

# 罗丹明 B 酰肼柱前衍生—高效液相色谱—质谱 联用法测定蜂蜜中的苯甲醛残留量

Determination of benzaldehyde residues contents in honey by HPLC-MS using Rhodamine B hydrazide as the pre-column derivatization Reagent

彭雪 韩瑞 陈桢颖 王玥 朱贵萍 曹瑞芳

PENG Xue HAN Rui CHEN Li-ying WANG Yue ZHU Gui-ping CAO Rui-fang

钟婷婷 申光辉 罗擎英 张志清 黎杉珊

ZHONG Ting-ting SHEN Guang-hui LUO Qing-ying ZHANG Zhi-qing LI Shan-shan

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

**摘要:**合成了新型化学衍生试剂罗丹明 B 酰肼(RBH),并建立了 RBH 柱前衍生—高效液相色谱—质谱联用法。样品经甲醇提取后用 RBH 衍生化,采用液相色谱—质谱联用法进行测定。结果显示:试剂 RBH 具有很好的质谱检测灵敏度,对苯甲醛的衍生化反应高效、专一。苯甲醛在 0.05~6.00 ng/mL 时呈良好的线性关系,相关系数为 0.996 2,该方法检测限和定量限分别为  $0.80 \times 10^{-3}$ 、 $2.71 \times 10^{-3}$  ng/mL,加标回收率为 93.3%~104.0%,相对标准偏差为 0.8%~2.6%。该方法选择性好、灵敏度高、检测限低,可满足蜂蜜中苯甲醛残留的测定。

**关键词:**罗丹明 B 酰肼(RBH);柱前衍生;苯甲醛;高效液相色谱—质谱联用(HPLC-MS)

**Abstract:** A novel HPLC-MS method was established, using a synthesized rhodamine B hydrazide (RBH) as the new pre-column derivatization reagent. After extracted with methanol and derivatized with RBH, the samples were determined by high-performance liquid chromatography(HPLC) coupled with mass spectrometry(MS). The results showed that the reagent RBH has a good sensitivity for mass spectrometry detection, and the derivatization reaction of benzaldehyde was efficient and specific. The benzaldehyde showed a good linear relationship in the range of 0.05~6.00 ng/mL, and the corre-

lation coefficient was 0.996 2. The detection limits and quantitation limits of the method were  $0.80 \times 10^{-3}$  ng/mL and  $2.71 \times 10^{-3}$  ng/mL, respectively. The standard recovery rate was 93.3%~104.0%, and the relative standard deviation was 0.8%~2.6%. The method was high selectivity and high sensitivity, and suitable for the determination of benzaldehyde residues in honey.

**Keywords:** rhodamine B hydrazide (RBH); pre-column derivatization; benzaldehyde; high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS)

随着生活水平的提高,人们对蜂蜜的需求量迅速增长,对其食用品质要求也越来越高<sup>[1]</sup>。蜂蜜的质量标准由 Codex Alimentarius 标准(CODEX Stan 12, 2001)和欧盟蜂蜜指令(Council Directive, 2001)定义,该标准规定蜂蜜中不应添加任何成分<sup>[2]</sup>。然而,目前市售的蜂蜜中常会存在天然苯甲醛的残留。苯甲醛具有苦杏仁特殊气味,存在于无花果、杏仁等天然植物中,同时也可人工合成,被作为食品添加剂广泛用于食品工业中<sup>[3]</sup>。由于其对眼和上呼吸道黏膜有刺激作用,对神经有麻醉作用,能引起过敏性皮炎<sup>[4]</sup>,因此建立蜂蜜中残留苯甲醛的检测方法,具有十分重要的意义。对于蜂蜜中苯甲醛的检测已有文献报道,如:超声辅助萃取和电子气相色谱捕获检测(GC-ECD)、固相微萃取与气相色谱—质谱联用测定光谱测定(SPME-GC/MS)等<sup>[5]</sup>。这些方法虽准确、可靠,但灵敏度尚有不足。近年来,化学衍生化—高效液相色谱—质谱检测技术(HPLC-MS)被广泛关注,该方法以化学衍生试剂对分析物进行衍生化,并采用 HPLC-MS 检测,是一种具有高灵敏度的分离检测技术,具有选择性

**基金项目:**四川省应用基础研究项目(编号:2018JY0275);四川省教育厅 2018 年度科研项目(编号:18ZB0458)

**作者简介:**彭雪,女,四川农业大学在读硕士研究生。

**通信作者:**黎杉珊(1986—),女,四川农业大学副教授,博士。

E-mail:lishanshan.812@163.com

**收稿日期:**2018-08-09

好,分析速度快,定性能力强<sup>[6]</sup>等特点,在痕量分析中有显著优势,该技术为发展高灵敏的苯甲醛检测分析方法提供了可能。

罗丹明类化合物是一种氧杂蒽类荧光染料<sup>[7]</sup>,其基本骨架主要由带有 3,6 位取代氨基的氧杂蒽母体(简称母环)和 9 位碳原子所连接的芳环(简称底环)两个片段组成。罗丹明类物质具有优异的理化性能,是制备 HPLC-MS 化学衍生试剂的一种理想材料:一方面,疏水性强,可有效改善分析物的反相 HPLC 的分离效果;另一方面,摩尔消光系数高、光稳定性好<sup>[8-10]</sup>,易雾化,易质子化<sup>[11]</sup>,有利于提高分析物分子离子化效率,能同时放大色谱和质谱响应信号;此外,罗丹明 B 分子结构中含有一个季铵型的正电荷,其衍生产物呈现正离子状态,从而提高信噪比和分析灵敏度<sup>[12]</sup>。目前,吕涛<sup>[13]</sup>曾合成了 4'-羧基罗丹明,并应用于人参二醇的质谱增敏研究,但对醛酮类物质的质谱增敏研究还没有相关报道。本试验拟研究一种新型化学衍生试剂罗丹明 B 酰肼(Rhodamine B hydrazide, RBH),并建立 RBH 柱前衍生—高效液相色谱—质谱联用法,以实现蜂蜜中残留苯甲醛含量的高灵敏检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

罗丹明 B(96%)(RB):分析纯,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;

水合肼(98%)、苯甲醛(98%):分析纯,北京百灵威科技有限公司;

无水乙醇:色谱纯,成都市科隆化学品有限公司;

甲醇:色谱纯,成都凌微科技有限公司;

甲酸:优级色谱纯,西格玛奥德里奇有限公司;

洋槐蜂蜜:购自雅安市红旗超市;

高效液相色谱仪:Agilent 1260 型,安捷伦科技有限公司;

质谱仪:Agilent 6120 型,安捷伦科技有限公司;

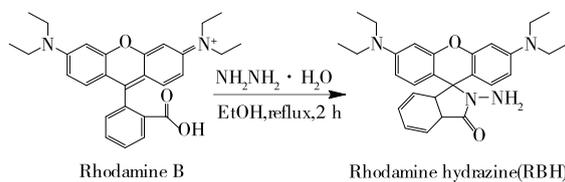
反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm):Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>型,安捷伦科技有限公司;

核磁共振波谱仪:Bruker AVIII 600 MHz 型,布鲁克科技有限公司;

傅里叶变换红外光谱仪:Thermo Scientific NicoletIS10 型,赛默飞世尔科技有限公司。

### 1.2 RBH 的合成及表征

1.2.1 RBH 的合成 合成路线如图 1 所示。称取 0.48 g 罗丹明 B 溶于 12 mL 无水乙醇,逐滴加入 85%水合肼 1.2 mL,剧烈搅拌回流 2 h,反应液由深紫色变为澄清的淡桔色。反应液冷却,减压抽除溶剂。向所得的固体中加入 1 mol/L HCl 溶液 20 mL,得澄清红色溶液。再在搅拌条件下向溶液中慢慢滴加约 1 mol/L NaOH 溶液 28 mL 至溶液 pH 9~10,将所得沉淀用 6 mL 超纯水洗涤 3 次,干燥,蒸除溶剂,得到粉色固体产物 RBH 0.45 g<sup>[14]</sup>。产率为 93.8%。



Rhodamine B

Rhodamine hydrazide(RBH)

图 1 罗丹明 B 酰肼(RBH)的合成路线

Figure 1 Synthetic route of Rhodamine B hydrazide (RBH)

1.2.2 核磁共振氢谱表征(<sup>1</sup>H-NMR) 以氘代乙腈为溶剂测定 RBH 的<sup>1</sup>H-NMR, NMR 谱仪质子共振频率为 600.13 MHz, TMS 为内标, 试验温度为 298 K。

1.2.3 傅里叶红外光谱(FTIR)表征 用压片法测定。以 KBr 为背景, 压力为 15 kPa, 仪器分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>, 扫描次数为 32 次<sup>[15]</sup>。

### 1.3 样品前处理

称取 10 g 洋槐蜂蜜样品(精确到 0.1 g)置于 100 mL 三角瓶中,加入 10 mL 甲醇,在液体混匀器上高速混合并放置 30 min 以上。转入 50 mL 容量瓶中,用水洗涤三角瓶,并入容量瓶中,再用超纯水稀释至刻度,混合均匀后为样品提取溶液<sup>[16]</sup>。

### 1.4 标准溶液的配制

称取 10.6 g 苯甲醛标准品置于 100 mL 容量瓶中,用无水乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,制得浓度为 1.0 mg/mL 的储备液,于低温避光处存放。根据试验需要,用无水乙醇将标准储备液配制成不同浓度的标准工作溶液,现配现用。

### 1.5 苯甲醛的衍生化

称取一定量 RBH 溶于无水乙醇,制得浓度为 0.156 mol/L 的衍生化试剂。将 25 mL 衍生化试剂于磁力加热搅拌下逐滴加入至 0.4 mL 苯甲醛标准溶液或样品溶液中,10 min 滴完,于 50 °C 水浴反应 1 h<sup>[17]</sup>,反应液用 0.22 μm 滤膜过滤,供 HPLC-MS 分析。

### 1.6 高效液相色谱—质谱联用条件

1.6.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为甲醇+0.1% HCOOH;流动相 B 为 H<sub>2</sub>O+0.1% HCOOH;梯度洗脱 0~6 min, 70%~95% A, 6~12 min, 95% A;进样量 5 μL;流速 1 mL/min;柱温 35 °C;DAD 检测波长 560 nm。

1.6.2 质谱条件 扫描方式:电喷雾离子源(ESI)正离子扫描;检测模式:SIM 扫描;雾化气体: N<sub>2</sub>;干燥气流速: 12.0 L/min;雾化器压力: 275.8 kPa;干燥气温度: 350 °C。以分子离子和碎片离子荷质比定性,质谱峰面积外标法定量。

### 1.7 数据处理

采用 Excel 2003 软件对试验数据进行统计,并应用 Origin 8.5 软件对数据进行作图分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RBH 的结构表征

利用<sup>1</sup>H-NMR 对合成的 RBH 进行结构研究并与 RB 对比,表 1 列出了 RBH 和 RB 在 CD<sub>3</sub>CN 中的质子化学位移

( $\delta$ H)及其位置归属。由表 1 可见, RBH 与 RB 分子上各质子的  $\delta$ H 值及峰裂分情况有明显差异, 与 RB 相比, RBH 在 0.003 8‰ 处多出现一个 2H 的宽单峰, 可归属于酰肼基团中的  $-\text{NH}_2$ , 这一特征值可表明 RB 底环上的羧基已转化为酰肼基团, RBH 合成成功。

表 1 RBH、RB 的核磁共振氢谱<sup>1</sup>H-NMR

Table 1 Nuclear magnetic resonance spectroscopy

<sup>1</sup>H-NMR of RBH, RB

质子位置	RBH			RB		
	$\delta/\text{‰}$	质子数	峰裂分	$\delta/\text{‰}$	质子数	峰裂分
24	0.003 80	2H	bs	—	—	—
22	0.001 12	12H	t	0.001 25	12H	t
21	0.003 36	8H	q	0.003 61	8H	q
18	0.007 79	1H	m	0.008 30	1H	d
16,17	0.007 42	2H	m	0.007 78	2H	m
15	0.006 99	1H	m	0.007 34	1H	d
1,8	0.006 40	2H	d	0.007 09	2H	d
4,5	0.006 39	2H	d	0.006 84	2H	d
2,7	0.006 35	2H	dd	0.006 93	2H	d

此外, 对 RBH 还进行了 FTIR 表征。如图 2 所示, 3 437.69  $\text{cm}^{-1}$  处的峰为  $-\text{NH}_2$  的伸缩振动吸收峰; 2 973.55, 2 931.90  $\text{cm}^{-1}$  处的峰可归属于母环顶端与氮原子相连的  $-\text{CH}_3$  的伸缩振动; 邻近的一个双峰则归属于  $-\text{CH}_2-$  基团; 1 697.86  $\text{cm}^{-1}$  处为酰胺上羰基  $\text{C}=\text{O}$  的吸收峰; 1 634.53, 1 615.63, 1 515.08  $\text{cm}^{-1}$  的峰为苯环  $\text{C}=\text{C}$  键的特征吸收峰; 1 375.61  $\text{cm}^{-1}$  的峰为顶端  $-\text{CH}_3$  的弯曲振动吸收峰; 1 220.05  $\text{cm}^{-1}$  的峰归属于顶端叔胺取代基; 1 119.05  $\text{cm}^{-1}$  处的峰归属于  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ ; 819.50, 789.75, 700.50  $\text{cm}^{-1}$  处的峰为取代苯  $\text{C}-\text{H}$  变形振动的吸收峰。以上数据进一步证实了 RBH 合成成功。

## 2.2 RBH 对苯甲醛的衍生化

RBH 对苯甲醛的衍生化反应如图 3 所示。酰肼类化合物可与含有羰基的醛类或酮类化合物发生亲核加成反应生成酰腙类化合物<sup>[18]</sup>, 由于肼类化合物其结构本身具有大的共轭结构, 使得生成的腙类化合物相对更加稳定。该反应灵

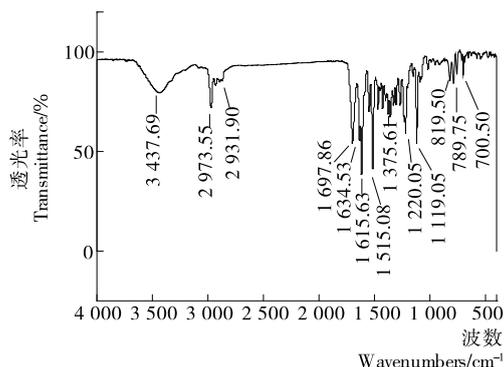


图 2 RBH 的傅里叶变换红外光谱图

Figure 2 Fourier transform infrared spectrum of RBH

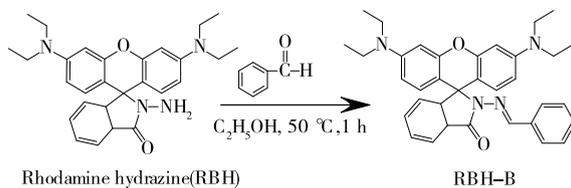


图 3 RBH 对苯甲醛的衍生化

Figure 3 Derivatization of RBH and benzaldehyde

敏且具有高度的选择性, 被广泛地应用于醛酮类物质的标记<sup>[19]</sup>。因此, RBH 可以作为化学衍生试剂用于苯甲醛的衍生化, 进而进行 HPLC-MS 检测。

2.2.1 RBH-B 的鉴定 对 RBH 及其与苯甲醛 (RBH 与苯甲醛的摩尔比为 1 : 1) 反应后的溶液进行 HPLC-MS 分析。图 4 是 RBH 的 HPLC 及 MS 谱图。HPLC 图中, 12.50 min 处的峰是 RBH 的峰; MS 谱图中,  $m/z=457.3$  的峰为 RBH 的  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰,  $m/z=229.3$  的峰为 RBH 的  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$  峰, 进一步证实 RBH 结构正确, 合成成功。图 5 是 RBH-B 的 HPLC 及 MS 谱图。HPLC 图中, 在 9.12 min 处出现一个新峰, 而 12.50 min 处 RBH 的峰基本消失, 证实衍生化反应中 RB 反应完全, 有新物质生成, 且反应转化率高, 选择性好, 无副产物。通过 MS 谱图对 9.12 min 处的峰进行分析, 其中  $m/z=545.3$  的峰可归属为 RBH-B 的  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰,  $m/z=273.3$  为 RBH-B 的  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$  峰, 由此可判断 RBH 对苯甲醛衍生化反应是成功的。

## 2.2.2 衍生条件的优化

(1) 衍生溶剂: 分别采用乙腈和无水乙醇为溶剂进行衍生化, 以无水乙醇为反应溶剂时, 反应充分且效率高。因此, 选择无水乙醇为反应溶剂。

(2) 衍生温度: 分别在常温和 50 °C 水浴加热条件下使 RBH 和苯甲醛完全反应, 试验表明, 在 50 °C 水浴加热条件

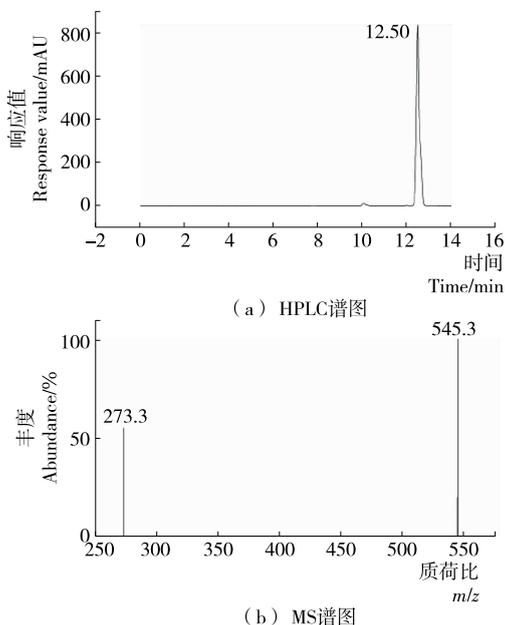


图 4 RBH 的 HPLC 及 MS 谱图

Figure 4 HPLC and MS spectra of RBH

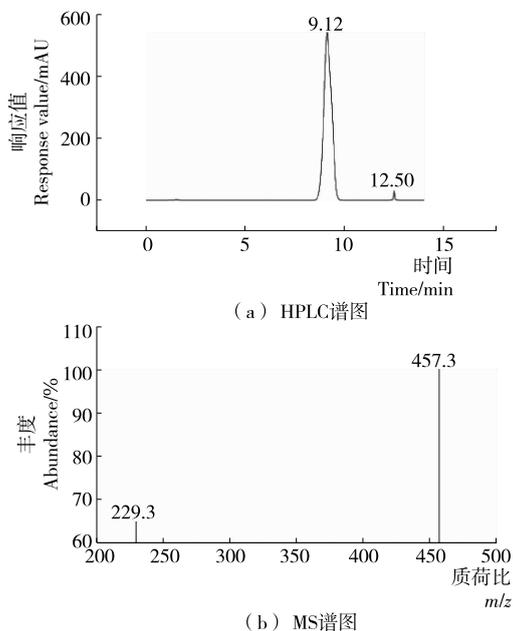


图5 RBH-B的HPLC及MS谱图

Figure 5 HPLC and MS spectra of RBH-B

下,其反应时间短,转化率高。

(3) 衍生时间:在8 h内研究了反应时间对衍生效率的影响。结果表明,反应1 h时反应效率最大且稳定,1 h后反应效率随着时间的延长逐渐变低。因此,反应时间选定为1 h。

结果表明,在最优条件下,分别测定RBH和RBH-B的色谱峰面积 $A_{RBH}$ 和 $A_{RBH-B}$ ,由 $A_{RBH-B}/(A_{RBH} + A_{RBH-B})$ 计算可得衍生化反应的转化率为95.2%。

2.2.3 质谱条件的优化 将配制的浓度为0.1 ng/mL的苯甲醛标准溶液,与RBH衍生化后,进入质谱系统进行质谱参数优化。由于化合物RBH-B含有杂环原子,在正离子模式下易得到 $H^+$ 形成准分子离子峰 $[M+H]^+$ 。因此,本试验选用正离子模式。首先采用全扫描模式选择母离子,再采用SIM扫描模式找出响应较高的两个碎片离子峰,对碰撞诱导

解离等条件进行优化(表2),最后选定定性离子和定量离子。

### 2.3 方法线性范围、检出限和定量限

本试验采用线性回归分析,以浓度为横坐标、定量离子峰面积为纵坐标进行计算。采用加标回收法测定检出限(LOD)和定量限(LOQ),分别根据最低测定浓度的信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 确定。结果表明,本方法在0.05~6.00 ng/mL浓度范围内呈良好的线性关系,线性方程为 $Y=7\,416.1X+5.03\times 10^5$ ,相关系数为0.996 2,LOD和LOQ分别为 $0.80\times 10^{-3}$ 、 $2.71\times 10^{-3}$  ng/mL。与已报道的方法以及GB/T 18932.14—2003中高效液相色谱荧光法(表3)相比较,本方法的LOD和LOQ明显更低,该方法在灵敏度方面具有显著优势。因此,RBH柱前衍生结合HPLC-MS法可用于苯甲醛高灵敏的定量检测。此外,RBH还可用于其他醛酮类物质的分析检测,对于高灵敏分析方法的开发具有一定的理论及实践价值。

### 2.4 样品加标回收率与精密度

加标回收试验是对空白样品进行3个不同浓度的添加并测定,添加浓度分别为0.1、1.0、3.0 ng/mL,每个添加浓度平行测定3次。方法精密度以3次平行结果的相对标准偏差(RSD)进行分析评估。测得回收率为93.3%~104.0%,RSD为0.8%~2.6%,如表4所示。说明该方法的准确性和精密度较好。采用本方法测得洋槐蜂蜜中的苯甲醛含量为0.7 ng/mL,蜂蜜样品和加标蜂蜜样品的SIM扫描谱图如图6所示。

表2 RBH-B的质谱采集参数<sup>†</sup>

Table 2 Mass spectrometry acquisition parameters for RBH-B

母离子 ( $m/z$ )	子离子 ( $m/z$ )	碰撞诱导解离 能量/V	驻留时间/ ms	相对驻留 时间/%
544.30	273.30	70	290	100.0
	545.30*			

† \* 定量离子。

表3 检测苯甲醛不同方法的线性范围、LOD和LOQ

Table 3 Linear range, LOD and LOQ for different methods of detecting benzaldehyde ng/mL

方法	线性范围	LOD	LOQ
顶空—固相微萃取—气相色谱法 <sup>[20]</sup>	$10.00\sim 5.00\times 10^2$	1.0	无
气相色谱法 <sup>[21]</sup>	$1.00\times 10^3\sim 7.00\times 10^5$	0.7	2.30
高效液相色谱法 <sup>[22]</sup>	$5.47\times 10^2\sim 5.47\times 10^4$	1.0	无
分散液液微萃取法 <sup>[23]</sup>	$1.00\sim 1.00\times 10^3$	0.2	无
极谱法 <sup>[24]</sup>	$3.00\times 10^{-2}\sim 50.00$	10.0	30.00
毛细管气相色谱法 <sup>[25]</sup>	$5.00\times 10^2\sim 1.00\times 10^5$	$1.0\times 10^5$	$4.00\times 10^5$
顶空—固相微萃取—气相色谱—氢离子火焰检测法 <sup>[26]</sup>	$25.00\sim 1.00\times 10^3$	10.0	25.00
高效液相色谱—荧光检测方法(GB/T 18932.14—2003)	$60.00\sim 5.00\times 10^2$	12.0	无
RBH柱前衍生—高效液相色谱—质谱联用法(本试验)	$5.00\times 10^{-2}\sim 6.00$	$8.0\times 10^{-4}$	$2.71\times 10^{-3}$

表 4 LC-MS 法测定蜂蜜样品中的加标回收率和相对标准偏差

Table 4 Recovery and relative standard deviations (RSD) of honey samples in LC-MS ( $n=3$ )

添加量/(ng · mL <sup>-1</sup> )	回收率/%	RSD/%
0.1	100.0	0.8
1.0	104.0	1.5
3.0	93.3	2.6

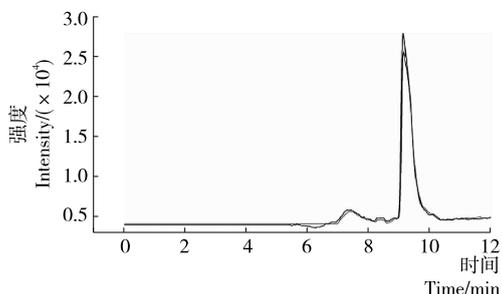


图 6 空白样品和加标样品(3 ng/mL)中苯甲醛的 SIM 扫描图

Figure 6 SIM scan of benzaldehyde in sample and spiked sample(3 ng/mL)

### 3 结论

本研究以 RB 为母体,设计合成了新型酰肼类化学衍生试剂 RBH。基于 RBH 与醛酮类物质反应灵敏、快速、选择性好的特点,及 HPLC-MS 技术分析范围广、灵敏度高的优点,建立了 RBH 柱前衍生 HPLC-MS 联用法对蜂蜜中的苯甲醛残留进行检测分析。结果表明,与已报道的其他方法相比,该方法具有选择性好、灵敏度高、衍生化时间短、检测限低等优点,可为醛酮类物质的检测分析提供有利、可靠的方法,并对开发超灵敏 LC-MS 新方法具有重要意义。但本试验没有对多个醛酮类物质同时检测,今后可以进一步对其他醛酮类物质衍生化,并采用多反应监测模式进行 HPLC-MS 测定。

#### 参考文献

[1] 任佳森, 彭文君, 田文礼, 等. 加工工艺对蜂蜜挥发性成分的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 41-45.

[2] JUAN-BORRÁS M, EVA D, ANDREA C, et al. Physicochemical quality parameters at the reception of the honey packaging process: influence of type of honey, year of harvest, and beekeeper[J]. Journal of Chemistry, 2015(2 015): 1-6.

[3] 彭渤. 胶束催化肉桂油水解制备苯甲醛[J]. 精细化工, 2007, 24(3): 261-264.

[4] 徐兰琴, 余林, 陶涛, 等. 高效液相色谱法测定生物燃料烟中丙酮和苯甲醛的含量[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(3): 200-202.

[5] ZHOU Jin-hui, XUE Xiao-feng, LI Yi, et al. Rapid and sensitive determination of two degradation products of flumethrin in honey by ultrasonically assisted extraction and gas chromatography with electron capture detection[J]. Journal of Separation Science, 2015, 30(12): 1 912-1 919.

[6] 米建萍, 徐远金, 朱平川, 等. 液质联用技术在滥用食品添加剂及食品中违法添加物测定中的应用及研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(7): 1 579-1 586.

[7] 黎俊波, 胡启辉, 曾阳, 等. 基于罗丹明染料的金属阳离子荧光探针[J]. 化学进展, 2012, 24(5): 823-833.

[8] 王炯, 张丽珠, 杨清镜, 等. 罗丹明染料的合成及光谱性能研究[J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2011, 20(3): 213-216.

[9] LI Kai, XIANG Yu, WANG Xiao-yan, et al. Reversible photochromic system based on rhodamine B salicylaldehyde hydrazone metal complex[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(4): 1 643-1 649.

[10] 刘海兴, 刘清, 郁延富. 基于罗丹明类荧光探针的研究进展[J]. 现代化工, 2017(4): 197-204.

[11] WATARAI H, FUNAKI F. Total internal reflection fluorescence measurements of protonation equilibria of rhodamine B and octadecylrhodamine B at a toluene/water interface [J]. Langmuir, 2011, 12(26): 6 717-6 720.

[12] ZHANG Yang, WANG Ji-lin, WANG Lu-lu, et al. Study on QPVA/TEOS hybrid anion membrane functionalized with quaternary ammonium groups for adsorption of Rhodamine B from aqueous solutions[J]. Journal of the Iranian Chemical Society, 2016, 14(1): 1-10.

[13] 吕涛. 罗丹明类新型衍生试剂合成及微萃取联用 LC-MS 分析方法建立与应用[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2015: 47-54.

[14] DONG Ming, MA Tian-hua, ZHANG Ai-jiang, et al. A series of highly sensitive and selective fluorescent and colorimetric "off-on" chemosensors for Cu (II) based on rhodamine derivatives[J]. Dyes & Pigments, 2010, 87(2): 164-172.

[15] 冯泳兰, 蒋伍玖, 邝代治, 等. 3,5-二溴水杨醛罗丹明 B 酰肼的合成及其在汞(II)检测中的应用[J]. 冶金分析, 2016(9): 52-56.

[16] 全国文献工作标准化委员会. GB/T 18932.14—2003 蜂蜜中苯甲醛残留量的测定方法 液相色谱-荧光检测法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 2-5.

[17] 毋尧, 崔身强, 赵明雷, 等. 罗丹明类测定三聚氰胺的荧光探针的合成及应用研究[J]. 分析试验室, 2010, 29(10): 29-32.

[18] 赵新璐. 酰肼希夫碱及其钕配合物的合成、结构及其催化苯乙烯氧化研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2016: 1-5.

[19] 龚淑果, 梁勇, 樊华, 等. 一种检测醛酮类化合物的方法: 中国, CN106645469A[P]. 2017-05-10.

[20] 王建刚, 张莉. 顶空固相微萃取-气相色谱法测定植物蛋白饮料中的苯甲醛[J]. 理化检验: 化学分册, 2015, 51(4): 493-495.

[21] 张丽娜. 气相色谱法同时测定复方庚酸炔诺酮注射液中的苯甲醇和苯甲醛[J]. 科学与财富, 2016, 8(5): 218-218.

[22] WU Chun-min, ZHU Jing-ying, CHI Wen-jie, et al. HPLC rapid screening and simultaneous determination of eight bacteriostatic agents and benzaldehyde in oxymatrine injection[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2012, 32(3): 451-454.

[23] MASHAYEKHI H A, REZAEE M, GARMAROUDI S S, et al. Rapid and sensitive determination of benzaldehyde arising from benzyl alcohol used as preservative in an injectable formulation solution using dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography[J]. Analytical Sciences, 2011, 27(8): 865-868.

场),采样时间为 2014~2015 年,按照季节统计均有检出,结果见表 2。

表 2 930 个生乳样品中硫氰酸盐含量的季节分布

Table 2 The content of thiocyanate in 930 milk samples during different seasons

季节	硫氰酸盐含量/ (mg·L <sup>-1</sup> )	样品数量	比例/%
春季	2.76~11.21	243	14.7
夏季	3.53~11.92	241	58.6
秋季	1.86~10.35	249	18.6
冬季	2.35~9.78	197	8.1
总量	—	930	100.0

由表 2 可知,春季和夏季生乳中硫氰酸盐含量偏高,可达到 11 mg/L 以上;秋季和冬季略低,硫氰酸盐含量在 10.5 mg/L 以下。但是,四季均有检出,生乳中硫氰酸盐含量的季节分布不存在显著差异。

研究<sup>[14]</sup>表明,硫氰酸盐也存在于植物源的饲料中,植物饲料中的硫配糖体或产氰配糖体在牛体内经过代谢能够转化成硫氰酸盐,比如芸苔属植物中硫配糖体含量在 100 mg/kg,而在生青豆中硫氰酸盐含量为 100~3 100 mg/kg,生薯类块茎为 10~462 mg/kg,生薯类叶子为 68~468 mg/kg,干薯类根皮为 2 450 mg/kg,竹笋尖为 8 000 mg/kg,核果和高粱为 2 500 mg/kg。营养丰富的青贮饲料中硫氰酸盐和硝酸盐含量高一些。因此饲料种类极可能是生乳中硫氰酸盐含量的关键影响因素。

环境污染也是生乳中硫氰酸盐的来源,日益严重的环境污染,导致硫氰酸盐及其前体渗透到土壤、水体中,土壤、水体中的硫氰酸盐及其前体通过饲草种植、饲料生产、奶牛饮水等途径转移到奶牛体内,通过代谢和泌乳的形式进入到生乳中。另外,中国目前的奶牛养殖对饲料草料、奶牛养殖环境的硫氰酸盐含量没有足够关注,也是生乳中硫氰酸盐来源的不可忽视的因素。

### 3 结论

2008 年国家明令禁止在生乳中使用硫氰酸盐,但通过对 21 个养牛小区(牧场)的 930 个生乳样品进行的硫氰酸盐含量的跟踪测试发现,生乳中的硫氰酸盐全部来源于本底,不存在人为添加。为了避免不法分子在生乳中人为添加硫氰酸盐延长生乳保存期,建议乳制品生产企业在收购生乳时加强生乳中硫氰酸盐的检测和摸底工作,有助于提高产品质量,维护食品安全和消费者健康;也能够为国家制定乳及乳制品中硫氰酸盐限量值标准提供数据支持。

本研究仅限于河北省的 21 个养牛小区(牧场),不足以代表整个河北省的全部养殖情况,另外需要进行全国性的连续跟踪监测,为生乳中硫氰酸盐的限量要求提供科学依据。为降低生乳中硫氰酸盐含量,建议饲料生产企业、奶牛养殖

企业加强饲草料、奶牛饲养环境中硫氰酸盐及其前体含量的监测和控制,提高全民族食品安全水平。

### 参考文献

- [1] 荫硕炎,贺巍巍,赵凯,等. 乳品中硫氰酸盐的食品安全对策[J]. 卫生研究, 2013(3): 529-531.
- [2] 周正香. 气相色谱-质谱法测定乳制品中的硫氰酸根[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 153-156.
- [3] 李红敏,陈霞,王静,等. 离子色谱法测定乳及乳制品中硫氰酸根含量[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(7): 78-81.
- [4] 苏晶,姜英杰,徐绍成. 固相萃取-顶空气相色谱法测定乳粉中硫氰酸盐含量[J]. 中国科技信息, 2013(9): 52-55.
- [5] 沈志武,靳艺,石飞云. 高效液相色谱法同时测定牛乳及乳粉中硝酸盐、亚硝酸盐和硫氰酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15): 3 035-3 037.
- [6] 邵丽,王晓,滕振勇. 高效液相色谱法测定牛奶中硫氰酸钠含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1 444-1 447.
- [7] 陈惠珠,宣栋梁,潘璐,等. 乳与乳制品中硫氰酸盐含量的分光光度法测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(8): 1 774-1 776.
- [8] 许东海. 市售乳制品中硫氰酸盐检测结果分析[J]. 职业卫生与病伤, 2012, 27(2): 105-108.
- [9] 高淑琴,刘玉欣,卢振敏,等. 2013 年河北省 159 份生乳中硫氰酸盐含量分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(5): 568-571.
- [10] 卢超,秦丹. 湖南省市售国产乳制品中硫氰酸盐检测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(12): 5 083-5 087.
- [11] 王舟,潘柳波,丘红梅,等. 深圳市售乳制品中硫氰酸盐检测结果分析与评估[J]. 中国热带医学, 2015, 15(6): 704-707.
- [12] 周亮,陈贤柏,王一红,等. 离子色谱法测定湖南省市售液态乳中硫氰酸盐的含量[J]. 实用预防医学, 2015, 22(11): 1 326-1 328.
- [13] 喻东威,李梅. 应用于牛乳的天然抑菌剂[J]. 中国乳业, 2010(1): 47-49.
- [14] 吴剑平,张鑫,顾欣,等. 饲喂十字花科类植物对生鲜牛乳中硫氰酸钠含量的影响研究[J]. 中国兽药杂志, 2012(10): 16-19.

(上接第 42 页)

- [24] KAZEMIFARD A G, MOORE D E, MOHAMMADI A. Polarographic determination of benzaldehyde in benzyl alcohol and sodium diclofenac injection formulations[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2002, 30(2): 257-262.
- [25] KAZEMIFARD A G, MOORE D E, MOHAMMADI A, et al. Capillary gas chromatography determination of benzaldehyde arising from benzyl alcohol used as preservative in injectable formulations [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2003, 31(4): 685-691.
- [26] MASOUMI V, MOHAMMADI A, KHOSHAYAND M R, et al. Application of polyaniline-multiwalled carbon nanotubes composite fiber for determination of benzaldehyde in injectable pharmaceutical formulations by solid-phase microextraction GC-FID using experimental design[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2017, 72(3): 264-271.