

实验技术与方法

离子色谱-脉冲安培法测定白酒中氰化物

王紫菲¹, 苗宏健¹, 骆鹏杰¹, 孙铁虎^{2,3}, 郑晓卫^{2,3}, 郭杰^{2,3}

(1. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100022; 2. 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209; 3. 中粮生物科技(北京)有限公司, 北京 102209)

摘要:目的 建立离子色谱-脉冲安培法检测白酒中氰化物含量的方法。方法 白酒样品稀释10倍后直接进样,以氢氧化钾溶液(12 mmol/L)进行等梯度淋洗,采用银工作电极,以Ag/AgCl复合参比电极模式,脉冲安培三点位波形式进行检测。结果 该方法在5~200 μg/L浓度范围内线性关系良好,相关系数 R^2 为0.999 9。该方法对白酒类基质检出限为3.5 μg/L,定量限为9.5 μg/L。对不同类型白酒样品,在10、30和50 μg/L三个加标浓度水平下回收率在91.7%~102.0%之间。日内相对标准偏差(RSD)在2.2%~4.8%之间,日间RSD在1.5%~1.9%之间。本方法与GB 5009.36—2016《食品安全国家标准 食品氰化物的测定》中的气相色谱法进行比较,结果差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 该方法操作步骤简单快速,结果准确可靠,适用于实际白酒样品中氰化物的检测。

关键词:白酒;离子色谱;脉冲安培;氰化物

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)03-0257-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.03.007

Development of an analytical method to detect cyanide in Chinese liquor by ion chromatography with pulsed amperometric detection

WANG Zifei¹, MIAO Hongjian¹, LUO Pengjie¹, SUN Tiehu^{2,3}, ZHENG Xiaowei^{2,3}, GUO Jie^{2,3}

(1. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China;

2. Nutrition & Health Research Institute, China Oil & Foodstuffs Corporation, Beijing 102209, China;

3. China Oil & Foodstuffs Corporation Biotech (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102209, China)

Abstract: Objective This study aimed to develop an ion chromatography-pulse amperometry (IC-PAD) technique for the identification and quantification of cyanide in Chinese liquor. **Methods** The real samples from local markets were diluted to 1 : 10 with ultrapure water before being injected to IC-PAD. Potassium hydroxide (12 mmol/L) was introduced for gradient elution. Silver electrode was utilized with Ag/AgCl composite reference electrode mode. Three potential wave forms were also involved in the study. **Results** This method showed good linear responses ranging from 5 to 200 μg/L with satisfactory linear correlation coefficient of 0.999 9. The limit of detection (LOD) was 3.5 μg/L, and the limit of quantitation (LOQ) was 9.5 μg/L in Chinese liquor samples. For different types of Chinese liquor, the recoveries of cyanide in fortified samples (10, 30, 50 μg/L) were from 91.7% to 102.0%. The intra-day relative standard deviation (RSD) was from 2.2% to 4.8%, and the inter-day RSD ranged from 1.5% to 1.9%. The comparison between this proposed method and the GB 5009.36-2016 method showed no statistical difference ($P>0.05$). **Conclusion** This technique was performer-friendly and exhibited high reliability and accuracy, which was suitable for the detection of cyanide in real samples.

Key words: Chinese liquor; ion chromatography; pulsed amperometric; cyanide氰化物是带有氰基(CN⁻)的化合物,主要包括无机氰化物(如氢氰酸、氯化钾)、有机氰化物(如乙腈)和络合氰化物,大部分属于高毒类化合物^[1]。氰离子易经呼吸道黏膜、消化道和皮肤吸收入体内,长期暴露会导致神经系统、心血管系统、呼吸系统和消化系统多种疾病产生,严重威胁机体健康^[2-3]。在我国,氰化物通常存在于发酵酒或蒸馏酒中^[4-6],人体主要通过摄入酒类产品导致氰化物的暴露^[7-9],因此,氰化物是酒类的一项重要食品安

收稿日期:2020-05-11

基金项目:“十三五”国家重点研发计划专项项目(2018YFC1604101)

作者简介:王紫菲 女 助理研究员 研究方向为食品安全理化检测方法和标准 E-mail:wangzifei@cfsa.net.cn

通信作者:郭杰 女 研发专员 研究方向为食品理化相关检测分析 E-mail:guojie6@cofco.com

全检测指标,GB 2757—2012《食品安全国家标准 蒸馏酒及其配制酒》^[10]中规定,酒中氰化物含量不得超过 8 mg/L(以氰化氢计)。

目前,我国针对酒类氰化物检测方法主要有化学分析法^[11]、分光光度法^[12-13]、气相色谱法^[14-15]、离子色谱法^[16-17]、气相-质谱联用法^[18]、电化学法^[19]以及一些新型传感器类方法^[20-21]等。分光光度法易受样品自身 pH 值、样品性状等影响。气相色谱法中样品前处理以氯胺 T 进行衍生,操作繁琐,对检测人员要求较高。相比以上方法,离子色谱法具有无需衍生、操作简便、试剂使用量少等优势^[22-23],在酒类氰化物含量检测中更加高效、快速、准确,适用于大样本量中氰化物的准确定量需求;因此,本课题组通过文献调研并结合自身研究基础,考察了白酒酒精度对检测结果的影响,建立了白酒中离子色谱-脉冲安培法测定氰化物含量的检测方法。本方法可直接进样,避免样品前处理引发的损失和污染,操作简便,灵敏度高,适合大量白酒样品的氰化物含量测定工作。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

ICS-3000 离子色谱仪(配备 EG 淋洗液发生器)、ED50A 电化学检测器(配备 Ag 工作电极、pH/Ag/AgCl 复合参比电极和 Ti 对电极)均购自美国赛默飞世尔。

水中氰成分分析标准物质[GBW(E) 080115, CN⁻浓度为 50 μg/mL,中国计量科学研究院],50 mmol/L 氢氧化钾(优级纯),超纯水(符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》^[24]规定的一级水)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液制备

氰化物(以 CN⁻计)标准中间液(1.0 μg/mL)的配制:准确吸取氰化物标准溶液(50 μg/mL)0.2 mL 于 10 mL 容量瓶中,加超纯水定容至刻度线,混匀。4 °C 保存备用。

氰化物(以 CN⁻计)标准系列工作溶液的配制:分别吸取氰化物(以 CN⁻计)标准中间液(1.0 μg/mL)0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 和 2.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,加超纯水定容至刻度线,混匀,配制成氰化物浓度为 5、10、20、50、100 和 200 μg/L 6 个梯度的标准系列工作溶液,4 °C 保存备用。

1.2.2 样品前处理及检测

吸取白酒样品 1.0 mL 于 10.0 mL 比色管中,加超纯水定容至 10 mL,充分混匀后注入自动进样器

配套的样品瓶中,按要求置于自动进样盘中,按照绘制标准曲线时的条件自动进样检测。

1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱:IonPac AS11-HC 分析柱(4 mm×250 mm,9 μm),IonPac AG11-HC 保护柱(4 mm×50 mm,13 μm);柱温:30 °C;淋洗液:12 mmol/L 氢氧化钾,等梯度淋洗;流速:1.00 mL/min;进样方式:自动进样;进样体积:25 μL;检测方式:银工作电极,Ag/AgCl 复合参比电极模式,脉冲安培三点位波形检测,见表 1。

表 1 氰化物测定的三电位波形

时间/s	电位/V	积分
0	-0.10	—
0.20	-0.10	on
0.90	-0.10	off
0.91	-1.00	—
0.93	-0.30	—
1.00	-0.30	—

注:—为未设置

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.1 及 Microsoft Office Excel 软件进行数据处理和统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前处理的优化

目前酒类基质中氰化物检测^[13-16]采用的前处理方法一般为:蒸馏、加酸加碱及与氯胺 T 溶液衍生后,再加入显色剂或者上机测定,操作相对繁琐,且有机溶剂使用量较大。本试验采用了离子色谱法,克服了气相色谱-质谱法前处理时间长,操作过程复杂,影响因素较多的局限性。同时针对离子色谱法的特点,研究了直接进样的可行性:选取已知氰化物浓度 0.001 mg/L 的 38% 酱香型白酒同批次样品(样品 1、2、3)以超纯水稀释 10、50 和 100 倍后,分别加入标准溶液(浓度 0.2 mg/L),在其他试验条件完全相同的情况下连续重复检测 3 次,计算其平均回收率和相对标准偏差(RSD),见表 2。结果显示当稀释倍数为 10 倍时,呈现较好的加标回收率和 RSD 值,因此,本试验选取稀释 10 倍、直接进样的离子色谱法前处理方法,具有操作简便、重现性好、使用有机溶剂量较少等优点。

2.2 酒精度的影响

有研究指出检测酒类基质时需考虑酒精度对结果的影响^[25]。本试验配制了氰化物浓度为 0.01、0.03 和 0.05 mg/L 的标准溶液,每个浓度水平用无水乙醇和水分别配制成酒精浓度为 20% 和 50% 的

表2 样品稀释倍数的影响($n=3$)

样品	稀释倍数	加标浓度 /(mg/L)	平均加标回收率 /%	RSD /%
样品 1	10	0.2	100.7	1.1
	50	0.2	102.7	3.9
	100	0.2	97.8	6.0
样品 2	10	0.2	100.4	1.5
	50	0.2	102.0	7.9
	100	0.2	97.2	6.9
样品 3	10	0.2	100.2	2.3
	50	0.2	96.5	7.0
	100	0.2	103.0	9.9

溶液,连续重复检测6次。结果显示回收率均在90%以上(表3),RSD符合相关标准和法规^[26]的要求。

表3 酒精度对该方法检测氰化物的影响($n=6$)

乙醇浓度 /%	标准溶液浓度 /(mg/L)	回收率范围 /%	RSD /%
20	0.01	99.5~105.0	2.8
	0.03	96.3~101.3	2.6
	0.05	98.6~102.8	1.5
	0.01	102.1~104.0	0.9
50	0.03	98.0~101.7	2.0
	0.05	94.2~103.6	3.4

2.3 线性范围

按照设定好的测定氰化物含量分析条件对仪器进行设定,待其状态稳定后,将浓度为5、10、20、50、100和200 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液,按1.2.3仪器条件进行检测。以检测目标物浓度为横坐标,以测得的峰面积为纵坐标绘制标准曲线图,并计算出线性方程和相关系数。结果表明,该方法氰化物浓度在5~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, R^2 为0.9999,线性方程为 $y=40.60x-0.01496$ 。同时得到氰化物标准溶液色谱图见图1。

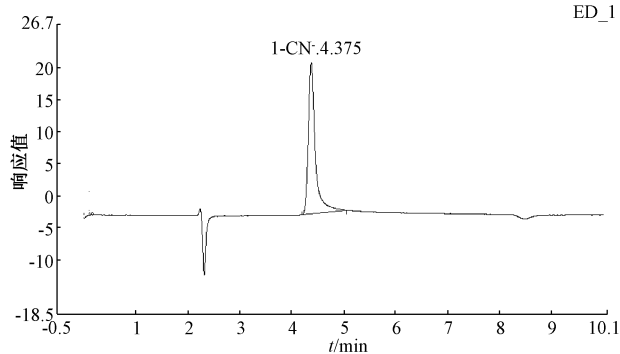


图1 氰化物标准溶液色谱图

Figure 1 Chromatogram of cyanide standard solution analyzed by IC-PAD

2.4 检出限和定量限

选择空白样品,定量添加标准溶液,按照1.2中的方法和分析条件进行检测。所得谱图信噪比(S/N)为3时,将此添加量定为检出限;信噪比为10时,将此添加量定为定量限。当白酒基质取样量为1.0 mL时,得到检出限为3.5 $\mu\text{g/L}$,定量限为9.5 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 精密度

选取已知氰化物浓度0.001 mg/L的38%酱香型白酒、28%清香型白酒和35%浓香型白酒作为基质,分别加入氰化物标准溶液(浓度0.2 mg/L),同日内连续重复检测6次,连续测定3 d。日内RSD在2.2%~4.8%之间,日间RSD在1.5%~1.9%之间,符合相关标准和法规在此浓度范围内^[26]的要求(表4)。3种基质中分别添加0.01、0.03、0.05 mg/L浓度的标准品溶液,每个添加浓度按1.2中的方法和分析条件,分别重复检测6次并计算回收率。结果显示回收率范围在91.7%~102.0%之间,RSD在1.1%~4.0%之间,符合相关标准和法规在此浓度范围内^[27]的要求(表5)。

表4 精密度检测结果($n=6$)

Table 4 Results of the precision study

样品	1 d		2 d		3 d		日间 RSD /%
	平均测定值 /(mg/L)	日内 RSD /%	平均测定值 /(mg/L)	日内 RSD /%	平均测定值 /(mg/L)	日内 RSD /%	
38%酱香型白酒	0.192 2	2.4	0.189 3	3.0	0.196 1	2.5	1.8
28%清香型白酒	0.191 8	4.5	0.195 8	3.0	0.197 4	2.2	1.5
35%浓香型白酒	0.191 6	4.8	0.198 2	2.9	0.198 0	2.3	1.9

表5 回收率检测结果($n=6$)

Table 5 Results of the recovery study

样品	本底值 /(mg/L)	加标浓度 /(mg/L)	回收率范围 /%	RSD /%
38%酱香型白酒	0.001	0.01	93.0~97.0	1.9
		0.03	91.7~94.3	1.1
		0.05	94.6~97.0	1.2
28%清香型白酒	0.001	0.01	92.0~95.0	1.5
		0.03	94.7~97.0	1.5
		0.05	95.8~99.6	2.1
35%浓香型白酒	0.001	0.01	96.0~102.0	2.8
		0.03	92.3~99.7	4.0
		0.05	93.8~100.2	3.3

2.6 实际样品检测

按照本方法的前处理和试验条件对实际白酒样品(包括市场上常见的酱香型、清香型和浓香型)进行检测,并与GB 5009.36—2016《食品安全国家标准 食品中氰化物的测定》^[27]中的气相色谱法进行比对。根据检测结果(表6)进行统计学分析,结果表明两种方法检测结果差异无统计学意义($P=0.9914$,95%置信区间:-0.02170~0.02148)。离子色谱图(图2)显示该方法基线平稳,峰形较好,无

表6 不同方法测定白酒中氰化物含量比较(mg/L)

Table 6 Comparison between different cyanide analytical methods

样品	离子色谱法	气相色谱法
酱香型1	0.065	0.063
酱香型2	0.072	0.073
酱香型3	0.059	0.061
浓香型1	0.038	0.036
浓香型2	0.046	0.044
浓香型3	0.017	0.019
清香型1	0.014	0.015
清香型2	0.025	0.023
清香型3	0.023	0.024

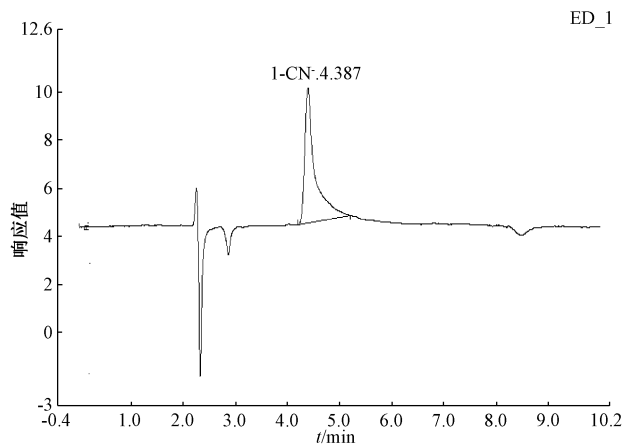


图2 实际样品色离子图谱

Figure 2 Chromatogram of cyanide analysis in real samples by IC-PAD

杂峰。说明本方法对于检测实际白酒基质中氰化物含量具有可靠性和实用性。

3 小结

本试验建立了离子色谱-脉冲安培法检测白酒中氰化物。该方法操作简单、快速准确,无需复杂的蒸馏和衍生等前处理过程,稀释后可直接上样,且每份样品检测时间为10 min,缩短检测周期。方法在5~200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好,相关系数为0.999 9,线性范围宽,准确度高,稳定性好。该方法适用于不同类型白酒中氰化物的检测分析,为精确定量白酒产品中氰化物含量、高效开展监督抽检工作、保障消费者健康提供重要可靠的技术支持。

参考文献

[1] MA J, DASGUPTA P K. Recent developments in cyanide detection; a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 673(2): 117-125.

[2] BOENING D W, CHEW C M. A critical review: general toxicity and environmental fate of three aqueous cyanide ions and associated ligands[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 1999, 109(1): 67-79.

[3] JACKSON R, LOGUE B A. A review of rapid and field-portable

analytical techniques for the diagnosis of cyanide exposure[J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 960(12): 18-39.

[4] 刘洋. 滴定法测定白酒中氰化物含量的方法研究[J]. *食品安全导刊*, 2019(21): 105.

[5] WU W L, XIAO Q W, ZHANG P, et al. Rapid measurement of free cyanide in liquor by ion chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Food Chem*, 2015, 172(9): 681-684.

[6] JIN G Y, ZHU Y, XU Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2017, 63(2): 18-28.

[7] 郭忠, 张文德. 食品中的氰化物来源及其安全性的研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(4): 404-408.

[8] JASZCZAK E, POLKOWSKA Ż, NARKOWICZ S, et al. Cyanides in the environment—analysis—problems and challenges [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(19): 15929-15948.

[9] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), SCHRENK D, BIGNAMI M, et al. Evaluation of the health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in foods other than raw apricot kernels[J]. *EFSA Journal*, 2019, 17(4): e05662.

[10] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 蒸馏酒及其配制酒; GB 2757—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[11] 陈慧玲, 张静, 毛丽莎. 试纸条快速检测法测定酒中氰化物的验证试验[J]. *职业与健康*, 2008, 24(15): 1526-1527.

[12] 刘丽, 王海雁, 冯鹏燕, 等. 流动注射—分光光度法测定水中氰化物和总氰化物[J]. *中国公共卫生管理*, 2018, 34(2): 219-222.

[13] 程根棋, 郑欣, 周陶鸿, 等. 异烟酸-巴比妥酸光谱法测定白酒中氰化物方法探讨[J]. *中国酿造*, 2019, 38(8): 183-186.

[14] 刘炜宁, 尹伊君, 付裕. 气相色谱法测定蒸馏酒中的氰化物[J]. *企业标准化*, 2008(13): 21.

[15] 吴晨, 夏俊鹏, 杨骅, 等. 气相色谱法快速测定食品中的氰化物[J]. *江苏预防医学*, 2019, 30(2): 222-223.

[16] 刘芯韵, 张坤, 易啸, 等. 离子色谱法测定蒸馏酒中氰化物含量的方法性能分析[J]. *食品与发酵科技*, 2017, 53(2): 94-95.

[17] 温维丽, 张红, 郭晶晶, 等. 离子色谱法测定水样中的氰化物[J]. *化学分析计量*, 2018, 27(S1): 54-56.

[18] YOUSO S L, ROCKWOOD G A, LEE J P, et al. Determination of cyanide exposure by gas chromatography-mass spectrometry analysis of cyanide-exposed plasma proteins [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 677(1): 24-28.

[19] 赵庆武, 刘志新, 高坤, 等. 离子选择电极法测定生活饮用水中氰化物方法的研究[J]. *医学动物防制*, 2018, 34(12): 1172-1174.

[20] BHASKAR R, SARVESWARI S. Colorimetric sensor for real-time detection of cyanide ion in water and food samples[J]. *Inorganic Chemistry Communications*, 2019, 102(2): 83-89.

[21] ERDEMIR S, MALKONDU S. On-site and low-cost detection of cyanide by simple colorimetric and fluorogenic sensors: smartphone and test strip applications [J]. *Talanta*, 2020, 207: 120278.

[22] RANDVIIR E P, BANKS C E. The latest developments in quantifying cyanide and hydrogen cyanide[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 64(8): 75-85.

[23] ISLAM M A, MAHBUB P, NESTERENKO P N, et al.

- Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems—a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1052(10): 10-26.
- [24] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 分析实验室用水规格和试验方法: GB/T 6682—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [25] 杨军. 影响白酒中氰化物检测加标回收率因素探究及方法优化[J]. *食品安全导刊*, 2019(23): 38.
- [26] BYRNE D. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results[J]. *Off J Eur Commun*, 2002, 8: 1-29.
- [27] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中氰化物的测定: GB 5009.36—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

实验技术与方法

同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定禽类食品中利巴韦林和金刚烷胺类化合物残留量

谢继安, 刘柏林, 赵紫微, 王秀莉

(安徽省疾病预防控制中心, 安徽 合肥 230601)

摘要:目的 建立同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法检测禽类食品中利巴韦林和金刚烷胺类化合物(金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺、3,5-二甲基金刚胺)的残留量。方法 样品经酶解, 三氯乙酸沉淀蛋白, 低温高速离心, 上清液调节 pH 值后经 PBA/PCX 复合固相萃取柱净化, Agilent ZORBAX SB-Aq 柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm)分析利巴韦林, Waters BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)分析金刚烷胺类化合物, 串联质谱测定, 同位素内标法定量。结果 利巴韦林在 1.0~100 ng/mL、金刚烷胺类化合物在 0.2~20 ng/mL 范围内呈良好的线性关系, 相关系数(*r*)均为 0.999。利巴韦林的检出限和定量限分别为 0.5 和 1.5 μg/kg; 金刚烷胺类化合物的检出限和定量限分别为 0.1 和 0.3 μg/kg。利巴韦林(1.5~15 μg/kg)和金刚烷胺类化合物(0.3~3.0 μg/kg)添加 3 个浓度的检测结果显示, 利巴韦林的回收率为 91.4%~103.7%, 金刚烷胺类化合物的回收率为 94.3%~108.2%, 相对标准偏差(*RSD*)均小于 10%。结论 本方法具有简便快捷、灵敏度高、定性准确等特点。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱; 利巴韦林; 金刚烷胺; 金刚烷甲胺; 金刚烷乙胺; 3,5-二甲基金刚胺; 禽类食品
中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)03-0261-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.03.008

Determination the residue of ribavirin and adamantanes in poultry food by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIE Ji'an, LIU Bolin, ZHAO Ziwei, WANG Xiuli

(Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Anhui Hefei 230601, China)

Abstract: Objective An isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the determination of ribavirin and adamantanes (amantadine, adamantanemethylamine, rimantadine, memantine) in poultry food. **Methods** After enzymatic hydrolysis and precipitated by trichloroacetic acid, the samples were centrifuged by high-speed centrifuge at low temperature, and purified by PBA/PCX composite solid-phase extraction cartridge. The separation of ribavirin was performed on UPLC system with Agilent ZORBAX SB-Aq (3.0 mm×100 mm, 1.8 μm), adamantanes with Waters BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) and determined by tandem mass spectrometry. The method was quantified by internal standard. **Results** The calibration curves showed a good linearity between the peak ratio and the concentrations of 1.0-100 ng/mL (ribavirin) and 0.2-20 ng/mL (adamantanes) with *r* = 0.999. The limit of detection of ribavirin was 0.5 and 0.1 μg/kg for adamantanes. The limit of quantification of ribavirin was 1.5 and 0.3 μg/kg for adamantanes. The mean recoveries of the ribavirin ranged from 91.4%-103.7% and ranged from 94.3%-108.2% for adamantanes spiked at three concentration levels (1.5-15 and 0.3-3.0 μg/kg), with the relative standard deviations (*RSD*) less than 10%. **Conclusion** This method was simple, high sensitivity and accuracy.