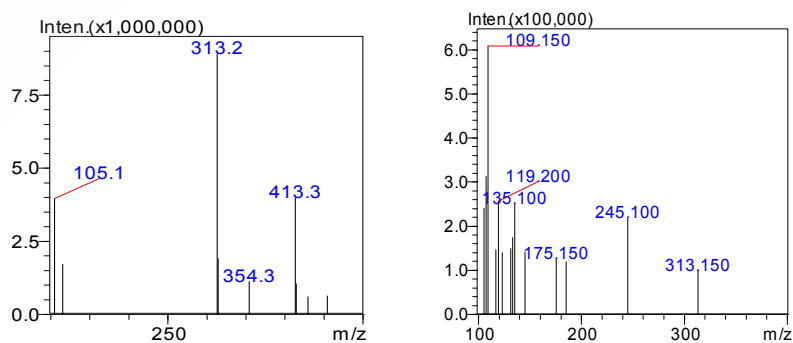
11. 乙酸甲地孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-19V）（右图）



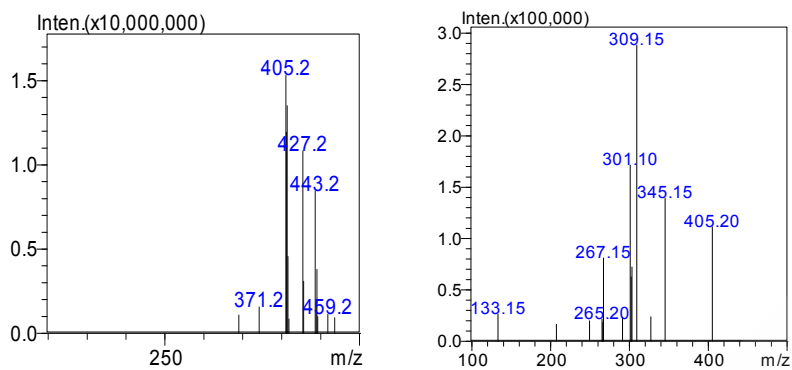
12. 甲羟孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-29V）（右图）



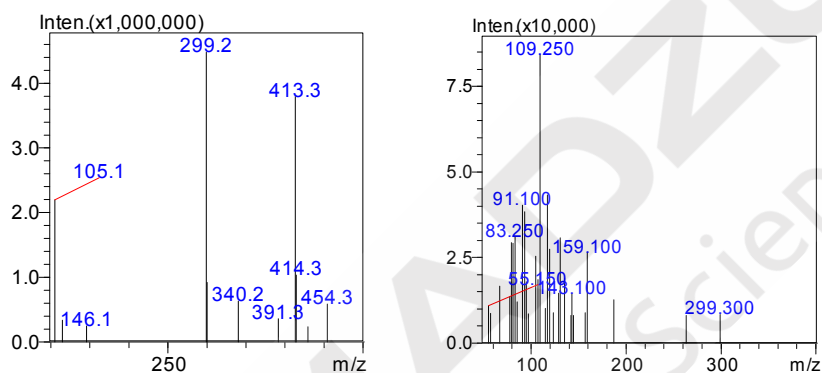
13. 甲羟孕酮乙酸酯的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-20V）（右图）



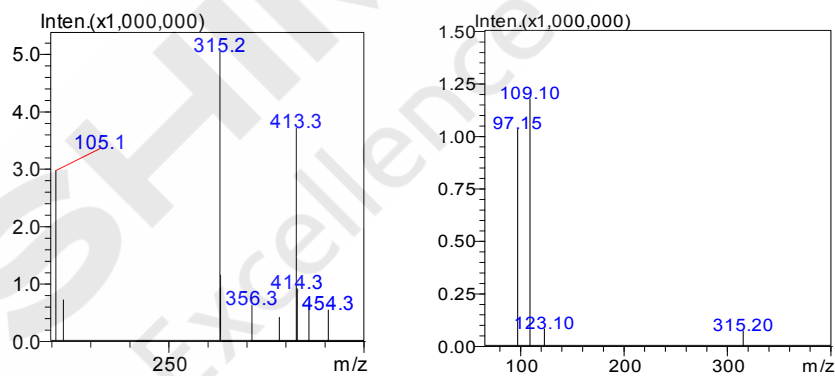
14. 甲基炔诺酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-26V）（右图）



15. 氯地孕酮乙酸酯的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-18V）（右图）



16. 炔诺酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-32V）（右图）



17. 孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）

图 1.17 种激素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标样的 MRM 色谱图如图 2 所示。

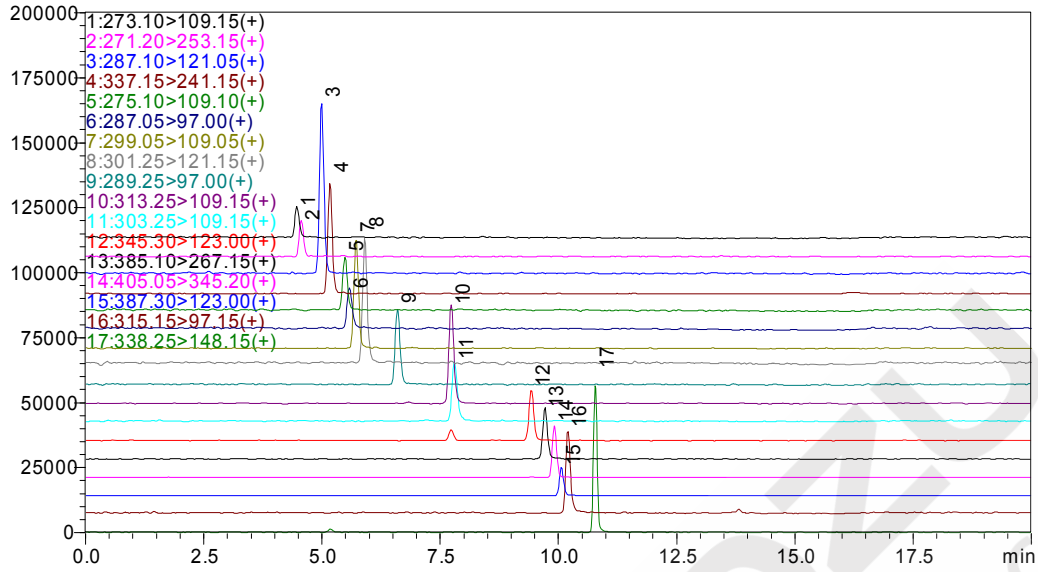
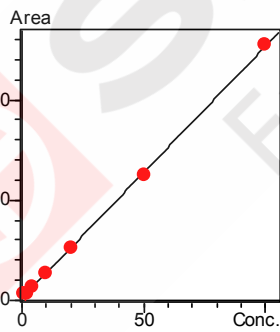


图 2. 标准样品 MRM 色谱图

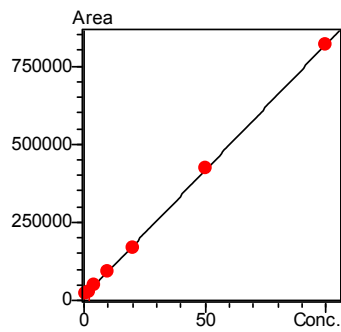
峰归属:1、去甲雄烯二酮 (10 μg/L); 2、群勃龙 (10 μg/L); 3、勃地酮(10 μg/L); 4、氟甲睾酮(100 μg/L); 5、诺龙(10 μg/L); 6、雄烯二酮 (10 μg/L); 7、炔诺酮 (50 μg/L); 8、美雄酮(10 μg/L); 9、睾酮(10 μg/L); 10、甲基炔诺酮(50 μg/L); 11、甲睾酮(10 μg/L); 12、甲羟孕酮 (10 μg/L); 13、乙酸甲地孕酮(10 μg/L); 14、氯地孕酮乙酸酯(50 μg/L); 15、甲羟孕酮乙酸酯 (10 μg/L); 16、孕酮 (10 μg/L); 17、达那唑 (100 μg/L)

2.3 线性关系

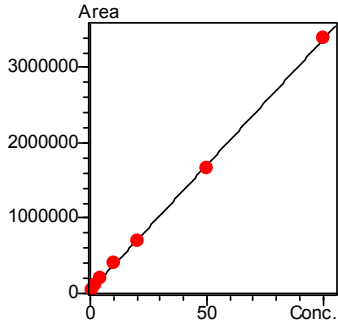
按 1.2 项下的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，七点外标法建立校准曲线，如图 3 所示。17 种激素在不同的线性浓度点下（见表 3），线性相关性良好，相关系数均在 0.9974-0.9999 之间（见表 4）。



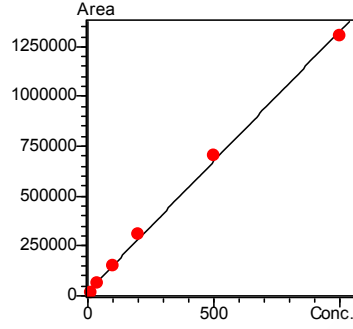
1、去甲雄烯二酮



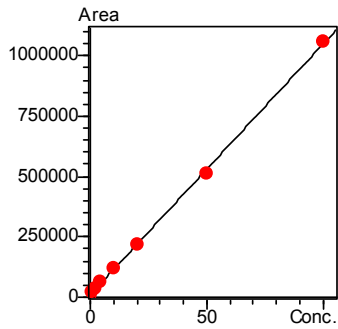
2、群勃龙



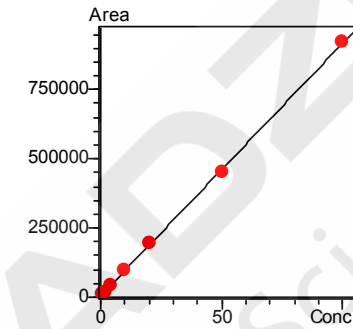
3、勃地酮



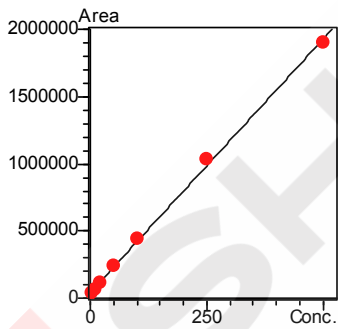
4、氟甲萘酮



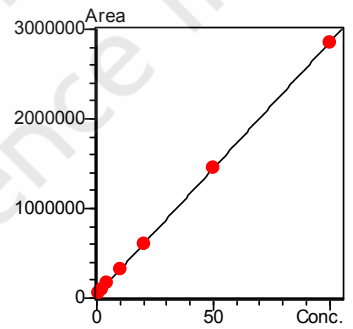
5、诺龙



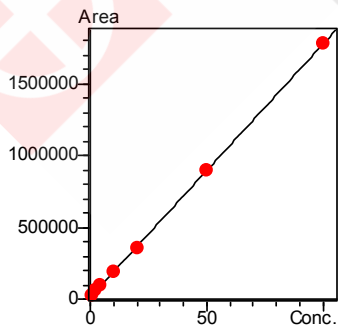
6、雄烯二酮



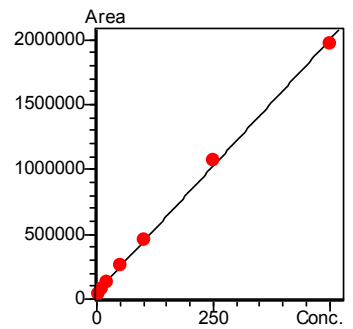
7、炔诺酮



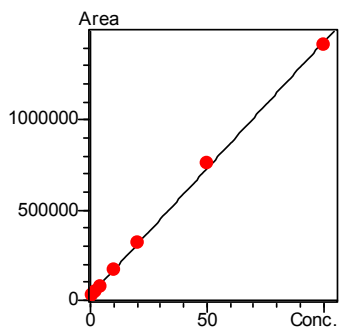
8、美雄酮



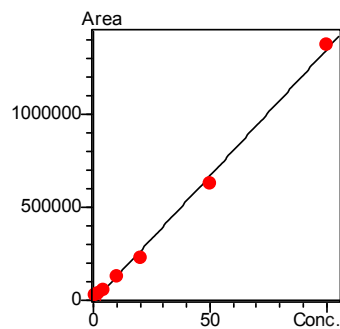
9、睾酮



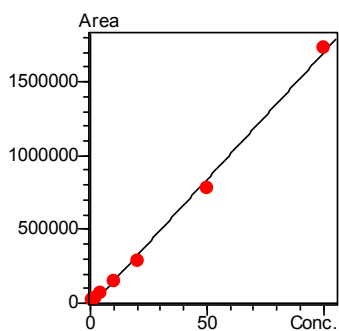
10、甲基炔诺酮



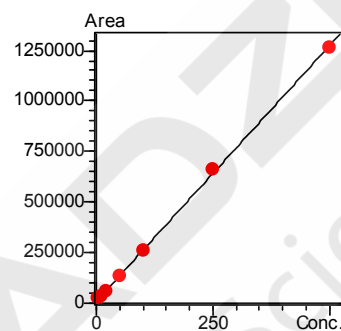
11、甲睾酮



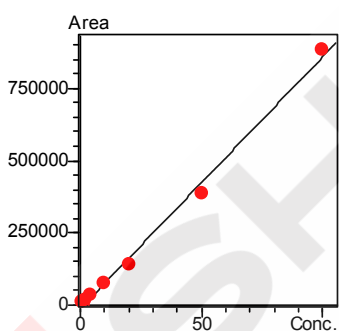
12、甲羟孕酮



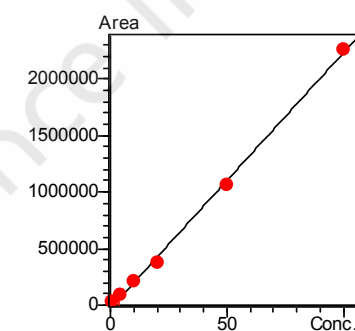
13、乙酸甲地孕酮



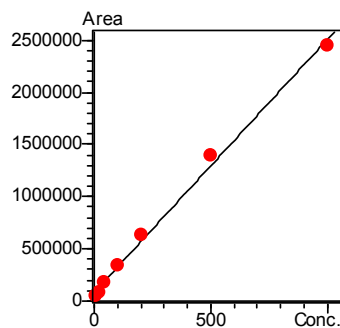
14、氯地孕酮乙酸酯



15、甲羟孕酮乙酸酯



16、孕酮



17、达那唑

图 3.17 种激素的标准工作曲线

表 4. 17 种激素的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围($\mu\text{g/L}$)	相关系数(R)
1	去甲雄烯二酮	$Y = (6291.94)X + (5045.17)$	1.0~100	0.9998
2	群勃龙	$Y = (8093.28)X + (11702.5)$	1.0~100	0.9999
3	勃地酮	$Y = (33290.1)X + (39696.4)$	1.0~100	0.9997
4	氟甲睾酮	$Y = (1304.96)X + (21697.4)$	10~1000	0.9991
5	诺龙	$Y = (10371.7)X + (11750.5)$	1.0~100	0.9997
6	雄烯二酮	$Y = (9140.16)X + (4939.96)$	1.0~100	0.9999
7	炔诺酮	$Y = (3771.80)X + (44103.2)$	5.0~500	0.9993
8	美雄酮	$Y = (28151.5)X + (39506.0)$	1.0~100	0.9999
9	睾酮	$Y = (17610.0)X + (13733.6)$	1.0~100	0.9999
10	甲基炔诺酮	$Y = (3882.87)X + (56327.6)$	5.0~500	0.9992
11	甲睾酮	$Y = (14053.9)X + (28168.1)$	1.0~100	0.9996
12	甲羟孕酮	$Y = (13545.6)X + (-8027.14)$	1.0~100	0.9985
13	乙酸甲地孕酮	$Y = (17153.8)X + (-18765.8)$	1.0~100	0.9984
14	氯地孕酮乙酸酯	$Y = (2524.61)X + (10654.8)$	5.0~500	0.9998
15	甲羟孕酮乙酸酯	$Y = (8715.12)X + (-11254.1)$	1.0~100	0.9974
16	孕酮	$Y = (22587.5)X + (-25767.7)$	1.0~100	0.9991
17	达那唑	$Y = (2422.08)X + (85881.9)$	10~1000	0.9977

2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样（浓度见表 5），平行测定 6 次，结果表明仪器具有良好的精密度（见表 5）。

表 5. 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD%(低浓度- $\mu\text{g/L}$)		RSD%(中浓度- $\mu\text{g/L}$)		RSD%(高浓度- $\mu\text{g/L}$)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
去甲雄烯二酮	0.161	5.82	0.115	2.32	0.0458	0.887
群勃龙	0.125	4.83	0.0787	3.17	0.0400	1.12
勃地酮	0.0958	4.48	0.0767	2.60	0.0384	1.57
氟甲睾酮	0.106	4.14	0.0700	2.40	0.0392	1.85

诺龙	0.131	6.55	0.0977	2.45	0.0444	0.715
雄烯二酮	0.149	5.24	0.0333	1.71	0.0325	1.51
炔诺酮	0.123	0.909	0.0737	1.24	0.0364	0.745
美雄酮	0.0942	2.83	0.0635	1.88	0.0405	0.713
睾酮	0.141	1.58	0.0578	3.53	0.0532	0.563
甲基炔诺酮	0.112	1.86	0.0414	2.14	0.0461	0.659
甲睾酮	0.160	2.27	0.0269	2.46	0.0472	1.54
甲羟孕酮	0.116	0.946	0.0147	3.65	0.0264	2.68
乙酸甲地孕酮	0.120	5.25	0.0172	5.61	0.0271	2.78
氯地孕酮乙酸酯	0.0622	4.03	0.0196	5.27	0.0116	1.56
甲羟孕酮乙酸酯	0.0862	6.54	0.0102	4.08	0.0169	2.51
孕酮	0.0658	4.99	0.0177	4.05	0.0138	2.04
达那唑	0.0566	5.09	0.0124	5.36	0.0168	2.74

1、低浓度: 除氟甲睾酮和达那唑浓度为 20 $\mu\text{g/L}$, 炔诺酮、甲基炔诺酮和氯地孕酮乙酸酯浓度为 10 $\mu\text{g/L}$, 其余物质浓度均为 2 $\mu\text{g/L}$;

2、中浓度: 除氟甲睾酮和达那唑浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, 炔诺酮、甲基炔诺酮和氯地孕酮乙酸酯浓度为 50 $\mu\text{g/L}$, 其余物质浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$;

3、高浓度: 除氟甲睾酮和达那唑浓度为 500 $\mu\text{g/L}$, 炔诺酮、甲基炔诺酮和氯地孕酮乙酸酯浓度为 250 $\mu\text{g/L}$, 其余物质浓度均为 50 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 检出限和定量限

为了考察仪器灵敏度, 配制如下浓度的标准测试样品 7 份 (见表 6), 平行进样 7 次, 色谱图如图 4 所示。由 7 次进样测定的标准偏差(S)计算出检出限和定量限, 此时检出限 $\text{MDL} = 3.14 \times S$, 定量限 $\text{LOQ} = 4 \times \text{MDL}$ 。测定结果如表 6 所示。

表 6. 17 种激素的检出限和定量限

No.	名称	浓度 ($\mu\text{g/L}$)	标准偏差 (S)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1	去甲雄烯二酮	1	0.076	0.24	0.96
2	群勃龙	1	0.062	0.19	0.76
3	勃地酮	1	0.060	0.19	0.76
4	氟甲睾酮	10	0.069	0.22	0.87
5	诺龙	1	0.054	0.17	0.68

6	雄烯二酮	1	0.089	0.28	1.12
7	炔诺酮	5	0.082	0.26	1.04
8	美雄酮	1	0.020	0.06	0.24
9	睾酮	1	0.043	0.14	0.54
10	甲基炔诺酮	5	0.11	0.34	1.36
11	甲睾酮	1	0.035	0.11	0.44
12	甲羟孕酮	1	0.060	0.19	0.76
13	乙酸甲地孕酮	1	0.10	0.31	1.24
14	氯地孕酮乙酸酯	5	0.071	0.22	0.88
15	甲羟孕酮乙酸酯	1	0.079	0.25	1.00
16	孕酮	1	0.059	0.19	0.76
17	达那唑	10	0.16	0.50	2.00

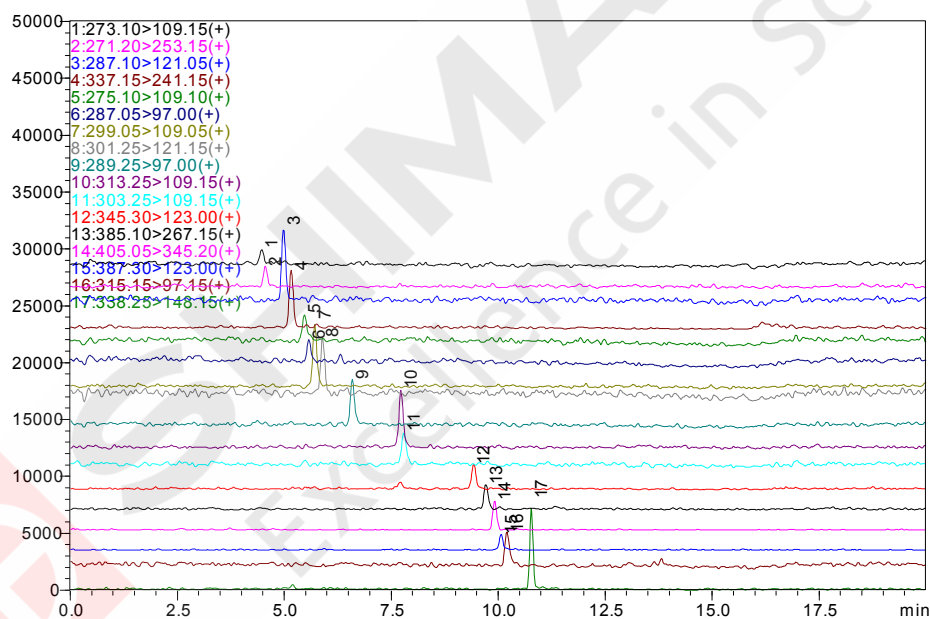


图 4. 标准测试样品的 MRM 色谱图 (浓度见表 6)

峰归属: 1、去甲雄烯二酮; 2、群勃龙; 3、勃地酮; 4、氟甲睾酮; 5、诺龙; 6、雄烯二酮; 7、炔诺酮;
8、美雄酮; 9、睾酮; 10、甲基炔诺酮; 11、甲睾酮; 12、甲羟孕酮; 13、乙酸甲地孕酮;
14、氯地孕酮乙酸酯; 15、甲羟孕酮乙酸酯; 16、孕酮; 17、达那唑

2.6 基质加标实验

图 5 为牛奶基质按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图, 由实验结果可知检测出上述 17 种激素中的孕酮。往牛奶基质中添加 17 种激素标样, 加标 MRM 色谱图如图 6 所示。牛奶

中 17 种激素检测与加标回收率结果见表 7。由信噪比的三倍计算得出该方法的定量限范围为 0.14-0.97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (见表 8)。

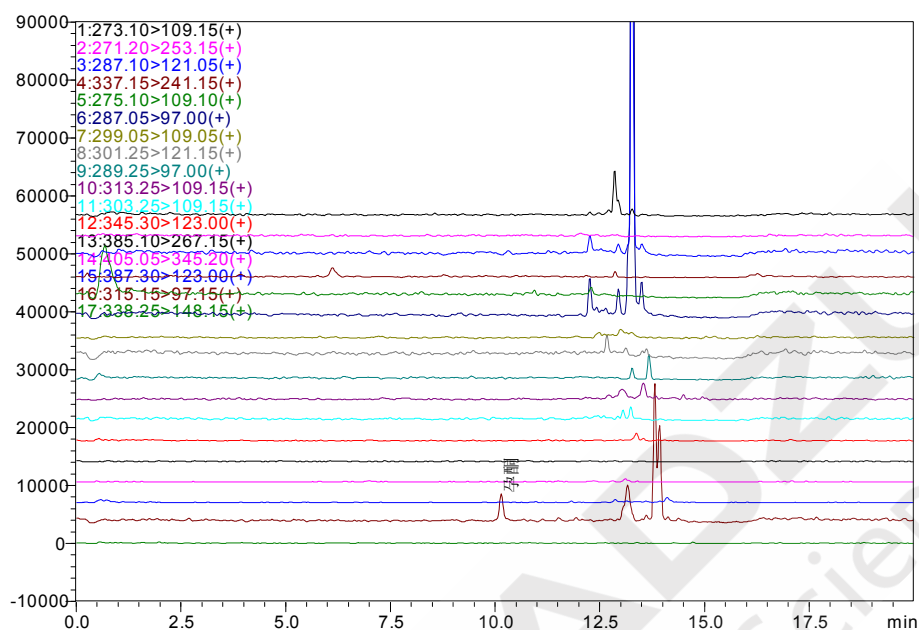


图 5. 牛奶基质的 MRM 色谱图

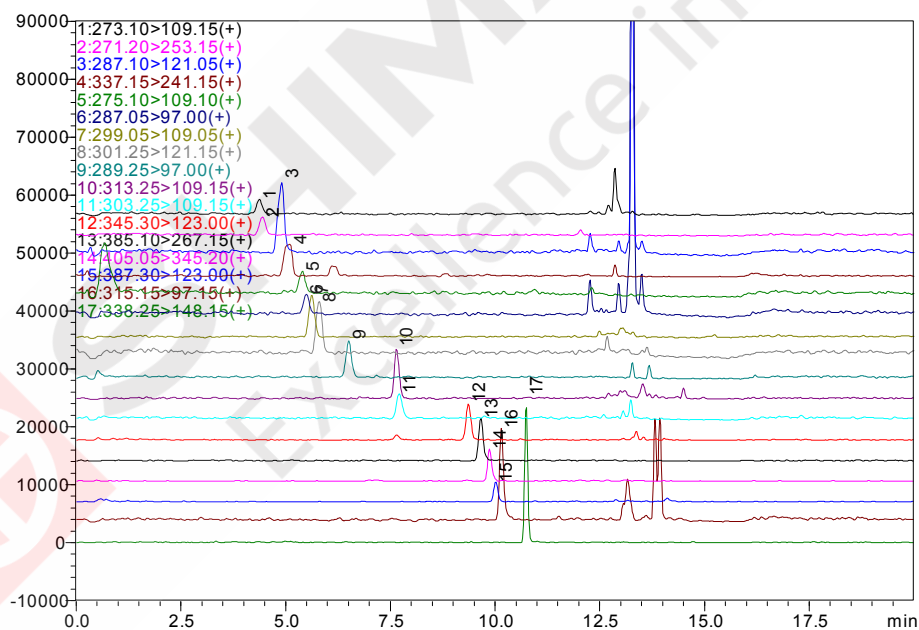


图 6. 牛奶加标的 MRM 色谱图 (浓度见表 7, 峰归属同图 4)

表 7. 牛奶中激素类药物检测与加标回收率结果

No.	名称	牛奶检测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	样品加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)
1	去甲雄烯二酮	N.D.	3.2	2.77	86.6
2	群勃龙	N.D.	3.2	2.39	74.7
3	勃地酮	N.D.	3.2	2.59	80.9
4	氟甲睾酮	N.D.	32	27.1	84.7
5	诺龙	N.D.	3.2	3.10	96.9
6	雄烯二酮	N.D.	3.2	3.00	93.8
7	炔诺酮	N.D.	16	10.5	65.6
8	美雄酮	N.D.	3.2	2.06	64.4
9	睾酮	N.D.	3.2	2.87	89.7
10	甲基炔诺酮	N.D.	16	10.9	68.1
11	甲睾酮	N.D.	3.2	2.25	70.3
12	甲羟孕酮	N.D.	3.2	3.55	110.9
13	乙酸甲地孕酮	N.D.	3.2	3.50	109.4
14	氯地孕酮乙酸酯	N.D.	16	14.5	90.6
15	甲羟孕酮乙酸酯	N.D.	3.2	3.30	103.1
16	孕酮	1.5	3.2	4.74	101.2
17	达那唑	N.D.	32	19.5	61.0

注: N.D.表示未检出

表 8. 方法检出限和定量限

No.	名称	样品加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	信噪比 (S/N)	方法检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	方法定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	去甲雄烯二酮	1.6	48	0.10	0.33
2	群勃龙	1.6	54	0.09	0.30
3	勃地酮	1.6	41	0.12	0.40
4	氟甲睾酮	16	168	0.29	0.97
5	诺龙	1.6	55	0.09	0.30

6	雄烯二酮	1.6	60	0.08	0.27
7	炔诺酮	8	140	0.17	0.57
8	美雄酮	1.6	89	0.05	0.17
9	睾酮	1.6	116	0.04	0.14
10	甲基炔诺酮	8	139	0.17	0.57
11	甲睾酮	1.6	96	0.05	0.17
12	甲羟孕酮	1.6	40	0.12	0.40
13	乙酸甲地孕酮	1.6	54	0.09	0.30
14	氯地孕酮乙酸酯	8	202	0.12	0.40
15	甲羟孕酮乙酸酯	1.6	56	0.09	0.30
16	孕酮	1.6	47	0.10	0.34
17	达那唑	16	171	0.28	0.93

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用快速测定牛奶中 17 种激素残留的分析方法。17 种激素线性范围宽，相关系数在 0.9974-0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.0102%~0.161% 和 0.563%~6.55% 之间，仪器精密度良好。牛奶基质加标回收率范围为 61.00%-110.9%，方法定量限范围为 0.14~0.97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，测定限低于国家标准 GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》。实验结果表明该方法灵敏度高，可以满足牛奶中激素类药物的检测需求。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法

测定奶粉中的7种糖皮质激素

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用快速测定奶粉中的糖皮质激素的方法。样品经提取后, 用超高效液相色谱 LC-30A 分离, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。7 种样品在 2 分钟内得到快速分离和检测。7 种样品在 0.5~40 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好, 标准曲线的相关系数均在 0.999 以上; 对 2 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 40 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验, 连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 3.860% 和 0.583% 以下, 系统精密度良好; 对于奶粉中的波尼松、波尼松龙、氢化可的松、地塞米松、倍氯米松和甲基波尼松, 方法定量限为 0.4 $\mu\text{g/kg}$; 对于乙酸氟氢可的松方法定量限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

关键词: 糖皮质激素 奶粉 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

糖皮质激素 (Glucocorticoid), 学名叫做“肾上腺皮质激素”, 是由肾上腺皮质分泌的一类甾体激素, 具有调节糖、脂肪、蛋白质的生物合成和代谢的作用, 还具有抗炎作用, 可用于一般的抗生素或消炎药所不及的病症, 如 SARS、败血症等。称其为“糖皮质激素”是因为其调节糖类代谢的活性最早为人们所认识。最近在国内发生的奶粉疑致“婴儿性早熟”事件成为继 2008 年三聚氰胺以来乳制品行业又一热点食品安全事件。2002 年我国农业部第 235 号公告中已经禁止使用群勃龙等化学合成类激素物质, 并规定在动物性食品中不得检出。同时欧盟第 96/22/EC 指令、美国食品药品监督管理局 (FDA)、日本肯定列表也禁止在动物源性食品中使用激素类药物。本文根据《GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱-质谱质谱法》, 使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用, 建立了快速准确测定奶粉中糖皮质激素的方法, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器： LC-30A 系统

色 谱 柱： Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D.×50 mm L., 1.6 μm

流 动 相：， A—0.1%甲酸水； B—乙腈

流 速： 0.4 mL/min

进样体积： 10 μL

柱 温： 40℃

洗脱方式： 梯度洗脱， B 相初始浓度为 60%， 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	70
2.01	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.51	Pumps	Pump B Conc.	60
3.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器： LCMS-8040

离子源： ESI(-)

离子源接口电压： -3.5 kV

雾化气： 氮气 3.0 L/min

干燥气： 氮气 15 L/min

碰撞气： 氩气

脱溶剂管温度： 250℃

加热模块温度： 400℃

扫描模式： 多反应监测 (MRM)

驻留时间： 10 ms

延迟时间： 3 ms

MRM 参数： 见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	波尼松	403.2	327.2	14.0	15.0	21.0
			357.2*	14.0	10.0	25.0
2	波尼松龙	405.2	329.2	14.0	20.0	22.0
			359.3*	14.0	15.0	24.0
3	氢化可的松	407.2	331.2	15.0	20.0	22.0
			361.2*	15.0	10.0	25.0
4	地塞米松	437.2	361.2	16.0	20.0	23.0
			391.3*	16.0	15.0	27.0
5	倍氯米松	453.2	377.2	10.0	15.0	25.0
			407.2*	10.0	15.0	28.0
6	乙酸氟氢可的松	467.3	421.3	17.0	15.0	28.0
			349.2*	17.0	25.0	24.0
7	甲基波尼松	419.3	343.2	15.0	16.0	23.0
			294.5*	15.0	44.0	29.0

*表示定性离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

用乙腈配制 100 µg/L 的混合标准中间溶液, 用 50%乙腈水稀释成浓度为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40 µg/L 的标准工作液。

样品前处理方法:

同国标《GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱-质谱质谱法》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

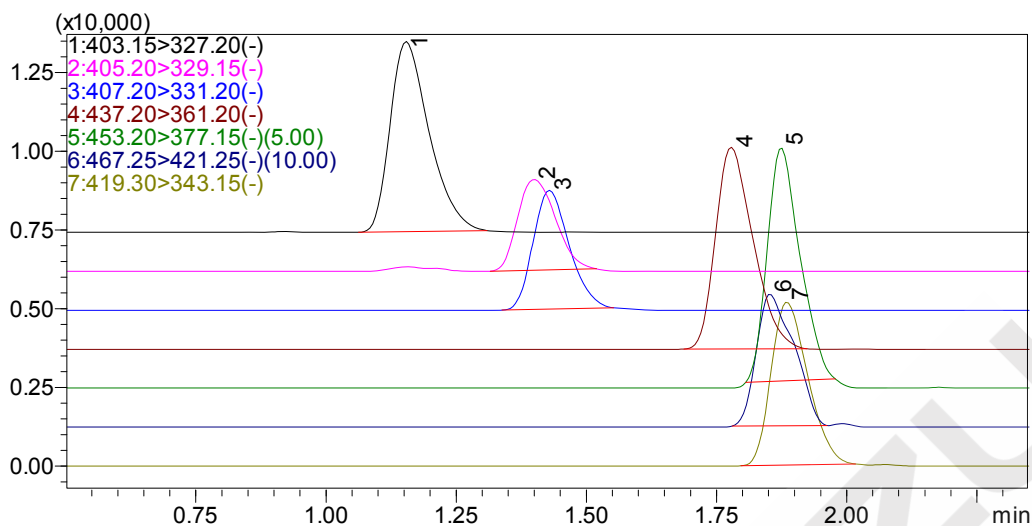


图 1 10 µg/L 标准样品的 MRM 色谱图

(1: 波尼松; 2: 波尼松龙; 3: 氢化可的松; 4: 地塞米松; 5: 倍氯米松; 6: 乙酸氟氢可的松; 7: 甲基波尼松)

2.2 线性关系

将浓度为 0.5, 1.0, 2.0, 5, 10, 20, 40 µg/L 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线如图 2~8 所示; 所得校准曲线线性关系良好, 线性方程及相关系数见表 3。

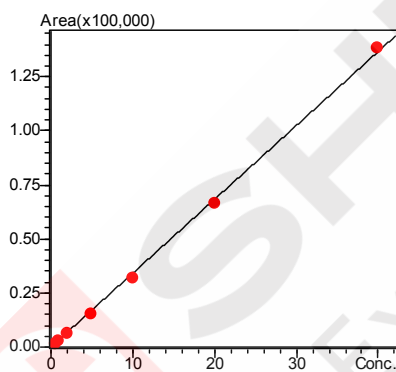


图 2 波尼松的标准工作曲线

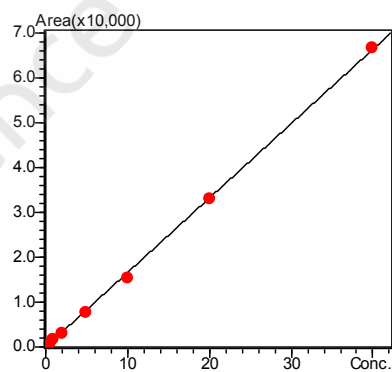


图 3 波尼松龙的标准工作曲线

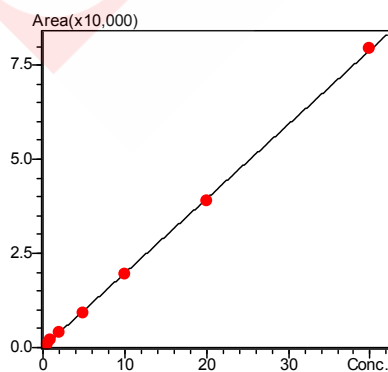


图 4 氢化可的松的标准工作曲线

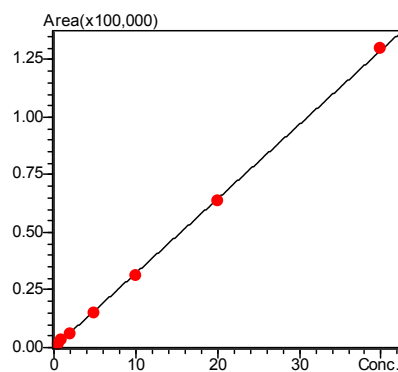


图 5 地塞米松的标准工作曲线

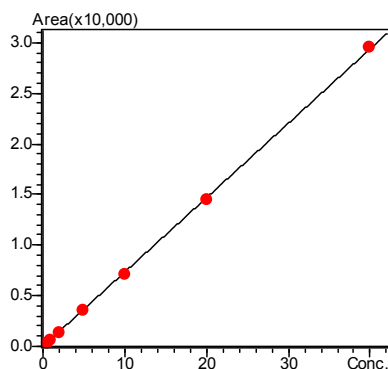


图 6 倍氯米松的标准工作曲线

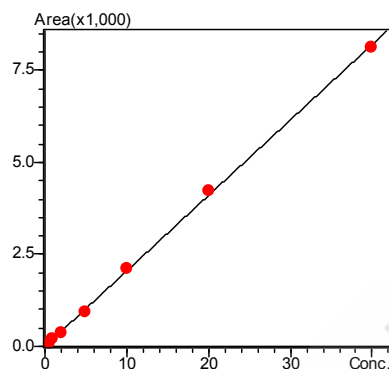


图 7 乙酸氟氢可的松的标准工作曲线

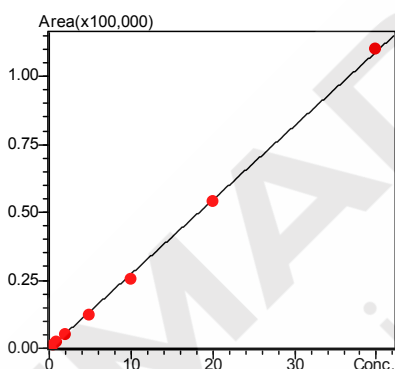


图 8 甲基波尼松的标准工作曲线

表 3 7 种糖皮质激素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r
1	波尼松	$Y = (3416.53)X + (0)$	0.9996
2	波尼松龙	$Y = (1657.36)X + (0)$	0.9998
3	氢化可的松	$Y = (1975.28)X + (0)$	0.9998
4	地塞米松	$Y = (3228.82)X + (0)$	0.9999
5	倍氯米松	$Y = (734.315)X + (0)$	0.9999
6	乙酸氟氢可的松	$Y = (205.149)X + (0)$	0.9996
7	甲基波尼松	$Y = (2729.61)X + (0)$	0.9998

2.3 精密度实验

对 2、10、40 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重现性结果如表 4 所示。结果显示：3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 1.496%~3.860%和 0.102%~0.583%之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重现性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (2 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (40 $\mu\text{g/L}$)	
	Area	R.T	Area	R.T	Area	R.T
波尼松	2.699	0.426	1.615	0.140	1.496	0.209
波尼松龙	2.652	0.535	1.932	0.105	2.389	0.130
氢化可的松	3.317	0.183	2.619	0.204	2.028	0.130
地塞米松	2.343	0.224	2.404	0.030	2.646	0.115
倍氯米松	3.826	0.139	2.509	0.137	3.704	0.154
乙酸氟氢可的松	3.860	0.583	2.095	0.364	2.832	0.212
甲基波尼松	2.690	0.209	2.826	0.417	2.165	0.102

2.4 灵敏度实验

为了考察方法的灵敏度，在奶粉空白样品中添加 0.4 $\mu\text{g/kg}$ 和 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 的混合标样，得到色谱图如图 9~11 所示。从图 9 可以看出奶粉样品检出微量的氢化可的松，浓度约为 0.03 $\mu\text{g/kg}$ 。对于奶粉中的波尼松，波尼松龙，氢化可的松，地塞米松，倍氯米松和甲基波尼松方法定量限为 0.4 $\mu\text{g/kg}$ ；对于乙酸氟氢可的松方法定量限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ ，满足《GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱-质谱质谱法》中的要求。

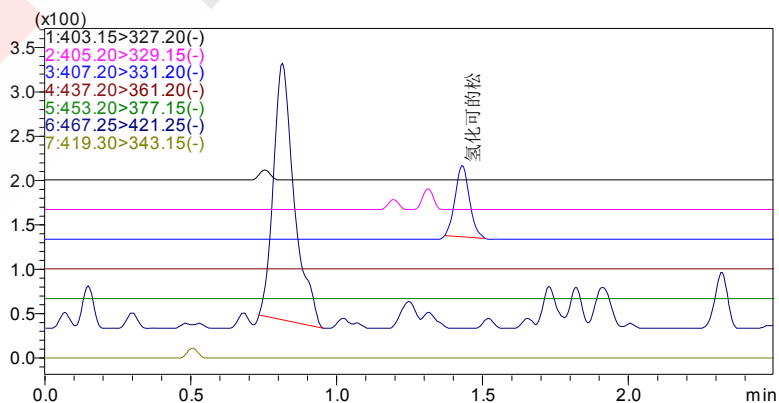


图 9 奶粉样品的 MRM 色谱图

(1: 波尼松; 2: 波尼松龙; 3: 氢化可的松; 4: 地塞米松; 5: 倍氯米松; 6: 乙酸氟氢可的松; 7: 甲基波尼松)

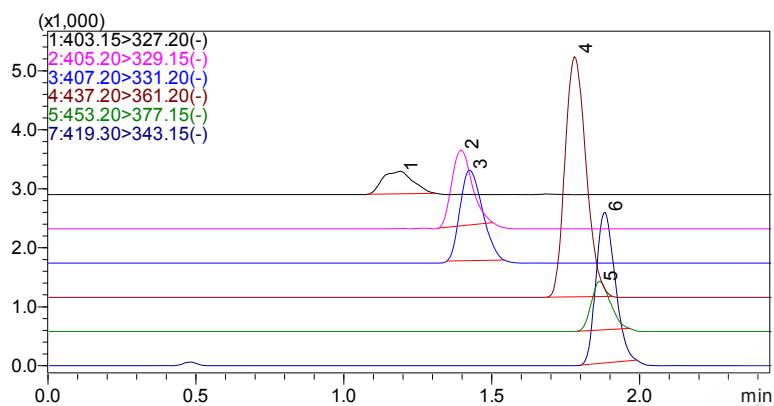


图 10 0.4 µg/kg 奶粉加标样品的 MRM 色谱图

(1: 波尼松; 2: 波尼松龙; 3: 氢化可的松; 4: 地塞米松; 5: 倍氯米松; 6: 甲基波尼松)

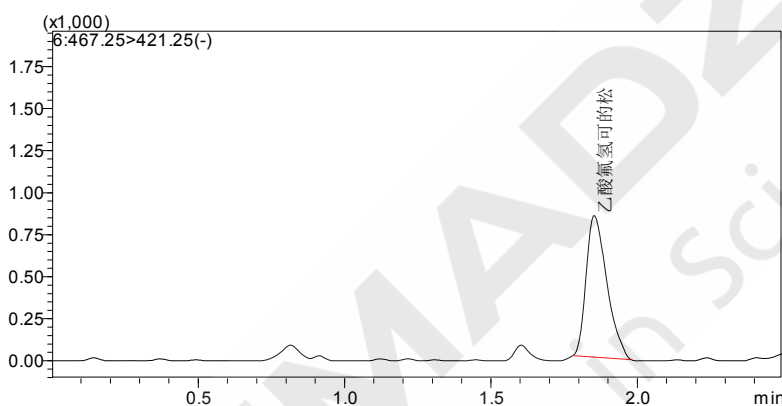


图 11 1.0 µg/kg 乙酸氟氢可的松加标样品的 MRM 色谱图

3.结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定奶粉中 7 种糖皮质激素的方法。该方法分析速度快，精密度良好；校准曲线在 0.5~40 µg/L 范围内的相关系数均在 0.999 以上；对于奶粉中的波尼松，波尼松龙，氢化可的松，地塞米松，倍氯米松和甲基波尼松方法定量限为 0.4 µg/kg；对于乙酸氟氢可的松方法定量限为 1.0 µg/kg，满足《GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱-质谱质谱法》中的要求。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定牛奶中的8种镇定剂残留

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中 8 种镇定剂残留的方法。该方法在 15 min 内完成氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、哌唑心安八种常见镇定剂的分离。在牛奶基质中甲苯噻嗪、氯丙嗪、丙酰二甲氨基、乙酰丙嗪在 0.1~500 ng/mL，阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、哌唑心安在 0.1~100 ng/mL 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.996 以上。用牛奶基质配制浓度为 2 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL 的标准溶液考察重复性，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.38%和 0.70~3.02%之间，仪器精密度良好。牛奶中八种镇定剂的定量限在 0.019~0.052 ng/mL 之间，检出限在 0.0057~0.016 ng/mL 之间，定量限和检出限均优于《GBT 22993-2008 牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定》的检测标准。

关键词： 三重四极杆质谱 牛奶 镇定剂

氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、哌唑心安八种药物是一类广谱镇定剂，该类物质作为麻醉剂具有止痛、肌肉松弛的作用。该类镇定剂因其抗精神病、抑制躁狂、兴奋、跳动、镇吐作用而广泛地用于动物。大量的药物成份潜伏于牛奶中并被人吸收。而这类药物有导致过敏反应，可引起体位性低血压、心悸、运动障碍、肝损害、恶性综合征，诱变致癌的副作用。因此，在世界各国对食用动物中镇定剂类药物残留量均有严格的限量要求。所以，建立一种高灵敏度的测定牛奶中镇定剂类药物的残留定量和定性方法是十分必要的。测定镇定剂类药物在动物组织中残留的分析方法比较多，而测定牛奶中镇定剂类药物残留的方法较少，主要只限于高效液相色谱法。本研究参照《GBT 22993-2008 牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定》使用岛津高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用，建立了一种测定牛奶中 8 种常见镇定剂（氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、哌唑心安）的方法，供相关行业检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D.× 150 mm L., 5 μm)

流动相: A: 0.01 mol/L 甲酸铵水溶液; B: 乙腈

流速: 0.32 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 30%, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	30
9.00	Pumps	Pump B Conc.	60
9.01	Pumps	Pump B Conc.	80
10.00	Pumps	Pump B Conc.	80
10.01	Pumps	Pump B Conc.	30
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子

加热模块温度: 450°C

脱溶剂管温度: 250°C

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 15.0 L/min

离子源电压: 4.5 kV

扫描模式：多反应监测(MRM)

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	甲苯噻嗪	221.1	90.1*	-30	-22	-16
			164.1	-30	-26	-29
2	咪唑心安	299.1	116.2*	-16	-21	-21
			222.1	-16	-20	-23
3	阿扎哌醇	330.2	121.1*	-25	-25	-21
			312.2	-25	-15	-21
4	阿扎哌隆	328.2	165.1*	-27	-21	-16
			121.2	-27	-23	-21
5	乙酰丙嗪	327.1	58.1*	-17	-36	-22
			86.2	-17	-21	-15
6	氟哌啶醇	376.1	123.1*	-29	-42	-21
			165.1	-29	-23	-30
7	丙酰二甲氨	341.1	58.1*	-18	-39	-22
			86.2	-18	-21	-15
8	氯丙嗪	319.1	58.1*	-17	-38	-22
			86.2	-17	-21	-15

*表示定量离子

1.3 标准工作溶液的配制

标准物质：共 8 种，氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、咪唑心安。

标准工作溶液配制：用无水乙醇配制 500 µg/mL 的混合标准贮备液，用甲醇-水（1:1）溶液稀释成 5 µg/mL 的混合标准溶液。

1.4 标准曲线的配制

前处理方法采用《GBT 22993-2008 牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定》的第 7 部

分。

牛奶前处理液用氮气吹干后再用甲醇-水(1:1)溶液复溶,该复溶液过0.22 μm有机滤膜后再用其将5 μg/mL的标准溶液稀释成500 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL、0.1 ng/mL系列浓度的混合标准工作液。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

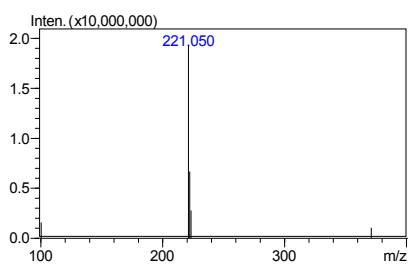


图1 甲苯噻嗪一级质谱图

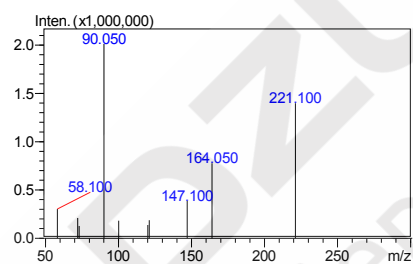


图2 甲苯噻嗪产物离子扫描图(CE值-25 V)

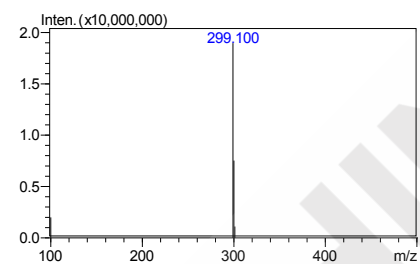


图3 唑啉心安一级质谱图

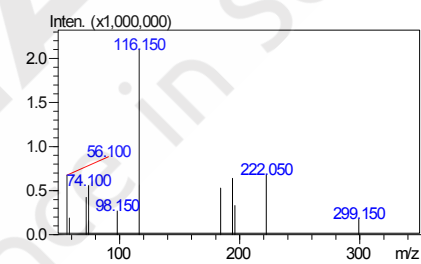


图4 唑啉心安产物离子扫描图(CE值-25V)

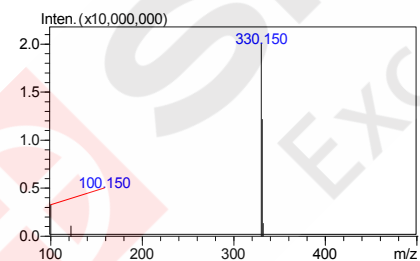


图5 阿扎哌醇一级质谱图

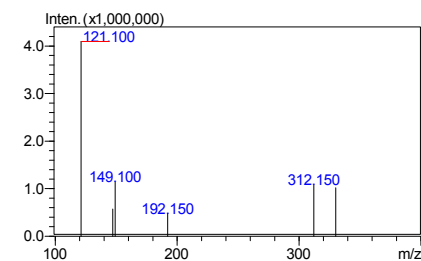


图6 阿扎哌醇产物离子扫描图(CE值-20V)

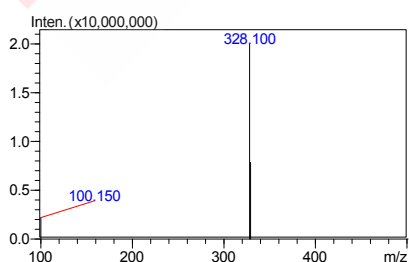


图7 阿扎哌隆一级质谱图

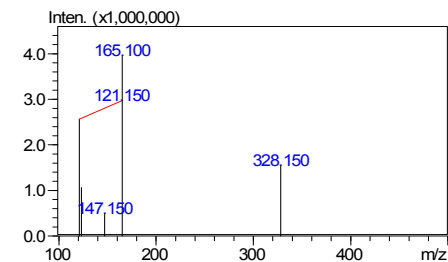


图8 阿扎哌隆产物离子扫描图(CE值-20V)

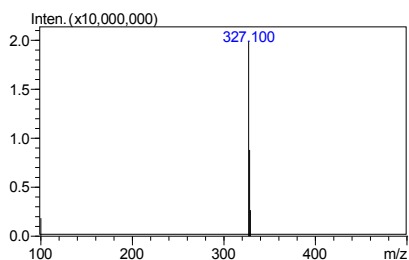


图9 乙酰丙嗪一级质谱图

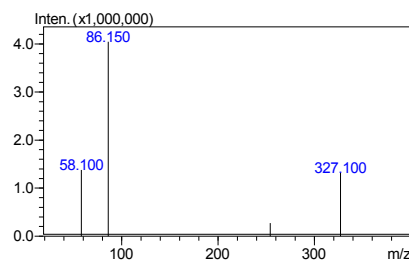


图10 乙酰丙嗪产物离子扫描图(CE值-20V)

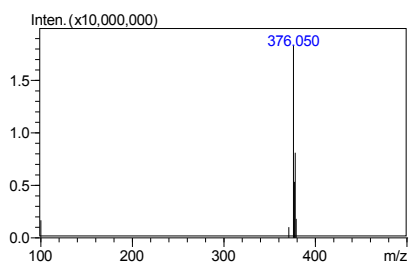


图11 氟哌啶醇一级质谱图

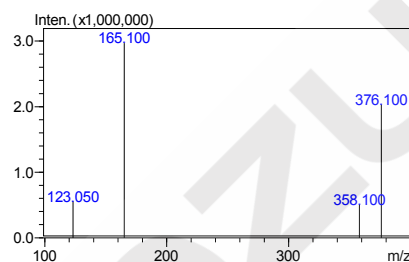


图12 氟哌啶醇产物离子扫描图(CE值-20V)

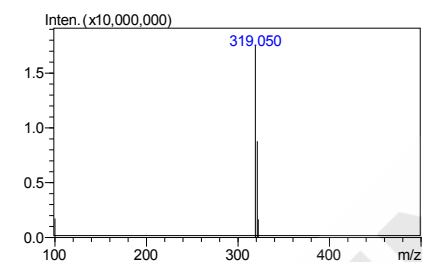


图13 氯丙嗪一级质谱图

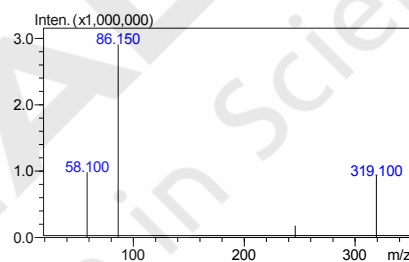


图14 氯丙嗪产物离子扫描图(CE值-25V)

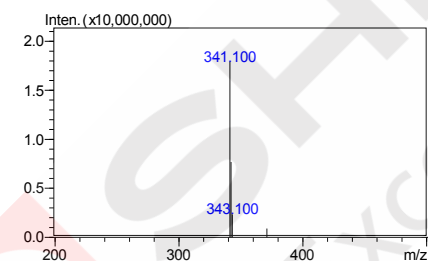


图 15 丙酰二甲氨一级质谱图

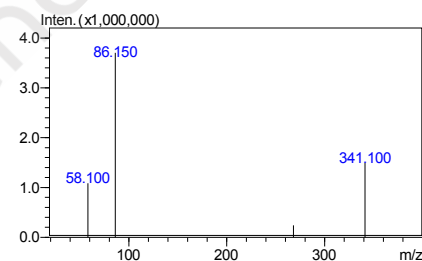


图 16 丙酰二甲氨产物离子扫描图(CE 值-20V)

2.2 牛奶基质加标样品的 MRM 色谱图

空白牛奶样品的色谱图如图 17 所示，加标样品色谱图如图 18 所示。

2.3 线性关系

将 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 系列浓度的标准溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 19 至图 26 所示。甲苯噻嗪、氯丙嗪、丙酰二甲氨、乙酰丙嗪在 0.1~500 ng/mL，阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、吡唑心安在 0.1~100 ng/mL 范围内线

性良好。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

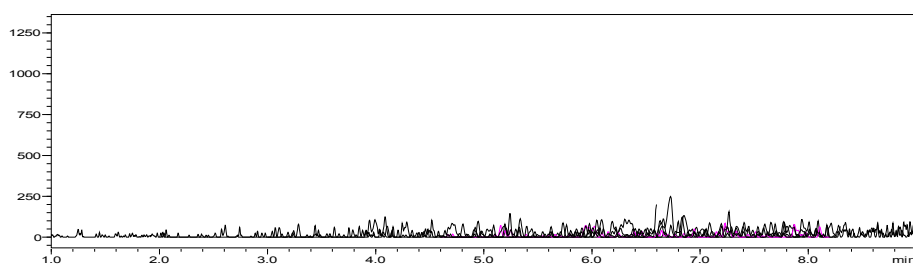


图 17 牛奶空白基质样品的 MRM 色谱图

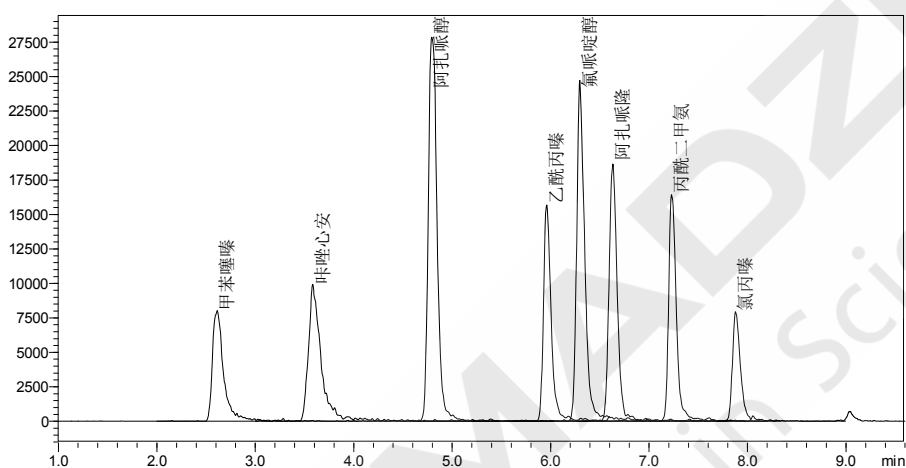


图 18 八种镇定剂牛奶基质加标样品的 MRM 色谱图 (0.5 ng/mL)

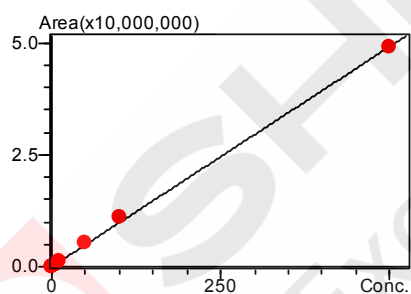


图 19 甲苯噻嗪标准曲线

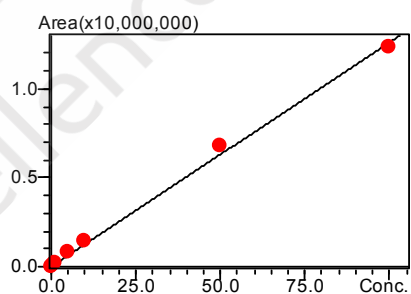


图 20 咪唑心安标准曲线

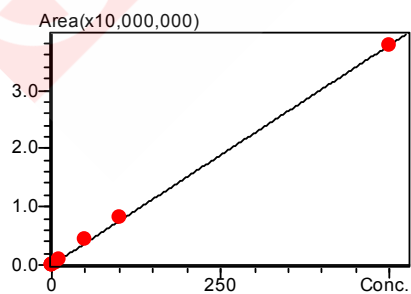


图 21 氯丙嗪标准曲线

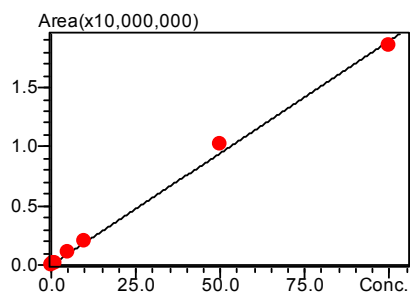


图 22 阿扎哌隆标准曲线

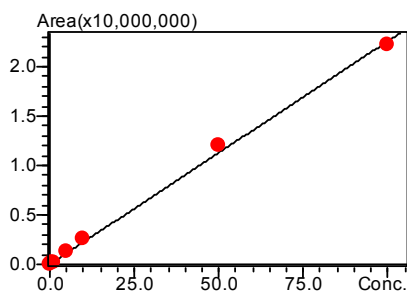


图 23 氟哌啶醇标准曲线

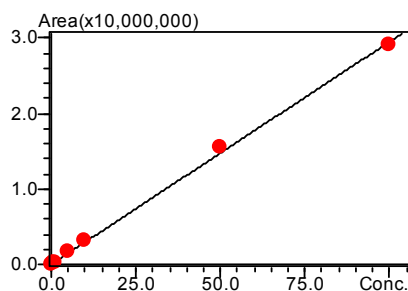


图 24 阿扎哌醇标准曲线

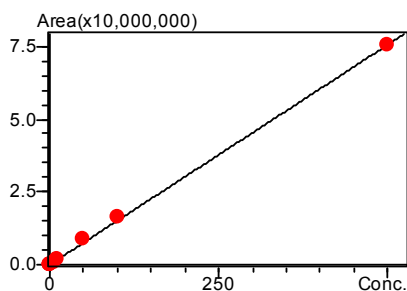


图 25 丙酰二甲氨标准曲线

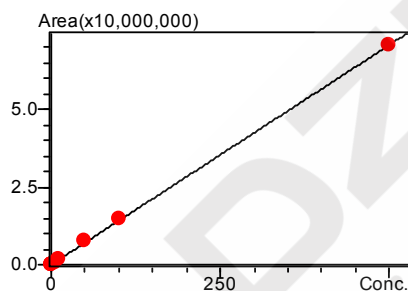


图 26 乙酰丙嗪标准曲线

表 3 八种镇定剂的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r
1	甲苯噻嗪	$Y = (98221.7)X$	0.1~500	0.9997
2	唑啉心安	$Y = (128636)X$	0.1~100	0.9963
3	氯丙嗪	$Y = (75513.2)X$	0.1~500	0.9998
4	阿扎哌隆	$Y = (189486)X$	0.1~100	0.9987
5	氟哌啶醇	$Y = (226102)X$	0.1~100	0.9991
6	阿扎哌醇	$Y = (295473)X$	0.1~100	0.9991
7	丙酰二甲氨	$Y = (151240)X$	0.1~500	0.9998
8	乙酰丙嗪	$Y = (141570)X$	0.1~500	0.9999

2.4 精密度实验

对 2 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.38%和 0.70~3.02%之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (2 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
甲苯噻嗪	0.38	1.76	0.31	0.70	0.30	0.85
咪唑心安	0.25	1.85	0.29	0.86	0.37	0.99
氯丙嗪	0.06	2.77	0.08	2.64	0.07	2.13
阿扎哌隆	0.14	2.15	0.12	1.69	0.13	1.02
氟哌啶醇	0.12	3.02	0.11	3.01	0.13	2.86
阿扎哌醇	0.23	1.60	0.21	1.89	0.28	1.41
丙酰二甲氨	0.09	1.38	0.09	0.80	0.11	0.94
乙酰丙嗪	0.15	2.28	0.13	0.77	0.14	1.04

2.5 灵敏度分析

用牛奶基质稀释得到浓度为0.1 ng/mL的溶液进样分析，八种镇定剂的最低检出限 (S/N=3, LOD表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ表示) 结果如表5所示。

表 5 八种物质的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	甲苯噻嗪	22.51	0.013	0.044
2	咪唑心安	28.36	0.011	0.035
3	氯丙嗪	19.05	0.016	0.052
4	阿扎哌隆	35.36	0.0085	0.028
5	氟哌啶醇	52.48	0.0057	0.019
6	阿扎哌醇	47.85	0.0063	0.021
7	丙酰二甲氨	40.77	0.0074	0.025
8	乙酰丙嗪	32.94	0.0091	0.030

2.6 基质加标实验

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后加混标至浓度为 4 ng/mL，平行 3 份样品测定回收率和 RSD。具体结果如表 6，样品加标回收率在 90.75 ~ 109.25%之间。

表 6 加标样的回收率结果 (n=3)

No.	样品名称	实测平均值 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD%
1	甲苯噻嗪	4.13	103.25	1.56
2	唑啉心安	4.31	107.82	1.31
3	氯丙嗪	3.63	90.75	2.06
4	阿扎哌隆	4.37	109.25	2.39
5	氟哌啶醇	4.25	106.25	3.69
6	阿扎哌醇	4.24	106.00	1.18
7	丙酰二甲氨	3.89	97.25	0.58
8	乙酰丙嗪	3.72	93.00	1.24

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定牛奶中八种镇定剂的方法。该方法在 15 min 内完成氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、唑啉心安八种常见镇定剂的分离，线性范围甲苯噻嗪、氯丙嗪、丙酰二甲氨、乙酰丙嗪为 0.1~500 ng/mL，阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、唑啉心安为 0.1~100 ng/mL，相关系数均在 0.996 以上。用牛奶基质配制 2 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL 的标准溶液考察重复性，连续 6 次进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.38% 和 0.70~3.02% 之间，仪器精密度良好。牛奶中八种镇定剂的定量限在 0.019~0.052 ng/mL 之间，检出限在 0.0057~0.016 ng/mL 之间，定量限和检出限均优于《GBT 22993-2008 牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定》的检测标准。该方法具有灵敏高、重复性好的特点，适合牛奶中镇定剂的高灵敏度检测。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定牛奶中的6种 β -内酰胺类抗生素残留

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中 6 种常见 β -内酰胺类抗生素残留的检测方法。该方法在 2.5 min 内完成青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素六种常见 β -内酰胺类抗生素的分离。在牛奶基质中青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素在 0.2~500 ng/mL 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.996 以上。用牛奶基质配制浓度为 5 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL 的标准溶液考察重复性，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.12%和 2.43~4.96%之间，仪器精密度良好。牛奶中 6 种常见 β -内酰胺类抗生素的定量限在 0.038~0.085 ng/mL 之间，检出限在 0.011~0.025 ng/mL 之间。

关键词： 三重四极杆质谱 牛奶 β -内酰胺类抗生素

β -内酰胺类抗生素(β -lactams)是指化学结构中具有 β -内酰胺环的一类抗生素，包括临床常用的青霉素与头孢菌素。其化学结构特点，特别是侧链的改变形成了许多不同抗菌谱和抗菌作用的抗生素。此类药物广泛用于产肉动物的呼吸、肠胃、泌尿生殖和皮肤病毒感染的治疗和预防，它们的使用会引起动物源性食品中兽药残留的存在，这种残留将对青霉素过敏的人产生健康危害。更为重要的是，抗生素被长期低剂量摄入健康人肠道，会破坏健康人肠道正常菌群环境，导致人体免疫力的降低使用后会动物体内有一定的残留，食用含有 β -内酰胺类抗生素残留的食品后会危害人们身体健康，已有人食用牛奶后引起青霉素过敏，而且长期使用会产生抗药性。为确保消费者的食品安全，世界各地均对牛奶中上述各种青霉素有允许最大残留量的要求。本研究参照《SN/T2050-2008 进出口动物源食品中 14 种 β -内酰胺类抗生素残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法》使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用建立牛奶中的 6 种常见 β -内酰胺类抗生素残留的检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC

柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 1.6 μm)

流动相: A: 0.1%甲酸水溶液; B:乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40℃

进样量: 10 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.80	Pumps	Pump B Conc.	65
2.00	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.51	Pumps	Pump B Conc.	20
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子

加热模块温度: 500℃

脱溶剂管温度: 300℃

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 15.0 L/min

离子源电压: 4.5 kV

扫描模式: 多反应监测(MRM)

MRM 参数: 见表 2

1.3 标准工作溶液的配制

标准物质: 共 6 种, 青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、青霉素。

标准工作溶液配制：用乙腈-水（1:1）配制 1 mg/mL 的标准贮备液，用乙腈-水（2:8）溶液稀释成 5 µg/mL 的混合标准溶液。

表 2 样品 MRM 参数及信息

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)	英文名	CAS
青霉素G	335.1	160.00*	-23.0	-10.0	-15.0	peillin G	61-33-6
		176.20	-23.0	-11.0	-11.0		
青霉素 V	351.20	160.10*	-26.0	-11.0	-28.0	Penicillin V	87-08-1
		114.10	-25.0	-29.0	-11.0		
苯唑青霉素	402.20	160.10*	-29.0	-15.0	-30.0	Proctaphlin	1173-88-2
		243.10	-29.0	-14.0	-25.0		
乙氧萘青霉素	414.90	199.10*	-20.0	-14.0	-20.0	Nafcillin	7177-50-6
		255.90	-20.0	-16.0	-27.0		
邻氯青霉素	436.10	277.10*	-23.0	-15.0	-30.0	Cloxacillin	7081-44-9
		160.10	-16.0	-15.0	-30.0		
双氯青霉素	470.00	160.00*	-24.0	-15.0	-16.0	Dicloxacillin	343-55-5
		310.90	-24.0	-13.0	-21.0		

*表示定量离子

1.4 标准曲线的配制

牛奶前处理液用氮气吹干后再用乙腈-水（2:8）溶液复溶，该复溶液过 0.22 µm 有机滤膜后再用其将 5 µg/mL 的标准溶液稀释成 500 ng/mL、200 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0.2 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

前处理方法采用《SN/T2050-2008 进出口动物源食品中 14 种 β-内酰胺类抗生素残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法》的第 7 部分。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

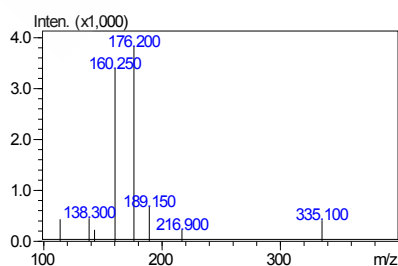


图1 青霉素G一级质谱图

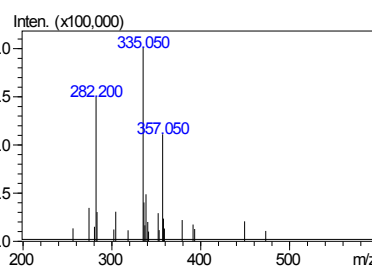


图2 青霉素G产物离子扫描图(CE值-15 V)

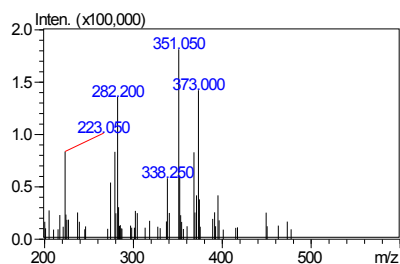


图3 青霉素V一级质谱图

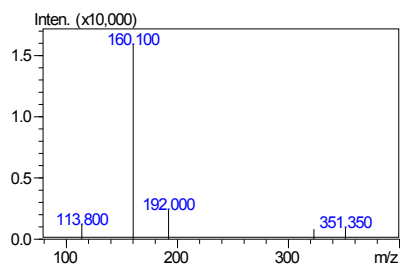


图4 青霉素V产物离子扫描图(CE值-10 V)

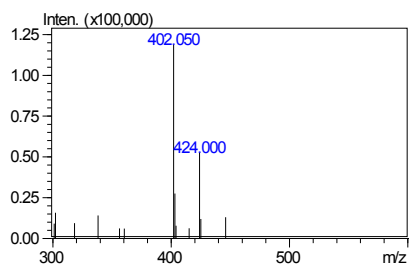


图5 苯唑青霉素一级质谱图

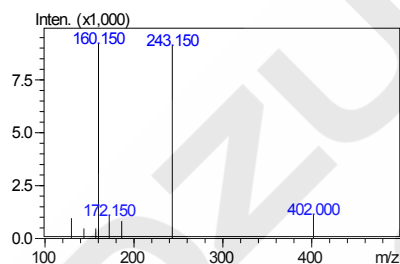


图6 苯唑青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

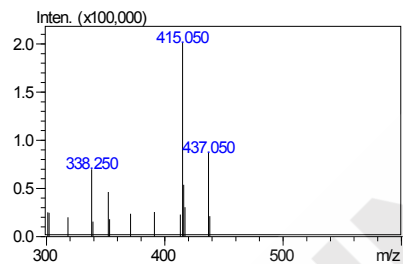


图7 乙氧萘青霉素一级质谱图

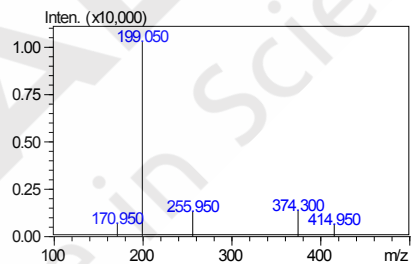


图8 乙氧萘青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

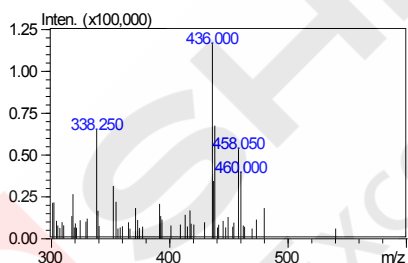


图9 邻氯青霉素一级质谱图

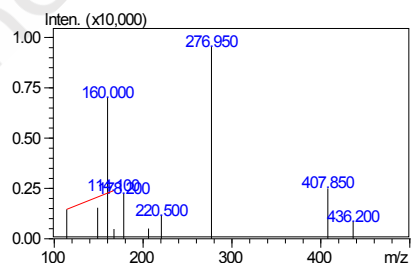


图10 邻氯青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

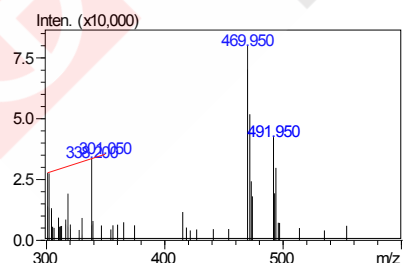


图11 双氯青霉素一级质谱图

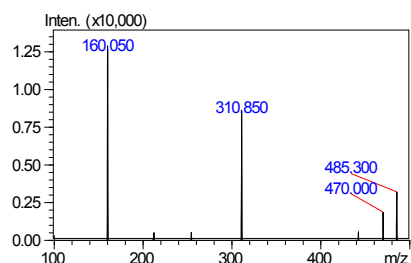


图12 双氯青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

2.2 牛奶基质加标样品的 MRM 色谱图

空白牛奶样品的色谱图如图 13 所示，加标样品色谱图如图 14 所示。

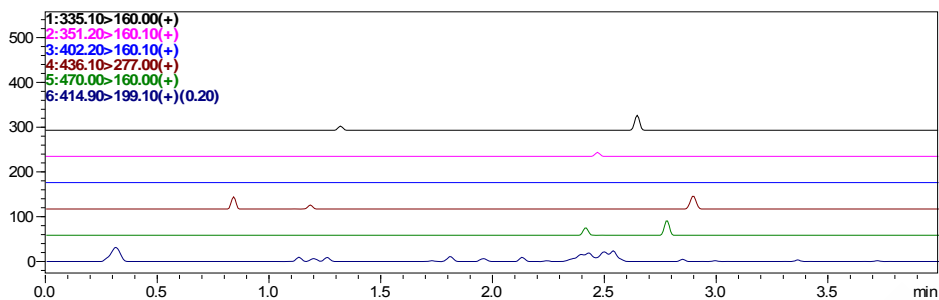


图 13 牛奶空白基质样品的 MRM 色谱图

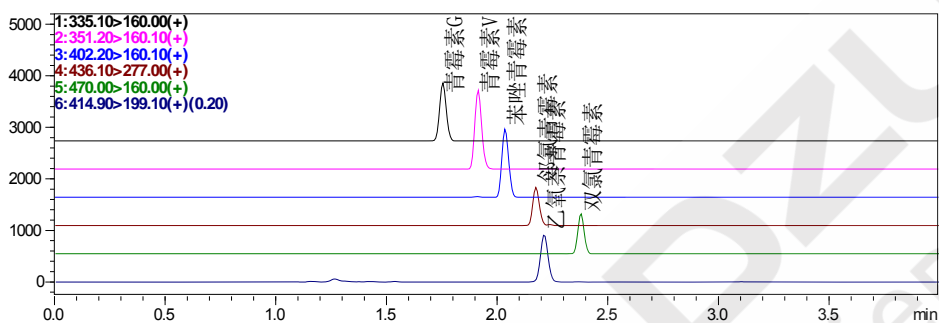


图 14 基质加标样品的 MRM 色谱图 (1 ng/mL)

2.3 线性关系

将 0.2 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 系列浓度的标准溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 15 至图 20 所示。青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉在 0.2~500 ng/mL 范围内校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

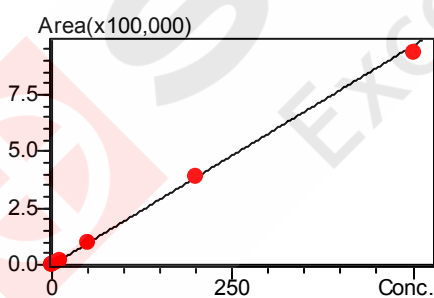


图 15 青霉素 G 标准曲线

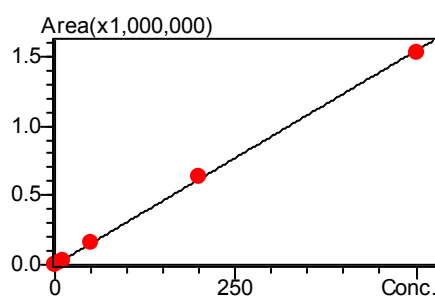


图 16 青霉素 V 标准曲线

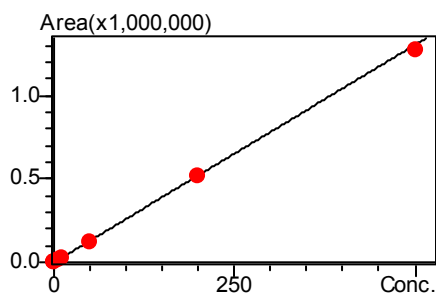


图 17 苯唑青霉素标准曲线

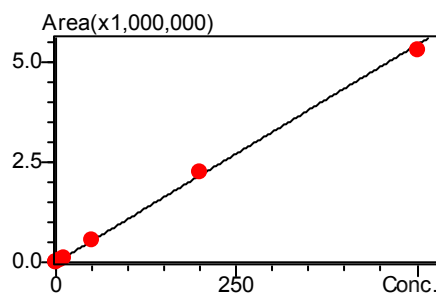


图 18 乙氧萘青霉素标准曲线

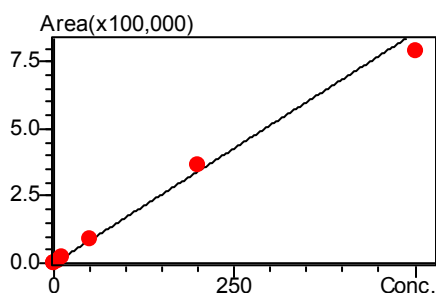


图 19 邻氯青霉素标准曲线

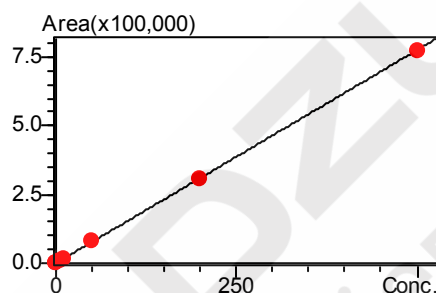


图 20 双氯青霉素标准曲线

表 3 六种 β -内酰胺类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r
1	青霉素 G	$Y = (1929.66)X + (-100.168)$	0.2~500	0.9979
2	青霉素 V	$Y = (3084.31)X + (227.681)$	0.2~500	0.9999
3	苯唑青霉素	$Y = (2606.83)X + (-112.456)$	0.2~500	0.9978
4	乙氧萘青霉素	$Y = (10875.9)X + (229.853)$	0.2~500	0.9997
5	邻氯青霉素	$Y = (1715.38)X + (22.3400)$	0.2~500	0.9962
6	双氯青霉素	$Y = (1551.58)X + (68.1587)$	0.2~500	0.9990

2.4 精密度实验

对 5 ng/mL、50 ng/mL 和 200 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.12%和 2.43~4.96%之间，仪器精密度良好。

2.5 灵敏度分析

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后稀释混标得到浓度为 0.2 ng/mL 的溶液进样分析，六种 β -内酰胺类抗生素的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 5 所示。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (5 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)		RSD% (200 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
青霉素 G	0.10	4.96	0.12	2.43	0.07	2.85
青霉素 V	0.08	4.65	0.10	3.76	0.08	4.91
苯唑青霉素	0.09	4.67	0.09	4.64	0.06	3.99
乙氧萘青霉素	0.07	2.47	0.06	2.66	0.08	2.98
邻氯青霉素	0.08	4.02	0.08	3.33	0.06	2.26
双氯青霉素	0.08	4.76	0.06	3.17	0.03	3.55

表 5 六种 β -内酰胺类抗生素的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	青霉素 G	23.62	0.025	0.085
2	青霉素 V	30.21	0.020	0.066
3	苯唑青霉素	29.25	0.021	0.068
4	乙氧萘青霉素	53.19	0.011	0.038
5	邻氯青霉素	36.70	0.017	0.055
6	双氯青霉素	32.94	0.018	0.061

2.6 基质加标实验

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后加混标至 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平行 3 份样品测定回收率。具体结果如表 6，样品加标回收率在 96.84 ~ 105.60% 之间。

表 6 加标样的回收率结果 (n=3)

No.	样品名称	实测平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)
1	青霉素 G	1.0560	105.60
2	青霉素 V	1.0250	102.50
3	苯唑青霉素	0.9684	96.84
4	乙氧萘青霉素	1.0032	100.32
5	邻氯青霉素	1.0362	103.62
6	双氯青霉素	1.0500	105.00

3. 结论

本应用建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定牛奶中六种 β -内酰胺类抗生素的方法。该方法在 2.5 min 内完成青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉六种 β -内酰胺类抗生素的分离，线性范围均为 0.2~500 ng/mL，相关系数均在 0.996 以上。用处理过的牛奶基质配制 5 ng/mL

、50 ng/mL、200 ng/mL的标准溶液考察重复性，连续6次进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.03~0.12%和2.43~4.96%之间，仪器精密度良好。牛奶中六种 β -内酰胺类抗生素的定量限在0.038~0.085 ng/mL之间，检出限在0.011~0.025 ng/mL之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，适合牛奶中 β -内酰胺类抗生素的快速、高灵敏度检测。



超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法

测定牛奶中的4种大环内酯类抗生素残留

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中 4 种常见大环内酯类抗生素残留的检测方法。该方法在 1.3 min 内完成替米考星、红霉素、泰乐菌素、罗红霉素四种常见大环内酯类抗生素的分离。在牛奶基质中替米考星在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好，红霉素、泰乐菌素、罗红霉素在 0.2~100 ng/mL 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.994 以上。用牛奶基质配制浓度为 5 ng/mL、20 ng/mL 和 100 ng/mL 的标准溶液考察重复性，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.23%和 2.44~4.78%之间，仪器精密度良好。牛奶中 4 种常见大环内酯类抗生素的定量限在 0.059~0.081 ng/mL 之间，检出限在 0.018~0.024 ng/mL 之间。

关键词： 三重四极杆质谱 牛奶 大环内酯类抗生素

大环内酯类抗生素(macrolide antibiotics) 结构上以一个十四元或十六元大内酯环为母体，连有多个氨基和配糖基，具有较强的抗菌活性，被广泛应用于兽药和饲料添加剂，预防和治疗食源性动物的细菌性和支原体感染疾病。泰乐菌素、螺旋霉素等除具有抗感染能力之外在低浓度还具有显著的促生长作用。在畜牧和食品行业中大环内酯类化合物广泛的应用，必然导致大环内酯类抗生素的残留问题，其主要危害是引起过敏反应和导致携带耐药因子的菌株扩散。本文主要参考《SN/T 1777.2-2007 动物源食品中大环内酯类抗生素残留检测方法 第 2 部分：高效液相色谱串联质谱法》和国内外的相关文献方法，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用，建立了一种快速测定牛奶中的大环内酯类残留的方法，该方法前处理操作简单、灵敏度高，能够对低浓度的样品进行很好的定性确认，供相关行业人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 1.6 μm)

流动相: A: 0.1%甲酸水溶液; B: 乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 10 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 15%, 洗脱程序见表 1 表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	60
1.01	Pumps	Pump B Conc.	80
1.30	Pumps	Pump B Conc.	90
1.40	Pumps	Pump B Conc.	15
3.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子

加热模块温度: 400°C

脱溶剂管温度: 250°C

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 15.0 L/min

离子源电压: 4.5 kV

扫描模式: 多反应监测(MRM)

MRM 参数: 见表 2

1.3 标准工作溶液的配制

标准物质: 共 4 种, 替米考星、红霉素、泰乐菌素、罗红霉素。

标准工作溶液配制: 用乙腈-水 (1:1) 配制 1 mg/mL 的标准贮备液, 用乙腈-水 (2:8) 溶液稀释成 1 μg/mL 的混合标准溶液。

1.4 标准曲线的配制

牛奶前处理液用氮气吹干后再用乙腈-水 (2:8) 溶液复溶, 该复溶液过 0.22 μm 有机滤膜

后再用其将 1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液稀释成 100 ng/mL 、50 ng/mL 、10 ng/mL 、5 ng/mL 、1 ng/mL 、0.5 ng/mL 、0.2 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

前处理方法采用出入境检验检疫行业标准《SN/T 1777.2-2007 动物源食品中大环内酯类抗生素残留检测方法 第 2 部分：高效液相色谱串联质谱法》的第 7 部分和河北出入境检验检疫局技术中心发表的文章《液相色谱-串联质谱法测定牛奶和奶粉中 6 种大环内酯类药物的残留量》的第 2 部分。

表 2 样品 MRM 参数及信息

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)	英文名	CAS
替米考星	869.60	174.10*	-32.0	-48.0	-17.0	Tilmicosin	108050-54-0
		696.40	-32.0	-44.0	-32.0		
红霉素	734.70	158.20*	-28.0	-34.0	-29.0	Erythromycin	114-07-8
		576.30	-28.0	-22.0	-40.0		
泰乐菌素	916.60	174.10*	-34.0	-44.0	-30.0	Tylosin	1401-69-0
		101.10	-34.0	-54.0	-17.0		
罗红霉素	837.00	679.40*	-32.0	-24.0	-24.0	Roxithromycin	80214-83-1
		158.20	-32.0	-36.0	-29.0		

*表示定量离子

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

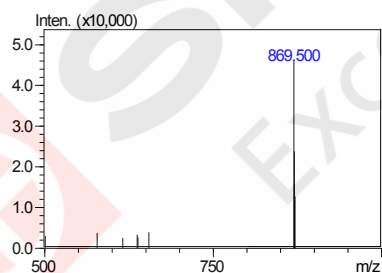


图1 替米考星一级质谱图

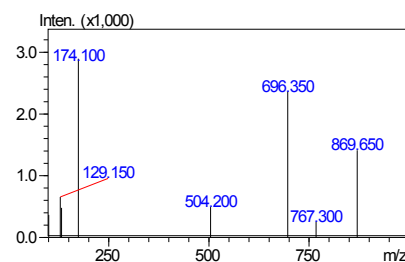


图2 替米考星产物离子扫描图(CE值-50 V)

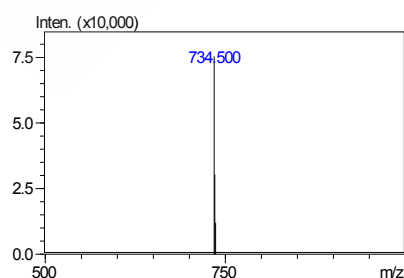


图3 红霉素一级质谱图

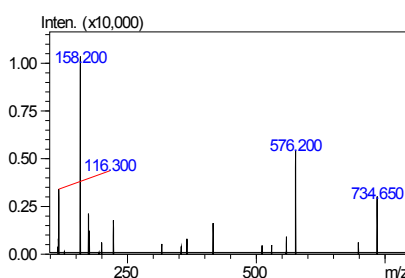


图4 红霉素产物离子扫描图(CE值-25 V)

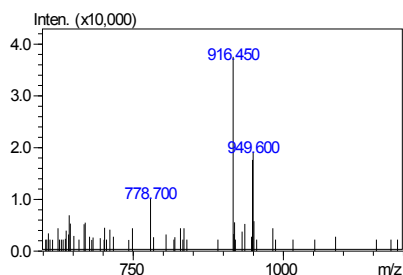


图5 泰乐菌素一级质谱图

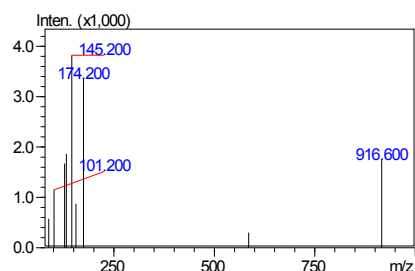


图6 泰乐菌素产物离子扫描图(CE值-40 V)

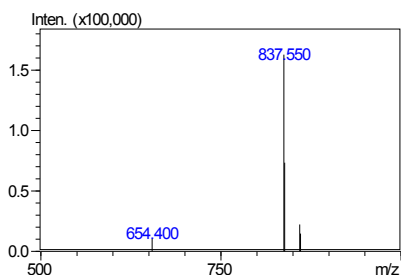


图7 罗红霉素一级质谱图

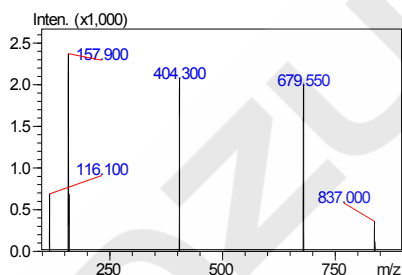


图8 罗红霉素产物离子扫描图(CE值-25 V)

2.2 牛奶基质加标样品的 MRM 色谱图

空白牛奶样品的色谱图如图 9 所示，加标样品色谱图如图 10 所示。

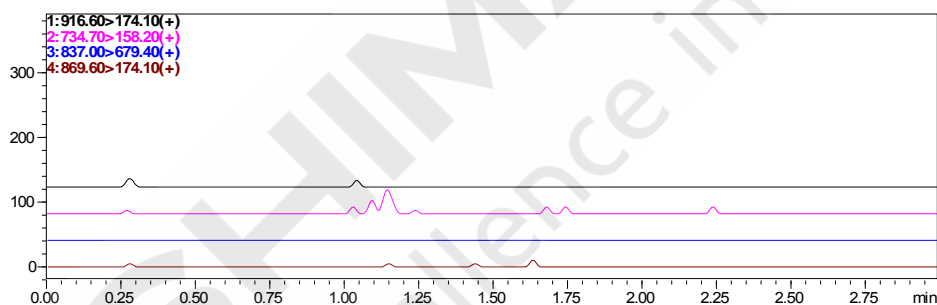


图 9 牛奶空白基质样品的 MRM 色谱图

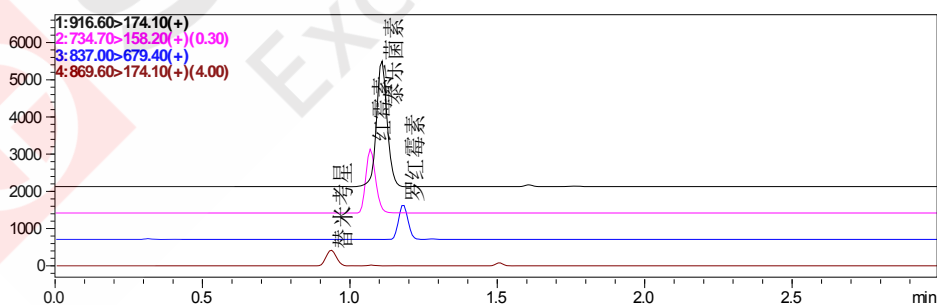


图 10 基质加标样品的 MRM 色谱图 (1 ng/mL)

2.3 线性关系

将 0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 系列浓度的标准溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 11 至图 14 所示。替米考星在 0.5~100 ng/mL 范围内校准曲线线性关

系良好，红霉素、泰乐菌素、罗红霉素在 0.2~100 ng/mL 范围内校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

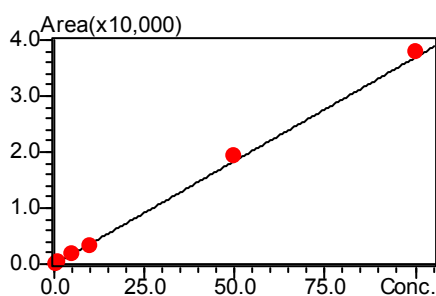


图 11 替米考星标准曲线

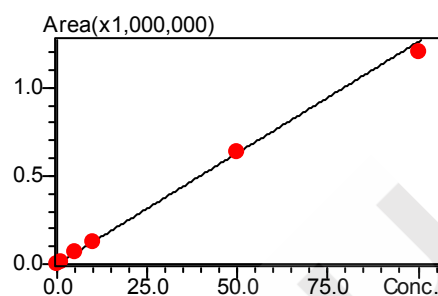


图 12 红霉素标准曲线

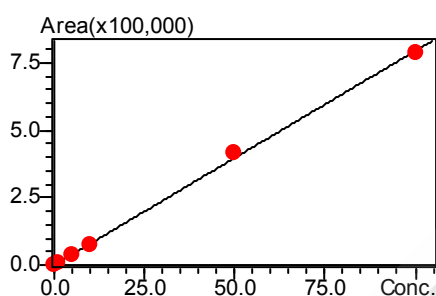


图 13 泰乐菌素标准曲线

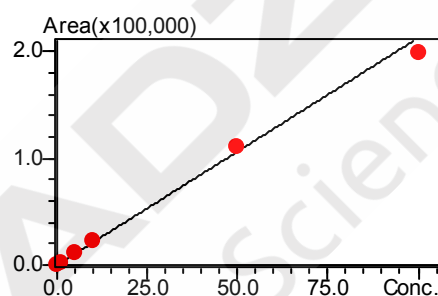


图 14 罗红霉素标准曲线

表 3 四种大环内酯类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r
1	替米考星	$Y = (369.574)X + (-58.7863)$	0.5~100	0.9942
2	红霉素	$Y = (12576.5)X + (567.112)$	0.2~100	0.9996
3	泰乐菌素	$Y = (7931.93)X + (261.239)$	0.2~100	0.9992
4	罗红霉素	$Y = (2126.15)X + (76.3701)$	0.2~100	0.9984

2.4 精密度实验

对 5 ng/mL、20 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.23%和 2.44~4.78%之间，仪器精密度良好。

2.5 灵敏度分析

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后稀释混标得到浓度为 0.5 ng/mL 的溶液进样分析，四种大环内酯类抗生素的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 5 所示。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (5 ng/mL)		RSD% (20 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
替米考星	0.23	4.09	0.19	4.78	0.11	4.77
红霉素	0.10	4.17	0.09	4.39	0.10	3.64
泰乐菌素	0.11	3.26	0.12	3.79	0.04	2.44
罗红霉素	0.11	3.84	0.08	3.49	0.06	3.27

表5 四种大环内酯类抗生素的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	替米考星	61.35	0.024	0.081
2	红霉素	77.21	0.019	0.065
3	泰乐菌素	85.17	0.018	0.059
4	罗红霉素	72.94	0.021	0.069

2.6 基质加标实验

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后加混标至 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平行 3 份样品测定回收率。具体结果如表 6, 样品加标回收率在 100.60 ~ 104.56% 之间。

表 6 加标样的回收率结果 (n=3)

No.	样品名称	实测平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)
1	替米考星	1.0456	104.56
2	红霉素	1.0116	101.16
3	泰乐菌素	1.0060	100.60
4	罗红霉素	1.0080	100.80

3. 结论

本应用建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定牛奶中四种大环内酯类抗生素的方法。该方法在 1.3 min 内完成替米考星、红霉素、泰乐菌素、罗红霉素四种大环内酯类抗生素的分离, 其中替米考星在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好, 红霉素、泰乐菌素、罗红霉素在 0.2~100 ng/mL 范围内线性良好, 标准曲线的相关系数均在 0.994 以上。用处理过的牛奶基质配制 5 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL 的标准溶液考察重复性, 连续 6 次进样, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.23% 和 2.44~4.78% 之间, 仪器精密度良好。牛奶中 4 种常见大环内酯类抗生素的定量限在 0.059~0.081 ng/mL 之间, 检出限在 0.018~0.024 ng/mL 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点, 适合牛奶中大环内酯类抗生素的快速、高灵敏度检测。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定牛奶中的 7 种四环素类抗生素残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定动物源性食品中 7 种四环素类抗生素残留的方法。样品经处理后,用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用外标法绘制 7 种四环素类抗生素的校准曲线,线性范围宽,校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。对 20 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验,连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.014%~0.122%和 2.459%~3.987%之间,系统精密度良好。

关键词: 四环素类抗生素 三重四极杆质谱 牛奶

四环素类抗生素 (Tetracyclines, TCs) 为广谱抗生素,对革兰氏阳性和阴性细菌、立克次氏体等均有抑菌作用,其作用机理主要是和 30S 核糖体的末端结合,干扰细菌蛋白质的合成。常用的四环素类抗生素有:四环素、金霉素、土霉素、强力霉素等。在畜禽生产中四环素类抗生素被广泛作为药物添加剂,用于防治肠道感染和促进生长。在奶牛业中四环素用来治疗乳腺炎等广科疾病,但容易诱导耐药菌株。许多国家对 TCs 残留实施例行监控,如欧盟的限量规定牛奶中最高残留量为 0.1mg/kg。

高效液相色谱-串联质谱联用技术是近些年来发展很快的分析技术,具有很高的选择性和灵敏度,对复杂基体中的药物残留具有很强的定性能力,而且准确度高。本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中的四环素类抗生素的方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack XR-C8 2.0 mm I.D.× 100 mm L., 2.2 μm

流动相: A—10 mM 三氟乙酸的水溶液; B—甲醇

流速: 0.3 mL/min; 柱温: 35℃; 进样量: 20 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	10
1.00	Pumps	Pump B Conc.	50
3.00	Pumps	Pump B Conc.	65
3.50	Pumps	Pump B Conc.	65
3.60	Pumps	Pump B Conc.	10
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+); 离子喷雾电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min; 干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气; DL 温度: 250℃

加热模块温度: 400℃

扫描模式: 多反应监测(MRM)

驻留时间: 15 ms; 延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

1.3 标准品溶液的配制

标准物质: 共 7 种, 分别为二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲基金霉素、金霉素、甲烯土霉素和强力霉素。

标准工作溶液配制: 用甲醇配制 20 mg/L 的混合标准中间溶液, 用甲醇+三氟乙酸水溶液(V/V, 1:19)稀释成不同浓度的混合标准工作液。

1.4 样品前处理方法

参照国标《GB/T 21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/

质谱法与高效液相色谱法》

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
二甲胺四环素	458.2	441.2*	-18.0	-20.0	-24.0
		283.1	-11.0	-44.0	-20.0
土霉素	461.2	426.0*	-14.0	-18.0	-23.0
		443.1	-14.0	-14.0	-24.0
四环素	445.2	410.2*	-11.0	-22.0	-30.0
		427.0	-11.0	-16.0	-23.0
去甲基金霉素	465.1	448.0*	-12.0	-16.0	-24.0
		154.2	-12.0	-32.0	-18.0
金霉素	479.2	444.1*	-12.0	-24.0	-23.0
		154.1	-12.0	-28.0	-12.0
甲烯土霉素	443.2	426.2*	-11.0	-20.0	-23.0
		201.2	-11.0	-30.0	-22.0
强力霉素	445.2	428.2*	-11.0	-16.0	-23.0
		154.1	-11.0	-34.0	-17.0

注：*表示定量离子

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

二甲胺四环素的一级质谱图见图 1，产物离子扫描质谱图见图 2。

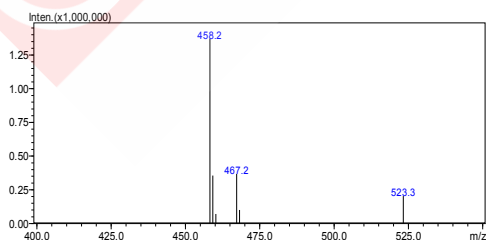


图1 二甲胺四环素的一级质谱图

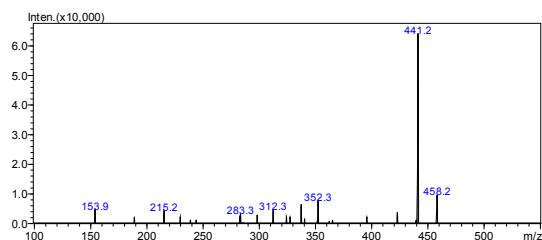


图2 二甲胺四环素的产物离子扫描质谱图(CE值-22V)

土霉素的一级质谱图见图 3，产物离子扫描质谱图见图 4。

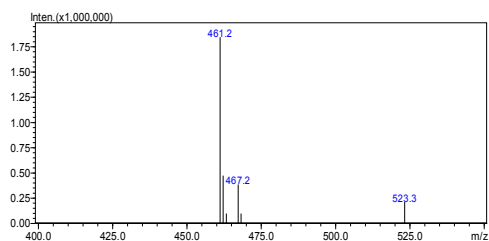


图3 土霉素的一级质谱图

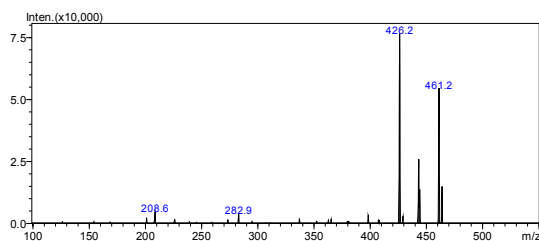


图4 土霉素的产物离子扫描图(CE值-25V)

四环素的一级质谱图见图5，产物离子扫描质谱图见图6。

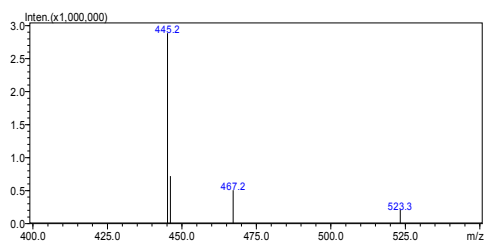


图5 四环素的一级质谱图

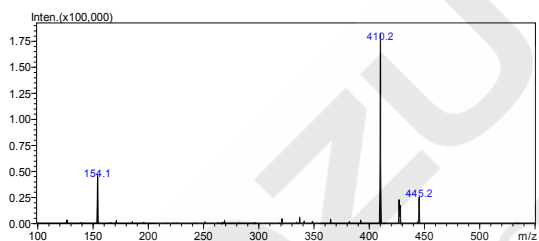


图6 四环素的产物离子扫描图(CE值-20V)

去甲基金霉素的一级质谱图见图7，产物离子扫描质谱图见图8。

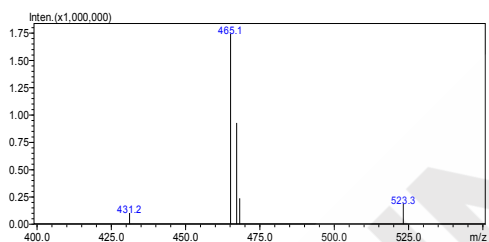


图7 去甲基金霉素的一级质谱图

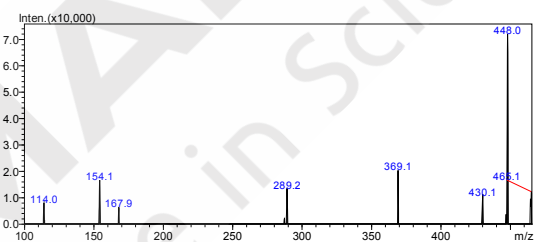


图8 去甲基金霉素的产物离子扫描图(CE值-20V)

金霉素的一级质谱图见图9，产物离子扫描质谱图见图10。

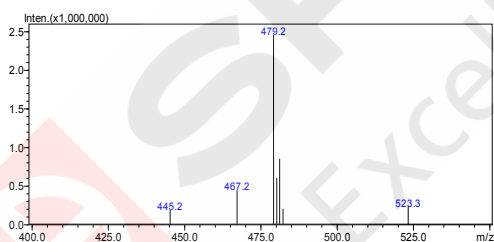


图9 金霉素的一级质谱图

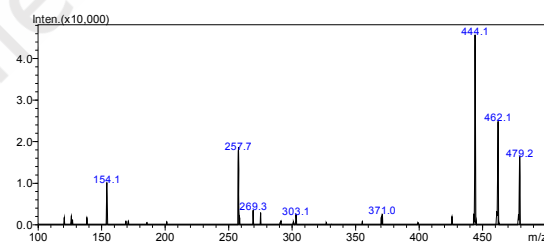


图10 金霉素的产物离子扫描图(CE值-20V)

甲烯土霉素的一级质谱图见图11，产物离子扫描质谱图见图12。

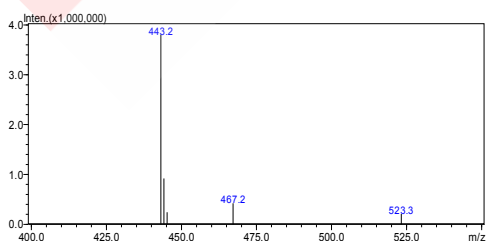


图11 甲烯土霉素的一级质谱图

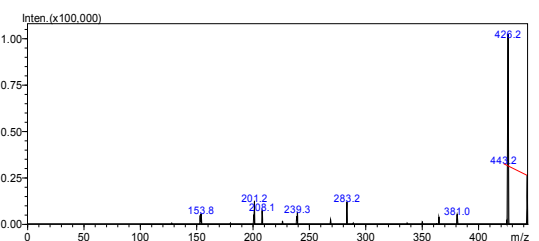


图12 甲烯土霉素的产物离子扫描图(CE值-20V)

强力霉素的一级质谱图见图13，产物离子扫描质谱图见图14。

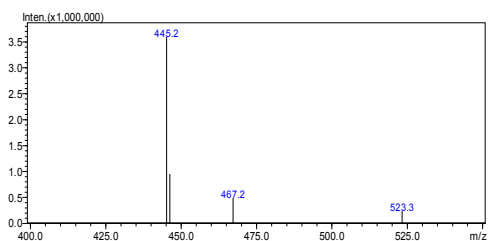


图13 强力霉素的一级质谱图

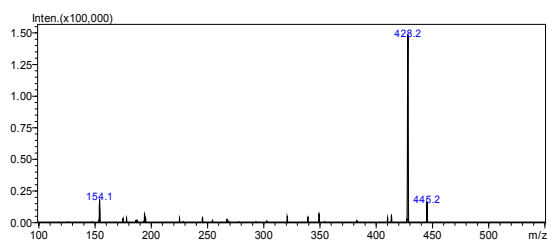


图14 强力霉素的产物离子扫描图(CE值-21V)

2.2 标准样品的MRM色谱图

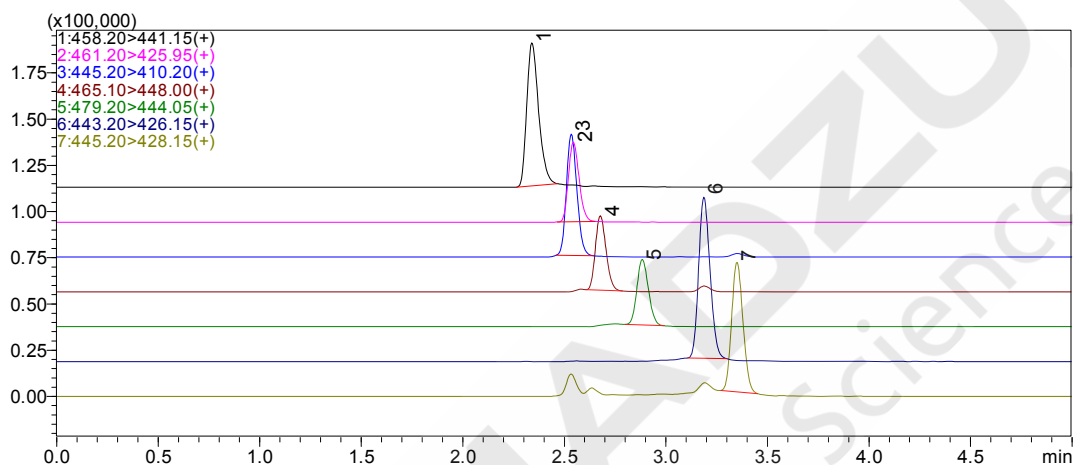


图 15 标准样品的MRM 色谱图(500 µg/L)

(1、二甲胺四环素；2、土霉素；3、四环素；4、去甲基金霉素；
5、金霉素；6、甲烯土霉素；7、强力霉素)

2.3 线性范围

将 1 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L、50 µg/L、100 µg/L、200 µg/L 和 500 µg/L 不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 16~22 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

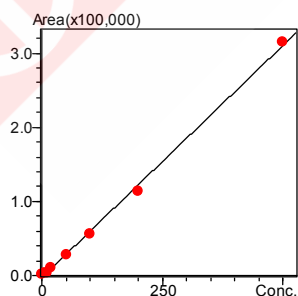


图 16 二甲胺四环素的校准曲线

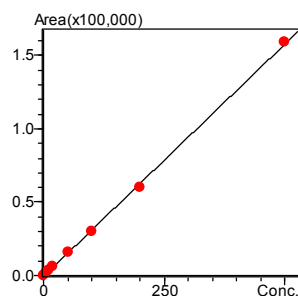


图 17 土霉素的校准曲线

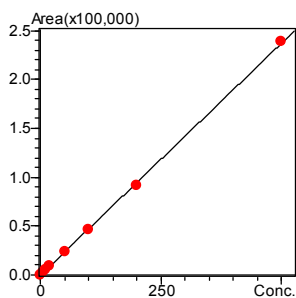


图 18 四环素的校准曲线

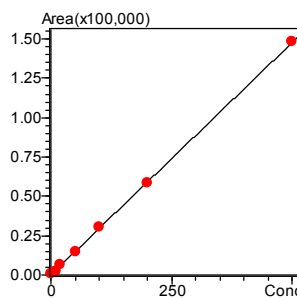


图 19 去甲基金霉素的校准曲线

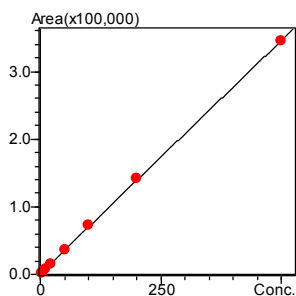


图 20 金霉素的校准曲线

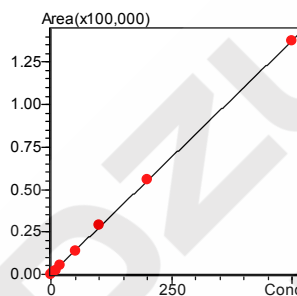


图 21 甲烯土霉素的校准曲线

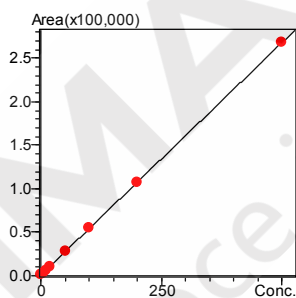


图 22 强力霉素的校准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围(μg/L)	相关系数 r
1	二甲胺四环素	$Y = (629.649)X + (-3957.10)$	5.0~500	0.9994
2	土霉素	$Y = (316.707)X + (-587.575)$	1.0~500	0.9998
3	四环素	$Y = (475.028)X + (-451.185)$	1.0~500	0.9999
4	去甲基金霉素	$Y = (295.352)X + (117.334)$	1.0~500	1.0000
5	金霉素	$Y = (274.750)X + (288.032)$	1.0~500	0.9999
6	甲烯土霉素	$Y = (688.518)X + (1657.78)$	1.0~500	0.9999
7	强力霉素	$Y = (7119.28)X + (-7322.01)$	1.0~500	1.0000

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重

复性结果如表 4 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.014%~0.122%和 2.459%~3.987%之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (20 µg/L)		RSD% (50 µg/L)		RSD% (100 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
二甲胺四环素	0.099	2.669	0.050	3.136	0.062	2.459
土霉素	0.122	3.987	0.089	3.360	0.014	3.385
四环素	0.076	2.613	0.039	2.618	0.051	2.625
去甲基金霉素	0.099	3.836	0.052	3.392	0.059	3.113
金霉素	0.081	3.539	0.109	3.521	0.045	3.197
甲烯土霉素	0.065	3.489	0.037	3.074	0.040	2.864
强力霉素	0.054	2.971	0.057	3.513	0.023	2.490

2.5 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，将 5 µg/L 混合标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定。5 µg/L 混合标准工作液的色谱图见图 23。通过 LabSolutions Ver. 5.41 软件计算信噪比、仪器检测限(3 倍信噪比计算)，二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲基金霉素、金霉素、甲烯土霉素和强力霉素的信噪比、检测限如表 5 所示。

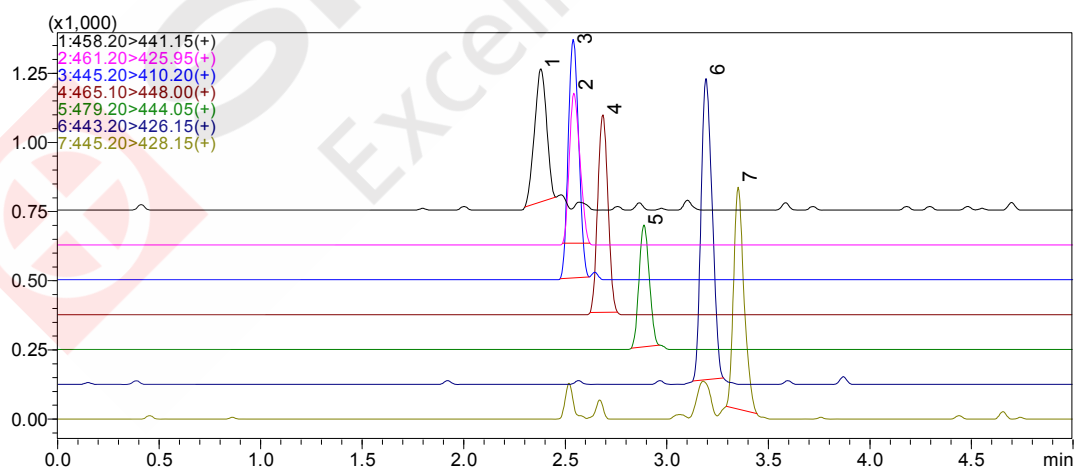


图 5 5 µg/L 混合标准工作液的色谱图

(1、二甲胺四环素；2、土霉素；3、四环素；4、去甲基金霉素；5、金霉素；6、甲烯土霉素；7、强力霉素)

表 5 信噪比(S/N)和检测限(LOD)

样品名称	S/N	LOD($\mu\text{g/L}$)
二甲胺四环素	19.23	1.54
土霉素	162.35	0.13
四环素	105.35	0.18
去甲基金霉素	25.22	0.14
金霉素	57.15	0.26
甲烯土霉素	26.81	0.37
强力霉素	14.64	1.13

2.6 基质加标实验

选用不含 7 种四环素类抗生素的牛奶为空白样品，添加 50 $\mu\text{g/kg}$ 的混合标准品，进行基质加标实验，牛奶样品的检测色谱图与加标样品色谱图如图 6 和图 7 所示。由表 6 结果可知该方法灵敏度高，对于牛奶样品中的四环素类抗生素检测的测定低限均优于国标《GB/T 21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法》。

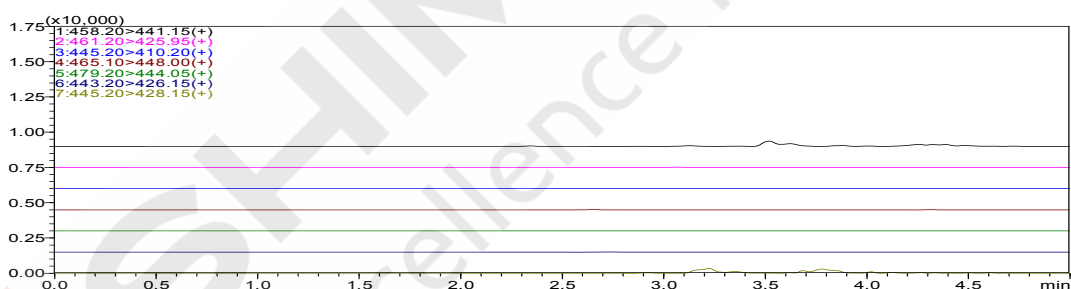


图 6 牛奶样品的 MRM 色谱图 (未检出)

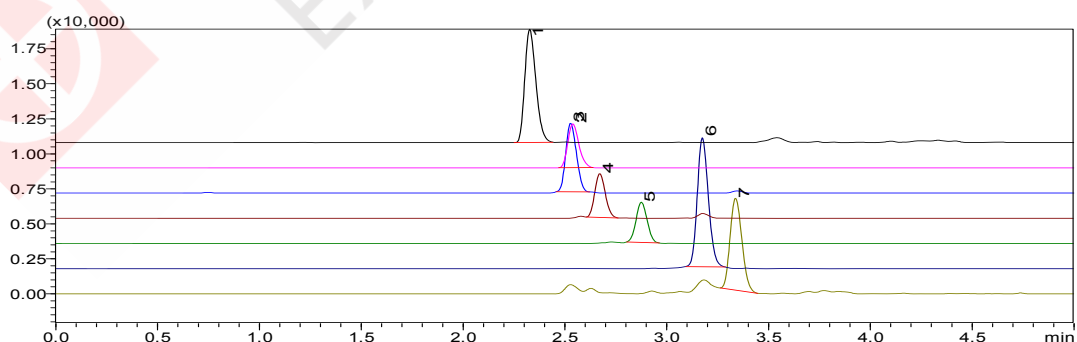


图 7 牛奶加标样品的 MRM 色谱图(50 $\mu\text{g/kg}$)

(1、二甲胺四环素；2、土霉素；3、四环素；4、去甲基金霉素；5、金霉素；6、甲烯土霉素；7、强力霉素)

表 6 加标样品信噪比(S/N)

样品名称	加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	信噪比(S/N)
二甲胺四环素	50	199
土霉素	50	1895
四环素	50	1292
去甲基金霉素	50	243
金霉素	50	269
甲烯土霉素	50	220
强力霉素	50	143

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中的四环素类抗生素残留量的检测方法。该方法在 5 min 之内完成 7 种目标物的分离分析,且线性范围宽,校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。对 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 混合标准溶液进行精密度实验,连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.014%~0.122%和 2.459%~3.987%之间,系统精密度良好。该方法具有超快速、高灵敏的特点,适合动物食品、水产品中四环素类兽药残留量的快速检测。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定牛奶中的14种喹诺酮类抗生素残留

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定动物源性食品中14种喹诺酮类抗生素的方法。样品经处理后，用超高效液相色谱LC-30A在7 min内实现快速分离，三重四极杆质谱仪LCMS-8040进行定量分析。使用外标法内绘制14种喹诺酮类抗生素的校准曲线，线性良好，相关系数为0.999以上；对不同浓度的标准溶液进行精密度实验，连续6次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.437%和4.937%以下，表明仪器精密度良好。

关键词：喹诺酮类抗生素 三重四极杆质谱 牛奶

喹诺酮类(Quinolones)是一类含有4-喹诺酮母核的化学合成抗菌药，它的抗菌谱广、抗菌活性强，广泛应用于畜牧、水产等养殖业中。然而，喹诺酮类药物有潜在的致癌性和遗传毒性，同时还容易使病菌产生耐药性。因此，喹诺酮类药物残留问题越来越引起人们的关注。美国FDA已于2005年宣布禁止用于治疗家禽细菌感染的抗菌药物恩诺沙星的销售和使用。联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂专家联席会议、欧盟都已制定了多种喹诺酮类药物在动物组织中的最高残留限量。

高效液相色谱-串联质谱联用技术是近些年来发展很快的分析技术，具有很高的选择性和灵敏度，对复杂基质中的抗生素类残留具有很强的定性能力，准确度高，是目前超痕量残留分析的首选方法。本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8040联用测定牛奶中14种喹诺酮类抗生素的方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D.× 150 mm L., 2.2 μm

流动相:

A—0.2%甲酸水溶液;

B—甲醇-乙腈溶液(40/60, v/v)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40℃

进样量: 20 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.5	Pumps	Pump B Conc.	40
4.6	Pumps	Pump B Conc.	95
5.5	Pumps	Pump B Conc.	95
5.6	Pumps	Pump B Conc.	20
7	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)

离子喷雾电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 250℃

加热模块温度: 400℃

扫描模式: 多反应监测(MRM)

驻留时间: 20 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 3

1.3 标准品溶液的配制

标准物质：共 14 种，分别为依诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、噁喹酸、氟甲喹、吡呱酸、萘啶酸和西诺沙星。

标准工作溶液配制：用甲醇配制 20 mg/L 的混合标准中间溶液，用含有 0.2 % 甲酸的甲醇水(20/80, v/v)溶液稀释成不同浓度的混合标准工作液。各标准物质的具体浓度见表 2。

表 2 混合标准工作液中各标准物质的浓度($\mu\text{g/L}$)

名称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6
依诺沙星	1	5	10	50	100	500
氧氟沙星	0.5	2.5	5	25	50	250
诺氟沙星	5	25	50	250	500	2500
培氟沙星	1	5	10	50	100	500
环丙沙星	1	5	10	50	100	500
洛美沙星	0.5	2.5	5	25	50	250
达氟沙星	1	5	10	50	100	500
恩诺沙星	1	5	10	50	100	500
沙拉沙星	1	5	10	50	100	500
噁喹酸	0.5	2.5	5	25	50	250
氟甲喹	0.5	2.5	5	25	50	250
吡呱酸	0.5	2.5	5	25	50	250
萘啶酸	0.5	2.5	5	25	50	250
西诺沙星	5	25	50	250	500	2500

1.4 样品前处理方法

牛奶样品的前处理操作方法参照国标《GB/T 21312-2007 动物源性食品中14种喹诺酮类药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》。

表3 MRM优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
依诺沙星	321.2	303.1*	-16.0	-20.0	-23.0
		203.9	-16.0	-48.0	-23.0

氧氟沙星	362.2	318.2*	-30.0	-18.0	-24.0
		261.1	-30.0	-28.0	-19.0
诺氟沙星	320.2	302.1*	-16.0	-20.0	-23.0
		231.1	-16.0	-46.0	-28.0
培氟沙星	334.2	316.2*	-13.0	-20.0	-24.0
		290.1	-13.0	-16.0	-22.0
环丙沙星	332.2	314.1*	-13.0	-16.0	-24.0
		231.0	-13.0	-44.0	-18.0
洛美沙星	352.2	265.0*	-18.0	-22.0	-20.0
		308.2	-18.0	-16.0	-23.0
达氟沙星	358.2	340.1*	-14.0	-20.0	-26.0
		255.0	-14.0	-42.0	-29.0
恩诺沙星	360.3	342.2*	-29.0	-20.0	-26.0
		316.2	-29.0	-20.0	-24.0
沙拉沙星	386.2	368.1*	-15.0	-20.0	-28.0
		299.1	-15.0	-25.0	-23.0
噁喹酸	262.1	244.1*	-30.0	-18.0	-30.0
		216.0	-30.0	-32.0	-26.0
氟甲喹	262.1	244.1*	-30.0	-16.0	-18.0
		202.0	-30.0	-36.0	-23.0
吡呱酸	304.2	286.1*	-30.0	-18.0	-22.0
		215.1	-30.0	-38.0	-24.0
萘啶酸	233.1	215.1*	-30.0	-14.0	-26.0
		187.0	-30.0	-28.0	-22.0
西诺沙星	263.1	245.1*	-21.0	-16.0	-19.0
		189.0	-21.0	-30.0	-22.0

注：*表示定量离子

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

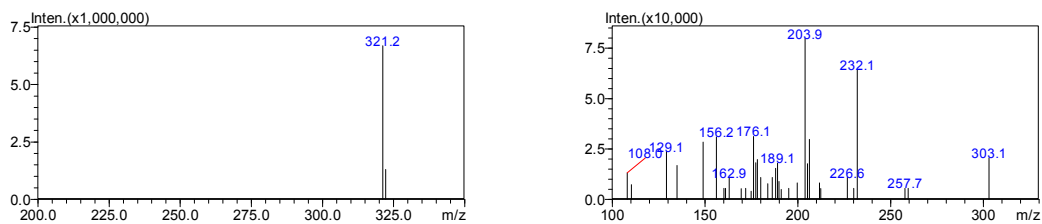


图1 依诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-48V）（右图）

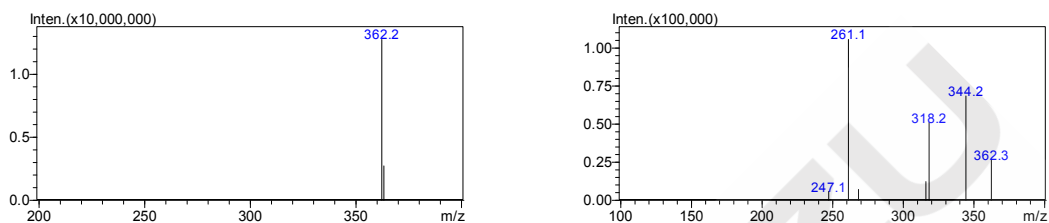


图2 氧氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

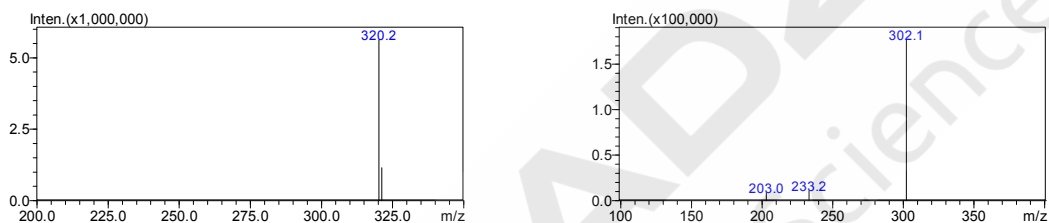


图3 诺氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

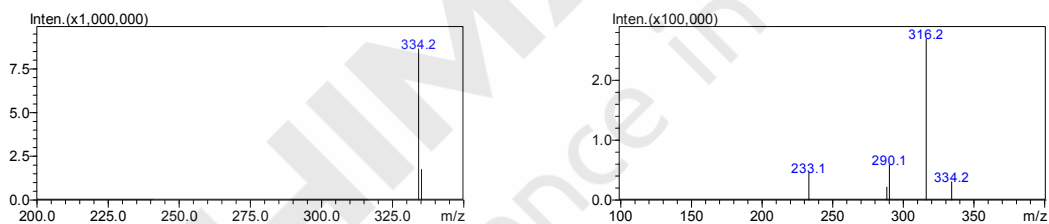


图4 培氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

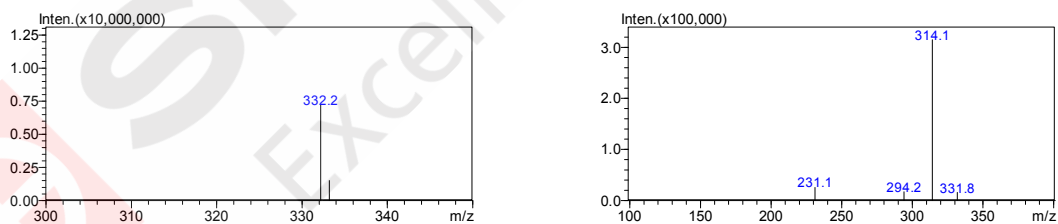


图5 环丙沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

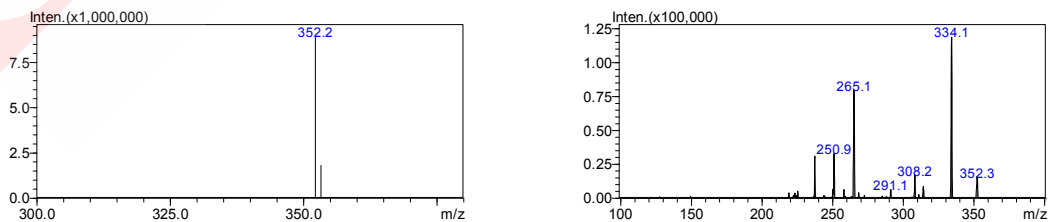


图6 洛美沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

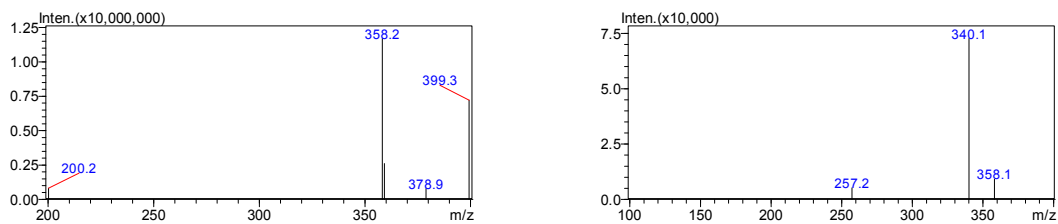


图 7 达氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

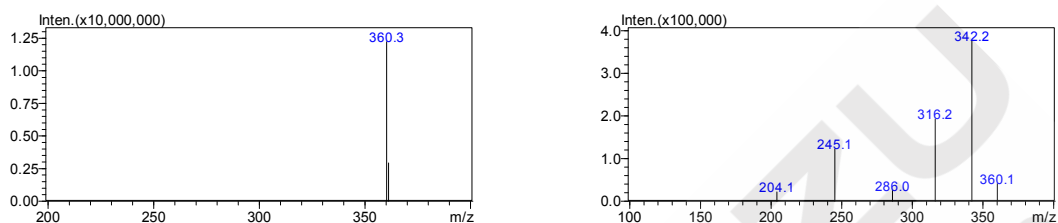


图 8 恩诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

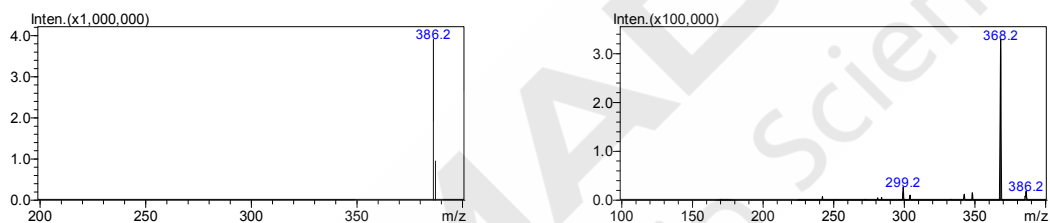


图 9 沙拉沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

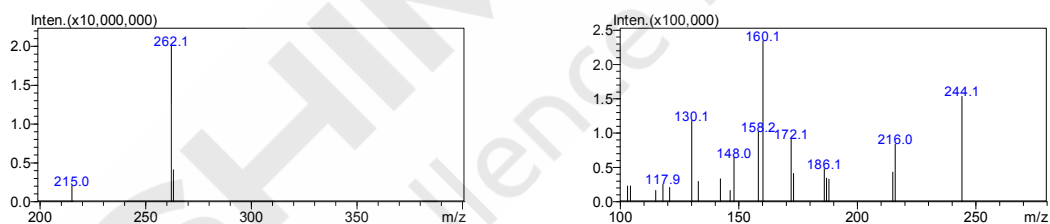


图 10 噁唑酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

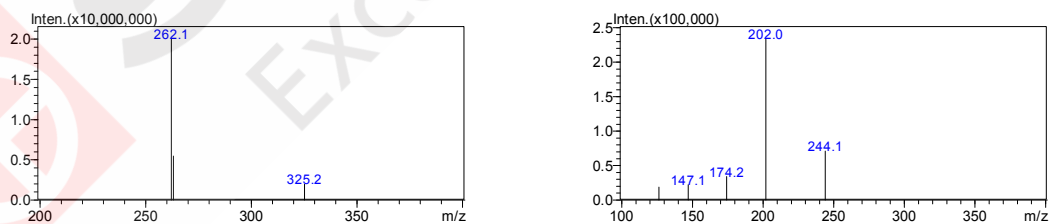


图 11 氟甲喹的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

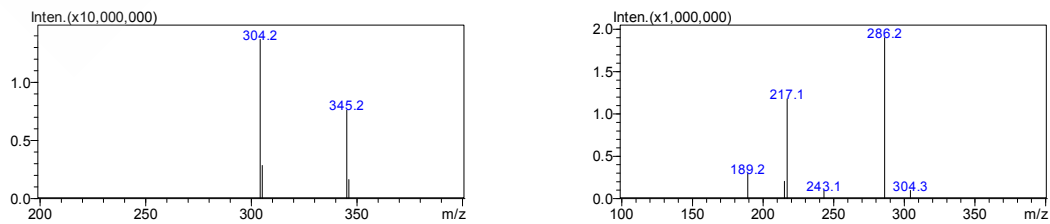


图 12 吡呱酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

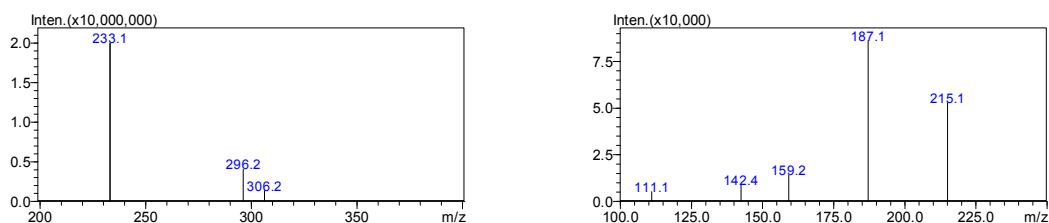


图 13 caffeine 的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

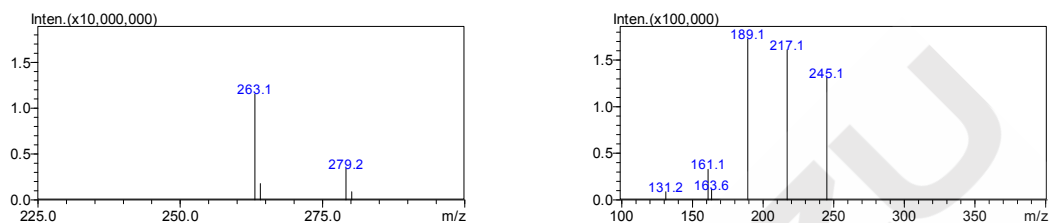


图 14 西诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

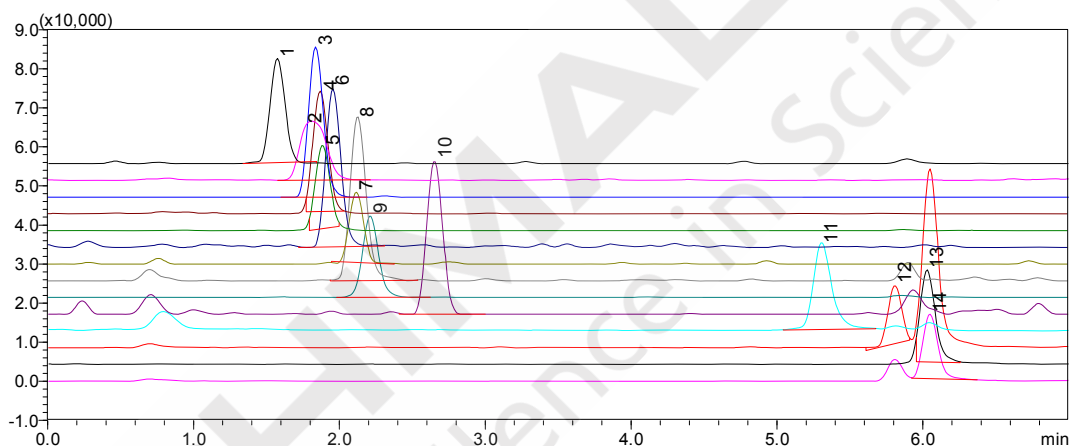


图 15 标准样品的 MRM 色谱图

（1、2.5 $\mu\text{g/L}$ 吡嗪酸；2、5 $\mu\text{g/L}$ 依诺沙星；3、2.5 $\mu\text{g/L}$ 氧氟沙星；4、25 $\mu\text{g/L}$ 诺氟沙星；5、5 $\mu\text{g/L}$ 培氟沙星；6、5 $\mu\text{g/L}$ 环丙沙星；7、2.5 $\mu\text{g/L}$ 洛美沙星；8、5 $\mu\text{g/L}$ 达氟沙星；9、5 $\mu\text{g/L}$ 恩诺沙星；10、5 $\mu\text{g/L}$ 沙拉沙星；11、25 $\mu\text{g/L}$ 西诺沙星；12、2.5 $\mu\text{g/L}$ 噁唑酸；13、2.5 $\mu\text{g/L}$ caffeine；14、2.5 $\mu\text{g/L}$ 氟甲喹）

2.3 线性范围

将不同浓度的混合标准工作液按 1.2 项下的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 16~29 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 4。

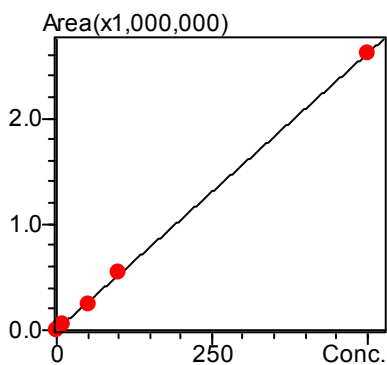


图 16 依诺沙星的校准曲线

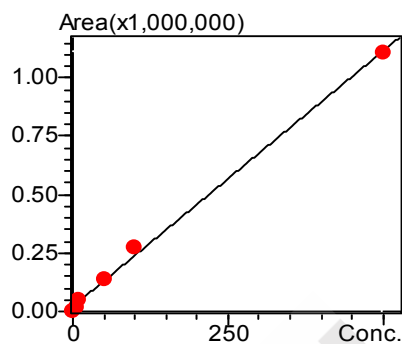


图 20 环丙沙星的校准曲线

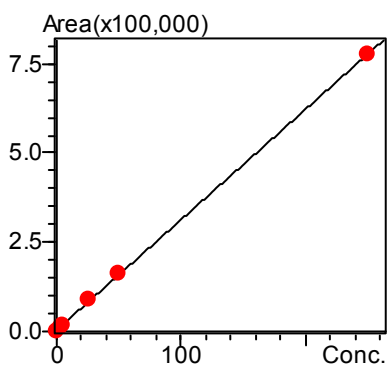


图 17 氧氟沙星的校准曲线

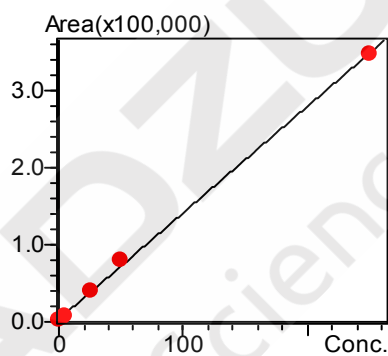


图 21 洛美沙星的校准曲线

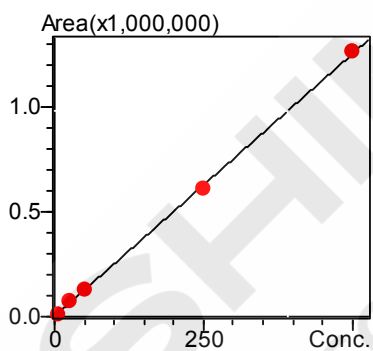


图 18 诺氟沙星的校准曲线

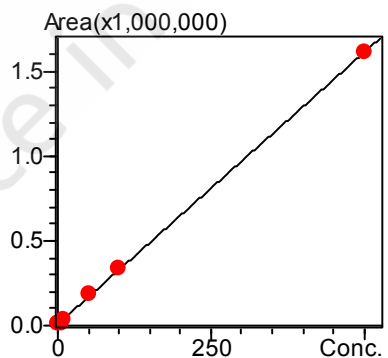


图 22 达氟沙星的校准曲线

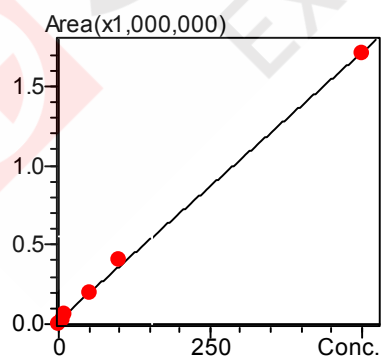


图 19 培氟沙星的校准曲线

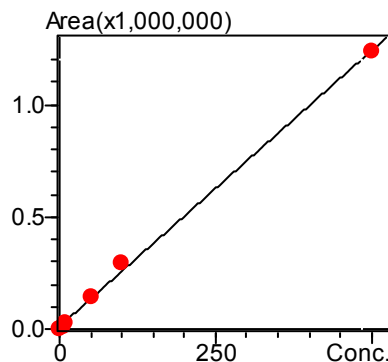


图 23 恩诺沙星的校准曲线

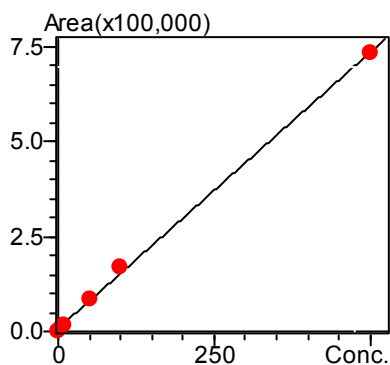


图 24 沙拉沙星的校准曲线

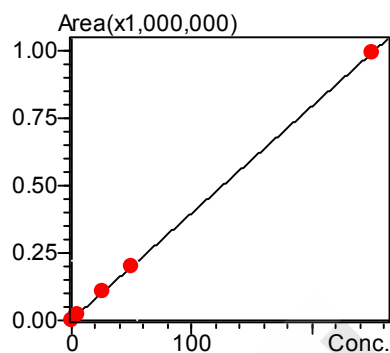


图 27 吡嗪酸的校准曲线

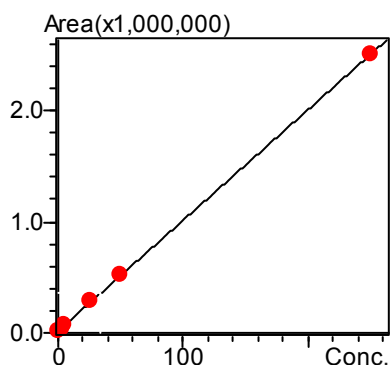


图 25 噁啉酸的校准曲线

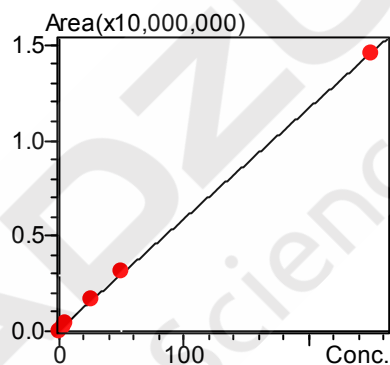


图 28 吡嗪酸的校准曲线

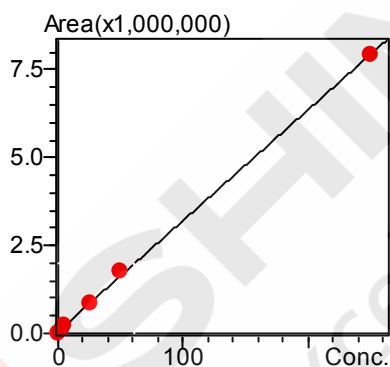


图 26 氟甲嗪的校准曲线

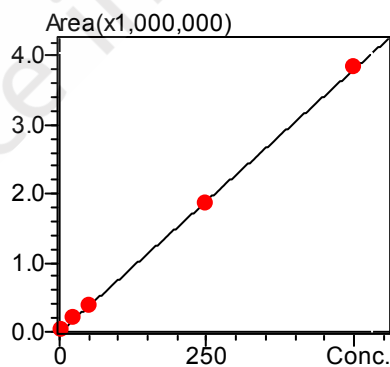


图 29 西诺沙星的校准曲线

表 4 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	相关系数 r
1	依诺沙星	$Y = (5210.26)X + (3090.70)$	1.0~500	1.0000
2	氧氟沙星	$Y = (3088.28)X + (4327.79)$	0.5~250	0.9998
3	诺氟沙星	$Y = (2499.58)X + (1672.78)$	5~500	0.9998
4	培氟沙星	$Y = (3370.81)X + (26856.7)$	1.0~500	0.9993
5	环丙沙星	$Y = (2189.90)X + (21093.5)$	1.0~500	0.9992
6	洛美沙星	$Y = (1382.09)X + (3417.15)$	0.5~250	0.9995

7	达氟沙星	$Y = (3207.19)X + (7670.04)$	1.0~500	0.9999
8	恩诺沙星	$Y = (2457.58)X + (12362.3)$	1.0~500	0.9992
9	沙拉沙星	$Y = (1453.99)X + (7474.59)$	1.0~500	0.9994
10	噁唑酸	$Y = (9946.96)X + (18523.3)$	0.5~250	0.9999
11	氟甲喹	$Y = (31449.4)X + (66461.2)$	0.5~250	0.9998
12	吡呱酸	$Y = (3955.87)X + (2805.99)$	0.5~250	1.0000
13	萘啶酸	$Y = (57834.6)X + (105320)$	0.5~250	0.9999
14	西诺沙星	$Y = (7624.15)X + (-8145.69)$	5~500	0.9998

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.014 % ~ 0.437 % 和 1.309 % ~ 4.937% 之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (5 µg/L)		RSD% (10 µg/L)		RSD% (50 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
依诺沙星	0.437	4.576	0.272	3.315	0.152	1.309
培氟沙星	0.158	4.419	0.248	3.974	0.065	1.762
环丙沙星	0.273	4.706	0.163	3.438	0.085	2.810
达氟沙星	0.143	3.545	0.186	3.172	0.079	2.468
恩诺沙星	0.212	4.756	0.225	3.750	0.099	2.719
沙拉沙星	0.238	4.353	0.060	1.918	0.119	2.622
样品名称	RSD% (2.5 µg/L)		RSD% (5 µg/L)		RSD% (25 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
氧氟沙星	0.245	4.625	0.300	4.556	0.145	2.719
洛美沙星	0.188	4.937	0.140	4.052	0.119	2.916
噁唑酸	0.023	4.790	0.023	3.308	0.014	2.450
氟甲喹	0.018	2.934	0.014	2.184	0.019	2.251
吡呱酸	0.202	3.765	0.268	3.762	0.036	2.645

茶啶酸	0.057	4.633	0.010	2.592	0.046	2.738
样品名称	RSD% (25 µg/L)		RSD% (50 µg/L)		RSD% (250 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
诺氟沙星	0.200	3.989	0.252	2.864	0.069	2.706
西诺沙星	0.046	4.384	0.075	1.782	0.040	1.344

2.5 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，将低浓度混合标准工作液按 1.2 项下的分析条件下进行测定。通过 LabSolutions Ver. 5.41 软件计算信噪比和检出限（以 3 倍信噪比计算），依诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、噁喹酸、氟甲喹、吡呱酸、茶啶酸和西诺沙星的信噪比和检出限如表 6 所示。

表 6 信噪比(S/N)和检出限(LOD)

名称	浓度水平(µg/L)	S/N	LOD(µg/L)
依诺沙星	1.00	14	0.24
氧氟沙星	0.50	31	0.05
诺氟沙星	5.00	39	0.43
培氟沙星	1.00	47	0.07
环丙沙星	1.00	8	0.41
洛美沙星	0.50	51	0.03
达氟沙星	1.00	10	0.35
恩诺沙星	1.00	32	0.10
沙拉沙星	1.00	9	3.60
噁喹酸	0.50	40	0.04
氟甲喹	0.50	70	0.02
吡呱酸	0.50	27	0.06
茶啶酸	0.50	44	0.04
西诺沙星	5.00	30	0.56

2.6 基质加标实验

选用不含 14 种喹诺酮类抗生素的牛奶为空白样品，进行基质加标实验，其中依诺沙星、培氟沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星的加标含量为 2 μg/kg，氧氟沙星、洛美沙星、噁喹酸、氟甲喹、吡呱酸和萘啶酸的加标含量为 1 μg/kg，诺氟沙星和西诺沙星的加标含量为 10 μg/kg。牛奶样品的检测色谱图与加标样品色谱图如图 30 和图 31 所示。由表 7 结果可知该方法灵敏度高，对于牛奶样品中的喹诺酮类抗生素检测的测定达到了国标《GB/T 21312-2007 动物源性食品中 14 种喹诺酮药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》水平。

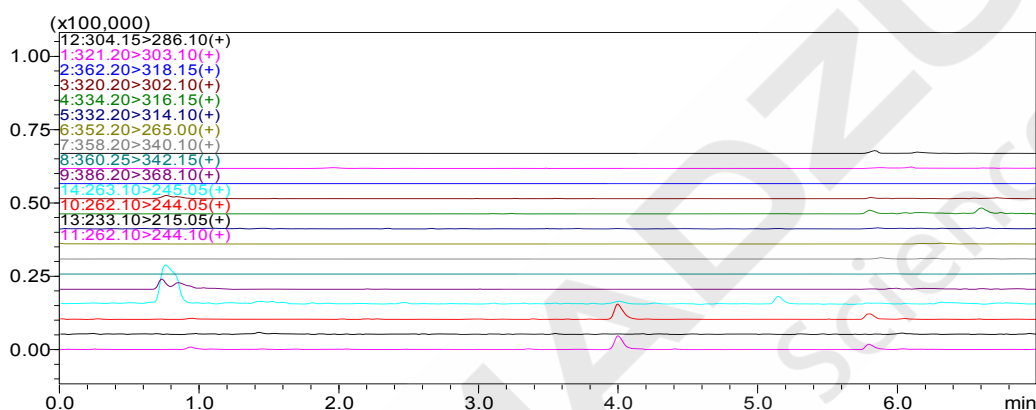


图 30 牛奶样品的 MRM 色谱图（未检出）

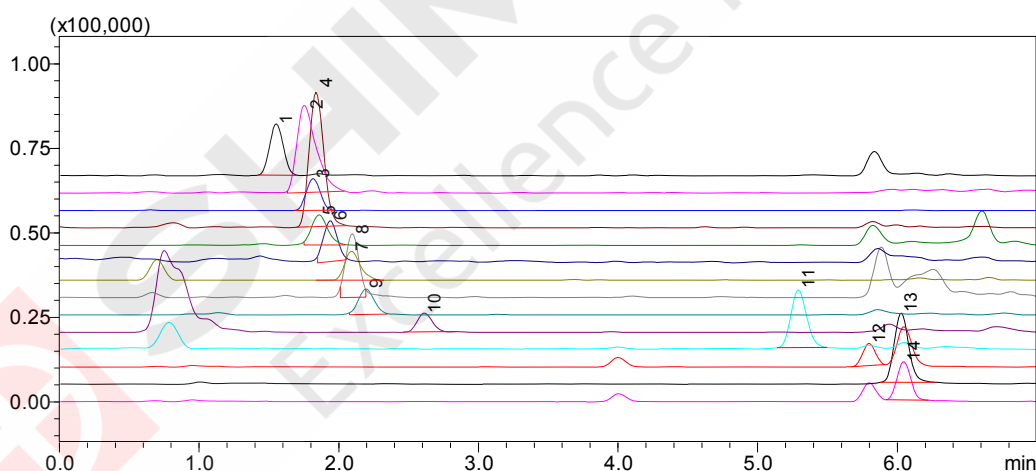


图 31 牛奶加标样品的 MRM 色谱图

(1、吡呱酸；2、依诺沙星；3、氧氟沙星；4、诺氟沙星；5、培氟沙星；6、环丙沙星；7、洛美沙星；8、达氟沙星；9、恩诺沙星；10、沙拉沙星；11、西诺沙星；12、噁喹酸；13、萘啶酸；14、氟甲喹)

表 6 加标样品信噪比(S/N)

名称	加标含量(μg/kg)	S/N
依诺沙星	2.00	40
氧氟沙星	1.00	79

诺氟沙星	10.00	45
培氟沙星	2.00	10
环丙沙星	2.00	11
洛美沙星	1.00	7
达氟沙星	2.00	9
恩诺沙星	2.00	17
沙拉沙星	2.00	10
噁喹酸	1.00	16
氟甲喹	1.00	15
吡呱酸	1.00	11
萘啶酸	1.00	58
西诺沙星	10.00	11

3 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8040联用测定牛奶中14种喹诺酮类抗生素的方法。该方法在7.0 min 之内完成14 种目标物的分离分析，且精密度高，线性范围宽，校准曲线的相关系数均在0.999以上。对不同浓度的标准溶液进行精密度实验，连续6次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.437%和4.937%以下，系统精密度良好。该方法具有超快速、高灵敏的特点，适合动物食品、水产品中喹诺酮类抗生素残留量的快速检测。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法

测定牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物的残留量

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物（喹噁啉-2-羧酸（QCA）和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸（MQCA））的方法。以 QCA-D4 做内标物，采用内标法快速、准确地测定 QCA 和 MQCA 的残留量。QCA 和 MQCA 的线性良好，相关系数均大于 0.999；不同浓度的精密度实验结果表明：其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.14~0.50% 和 1.32~4.91% 间，仪器精密度良好；QCA 和 MQCA 检出限分别为 0.27 $\mu\text{g/L}$ 和 0.23 $\mu\text{g/L}$ ，定量限分别为 1.09 $\mu\text{g/L}$ 和 0.92 $\mu\text{g/L}$ ；样品加标回收率在 72.8~94.2% 间。

关键词: 卡巴氧代谢物 喹乙醇代谢物 牛奶与奶粉 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

卡巴氧（Carbadox）和喹乙醇（Olaquinox）同属于喹噁啉类化合物，该类药物具有显著的促进动物生长的作用，用做牛、猪等养殖动物的饲料添加剂，可以改善动物的生长性能和饲料利用率。根据 JECFA 报告中对卡巴氧和喹乙醇的风险评估，不仅二者本身具有潜在的致畸变、致癌作用，二者的代谢物也可能带来健康风险。因此，许多国家将卡巴氧和喹乙醇列为对食用动物禁用或限用的药物，欧盟、中国、日本、美国、澳大利亚等对二者在动物组织内迅速代谢而产生的相应代谢产物喹噁啉-2-羧酸（QCA）和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸（MQCA）制定了残留监控的限量标准。为此，建立卡巴氧和喹乙醇的代谢物在牛奶和奶粉中的多残留检测方法是十分必要的。

检测 QCA 和 MQCA 的方法有液相方法、气质联用法和液质联用法，但是多用超高效液相色谱与串联四极杆质谱联用来测定。因此，本方法参考《GB/T 22984-2008 牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，建立了测定牛奶与奶粉中 QCA 和 MQCA 的超高效液相色谱-串联质谱分析方法，可供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II

2.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μm

流动相：A—0.1%甲酸水溶液；B—甲醇流速：0.3 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
1.00	Pumps	Pump B Conc.	50
2.00	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.00	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI(+)

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 ℃

加热模块温度：400 ℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：40 ms；

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	中文名	英文名	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	喹噁啉-2-羧酸	Quinoxaline-2-carboxylic acid (QCA)	879-65-2	175.1	129.1*	-19	-19	-24
					131.1	-12	-16	-23
		3-methyl			145.2*	-13	-14	-29
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA)	74003-63-7	189.1	143.2	-13	-17	-27
					133.1*	-13	-18	-25
3	喹噁啉-2-羧酸-D4	Quinoxaline-2-carboxylic acid -D4 (QCA-D4)		179.1	106.1	-13	-34	-20

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制:

配制 1000 mg/L 单个标准溶液, 然后混合稀释成 1 mg/L 混合标液; 用甲醇-0.1%甲酸水溶液 (5/95, v/v) 溶液稀释成 2、5、10、20、50、100 和 200 $\mu\text{g/L}$ 不同浓度的混合标准工作液, 并加入 10 $\mu\text{g/L}$ 内标物 QCA-D4 至每个工作液中。

1.3.2 样品前处理方法:

奶粉样品的制备: 称取 12.5 g 奶粉至 100 mL 烧杯中, 加水至总质量为 100 g, 充分混匀, 取出 5 g 样品。

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)至 50 mL 离心管中, 加入一定量的内标溶液 (QCA-D4), 使其浓度为 2.0 ng/g, 再加入 10 mL 0.6% 甲酸水溶液, 混匀后, 置于 $(47 \pm 3)^\circ\text{C}$ 水浴锅中水浴 1 h, 然后先加入 3 mL 1.0 mol/L Tris 溶液, 再加入 0.3 mL 0.01 g/mL Protease 蛋白酶水溶液, 充分混匀后, 置于 $(47 \pm 3)^\circ\text{C}$ 水浴中酶解 16 h ~ 18 h。加入 20 mL 0.3 mol/L 盐酸, 振荡 5 min, 然后 5000 r/min 离心 15 min, 上清液过滤。

然后将所得上清液以约 1 mL/min 的流速全部通过 Oasis MAX 固相萃取柱, 分别用 15 mL 0.05 mol/L 乙酸钠(pH 7.0) - 甲醇溶液 (19+1) 淋洗固相萃取柱, 真空抽干 15 min。再用 5 mL 甲醇、3 mL 水、5 mL 0.1 mol/L 盐酸和 3 mL 20% 甲醇-水溶液分别淋洗, 真空抽干 15 min, 然后用 2 mL 乙酸乙酯淋洗固相萃取柱, 弃去全部淋出液, 最后用 3 mL 2% 甲酸-乙酸乙酯溶液洗脱目标物, 置于 15 mL 离心管中, 然后氮吹干。准确加入 1.0 mL 甲醇-0.1% 甲酸 (5+95) 溶液溶解残渣, 过 0.22 μm 滤膜, 用质谱分析。

2. 结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

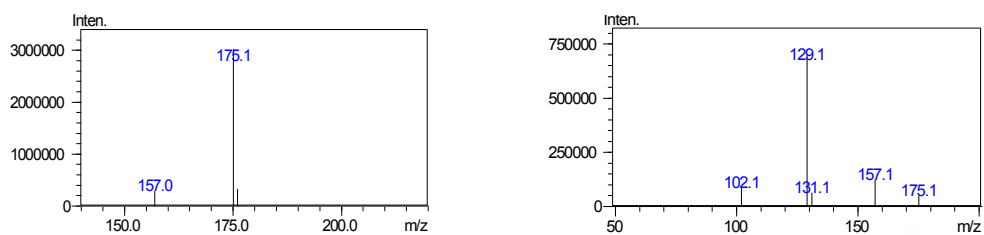


图1 喹噁啉-2-羧酸(QCA)的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值-18V,右图)

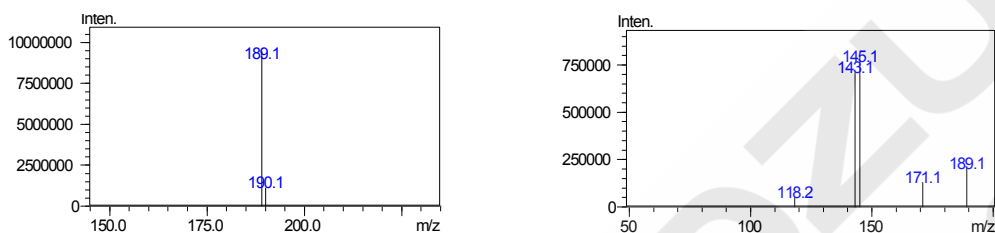


图2 3-甲基喹噁啉-2-羧酸(MQCA)的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值-15V,右图)

2.2 标准样品的MRM色谱图

混合标准样品的MRM色谱如图4所示。

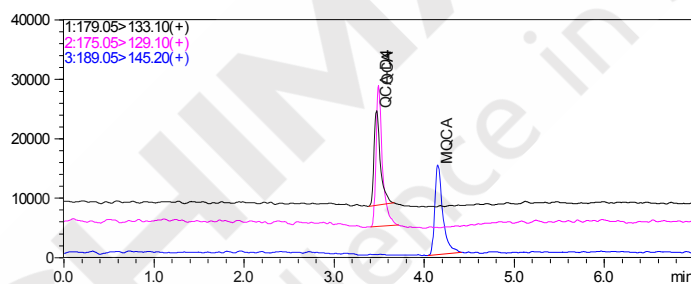


图4 20 µg/L 混合标样的MRM图

2.3 线性关系

将浓度为2、5、10、20、50、100和200 µg/L混合标准工作液,按1.2项下的分析条件进行测定,内标法制作校准曲线,如图5~图6所示。

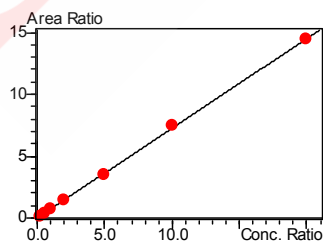


图5 喹噁啉-2-羧酸的标准工作曲线

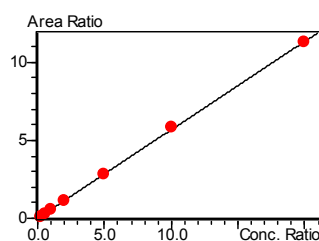


图6 3-甲基喹噁啉-2-羧酸的标准工作曲线

表 3 2 种物质的校准曲线参数

No.	名称	线性范围	校准曲线	相关系数 R
1	喹噁啉-2-羧酸	2~200 µg/L	$Y = (0.725519)X + (-0.00569246)$	0.9998
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	2~200 µg/L	$Y = (0.566103)X + (0.0147298)$	0.9998

2.4 检出限和定量限

配制 2 µg/L 的混合标样 7 份，进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 MDL=3.14×S，定量限 LOQ=4×MDL。

表 4 2 种物质的检出限与定量限(n=7)

No.	名称	标准偏差(S)	检出限(µg/L)	定量限(µg/L)
1	喹噁啉-2-羧酸	0.087	0.27	1.09
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	0.073	0.23	0.92

2.5 精密度实验

配置如表 4 浓度的混合标液，重复进样 6 次。2 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.14~0.50%和 1.32~4.91%之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

No.	名称	RSD% (2 µg/L)		RSD% (20 µg/L)		RSD% (200 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	喹噁啉-2-羧酸	0.42	4.91	0.28	2.56	0.14	1.32
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	0.50	2.91	0.33	2.58	0.18	1.32

2.5 基质加标实验

按照 1.3.2 中样品制备方法，加标含量如表 6，各平行 4 次。测试结果显示：牛奶样品的加标回收率在 72.8~80.0%之间；奶粉样品的加标回收率在 77.8~94.2%之间；具体结果如表 6。样品的色谱图如图 7、图 9 所示，加标样品的色谱图如图 8、图 10 所示。

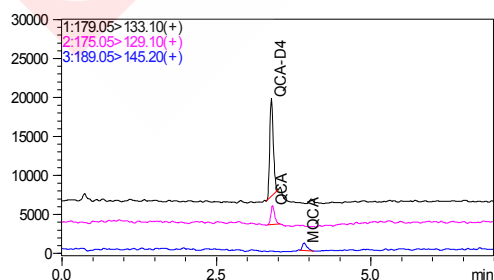


图 7 牛奶样品的色谱图

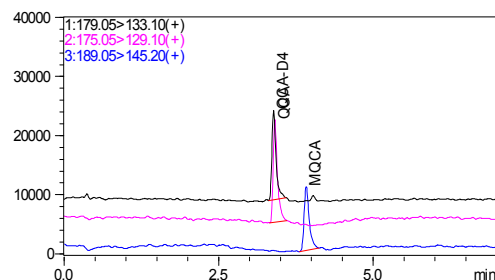


图 8 4 µg/kg 牛奶基质加标样色谱图

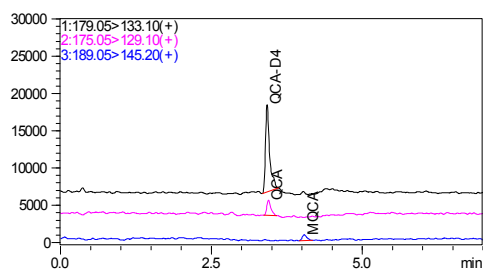


图9 奶粉样品的色谱图

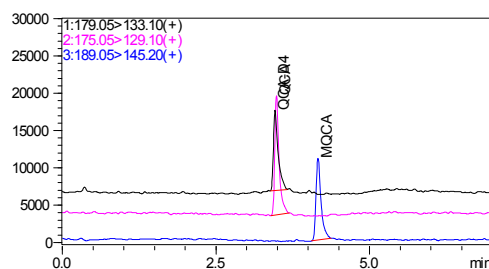


图10 32 µg/kg 奶粉基质加标样色谱图

表6 加标样的回收率结果(n=4)

No.	样品名称	牛奶样品		奶粉样品			
		样品	回收率 (1 µg/kg)	回收率 (4 µg/kg)	样品	回收率 (32 µg/kg)	回收率 (240 µg/kg)
1	喹噁啉-2-羧酸	0.51µg/kg	72.8%	74.9%	4.09µg/kg	77.8%	79.6%
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	0.36µg/kg	80.0%	78.5%	1.64µg/kg	89.0%	94.2%

3. 结论

使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8040联用测定牛奶与奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物（喹噁啉-2-羧酸和3-甲基喹噁啉-2-羧酸）的残留量，喹噁啉-2-羧酸和3-甲基喹噁啉-2-羧酸的线性良好，相关系数均大于0.999；其检出限分别为0.27 µg/L和0.23 µg/L，定量限分别为1.09 µg/L和0.92 µg/L；牛奶基质加标的回收率在72.8~80.0%之间；奶粉样品的加标回收率在77.8~94.2%之间；完全满足《GB/T 22984-2008 牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》的要求。

超高效液相色谱三重四极杆质谱测定乳制品中呋喃苯烯酸钠 残留量

摘要：本文建立了岛津三重四极杆质谱仪LCMS-8040测定乳制品中呋喃苯烯酸钠残留量的分析方法。样品采用乙腈提取，正己烷萃取净化，采用MRM多反应监测进行定性定量分析。采用乳制品空白基质配制呋喃苯烯酸钠标准工作溶液，以外标法定量，在1~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内，校准曲线线性良好。对呋喃苯烯酸钠标准品低、中、高浓度进行系统稳定性考察，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.07%~0.107%和0.98%~1.51%之间系统精密度良好。考察牛奶样品分析及加标实验，1 $\mu\text{g/kg}$ 呋喃苯烯酸钠加标样的回收率为86.4%。

关键词：呋喃苯烯酸钠 乳制品 三重四极杆质谱

呋喃苯烯酸钠（Sodium nifurstylenate, CAS#54992-23-3），属于硝基呋喃类药物，是人工合成的一种广谱抗菌药物，主要用于动物和鱼类的细菌预防和治疗中，有良好的效果。但是，世界卫生组织和联合国粮农组织联合报道硝基呋喃类药物具有潜在的致突变和致癌性。为保护消费者的健康，世界各国纷纷禁止硝基呋喃类药物在食品动物上的使用。然而，这些药物的违法使用现象仍然存在。

目前，国内外色谱法对呋喃苯烯酸钠残留检测主要采用HPLC-UV作为检测手段，而HPLC法由于检测灵敏度低、前处理操作繁琐费时，不能满足进出口贸易中各国对呋喃苯烯酸钠残留限量要求。因此，为保证我国有关食品的进出口贸易，促进呋喃苯烯酸钠残留监控工作的顺利开展，建立一种快速简便、灵敏度高、准确度好的检测方法势在必行。

本文使用岛津LCMS-8040三重四极杆质谱，参考《SN/T 2451-2010 动物源性食品中呋喃苯烯酸钠残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》，建立了UHPLC-MS/MS法检测乳制品中呋喃苯烯酸钠残留。采用乙腈提取，正己烷萃取净化，方法简便、快速，可用于乳制品进出口样品的监控和检测。

1. 实验部分

1.1 仪器

实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为：LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mmI.D.×50 mmL., 1.6 μm

流速：0.2 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40℃

流动相：A-0.1%甲酸水；B-乙腈

洗脱方式：梯度洗脱， B 相初始浓度 45%，梯度洗脱见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	45
1.00	Pumps	Pump B Conc.	80
2.50	Pumps	Pump B Conc.	80
2.51	Pumps	Pump B Conc.	45
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，负离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 20 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：450℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：150 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2. MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
呋喃苯烯酸钠	258.00	214.05*	13.0	12.0	21.0

184.05

13.0

17.0

18.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 样品前处理方法

参考《SN/T 2451-2010 动物源性食品中呋喃苯烯酸钠残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》前处理方法。

称取约 5 g 牛奶试样，置于 50 mL 聚丙烯具塞离心管中，加入 5 g 无水硫酸钠混匀后，加入 25 mL 乙腈，涡旋混匀 30 s，超声提取 5 min，于 4000 r/min 离心 5 min。上清液转移至 50 mL 容量瓶中。残渣依上述方法再提取一次，合并上清液，混匀后用乙腈定容至 50 mL。移取 10 mL 提取液，于 40℃ 氮气吹至近干，加入 1.0 mL 0.1% 甲酸溶液+乙腈 (4:1) 溶液涡旋 30 s 溶解残渣。

向溶解液中加入 3 mL 乙腈饱和正己烷，震荡后静置分层，取下层溶液于 9500 rpm 离心 5 min，过滤上机测试。

1.3.2 标准溶液配制

用甲醇配制 10 mg/L 的混合标准中间溶液，用乳制品空白基质溶液稀释成浓度为 1, 10, 25, 50, 100 μg/L 标准工作液。

2. 结果讨论

2.1 呋喃苯烯酸钠标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

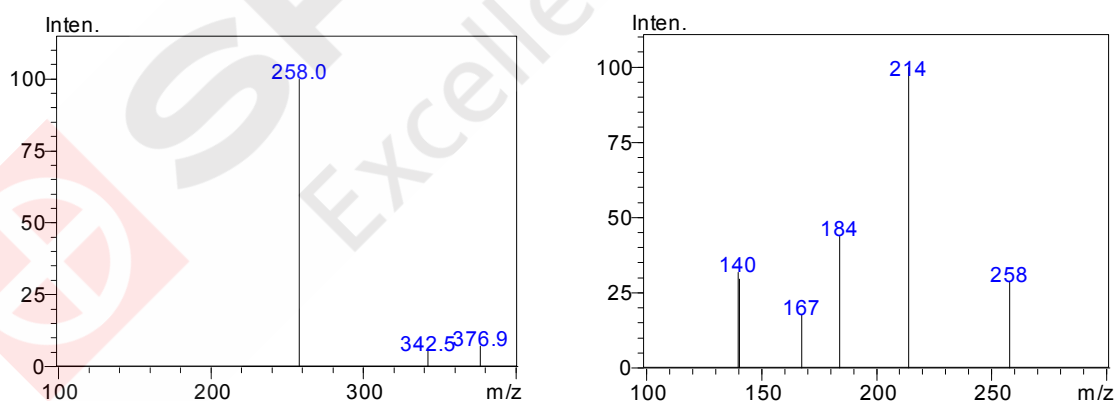
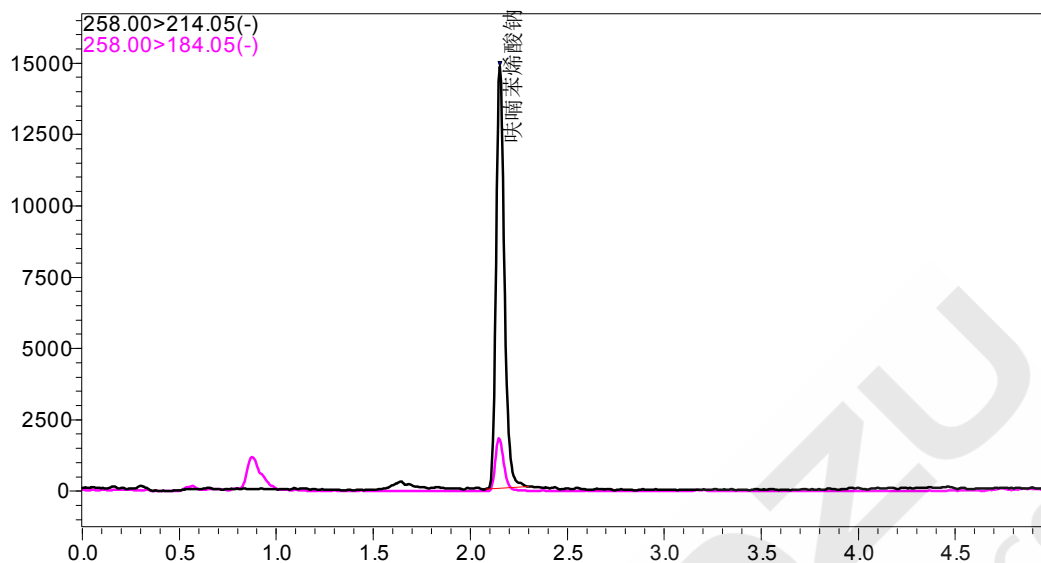


图 1. 呋喃苯烯酸钠的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为 15V）（右图）

2.2 标准溶液的 MRM 色谱图

呋喃苯烯酸钠标准溶液 MRM 色谱图如图 2 所示。

图 2. 呋喃苯烯酸钠 1 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 以 1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/L}$ 标准工作液浓度点, 采用外标法建立校准曲线, 如图 3 所示呋喃苯烯酸钠在线性浓度范围内, 线性相关性良好, 相关系数为 0.9993。

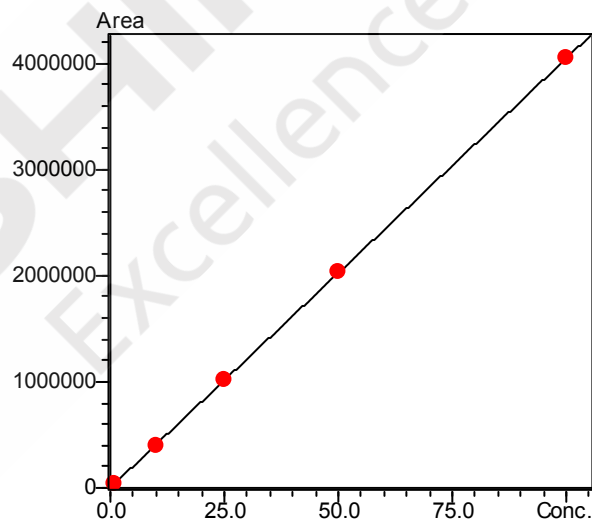


图 3. 呋喃苯烯酸钠校准曲线

表 3. 呋喃苯烯酸钠的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (R)
1	呋喃苯烯酸钠	$Y = (40451.8)X + 2490.94$	1.0-100	0.9999

2.4 检出限和定量限

配制 7 份 1 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液，进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 $\text{MDL}=3.14\times\text{S}$ ，定量限 $\text{LOQ}=4\times\text{MDL}$ 。测定结果如表 4 所示：

表 4. 呋喃苯烯酸钠的检出限和定量限

名称	浓度 ($\mu\text{g/L}$)	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量限($\mu\text{g/L}$)
呋喃苯烯酸钠	1.0	0.011	0.035	0.14

2.5 精密度实验

配制低中高浓度的混合标样依次平行测定 6 次，呋喃苯烯酸钠的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.07%~0.107%和 0.98%~1.51%之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表 5. 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (1 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (25 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (100 $\mu\text{g/L}$)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
呋喃苯烯酸钠	0.107	0.98	0.07	1.19	0.091	1.51

2.6 实际样品分析及回收率实验

将所建立的分析方法用于实际样品分析，检测牛奶样品，未检测到呋喃苯烯酸钠。图 4 为牛奶样品的 MRM 色谱图。在牛奶样品中添加浓度为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 的混合标准溶液，加标样品 MRM 色谱图如图 5 所示，加标回收率结果见表 6。

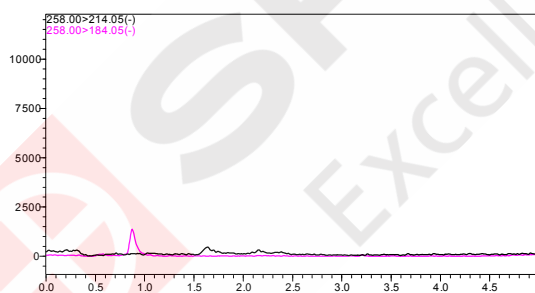


图 4. 牛奶样品的呋喃苯烯酸钠 MRM 色谱图

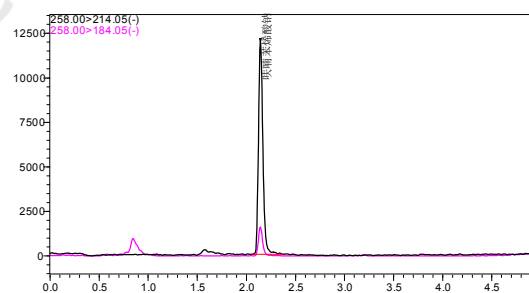
图 5. 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 呋喃苯烯酸钠基质加标 MRM 色谱图

表 6. 牛奶样品呋喃苯烯酸钠检测与加标回收结果

编号	名称	检测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	理论浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)
1	呋喃苯烯酸钠	N.D.	1.0	0.864	86.4

注：N.D.表示未检出

3. 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定乳制品中呋喃苯烯酸钠残留量的分析方法。呋喃苯烯酸钠在 1~100 $\mu\text{g/L}$ 线性范围内线性良好，相关系数达到 0.9999。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.07%~0.107%和 0.98%~1.51%之间，仪器精密度良好。考察牛奶样品分析及加标实验，呋喃苯烯酸钠的回收率范围为 86.4%，可以满足乳制品中呋喃苯烯酸钠残留量的检测需求。



SHIMADZU
Excellence in Science

GPC-GC-MS/MS联用法测定奶粉中有机氯农药含量

摘要： 本文利用岛津公司在线凝胶色谱串联三重四极杆气质联用仪 GPC-GC-MS/MS 测定奶粉中有机氯农药残留含量。在 1~50 $\mu\text{g/L}$ 标准曲线浓度范围内各组分线性关系良好，相关系数 r 大于 0.9997；重复性良好，1 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液连续 5 针进样，峰面积 RSD 均小于 5.46%。该方法可用奶粉中有机氯农药残留的快速定性定量测定。

关键词： 在线凝胶色谱串联三重四极杆气质联用仪 GPC-GC-MS/MS 奶粉 有机氯农药残留

有机氯农药在上世纪50年代至80年代应用广泛，因其不易被物理、化学和微生物等因素的作用而降解，属于持久性有机污染物，可以在环境中长期存留，且可以通过食物链蓄积和逐级传递，进入有机体的脂肪组织，当积累到一定浓度，会干扰人体正常的内分泌功能，导致各种内分泌疾病和异常。

现行国标《GB/T 23210-2008 牛奶和奶粉中511种农药及相关化学品残留量的测定》中对奶粉的方法检出限为4.2 $\mu\text{g/kg}$ ~2.0 mg/kg 。最新发布的强制性国家标准《GB 23200.86-2016 食品安全国家标准 乳及乳制品中多种有机氯农药残留量的测定》中对奶粉的方法检出限为0.8 $\mu\text{g/kg}$ 。

乳制品中因含脂肪成分，分析时需要复杂的净化过程，采用GPC-GC-MS/MS系统可以对乳制品进行在线净化，有效的简化样品前处理过程。同时结合GC-MS/MS的MRM采集方法，可以减少基质干扰，降低检出限。本文采用二者联用，为奶粉中有机氯农药残留检测提供了一种简单可靠的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器

岛津在线凝胶色谱串联三重四极杆气质联用仪（GPC-GC-MS/MS）

1.2 分析条件

GPC 条件：

色谱柱：Shodex CLNpak EV-200（2.1 mm ×150 mm ）

流动相：丙酮/环己烷（3/7，V/V）；流速：0.1 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量：10 μL

GC-MS/MS 条件：

色谱柱：惰性石英管：5 m ×0.53 mm

预柱：Rtx-5 MS, 5m×0.25mm×0.25μm

分析柱：Rtx-5 MS, 25m×0.25mm×0.25μm

柱温程序：82℃(5min)_8℃/min_300℃(7.75min)

PTV 进样口温度程序：120℃(5min)_100℃/min_250℃(33.7min)

进样口压力程序：120kPa(0min)_100kPa/min_180kPa(4.4min)_(-49.8 kPa/min)_120kPa (33.8min)

隔垫吹扫程序：5.0mL/min_(-10mL/min)_ 0 mL/min(6min)_10mL/min_5mL/min(5min)

不分流进样时间：7min；溶剂切割时间：9.7min

接口温度：300℃；离子源温度：200℃

采集方式：MRM，采集条件见表 1

1.3 样品制备

样品前处理流程图如图1所示。

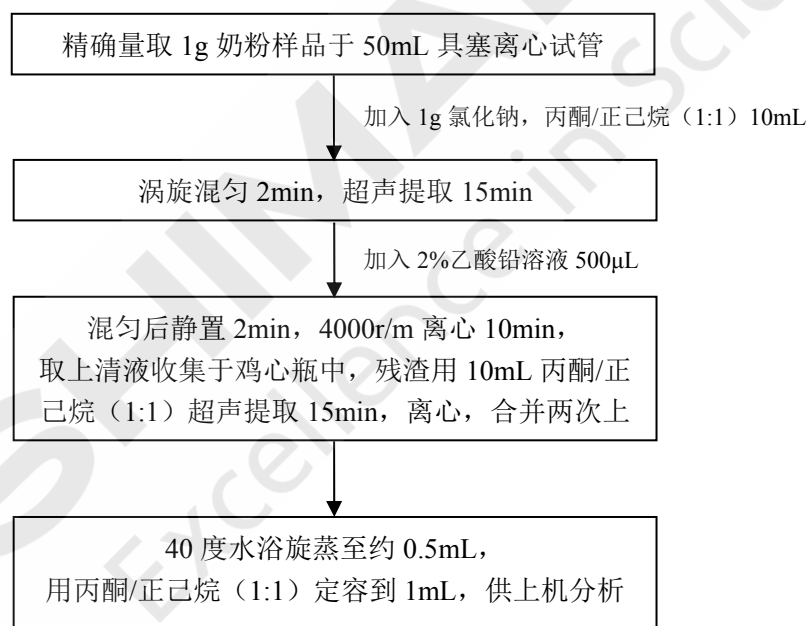


图1. 样品前处理流程图

表 1. 农药组分保留时间及 MRM 参数

No.	名称	英文名称	CAS	保留时间	定量离子 (CE)	定性离子 (CE)
1	α-六六六	alpha-HCH	319-84-6	18.296	219>183(8)	219>145(18)
2	β-六六六	beta-HCH	319-85-7	19.037	219>183(8)	219>147(20)
3	γ-六六六	gamma-HCH (Lindane)	58-89-9	19.247	219>183(8)	219>147(20)
4	δ-六六六	delta-HCH	319-86-8	20.077	219>183(10)	219>145(22)
5	七氯	七氯	76-44-8	21.224	272>237(20)	272>117(32)
6	艾氏剂	Aldrin	309-00-2	22.178	263>193(28)	263>203(26)

7	环氧七氯	Heptachlor epoxide	1024-57-3	23.216	353>263(14)	353>282(12)
8	反-氯丹	trans-Chlordane	5103-74-2	23.832	373>337(10)	373>143(26)
9	顺-氯丹	cis-Chlorden	5103-71-9	24.162	373>266(22)	373>337(6)
10	α -硫丹	alpha-Endosulfan	959-98-8	24.171	339>160(18)	339>267(4)
11	p,p'-DDE	p,p'-DDE	72-55-9	24.742	246>176(28)	246>211(22)
12	狄氏剂	Dieldrin	60-57-1	24.869	277>241(8)	277>170(38)
13	异狄氏剂	Endrin	72-20-8	25.403	263>191(30)	263>193(28)
14	β -硫丹	beta-Endosulfan	33213-65-9	25.691	339>267(8)	339>160(16)
15	p,p'-DDD	p,p'-DDD	72-54-8	25.812	235>165(24)	235>199(14)
16	异狄氏剂醛	Endrin aldehyde	7421-93-4	26.057	345>317(10)	347>319(10)
17	硫丹硫酸盐	Endosulfan sulfate	1031-07-8	26.65	387>289(10)	387>253(16)
18	p,p'-DDT	p,p'-DDT	50-29-3	26.751	235>165(22)	235>199(14)
19	异狄氏剂酮	Endrin ketone	53494-70-5	27.832	315>279(10)	317>281(10)
20	甲氧滴滴涕	Methoxychlor	72-43-5	28.132	227>169(24)	227>212(14)

2 结果讨论

2.1 标准谱图

20种有机氯农药混标溶液 MRM 图如图 2 所示。

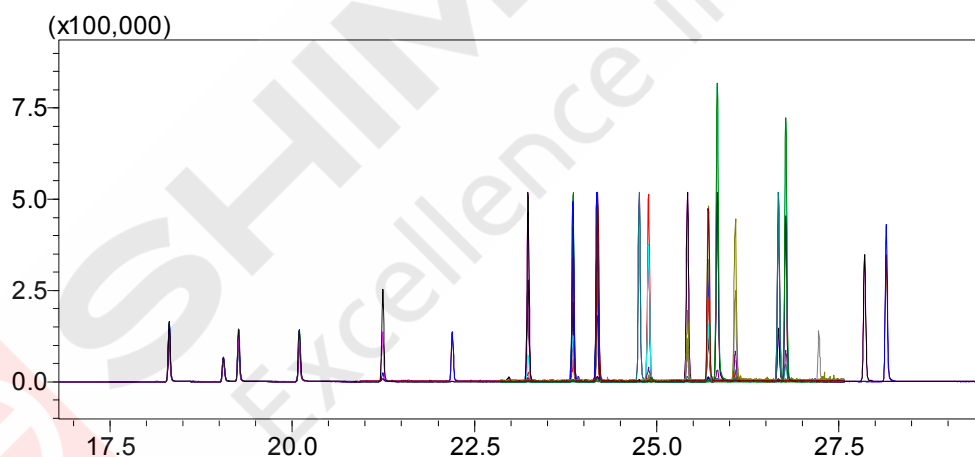
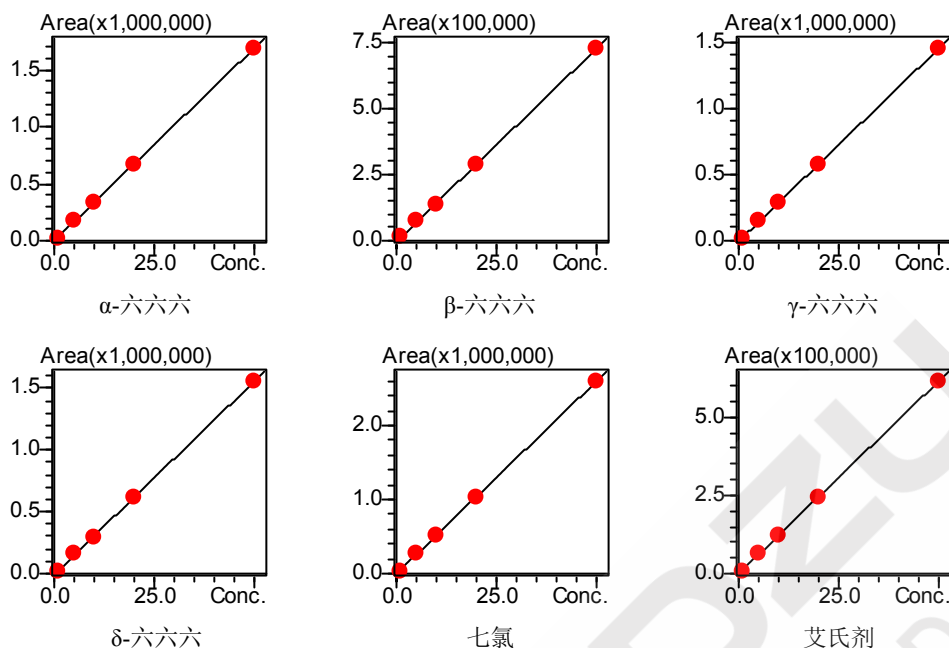


图 2. 有机氯农药混标 MRM 图 (10 μ g/L)

2.2 标准曲线

使用丙酮/环己烷 (3/7, V/V) 配制农药混合标准系列, 浓度分别为 1、5、10、20、50 μ g/L, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 制作标准曲线。因篇幅所限, 部分农药组分标准曲线如下所示, 各组分标准曲线相关系数如表 2 所示。



2.3 检出限及重复性

根据 1 μ g/L 标准溶液数据，计算仪器检出限（3 倍噪声计算）。因篇幅所限，部分农药组分（1 μ g/L）MRM 图如下所示。各组分检出限见表 2，且面积重复性良好。

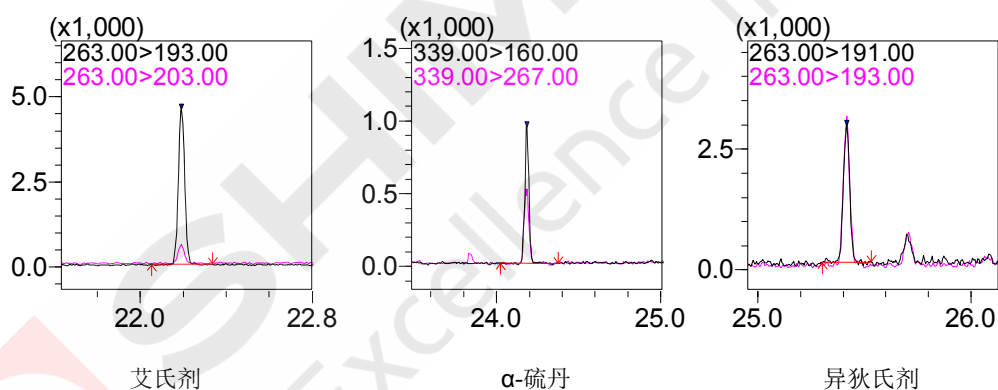


表 2. 各组分检出限及面积重复性 (n=5)

No.	化合物	相关系数	检出限 (μ g/L)	%RSD	No.	化合物	相关系数	检出限 (μ g/L)	%RSD
1	α -六六六	0.9999	0.002	2.67	11	p,p'-DDE	0.9999	0.002	2.14
2	β -六六六	0.9999	0.005	3.59	12	狄氏剂	0.9999	0.010	3.90
3	γ -六六六	0.9999	0.002	4.10	13	异狄氏剂	0.9998	0.106	3.72
4	δ -六六六	0.9999	0.003	2.25	14	β -硫丹	0.9999	0.072	3.98
5	七氯	0.9999	0.001	3.13	15	p,p'-DDD	0.9999	0.003	3.26
6	艾氏剂	0.9999	0.014	3.01	16	异狄氏剂醛	0.9998	0.098	4.37
7	环氧七氯	0.9999	0.008	4.77	17	硫丹硫酸盐	0.9999	0.020	3.29
8	反-氯丹	0.9999	0.010	4.90	18	p,p'-DDT	0.9998	0.004	3.40
9	顺-氯丹	0.9999	0.003	3.68	19	异狄氏剂酮	0.9999	0.009	2.44

10	α -硫丹	0.9997	0.026	5.46	20	甲氧滴滴涕	0.9998	0.004	3.99
----	--------------	--------	-------	------	----	-------	--------	-------	------

2.4 回收率

将有机氯农药混标溶液添加到奶粉样品中（市售某品牌奶粉），按照样品前处理方法制备，样品中加标浓度分别为 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平行制样 3 次，回收率结果见表 3。

表 3. 样品测试结果及加标回收率

No.	化合物名称	检测结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)			平均值 (%)	RSD% (n=3)
			1	2	3		
1	α -六六六	N.D	73.23	75.00	74.03	74.09	1.20
2	β -六六六	N.D	91.85	94.61	92.75	93.07	1.51
3	γ -六六六	N.D	78.79	79.12	79.82	79.24	0.66
4	δ -六六六	N.D	82.94	84.54	83.63	83.70	0.96
5	七氯	N.D	75.43	76.85	75.61	75.96	1.02
6	艾氏剂	N.D	73.74	75.51	74.86	74.70	1.20
7	环氧七氯	N.D	76.36	77.08	76.30	76.58	0.57
8	反-氯丹	N.D	74.84	77.36	71.26	74.49	4.12
9	顺-氯丹	N.D	74.55	75.32	70.84	73.57	3.26
10	α -硫丹	N.D	76.38	75.34	66.39	72.71	7.56
11	p,p'-DDE	N.D	77.90	77.89	80.43	78.74	1.86
12	狄氏剂	N.D	74.49	71.53	72.06	72.69	2.17
13	异狄氏剂	N.D	81.08	76.51	77.28	78.29	3.12
14	β -硫丹	N.D	79.39	73.44	72.17	75.00	5.14
15	p,p'-DDD	N.D	81.22	81.18	82.91	81.77	1.21
16	异狄氏剂醛	N.D	36.26	34.45	41.02	37.24	9.11
17	硫丹硫酸盐	N.D	74.62	74.69	77.52	75.61	2.18
18	p,p'-DDT	N.D	70.81	70.61	74.32	71.91	2.91
19	异狄氏剂酮	N.D	74.07	71.17	80.02	75.09	6.02
20	甲氧滴滴涕	N.D	72.87	72.29	74.49	73.22	1.55

3 结论

采用岛津公司在线凝胶色谱串联三重四极杆气质联用仪（GPC-GC-MS/MS）对奶粉中有机氯农药残留进行定性定量分析。该方法前处理操作简单，重复性好，灵敏度高，在 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标浓度下，大部分农药的回收率在 71.91~93.07%之间，本方法可以用于奶粉中有机氯农药的定性定量检测。

乳制品中非法添加 和滥用物质检测



SHIMADZU
Excellence in Science

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法

测定奶粉中的双氰胺残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定奶粉中双氰胺的方法。奶粉样品经提取和净化后,用超高效液相色谱 LC-30A 进行分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定性和定量分析。双氰胺在 1 $\mu\text{g/L}$ ~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好,标准曲线的相关系数为 0.9997;对 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 低中高不同浓度的混合标准工作液连续测定 6 次,保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.11%~0.12%和 0.93%~2.78%之间,仪器精密度良好。

关键词: 奶粉 双氰胺 三重四极杆质谱

双氰胺(dicyandiamide, 缩写 DCD)也称二聚氰胺,或者二氰二胺,常用作化工原料,医药及染料中间体。近年来,双氰胺的应用领域还在不断地扩展。2013 年 1 月 24 日,新西兰初级产业部(MPI)宣布,该国牛奶和奶粉中发现存在低毒的化学物质双氰胺残留,新西兰政府已经下令禁止含有双氰胺的奶制品销售和出口。MPI 表示,为了保持草场的肥沃,农民会在牧场喷洒双氰胺,以防止因人工施用的肥料中对人体有害物质硝酸盐流入河流和湖泊。由于牧草含有双氰胺,导致牛奶中双氰胺的残留。

高效液相色谱-串联质谱联用技术灵敏度高,适合于复杂基体中的有机物痕量分析。本文建立了一种用于检测奶粉中双氰胺的方法,包括样品前处理和 LC-MS/MS 方法,可实现乳制品中双氰胺残留快速准确检测。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: InertsilAmide 2.1 mm I.D. \times 150mm L., 3 μm

流动相 A: 含 0.2%乙酸和 10 mM 乙酸铵的水溶液

流动相 B: 含 0.2%乙酸的乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 97%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	Pumps	Pump B Conc.	97
2.70	Pumps	Pump B Conc.	70
2.90	Pumps	Pump B Conc.	70
2.91	Pumps	Pump B Conc.	97
5.00	Controller	Stop	

流速: 0.4mL/min; 柱温: 40°C; 进样量: 10 µL

质谱条件

离子化模式: ESI(+); 离子喷雾电压: 4.5 kV; 雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min; 碰撞气: 氦气; DL 温度: 250°C

加热模块温度: 450°C; 扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 100 msec; 延迟时间: 3 msec

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	DL	Qarray	Q1 Pre	CE(V)	Q3 Pre
			Bais(V)	Bais(V)	Bais(V)		Bais(V)
双氰胺	85.2	68.1*	25	25	-17	-18	-28
		43.1	25	25	-17	-16	-16

*表示定量离子

1.3 标准品溶液的配制及样品前处理

标准工作溶液配制:

用乙腈配制 20 mg/L 的混合标准中间溶液, 再用乙腈稀释成 1 µg/L、2 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/L 不同浓度的混合标准工作液。

奶粉样品前处理:

准确称取 1 g 奶粉, 用 2 mL 热水溶解, 加入约 8 mL 乙腈定容到 10 mL, 漩涡混合 2 min, 于 4000 rpm 离心 10min。取 4mL 上清液, 加入 dSPE 双氰胺净化管中, 漩涡混合 30 秒。静置 2 min, 取上清液旋转蒸发至近干, 用乙腈定容至 1 mL。在混合器上混匀后, 用 0.22µm 滤膜过滤,

待测。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

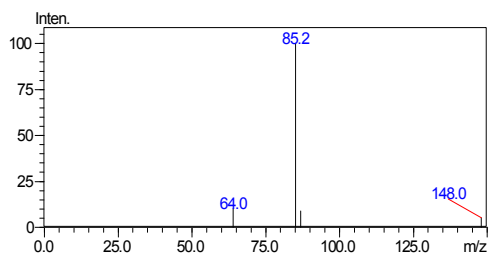


图1 双氰胺的一级质谱图

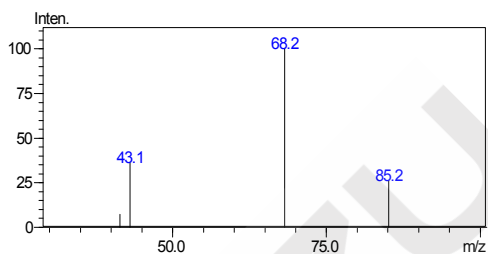


图2 双氰胺的产物离子扫描质谱图(CE值-18V)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

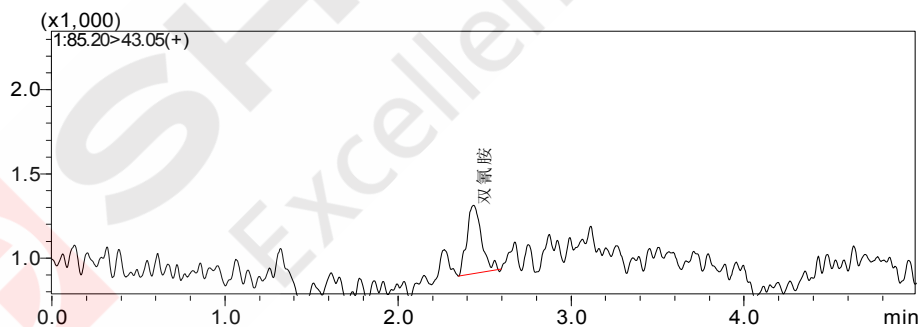
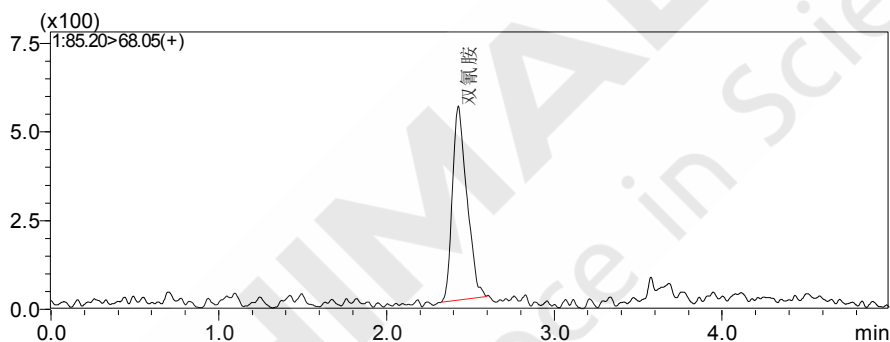


图3 1 µg/L 双氰胺标准样品的色谱图

2.3 线性关系

1 µg/L、2 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/L 不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 4 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程为 $Y = (4985.44)X$ ；相关系数 $R=0.9997$ 。

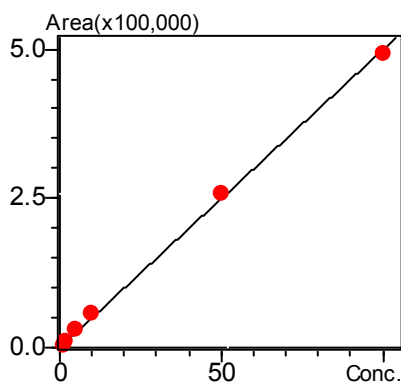


图4 双氰胺校准曲线

2.4 精密度试验

对 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.11%~0.12%和 0.93%~2.78%之间，仪器精密度良好。

表 3 双氰胺保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

Conc.($\mu\text{g/L}$)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
5	0.12	2.78
10	0.11	1.35
50	0.12	0.93

2.5 灵敏度实验

为了考察仪器灵敏度，配制浓度为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 测试样品 7 份，平行进样 7 次分析结果。由 7 次进样测定的标准偏差(S)计算出检测限和最低定量浓度，此时检出限 $\text{MDL}=3.14\times\text{S}$ ，定量下限 $\text{LOQ}=4\times\text{MDL}$ 。测定结果如表 4 所示。

表 4 双氰胺的检出限和定量下限

名称	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量下限($\mu\text{g/L}$)
双氰胺	0.08	0.24	0.96

2.6 回收率实验

取空白奶粉样品 1 g，加入少量双氰胺标准溶液，使加标浓度均为 50 $\mu\text{g/kg}$ ，样品经提取与净化后，按照 1.2 中的分析条件进行测定双氰胺的加标回收率。空白奶粉样 MRM 色谱图如 5 所示，加标样品 MRM 色谱图如 6 所示，回收率为 71%。

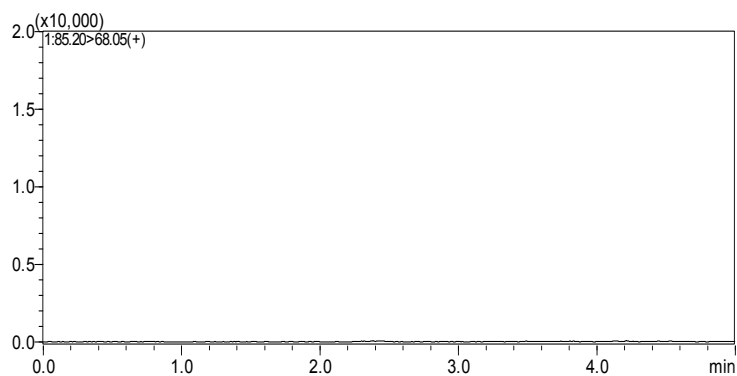


图 5 空白奶粉样品 MRM 色谱图

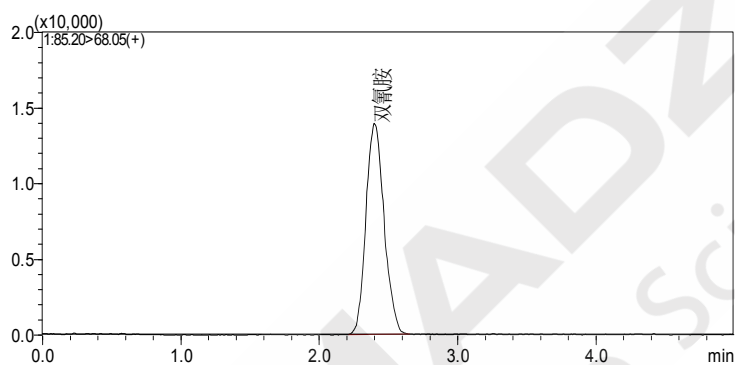


图 6 50 µg/kg 加标样品 MRM 色谱图

3 结论

建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪LCMS-8040测定奶粉中双氰胺的方法。奶粉样品经提取和净化后,用超高效液相色谱LC-30A进行分离,三重四极杆质谱仪LCMS-8040进行定性和定量分析。双氰胺在1 µg/L~100µg/L浓度范围内线性良好,对低中高不同浓度混合标准工作液连续测定6次,保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.12%和2.78%以下。本方法操作简单,可用于乳制品中双氰胺的快速准确检测,实现高通量的产品筛查。

三重四极杆质谱测定乳制品中舒巴坦的含量

摘要: 本文建立了岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 测定乳制品中舒巴坦含量的方法。舒巴坦的线性良好, 相关系数大于 0.998; 仪器精密度良好, 其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.34% 和 3.84%; 其检测限和定量限分别为 0.01 和 0.04 ng/mL。加标浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 回收率在 92.7~116.6% 之间。该方法可准确、快速地检测牛奶中舒巴坦的含量。

关键词: 牛奶 舒巴坦 三重四极杆质谱仪

牛奶是老少皆宜的营养品。牛奶中若含有抗生素, 对长期饮用者来说无疑是等于长期服用小剂量的抗生素。2001 年 10 月, 农业部发布实施了 NY-5045-2001 《无公害食品生鲜牛乳》标准, 明确了新鲜牛乳的卫生指标—抗生素不得检出。然而就中国奶牛饲养环境而言, 牛奶的绝对“无抗”较难达到。针对这种情况, 市场上出现了“解抗剂”, 该分解剂可选择性分解牛奶中残留的 β -内酰胺抗生素, 其成分就是 β -内酰胺酶。针对这种现象, 2009 年 3 月 6 日卫生部颁发了《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近期工作重点及要求》, 明确规定乳及乳制品中添加 β -内酰胺酶属于违法行为。不法分子为了逃避 β -内酰胺酶的检测又在牛奶中加入 β -内酰胺酶抑制剂, 使 β -内酰胺酶失去活性, 导致 β -内酰胺酶阳性的牛奶不能被检出而逃避责任。

舒巴坦属于 β -内酰胺酶抑制剂, 对青霉素酶和头孢菌素酶有强的不可逆的抑制作用, 抑制剂清除后也不能使酶的活性得到恢复。因此有必要研究乳制品中 β -内酰胺酶抑制剂舒巴坦的检测方法。目前国家食品安全风险抽样已把舒巴坦列入风险监控项目, 可是, 国家并未出台一些关于舒巴坦的检测方法标准。本文建立了乳制品中舒巴坦的检测方法, 简便, 快速, 灵敏度高, 可应用于乳制品中舒巴坦的检测。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-20AD \times 2(输液泵), DGU-20A3R(在线脱气机), SIL-20A(自动进样器), CTO-20A(柱温箱), CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.60 SP2 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: InertSustain C18 Column (2.1 mm I.D.×100 mm L., 5 μm)

流动相: 水: 乙腈=15: 85 (v/v)

流速: 0.2 mL/min

柱温: 35℃

洗脱方式: 等度洗脱

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI-

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300℃

DL 温度: 200℃

加热模块温度: 400℃

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM), MRM 参数见表 1

表 1. 化合物信息及 MRM 参数

序号	化合物	英文名	CAS	前体离子	产物离子	Q1Pre Bias(V)	CE	Q3Pre Bias(V)
1	舒巴坦	Sulbactam	68373-14-8	232.10	140.10*	16	33	25
					64.00	15	12	27

*表示定量离子

1.3 标样制备

标准工作溶液配制: 用水配制 1 mg/mL 的舒巴坦母液, 用水稀释成 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 ng/mL 的标准工作溶液。

1.4 样品制备

样品前处理方法: 取试样 5 g, 加入 15 mL 0.2%乙酸水溶液, 涡旋 30 s, 超声提取 20 min, 用 0.2%乙酸水溶液定容至 25 mL, 涡旋混匀后, 8000 rpm 离心 10 min, 取上清液待净化。

HLB 固相小柱预先用 5 mL 甲醇、5 mL 0.2%乙酸水溶液进行活化, 取 10 mL 离心上清液流经小柱, 待上清液自然流尽后, 用 5 mL 0.2%乙酸水溶液淋洗, 用吸球吹出小柱中残留液体, 加 5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 氮气吹干, 准确吸取 2 mL 水溶解, 经 0.22 μm 滤膜过滤作为

测定液，用 LCMSMS 测定。

2. 结果讨论

2.1 标准样品 MRM 色谱图

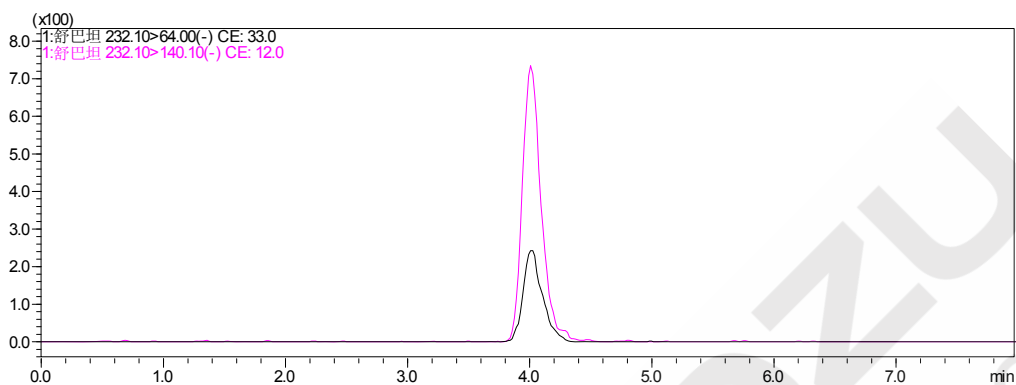


图 1. 1 ng/mL 标准样品 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 ng/mL 的标准溶液，按 1.2 分析条件进行分析，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 2 所示，标准曲线参数见表 2。

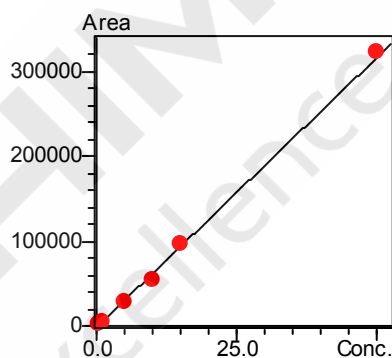


图 2. 舒巴坦标准曲线

表 2. 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	准确度范围 (%)
1	舒巴坦	$Y = 6,239.30X - 1,192.65$	0.9981	86.3~116.4

2.3 重复性实验

配制浓度为 1.0 ng/mL 的标准溶液，平行测试 6 次。舒巴坦的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.34%和 3.84%，仪器精密度良好。

表 2. 重复性数据

ID	1	2	3	4	5	6	Ave	RSD%
----	---	---	---	---	---	---	-----	------

保留时间 (min)	3.991	3.980	3.981	4.011	4.011	3.997	3.995	0.34
峰面积	2,911	2,640	2,788	2,932	2,890	2,861	2,937	3.84

2.4 灵敏度

配制浓度为 0.5 ng/mL 的标样进样分析, 根据 S/N=3 和 10 定义其检出限和定量限, 舒巴坦的检出限和定量限分别为 0.01 和 0.04 ng/mL。

2.5 基质加标实验

按照 1.3 中样品制备方法, 测定空白牛奶, 以及空白牛奶加标含量为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 样品, 平行测定 3 次。扣除空白样品中舒巴坦的浓度, 其加标回收率在 92.7~116.6%之间。图 3 及图 4 分别为空白牛奶及空白牛奶加标浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 舒巴坦的 MRM 色谱图。

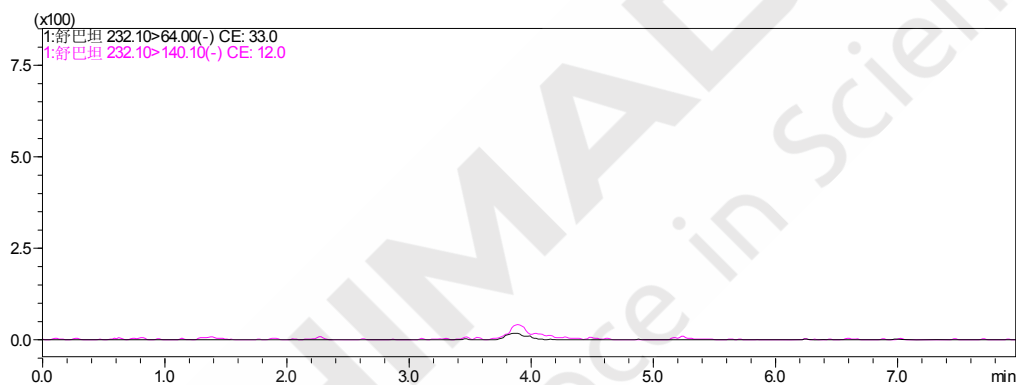


图 3. 空白牛奶 MRM 色谱图

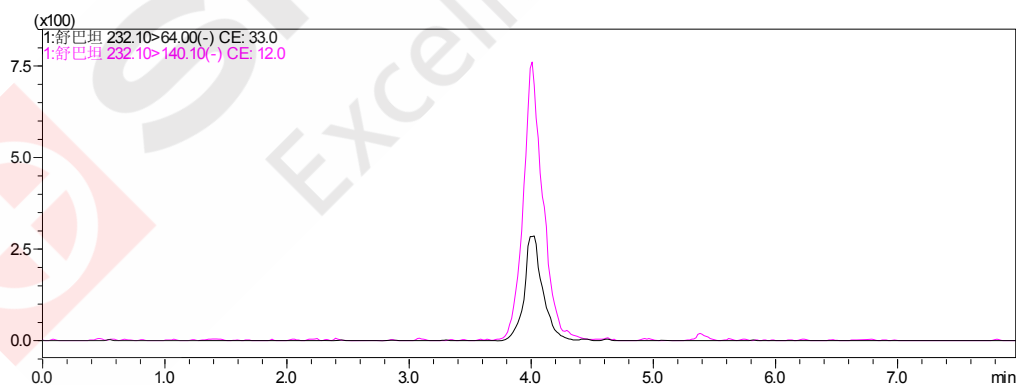


图 4. 空白牛奶加标 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MRM 色谱图

2.6 实际样品测定结果

按照 1.3 中样品制备方法处理某品牌乳制品, 平行测定 3 次, 测得样品中舒巴坦的含量为 0.182 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3. 结论

本文建立了高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术测定乳制品中舒巴坦含量的方法。分析物线性良好，相关系数 r 大于 0.998，检测限和定量限分别为 0.01 和 0.04 ng/mL。仪器的重复性良好，1 ng/mL 混合标准溶液连续进样 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.34% 和 3.84%。空白牛奶及加标样品经过样品前处理后上机分析，回收率在 92.7~116.6% 之间。本法简单、快速、准确，可满足乳制品中舒巴坦含量测定的需求。



SHIMADZU
Excellence in Science

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定婴幼儿奶粉中的香兰素

摘要: 本文建立了使用液相色谱仪-三重四极杆质谱仪测定婴幼儿配方奶粉中甲基香兰素和乙基香兰素的方法。通过高效液相色谱分离,三重四极杆质谱仪进行定量分析两种香兰素,甲基香兰素和乙基香兰素在 1~500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好,标准曲线相关系数均在 0.999 以上;重复性实验表明 2.5 $\mu\text{g/L}$, 25 $\mu\text{g/L}$ 和 250 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液连续进样 6 次,保留时间和峰面积相对标准规偏差分别在 0.5%和 2%以下;甲基香兰素和乙基香兰素的最低定量限分别为 1.00 $\mu\text{g/L}$ 和 0.80 $\mu\text{g/L}$;空白样品中加入 50 $\mu\text{g/kg}$ 甲基香兰素和乙基香兰素,回收率分别为 87.2%和 79.8%。

关键词: 香兰素 婴幼儿奶粉 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

香兰素是重要的食品添加剂,其被广泛用作糖果、饼干、糕点、饮料等食品的增香剂。我国《食品添加剂使用标准 GB 2760-2011》明确规定 0 到 6 个月婴幼儿配方食品中不得添加任何食用香料,引发业内广泛关注。目前,国内外测定香兰素的方法主要有光度法、高效液相色谱法、电化学法等,尚无国标方法。但是这些方法都无法高灵敏度、高选择性地检测婴幼儿奶粉中添加的香兰素。本方法采用高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术测定婴幼儿奶粉中的甲基香兰素和乙基香兰素,具有灵敏度高、选择性好等优点。

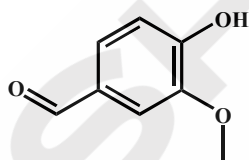


图1 甲基香兰素结构式

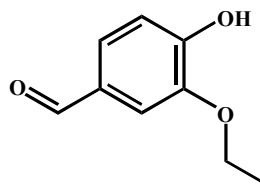


图2 乙基香兰素结构式

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统,包括 LC-30AD \times 2(输液泵), SIL-30AC (自动进样器), CTO-30A (柱温箱), CBM-20A(系统控制器), DGU-20A₅(在线脱气机), LCMS-8040 (三重四极杆液质) 和 LabSolutions Ver 5.50(工作站)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

流动相: A相: 水; B相: 乙腈

流 速： 0.4 mL/min

色 谱 柱： Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmID×50 mm, 1.6 μm

柱 温： 40℃

洗脱方式： 梯度洗脱

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	有机相浓度 (%)
0.0-2.0	10-90
2.0-2.5	90-10
2.5-3.5	10-90

进样量： 5 μL

质谱条件

分析仪器： LCMS-8040；离子源： ESI(-)

离子源接口电压： -3.5 kV；雾化气及干燥气： 氮气 3.0 L/min、20 L/min

碰撞气： 氩气；脱溶剂管温度： 250℃

加热模块温度： 400℃；检测器电压： 1.96 kV

扫描模式： 多反应监测 (MRM)；驻留时间及延迟时间： 25 ms、3 ms

表 2 2 种化合物的 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
甲基香兰素	151.00	136.00*	10	18	25
		92.10	10	20	17
乙基香兰素	165.05	136.00*	20	11	24
		92.10	20	22	14

*表示定量离子

1.3 标准溶液的配制及样品前处理

标准溶液配制：称取 10 mg 的甲基香兰素、乙基香兰素标准品，用乙腈溶于 10 mL 的容量瓶中，配成 1 mg/mL 的母液，经流动相稀释，配制标准溶液浓度系列。

前处理步骤：准确称取奶粉试样 1 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管中，加入 pH=4.5 的水溶液 5 mL，混匀超声提取 5 分钟，加 2%乙酸铅溶液 2 mL，混匀后静置 2 min，8000 rpm/min

离心 10 分钟；取上清液用 5%氨水溶液调节 pH 至中性；将上清液全部加样至活化好的 InertSep MA-1 (GL Sciences) 小柱，然后分别用 3 mL 5%氨水溶液和 3 mL 甲醇淋洗小柱，弃去淋洗液；用 3 mL 5%酸化甲醇洗脱，收集洗脱液氮气吹干，用 1 mL 流动相重新溶解，过滤，待测。

2. 结果讨论

2.1 标准品的 MRM 色谱图

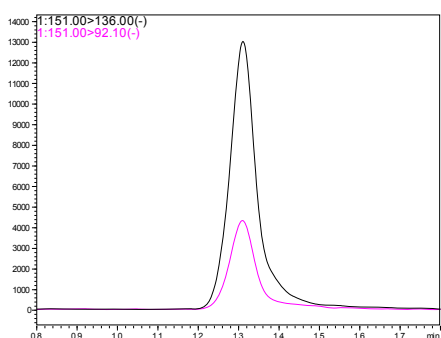


图 3 50 µg/L 甲基香兰素标准品色谱图

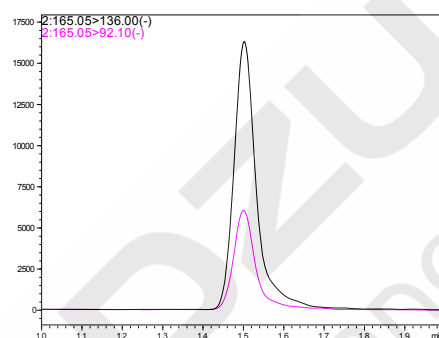


图 4 50 µg/L 乙基香兰素标准品色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 1, 2.5, 10, 25, 250, 500 µg/L 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如下图所示，线性方程及相关系数见表 3。

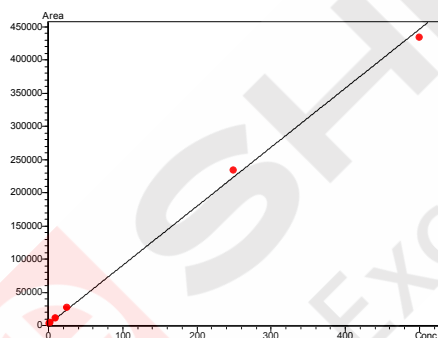


图 5 甲基香兰素标准曲线

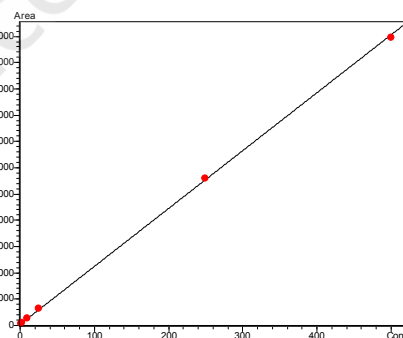


图 6 乙基香兰素标准曲线

表 3 2 种化合物的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数 r
1	甲基香兰素	$Y = (890.177)X + (1638.61)$	0.9991
2	乙基香兰素	$Y = (1101.87)X + (2111.54)$	0.9997

2.3 重复性实验

对 2.5 µg/L, 25 µg/L 和 250 µg/L 混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的重复性，保留

时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。保留时间 RSD%<0.5%，峰面积 RSD%<2%。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	名称	2.5 $\mu\text{g/L}$		25 $\mu\text{g/L}$		250 $\mu\text{g/L}$	
		RSD%	RSD%	RSD%	RSD%	RSD%	RSD%
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	甲基香兰素	0.43	1.67	0.14	1.75	0.11	1.06
2	乙基香兰素	0.37	1.69	0.21	1.43	0.08	1.50

2.4 灵敏度

重复分析 2.5 $\mu\text{g/L}$ (n=7) 标准溶液, 计算 7 次平行测定的标准偏差, 置信度为 99% 时的 t 值取 3.143, 按照 $\text{LOD}=\text{t}\times\text{SD}$ 计算仪器检出限, 4 倍检出限为定量限。仪器检出限和定量限的计算结果见表 5。

表 5 仪器定量限和检出限

编号	名称	RSD%	LOQ	LOD
		Area	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)
1	甲基香兰素	3.20	1.00	0.25
2	乙基香兰素	2.58	0.80	0.20

2.5 回收率实验

按照 1.3 所述方法处理 1 段 (0-6 个月) 婴幼儿奶粉, 未检出甲基香兰素及乙基香兰素, 样品色谱图见图 7。1g 样品中加入 0.05 μg 标准品, 加标色谱图见图 8。甲基香兰素的回收率为 87.2%, 乙基香兰素的回收率为 79.8%。

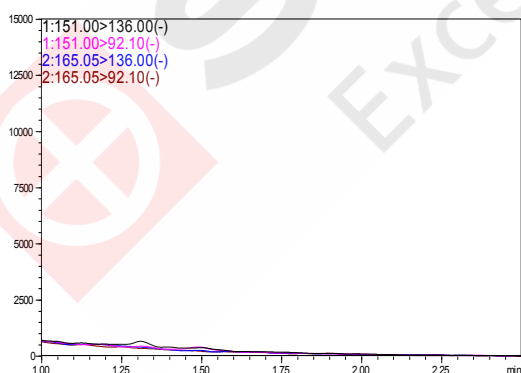


图 7 1 段 (0-6 个月) 婴幼儿奶粉色谱图

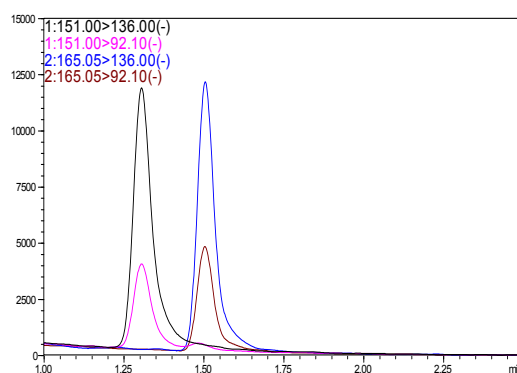


图 8 50 $\mu\text{g/kg}$ 加标样品色谱图

3. 结论

本文建立了超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术同时测定婴幼儿奶粉中甲基香兰素

和乙基香兰素的方法。仪器的重复性良好，不同浓度混合标准溶液连续进样 6 次，保留时间和峰面积相对标准规偏差分别在 0.5%和 2%以下，两种化合物的线性范围 1~500 $\mu\text{g/L}$ ，定量限分别为 1.00 $\mu\text{g/L}$ 和 0.80 $\mu\text{g/L}$ ，空白样品中加入 50 $\mu\text{g/kg}$ 甲基香兰素和乙基香兰素，回收率分别为 87.2%和 79.8%。本方法适合婴幼儿奶粉中香兰素测定。



肪、蛋白等前处理后,可以将青霉噻唑酸钾提取出来,经高效液相色谱仪检测确认其是否存在,从而判定该牛乳是否为人造“无抗奶”。

1.2 仪器与试剂

岛津 UFLC 快速液相系统,包括 LC-20ADXR×2(输液泵),SIL-20ACXR(自动进样器),CTO-20AC(柱温箱),SPD-20AV(紫外可见检测器),CBM-20A(系统控制器),LCsolution(色谱工作站)。

青霉素钾,β-内酰胺酶(2510 benzylpenicillin units/mg protein),Sigma 公司。

甲醇,HPLC 级,Sigma 公司。

磷酸二氢钾,分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.3 分析条件

流动相:甲醇/10 mM 磷酸二氢钾(pH = 4.5) = 40/60

流速:1.0 mL/min;进样体积:2 μL

色谱柱:Shim-pack XR-ODS II 3.0 mm I.D.×75 mm L. 2.2 μm

柱温:40℃;检测波长:230 nm

1.4 标准品溶液的配制及样品前处理

1.4.1 标准溶液配制

称取 50 mg 青霉素钾于 50 mL 容量瓶中,加入 1.6 mg β-内酰胺酶,室温放置 2 h 使青霉素钾酶解完全后用去离子水定容,得到青霉噻唑酸钾标准溶液,浓度 1000 μg/mL。逐级稀释得到 500 μg/mL,100 μg/mL,50 μg/mL,10 μg/mL 的标准溶液。采用 5 点外标法得到青霉噻唑酸钾的校准曲线。

1.4.2 实验步骤

称取 20 g 试样,在 4℃,16000 rpm 条件下离心 30 min。取下层清液 10 g 于 50 mL 塑料离心管,加入无水乙醇 15 mL,振荡提取 30 min 后离心,取清液经 0.45 μm 的滤膜过滤,待测。

2. 结果与讨论

2.1 线性范围及检出限

标准品进样后图谱如下图 2 所示。色谱峰 1 和 2 分别对应于青霉噻唑酸钾和青霉酸钾。同时检测了 β-内酰胺酶,青霉素钾在该条件下的色谱图,见图 3。以浓度为纵坐标,为峰面积横

坐标绘制工作曲线见图 4，结果表明：在此范围内，线性关系良好，相关系数达到了 0.9999。回归方程为 $Y=(72.355)X+(455.8749)$ 。计算机自动计算青霉噻唑酸钾的检测限为 $6.053 \mu\text{g/L}$ ，定量限为 $18.344 \mu\text{g/L}$ 。

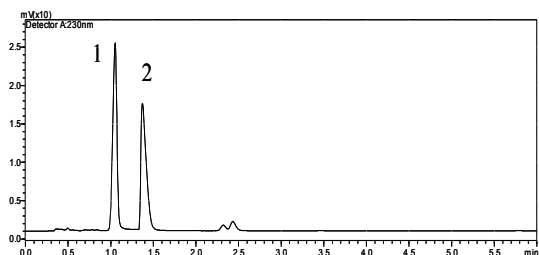


图2 标准溶液色谱图：1.青霉噻唑酸钾 2.青霉素钾

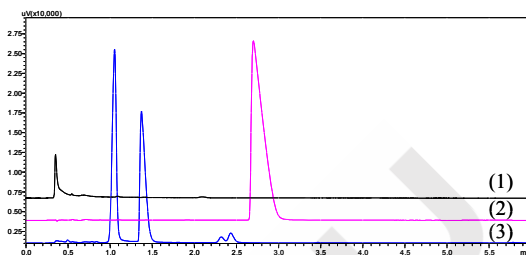


图3 β -内酰胺酶溶液(1)，青霉素钾(2)和青霉噻唑酸钾(3)的色谱图

2.2 精密度试验

100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标样连续测定 5 次，考察方法的精密度。保留时间和峰面积的 RSD% 结果如表 1 所示。

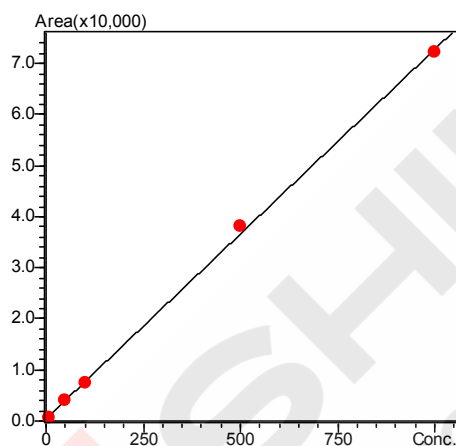


图4 青霉噻唑酸钾的校准曲线

表 1 青霉噻唑酸钾的重现性

No.	RT (min)	Area
1	1.038	8929
2	1.039	8872
3	1.038	8777
4	1.037	8741
5	1.038	8740
Average	1.038	8812
RSD%	0.071	0.962

2.3 实际样品分析结果

按照 1.4 所述方法处理两份阳性样品，测定结果见图 5。两种样品中青霉噻唑酸钾的浓度分别是： $31.2 \mu\text{g/mL}$ 和 $5.4 \mu\text{g/mL}$ ，说明牛奶中添加过 β -内酰胺酶。

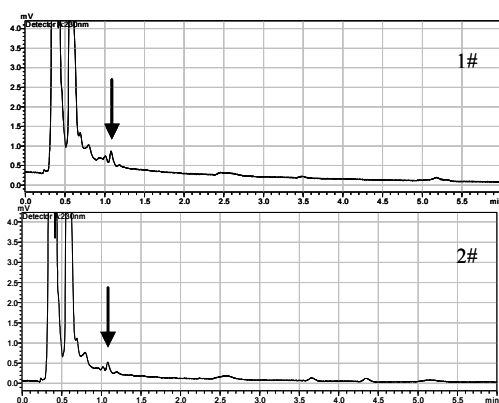


图 5 市售两种品牌牛奶样品的色谱图

3. 结论

本文使用超快速液相 UFLCXR，配合岛津 shim pack XR-ODS II 3.0 mm I.D.×75 mm L，2.2 μm 快速分析色谱柱，测定市售牛奶中青霉噻唑酸钾的含量，标准曲线线性良好，重现性良好，1#样品中青霉噻唑酸钾为 31.2 μg/mL，2#样品中青霉噻唑酸钾为 5.4 μg/mL，说明牛奶中添加过 β-内酰胺酶。

柱后衍生高效液相色谱法测定乳制品中皮革水解蛋白

摘要: 本文使用岛津氨基酸柱后衍生系统锂型分析柱建立了 24 种氨基酸的高效液相色谱柱后衍生分析方法。5 个不同浓度标准品进样(10, 50, 100, 250, 1000ug/L), 对于大多数目标物校准曲线相关系数可达 0.9999; 对于 L(-)-羟脯氨酸, 方法的检测限(S/N=3.3)为 20 ug/L, 定量限(S/N=10)为 50 ug/L。连续 7 针进样(250ug/L, 10uL)保留时间相对标准偏差为 0.01-1.38%, 峰面积相对标准偏差为 0.01-0.83%。取两份牛奶阳性样品检测, 对所含 L-羟脯氨酸含量进行了准确定量。

关键词: 皮革水解蛋白 乳制品 高效液相色谱 柱后衍生

皮革水解蛋白是从动物皮毛中水解出的物质, 能增加食品中氨基酸的含量, 但皮革水解物含有危害人体健康的重金属六价铬, 不能用于食品加工。如果被人体吸收的话, 可能导致中毒、关节肿大、关节疏松肿大。国家卫生部最新印发了《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》, 明令禁止在乳及乳制品中添加皮革水解蛋白。皮革水解蛋白与三聚氰胺不同, 是真正的蛋白质, 若添加到食品当中, 检测起来难度更大。因 L(-)-羟脯氨酸为胶原蛋白中的特有组分, 其含量占胶原蛋白 10%以上; 而乳蛋白中不含有此成分, 如若样品中含有 L(-)-羟脯氨酸, 可判定添加了动物水解蛋白。本文使用岛津氨基酸柱后衍生系统锂型分析柱建立了包括 L(-)-羟脯氨酸的 24 种氨基酸高效液相色谱柱后衍生分析方法, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 原理

柱后衍生系统是欧洲药典收录的氨基酸分析方法。与柱前衍生相比, 柱后衍生方法允许样品中残留少量缓冲溶液, 不易受基质干扰, 适用范围更广泛, 尤其适用于生物样品分析, 衍生反应及色谱检测全自动完成, 同时还具有定量、重现性优异等优点。目前, 氨基酸柱后衍生主要有茚三酮衍生法和邻苯二甲醛(OPA)衍生法两种。前者用紫外检测器测定, 后者用荧光检测器测定, 检出限可达 ppb 级。邻苯二甲醛(OPA)衍生法按照分析柱的不同分为钠型分析系统和锂型分析系统。锂型分析系统对生物样品和食品分析具有更好的选择性, 常用来分析血浆、植物提取物、代谢中间体、生物碱、药物等。

氨基酸样品经锂型阳离子交换色谱柱分离后, 氨基酸链端的一级氨基团与邻苯二甲醛(OPA)和 N-Acetyl-L-cysteine 反应生成一种带荧光基团的产物, 可用荧光检测器定量。N-Acetyl-L-cysteine 较以往使用的 2-巯基乙醇(MERC)而言, 没有恶臭, 配制方便, 同时提高了

方法的灵敏度。

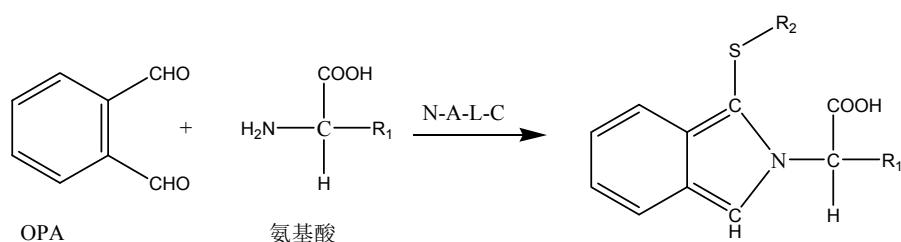


图1 氨基酸柱后衍生检测原理

1.2 试剂与仪器

标准品：24种氨基酸混标，购于Sigma-Aldrich公司。试剂：纯水，Milli-Q超纯水仪制备得到；柠檬酸锂、高氯酸、溴酸、氢氧化锂，AR；N-Acetyl-L-cysteine、Brij-35、邻苯二甲醛(OPA)，购自Sigma-Aldrich；流动相MA：0.15N柠檬酸锂和7% methyl cellosolve用高氯酸调节pH到2.6；流动相MB：0.30N柠檬酸锂和0.20M溴酸用4M氢氧化锂调节pH到10.0；流动相MC：0.20M氢氧化锂；反应液RA：0.4 μL/mL sodium hypochlorite用碳酸-溴酸缓冲溶液调至pH 10.0；反应液RB：0.08%OPA、1.40%乙醇、0.04%Brij-35和0.10%N-Acetyl-L-cysteine用碳酸-溴酸缓冲溶液调至pH 10.0。以上试剂使用当天配制。所有试剂和样品需用0.45 μm以下滤膜过滤。

仪器：Shimadzu 20A氨基酸柱后衍生系统。具体配置为：LC-20AD×2(衍生剂输液泵)，LC-20AB(梯度洗脱输液泵)，SIL-20AC(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，RF-10AXL(荧光检测器)，CBM-20A(控制器)，DGU-20A5(在线脱气机)，FCV-11AL(流路选择阀)。工作站LCSolution。

1.3 分析条件

色谱柱：锂型氨基酸专用分析柱：Shimadzu Shim-Pack AMINO-Li (6.0 mmID x 100 mmL)；锂型捕氨柱 Shimadzu Shim-Pack ISC-30 Li (4.0 mmID x 50 mmL)。

流动相流速：0.6 mL/min；反应液流速：0.2 mL/min；柱温：39℃；进样量：10 μL；波长：Ex=350nm，Em=450nm。梯度洗脱程序如表1所示：

1.4 实验方法

氨基酸混标用流动相MA稀释配制成10, 50, 100, 250和1000 μg/L的溶液。某两种品牌牛奶样品经提取、水解、过滤后待测。

表 1 流动相梯度洗脱程序

<i>Time(min)</i>	<i>Module</i>	<i>Action</i>	<i>Value</i>
16.00	Pumps	Pump A B.Conc	0
18.00	Pumps	Pump A B.Conc	1
22.50	Pumps	Pump A B.Conc	1
22.51	Pumps	Pump A B.Conc	4
22.51	Pumps	Pump A B.Curve	4
50.00	Pumps	Pump A B.Conc	6
50.01	Pumps	Pump A B.Conc	9
64.00	Pumps	Pump A B.Conc	9
64.00	Pumps	Pump A B.Curve	-1
79.00	Pumps	Pump A B.Conc	34
86.00	Pumps	Pump A B.Conc	34
86.01	Pumps	Pump A B.Conc	44
105.00	Pumps	Pump A B.Conc	51
105.01	Pumps	Pump A B.Conc	61
109.00	Pumps	Pump A B.Conc	68
109.01	Pumps	Pump A B.Conc	100
133.00	Pumps	SV(Pump A)	B-A-A
137.70	Pumps	Pump A B.Conc	100
137.71	Pumps	Pump A B.Conc	0
142.70	Pumps	SV(Pump A)	A-A-A
180.00	Controller	Stop	0

2. 结果与讨论

2.1 标样色谱图

图 2 为 10 $\mu\text{g/L}$ 的标样溶液 10 μL 进样的荧光图谱，与标准图谱相对照，可以确定 24 种氨基酸出峰顺序如下。图 3 为 1000 $\mu\text{g/L}$ 的标样溶液 10 μL 进样的荧光图谱，与 10 $\mu\text{g/L}$ 的标样溶液出峰时间完全一致。

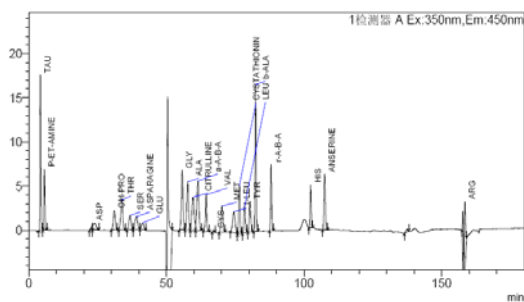


图 2: 24 种氨基酸混标色谱图(10 µg/L)

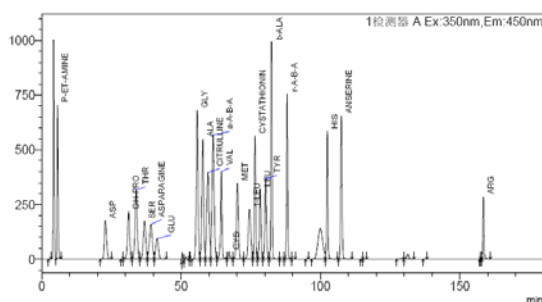


图 3: 24 种氨基酸混标色谱图(1000 µg/L)

2.2 校准曲线

五点外标法得到 L(-)-羟脯氨酸 (OH-PRO) 的校准曲线如图 4 所示:

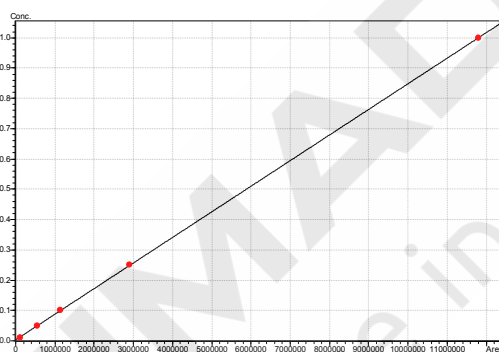


图 4: L(-)-羟脯氨酸校准曲线 (10, 50, 100, 250, 和 1000 µg/L)

L(-)-羟脯氨酸校准曲线相关系数 $R^2 = 0.99999$, 检测限(S/N=3.3)为 20 µg/L, 定量限(S/N=10)为 50 µg/L。其他样品信息参见表 2。

表 2 氨基酸混标校准曲线及检测限

ID	氨基酸	校准曲线	R2	LOD (µg/L)
1	TAU	$Y = (2.42294e-008)X + (0.00154695)$	0.99990	10
2	P-ET-AMINE	$Y = (5.54679e-008)X + (-0.000140864)$	0.99996	10
3	ASP	$Y = (9.92064e-008)X + (0.0085046)$	0.99998	20
4	OH-PRO	$Y = (8.44876e-008)X + (0.0031468)$	0.99998	20
5	THR	$Y = (5.69129e-008)X + (0.00203987)$	0.99999	10
6	SER	$Y = (9.18671e-008)X + (0.00444937)$	0.99998	20
7	ASPARAGINE	$Y = (8.50114e-008)X + (0.00246175)$	0.99999	20
8	GLU	$Y = (1.51e-007)X + (0.00812799)$	0.99987	40

9	GLY	$Y = (3.40829e-008)X + (0.00188337)$	0.99999	10
10	ALA	$Y = (3.8559e-008)X + (0.00194875)$	0.99999	10
11	CITRULLINE	$Y = (4.3273e-008)X + (0.00463618)$	0.99996	10
12	a-A-B-A	$Y = (3.23871e-008)X + (0.00184372)$	0.99999	10
13	VAL	$Y = (6.8192e-008)X + (0.00408964)$	0.99997	10
14	CYS	$Y = (7.53967e-007)X + (0.0179881)$	0.99917	12
15	MET	$Y = (5.63628e-008)X + (0.00734179)$	0.99989	10
16	1-LEU	$Y = (6.94951e-008)X + (0.00222307)$	0.99998	20
17	CYSTATHIONIN	$Y = (5.27642e-008)X + (0.00248737)$	0.99999	10
18	LEU	$Y = (7.73811e-008)X + (0.00313457)$	0.99999	10
19	TYR	$Y = (6.62942e-008)X + (0.00285258)$	0.99999	10
20	b-ALA	$Y = (2.9632e-008)X + (-0.0233193)$	0.99584	10
21	r-A-B-A	$Y = (4.63751e-008)X + (0.00120445)$	0.99999	10
22	HIS	$Y = (5.88388e-008)X + (0.00347516)$	0.99999	10
23	ANSERINE	$Y = (4.37727e-008)X + (0.00236786)$	0.99999	10
24	ARG	$Y = (1.28958e-007)X + (-0.0175855)$	0.99966	10

2.3 重复性

用 250 µg/L 标准品进样 7 次后，保留时间及峰面积重现性结果如表 3 所示：

表 3 七针标准品 (250 µg/L) 重现性数据

ID	氨基酸	RT (min)	RT (%RSD)	Area (%RSD)
1	TAU	4.2	1.08	0.06
2	P-ET-AMINE	5.6	0.13	0.05
3	ASP	23.0	1.13	0.83
4	OH-PRO	31.0	1.15	0.19
5	THR	33.7	0.18	0.18
6	SER	36.7	1.38	0.13
7	ASPARAGINE	39.0	0.09	0.09
8	GLU	41.3	0.06	0.06

9	GLY	55.7	0.11	0.09
10	ALA	57.7	0.11	0.08
11	CITRULLINE	59.6	0.11	0.10
12	a-A-B-A	61.4	0.09	0.07
13	VAL	64.4	0.02	0.01
14	CYS	67.1	0.03	0.02
15	MET	70.1	0.04	0.01
16	1-LEU	74.5	0.04	0.01
17	CYSTATHIONIN	76.5	0.02	0.01
18	LEU	78.3	0.04	0.01
19	TYR	80.3	0.02	0.01
20	b-ALA	82.3	0.08	0.01
21	r-A-B-A	88.0	0.01	0.01
22	HIS	102.4	0.03	0.02
23	ANSERINE	107.4	0.01	0.01
24	ARG	158.4	0.02	0.01

2.4 实际样品分析

采用氨基酸柱后衍生系统测定了两份牛奶阳性样品，对其中所含的氨基酸进行定量定性分析，两份样品分析数据见表4，色谱图见图5和图6。

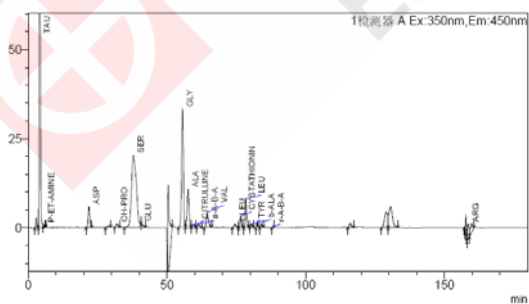


图5 一号牛奶样品色谱图

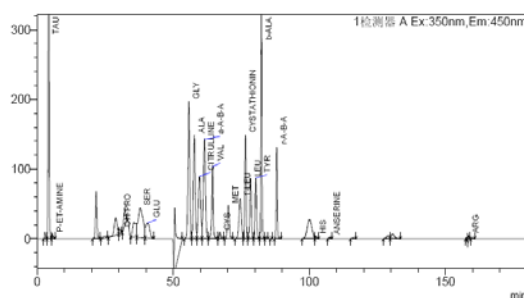


图6 二号牛奶样品色谱图

表 4 市售某两种品牌牛奶中氨基酸定量分析结果

ID	缩写	名称	1 号样品	2 号样品
			($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
1	TAU	牛黄酸	0.15	0.64
2	P-ET-AMINE	2-氨基-乙基-磷酸二氢	ND	0.013
3	ASP	天冬氨酸	0.020	ND
4	OH-PRO	L-羟脯氨酸	0.038	0.15
5	THR	苏氨酸	ND	ND
6	SER	丝氨酸	0.23	0.48
7	ASPARAGINE	天冬酰胺	ND	ND
8	GLU	谷氨酸	0.0071	0.30
9	GLY	氨基乙酸 (甘氨酸)	0.069	0.40
10	ALA	丙氨酸	0.029	0.37
11	CITRULLINE	瓜氨酸	0.0072	0.27
12	α -A-B-A	2-氨基丁酸	0.0052	0.39
13	VAL	缬氨酸	0.0082	0.11
14	CYS	半胱氨酸	ND	0.23
15	MET	蛋氨酸 (甲硫氨酸)	ND	0.13
16	1-LEU	异亮氨酸	0.0043	0.19
17	CYSTATHIONIN	胱氨酸	0.0071	0.23
18	LEU	亮氨酸	0.018	0.23
19	TYR	酪氨酸	0.0033	0.15
20	b-ALA	β -丙氨酸	ND	0.52
21	γ -A-B-A	4-氨基丁酸	0.0015	0.20
22	HIS	组氨酸	ND	0.0085
23	ANSERINE	肌肽	ND	0.0062
24	ARG	精氨酸	0.0038	0.0040

3. 结论

本文采用岛津氨基酸柱后衍生系统锂型分析柱建立了牛奶制品中 24 种氨基酸的高效液相色谱柱后衍生分析方法，该方法柱后衍生及样品测定为全自动完成，消除了柱前衍生不同操作人员引入的人为误差，大大简化了样品前处理步骤，节约了时间，是一种可靠快速的检测方法。本方法可以直接用于检测牛奶中 24 种氨基酸。推荐使用岛津生产的高质量流动相及反应试剂，在降低基线波动的同时提高了灵敏度。也可以自行配制衍生试剂，要注意配制衍生试剂所用的各种试剂尽可能纯度高，否则基线波动大。本法可给从事乳制品中皮革水解蛋白非法添加检测的人员做参考。



SHIMADZU
Excellence in Science

离子色谱法测定乳制品中硫氰酸根离子含量

摘要: 本文使用岛津抑制性离子色谱系统建立了乳制品中硫氰酸根离子的检测方法。6 个不同浓度标准品进样(0.1、0.2、0.5、2、5、10mg/L), 校准曲线相关系数可达 0.9999; 液态乳定量限为 1.17 mg/kg, 奶粉定量限为 2.92mg/kg。5mg/L 连续 7 针进样(25uL)保留时间相对标准偏差为 0.05%, 峰面积相对标准偏差为 0.82%。测定了 7 个阳性样品, 每个样品取样 3 次, 结果重复性良好。

关键词: 离子色谱, 硫氰酸根离子, 乳制品

近期我国食品安全问题突出, 政府在加强监管力度。日前卫生部发布的《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)》中明确规定乳及乳制品中硫氰酸钠属于违法添加物质。硫氰酸钠(NaSCN)是白色斜方晶系结晶或粉末, 毒害品, 易溶于水、乙醇和丙酮。据中国检科院综合检测中心报道, 硫氰酸钠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, 导致急性中毒。原料乳或奶粉中掺入硫氰酸钠后可有效的抑菌、保鲜, 是不法奶户的掺假物质之一, 但是少量的食入就会对人体造成极大伤害。本文利用岛津抑制型离子色谱仪, 建立了乳制品中硫氰酸根离子的检测方法。实际阳性样品测试结果表明该方法效果良好, 具有较好的实用价值。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 Prominence HIC-20A 抑制型离子色谱仪。HIC-20A 是岛津制作所开发的新一代离子色谱仪, 具有以下特点: 加装了 SeQuant 阴离子抑制器, 可以进行高灵敏度分析, 具有抑制效果好和性价比高的特点; 采用高性能电导检测器, 实用低噪声电子部件, 彻底实现低噪声化; 装上双系统组件后可以同时分析阴阳离子; 可以方便地在抑制型和非抑制型之间切换。

本次实验所用仪器的具体配置为 LC-20ADsp 输液泵, DGU-20A₃ 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CDD-10Avp 电导检测器, CBM-20A lite 系统控制器, SeQuant 阴离子抑制器和 Lcsolution 色谱工作站。

1.2 分析方法

色谱柱: Shim-pack IC-SA2(4.0 mm ID×250 mm L)阴离子分析柱

保护柱: Shim-pack IC-SA2(G)(4.6 mm ID×10 mm L)阴离子分析保护柱

流动相：1.8 mM 碳酸钠+1.7 mM 碳酸氢钠

流速：1 mL/min；洗脱方式：等度

柱温：40℃；池温：43℃

进样量：25 μ L；阴离子抑制柱：SeQuant 1120-100

1.3 样品前处理方法

样品前处理采用了 Onguard II RP 柱作为净化柱，具体步骤如图 1 所示。

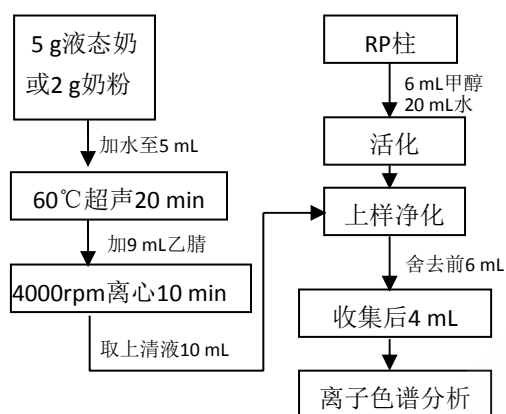


表 1 保留时间与峰面积的重现性

编号	保留时间(min)	峰面积(uV·S)
1	24.496	27,508
2	24.491	27,574
3	24.481	27,328
4	24.479	27,558
5	24.479	27,055
6	24.469	27,729
7	24.460	27,298
Average	24.479	27,436
%RSD	0.05	0.82

图 1 样品前处理步骤

2. 结果与讨论

2.1 保留时间与峰形

图 2 为本方法检测硫氰酸根离子的典型色谱图（硫氰酸根离子浓度为 5.98 mg/L）

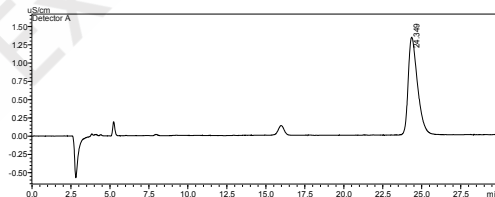


图 2 硫氰酸根离子标样图谱

由图 2 可见，本方法所测硫氰酸根离子保留时间为 24.45min，峰形良好。

2.2 精密度

取浓度为 5 mg/L 标样(硫氰酸钾浓度)，连续进样 7 次，结果如表 1 所示。

由表 1 结果，本方法具有很好的重复性。

2.3 标准曲线

称取 50 mg 硫氰酸钾，用 500 mL 容量瓶加水定容，配成 100 mg/L 的硫氰酸钾标准储备溶液，折合成硫氰酸根离子浓度为 59.8 mg/L。再稀释成浓度为 0.10 mg/L、0.20 mg/L、0.50 mg/L、2.00 mg/L、5.00 mg/L 和 10.0 mg/L 的标准工作溶液(硫氰酸钾浓度)，分别进样，得到校准曲线(见图 3)。结果表明，相关系数为 0.9999。

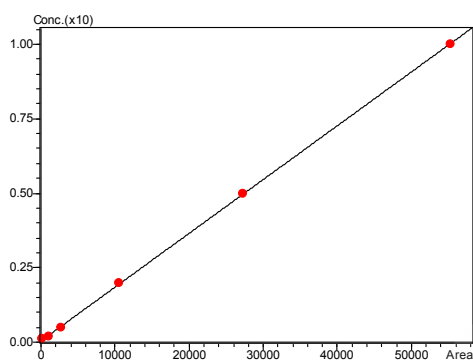


图 3 校准曲线

表 2 空白及加标样品 3 次取样测定结果

样品	测定结果 (mg/kg)	平均值 (mg/kg)	回收率%
空白液态 奶	1.17	1.22	—
	1.23		
	1.27		
空白液态 奶加标	5.65	5.34	82.4
	5.25		
	5.12		

2.4.加标回收率

取空白液态奶样品，添加硫氰酸根离子工作液，使空白样品中硫氰酸根离子含量增加 5 mg/kg，3 次取样检测结果如表 2 所示。

2.5.检测限和定量限

用软件多点校正计算出对于硫氰酸根离子，液态乳定量限为 1.17 mg/kg，奶粉定量限为 2.92mg/kg。

2.6.实际样品分析结果

样品（硫氰酸根离子浓度为 1.32 mg/L）的典型色谱图如图 4 所示，对 7 份阳性样品，各取样 3 次，测得结果如表 4 所示。从结果列表中看出，方法操作重复性较好。

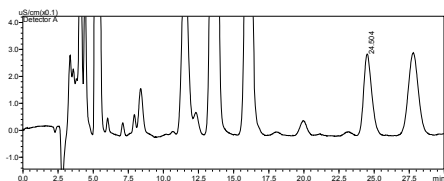


图4 实际样品检测图谱

表4 7个实际样品各取样3次分析结果

样品	取样1	取样2	取样3	平均值 (mg/kg)
奶粉4#	2.69	2.49	2.79	2.66
奶粉5#	10.6	10.3	11.3	10.8
奶粉6#	18.2	20.5	19.4	19.4
液态奶2#	1.77	1.75	1.93	1.82
液态奶7#	18.7	17.9	16.9	17.8
液态奶8#	50.2	51.7	50.9	50.9
液态奶9#	86.1	87.9	88.5	87.3

3. 结论

使用岛津离子色谱仪对乳制品中硫氰酸根离子检测方法进行了验证。保留时间约为24.5分钟，5 mg/L 样品连续7针进样保留时间和峰面积重现性佳。校准曲线线性良好。对于方法定量限，液态乳定量限为1.17 mg/kg，奶粉定量限为2.92 mg/kg，满足国标要求。测定了7个未知样品，每个样品取样3次，结果重复性良好。对于5 mg/kg左右浓度的液态奶，回收率为82.4%。结果表明使用岛津抑制型离子色谱仪可以很好地检测乳制品中硫氰酸根离子的含量。

乳制品中无机元素检测



SHIMADZU
Excellence in Science

石墨炉原子吸收法测定奶粉中的铅、铬元素

摘要: 参考GB/T 5009.12-2010和GB/T 5009.123-2003方法标准, 使用石墨炉原子吸收法测定了奶粉标准样品GBW10017铅和铬的含量。实验结果表明, 铅和铬的线性关系良好, 标准样品测定结果与标准值吻合。该方法方便可靠, 适合测定乳制品中铅和铬元素的含量。

关键词: 奶粉 标准样品 石墨炉 原子吸收

随着人们对身体健康的日益重视, 奶粉已成为人们日常生活中一种非常重要的营养食品。重金属超标会对人体很多器官产生危害。2012年最新发布的食品安全国家标准GB 2762-2012《食品中污染物限量》中, 对乳或乳制品中Pb, Cr等重金属的最高限值作了明确的规定。本文参考GB/T 5009.12-2010和GB/T 5009.123-2003方法标准使用火焰原子吸收法和石墨炉原子吸收法分别测定了奶粉标准样品GBW10017中的铅和铬的含量。

1. 实验部分

岛津 AA-7000 原子吸收分光光度计

1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿均为玻璃制品 (30% 硝酸浸泡 24 小时); 实验所用酸均为电子纯试剂, 实验用水为超纯去离子水。

1.3 仪器条件和参数

配制铅和铬标准溶液。仪器稳定后, 按表 1 仪器工作条件, 标准曲线法计算结果。

表 1 石墨炉法工作条件

元素	波长 (nm)	石墨管 类型	点灯方式	灰化		原子化	
				温度 (°C)	时间 (s)	温度 (°C)	时间 (s)
Pb	283.3	热解石墨管	BGC-D ₂	800	20	2200	2
Cr	357.9	热解石墨管	BGC-D ₂	800	20	2300	2

注: 测定 Pb 元素时, 加入 5 μ L 100 μ g/mL 的硝酸钡作为基体改进剂

1.4 样品的前处理

称取适量试样于瓷坩埚中, 置于电热板上 180°C 左右将样品炭化至无烟, 移入马弗炉 500°C 灰化

5h, 冷却。用1 mL (1:1) 硝酸将残渣溶解, 并转移至25 mL容量瓶中, 用纯水多次清洗坩埚, 合并洗液与容量瓶中, 纯水定容。用2%硝酸稀释5倍, 待测。

2. 结果与讨论

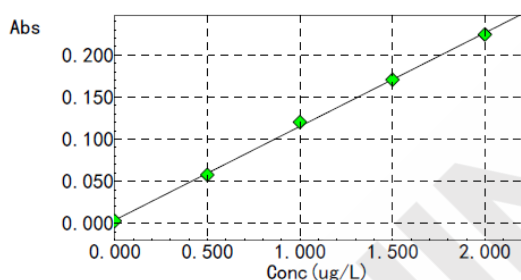
2.1 标准曲线及方程式

配制 2.0 $\mu\text{g/L}$ 铅和铬混合标准溶液, 利用自动进样器自动稀释功能制备系列标准溶液, 用石墨炉原子吸收仪测定。标准系列见表 2。

表 2 标准曲线浓度

元素	仪器测定方法	标准曲线浓度				
Pb/Cr	石墨炉法($\mu\text{g/L}$)	0	0.5	1.0	1.5	2.0

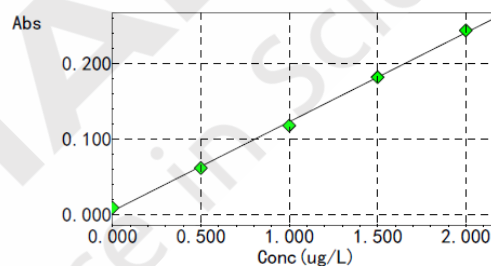
测得标准曲线如下:



$$\text{Abs} = 0.11124\text{Conc} + 0.0038400$$

$$r = 0.9994$$

图 1 铅元素的标准曲线



$$\text{Abs} = 0.11808\text{Conc} + 0.0042200$$

$$r = 0.9992$$

图 2 铬元素的标准曲线

2.2 仪器检出限

对空白标准溶液进行 10 次测定, 取 3 倍的空白标准偏差除以斜率所对应的浓度即为检出限, 其结果见表 2。

表 2 各元素的检出限

元素名称	Pb	Cr
检出限 ($\mu\text{g/L}$)	0.050	0.010

2.3 标准样品测定结果及标准值对比

按实验方法对奶粉标准物质 GBW10017 进行分析, 分析结果见表 3。

表 3 GBW10017 测定结果及标准值

元素名称	Pb	Cr
称样量 (g)	1.2033	0.2048
测定结果 ($\mu\text{g/g}$)	0.0711	0.370
GBW10017 标准值 ($\mu\text{g/g}$)	0.07 ± 0.02	0.39 ± 0.04
RSD (%)	3.71	3.18

3. 结论

本文参考食品安全国家标准 GB 5009.12—2010 和 GB 5009.123—2003, 使用石墨炉原子吸收法测定了奶粉标准样品中铅和铬的含量。实验结果表明, 各元素线性关系良好, 测定结果与标准值吻合。该方法操作简便, 适合测定乳制品中铅和铬的含量。



SHIMADZU
Excellence in Science

氢化物发生原子吸收法测定奶粉及饲料中汞的含量

摘要：参考GB/T 5009.17-2003和GB/T 13081-2006，采用湿法消解，氢化物发生原子吸收法测定了奶粉及饲料中的汞的含量，结果表明，在0~10 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好，相关系数 $r=0.9995$ ，方法检出限为0.06 $\mu\text{g/L}$ ，加标回收率在95%~105.0%之间，该方法可满足奶粉及饲料中微量汞元素的测定。

关键词：奶粉 饲料 原子吸收 氢化物发生

汞主要危害人的神经系统，可使脑部受损，造成“汞中毒脑症”引起的四肢麻木、运动失调、听力困难等症状，重者心力衰竭而死亡。中毒较重者可以出现口腔病变、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等症状，也可对皮肤黏膜及泌尿、生殖等系统造成损害。

汞可能通过水或者饲料污染到原料乳，使用这些原料乳生产的奶粉就可能出现汞异常。在国家标准 GB2762-2005《食品中污染物的限量》中，鲜乳的总汞限量为0.01mg/Kg。在本文中，参照 GB/T 5009.17-2003《食品中总汞和有机汞的测定》，采用湿法消解，氢化物发生原子吸收法对市场上某奶粉样品进行测定。考虑到饲料有可能是奶粉中汞的来源，又同时根据 GB/T13081-2006《饲料中汞的测定》，对某鱼粉饲料进行测定。结果稳定，回收率良好。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 AA-7000 原子吸收分光光度计

氢化物发生器 HVG-1（岛津）

1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿均为玻璃制品（30% 硝酸浸泡 24 小时）；实验所用酸均为优级纯试剂，实验用水为超纯去离子水。

1.3 样品的前处理

取1.0g样品，加入硝酸25mL，高氯酸4mL，混匀，在电热板上以50℃低温预消解3小时，再在180℃下消解，至黄烟冒尽，大概6小时。此时消解液剩下3mL左右，用纯水定容至10mL。

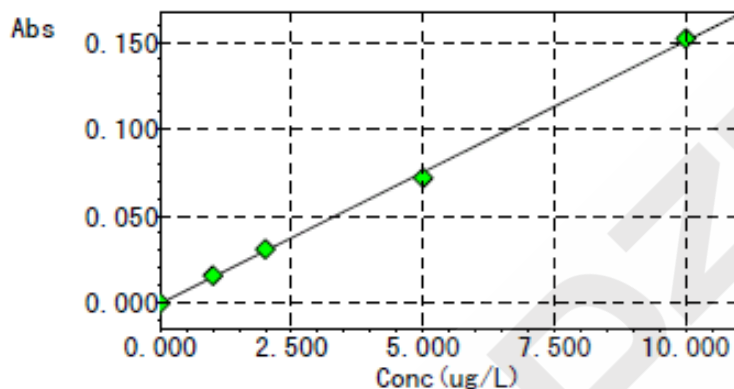
2. 结果与讨论

2.1 仪器工作参数

波长 253.7 nm, 狭缝宽 0.7 nm, 点灯方式 BGC-D₂, 灯电流 10 mA

2.2 标准曲线

配制Hg标准溶液0 μ g/L, 1 μ g/L, 2 μ g/L, 5 μ g/L, 10 μ g/L, 并分别加入高氯酸, 以30%的比例进行基体匹配。依次进样后得到图1, 元素汞的工作曲线。



$$\text{Abs} = 0.015103 \text{Conc} - 0.00041104$$

$$r = 0.9995$$

图2 汞元素标准曲线

在 0.00~10.00 μ g/L 的浓度范围内, 汞的浓度与吸光度有着良好的线性关系, 相关系数为 $r=0.9995$ 。按照实验方法, 对空白溶液重复测定 11 次, 根据 3 倍的标准偏差除以曲线斜率求得汞的方法检出限分别为: 0.06 μ g/L。

2.2 样品测定结果

分别称取奶粉和鱼粉样品各2份, 消解定容后, 分别测定试样中的汞含量, 其结果见表1。

表1 奶粉及鱼粉样品中汞元素的分析结果

样品名称	称样量 (g)	测定结果 (μ g/L)	样品含量 (mg/Kg)	RSD (%)
奶粉 1	1.003	0.24	0.0024	2.05
奶粉 2	1.001	0.24	0.0024	1.12
鱼粉 1	1.012	2.01	0.0199	0.23
鱼粉 2	1.032	2.06	0.0200	2.29

2.3 加标回收实验

以同样的方法进行前处理，对奶粉样品，进行了加标回收率实验，其结果见表 2。

表 2 奶粉样品的回收率

样品名称	加标前 ($\mu\text{g/L}$)	加标量 ($\mu\text{g/L}$)	加标后 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
奶粉 1	0.24	2.0	2.34	105.0
奶粉 2	0.24	2.0	2.23	99.5

3. 结论

本文参考 GB/T 5009.17-2003 和 GB/T 13081-2006，采用湿法消解，氢化物发生原子吸收法测定了奶粉及饲料中的汞的含量。该方法操作简便，检测限低，回收率好，可满足奶粉及饲料中有害元素汞的检测。

ICP-AES 法测定奶粉中的 8 种无机元素

摘要：采用 $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2(6:2)$ 作为消解剂对奶粉样品进行微波消解，然后应用电感耦合等离子体发射光谱技术(ICP-AES)分别对婴儿奶粉和学生奶粉中的钙、镁、钾、钠、铁、锰、铜和锌八种金属元素进行测定，各元素的回收率在 92.0~117.0% 之间，相对标准偏差 $\text{RSD} \leq 3.98$ ，方法检出限在 0.30~40.0 $\mu\text{g/L}$ 之间。该方法快速简便、准确率高、精密度好，适合奶粉中微量元素和常量元素的测定。

关键词：微波消解 ICP-AES 奶粉 元素

随着人们对身体健康的日益重视，奶粉已成为人们日常生活中一种非常重要的营养食品，对婴幼儿来说，奶粉是除母乳外最重要的食品。伴随着成长的需要，在奶粉中添加一些人体所必需的有益元素，使得奶粉的营养更加全面、均衡，从而满足不同人群的需求。为此我国于 2010 年修订了食品安全国家标准 GB 5413.21-2010 的国家强制标准，该标准规定了婴幼儿配方食品和乳粉中钙、铁、锌、钠、钾、镁、铜和锰的测定方法。该标准规定了使用原子吸收光谱法测定该 8 种元素，同时还增加了电感耦合等离子体原子发射光谱测定方法(ICP-AES)。ICP-AES 是近年来发展迅速的分析方法，具有检出限低，灵敏度高，精密度好，线性范围宽，同时检测多种元素的优点。本文采用微波消解法处理奶粉样品并使用电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)测定了奶粉中八种金属元素，结果较为满意。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 ICPE-9000 全谱发射光谱仪

1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿均为玻璃制品；实验所用酸均为优级纯试剂，校准曲线用标准溶液为百灵威化学技术公司生产的原子吸收用单元素标准溶液。实验用水为超纯去离子水。

1.3 校准曲线的配制

配制 Ca、Mg、K、Na、Cu、Fe、Mn 和 Zn 八种金属元素的混合标准溶液(见表 1)。

表 1 校准曲线标准系列(mg/L)

元素 Element	1	2	3	4	5
Ca	0.00	1.00	3.00	5.00	10.00
Mg	0.00	1.00	3.00	5.00	10.00
K	0.00	1.00	3.00	5.00	10.00
Na	0.00	1.00	3.00	5.00	10.00
Fe	0.00	1.00	3.00	5.00	10.00
Cu	0.00	0.01	0.05	0.10	1.00
Mn	0.00	0.01	0.05	0.10	1.00
Zn	0.00	0.01	0.05	0.10	1.00

1.4 样品的前处理

分析天平准确称取奶粉粉末约 1.0 g 于干净的聚四氟乙烯消解罐中，加入消解剂(6 mL HNO₃ 和 2 mL H₂O₂)，拧紧聚四氟乙烯盖子。按照如下程序进行消解：

步数	时间(min)	功率	温度
1	00:15:00	600w	210℃
2	00:20:00	600w	210℃
Vent 冷却	30		

放置冷却半小时后在通风橱内打开，然后将消解液转移至 50 mL 容量瓶中，去离子水定容至刻度待测。

2. 结果与讨论

2.1 仪器参数和分析线的选择

ICPE-9000 仪器工作参数：高频频率：27.12 MHz，高频输出功率：1.2 kW。同心雾化器，旋流雾室。冷却气流速 10 L/min，等离子气流速 0.6 L/min，载气流速 0.7 L/min。观测方向：轴向。

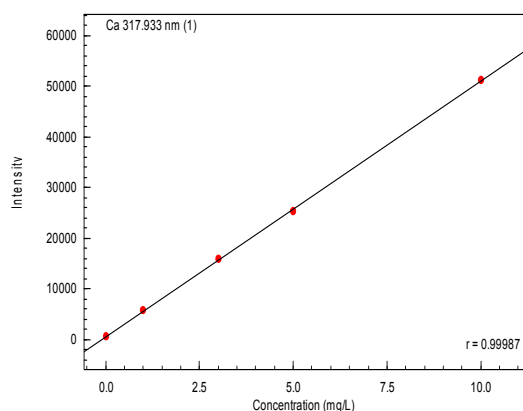
岛津 ICPE-9000 软件[助手功能]可自动进行测定元素的波长选择，选择共存元素谱线干扰小，检出限和信背比高的谱线(见表 2)

表 2 分析线波长

元素	Ca	Mg	K	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
波长(nm)	317.933	285.213	766.490	589.592	324.754	238.204	257.610	220.548

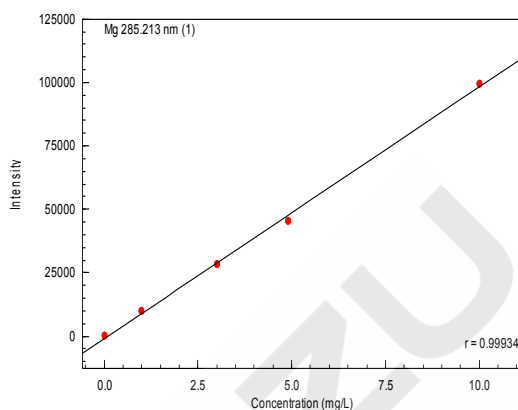
2.2 标准曲线

Ca、Mg、K、Na、Cu、Fe、Mn 和 Zn 八种重金属元素的标准曲线如下：



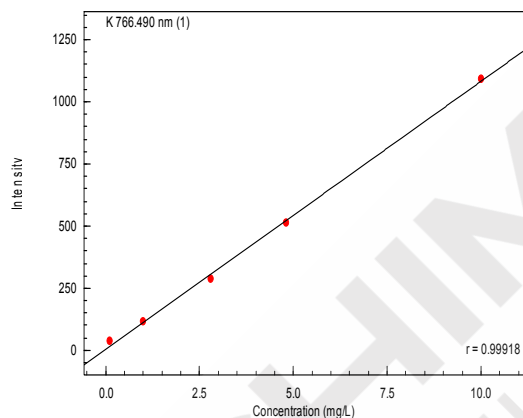
R=0.99987

1-1 钙的标准曲线



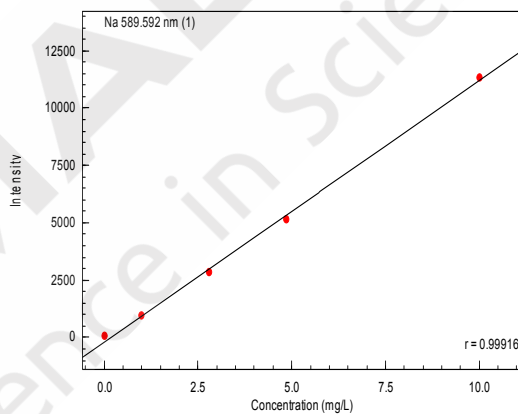
R=0.99934

1-2 镁的标准曲线



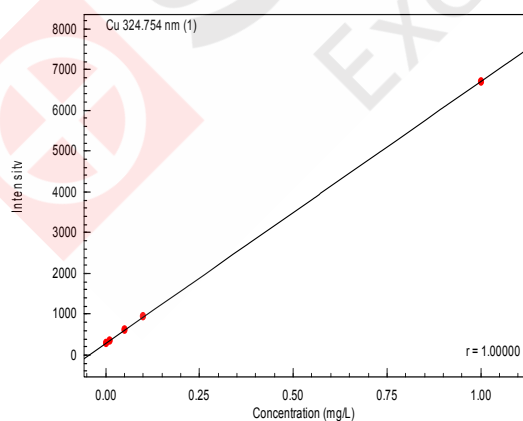
R=0.99918

1-3 钾的标准曲线



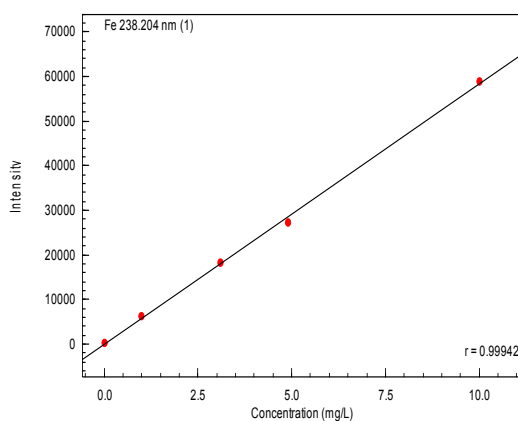
R=0.99916

1-4 钠的标准曲线



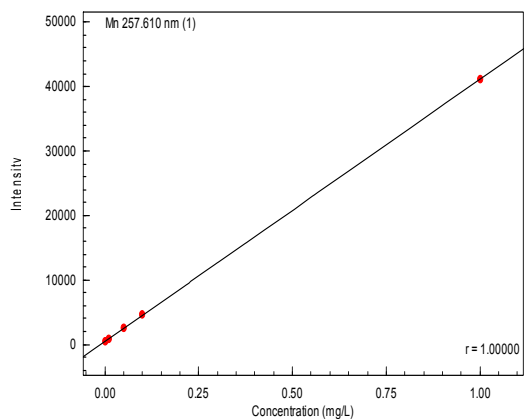
R=1.00000

1-5 铜的标准曲线



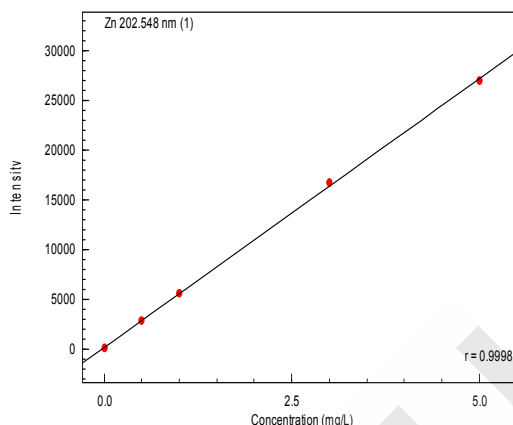
R=0.99942

1-6 铁的标准曲线



R=1.00000

1-7 锰的标准曲线



R=0.99985

1-8 锌的标准曲线

2.3 方法的检出限与精密度(RSD%)

检出限与仪器的性能、样品的基体、元素的灵敏度等都有密切关系。对空白标准溶液(硝酸-双氧水)的分析元素进行 10 次测定,取 3 倍的空白标准偏差所对应的浓度即为各元素的检出限,其结果见表 3。

表 3 检出限及精密度

元素	Ca	Mg	K	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
检出限 (μg/L)	3.00	0.60	30.00	20.00	4.80	0.90	0.30	1.2
RSD(%)	1.39	0.16	2.80	0.70	3.98	0.65	2.17	2.61

2.4 方法的回收率

为考察方法的准确度,在 6 个平行样品中加入等量待测元素标准溶液,按实验方法及测定条件进行测定,计算回收率。各元素的回收率见表 4。

表 4 回收率

元素	样品含量 (mg/L)	加标量 (mg/L)	测定总量 (mg/L)	回收量 (mg/L)	回收率 (%)
Ca	112.50	50.00	162.00	49.50	99.00
Mg	15.80	10.00	26.20	10.30	104.00
K	182.50	10.00	193.00	10.50	105.00
Na	38.50	10.00	50.20	11.70	117.00
Cu	0.07	1.00	0.99	0.92	92.00
Fe	1.49	1.00	2.42	0.90	93.00
Mn	0.23	1.00	1.20	0.97	97.00
Zn	1.01	1.00	1.99	0.98	98.00

2.5 测定结果

采用微波消解 ICP-AES 法测定两种进口奶粉样品分析结果列于表 5。由方法的回收率在

92.0%~17.00%之间，从而表明该测定结果的数据可靠。

表 5 样品测定结果(n=3)

奶粉名称	mg/kg							
	Ca	Mg	K	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
学生奶粉	5587.00	784.66	9063.37	1912.00	3.48	73.99	11.42	50.16
婴儿奶粉	7609.55	1080.71	10534.40	3023.99	0.55	93.69	1.20	0.55

3. 结论

本实验采用微波消解 ICP-AES 法测定了奶粉中 Ca、Mg、K、Na、Cu、Fe、Mn 和 Zn 的含量，结果表明：使用该方法安全、快速、易操作、空白值低、方法精密度高、数据准确，并且回收率高，适用于质检部门以及卫生部门对奶粉样品中金属元素的快速检验。



SHIMADZU
Excellence in Science

ICPMS-2030 分析奶粉中的营养元素及有害元素

摘要：采用微波消解奶粉样品，使用岛津ICPMS-2030型电感耦合等离子体质谱测定了NMIJ CRM7512-a认证标准物质中高浓度营养元素和微量的有害元素。结果表明，CRM7512-a测定值与标准值吻合；样品加标回收率为100%~108%，该方法操作简单，精密度和准确度高，能够对奶粉中的高浓度营养元素和微量的有害元素进行同步分析。

关键词：奶粉 ICPMS-2030 营养元素 有害元素

在奶粉中，婴幼儿成长所必需的营养成分是按照规定比例调配的。根据健康法规定，对于特殊用途食品（幼儿用配方奶粉）中的钙（Ca）、铁（Fe）、铜（Cu）等所需营养成分的比例有严格规定的，并且规定生产商要明确标出营养成分。同时，由于铅（Pb）等有害元素会对婴幼儿的发育产生不良影响，从原料到最终产品都进行严格的安全管理是非常重要的。

我们使用岛津的 ICPMS-2030 对奶粉（NMIJ 认证标准物质）中的元素进行了同步分析。ICPMS-2030 除具备高灵敏度之外，标配氦气碰撞系统，可大幅降低氩、氯等元素产生的谱线干扰。

1 实验部分

1.1 仪器

岛津 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪

1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿分别为塑料或玻璃材质，使用硝酸溶液（1+1）浸泡24小时后，用去离子水冲洗，干燥备用；实验所用的HF和HNO₃为优级纯试剂，实验用水为超纯去离子水。

1.3 样品的前处理

微波消解法与一般的湿法消解法相比，其优点在于可在短时间内进行分解，且由于其密闭性，As 等物质的挥发损失也较少，本文使用 Milestone General 公司生产的 ETOS-1 对样品进行消解。

将 0.25 g 样品与 0.5 mL 盐酸、6.5 mL 硝酸放入微波消解的石英容器后，使用微波消解进行样品处理。消解完成后，用纯水定容到 250 mL，得到待测液（1000 倍稀释）。此时，添加内标元素 Sc、Co、Ga、Y、In 与 Tl（使待测液浓度为 10 μg/L）。消解条件如表 1 所示。

表 1 微波消解仪 样品消解条件

STEP	温度 (°C)	时间 (分)	功率 (W)
1	50	2	1000
2	30	3	0
3	180	25	1000
4	150	1	0
5	180	4	1000
6	180	15	1000

1.4 仪器参数

等离子体参数：高频功率：1.2 kW

等离子体气流速 L/min: 10 L/min

辅助气流速：0.6 L/min

载气流速：0.6 L/min

矩管类型：Mini

雾化器类型：雾化器-10

雾化室：旋流雾室（电子冷却）

雾室温度：5 °C

2. 结果与讨论

2.1 分析

使用标准曲线，对奶粉中的营养元素及有害元素进行同步分析。

为确保分析值的合理性，针对微量元素（Cd、Cr、Pb 和 As），在消解处理后，样品中添加分析元素标准液作为添加回收试验用样品。

2.2 分析结果

按照实验方法，测定奶粉认证标准物质（NMIJ CRM7512-a）标准样品。分析结果如表 3 所示。

表 2 分析结果

元素	单位	分析值 (粉末)	NMIJ 认证值	扩大不确定性	添加回收率 (%)
Ca		8.5	8.65	0.38	-
Fe		0.102	0.104	0.007	-
K	g/Kg	8.3	8.41	0.33	-
Mg		0.82	0.819	0.024	-
Na		1.81	1.87	0.09	-
P		5.4	5.62	0.23	-
Mn	mg/Kg	0.91	0.931	0.032	-
Mo		0.230	0.223	0.012	-

Sr	5.7	5.88	0.20	-
Zn	41	41.3	1.4	-
Cd	<0.005	-	-	100
Cr	<0.06	-	-	101
Pb	<0.03	-	-	100
As	<0.03	-	-	108

3. 结论

通过使用 ICPMS-2030, 能够对奶粉中的高浓度营养元素和微量的有害元素进行同步分析。



SHIMADZU
Excellence in Science

乳制品中风险物质检测



SHIMADZU
Excellence in Science

气相色谱单四极杆质谱联用法

测定牛奶中 16 种邻苯二甲酸酯类含量

摘要: 本文利用正己烷超声提取牛奶, 结合岛津 GCMS-QP2010 Ultra 仪器, 建立了牛奶中 16 种邻苯二甲酸酯测定的气相色谱质谱联用方法。在 0.025~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内建立标准曲线, 线性关系良好, 相关系数 r 为 0.9993~0.9999, 且面积重现性良好, RSD 小于 3%。该方法操作简单, 检出限为 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 样品加标回收率为 71.0~94.0%。该方法可用于牛奶中邻苯二甲酸酯的快速测定。

关键词: 气相色谱质谱联用仪 牛奶 增塑剂 邻苯二甲酸酯

近期因为白酒中“增塑剂”事件, PAEs再一次引起人们普遍关注。邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs)作为一种塑料改良剂, 广泛应用于塑料、农药、涂料、化妆品、食品包装物等产品中, PAEs已经成为环境中的主要污染物之一。邻苯二甲酸酯(PAEs)是一种类似雌激素的环境激素, 研究表明, 其会影响人体的内分泌系统, 干扰正常的荷尔蒙分泌, 其损害严重时可导致细胞突变, 最终致畸或致癌。

牛奶是一种营养价值很高的食品, 除膳食纤维外, 牛乳含有人体所需要的全部营养物质, 是唯一的全营养食物, 其营养价值之高, 是其他食物无法比拟的, 是人们生活中比不可少的饮品。因此牛奶中的塑化剂的迁移问题更需要受到关注。

本文用正己烷萃取牛奶中的邻苯二甲酸酯类化合物, 采用N-丙基乙二胺固相分散净化, 离心后取上清液进行GC/MS测定, 建立了一种牛奶中邻苯二甲酸酯类的检测方法, 该方法操作简单, 灵敏度高, 检出限低, 且适用性强。

1. 实验部分

1.1 仪器

GCMS-QP2010 Ultra 气相色谱-质谱联用仪

1.2 分析条件

GCMS参数:

色谱柱: DB-5MS, 30m \times 0.25mm \times 0.25 μm

柱温程序: 60 $^{\circ}\text{C}$ _20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _220 $^{\circ}\text{C}$ (1min) _5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _280 $^{\circ}\text{C}$ (4min)

进样口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

进样方式: 不分流 (1min)

载气: 氦气

载气控制方式: 恒线速度

载气线速度: 36.5 cm/sec

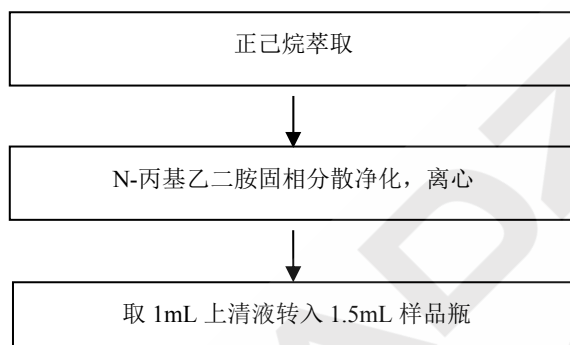
接口温度: 280°C

离子源温度: 200°C

离子化方式: EI

采集方式: SIM

1.3 样品前处理



2 结果讨论

2.1 标准谱图

PAEs 混标溶液总离子流图如图 1 所示。

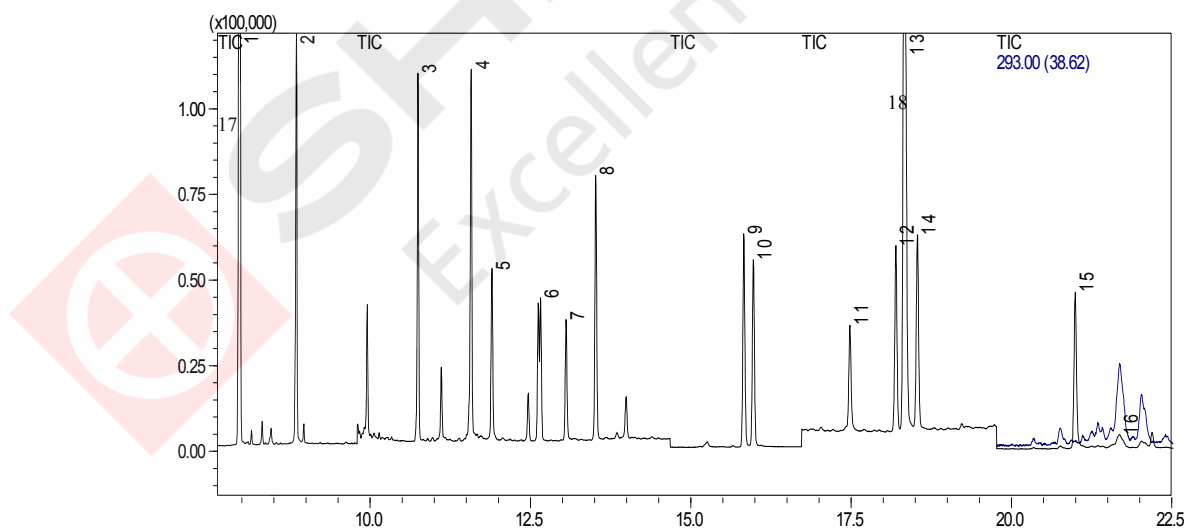


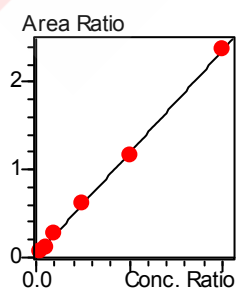
图 1.PAEs 混标总离子流图 (0.1 μg/mL)

表 1. 标准溶液保留时间和特征离子

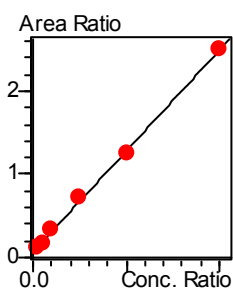
No.	化合物名称	CAS	保留时间	定量离子	定性离子	定性离子
1	邻苯二甲酸二甲酯(DMP)	131-11-3	7.967	163	77	133
2	邻苯二甲酸二乙酯(DEP)	84-66-2	8.850	149	177	176
3	邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)	84-69-5	10.750	149	167	206
4	邻苯二甲酸二丁酯(DBP)	84-74-2	11.575	149	205	150
5	邻苯二甲酸二(2-甲氧基乙基)酯(DMOEP)	117-82-8	11.900	59	193	149
6	邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯(BMPP1)	146-50-9	12.625	149	121	251
7	邻苯二甲酸二(2-乙氧基乙基)酯(DEOEP)	605-54-9	13.058	73	72	221
8	邻苯二甲酸二戊酯(DAP)	131-18-0	13.517	149	219	150
9	邻苯二甲酸二己酯(DHXP)	84-75-3	15.833	149	233	150
10	邻苯二甲酸二丁苄酯(BBP)	85-68-7	15.983	149	91	206
11	邻苯二甲酸二(2-丁氧基乙基)酯(DBOEP)	117-83-9	17.483	193	176	149
12	邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)	84-61-7	18.200	149	167	249
13	邻苯二甲酸二苯酯(DPP)	84-62-8	18.358	225	77	226
14	邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)	117-81-7	18.542	149	279	167
15	邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)	117-84-0	21.000	149	150	279
16	邻苯二甲酸二壬酯(DNP)	84-76-4	21.700	149	127	293
17	邻苯二甲酸二甲酯-D4(DMP-D4)	93951-89-4	7.959	167	81	198
18	邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯-D4(DEHP-D4)	93951-87-2	18.323	153	108	171

2.2 标准曲线

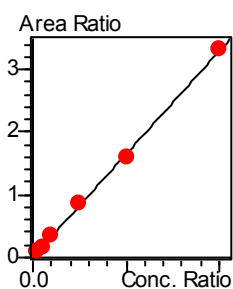
使用正己烷配制邻苯二甲酸酯混合标准系列，分别以 DMP-D4、DEHP-D4 为内标，浓度分别为 0.025、0.05、0.1、0.5、1 μ g/mL。各组分标准曲线如下所示。



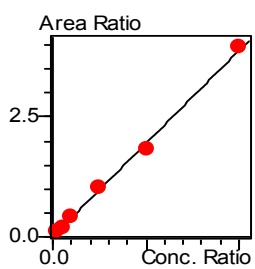
DMP



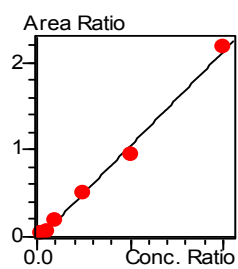
DEP



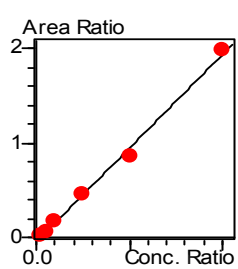
DIBP



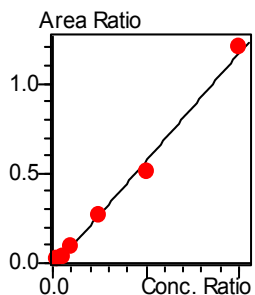
DBP



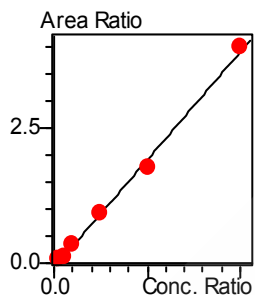
DMEP



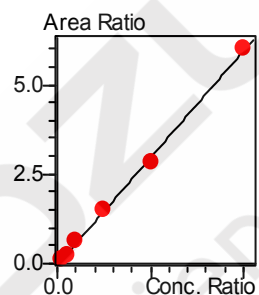
BMPP



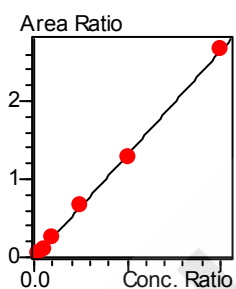
DEEP



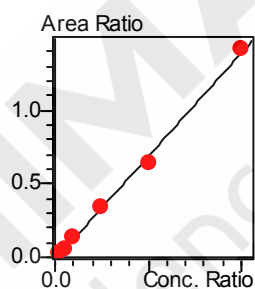
DAP



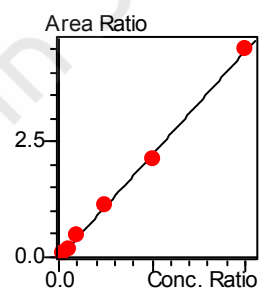
DHXP



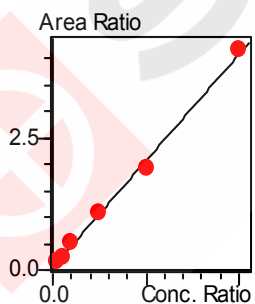
BBP



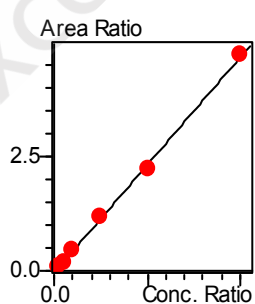
DBEP



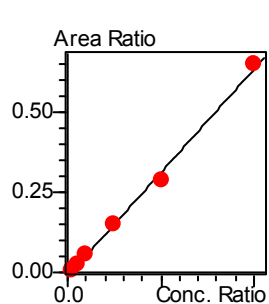
DCHP



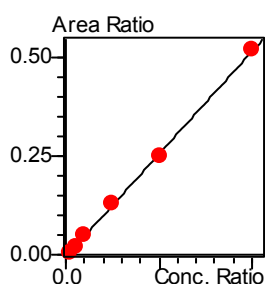
DEHP



DPP



DNOP



DNP

2.3 检出限及重复性

根据 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液数据，计算方法检出限（3 倍噪声计算）。各组分检出限见表 2，连续 5 针进样测定，峰面积 RSD 小于 2%，重复性良好。

表 2. 各组分标准曲线相关系数、检出限及面积重现性 (n=5)

No.	化合物	相关系数	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	%RSD	No.	化合物	相关系数	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	%RSD
1	DMP	0.9998	0.005	1.26	9	DHXP	0.9993	0.005	0.54
2	DEP	0.9996	0.005	1.57	10	BBP	0.9996	0.005	0.93
3	DIBP	0.9996	0.005	0.95	11	DBEP	0.9997	0.005	1.76
4	DBP	0.9995	0.005	1.02	12	DCHP	0.9993	0.005	0.72
5	DMEP	0.9991	0.005	0.56	13	DEHP	0.9997	0.005	0.34
6	BMPP	0.9994	0.005	0.45	14	DPP	0.9996	0.005	0.70
7	DEEP	0.9990	0.005	1.34	15	DNOP	0.9996	0.005	0.87
8	DPP	0.9998	0.005	1.26	16	DNP	0.9996	0.005	1.44

2.4 回收率

将 PAEs 混标溶液添加到牛奶，按照样品前处理方法制备，样品中加标浓度分别为 0.1mg/kg、0.5mg/kg。每浓度加标样品分别平行制样 3 次。回收率及 3 次平行样品 RSD%结果见表 3。

表 3. 样品加标回收率

No.	化合物名称	0.1mg/kg		0.5mg/kg	
		回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
1	DMP	94.0	3.30	88.2	1.63
2	DEP	73.1	4.31	79.3	3.03

3	DIBP	75.3	4.14	83.2	2.46
4	DBP	93.2	2.56	92.1	1.36
5	DMEP	71.0	3.48	85.5	4.06
6	BMPP	75.8	4.47	82.3	3.22
7	DEEP	75.5	5.15	81.6	2.64
8	DPP	76.4	5.04	79.7	1.93
9	DHXP	80.3	5.26	82.7	4.04
10	BBP	72.5	3.90	74.4	2.05
11	DBEP	79.3	5.08	79.5	3.58
12	DCHP	85.6	5.26	84.8	0.97
13	DEHP	91.8	5.26	85.4	1.73
14	DPP	72.3	4.55	76.0	4.17
15	DNOP	74.3	3.35	80.6	4.96
16	DNP	71.9	4.15	75.4	3.05

2.5 样品测定结果

选取市售某种牛奶，依照前处理方法处理后进样分析，谱图如图 2 所示，定量结果如下表 4 所示。

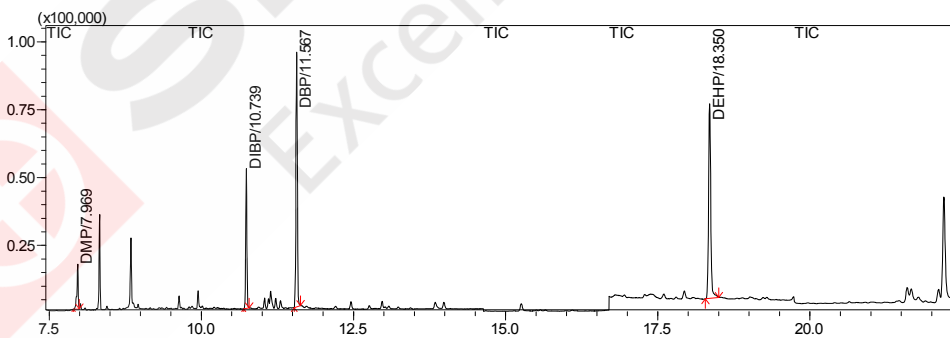


图 2.牛奶样品色谱图

表 4 牛奶样品定量结果

No.	组分名称	定量结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	No.	组分名称	定量结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	DMP	13.6	9	DHXP	N.D

2	DEP	N.D	10	BBP	N.D
3	DIBP	44.6	11	DBEP	N.D
4	DBP	50.0	12	DCHP	N.D
5	DMEP	N.D	13	DEHP	65.0
6	BMPP	N.D	14	DPP	N.D
7	DEEP	N.D	15	DNOP	N.D
8	DPP	N.D	16	DNP	N.D

注：N.D 表示未检出

3. 结论

采用岛津公司气相色谱质谱联用仪（GCMS-QP2010 Ultra）分析牛奶中的邻苯二甲酸酯，方法操作简单，在 0.025~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准曲线范围内线性良好，且检出限为 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，样品加标回收率为 71.0~94.0%。本方法可以用于牛奶中的邻苯二甲酸酯的检测。

气相色谱三重四极杆质谱联用法

测定奶粉中19种邻苯二甲酸酯类化合物

摘要： 本文采用岛津三重四极杆气相色谱质谱联用仪GCMS-TQ8030对奶粉中19种邻苯二甲酸酯类化合物进行了同时测定。该方法简便快捷，定性定量准确，灵敏度高，检出限低，在0.05~2.00 mg/L标准曲线范围内线性良好，加标平均回收率保持在93%~125%之间，连续进样5针峰面积RSD均小于6%。

关键词： GC-MS/MS 奶粉 邻苯二甲酸酯

邻苯二甲酸酯（PAEs）在塑料工业中常用作增塑剂和软化剂，用来增大塑料的可塑性和韧性。目前，保存奶制品的有效方法是进行各种包装处理，如塑料包装等。但包装材料直接与奶制品接触，PAEs可迁移到奶制品中成为污染源；另外，在使用PVC软管进行机械采奶和加工过程中，也存在PAEs对奶制品的污染问题。因此，奶制品在生产过程、加工过程或包装环节都有可能受到PAEs的污染，引起奶制品的食用安全问题。

邻苯二甲酸酯是一种类似雌激素的环境激素，研究表明，其会影响人体的内分泌系统，干扰正常的荷尔蒙分泌，其损害严重时可导致细胞突变，最终致畸或致癌。GB/T 21911-2008《食品中邻苯二甲酸酯的测定》中规定不含油脂样品中各邻苯二甲酸酯化合物的检出限为0.05mg/kg。

本文使用气相色谱串联质谱仪建立奶粉中19种邻苯二甲酸酯类增塑剂的分析方法，该方法操作简单，灵敏度高，检出限低，适用性强，能够准确地对奶粉中的邻苯二甲酸酯的含量进行测定。

1. 实验部分

1.1 仪器

三重四极杆气质联用仪：GCMS-TQ8040

1.2 分析条件

色谱柱：Rxi-5Sil MS,30m×0.25mm×0.25μm

柱温程序：60℃(1min)_20℃/min_220℃（1min）_5℃/min_280℃(5min)

CID 气：氩气

进样口温度：250℃

进样量：1μL

进样方式：不分流，1min

控制方式：恒线速度方式

载气线速度：36.5cm/sec

接口温度：280℃；离子源温度：230℃

采集方式：MRM

1.3 样品制备

取奶粉样品 5.0 g，加入纯水 10 mL，涡动 1 min 使其完全溶解，加入正己烷 10 mL 超声波提取 10 min，振荡提取 20 min，3000 rpm 离心 5 min，重复提取一次，合并上清液，旋转蒸发（40℃）至干。2.0 mL 正己烷复溶（超声溶解残留物），过 0.2 μm 滤膜待分析。

2. 结果与讨论

2.1 色谱图

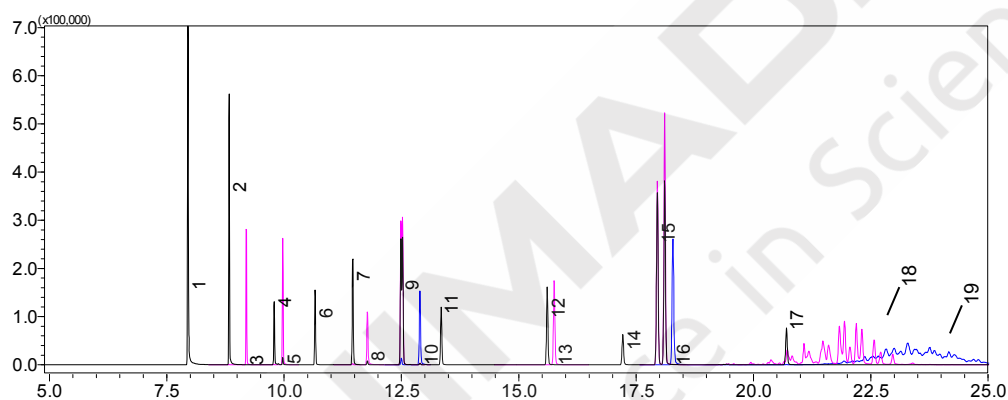


图 2 邻苯二甲酸酯混合标准溶液（1.0 mg/L）MRM 图

表 1 邻苯二甲酸酯的保留时间及 MRM 参数

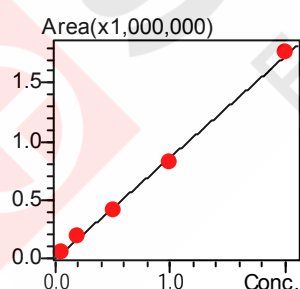
No.	化合物名称	CAS#	保留时间	定量离子	CE	定性离子	CE
1	邻苯二甲酸二甲酯(DMP)	131-11-3	7.951	163>77	23	194>163	7
2	邻苯二甲酸二乙酯(DEP)	84-66-2	8.828	177>149	10	222>149	15
3	邻苯二甲酸二异丙酯(DIPP)	605-50-5	9.195	209>149	10	167>149	10
4	邻苯二甲酸二烯丙酯(DALP)	131-17-9	9.788	132>104	7	189>105	17
5	邻苯二甲酸二丙酯(DPRP)	131-16-8	9.971	209>149	8	191>149	5
6	邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)	84-69-5	10.661	223>149	10	205>149	5
7	邻苯二甲酸二丁酯(DBP)	84-74-2	11.463	223>149	10	205>149	5
8	邻苯二甲酸二(2-甲氧基乙基)酯(DMOEP)	117-82-8	11.775	207>59	5	176>149	10

9	邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯(BMPP1)	146-50-9	12.489	167>149	10	251>149	20
10	邻苯二甲酸二(2-乙氧基乙基)酯(DEOEP)	605-54-9	12.894	176>149	10	176>104	25
11	邻苯二甲酸二戊酯(DAP)	131-18-0	13.348	237>149	10	219>149	5
12	邻苯二甲酸二己酯(DHXP)	84-75-3	15.606	251>149	15	233>149	5
13	邻苯二甲酸二丁苄酯(BBP)	85-68-7	15.754	206>149	10	238>104	20
14	邻苯二甲酸二(2-丁氧基乙基)酯(DBOEP)	117-83-9	17.217	193>149	15	176>149	10
15	邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)	84-61-7	17.954	167>149	10	249>149	15
16	邻苯二甲酸二苯酯(DPP)	84-62-8	18.284	225>77	25	225>141	20
17	邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)	117-84-0	20.704	279>149	12	279>71	17
18	邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)	68515-48-0	21.939	293>149	10	293>167	5
						293>71	10
19	邻苯二甲酸二异酯(DIDP)	26761-40-0	23.288	307>149	20	307>167	5
						307>71	20

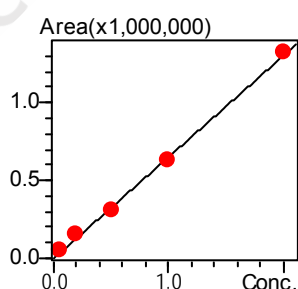
2.2 标准曲线及检出限

配制 5 个浓度点邻苯二甲酸酯的混合标准溶液, 浓度分别为: 0.05、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L (DINP、DIDP 浓度分别为: 0.5、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L), 以浓度为横坐标, 定量离子的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 标准曲线见图 3。

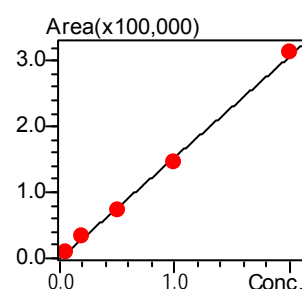
以 0.05 mg/L 标样数据为基础, 3 倍信噪比计算各组分的最低检出限如下表所示。



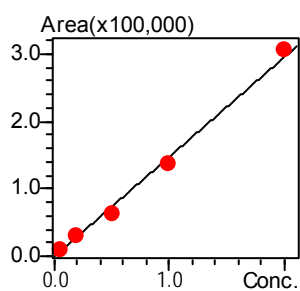
DMP



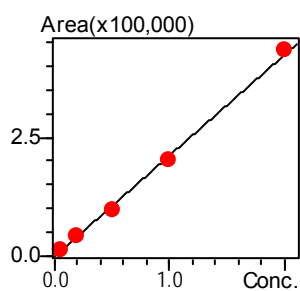
DEP



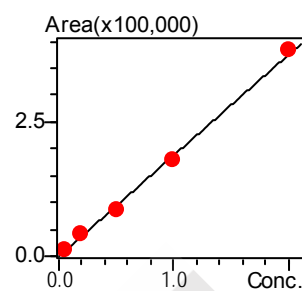
DIPP



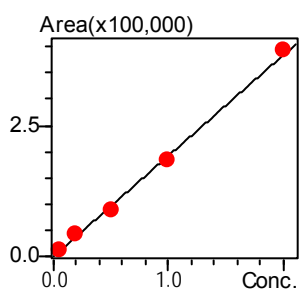
DALP



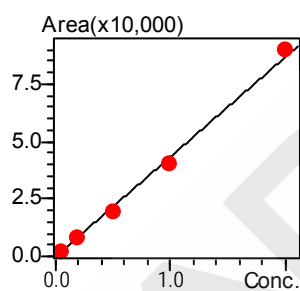
DPRP



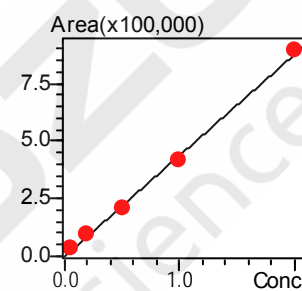
DIBP



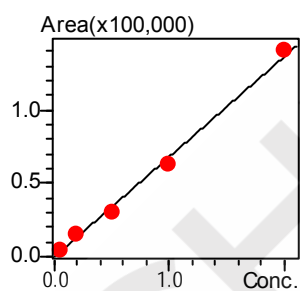
DBP



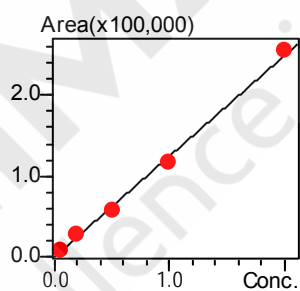
DMOEP



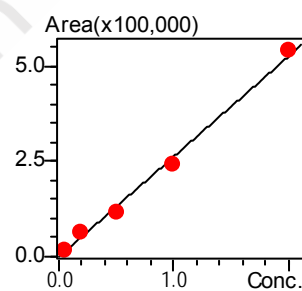
BMPP



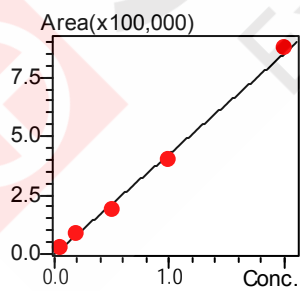
DEOEP



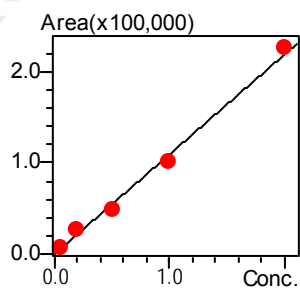
DAP



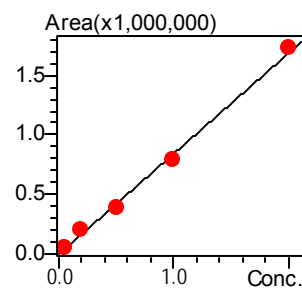
DHXP



BBP



DBOEP



DCHP

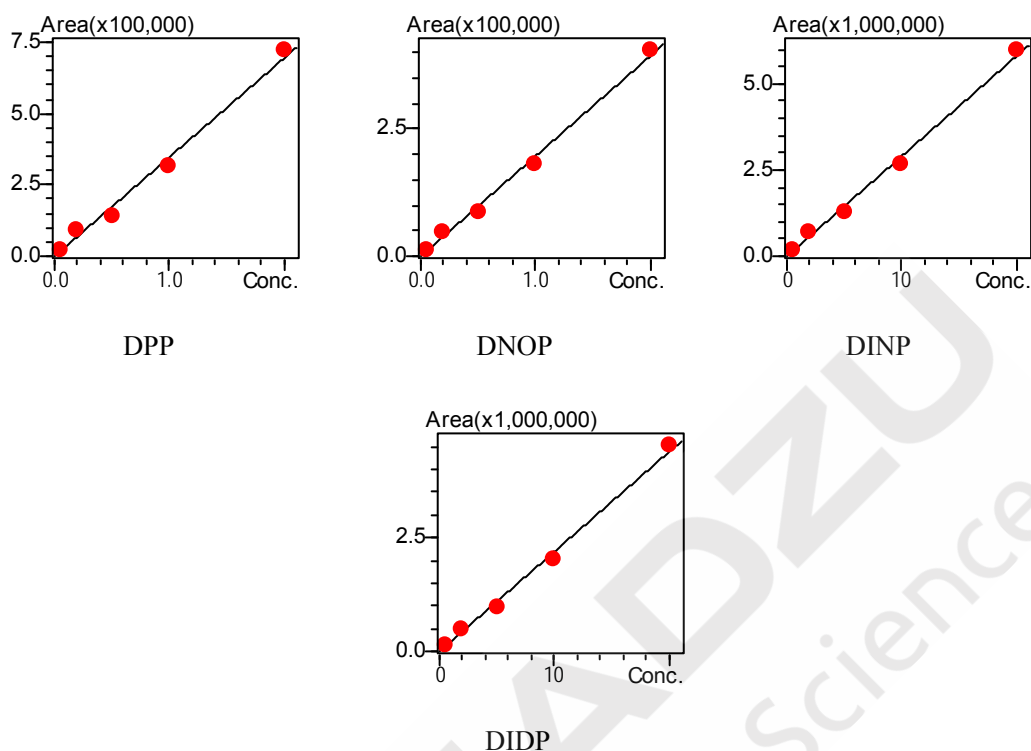


图 3 19 种邻苯二甲酸酯各组分的标准曲线

表 2 19 种邻苯二甲酸酯标准曲线相关系数及检出限

序号	化合物名称	相关系数	检出限 (μg/L)	序号	化合物名称	相关系数	检出限 (μg/L)
1	DMP	0.999	1.0	11	DAP	0.998	1.0
2	DEP	0.999	1.0	12	DHXP	0.998	1.0
3	DIPP	0.999	1.0	13	BBP	0.998	1.0
4	DALP	0.997	1.0	14	DBOEP	0.997	1.0
5	DPRP	0.999	1.0	15	DCHP	0.998	1.0
6	DIBP	0.999	1.0	16	DPP	0.995	1.0
7	DBP	0.999	1.0	17	DNOP	0.998	1.0
8	DMOEP	0.999	1.0	18	DINP	0.998	10.0
9	BMPP	0.998	1.0	19	DIDP	0.998	10.0
10	DEOEP	0.999	1.0				

2.3 回收率

选取市售某种奶粉进行回收率试验，加标浓度为120 μg/kg，按照样品前处理方法平行制备3份，

进样分析，结果见表3。

表3 回收率和重现性

No	化合物名称	回收率 1 (%)	回收率 2 (%)	回收率 3 (%)	平均回收率 (%)	RSD%
1	DMP	104.62	109.36	105.86	106.61	2.31
2	DEP	112.10	118.43	116.73	115.75	2.83
3	DIPP	97.48	102.28	99.92	99.89	2.40
4	DALP	94.91	100.20	101.74	98.95	3.62
5	DPRP	94.09	98.52	96.43	96.35	2.30
6	DIBP	122.52	127.78	125.38	125.23	2.11
7	DBP	111.81	117.14	115.06	114.67	2.34
8	DMOEP	91.12	94.88	94.18	93.39	2.14
9	BMPP	108.32	111.80	106.48	108.87	2.48
10	DEOEP	99.99	93.93	97.48	97.13	3.13
11	DAP	107.52	111.91	111.50	110.31	2.20
12	DHXP	111.34	116.40	115.55	114.43	2.37
13	BBP	101.44	105.88	104.83	104.05	2.23
14	DBOEP	107.03	110.26	112.75	110.01	2.61
15	DCHP	115.33	119.96	118.27	117.85	1.99
16	DPP	114.48	120.72	119.82	118.34	2.85
17	DNOP	114.41	120.48	118.70	117.86	2.65
18	DINP	109.93	115.45	111.61	112.33	2.52
19	DIDP	118.22	116.13	115.06	116.47	1.38

2.4 重复性结果

对 0.2mg/L 的标准样品，重复进样 5 次，5 次测定峰面积重复性见表 4。

表4 峰面积重复性结果

No.	化合物名称	1	2	3	4	5	RSD (%)
1	DMP	203283	195996	203049	201295	200028	0.75

2	DEP	158473	152674	159272	158140	156554	0.86
3	DIPP	33776	32642	34189	33752	33414	1.15
4	DALP	30875	30678	30994	30523	30116	1.44
5	DPRP	44948	43630	45337	45115	44595	0.85
6	DIBP	42150	40829	42363	41836	41400	1.15
7	DBP	43815	42228	43632	43369	42978	0.76
8	DMOEP	8540	8206	8442	8428	8205	1.59
9	BMPP	107088	104122	113537	111264	111619	1.09
10	DEOEP	15301	14706	15017	14780	14636	1.30
11	DAP	28301	27304	28057	27853	27523	0.97
12	DHXP	63541	61817	63606	62802	62135	1.17
13	BBP	91845	88408	91335	90651	89398	1.09
14	DBOEP	26015	25344	26320	26133	25982	0.65
15	DCHP	207140	199729	206985	204798	203283	0.91
16	DPP	93220	90353	94339	94211	93272	0.62
17	DNOP	48926	47179	49546	49362	49434	0.19
18	DINP	659585	672157	678200	650707	668354	2.09
19	DIDP	473955	471925	444650	447010	401968	5.88

3 结论

采用岛津 GCMS-TQ8040 对奶粉中 19 种邻苯二甲酸酯进行分析,该方法操作简单,在 0.05~2.00 mg/L 标准曲线范围内线性良好,加标平均回收率保持在 93%~125%之间,可完全满足奶粉中邻苯二甲酸酯检测要求。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定奶粉中的壬基酚

摘要：本文建立了一种应用超高效液相色谱串联质谱法测定奶粉中壬基酚的检测方法。样品经环己烷/乙酸乙酯（1:1）超声提取、离心并氮吹后，再用流动相复溶后用LCMS-8040进行定量分析，使用外标法定量。壬基酚标准品在1 $\mu\text{g/L}$ -200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内标准曲线相关系数为0.9997，2 $\mu\text{g/L}$ 浓度标准品6次平行的保留时间及峰面积的RSD分别为0.05%和2.02%。测定添加10 $\mu\text{g/kg}$ 壬基酚的奶粉样品，重复三次，其平均回收率为85.5%，保留时间及测定浓度的RSD分别为0.12%和5.02%。

关键词：液相色谱质谱联用 奶粉 壬基酚

近年来，环境激素对人类的威胁已经引起广泛的关注，通过污染食品进入人体是其影响人类健康的重要途径。壬基酚是重要的化工原料，被广泛用于工业制备合成洗涤剂、增湿剂、润滑油添加剂、增塑剂等，是环境中广泛分布的污染物。它同时也会被用到奶粉的包装材料及奶瓶、奶嘴等婴幼儿用品。壬基酚是一种内分泌干扰物，具有雌激素样效应，能够对机体产生毒害作用。大量体内外试验证明了壬基酚的雌激素样效应和生物毒性，其对生物体产生的不良作用包括对内分泌系统、生殖系统和免疫系统的影响以及致癌作用等。因此，奶粉包装内涂料中和婴幼儿奶瓶中壬基酚的分析方法已成为各国食品安全检测的研究热点。在本文中建立的 LC-MS/MS 方法可快速准确测定奶粉中壬基酚的含量。

1.实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.85 色谱工作

液相色谱条件

分析色谱柱：Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mm I.D. \times 50 mm L, 1.6 μm

鬼峰捕集柱：Ghost trap DS-HP 2.1 mm I.D. \times 30 mm L （连接在混合器与自动进样器之间）

流动相：A，水+0.1%氨水；B，甲醇

流速：0.25 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	100
2.50	Pumps	Pump B Conc.	100
2.80	Pumps	Pump B Conc.	50
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(-)

离子源接口电压: -3 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15.0 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

延迟时间: 1 ms

驻留时间: 100 ms

扫描模式: 多反应监测(MRM), MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子(m/z) [M-H] ⁻	产物离子 (m/z)	Q1 电压 (V)	碰撞能量(V)	Q3 电压 (V)
壬基酚	219.2	133.1*	16	32	19
		147.1	16	30	20

*为定量离子对

1.3 样品制备

称取 2.0 g 奶粉样品, 加入 10 mL 环己烷: 乙酸乙酯=1:1 的溶液, 超声 15 min, 在 2500 rpm 的转速下离心 5 min, 用移液管取 1 mL 上清液, N₂ 吹干。用 1 mL 流动相 (0.1%氨水: 甲醇=1:1) 复溶, 过 0.22 μm 的滤膜上机。

2. 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

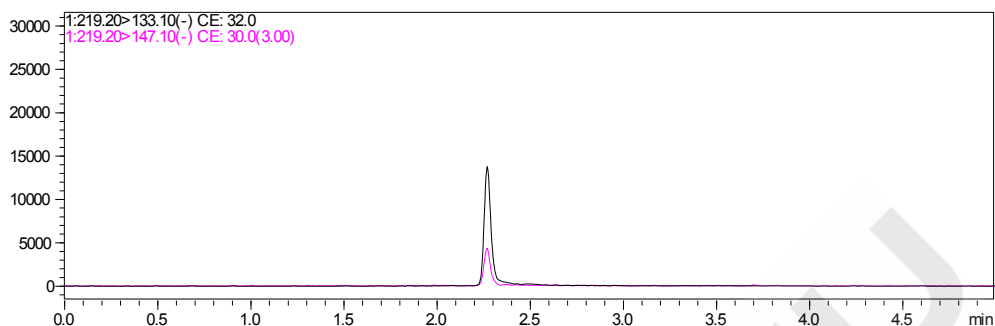


图1 壬基酚标准品(10 µg/L)MRM 色谱图

2.2 线性关系

用 1%氨水/甲醇(1:1)溶液配制浓度分别为 1、10、50、100、200 µg/L 的壬基酚标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法制作校准曲线，线性良好，线性方程、相关系数和每个浓度的准确度见表 3，曲线图形见图 2。

表 3 线性结果

化合物名称	回归方程	r	浓度 (µg/L)	准确度 (%)
壬基酚	$y=3954.58x+126.13$	0.9997	1	99.9
			10	99.2
			50	103.5
			100	100.3
			200	97.1

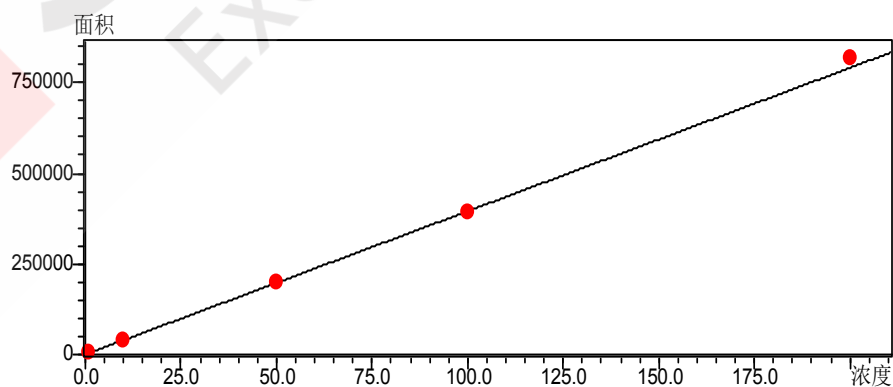


图2 壬基酚校准曲线

2.3 重复性

取浓度为 2 µg/L 的壬基酚标准溶液，重复进样 6 次，考察保留时间、峰面积的重复性，结果见

表 4。

表4 壬基酚标准溶液重复性结果 (n=6)

编号	保留时间 (min)	峰面积
1	2.271	8,912
2	2.269	9,360
3	2.271	9,387
4	2.271	9,173
5	2.271	9,113
6	2.272	9,354
平均	2.271	9,216
RSD(%)	0.05	2.02

2.4 基质加标实验

向空白奶粉中添加壬基酚标准品，使其浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平行 3 份样品测定回收率和 RSD。具体结果如表 5，样品加标平均回收率为 85.5%，测定结果 RSD 为 5.02%。

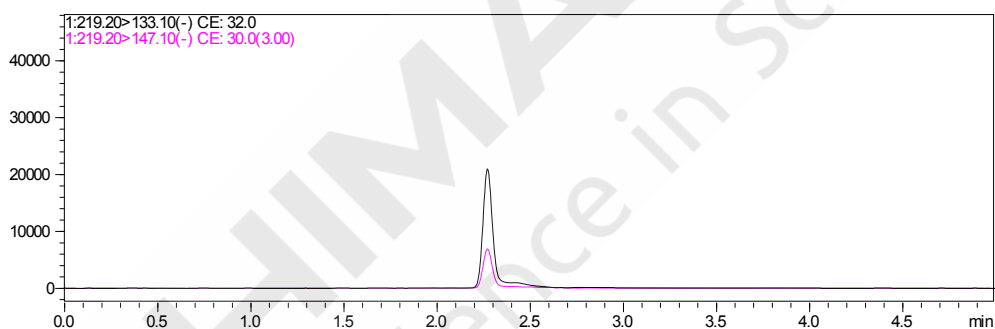


图3 基质加标奶粉 MRM 色谱图

表5 添加回收重复性结果 (n=3)

编号	保留时间 (min)	含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	2.276	8.12
2	2.275	8.54
3	2.270	8.98
平均	2.274	8.55
RSD(%)	0.12	5.02

3 结论

本文建立了使用岛津超高效色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定奶粉中壬基酚的快速准确定量方法，壬基酚标准品在 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ -200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内曲线相关系数为 0.9997。测定添加 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 壬基酚的奶粉样品，重复三次，其平均回收率为 85.5%，保留时间及测定浓度的 RSD

分别为 0.12%和 5.02%。方法学实验结果表明，该方法线性、精密度、灵敏度均满足奶粉中壬基酚含量的测定要求。



GCMS-TQ8040 应用于食品和动物饲料中二恶英(PCDD/Fs)检测

摘要: 本文介绍了一种气相色谱-三重四极杆质谱法(GC-MS/MS)测定食品和动物饲料中超痕量二恶英(PCDD/Fs)的分析方法。方法采用岛津GCMS-TQ8040仪结合MRM监测模式进行检测,采用¹³C标记同位素内标法定量。结果显示该方法具有较好的灵敏度和重复性(2,3,7,8-TCDD绝对进样量为20 fg时,峰面积RSD%<15% (n=12),信噪比S/N>40),且在0.1-200 ng/mL (TCDD)浓度范围内具有良好的线性(线性相关系数R²>0.999)。实际样品的检测结果与高分辨气相色谱-高分辨质谱(HRGC/HRMS)法的测定结果具有较好的一致性,表明GCMS-TQ8040能够按照欧盟法规要求实现对食品和动物饲料中痕量二恶英的分析检测。

关键词: GCMS-TQ8040 食品 动物饲料 二恶英

多氯代二苯并-对-二恶英/多氯代二苯并呋喃(PCDD/Fs)是一类典型的持久性有机污染物(POPs),具有致癌、致畸、致突变等特性,被国际癌症研究机构(IARC)列为一级致癌物(Group I)。PCDD/Fs广泛分布于各种环境介质中,其化学性质稳定,难以生物降解,且具有生物富集和放大能力。人体暴露的PCDD/Fs90%以上来源于饮食摄入,其中90%以上来源于动物源性食物^[1]。因此,与食物和动物饲料相关的二恶英污染事件曾在世界范围内引起极大的关注,如:2010-2011年德国农场饲料二恶英污染事件导致近4700家农场被迫关闭,最终造成巨大经济损失。

早在21世纪初期,欧盟法规就制定了用于食品和动物饲料中PCDD/Fs和多氯联苯(PCBs)污染监控的采样和分析方法,并设定了污染物的最大限量标准。2014年欧盟委员会第589/2014号^[2]和709/2014法规^[3]首次将气相色谱-三重四级杆质谱法(GC-MS/MS)列为食品和饲料中PCDD/Fs和PCBs的分析确认方法(confirmatory method),这表明GC-MS/MS不仅能够在超痕量污染物的筛查中发挥重要作用,而且在政府监控食物和饲料样品中PCDD/Fs和PCBs等方面承担更多角色。

本文介绍了基于岛津GCMS-TQ8040结合SmartMRM功能建立的食品和动物饲料中PCDD/Fs的分析方法,并对实际食品和饲料样品进行了检测分析,结果与高分辨气相色谱/高分辨质谱法(HRGC/HRMS)检测结果具有较好的一致性。

表1.PCDD/Fs毒性当量因子(TEF)列表

化合物	WHO ₁₉₉₈ -TEF	WHO ₂₀₀₅ -TEF	化合物	WHO ₁₉₉₈ -TEF	WHO ₂₀₀₅ -TEF
2,3,7,8-TCDD	1	1	2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1	1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.03
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1	2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.001	0.001	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1

OCDD	0.0001	0.0003	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1
			1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.001	0.001
			1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.001	0.001
			OCDF	0.0001	0.0003

1 实验部分

1.1 试剂

PCDD/Fs 标准品及 ^{13}C 标记同位素内标分别购自美国 Cambridge Isotope Laboratories 和 加拿大 Wellington Laboratories。

1.2 样品前处理

食品和动物饲料样品的前处理方法基于 EPA method 1613B^[4] 并进行适当修改。样品萃取采用加速溶剂萃取 (ASE) 法, 净化采用酸/碱复合硅胶柱, 氧化铝柱和活性炭柱等。样品萃取前加入 ^{13}C 标记替代内标 (1613-LCS), 仪器分析前加入 ^{13}C 标记进样内标 (1613-IS)。

1.3 仪器条件

样品分析采用岛津 GCMS-TQ8040。表 2 是 GC-MS/MS 的仪器分析条件。PCDD/Fs 分析的 MRM 方法采用岛津的 MRM 自动优化工具, 在一个序列中优化最佳的产物离子及碰撞能量, 并将 MRM 的相关参数自动注册到 Smart MRM 数据库, 建立 MRM 的仪器方法 (见图 1)。该 MRM 方法中所监测的 17 种 PCDD/Fs 及其 ^{13}C 标记同位素内标均选择两个不同的前体离子和对应产物离子, 并给出各离子对的驻留时间 (dwell time)。为改善低浓度下目标物色谱峰的峰型 (2,3,7,8-TCDD/F, 10 fg/ μL), 以及灵敏度和重现性, 设置中将 2,3,7,8-TCDD/F 的驻留时间增加至 0.35s; 为保证各组中化合物的循环采集时间在 1.1s, 将 ^{13}C 标记同位素内标的 2,3,7,8-TCDD/F 的驻留时间减少至 0.2s。PCDD/Fs 同系物和 ^{13}C 标记内标的保留时间及 MRM 条件设置见表 3。

表 2. GCMS 的仪器条件

气相条件	
色谱柱	DB-5MS (60 m \times 250 μm \times 0.25 μm)
进样口模式	不分流进样
进样体积	2 μL
高压进样	300kPa (2 min)
进样时间	1 min
进样温度	290 $^{\circ}\text{C}$
色谱柱柱温程	150 $^{\circ}\text{C}$ (3 min) \rightarrow (20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) \rightarrow 230 $^{\circ}\text{C}$
序	(18 min) \rightarrow (5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) \rightarrow 235 $^{\circ}\text{C}$ (10 min) \rightarrow (4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) \rightarrow 320 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)
控制模式	恒线速度控制
流量	1.03 mL/min

质谱条件

离子化方式	EI
离子源温度	250 °C
接口温度	270 °C
采集模式	MRM 模式
CID 气	氦气
发射电流	250 μA
循环时间	1.1 sec
CID 气压力	150 kPa
检测器电压	1.8 kV

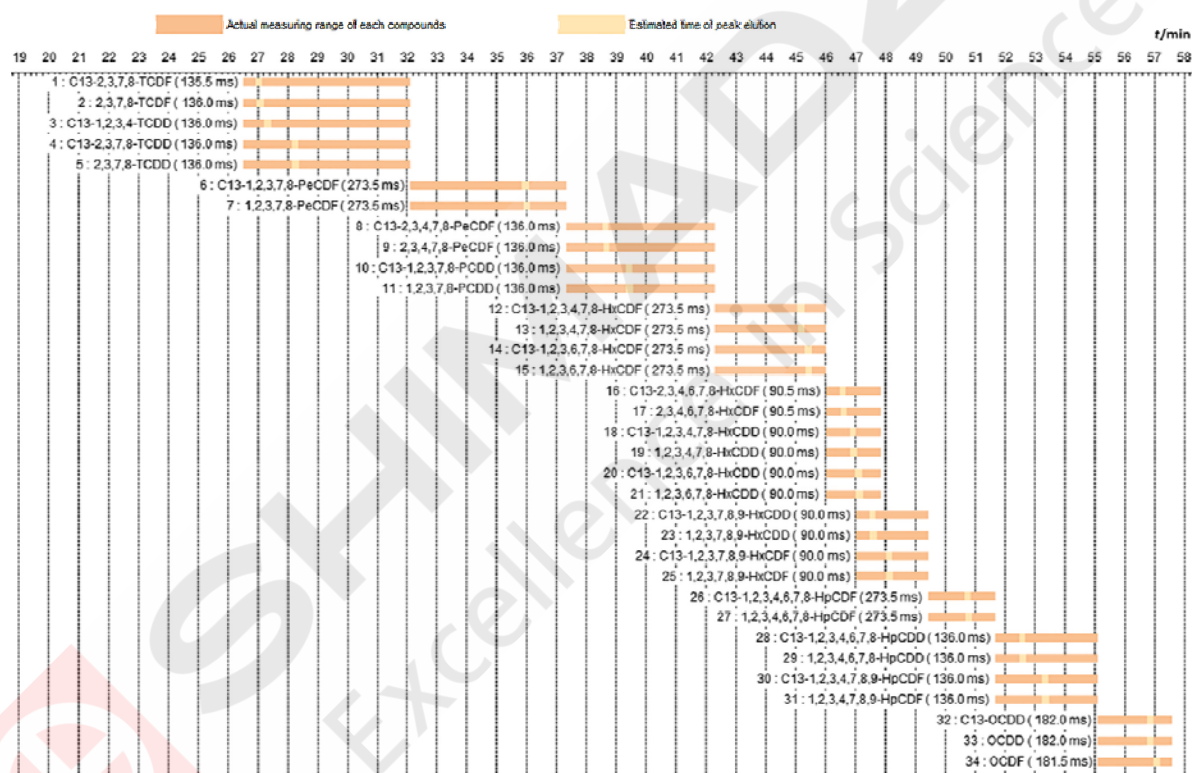


图 1 采用 Smart MRM 功能建立的 PCDD/Fs 同系物 MRM 自动采集方法

表 3. PCDD/Fs 同系物和 ¹³C 标记同位素内标的保留时间及 MRM 条件设置

峰	分析物	保留时间	前体离子>产物离子	CE(V)	前体离子>产物离子	CE(V)
1	C13-2,3,7,8-TCDF	27.024	315.90>251.90	31	317.90>253.90	31
2	2,3,7,8-TCDF	27.076	303.90>240.90	31	305.90>242.90	31
3	C13-1,2,3,4-TCDD	27.323	331.90>267.90	25	333.90>269.90	25
4	C13-2,3,7,8-TCDD	28.235	331.90>267.90	25	333.90>269.90	25
5	2,3,7,8-TCDD	28.253	319.90>256.90	25	321.90>258.90	25
6	C13-1,2,3,7,8-PeCDF	35.953	351.90>287.90	34	349.90>285.90	34
7	1,2,3,7,8-PeCDF	36.01	339.90>276.90	34	337.90>274.90	34
8	C13-2,3,4,7,8-PeCDF	38.625	351.90>287.90	37	349.90>285.90	37
9	2,3,4,7,8-PeCDF	38.673	339.90>276.90	37	337.90>274.90	37

10	C13-1,2,3,7,8-PCDD	39.419	367.90>303.90	25	365.90>301.90	25
11	1,2,3,7,8-PCDD	39.441	355.90>292.90	25	353.90>290.90	25
12	C13-1,2,3,4,7,8-HxCd	45.168	385.80>321.90	37	387.80>323.90	37
13	1,2,3,4,7,8-HxCDF	45.183	373.80>310.90	37	375.80>312.90	37
14	C13-1,2,3,6,7,8-HxCd	45.413	385.80>321.90	37	387.80>323.90	37
15	1,2,3,6,7,8-HxCDF	45.438	373.80>310.90	37	375.80>312.90	37
16	C13-2,3,4,6,7,8-HxCd	46.568	385.80>321.90	37	387.80>323.90	37
17	2,3,4,6,7,8-HxCDF	46.604	373.80>310.90	37	375.80>312.90	37
18	C13-1,2,3,4,7,8-HxCd	46.911	401.80>337.90	25	403.80>339.80	25
19	1,2,3,4,7,8-HxCDD	46.935	389.80>326.90	25	391.80>328.80	25
20	C13-1,2,3,6,7,8-HxCd	47.1	401.80>337.90	25	403.80>339.80	25
21	1,2,3,6,7,8-HxCDD	47.139	389.80>326.90	25	391.80>328.80	25
22	C13-1,2,3,7,8,9-HxCd	47.577	401.80>337.90	25	403.80>339.80	25
23	1,2,3,7,8,9-HxCDD	47.591	389.80>326.90	25	391.80>328.80	25
24	C13-1,2,3,7,8,9-HxCd	48.126	385.80>321.90	34	387.80>323.90	34
25	1,2,3,7,8,9-HxCDF	48.145	373.80>310.90	34	375.80>312.90	34
26	C13-1,2,3,4,6,7,8-HpC	50.755	419.80>355.80	37	421.80>357.80	37
27	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	50.788	407.80>344.80	37	409.80>346.80	37
28	C13-1,2,3,4,6,7,8-HpC	52.584	435.80>371.80	25	437.80>373.80	25
29	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	52.596	423.80>360.80	25	425.80>362.80	25
30	C13-1,2,3,4,7,8,9-HpC	53.348	419.80>355.80	37	421.80>357.80	37
31	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	53.357	407.80>344.80	37	409.80>346.80	37
32	C13-OCDD	56.85	469.70>405.80	25	471.70>407.80	25
33	OCDD	56.867	457.70>394.80	25	459.70>396.80	25
34	OCDF	57.081	441.70>378.80	34	443.70>380.80	34

2 结果与讨论

2.1 色谱图

图 2 是 17 种 PCDD/Fs 同系物的分析质量色谱图 (EPA 1613-CS3), 仪器分析时间共计 60 min。

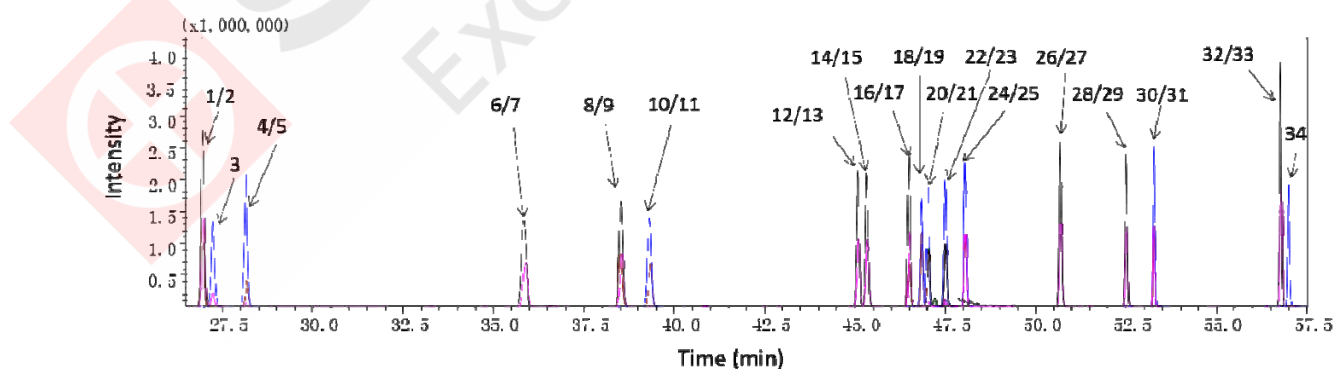


图 2 . PCDD/Fs (10-100 pg/ μ L) 的质量色谱图 (EPA 1613-CS3) , 峰号对应目标物参见表 3.

2.2 线性考察

采用 EPA-1613 CVS 系列 (CSL,CS0.5,CS1-CS5)制作标准曲线。标准溶液进样量为 1 μ L。所有化合物在设定范围内(例:0.1-200ng/ml (TCDD))线性相关系数 $R^2 > 0.999$ 。17 种 PCDD/Fs

同系物的平均相对响应因子见表 4。图 3-5 分别例举了 2,3,7,8-TCDD, 2,3,7,8-TCDF 和 1,2,3,7,8-PeCDD 的校正曲线。

表 4.PCDD/Fs 校准曲线的相关系数及各同系物的平均响应因子。

化合物	线性回归方程	R ²	平均 RF	RF %RSD
2378-TCDD	Y = 1.150399X + 3.29953e-004	0.99999	1.22794	8.06
12378-PCDD	Y = 1.014733X + 3.009239e-003	1.00000	1.03887	1.96
123478-HxCDD	Y = 1.079761X - 5.260601e-004	0.99997	1.09358	3.65
123678-HxCDD	Y = 0.9705907X + 5.362575e-002	0.99915	1.08710	5.37
123789-HxCDD	Y = 1.024768X + 3.682249e-002	0.99967	1.00394	14.48
1234678-HpCDD	Y = 0.9429045X + 1.331675e-002	0.99998	1.02985	6.92
OCDD	Y = 1.242978X - 6.145206e-002	0.99929	1.14683	6.10
2378-TCDF	Y = 1.15754X + 9.032785e-004	0.99996	1.18104	3.57
12378-PeCDF	Y = 1.015266X - 5.771587e-003	0.99997	1.07846	7.83
23478-PeCDF	Y = 1.045151X - 6.304552e-003	0.99998	1.04210	4.49
123478-HxCDF	Y = 1.006328X + 2.605984e-002	0.99988	1.09930	6.04
123678-HxCDF	Y = 0.9307018X + 3.432044e-002	0.99971	1.06611	8.06
234678-HxCDF	Y = 0.9080292X + 3.053454e-002	0.99983	1.00464	6.34
123789-HxCDF	Y = 0.960272X + 2.450491e-002	0.99993	1.03403	9.10
1234678-HpCDF	Y = 0.9732686X + 4.031919e-002	0.99958	1.08255	4.88
1234789-HpCDF	Y = 0.9562794X + 3.622056e-002	0.99969	1.06788	5.48
OCDF	Y = 1.424071X + 3.271179e-003	0.99999	1.50245	8.94

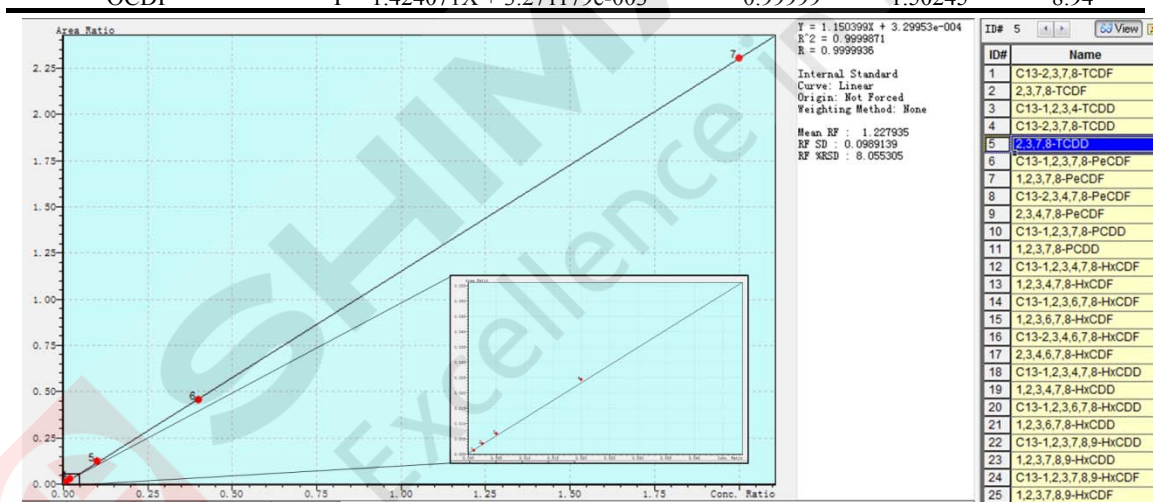


图 3. 2,3,7,8-TCDD 的 7 点线性拟合校准曲线及平均响应因子

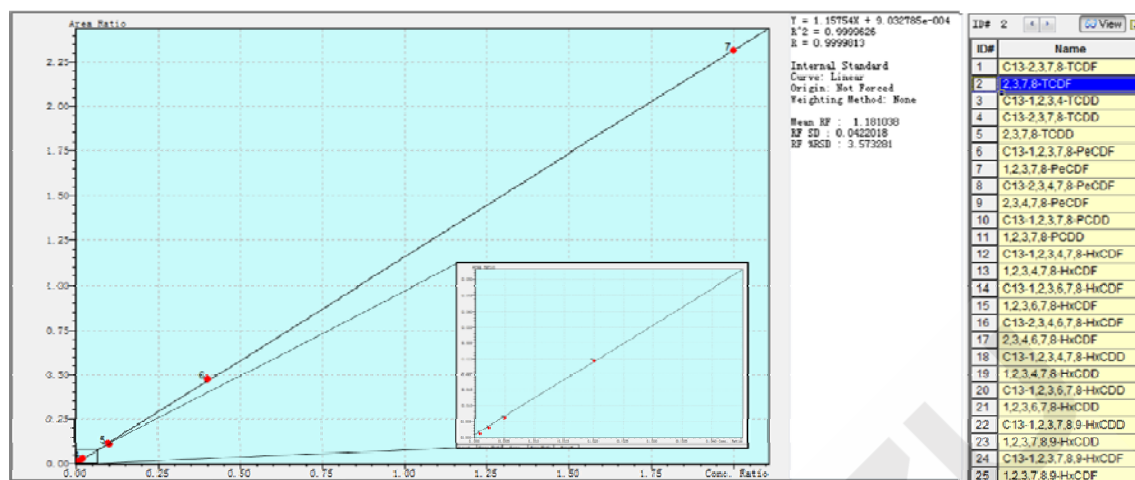


图 4. 2,3,7,8-TCDF 的 7 点线性拟合校准曲线及平均响应因子

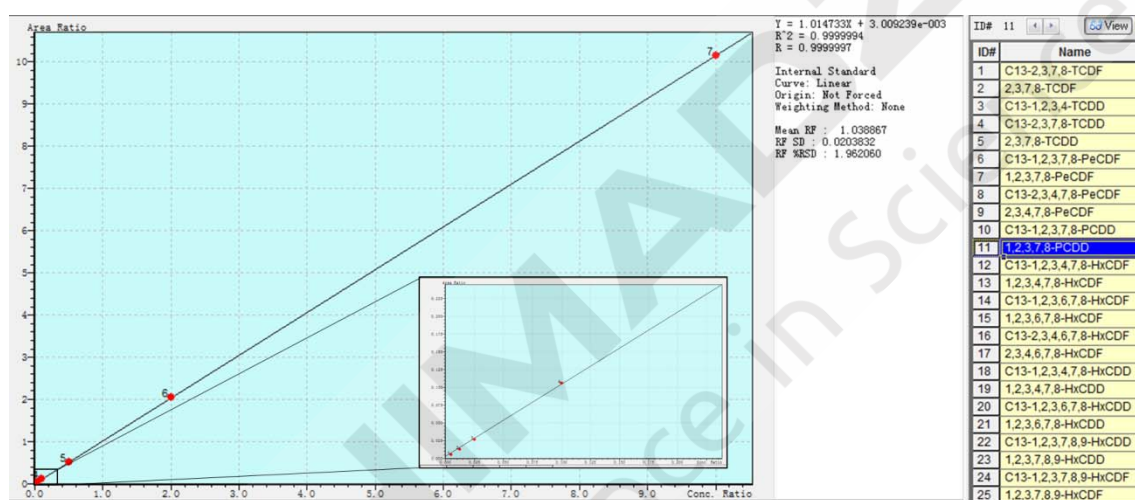


图 5. 1,2,3,7,8-PeCDD 的 7 点线性拟合校准曲线及平均响应因子

2.3 灵敏度考察

为考察 GC-MS/MS 在低进样浓度的响应灵敏度,将 EPA-1613CS1 标准溶液稀释 50 倍(10 fg/ μ L 2,3,7,8-TCDD),进样量为 2 μ L,即绝对进样量为 20 fg。PCDD/Fs 同系物的 MRM 分析质量色谱图如图 6。

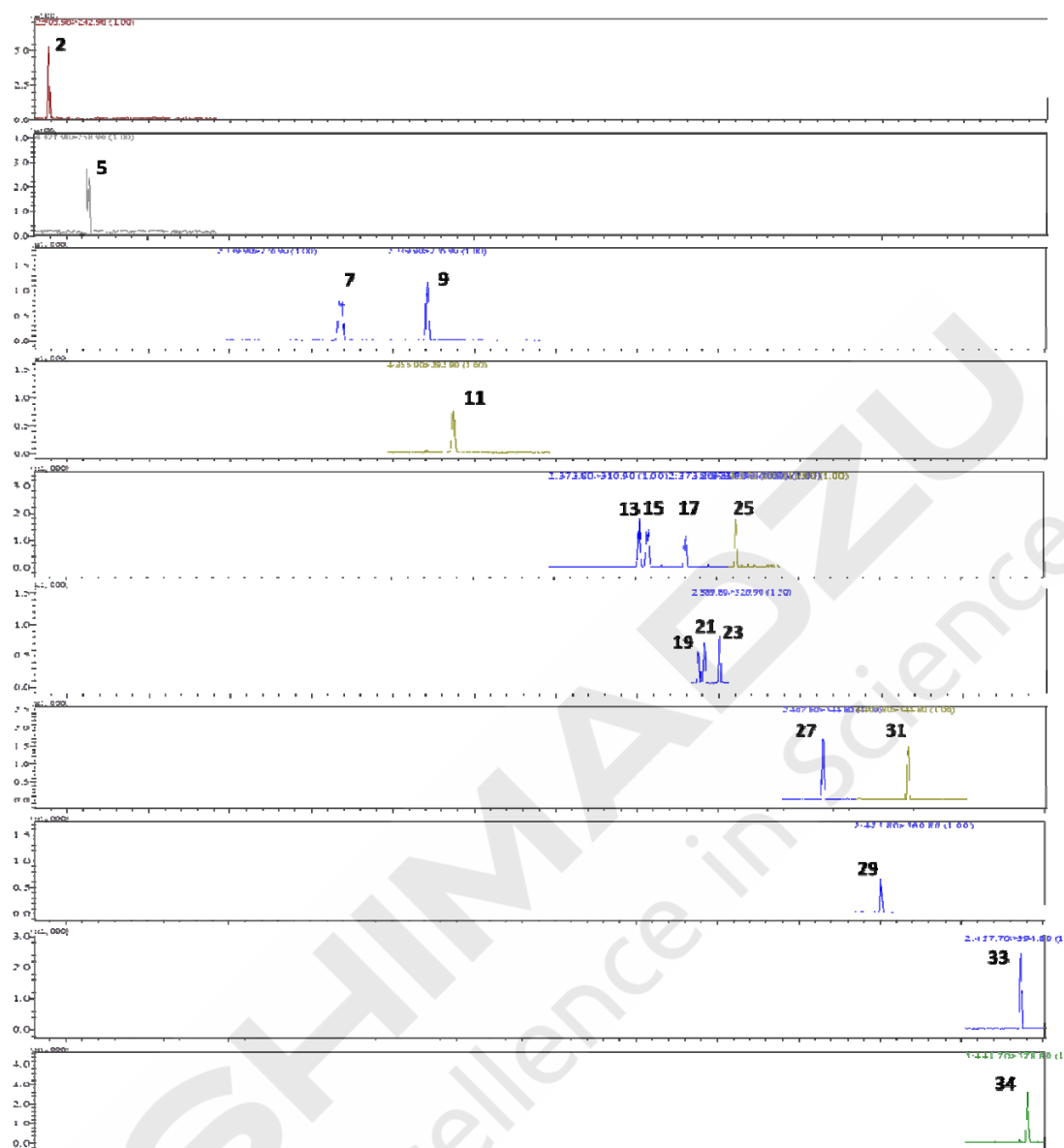


图 6. PCDD/Fs 同系物(10-100 fg/ μ L, 2 μ L 进样体积)的 MRM 分析质量色谱图。图中峰号代表的化合物参见表 3。

2.4 重复性考察

将稀释 50 倍的 EPA-1613CS1 (10 fg/ μ L, 2,3,7,8-TCDD)分别进行日内和日间进样,考察仪器响应的重复性和稳定性。日内连续进样 4 次,日间连续进样 3 天,共计 12 次。峰面积变化的结果见图 7,17 种 PCDD/Fs 同系物与对应 ^{13}C 标记同位素内标的峰面积 RSD 均小于 15% (见图 7),表明仪器响应的重复性和稳定性均较好。

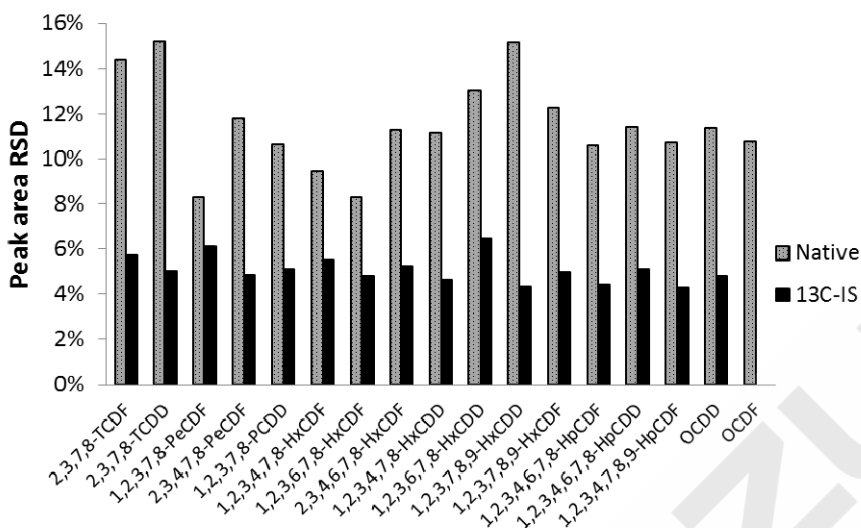


图 7. PCDD/Fs 与 ¹³C 标记同位素内标峰面积的重现性(n=12)

2.5 实际样品分析

牛奶和饲料用鱼油样品经前处理后，在相同的气相色谱条件下分别进行 GC-MS/MS 和 HRGC/HRMS 检测分析。图 8 是鱼油样品中 2,3,7,8-TCDF, 2,3,7,8-TCDD 和 1,2,3,7,8-PCDD 及其对应的 ¹³C 标记同位素内标 MRM 分析质量色谱图。图 9 和图 10 分别是鱼油和奶粉样品中 PCDD/Fs 同系物的 GC-MS/MS 和 HRGC/HRMS 检测结果对比。在 GC-MS/MS 的检测结果中，鱼油和奶粉中 PCDD/Fs 的毒性相当量 (TEQ) 分别为 29.5 pg WHO-TEQ₂₀₀₅/g 脂肪和 1.38 pg WHO-TEQ₂₀₀₅/g；而 HRGC/HRMS 的检测结果中，鱼油和奶粉中 PCDD/Fs 的毒性相当量 (TEQ) 分别为 24.9 pg WHO-TEQ₂₀₀₅/g 脂肪和 1.37 pg WHO-TEQ₂₀₀₅/g。二者相对偏差 RD<10%，表明 GC-MS/MS 与 HRGC/HRMS 的分析结果具有较好的一致性。

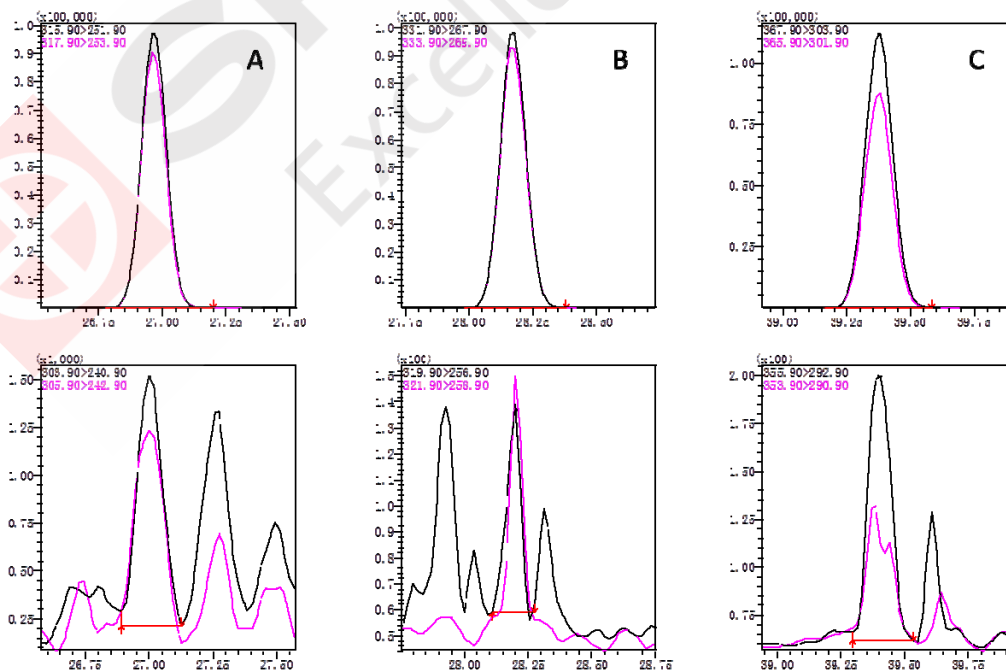


图 8. 鱼油样品中 2,3,7,8-TCDF (A), 2,3,7,8-TCDD (B) 和 1,2,3,7,8-PCDD (C) 及其对应的 ¹³C 标记同位素内

标的 MRM 分析质量色谱图

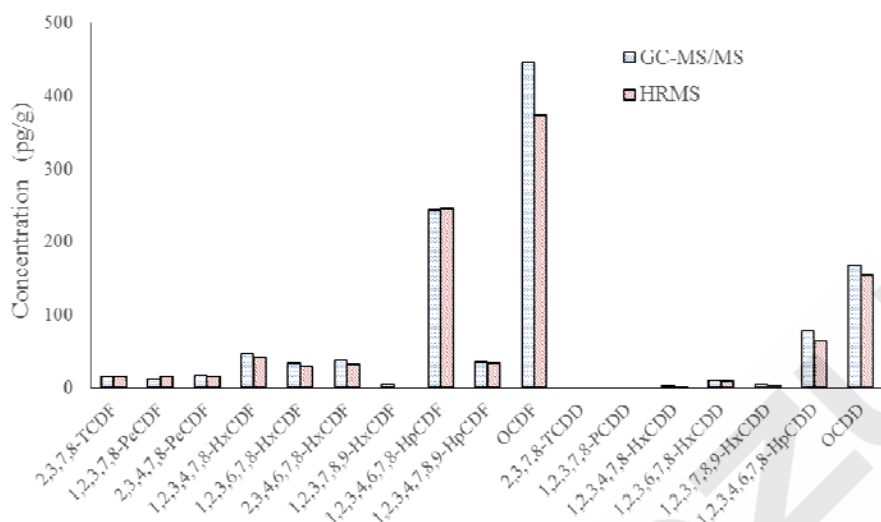


图 9. 鱼油中 PCDD/Fs 同系物的 GC-MS/MS 和 HRGC/HRMS 检测结果对比图

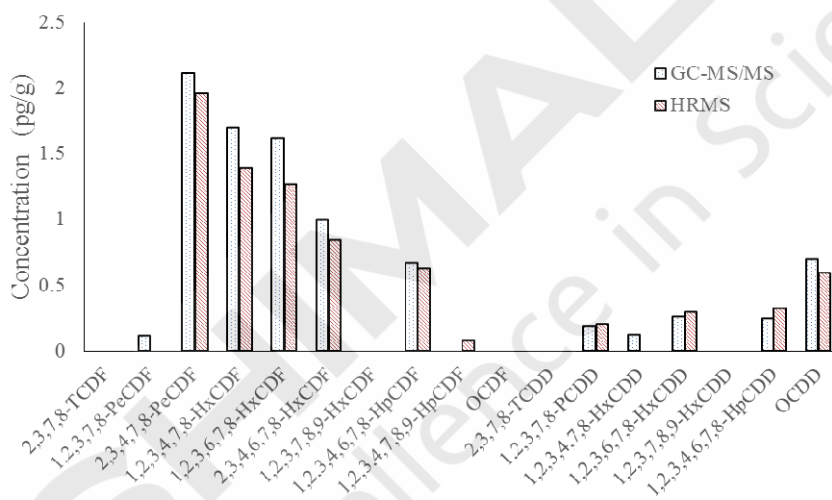


图 10. 奶粉中 PCDD/Fs 同系物的 GC-MS/MS 和 HRMS 检测结果对比图

3 结论

岛津 GCMS-TQ8040 系统能够实现对食品和动物饲料中 PCDD/Fs 的有效筛查和定量分析。该方法具有较高的灵敏度，良好的线性和重现性。对实际样品的分析显示，GC-MS/MS 能够获得与 HRGC/HRMS 的基本一致的分析结果，表明 GCMS-TQ8040 能够按照欧盟法规要求实现对食品和动物饲料中痕量 PCDD/Fs 的分析检测。

气相色谱质谱联用法检测奶粉中四种雌激素

摘要: 本实验建立了对复杂基质本底的奶粉中四种雌激素雌酮、雌二醇、雌三醇和炔雌醇的气相色谱质谱联用检测方法。实验以乙腈为提取溶剂,经正己烷去除油脂,通过 C18 固相萃取柱净化后,使用体积比为 99:1 的双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)和甲基氯硅烷(TMCS)为衍生试剂在吡啶存在下进行衍生。结果显示该方法各组分分离良好,在低浓度下加标回收率为 61.2~85.4%,线性范围为 2~500 ng/g,在低浓度下 RSD 均低于 15.0%,检测限为 0.13~0.3ng/g。该方法可实现对奶粉中四种雌激素准确、灵敏的定性定量检测。

关键词: 气相色谱质谱联用, 雌激素, 奶粉

类固醇类雌激素是一大类亲脂、低分子量、具有雌激素活性的一类化合物,被广泛用于奶牛养殖业,其在促进提高牛奶产量同时也带来了牛奶和奶粉中残留雌激素的风险。激素通过食物链进入人体会产生一系列与内分泌相关的诸如生长发育障碍、出生缺陷和生育缺陷等疾病,且多数激素具有潜在的致癌性。其中,关注的重点集中在几个雌激素活性尤其高的化合物上,如天然雌激素 17 β -雌二醇(17 β -estradiol,E2),雌酮(estrone,E1),雌三醇(estriol,E3)和炔雌醇(17 α -ethinylestradiol,EE2)。考虑到奶粉的主要消费对象为婴幼儿和青春期前儿童,他们处于生长发育的关键时期且对雌激素高度敏感。因此牛奶中各种类固醇类雌激素的分析和检测意义十分重大。

本文采用气质联用法测定奶粉中四种雌激素雌酮、17 β -雌二醇、雌三醇和炔雌醇的含量,此方法重现性好,灵敏度高。

1. 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 GCMS-QP2010 Ultra 气质联用仪、旋转蒸发器、氮吹仪、固相萃取装置、固相萃取柱 C18(2 g, 6 mL)。

乙腈、正己烷、吡啶为 HPLC 级

衍生试剂: BSTFA-TMCS(体积比 99:1)

1.2 分析条件

色谱柱: Rtx-5Sil MS, 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m

进样口温度: 280 $^{\circ}$ C

柱温: 100 $^{\circ}$ C(1 min) 25 $^{\circ}$ C/min 250 $^{\circ}$ C(0 min) 5 $^{\circ}$ C/min 300 $^{\circ}$ C(5 min)

柱流量: 1.02 mL/min

离子源温度: 230 $^{\circ}$ C

进样模式: 不分流, 1 min

接口温度: 280 $^{\circ}$ C

高压进样: 250 kPa, 1 min

采集方式：SIM(各组分的定量离子和参考离子见表 1)

表 1 各组分定量离子和参考离子

雌激素	定量离子	参考离子
雌酮(E1)	342	257,244
雌二醇(E2)	416	285,326
炔雌醇(E2)	425	285,440,300
雌三醇(E3)	504	311,345

1.3 样品处理

样品处理步骤见图 1。

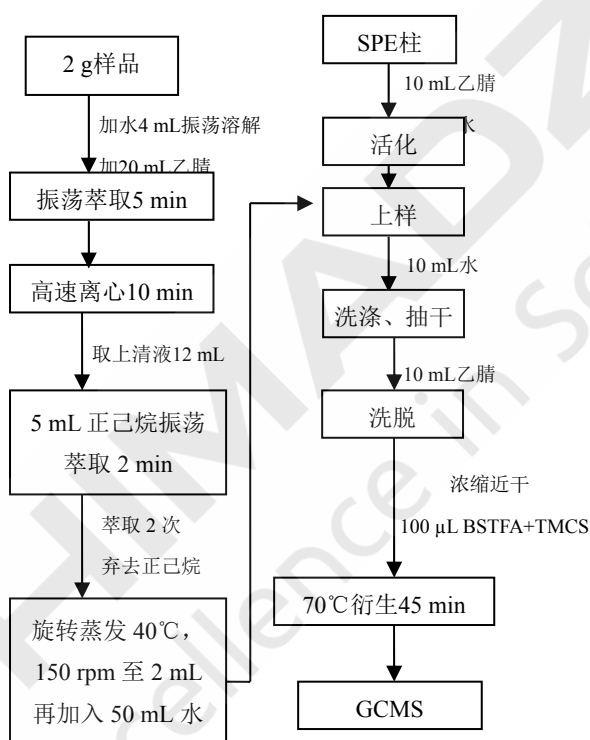
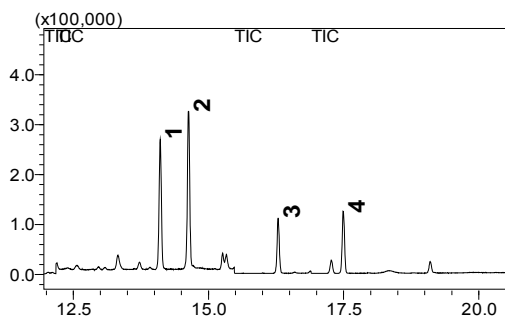


图 1 样品前处理步骤

2. 结果与讨论

2.1 雌激素组分出峰谱图

图 2 为本方法检测四种雌激素标样的总离子流图(浓度为 10 ng/mL)



1. 雌酮 2.雌二醇 3.炔雌醇 4.雌三醇

图2 四种雌激素标样总离子流图

2.2 标准曲线

取甲醇定容的浓度为 100ng/mL 的工作液储备液，使用按照样品处理步骤制备的基质溶液将标准稀释为 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500ng/mL 的标准工作液，氮气吹干后衍生，分别进样，得到校准曲线。

结果表明，该方法线性良好，线性方程及相关系数见表 2。

表 2 线性方程及相关系数

雌激素	线性方程	相关系数
E1	Y=21721X-28474	0.9991
E2	Y=19227X-26088	0.9993
EE2	Y=11202X-21841	0.9981
E3	Y=5662X-9451	0.9989

2.3 方法重现性

平行处理加标浓度为 20 ng/g 的样品 3 份，重现性结果如表 3 所示。

表 3 保留时间与峰面积的重现性

编号	保留时间(min)			
	E1	E2	EE2	E3
1	14.151	14.665	16.328	17.520
2	14.163	14.674	16.344	17.531
3	14.148	14.663	16.327	17.521
平均值	14.154	14.667	16.333	17.524
RSD%	0.06	0.04	0.06	0.03

编号	峰面积			
	E1	E2	EE2	E3
1	1098890	882117	498600	223924
2	1050633	844935	515861	245422
3	879692	666549	430615	184217
平均值	1009828	797867	481692	217845
RSD%	11.39	14.44	9.36	14.25

结果表明样品在低浓度加标，经过前处理后检测结果具有良好的重现性。

2.4 加标回收率

取奶粉空白样品，分别加入不同浓度的四种雌激素标准工作液，使最终含量分别为 5 ng/g, 20 ng/g。其加标回收率结果如表 4 所示。

表 4 不同浓度加标回收率

加标量 (ng/g)	化合物	平均结果 (ng/g)	平均回收率 (%)
5	E1	3.28	65.6
	E2	3.06	61.2
	EE2	3.47	69.7
	E3	4.04	80.8
20	E1	16.08	80.4
	E2	16.65	83.3
	EE2	16.63	83.2
	E3	17.07	85.4

2.5 检测限

以三倍噪声计算得出四种雌激素 E1、E2、EE2 和 E3 的检测限分别为 0.16 ng/g、0.13 ng/g、0.24 ng/g、0.30 ng/g。

2.6 实际样品分析结果

按本方法测定某品牌的奶粉，得到的图谱如图 3 所示。两份重复样品中均未检出四种雌激素。

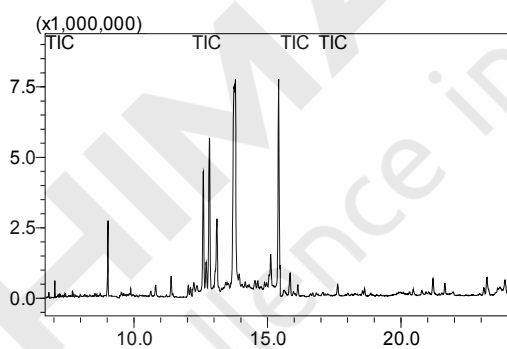


图 3 某品牌样品总离子流图

3. 结论

本方法具有灵敏度高、重现性好、线性范围宽等优点，适用于奶粉中四种雌激素含量的准确测定，特别是低含量样品的检测。

LCMS-8045 测定牛奶中 5 种雌激素含量

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定牛奶中雌酮、17 β -雌二醇、雌三醇 3 种天然雌激素和己雌酚、己烯雌酚 2 种合成雌激素含量的方法。牛奶样品以乙腈沉淀蛋白，并超声萃取后，不需要经过衍生，样品在 ESI 源负离子模式下电离，MRM 模式采集数据，外标法定量，校准曲线线性良好，线性相关系数均不低于 0.9993。对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05~0.12%和 0.42~8.26%之间，仪器定量限在 0.006~0.033 ng/mL。该方法前处理简单、灵敏度高、重复性好，可用于牛奶样品中雌激素含量的检测。

关键词: 三重四极杆质谱 LCMS-8045 牛奶 雌激素 负离子模式

雌激素属于类固醇类激素的一种，其在奶牛养殖业被广泛使用，以提高奶牛的产奶量，这种做法在提高经济效益的同时可能会使得雌激素在牛奶中残留。近年来，已经有大量研究证明：雌激素通过食物链进入人体可能会诱发乳腺、子宫、睾丸、骨、肾和其他一些组织的癌症。因此牛奶中雌激素的分析和检测具有十分重要的现实意义。

本文以雌酮 (Estrone, E1)、17 β -雌二醇 (17 β -Estradiol, E2)、雌三醇 (Estriol, E3)、己雌酚 (Hexestrol, HEX) 和己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, DES) 为目标物，利用岛津 LCMS-8045 建立了牛奶中雌激素含量的检测方法：牛奶样品以乙腈沉淀蛋白，并超声萃取后，不需要经过衍生，样品在 ESI 源负离子模式下电离，MRM 模式采集数据，外标法定量。该方法前处理简单、灵敏度高、重复性好，可用于牛奶样品中雌激素含量的检测。

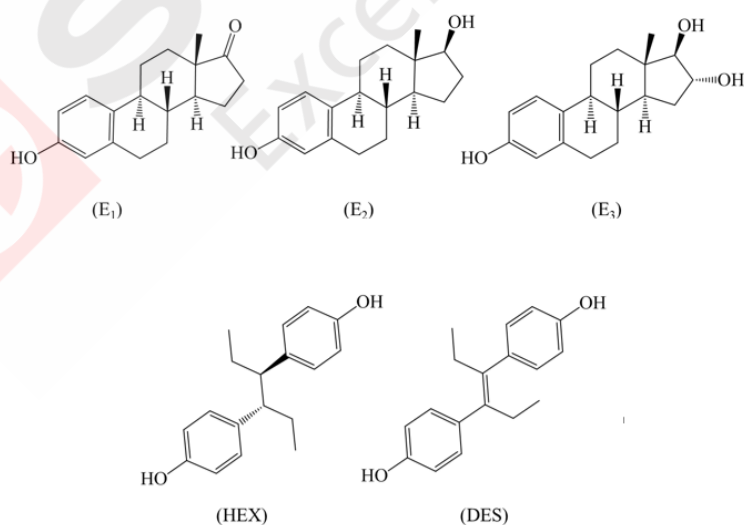


图1 5种雌激素分子结构式

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8045 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GISS Column (2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm C18)

流动相: A 相-0.03%氨水溶液, B 相-乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40℃

进样量: 5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	Pump B Conc.	20
0.50	Pumps	Pump B Conc.	50
3.50	Pumps	Pump B Conc.	50
3.70	Pumps	Pump B Conc.	95
4.50	Pumps	Pump B Conc.	95
4.60	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(-)

DL 温度: 150℃

加热气: 空气 12.0 L/min

加热模块温度: 350℃

雾化气: 氮气 2.0 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM)

干燥气: 氮气 8.0 L/min

驻留时间: 100 ms

碰撞气: 氩气

延迟时间: 3 ms

接口温度: 350℃

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM优化参数

化合物	英文名	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
雌三醇	Estriol (E3)	50-27-1	287.20	171.10*	20.0	40.0	27.0
				145.10	20.0	47.0	22.0
17β-雌二醇	17β-Estradiol (17β-E2)	50-28-2	271.20	145.10*	13.0	44.0	21.0
				183.20	28.0	45.0	30.0
雌酮	Estrone (E1)	53-16-7	269.20	145.10*	30.0	41.0	25.0
				143.00	13.0	66.0	12.0
己雌酚	Hexestrol (HEX)	84-16-2	269.20	119.05*	19.0	43.0	18.0
				134.10	19.0	16.0	11.0
己烯雌酚	Diethylstilbestrol (DES)	6898-97-1	267.20	251.10*	18.0	27.0	23.0
				237.10	18.0	31.0	22.0

注：*表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

标准溶液配制：将 100 mg/L 混合标样储备液以 50% 甲醇水溶液逐级稀释得到浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 ng/mL 的标准溶液。

1.4 样品前处理方法

取 200 μL 牛奶样品，加入 800 μL 乙腈，涡旋振荡 1 min，超声萃取 20 min，10000 rpm 离心 3 min，取上清液上机检测。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品色谱图

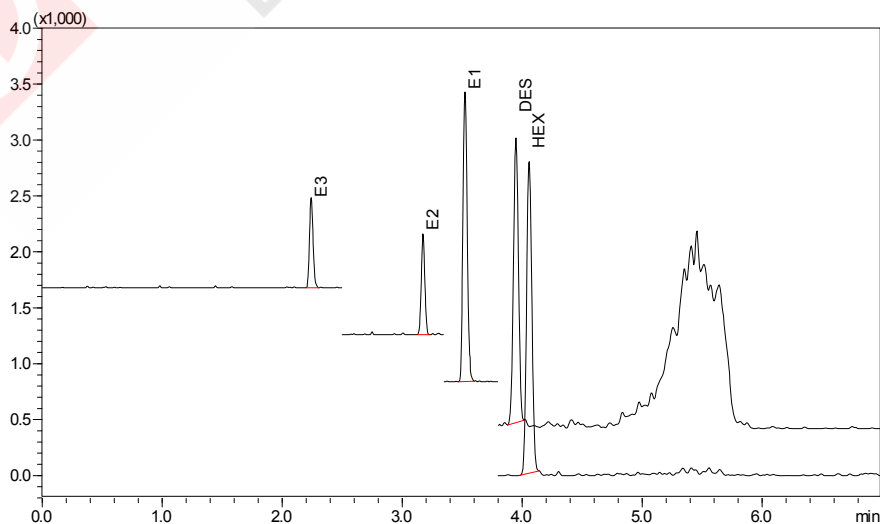


图2 0.2 ng/mL 标准样品 MRM 色谱图

2.2 线性范围

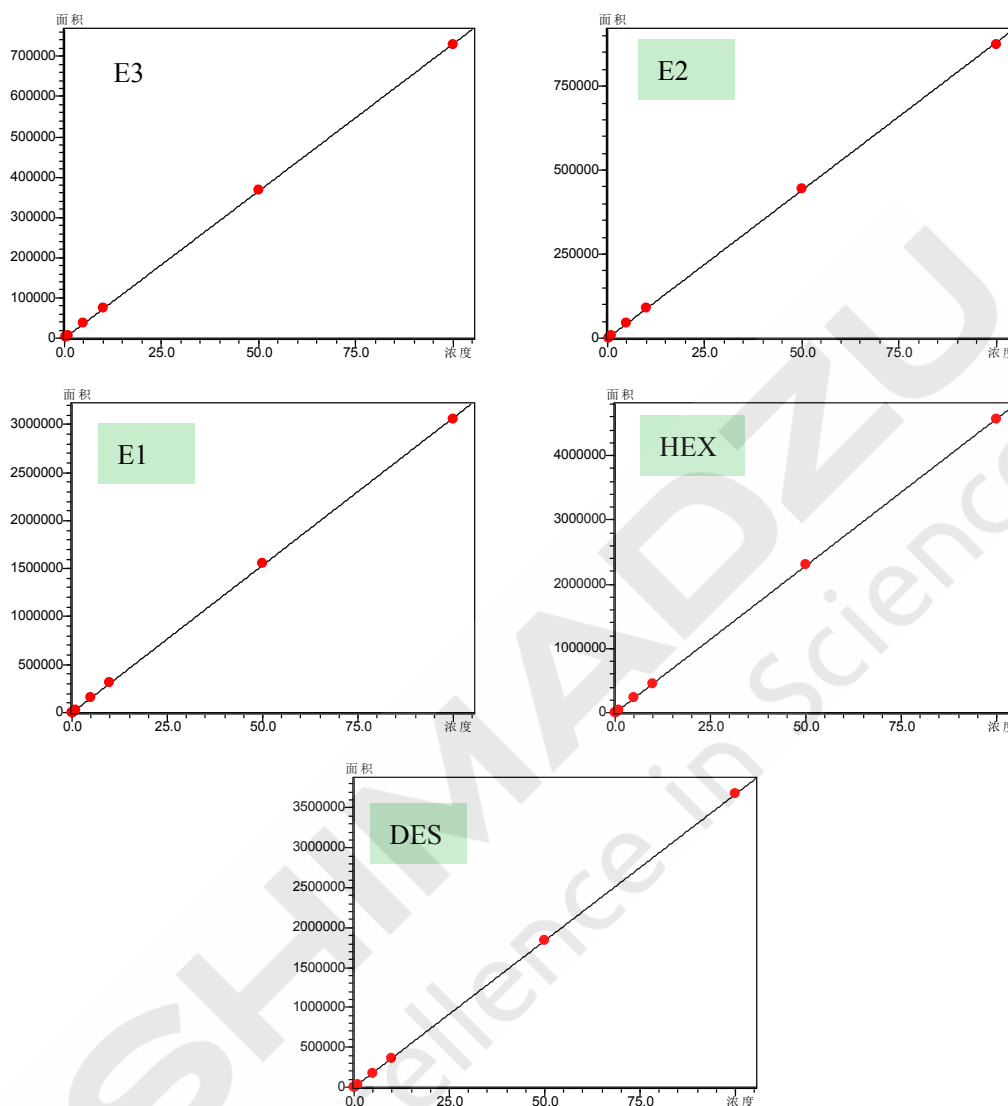


图3 校准曲线

将浓度为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 和 100.0 ng/mL 的 4 种目标物标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 2 所示，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

表 3 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	线性相关系数 R	准确度 (%)
E3	$Y = (7335.5)X + 150.426$	0.2-100	0.9999	96.01-103.4%
E2	$Y = (8932.6)X - 2.7160$	0.2-100	0.9999	95.5-104.7%
E1	$Y = (30778.2)X - 18.0396$	0.1-100	0.9998	94.7-104.9%
HEX	$Y = (45714.2)X - 376.316$	0.1-100	0.9999	96.5-106.1%
DES	$Y = (36057.1)X - 196.210$	0.1-100	0.9997	93.4-105.1%

2.3 精密度实验

配制目标物浓度分别为 0.2、5.0、100 ng/mL 的混合标样，平行测定各 6 次，考察仪器的重复性，保留时间和峰面积重复性结果如表 4 所示，仪器重复性良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

名称	RSD (% , 0.2 ng/mL)		RSD (% , 5.0 ng/mL)		RSD (% , 100 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
E3	0.12	3.99	0.11	1.33	0.08	0.42
E2	0.12	5.34	0.09	1.48	0.06	0.54
E1	0.10	2.20	0.09	0.62	0.06	0.51
HEX	0.11	3.35	0.09	0.84	0.05	0.49
DES	0.08	8.26	0.09	1.62	0.05	0.39

2.4 灵敏度实验

对目标物浓度为 0.20 ng/mL 标准溶液进样分析，由信噪比计算各目标组分仪器检出限(ILOD, S/N=3) 和仪器定量限 (ILOQ, S/N=10)，结果如表 5 所示。

表 5 检出限和定量限

名称	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
E3	0.008	0.025
E2	0.007	0.021
E1	0.002	0.006
HEX	0.007	0.020
DES	0.010	0.033

2.5 回收率实验

将在超市购买的某品牌牛奶按照 1.4 对样品处理后进样分析，结果 5 种目标组分均未检出，如图 4 所示。在牛奶中添加 5 种目标组分，计算加标回收率，结果如表 6 所示。

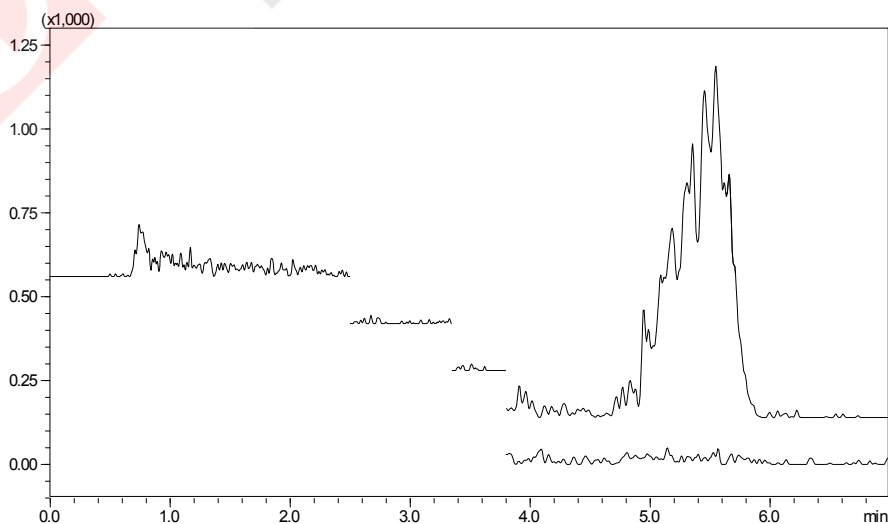


图 4 阴性样品色谱图

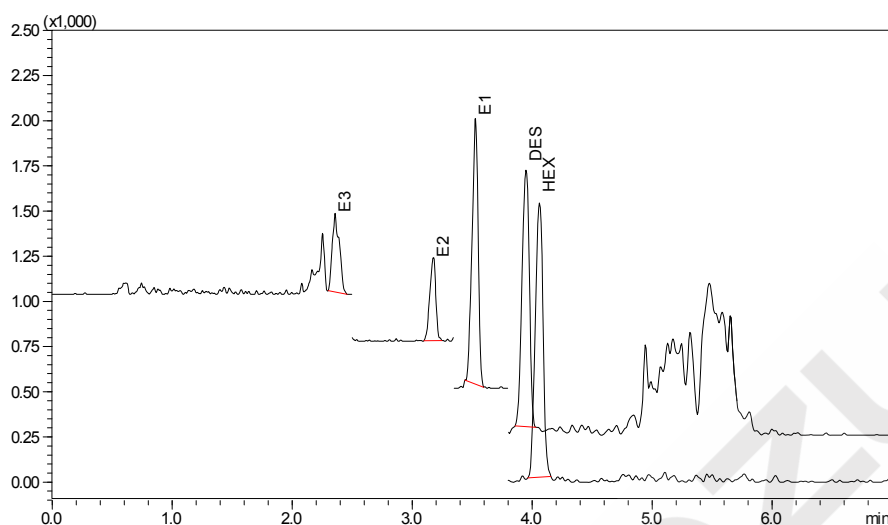


图 5 空白基质加标 0.2 ng/mL 色谱图

表 6 加标回收实验

名称	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)
E3	0.2	103.3	4.0	86.5	80	92.0
E2	0.2	87.8	4.0	103.3	80	106.0
E1	0.2	86.8	4.0	102.4	80	106.3
HEX	0.2	81.0	4.0	90.8	80	95.9
DES	0.2	83.3	4.0	102.9	80	109.4

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定牛奶中雌酮、17 β -雌二醇、雌三醇 3 种天然雌激素和己雌酚、己烯雌酚 2 种合成雌激素含量的方法。牛奶样品以乙腈沉淀蛋白，并超声萃取后，不需要经过衍生，样品在 ESI 源负离子模式下电离，MRM 模式采集数据，外标法定量，校准曲线线性良好，线性相关系数均不低于 0.9993。对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05 ~ 0.12% 和 0.42 ~ 8.26% 之间，仪器定量限在 0.006~0.033 ng/mL。该方法前处理简单、灵敏度高、重复性好，可用于牛奶样品中雌激素含量的检测。

乳制品中营养物质检测



SHIMADZU
Excellence in Science

高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中维生素A的含量

摘要：本文建立了一种使用岛津液相色谱测定婴幼儿奶粉中维生素 A 的方法。实验结果表明：校准曲线相关系数为 0.99999；方法的检出限为 0.0015 $\mu\text{g/g}$ ，定量限为 0.0050 $\mu\text{g/g}$ ；标样 6 次连续进样的峰面积相对标准偏差为 0.78 %。该方法简便快速，且易操作。

关键词：液相色谱法 婴幼儿奶粉 维生素 A

维生素 A 的化学名为视黄醇，是最早被发现的维生素，属于脂溶性维生素。人体缺乏维生素 A，影响暗适应能力，如儿童发育不良、皮肤干燥、干眼病、夜盲症等。但维生素 A 过量摄入，可引起中毒。婴幼儿慢性中毒常见皮肤干粗或薄而发亮，有皮脂溢出性皮炎或全身散在性斑丘疹，斑片状脱皮和严重瘙痒。因此控制检测维生素 A 在婴幼儿奶粉中的含量至关重要。本文参考国家标准《GB5413.9-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定》，采用岛津液相色谱仪 LC-20A 测定婴幼儿奶粉中的维生素 A，取得了良好的实验结果。

1. 实验部分

1.1 试剂

标准贮备液：精确称取 10 mg 的维生素 A 标准品，用乙醇溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中。该标准贮备液每毫升含维生素 A 0.1 mg。

标准使用液：分别吸取维生素 A 标准储备液 0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 $\mu\text{g/mL}$

1.2 仪器

Prominence LC-20A 液相色谱仪系统，配有紫外检测器。

1.3 分析条件

色谱柱：Inertsil ODS-SP (4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm)；流动相：甲醇。流速：1.0 mL/min；柱温：35℃；进样量：20 μL ；洗脱方式：等度洗脱，紫外检测波长：325nm

1.4 样品处理

称取试样 10g (均精确到 0.1mg) 于 250mL 三角瓶中，用 50 mL 45~50℃ 蒸馏水使其溶解，混合均匀，于上述溶液中加入约 100mL 维生素 C 的乙醇溶液 (15 $\mu\text{g/L}$)，充分混匀后加 25mL 氢氧化钾的水溶液 (2 g/mL) 混匀，放入磁力搅拌棒，充氮排出空气，盖上胶塞，在 55℃ 水浴

的恒温磁力搅拌器上搅拌皂化 45 min 后取出立刻冷却到室温。将皂化液全部转入 500 mL 分液漏斗中，加入 100 mL 石油醚，室温下震荡约 10 min 后静置分层，将水相转入另一 500 mL 分液漏斗中，按上述方法进行第二次萃取，合并醚液，用蒸馏水洗至中性，通过无水硫酸钠过滤脱水，滤液收入 500 mL 平底烧瓶中，于旋转蒸发器上在 40℃ 充氮条件下蒸至近干，用石油醚转移至 10 mL 容量瓶中定容。从上述容量瓶中取 2 mL 石油醚溶液放入试管中，置于 40℃ 的氮吹仪中将试管中的石油醚吹干，向试管中加 5 mL 甲醇溶解用来测定维生素 A，再将试管以 5000 r/min 的速度离心 10 min，取出静置至室温后过 0.22 μm 滤膜后待测。

2. 结果讨论

2.1 标准品色谱图

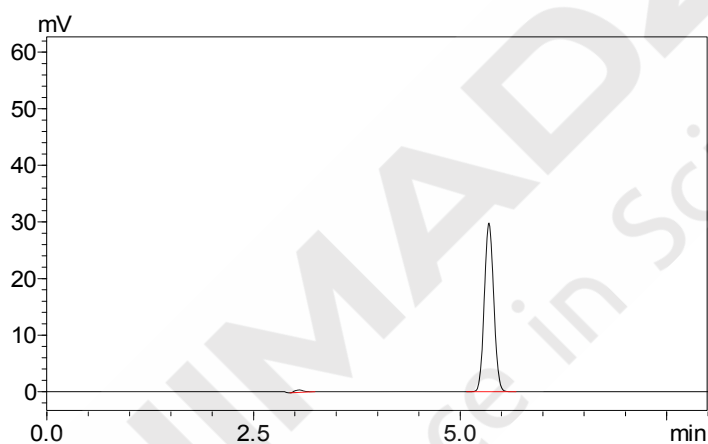
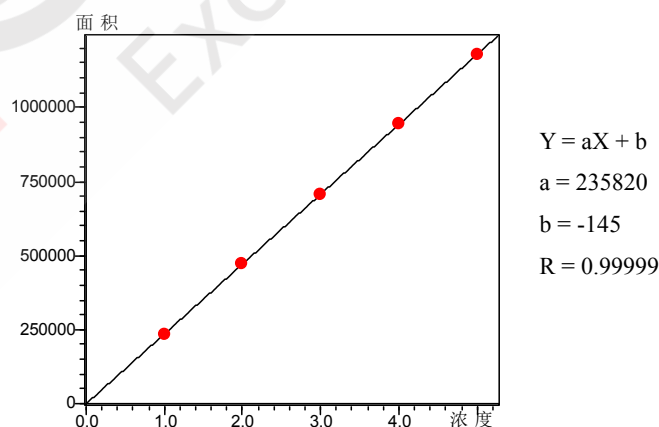


图 1 浓度为 1 μg/mL 的维生素 A 标准品的色谱图

2.2 线性关系



2.3 重复性结果

对浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品进行 6 次平行测定，面积的相对标准偏差（以 RSD%表示）为 0.90%，仪器的重复性良好。

表 1 面积重复性测试

面积 1	面积 2	面积 3	面积 4	面积 5	面积 6	RSD (%)
705783	707166	708332	718390	702333	711938	0.78

2.4 方法的灵敏度

维生素A的最低检出限 (S/N=3, LOD表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ表示) 分别为0.0015 $\mu\text{g/g}$ 和0.0050 $\mu\text{g/g}$ ，方法的灵敏度满足国标的要求。

2.5 实际样品测定

对某品牌婴幼儿奶粉进行检测，得到结果如下：

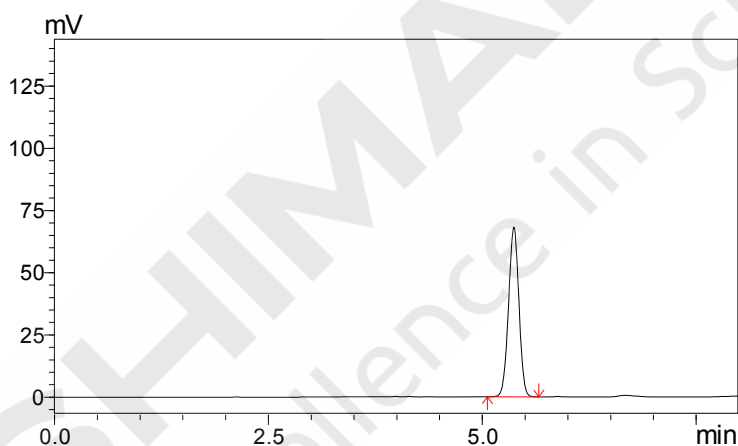


图 2 实际样品色谱图

表 3 实际样品检测结果

保留时间 (min)	峰面积	进样浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	奶粉中含量 ($\mu\text{g/g}$)
5.364	574835	2.44	6.10

3. 结论

本实验参考国家标准GB5413.9-2010, 使用了配有紫外检测器的高效液相色谱仪检测了婴幼儿奶粉中的维生素A的含量。该方法具有操作简单，回收率高，重现性好等特点，可用于对婴幼儿奶粉中对此种维生素的检测。

高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中维生素E的含量

摘要: 本文建立了一种使用岛津液相色谱测定婴幼儿奶粉中维生素 E 的方法。实验结果表明: 校准曲线相关系数为 0.99999; 方法的检出限为 0.03 $\mu\text{g/g}$, 定量限为 0.10 $\mu\text{g/g}$; 标样 6 次连续进样的峰面积相对标准偏差为 0.89 %。该方法简便快速, 且易操作。

关键词: 液相色谱法 婴幼儿奶粉 维生素 E

维生素 E 是一种脂溶性维生素, 又称生育酚, 是最主要的抗氧化剂之一。在身体内具有良好的抗氧化性, 即降低细胞老化, 保持红细胞的完整性, 促进细胞合成, 抗污染, 抗不孕的功效。缺乏维生素 E, 会导致动脉粥样硬化, 血浓性贫血, 白内障等其他老年腿行性病变疾病; 形成疤痕; 会使牙齿发黄; 引发近视; 引起残障、弱智等等。牛奶是人们日常摄取维生素 E 的主要来源之一, 因此婴幼儿奶粉中维生素 E 的检测对于乳品企业的质量控制具有重要意义。本文参考国家标准《GB5413.9-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定》, 采用岛津液相色谱仪 LC-20A 测定婴幼儿奶粉中的维生素 E, 取得了良好的实验结果。

1. 实验部分

1.1 试剂

标准贮备液: 精确称取 50 mg 的维生素 E 标准品, 用乙醇溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中。该标准贮备液每毫升含维生素 E 0.5 mg。

标准使用液: 分别吸取维生素 E 标准储备液 1.00、2.00、3.00、4.00 mL、5.00 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2 仪器

Prominence LC-20A 液相色谱仪系统, 配有紫外检测器。

1.3 分析条件

色谱柱: Inertsil ODS-SP (4.6 mm I.D. \times 250 mm L., 5 μm); 流动相: 甲醇。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 洗脱方式: 等度洗脱, 紫外检测波长: 294 nm

1.4 样品处理

称取试样 10g (均精确到 0.1mg) 于 250mL 三角瓶中, 用 50 mL 45~50 $^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水使其溶解,

混合均匀，于上述溶液中加入约 100mL 维生素 C 的乙醇溶液 (15 $\mu\text{g/L}$)，充分混匀后加 25mL 氢氧化钾的水溶液 (2 g/mL) 混匀，放入磁力搅拌棒，充氮排出空气，盖上胶塞，在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴的恒温磁力搅拌器上搅拌皂化 45 min 后取出立刻冷却到室温。将皂化液全部转入 500 mL 分液漏斗中，加入 100 mL 石油醚，室温下震荡约 10 min 后静置分层，将水相转入另一 500 mL 分液漏斗中，按上述方法进行第二次萃取，合并醚液，用蒸馏水洗至中性，通过无水硫酸钠过滤脱水，滤液收入 500 mL 平底烧瓶中，于旋转蒸发器上在 40 $^{\circ}\text{C}$ 充氮条件下蒸至近干，用石油醚转移至 10 mL 容量瓶中定容。从上述容量瓶中取 2 mL 石油醚溶液放入试管中，置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 的氮吹仪中将试管中的石油醚吹干，向试管中加 5 mL 甲醇溶解用来测定维生素 E，再将试管以 5000 r/min 的速度离心 10 min，取出静置至室温后过 0.22 μm 滤膜后待测。

2. 结果讨论

2.1 标准品色谱图及线性关系

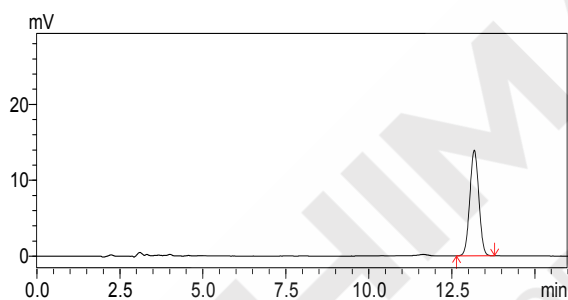


图 1 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 的维生素 E 标准品的色谱图

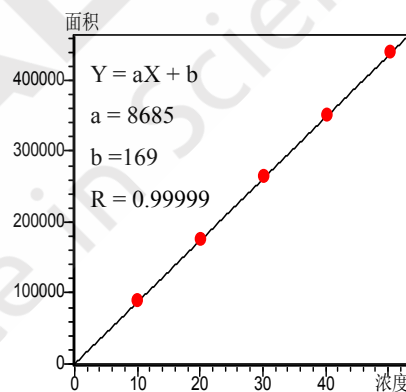


图 2 标准曲线

2.2 重复性结果

对浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品进行 6 次平行测定，面积的相对标准偏差 (以 RSD% 表示) 为 0.89%，仪器的重复性良好。

表 1 面积重复性测试

面积 1	面积 2	面积 3	面积 4	面积 5	面积 6	RSD (%)
175660	179800	176123	176636	178344	176367	0.89

2.3 方法的灵敏度

维生素 E 的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 分别为 0.03 $\mu\text{g/g}$ 和 0.10 $\mu\text{g/g}$ ，方法的灵敏度满足国标的要求。

2.4 实际样品测定

对某品牌婴幼儿奶粉进行检测，得到结果如下：

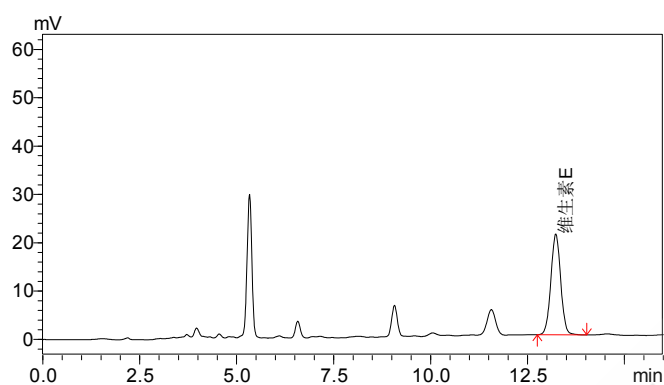


图2 实际样品色谱图

表3 实际样品检测结果

保留时间 (min)	峰面积	进样浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	奶粉中含量 ($\mu\text{g/g}$)
13.230	367078	42.24	105.6

3. 结论

本实验参考国家标准GB5413.9-2010, 使用了配有紫外检测器的高效液相色谱仪检测了婴幼儿奶粉中的维生素E的含量。该方法具有操作简单, 回收率高, 重现性好等特点, 可用于对婴幼儿奶粉中对此种维生素的检测。

高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中维生素B1的含量

摘要: 本文建立了一种使用液相色谱测定婴幼儿奶粉中维生素 B1 的方法。实验结果表明: 校准曲线相关系数为 0.99979; 方法的检出限为 0.005 $\mu\text{g/g}$, 定量限为 0.020 $\mu\text{g/g}$; 标样 6 次连续进样的峰面积相对标准偏差为 0.78 %。该方法简便快速, 且易操作。

关键词: 液相色谱法 婴幼儿奶粉 维生素 B1

维生素 B1 又叫硫胺素, 是一种水溶性维生素。维生素 B1 对于发育中的婴幼儿有着重要的意义, 能增强婴幼儿的胃肠和心脏肌肉的活力, 还能增进食欲, 促进食物的吸收与消化。缺乏维生素 B1 可能会引起平衡感较差, 身体反应较慢, 眼手不协调。容易疲劳, 胃口不好, 烦躁易怒, 情绪不稳定等症状。婴儿正处在生长发育迅速的阶段, 体内新陈代谢十分旺盛, 对维生素 B1 的需要量高于成年人, 每天需要维生素 B1 1~2 毫克。本文参考国家标准《GB5413.11-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中维生素 B1 的测定》, 采用岛津液相色谱仪 LC-20A 测定婴幼儿奶粉中的维生素 B1, 取得了良好的实验结果。

1. 实验部分

1.1 试剂

标准贮备液: 精确称取 50 mg 的维生素 B1 标准品, 用 0.01 mol/L HCl 溶解并定容于 100 mL 容量瓶中。该标准贮备液每毫升含维生素 B1 0.5 mg。

标准中间液: 精确吸取 2.00 mL 维生素 B1 的标准贮备液, 用水稀释至 100 mL。该标准中间液每毫升含维生素 B1 0.01 mg。

标准使用液: 分别吸取维生素 B1 标准中间液 0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 $\mu\text{g/mL}$

1.2 仪器

Prominence LC-20A 液相色谱仪系统, 配有荧光检测器。

1.3 分析条件

色谱柱: Inertsil ODS-SP (4.6 mm I.D. \times 250 mm L., 5 μm); 流动相: A-0.05 mol/L 乙酸钠溶液 B-甲醇 A/B=65/35 (v/v)。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 洗脱方式: 等度洗脱, 检测波长: Ex=375nm Em=435nm

1.4 样品处理

准确称取 10.0g 试样于 100 mL 三角瓶中, 加 60 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液, 充分摇匀, 用棉花塞和牛皮纸封口, 放入高压灭菌锅内, 在 121 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 30 min, 待冷至却 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下后取出, 轻摇数次; 用 2.0 mol/L 乙酸钠溶液调 pH 值至 4.0 左右, 加入 2.0 mL 混合酶液(称取 2.345 g 木瓜蛋白酶、1.175

g 淀粉酶,用水溶解并定容至 50 mL), 摇匀后,置于 37℃的培养箱中过夜;将酶解液转移至 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,定量滤纸过滤,取滤液备用。

取上述滤液 10.00 mL 于 50 mL 具塞比色管中,加入 5 mL 碱性铁氰化钾(将 5 mL 铁氰化钾溶液与 200 mL 氢氧化钠溶液(100g/L)混合),充分混匀后,加 10.00 mL 正丁醇,强烈摇动,静止充分分层,吸取正丁醇相(上层)于 4000~6000 rpm 离心 5 分钟,取上清液进样。另取 10.00 mL 标准工作液,与试液同步进行衍生化。

2. 结果讨论

2.1 标准品色谱图与线性关系

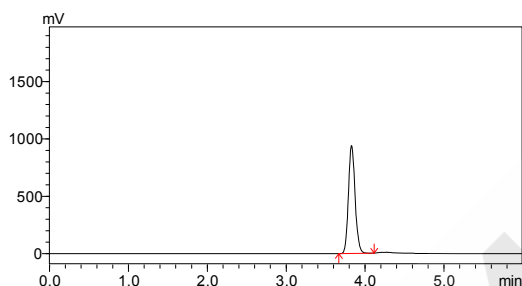


图 1 浓度为 0.20 µg/mL 的维生素 B1 标准品的色谱图

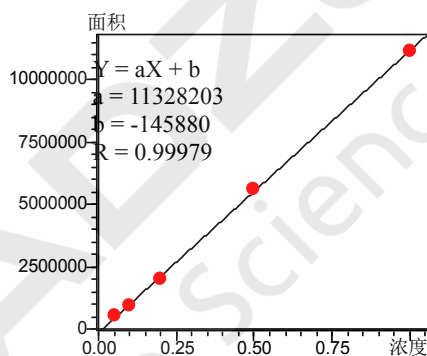


图 2 标准曲线

2.2 重复性结果

对浓度为 0.20 µg/mL 的标准品进行 6 次平行测定,面积的相对标准偏差(以 RSD%表示)为 0.78%,仪器的重复性良好。

表 1 面积重复性测试

面积 1	面积 2	面积 3	面积 4	面积 5	面积 6	RSD (%)
1990338	1993800	1975677	1972313	1953456	1963459	0.78

2.4 方法的灵敏度

维生素B1的最低检出限(S/N=3, LOD表示)、最低定量限(S/N=10, LOQ表示)分别为0.005 µg/g 和0.020 µg/g,方法的灵敏度满足国标的要求。

2.5 实际样品测定

对某品牌婴幼儿奶粉进行检测,得到结果如下:

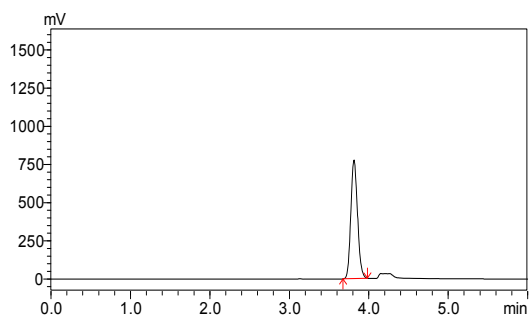


图 2 实际样品色谱图

表 3 实际样品检测结果

保留时间 (min)	峰面积	进样浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	奶粉中含量 ($\mu\text{g/g}$)
3.821	4547316	0.41	0.41

3. 结论

本实验参考国家标准GB5413.11-2010，使用了配有荧光检测器的高效液相色谱仪检测了婴幼儿奶粉中的维生素B1的含量。该方法具有操作简单，回收率高，重现性好等特点，可用于对婴幼儿奶粉中对此种维生素的检测。

高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中牛磺酸的含量

摘要：本文建立了一种使用液相色谱测定婴幼儿奶粉中牛磺酸的方法。实验结果表明：校准曲线相关系数为 0.99992；方法的检出限为 3.0 $\mu\text{g/g}$ ，定量限为 10.0 $\mu\text{g/g}$ ；标样 6 次连续进样的峰面积相对标准偏差为 0.54 %。该方法简便快速，且易操作。

关键词：液相色谱法 婴幼儿奶粉 牛磺酸

牛磺酸对婴幼儿大脑发育、神经传导、视觉机能的完善、钙的吸收有良好作用，是一种对婴幼儿生长发育至关重要的营养素。婴幼儿体内半胱氨酸亚磺酸脱羧酶尚未成熟，体内不能自身合成牛磺酸，必须外源补充才能满足正常生长发育的需要。而牛奶中恰恰牛磺酸的含量极微，婴儿配方奶粉中必须添加一定量的牛磺酸。因此，牛磺酸含量的多少是乳品企业奶粉质量是否达标的重要指标。本文参考国家标准《GB5413.26-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定》，采用岛津液相色谱仪 LC-20A 测定婴幼儿奶粉中的牛磺酸，取得了良好的实验结果。

1. 实验部分

1.1 试剂

标准贮备液：精确称取 100 mg 的牛磺酸标准品，用水定容至 100 mL 容量瓶中。该标准贮备液每毫升含牛磺酸 1.0 mg。

标准使用液：分别吸取牛磺酸标准贮备液 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 0、5、10、15、20 $\mu\text{g/mL}$

1.2 仪器

Prominence LC-20A 液相色谱仪系统，配有紫外检测器。

1.3 分析条件

色谱柱：Inertsil ODS-SP (4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm)；流动相：A-10 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 4.2) B-乙腈 A/B=7/3 (v/v)。流速：1.0 mL/min；柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量：20 μL ；洗脱方式：等度洗脱，检测波长：254 nm

1.4 样品处理

称取 5.0 g 试样于 100 mL 容量瓶中，加入 80 mL 温水 (50~60 $^{\circ}\text{C}$) 溶解，充分混匀，置超声波振荡器上振荡 10 分钟，冷却到室温。加 1.0 mL 沉淀剂 I (称取 15.0 g 亚铁氰化钾，用水溶解并定容至 100 mL)，涡旋混合，1.0 mL 沉淀剂 II (称取 30.0 g 乙酸锌，用水溶解并定容至 100 mL)，涡旋混合，用水定容至刻度，充分混匀，试液于 5000 rpm 条件下离心 10 min，取上清液备用。

准确吸取 1.00 mL 上述上清液到 10 mL 具塞玻璃试管中，加入 1.00 mL 碳酸钠缓冲液(称取 0.424 g 无水碳酸钠，加 40 mL 水溶解，用 1 mol/L 盐酸溶液调 pH 值至 9.5，用水定容至 50 mL)，1.00 mL 丹磺酰氯溶液 (称取 0.015 g 丹磺酰氯，用乙腈溶解并定容至 100 mL)，充分混合，室温避光

衍生反应 2 h (1 h 后需摇晃 1 次), 加入 0.10 mL 盐酸甲胺溶液 (称取 2.0 g 盐酸甲胺, 用水溶解并定容至 100 mL) 涡旋混合, 以终止反应, 避光静置至沉淀完全。取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液备用。衍生物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 可避光保存 48 h。另取 1.00 mL 标准工作液, 与试液同步进行衍生。

2. 结果讨论

2.1 标准品色谱图及线性关系

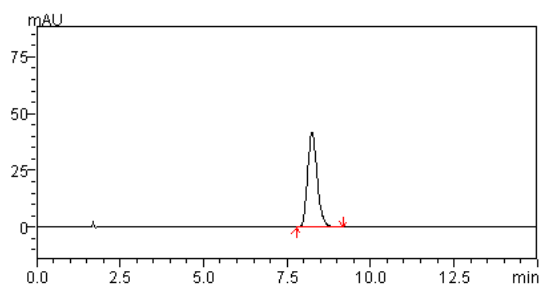


图 1 浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的牛磺酸标准品的色谱图

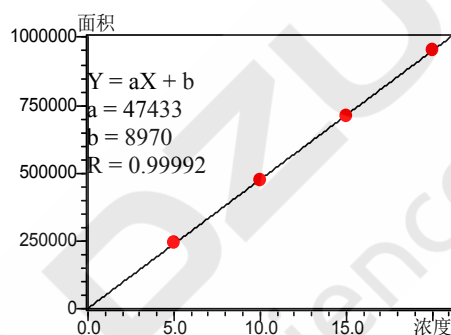


图 2 标准曲线

2.2 重复性结果

对浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品进行 6 次平行测定, 面积的相对标准偏差 (以 RSD% 表示) 为 0.54%, 仪器的重复性良好。

表 1 面积重复性测试

面积 1	面积 2	面积 3	面积 4	面积 5	面积 6	RSD (%)
471232	478903	473891	474925	476658	475690	0.54

2.3 方法的灵敏度

牛磺酸的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 分别为 3.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{g}$, 方法的灵敏度满足国标的要求。

2.4 实际样品测定

对某品牌婴幼儿奶粉进行检测, 得到结果如下:

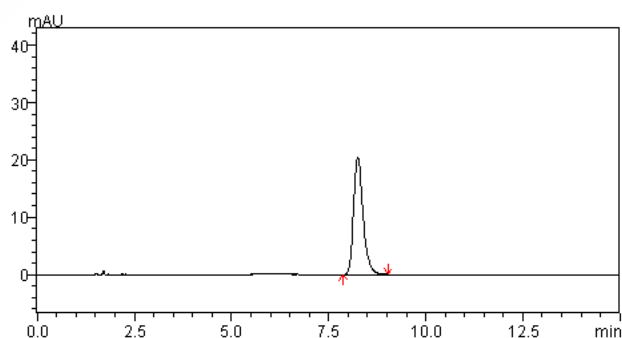


图2 实际样品色谱图

表3 实际样品检测结果

保留时间 (min)	峰面积	进样浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	奶粉中含量 ($\mu\text{g/g}$)
8.247	348008	7.13	142.6

3. 结论

本实验参考国家标准GB5413.26-2010，使用了配有紫外检测器的高效液相色谱仪检测了婴幼儿奶粉中的牛磺酸的含量。该方法具有操作简单，回收率高，重现性好等特点，可用于对婴幼儿奶粉中对此种物质的检测。



SHIMADZU
Excellence in Science

应用高效液相色谱—串联质谱法测定婴幼儿配方食品和乳粉中的乳清蛋白

摘要：建立一种测定婴幼儿配方食品和乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）并用于考察5个实际样品婴幼儿配方食品和乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量。样品经烷基化和酶解处理后，用超高效液相色谱LC-30A快速分离酶解后的肽段，三重四极杆质谱仪LCMS-8050进行定量分析。使用内标法定量酶解后的特征肽段， α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段的定量标准曲线相关系数分别为0.9961和0.9968；浓度线性范围分别为20 nmol/L ~ 500 nmol/L和40 nmol/L ~ 1000 nmol/L。

关键词：乳清蛋白； α -乳白蛋白； β -乳球蛋白；超高效液相色谱串联质谱法

乳清蛋白被称为蛋白之王，是从牛奶中提取的一种蛋白质，具有营养价值高、易消化吸收、含有多重活性成分等特点，是公认的人体优质蛋白质补充剂之一。乳清蛋白中主要含有的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白等，各自都有独特的生物活性。 α -乳白蛋白是必需氨基酸和支链氨基酸的极好来源，也是唯一能与金属元素和钙元素结合的乳清蛋白成分。 β -乳球蛋白具备最佳的氨基酸比例，支链氨基酸含量极高，对促进蛋白质合成和减少蛋白质分解起着重要的作用。

婴幼儿配方食品和乳粉中乳清蛋白的质量，尤其是 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量，对婴幼儿的生长发育和健康成长至关重要。长期以来，劣质婴幼儿配方乳粉得不到有效控制，有多种原因，缺乏有效的检测方法乃是原因之一。我们在本文中开展的LC-MS/MS方法可通过检测特异肽段来快速准确定量婴幼儿配方食品和乳粉中乳清蛋白的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱： C18 色谱柱 2.1 mm I.D. \times 100 mm L, 柱温： 40 $^{\circ}$ C
1.7 μ m。 样品温度： 20 $^{\circ}$ C
流动相： A, 水+0.1%甲酸； B, 乙腈+0.1%甲酸 洗脱方式： 采用梯度洗脱， B 相初始浓度为 5%
流速： 0.3 mL/min 时间程序见表 1
进样体积： 10 μ L

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
-----------	--------	---------	-------

0.80	Pumps	Pump B Conc	5
1.20	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Pumps	Pump B Conc.	17
2.60	Pumps	Pump B Conc.	22
4.20	Pumps	Pump B Conc.	24
4.30	Pumps	Pump B Conc.	100
5.00	Pumps	Pump B Conc.	100
5.10	Pumps	Pump B Conc.	5
9.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)

接口温度: 300 °C

离子源接口电压: 4.5 kV

DL 温度: 250 °C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热模块温度: 400 °C

加热气: 空气 10 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM)

干燥气: 氮气 10 L/min

延迟时间: 1 ms

碰撞气: 氩气

MRM 参数: 见表 2

1.3 标准品与试剂

牛 α -乳白蛋白特异肽段标准品 (序列: VGINYWLAHK, 分子量 1200.4 Da, 纯度 \geq 99%); 牛 α -乳白蛋白同位素标记特异肽段标准品 (序列: VGI*NYWL*AHK, 分子量 1214.4 Da, 纯度 \geq 95%); 牛 α -乳白蛋白同位素标记内标 (序列: KILDKVGI*NYWL*AHKALCSEK, 分子量 2443.9 Da, 纯度 \geq 95%); 牛 β -乳球蛋白特异肽段标准品 (序列: IDALNENK, 分子量 916.0 Da, 纯度 \geq 99%); 牛 β -乳球蛋白同位素标记特异肽段标准品 (序列: I*DAL*NENK, 分子量 930.0 Da, 纯度 \geq 95%); 牛 β -乳球蛋白同位素标记内标 (序列: KIPAVFKI*DAL*NEN KVLVLDTDYK, 分子量 2761.2 Da, 纯度 \geq 95%)。

注: 上述所示肽段序列中注有*的氨基酸为同位素氨基酸。

乙腈购自 Merck 公司; 实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 经去离子与二次净化制得; 甲酸 (纯度 99%, Wako, Japan); 其余试剂均为分析纯; 碱性胰蛋白酶: 活力大于 10000 BAEE 每毫克蛋白质。

碳酸氢铵溶液 (500 mmol/L): 称取碳酸氢铵 3.95 g, 用水溶解后定容至 100 mL;

二硫苏糖醇溶液 (500 mmol/L): 称取二硫苏糖醇 0.771 g, 用碳酸氢铵溶液溶解后定容至 10 mL;

碘代乙酰胺溶液 (500 mmol/L): 称取碘代乙酰胺 0.925 g, 用碳酸氢铵溶液溶解后定容至 10 mL;

氯化钙溶液 (100 mmol/L): 称取氯化钙 0.111 g, 用水溶解后定容至 10 mL;

乙酸溶液 (1%, V/V): 移取乙酸 0.1 mL, 用水稀释并定容至 10 mL;

胰蛋白酶溶液 (500 μ g/mL): 称取碱性胰蛋白酶 5 mg, 用乙酸溶液溶解后定容至 10 mL。

1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

牛 α -乳白蛋白特异肽段标准储备溶液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取牛 α -乳白蛋白特异肽段固体 6.00 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段储备溶液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段固体 6.07 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛 α -乳白蛋白同位素内标储备溶液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取牛乳 α -乳白蛋白同位素内标固体 12.22 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛 β -乳球蛋白特异肽段标准储备溶液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取牛 β -乳球蛋白特异肽段固体 4.58 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段储备溶液: 准确称取牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段固体 4.65 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛 β -乳球蛋白同位素内标储备溶液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 称取牛 β -乳球蛋白同位素内标固体 13.81 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

特异肽段标准中间混合溶液 (2 $\mu\text{mol/L}$ 和 4 $\mu\text{mol/L}$): 分别准确移取牛 α -乳白蛋白特异肽段标准储备液 40 μL 和牛 β -乳球蛋白特异肽段标准储备液 80 μL , 于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。

同位素标记特异肽段中间混合溶液 (2 $\mu\text{mol/L}$ 和 4 $\mu\text{mol/L}$): 分别准确移取牛 α -乳白蛋白同位素标记特异肽段标准储备液 40 μL 和牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段标准储备液 80 μL , 于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。

同位素内标中间混合溶液 (2 $\mu\text{mol/L}$ 和 4 $\mu\text{mol/L}$): 分别准确移取牛 α -乳白蛋白同位素内标储备液 40 μL 和牛 β -乳球蛋白同位素内标储备液 80 μL , 于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。

标准系列工作溶液: 分别吸取特异肽段标准中间混合溶液 10、25、50、100、150、200、250 μL , 每个浓度点加入 50 μL 的同位素标记特异肽段中间混合溶液, 用 0.1% 甲酸水溶液稀释至 1.0 mL, 得 α -乳白蛋白特异肽段浓度为 20、50、100、200、300、400、500 nmol/L 和 β -乳球蛋白特异肽段浓度为 40、100、200、400、600、800、1000 nmol/L 的标准系列工作溶液。临用前配制。

1.5 样品制备

称取固体试样约 2 g 或液体试样约 10 g (精确至 0.01 g, 内含蛋白质约 200 mg 左右) 于 500 mL 烧杯中, 分次用 900 mL 水将试样充分溶解, 转移到 1000 mL 容量瓶中, 并用水定容至刻度, 混匀, 备用。

准确移取 200 μL 试样溶液，于 2 mL 离心管中，加入 50 μL 同位素内标中间混合溶液，混匀，加入 150 μL 碳酸氢铵溶液和 10 μL 二硫苏糖醇溶液，混匀，置于 75 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温反应 30 min；冷却至室温，加入 30 μL 碘代乙酰胺溶液，暗处静置 30 min；加入 10 μL 氯化钙溶液和 50 μL 胰蛋白酶溶液，混匀，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温酶解 5 小时及以上。加入 10 μL 甲酸，混匀，室温下静置 15 min，加入 490 μL 水，混匀，用 0.22 μm 滤膜过滤，供液相色谱串联质谱仪检测。

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子(m/z) [M+2H] ²⁺	产物离子(m/z)	碰撞能量(V)
α -乳白蛋白 特异肽段	600.8	284.1*	-33
		355.2	-26
α -乳白蛋白同 位素特异肽段	608.0	284.1*	-34
		355.0	-28
β -乳球蛋白 特异肽段	458.7	261.2*	-24
		504.1	-18
β -乳球蛋白同 位素特异肽段	465.7	261.0*	-24
		504.1	-17

*为定量离子对

2. 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

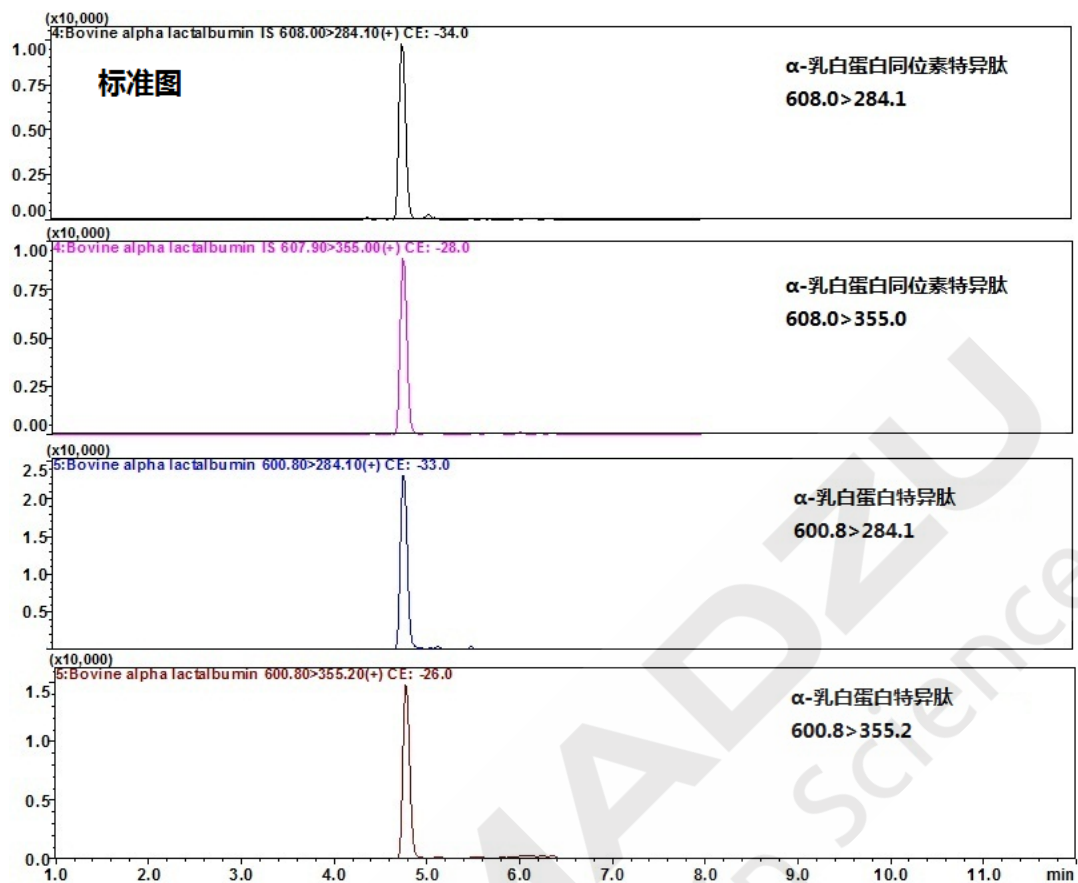


图1 α -乳白蛋白特异肽段和同位素特异肽标准品(100 nmol/L)MRM 色谱图

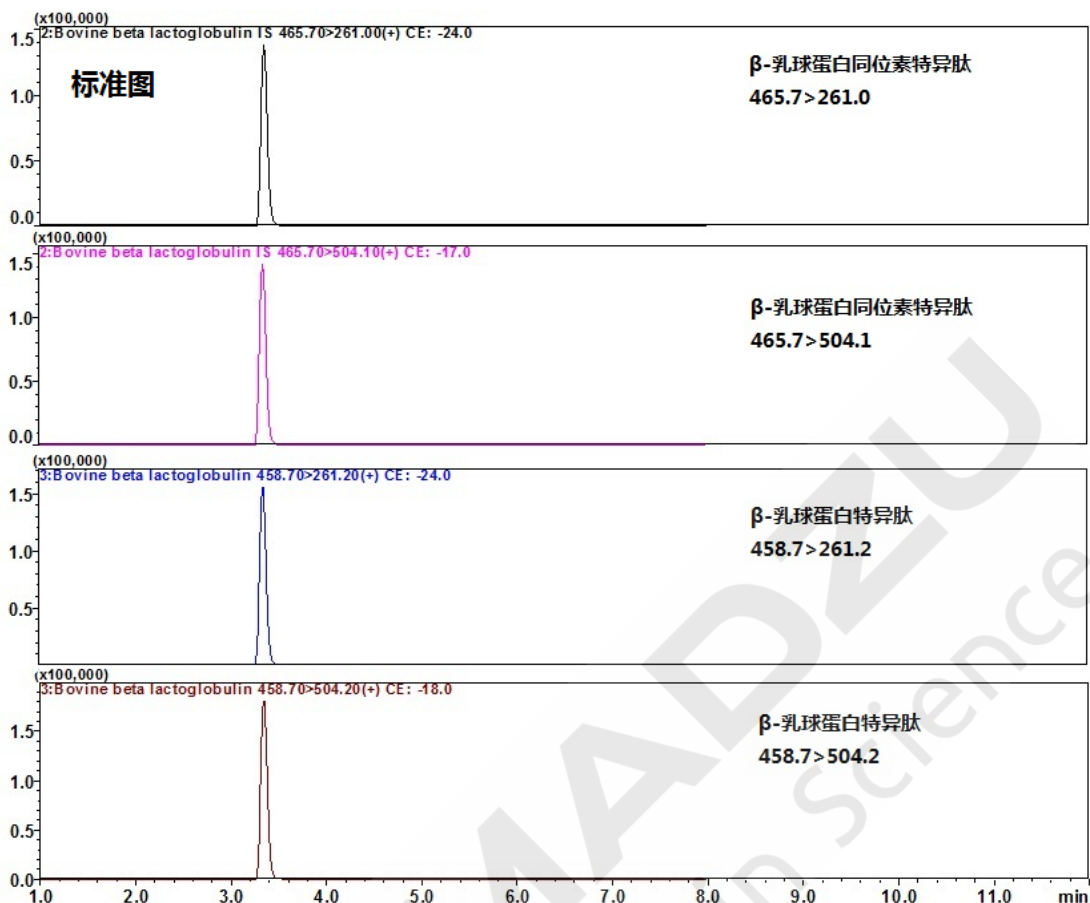


图 2 100 nmol/L β-乳球蛋白特异肽和同位素特异肽标准品(100 nmol/L)MRM 色谱图

2.2 线性关系

将配制的 α-乳白蛋白特异肽段 20、50、100、200、300、400、500 nmol/L 和 β-乳球蛋白特异肽段 40、100、200、400、600、800、1000 nmol/L 不同浓度的标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，内标法制作校准曲线，线性良好，线性方程、相关系数和线性范围见表 3。

表 3 线性结果

基质	回归方程	r	线性范围
α 乳白蛋白特异肽段	$y=0.254051x-0.0568241$	0.9961	20 ~500 nmol/L
β 乳球蛋白特异肽段	$y=10.6884x+3.73716$	0.9968	40 ~1000 nmol/L

2.3 实际样品测定结果

不称取试样，按 1.5 的步骤进行空白试验，确认空白中没有干扰待测组分的物质。

实际样品按 1.5 的步骤处理。将处理后的样品注入液相色谱-串联质谱仪，按照已确立的参考条件与参数，测得相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中牛 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白特异肽段的浓度，平行测定次数不少于两次，结果见表 4

表4 实际样品中α-乳白蛋白特异肽段和β-乳球蛋白特异肽段检测结果

样品	α-乳白蛋白特异肽段浓度(nmol/L)	RSD(%) n=2	β-乳球蛋白特异肽段浓度(nmol/L)	RSD(%) n=2

Sample 1	199.47	1.33%	393.39	3.14%
Sample 2	214.99	4.10%	140.05	2.82%
Sample 3	139.81	7.49%	203.74	0.27%
Sample 4	212.78	1.07%	267.097	1.04%
Sample 5	176.99	2.00%	208.42	3.43%

3 结论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定婴幼儿配方食品和乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白含量的快速准确定量方法，经方法学研究表明线性、精密度、灵敏度均满足样品测定要求。本文分别检测了 5 个婴幼儿配方食品和乳粉实际样品中 α -乳白蛋白特异肽段和 β -乳球蛋白特异肽段的浓度。



SHIMADZU
Excellence in Science

应用高效液相色谱—串联质谱法测定食品中的乳铁蛋白

摘要：建立一种测定乳品中乳铁蛋白的超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）并用于考察26个实际样品鲜乳和奶粉中乳铁蛋白的含量。样品经酶解处理后，用超高效液相色谱LC-30A快速分离酶解后的肽段，三重四极杆质谱仪LCMS-8050进行定量分析。使用内标法定量酶解后的特征肽段，乳铁蛋白特征肽段的定量标准曲线相关系数为0.9981；浓度线性范围分别为2 nmol/L ~50 nmol/L。

关键词：乳铁蛋白；特异肽段；超高效液相色谱串联质谱法

乳铁蛋白 1939 年首次从牛乳中分离获得，是一种具有许多生理活性的铁结合性糖蛋白，它既能参与铁的转运，又能调节免疫系统，同时又可抗菌、抗病毒、抗氧化和抗肿瘤等。由于乳铁蛋白有如此多的生理功能，许多乳制品公司把乳铁蛋白作为一种重要的功能性添加剂，因此，对乳铁蛋白灵敏快速检测技术的建立亟待解决。我们在本文中开展的 LC-MS/MS 方法可通过检测乳铁蛋白的特异肽段来快速准确定量鲜乳和奶粉中乳铁蛋白的含量。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱： C18 色谱柱 2.1 mm I.D. ×100 mm L, 柱温： 40℃
1.7 μm。 样品温度： 15℃
流动相： A, 水+0.1%甲酸； B, 乙腈+0.1%甲酸 洗脱方式： 采用梯度洗脱， B 相初始浓度为 5%
流速： 0.3 mL/min 时间程序见表 1
进样体积： 10 μL

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.80	Pumps	Pump B Conc	5
1.20	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Pumps	Pump B Conc.	17
2.60	Pumps	Pump B Conc.	22
4.20	Pumps	Pump B Conc.	24
4.30	Pumps	Pump B Conc.	100
5.00	Pumps	Pump B Conc.	100

5.10	Pumps	Pump B Conc.	5
9.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 空气 10 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测(MRM)

延迟时间: 1 ms

MRM 参数: 见表 2



SHIMADZU
Excellence in Science

1.3 标准品与试剂

乳铁蛋白特异肽标准品：序列为 VDSALYLGSR，分子量 1079.6 Da，纯度 \geq 99%；
乳铁蛋白同位素特异肽标准品：序列为 VDSAL*YL*GSR，分子量 1093.6 Da，纯度 \geq 95%；乳铁蛋白同位素内标：序列为 ALGFLRIPSKVDSAL*YL*GSRYLTTLKLNRE，分子量 3409.9 Da，纯度 \geq 95%。
注：上述所示肽段序列中注有*的氨基酸为同位素氨基酸。

乙腈购自 Merck 公司；实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统（Millipore, Ltd.）经去离子与二次净化制得；甲酸（纯度 99%，Wako, Japan）；其余试剂均为分析纯。

碳酸氢铵溶液（500 mmol/L）：称取 3.95 g 碳酸氢铵，用水溶解后定容至 100 mL。

二硫苏糖醇溶液（500 mmol/L）：称取 0.771 g 二硫苏糖醇，用碳酸氢铵溶液溶解后定容至 10 mL。

碘代乙酰胺溶液（500 mmol/L）：称取 0.925 g 碘代乙酰胺，用碳酸氢铵溶液溶解后定容至 10 mL。

氯化钙溶液（100 mmol/L）：称取 0.111 g 氯化钙，用水溶解后定容至 10 mL。

乙酸溶液（1%，V/V）：吸取 0.1 mL 乙酸溶液，用水稀释并定容至 10 mL。

碱性胰蛋白酶溶液（100 μ g/mL）：称取 1 mg 碱性胰蛋白酶，用乙酸溶液溶解后定至 10 mL。

1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

乳铁蛋白特异肽标准储备溶液（100 μ mol/L）：准确称取 1.08 mg（精确至 0.01 mg）乳铁蛋白特异肽标准品，用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中，于-20 $^{\circ}$ C 保存。

乳铁蛋白同位素特异肽储备溶液（100 μ mol/L）：准确称取 1.09 mg（精确至 0.01 mg）乳铁蛋白同位素特异肽标准品，用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中，于-20 $^{\circ}$ C 保存。

乳铁蛋白同位素内标储备溶液（100 μ mol/L）：准确称取 3.41 mg（精确至 0.01 mg）乳铁蛋白同位素内标标准品，用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中，于-20 $^{\circ}$ C 保存。

乳铁蛋白特异肽标准中间溶液（500 nmol/L）：准确吸取 50 μ L 乳铁蛋白特异肽标准储备液于 10 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中，于-20 $^{\circ}$ C 保存。

乳铁蛋白同位素特异肽中间溶液（1 μ mol/L）：准确吸取 100 μ L 乳铁蛋白同位素特异肽储备液于 10 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中，于-20 $^{\circ}$ C 保存。

乳铁蛋白同位素内标中间溶液（1 μ mol/L）：准确吸取 100 μ L 乳铁蛋白同位素内标储备液于 10 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中，于-20 $^{\circ}$ C 保存。

标准系列工作溶液：分别吸取 4、10、20、40、60、80、100 μ L 的乳铁蛋白特异肽标准中间溶液，每个浓度点分别加入 20 μ L 的同位素特异肽中间溶液，用 0.1%甲酸水溶液定容至 1 mL，得到乳铁蛋白特异肽浓度分别为 2、5、10、20、30、40、50 nmol/L 的标准系列工作溶液。临用前配制。

1.5 样品制备

液体试样：称取 5 g（精确至 0.01 g）试样，于 100 mL 烧杯中，用 40 mL 水稀释后，转移至

50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀，待酶解。

固体试样：称取 1 g（精确至 0.01 g）试样，于 100 mL 烧杯中，用 80 mL 温水溶解，待冷却至室温后，转移至 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀，待酶解。

准确吸取 200 μL 上述试样溶液于 2 mL 离心管中，加入 20 μL 乳铁蛋白同位素内标中间溶液，混匀。加入 180 μL 碳酸氢铵溶液和 15 μL 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 30 min；冷却至室温，加入 45 μL 碘代乙酰胺溶液，暗处静置 30 min；加入 10 μL 氯化钙溶液和 40 μL 碱性胰蛋白酶溶液，混匀，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温酶解 4 h 以上。加入 10 μL 甲酸混匀，室温静置 30 min，加入 480 μL 水，混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪分析。

表 2 MRM 优化参数

名称	前体离子(m/z) [M+2H] ²⁺	产物离子 (m/z)	碰撞能量(eV)
乳铁蛋白特异肽	540.8	595.3*	-23
		866.4	-19
乳铁蛋白同位素特异肽	547.8	602.3*	-21
		880.4	-18

*为定量离子对

2. 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

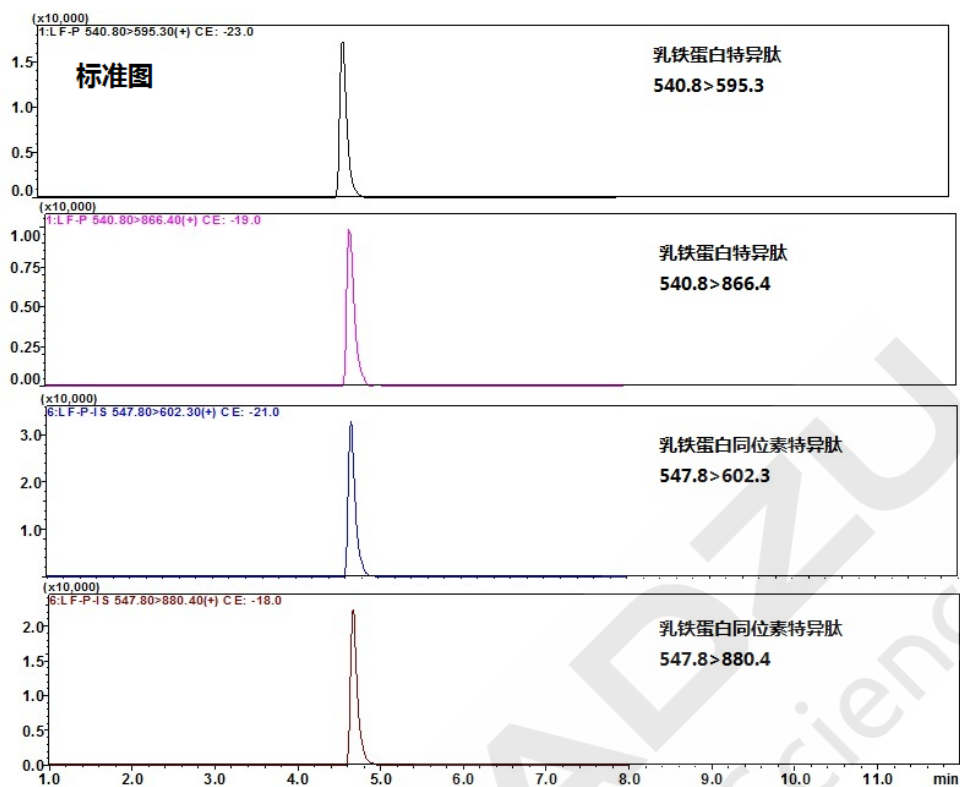


图1 乳铁蛋白特异肽段 10 nmol/L 标准品 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将配制的 α -乳白蛋白特异肽段 2、5、10、20、30、40、50 nmol/L 不同浓度的标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，内标法制作校准曲线，线性良好，线性方程、相关系数和线性范围见表 3。

表3 线性结果

基质	回归方程	r	范围
乳铁蛋白	$y=7.32510x+0.0478466$	0.9981	2~50 nmol/L

2.3 实际样品测定结果

不称取试样，按1.5的步骤进行空白试验，确认空白中没有干扰待测组分的物质。

样品按照1.5的步骤进行处理，将处理后的样品注入液相色谱-串联质谱仪，按照已确立的参考条件与参数，测得相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中乳铁蛋白特异肽段的浓度。结果见表4

表4 鲜乳和奶粉中乳铁蛋白特异肽段检测结果

序号	样品名称	检测结果 (mg/100g)	序号	样品名称	检测结果 (mg/100g)
1	鲜乳01	19.2	14	婴儿配方奶粉基粉	40.7
2	鲜乳02	18.8	15	婴儿配方奶粉基粉	36.6
3	鲜乳03	18.7	16	婴儿配方奶粉基粉	83.3

4	鲜乳04	19.3	17	全脂奶粉01	57.1
5	鲜乳05	19.4	18	全脂奶粉02	55.7
6	鲜乳06	18.4	19	全脂奶粉03	55.6
7	婴儿配方奶粉基粉	63.8	20	全脂奶粉04	53.1
8	婴儿配方奶粉基粉	62.9	21	全脂奶粉05	53.1
9	婴儿配方奶粉基粉	38.4	22	全脂奶粉06	59.4
10	婴儿配方奶粉基粉	40.8	23	全脂奶粉07	64.0
11	婴儿配方奶粉基粉	35.6	24	全脂奶粉08	64.7
12	婴儿配方奶粉基粉	40.5	25	全脂奶粉09	63.2
13	婴儿配方奶粉基粉	46.9	26	全脂奶粉10	57.5

3 结论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8050联用定量乳品中乳铁蛋白含量的快速准确定量方法，得到的校准曲线相关系数为0.9981，线性范围为2 nmol/L~50 nmol/L，该方法分析速度快，可在9 min完成一个样品的分析。本文利用该方法分别检测了26个鲜乳和奶粉实际样品中乳铁蛋白特异肽段的浓度。

利用 Perfinity iDP 和 LCMS-8060 联用构建 α -酪蛋白的定量分析方法

摘要: 本文使用岛津在线蛋白酶切液相色谱 Perfinity iDP 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用建立 α -酪蛋白的定量分析方法。首先通过 Skyline 软件完成 α -酪蛋白特征肽段的筛选和 MRM 碰撞能量优化, 然后再结合 Perfinity iDP 配套软件自动生成的酶切、脱盐和分析时间程序, 从而构建完整的 α -酪蛋白 LC-MS/MS 定量分析方法。本文完成了 α -酪蛋白的定量分析方法开发, 定量特征肽段为 YLGYLEQLLR (634.35>991.55), 线性范围 30 mg/L~3000mg/L。该方法前处理简单, 避免了传统手动酶解的繁琐工作, 分析速度快、重复性好、灵敏度高。

关键词: Perfinity iDP 三重四极杆质谱 α -酪蛋白 定量分析

酪蛋白是哺乳动物包括母牛、羊和人奶中的主要蛋白质, 又称: 干酪素、酪朊、乳酪素, 其中 α -酪蛋白是哺乳动物的主要蛋白(人乳除外)。酪蛋白对幼儿既是氨基酸的来源, 也是钙和磷的来源。酪蛋白具有 pH 敏感性, 因此在肠胃的酸性环境下可以凝固变成凝胶状, 这也是酪蛋白消化率缓慢的原因所在。 α -酪蛋白既是营养物质, 同时也是过敏源, 可引发皮肤、胃肠道和呼吸道等过敏, 因此检测食品中 α -酪蛋白显得尤为重要。

对于三重四极杆质谱检测大分子蛋白类化合物来说, 通常需酶解后通过定量特征肽段来实现蛋白质的定量。传统的酶解方法一般需 12-24 小时, 岛津推出的 Perfinity iDP (Integrated Digestion Platform)是自动化在线蛋白质酶切液相色谱, 采用高效率的胰蛋白酶固定化色谱柱, 对样品中的蛋白质进行在线酶切。通过使用已最优化的专用胰蛋白酶酶解缓冲液, 提高了酶解效率, 实现了最快几分钟完成的在线酶切, 与传统手工酶切相比, 大大缩短了样品前处理时间; 同时在重现性方面, 由于 Perfinity iDP 系统将酶切、浓缩、分离、检测的一系列过程在线自动化, 降低了人为误差, 提高了分析精度。

为了准确、快速、高灵敏度地对 α -酪蛋白进行定量分析, 本文首先利用 Skyline 软件筛选和优化特征肽段, 然后再结合 Perfinity iDP 配套软件自动生成在线酶解、脱盐和分析程序, 构建 α -酪蛋白的定量分析方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 Perfinity iDP 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-20AD、LC-20AD_{XR}×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站, Skyline Ver.3.5.0.9319 软件, Perfinity 1.0 软件。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Acquity BEH Peptide C18 2.0 mm I.D.×150 mm L., 1.7 μm (方法开发) / ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.7 μm) (定量分析)

流动相: A 相-0.1%甲酸水溶液

B 相-0.1%甲酸乙腈

流速: 0.4 mL/min (方法开发)

0.3 mL/min (定量分析)

柱温: 40°C

进样量: 10 μL

肽段筛选洗脱条件:

梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 洗脱程序 0.0-3.0 min, 5%; 3.0-35.0 min, 5%~40%; 35.0-37.5 min, 40%~95%; 37.5~45.0 min, 95%; 45.5-50.0 min, 5%。

定量分析洗脱条件:

梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 10 分钟内线性升到 70%。

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 1.0 kV

加热气: 空气 15.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 5.0 L/min

碰撞气: 氩气

源温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测(MRM)

驻留时间: 30 ms

延迟时间: 3 ms

定量分析 MRM 参数: 见表 1

1.3 样品前处理过程

肽段筛选和 MRM 通道构建:

称取 1 mg α-酪蛋白, 加入 175 μL 的 8 M 脲 (溶剂为 500 mM 的 Tris-HCl 中), 混匀后加入 25 μL 的 DTT 溶液 (40 mg/mL), 涡旋混匀后在 37°C 下反应 90 分钟; 加入 50 μL 的 IAA 溶液 (40 mg/mL), 涡旋混匀后在 37°C 下避光反应 30 分钟, 反应完成后加入 750 μL 碳酸氢铵溶液 (50 mM), 然后加入 20 μL 胰蛋白酶溶液 (1 mg/mL) 所得, 过夜酶解 12 小时后上机分析进行方法初步优化。

在线酶解定量分析:

配制 α -酪蛋白标准曲线: 用纯水配制浓度分别为 30、150、300、1500、3000 mg/L 的标准品。

表 1 MRM 参数 (α -酪蛋白定量分析方法)

肽段选择	MRM 通道[m/z]	CE (V)	肽段作用
HQGLPQEVLENLLR	587.30 ⁺⁺ →758.40 ^{+(y6)}	-22.9	定性肽段
	587.30 ⁺⁺ →871.50 ^{+(y7)}	-18.9	
	587.30 ⁺⁺ →970.55 ^{+(y8)}	-22.9	
YLGYLEQLLR	634.35 ⁺⁺ →991.55 ^{+(y8)*}	-26.9	定量肽段
	634.35 ⁺⁺ →771.45 ^{+(y6)}	-26.9	
	634.35 ⁺⁺ →658.40 ^{+(y5)}	-22.9	
FFVAPFPEVFGK	692.85 ⁺⁺ →991.50 ^{+(y9)}	-29.2	定性肽段
	692.85 ⁺⁺ →920.50 ^{+(y8)}	-25.2	
	692.85 ⁺⁺ →676.35 ^{+(y6)}	-29.2	

注: *表示定量离子

2. 结果与讨论

2.1 α -酪蛋白特征肽段的选择和优化

利用 Skyline 软件筛选 α -酪蛋白的特征肽段并优化 MRM 碰撞能量, 结合文献报道和蛋白序列比对, 最终选择 3 个信号比较强的特征肽段 (图 1), 分别为: HQGLPQEVLENLLR、YLGYLEQLLR 和 FFVAPFPEVFGK。

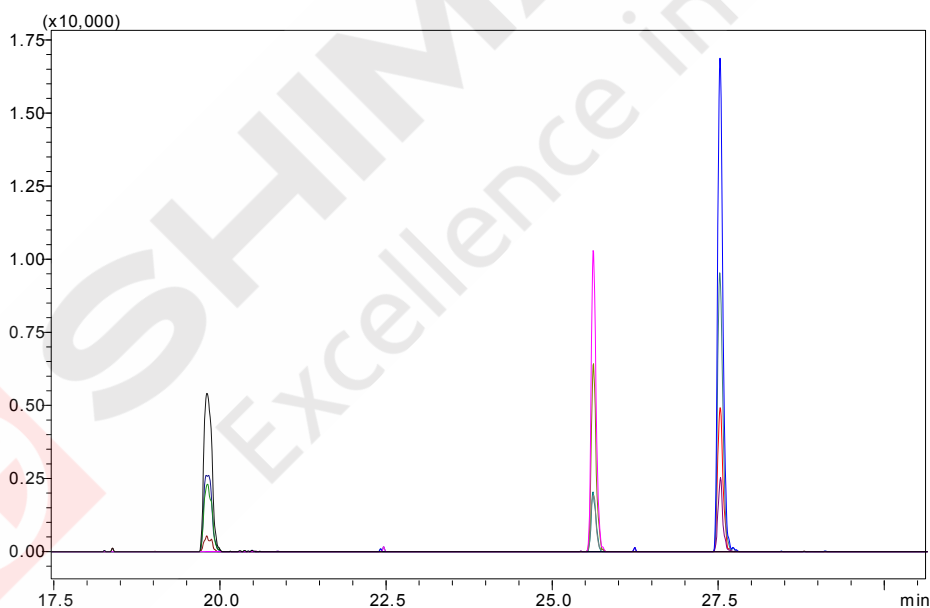


图 1 Skyline 软件最终确定的 3 个特征肽段 MRM 色谱图

2.2 Perfinity iDP 在线酶切、脱盐和分析时间程序建立

利用 Perfinity iDP 和 LCMS-8060 联用系统检测 α -酪蛋白, 操作简单方便, 仅需 23 min 即可完成包括在线酶切在内的整个分析过程。在分析检测过程中直接将 α -酪蛋白标准品溶液上机分析, 将在线酶解时间设置为 4 min, 酶解完成后经脱盐柱脱盐, 11 min 后进入 C18 柱进行色谱分离, 利用 LCMS-8060 检测酶解后的特征肽段, 经过不同肽段和离子对的信号比对, 最终选择 YLGYLEQLLR 作为定量肽段, 离子对 634>991.55 作为定量离子对。

在 Perfinity iDP 配套软件中输入酶解时间、色谱柱尺寸、流速、柱温以及梯度洗脱的起始和终止浓度（图 2），软件会自动生成在线酶切的时间程序（图 3）。

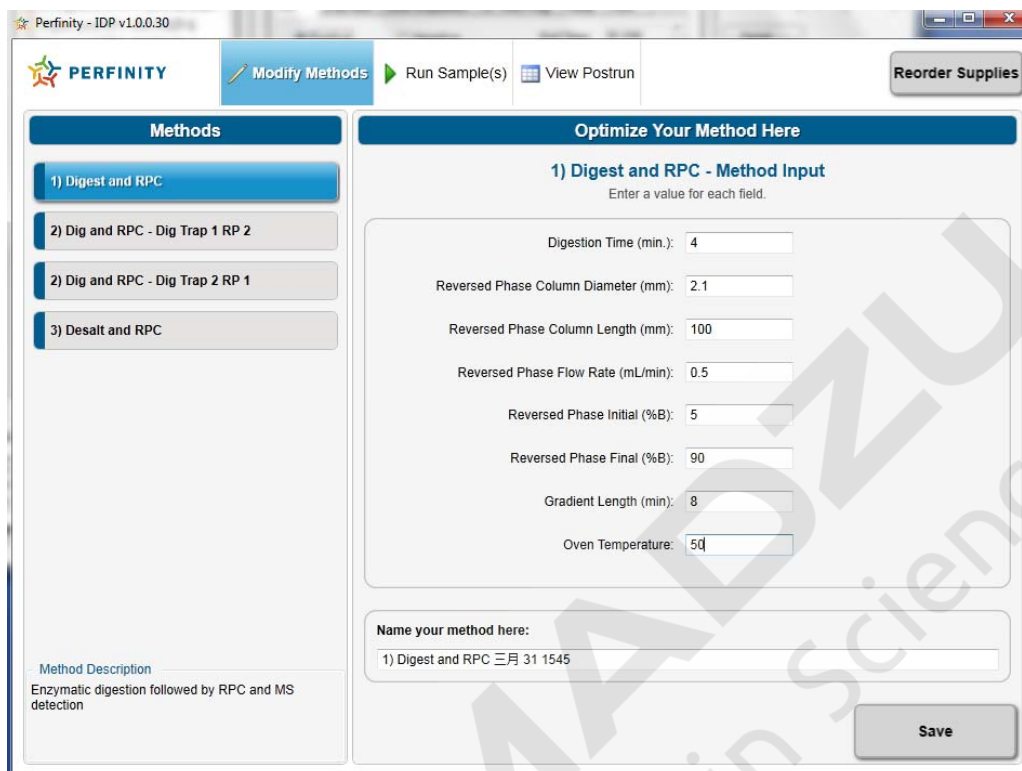


图 2 Perfinity 软件参数设置

	Time	Module	Command	Value
1	0.01	Controller	Event	12
2	0.01	Pumps	Pump B Conc.	5
3	0.01	Pumps	Pump C Flow	0.025
4	0.01	Controller	Start	1) Digest and RPC
5	8.01	Pumps	Pump C Flow	0.025
6	8.11	Pumps	Pump C Flow	0.4
7	8.61	Controller	Event	0
8	8.61	Pumps	Pump C Flow	0.4
9	8.61	Pumps	SV(Pump C)	D
10	8.71	Pumps	Pump C Flow	2
11	10.11	Pumps	SV(Pump C)	B
12	11.11	Pumps	Pump C Flow	2

图 3 在线酶切、脱盐和分析时间程序表

2.3 α -酪蛋白定量分析方法建立

利用 Skyline 软件导出含最佳碰撞能量的 MRM 列表，结合 Perfinity 软件生成的在线酶切、脱盐和分析时间程序列表构建完整的 LC-MS/MS 方法，定量分析的典型色谱图如图 4 所示，在 30~3000 mg/L 范围内 YLGYLEQLLR 具有良好的线性关系（图 5 和表 2）和重复性（表 3）。

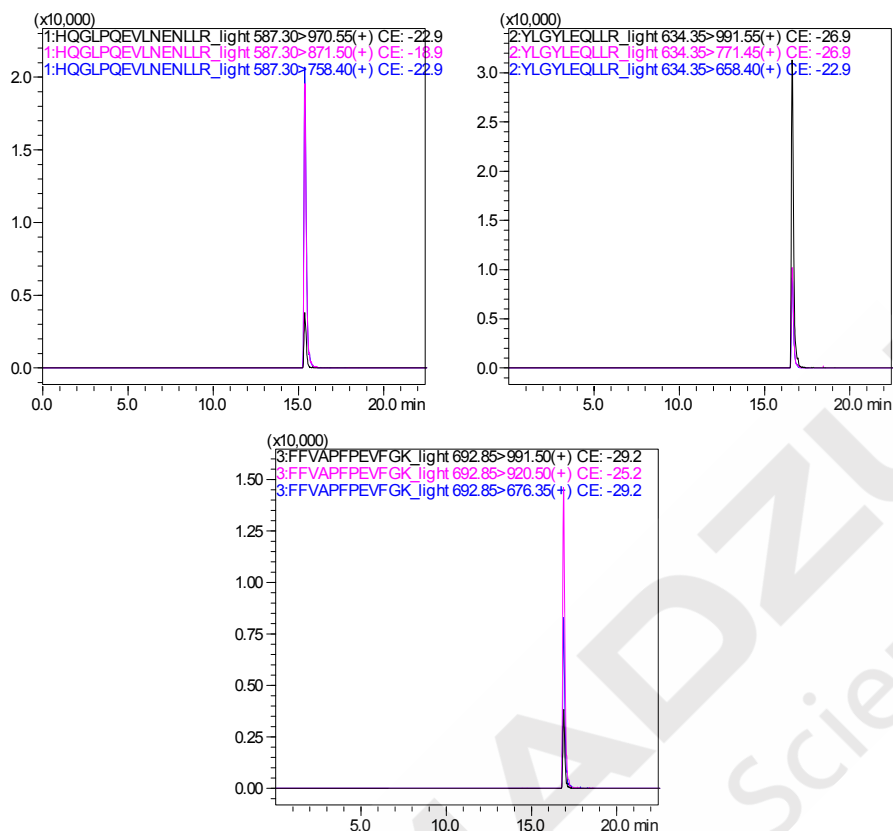


图 4 α -酪蛋白 LC-MS/MS 分析获得的典型色谱图

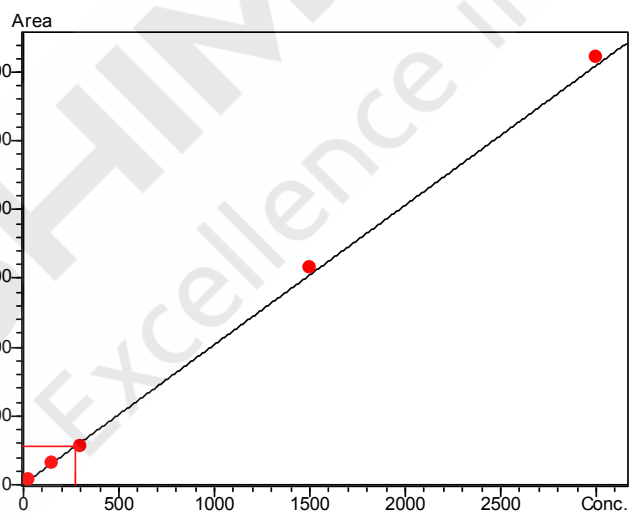


图 5 α -酪蛋白定量检测的标准曲线 (YLGYLEQLLR (634.35-991.55))

表 2 标准曲线的线性方程和相关系数

蛋白	肽段信息	校准曲线	线性范围 (mg/L)	相关系数 r	准确度 (%)
α -酪蛋白	YLGYLEQLLR (定量)	$Y = (101.500)X + (333.938)$	30~3000	0.9987	92.1~103.7

表 3 精密度考察结果(每个浓度点重复 6 次进样)

理论浓度	RSD% (R.T)	RSD% (Area)
30 mg/L	0.057	6.05
300 mg/L	0.051	2.39
3000 mg/L	0.033	2.27

3. 结论

采用岛津公司在线蛋白酶解液相色谱 Perfinity iDP-三重四极杆质谱 LCMS-8060 联用系统检测奶制品类过敏源 α -酪蛋白，此方法操作简单方便，无需十几小时的手工酶切过程，蛋白样品溶解后直接上机检测，在线酶切、脱盐和色谱分离检测仅需 23 分钟即可完成，实现过敏源蛋白的快速检测和定量。实验结果显示以特征肽段 YLGYLEQLLR 作为定量肽段， α -酪蛋白标准品在 30-3000 mg/L 范围内，线性回归系数 r 为 0.9987，准确度为 92.1-103.7%。该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合过敏源的超快速检测。



SHIMADZU
Excellence in Science

乳制品掺假鉴别



SHIMADZU
Excellence in Science

应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定羊奶粉中牛奶粉的掺伪

摘要: 本文应用异硫氰酸胍提取法, 从羊奶粉和牛奶粉中提取基因组, 使用羊和牛的特异性引物进行 PCR 扩增, 应用微芯片电泳仪检测到了相应条带。应用此方法检测羊奶粉和牛奶粉的混合样品, 结果显示同时检测到了羊和牛的特异性条带, 表明此方法可以实现羊奶粉中牛奶粉掺伪的定性检测。

关键词: 微芯片电泳仪 MultiNA 羊奶粉 牛奶粉 掺伪鉴定

近几年无论在资本市场还是消费市场, 羊奶粉越来越受青睐, 目前, 羊奶粉的价格也普遍高于牛奶粉。然而, 媒体报道市面上有羊奶粉掺假的情况, 打着羊奶的旗号, 实际上在奶粉中掺入了牛乳清粉, 有欺骗消费者之嫌。更有甚者直接用牛奶粉冒充羊奶粉, 严重侵害了消费者的利益。

由于羊奶粉和牛奶粉属于不同的动物源性, 应用分子生物学 PCR 和电泳检测手段鉴定羊奶粉中牛的特异性基因, 可以鉴定羊奶粉中是否掺有牛奶粉成分。本文应用微芯片电泳仪 MultiNA 开发一种快速简单地检测羊奶粉和牛奶粉的方法, 可进行羊奶粉中牛奶粉掺伪的鉴定

1 实验部分

1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

1.2 试剂和样品

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (Shimadzu, Code: 292-27910-91)

SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Code: S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, Code: 10597-011)

异硫氰酸胍 GuSCN (Sigma, Code: G9277-100G)

辛基苯氧基聚乙氧乙醇 Triton X-100 (Sigma, Code: I8896-50ML)

1 mol/L-Tris-HCl 缓冲液 (nacalai tesque, Code: 35435-11)

Proteinase K 粉末 100 mg (Sigma, Code: P6556)

Ampdirect[®] Plus (For International) (WAKO pure chem, Code: 604-21469; Shimadzu, Code: S241-08800-99)

IMMOLASE[™] DNA Polymerase (BIOLINE, Code: BIO-21046)

样品: 超市购得某品牌羊奶粉和牛奶粉

PCR引物: 根据基因序列, 对牛和羊设计特异性PCR引物, 羊和牛的扩增条带理论片段长度分别为 335 bp和266 bp。

1.3 奶粉样品DNA的提取

配制奶粉样品的裂解液, 包括: 5 mol/L异硫氰酸胍, 0.05 mol/L Tris-HCL (pH 6.4), 0.02 mol/L EDTA (pH 8.0), 1.3% Triton X-100。称取50 mg样品于1.5 mL离心管中, 加入200 μ L TE (pH 8.0)、400

μL 异硫氰胍裂解液和10 μL 蛋白酶K, 涡旋30 S, 于65 $^{\circ}\text{C}$ 消化3 h (期间每隔30 min应充分振荡1次)。向样品中加入600 μL 饱和酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 涡旋30 S, 13000 rpm离心10 min; 取上清, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24: 1), 涡旋30S, 13000 rpm离心10 min; 取上清, 加入等体积的氯仿, 涡旋30S, 13000 rpm离心10 min, 取上清, 加入0.8倍体积的异丙醇, 涡旋30S, 13000 rpm离心10 min; 取沉淀, 加入500 μL 70%乙醇, 涡旋30S, 13000 rpm离心10 min。用移液器小心吸出液体, 倒扣离心管, 使沉淀干燥。向干燥好的沉淀物中加入100 μL TE溶解。

1.4 PCR反应体系

PCR反应试剂与反应条件见表1和表2。

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
Ampdirect [®] Plus	10.0 μL	1 \times
IMMOLASE [™] DNA Polymerase	0.1 μL	
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μL	0.5 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μL	0.5 μM
DNA 模板	2.0 μL	3-5 ng/ μL
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	5.9 μL	
总体积	20.0 μL	

表2 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/ $^{\circ}\text{C}$
活化 DNA 活性酶和预变性	600	94
PCR (35 个循环)		
变性	30	94
退火	30	60
延伸	30	72
循环后保持	420	72

1.5 微芯片电泳MultiNA检测

PCR扩增产物进入MultiNA进行测定。根据理论产物片段大小, 实验中选用500 bp的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性, 本文同时进行阴性对照实验, 阴性对照的反应体系中以纯水代替DNA模板。

2 结果讨论

图1是微芯片电泳仪MultiNA检测样品的凝胶图, 羊奶粉和牛奶粉样品使用相应的特异性引物进行PCR扩增, MultiNA检测出对应的条带, 表明从奶粉样品中成功提取到了基因组, 且PCR过程被顺利实施。图2和图3是分析纯的羊奶粉和牛奶粉样品的电泳图, MultiNA结果直接提供条带的尺寸, 考虑到检测结果可以有5%的误差, 得到的条带实际尺寸与理论相一致。图3是检测羊奶粉和牛奶粉混合物的电泳图, 结果显示羊和牛的特异性条带被同时检测到, 这表明微芯片电泳MultiNA适合对多重PCR产物的检测, 可同时鉴定出羊奶粉和牛奶粉, 即适用于羊奶粉中牛奶粉掺假的鉴定。

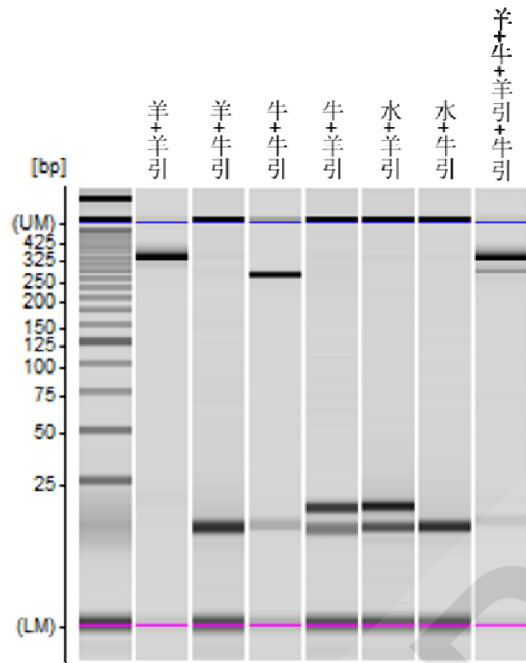


图1 微芯片电泳仪MultiNA检测样品的凝胶图（羊：羊奶粉样品；牛：牛奶粉样品；羊引：羊特异性引物；牛引：牛特异性引物）

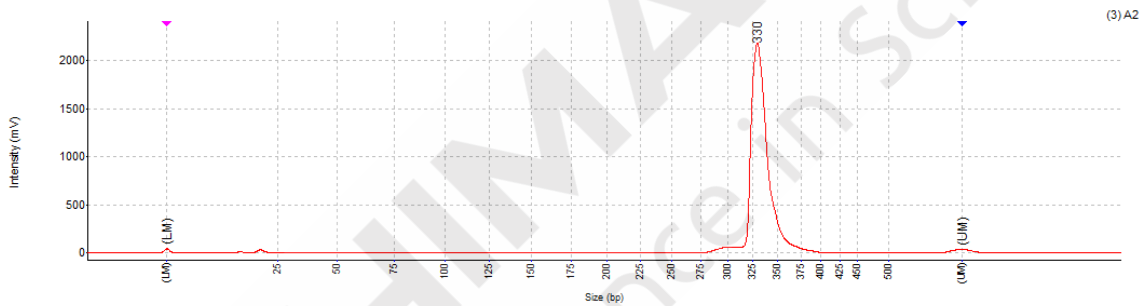


图2 微芯片电泳仪MultiNA检测羊奶粉的电泳图

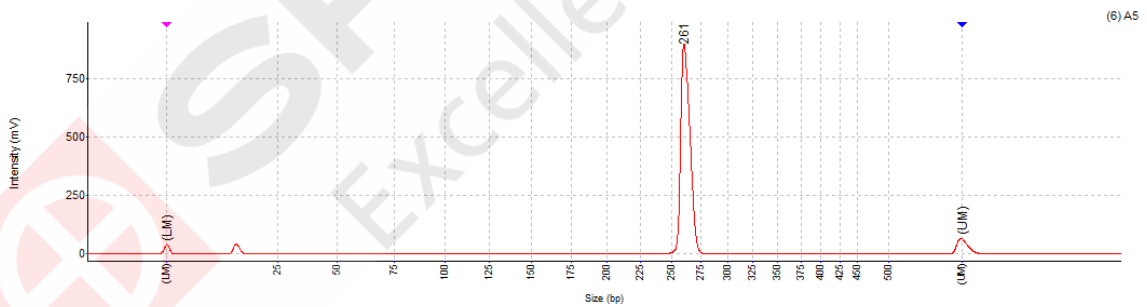


图3 微芯片电泳仪MultiNA检测牛奶粉的电泳图

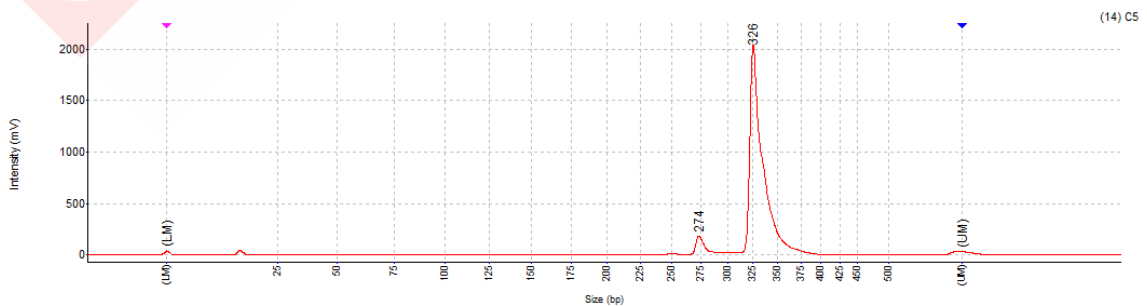


图4 微芯片电泳仪MultiNA检测羊奶粉和牛奶粉混合物的电泳图

3 结论

本文基于分子生物学技术,应用 PCR 方法和岛津公司微芯片电泳仪 MultiNA 实现了羊奶粉和牛奶粉的定性检测,并建立了同时鉴定这两种奶粉的方法。此方法分析效率高,操作简便,分析成本低,是鉴定羊奶粉中牛奶粉掺伪的有力检测手段。



超高效液相色谱—串联质谱法测定山羊全脂奶粉产品中山羊奶粉和奶牛奶粉成分的含量

摘要：建立了一种测定山羊全脂奶粉产品中的山羊奶粉和奶牛奶粉成分含量的超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）并用于考察5个市售山羊全脂奶粉中山羊奶粉和奶牛奶粉的含量。奶粉的山羊和奶牛 β -乳球蛋白经二硫苏糖醇、碘代乙酰胺变性还原，以碱性重组胰蛋白酶酶解成特异性肽段后，用稳定同位素稀释-液相色谱串联质谱法测定目标蛋白的特异肽段，内标法定量。方法学结果表明，羊奶粉和奶牛奶粉含量的两条曲线线性均良好， R^2 在0.9989以上。在两个不同含量的混合对照品条件下，两种奶粉测定结果的RSD%在13%以下，方法的精密度良好。

关键词：山羊全脂奶粉 山羊奶粉 奶牛奶粉 超高效液相色谱串联质谱法

山羊奶是全球继奶牛奶、水牛奶之后的第三大奶类资源，占总奶量 2.07%。通常奶类蛋白中的酪蛋白在胃酸的作用下易形成较大的凝固物，从而影响蛋白的消化率。羊奶中酪蛋白含量低于牛奶，与人奶相似，所以羊奶中蛋白质的消化率比牛奶高，更适合作为婴儿、老人的保健食品。同时羊奶的酪蛋白结构与牛奶中的不同，羊奶中主要含 α -2S 酪蛋白、 β -酪蛋白，这两种酪蛋白易被酵母分解；而牛奶中主要含 α -1S 酪蛋白，因此，对牛奶过敏和体质较弱的人群完全可以接受山羊奶。因此可以说羊奶是乳制品中最接近母乳，营养成分最全、最易被人体吸收的奶品，正日益得到人们的青睐。然而羊奶产品的成本要比牛奶高，因此有不法厂商向羊奶粉中添加牛乳清粉等成分，更有甚者直接用牛奶粉冒充羊奶粉，严重侵害了消费者的利益。相关部门对此十分重视，相继出台了相关文件，要求产品名称中有动物性来源的应当在配方组成中注明生乳、乳粉、乳清（蛋白）粉等乳制品原料的动物性来源，同一乳制品原料有两种以上动物性来源的，应当标明各种动物性来源原料所占比例。因此，建立一个能够准确测定山羊奶粉中羊奶粉和牛奶粉含量的方法迫在眉睫。

在本文中建立的 LC-MS/MS 方法可通过检测特异肽段来快速准确测定全脂山羊奶粉中羊奶粉和牛奶粉含量。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱： C18 色谱柱 2.1 mm I.D. \times 100 mm L, 流动相： A, 水+0.1%甲酸； B, 乙腈+0.1%甲酸
1.7 μ m, 孔径 300 Å。 流速： 0.3 mL/min

进样体积: 10 μ L

洗脱方式: 采用梯度洗脱, B 相初始浓度为 3%

柱温: 40 $^{\circ}$ C

时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.0	Pumps	Pump B Conc	32
5.5	Pumps	Pump B Conc.	100
6.5	Pumps	Pump B Conc.	100
7.0	Pumps	Pump B Conc.	3
9.0	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 空气 10.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300 $^{\circ}$ C

DL 温度: 250 $^{\circ}$ C

加热模块温度: 400 $^{\circ}$ C

扫描模式: 多反应监测(MRM)

MRM 参数: 见表 2



SHIMADZU
Excellence in Science

1.3 试剂

乙腈购自 Merck 公司；实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统（Millipore, Ltd.）经去离子与二次净化制得；甲酸（纯度 99%，Wako, Japan）；其余试剂均为分析纯；碱性重组胰蛋白酶：活力大于 10000 BAEE 每毫克蛋白质。

碳酸氢铵溶液（100 mmol/L）：称取 0.79 g 碳酸氢铵，用水溶解后定容至 100 mL。

二硫苏糖醇溶液（100 mmol/L）：称取 1.542 g 二硫苏糖醇，用 100 mmol/L 的碳酸氢铵溶液溶解后定容至 100 mL。

碘代乙酰胺溶液（100 mmol/L）：称取 1.850 g 碘代乙酰胺，用 100 mmol/L 的碳酸氢铵溶液溶解后定容至 100 mL。

乙酸溶液（1%，V/V）：移取 0.1 mL 乙酸，用水稀释并定容至 10 mL。

碱性重组胰蛋白酶溶液（300 μg/mL）：称取 3 mg 碱性重组胰蛋白酶，用 1%乙酸溶液溶解后定容至 10 mL。

甲酸水溶液（0.1%，V/V）：吸取 1 mL 甲酸，用水稀释并定容至 1000 mL。

甲酸乙腈溶液（0.1%，V/V）：吸取 1 mL 甲酸，用乙腈稀释并定容至 1000 mL。

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子(m/z) [M+2H] ²⁺	产物离子(m/z)	碰撞能量(V)
奶牛β-乳球蛋白特异肽段	858.6	462.2	-28
		685.3	-27
		1254.5*	-32
奶牛β-乳球蛋白同位素特异肽段	865.7	462.2	-26
		693.3	-27
		1268.6*	-31
山羊β-乳球蛋白特异肽段	807.5	600.2	-30
		842.4	-28
		1168.4*	-28
山羊β-乳球蛋白同位素特异肽段	814.0	606.2	-30
		855.4	-32
		1182.0	-27

*为定量离子对

1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

奶牛 β -乳球蛋白特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取奶牛 β -乳球蛋白特异肽粉末 8.29 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解后定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

山羊 β -乳球蛋白特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取山羊 β -乳球蛋白特异肽粉末 7.78 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解后定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

奶牛 β -乳球蛋白稳定同位素特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取奶牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段粉末 8.36 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解后定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

山羊 β -乳球蛋白稳定同位素特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取山羊 β -乳球蛋白同位素特异肽段粉末 7.85 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解后定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

奶牛 β -乳球蛋白特异肽段工作溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$): 准确吸取 20 μL 奶牛 β -乳球蛋白特异肽标准储备液, 按照 1.5.2 步骤进行烷基化后, 用水稀释并定容至 1 mL。

山羊 β -乳球蛋白特异肽段工作溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$): 准确吸取 20 μL 山羊 β -乳球蛋白特异肽标准储备液, 按照 1.5.2 步骤进行烷基化后, 用水稀释并定容至 1 mL。

奶牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段工作溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$): 准确吸取 20 μL 奶牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段储备液, 按照 1.5.2 步骤进行烷基化后, 用水稀释并定容至 1 mL。

山羊 β -乳球蛋白同位素特异肽段工作溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$): 准确吸取 20 μL 山羊 β -乳球蛋白同位素特异肽段储备液, 按照 1.5.2 步骤进行烷基化后, 用水稀释并定容至 1 mL。

同位素标记特异肽中间混合溶液 (25 $\mu\text{mol/L}$): 分别准确吸取 500 μL 奶牛和山羊 β -乳球蛋白特异肽标准储备液和奶牛, 用水稀释并定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

1.5 样品前处理

1.5.1 样品制备

称取奶粉试样约 1 g 或鲜乳试样约 5 g (精确至 0.01 g, 内含总蛋白质约 100 mg 左右) 于

50 mL 烧杯中，用 50 mL 水分次将试样充分溶解后转移到 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，必要时置于涡旋混合器上充分涡旋溶解。移取上述溶液 50 μ L 于 2 mL 离心管中，加入 20 μ L 稳定同位素标记内标中间混合溶液，待酶解。

1.5.2 烷基化与酶解

向上述样液中加入 100 μ L 碳酸氢铵溶液、10 μ L 二硫苏糖醇溶液和 660 μ L 超纯水，混匀后于 70 $^{\circ}$ C 下恒温水浴 30 min；冷却至室温，加入 30 μ L 碘代乙酰胺溶液，暗处静置 30 min；再加入 100 μ L 碳酸氢铵溶液，20 μ L 胰蛋白酶溶液，充分混匀后于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中酶解 2 h。加入 10 μ L 甲酸混匀，室温下静置 10 min，用 0.22 μ m 滤膜过滤，供高效液相色谱-串联质谱仪检测。

注：以上前处理过程中所使用耗材均应考虑多肽吸附效应，吸附率应小于 15%

1.6 计算

本方法以标准山羊奶粉和奶牛奶粉作为标准品，检测定量样品中山羊奶粉和奶牛奶粉含量。并将定量结果代入公式（1）和公式（2），分别计算得出样品中的山羊奶与奶牛奶的成分占比。

$$C_a = \frac{n_a}{n_a + n_b} \times 100\%$$

$$C_b = \frac{n_b}{n_a + n_b} \times 100\%$$

式中：

c_a —试样中山羊奶成分占比， %；

c_b —试样中奶牛奶成分占比， %；

n_a —试样溶液中山羊奶成分相对于标准山羊奶粉的当量；

n_b —试样溶液中奶牛奶成分相对于标准奶牛奶粉的当量。

2. 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

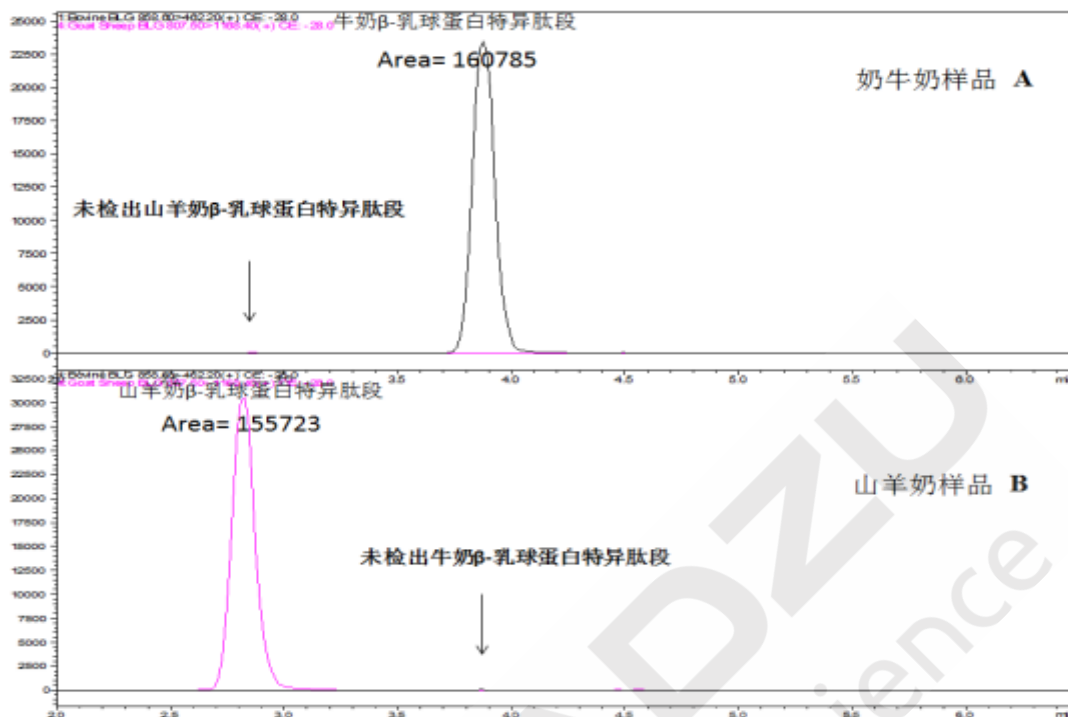


图 1 标准奶牛奶 (A) 和标准山羊奶 (B) 酶解溶液的 MRM 色谱图

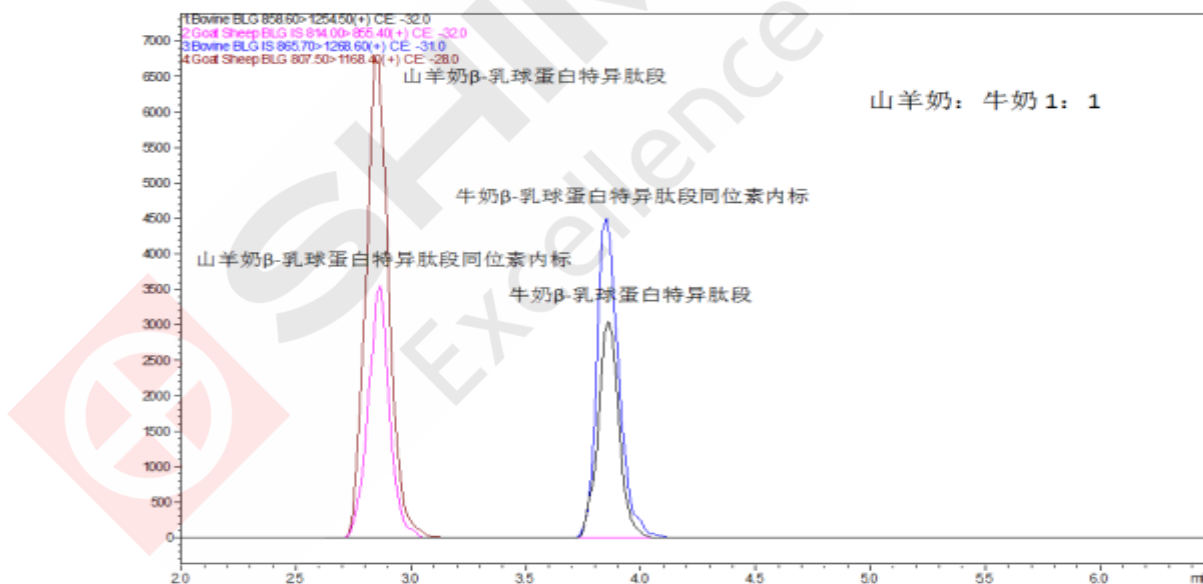


图 2 奶牛奶粉/山羊奶粉 1: 1 混合酶解溶液的 MRM 色谱图

2.2 线性关系

分别称取标准山羊和奶牛奶粉试样约 1 g (精确至 0.01 g, 内含总蛋白质约 100 mg 左右) 于 50 mL 烧杯中, 用 50 mL 水分次将试样充分溶解后转移到 100 mL 容量瓶中。按照表 3 中比例混合配制不同浓度的标准系列。依次进样后制作以牛奶粉/羊奶粉含量为横坐标、以牛奶和羊

奶的实际测定比值为纵坐标的两条校准曲线分别对牛奶粉和羊奶粉含量进行定性。由结果可见，两条曲线线性关系均良好， R^2 在 0.9989 以上。

表3 牛羊奶标准曲线制作方法

序号	标准曲线 [%]	
	牛奶标准溶液	羊奶标准溶液
1	0	100
2	10	90
3	20	80
4	30	70
5	40	60
6	50	50
7	60	40
8	70	30
9	80	20
10	90	10
11	100	0

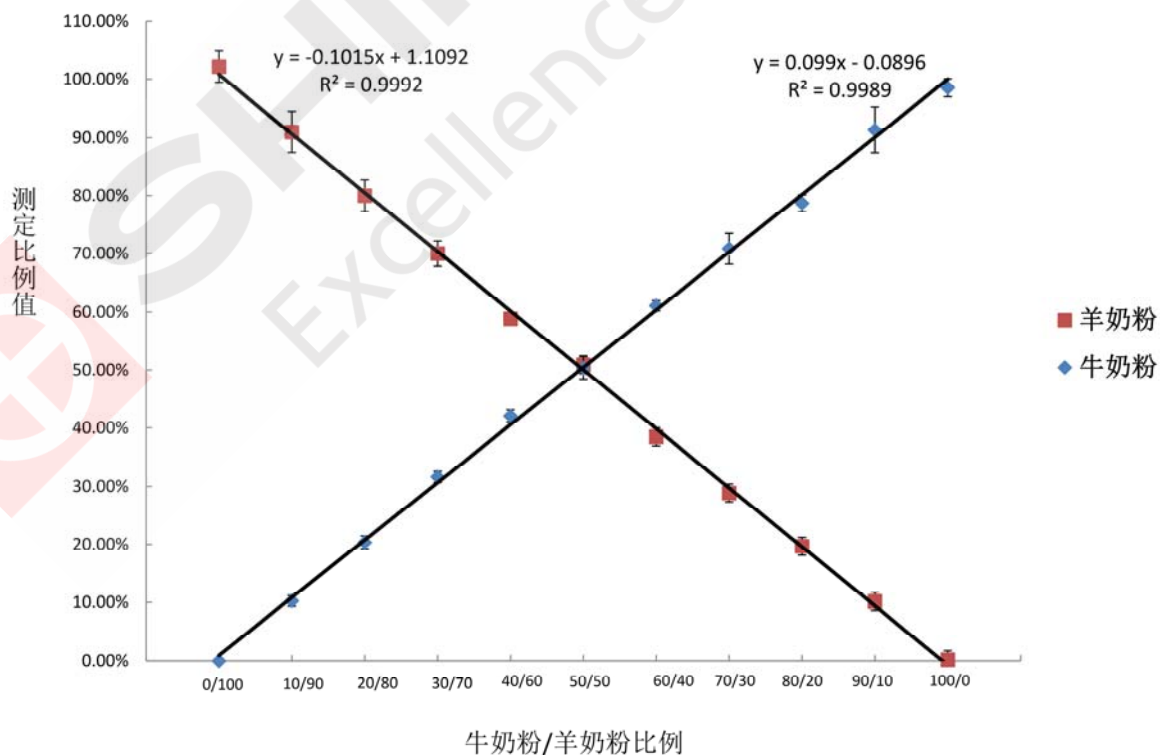


图3 羊奶粉与牛奶粉不同比例下的校准曲线

2.3 精密度结果

取含量分别为山羊奶粉/奶牛奶粉 1:9 与 9:1 的两个浓度下的混合对照品溶液，每个浓度的溶液做六次实验，分别酶解后进入质谱进行分析，得到的结果如图 4 所示。两种奶粉在这两个浓度下的测定含量 RSD%在 13%以下。

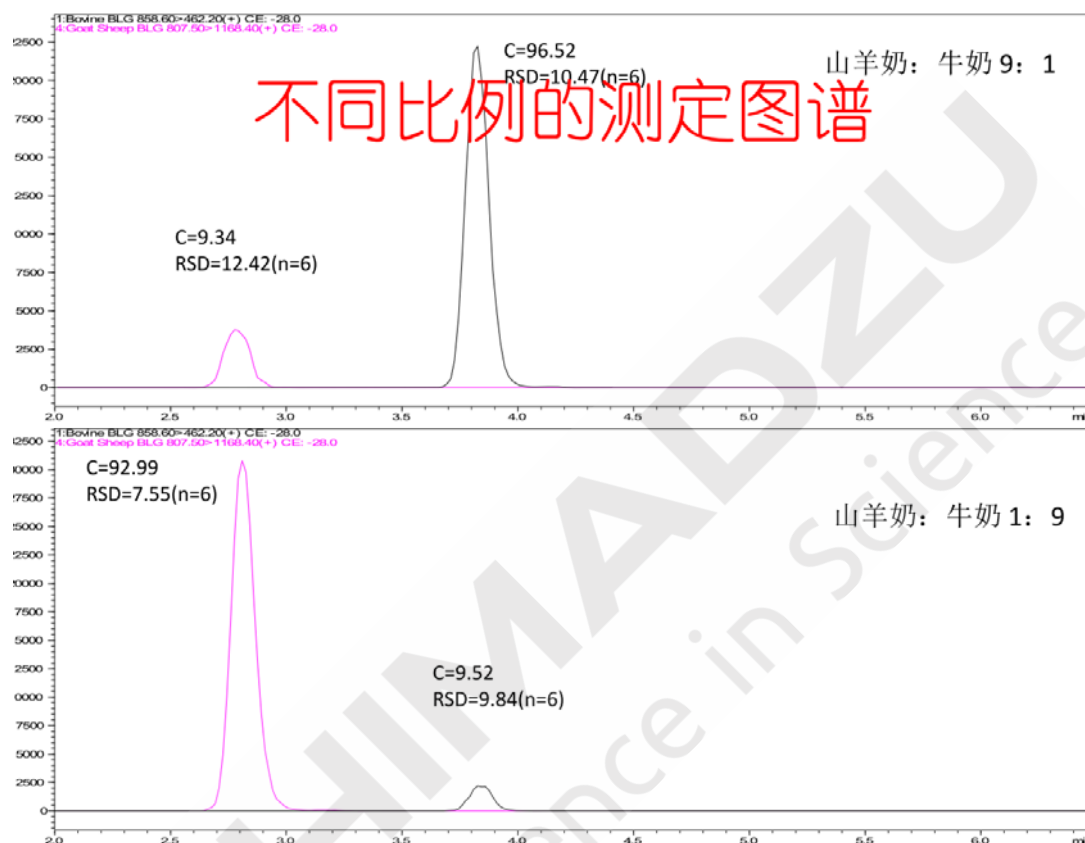


图 4 山羊奶粉/奶牛奶粉含量分别为 1:9 (上) 与 9:1 (下) 的混合酶解溶液 MRM 色谱图

2.4 实际样品测定结果

抽取市售的 5 个品牌的羊奶粉样品，每个样品做三个平行样，按 1.5 的步骤进行处理，将处理后的样品注入液相色谱-串联质谱仪，按照已确立的方法进行测定，结果见表 4。从结果看到，只有一个品牌的羊奶粉没有添加牛奶成分，其它四个品牌的羊奶粉不同比例的添加了牛奶成分，添加的比例从 3%到 17%不等。

表4 市售羊奶粉中羊奶及牛奶成分检测结果

样品	相对标准牛奶比例 (%)	相对标准山羊奶比例 (%)
Sample 1	3.85±0.27	86.09±1.56
Sample 2	-	87.28±3.54
Sample 3	4.50±0.21	77.76±2.71
Sample 4	9.07±0.36	83.66±1.09
Sample 5	16.67±0.57	68.05±0.47

3. 结论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定山羊全脂奶粉中的山羊奶粉和奶牛奶粉成分含量的快速准确定量方法，方法曲线的线性、重复性、灵敏度均满足样品测定要求。本文还检测了市售的 5 个品牌的羊奶粉样品，结果显示只有一个品牌的羊奶粉没有添加牛奶成分，其它四个品牌的羊奶粉均不同比例的添加了牛奶成分。





本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

岛津企业管理（中国）有限公司 / 岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F
邮政编码：100020
电话：(010) 8525-2310/2312
传真：(010) 8525-2326/2329

上海

上海市淮海西路 570 号红坊 E 楼
邮政编码：200052
电话：(021) 2201-3888
传真：(021) 2201-3555

沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码：110001
电话：(024) 2383-6735
传真：(024) 2383-6378

四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层
邮政编码：610015
电话：(028) 8619-8421/8422
传真：(028) 8619-8420

武汉

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦1座41层4116室
邮政编码：430022
电话：(027) 8555-7910
传真：(027) 8555-7920

广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼
邮政编码：510010
电话：(020) 8710-8603
传真：(020) 8710-8698

西安

西安市南二环西段88号老三届世纪星大厦24层G座
邮政编码：710065
电话：(029) 8838-6016
传真：(029) 8838-6497

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座
邮政编码：830000
电话：(0991) 230-6271/6272
传真：(0991) 230-6273

昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室
邮政编码：650021
电话：(0871) 315-2987
传真：(0871) 315-2991

南京

南京市中山南路 49 号商茂世纪广场 23 层 A1 座
邮政编码：210005
电话：(025) 8689-0278
传真：(025) 8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室
邮政编码：400010
电话：(023) 6380-6057/6058
传真：(023) 6380-6551

深圳

深圳市福田区福华一路98号卓越大厦15楼1号
邮政编码：518040
电话：(0755) 8340-2852
传真：(0755) 8389-3100

河南

郑州市郑东新区金水东路21号永和广场A区14层1405、1406室
邮政编码：450046
电话：(0371) 8663-2981/2983
传真：(0371) 8663-2982

香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City.
Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong
电话：(00852) 2375-4979
传真：(00852) 2199-7438

用户服务热线电话：800-8100439
400-6500439

本产品样本所宣传的内容，以本版本为准
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注：此样本所有信息仅供参考，如有变动恕不另行通知