一种新型固相萃取柱结合超高效液相色谱-串联质谱法 选择性富集测定猪肉中的盐酸克伦特罗

孟文瑛¹, 郭志谋², 沈伟健³, 沈崇钰³, 吴 斌³,
刘艳明⁴, 章飞芳^{1*}, 梁鑫淼^{1,2}

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237 ; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连
116023 ; 3. 江苏出入境检验检疫局食品实验室, 江苏 南京 210001 ;
4. 山东省产品质量监督检验研究院, 山东 济南 250103)

摘要 :发展了一种测定猪肉中盐酸克伦特罗残留的简便、高效、准确的固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱(SPE-UPLC-MS/MS)的方法。将搅碎的猪肉样品用 5% (v/v)高氯酸超声提取 ,再以 10 000 r/min 离心 15 min 后 ,上清液用 SMCX 固相萃取柱进行富集和净化。因 SMCX 是以硅胶为基质兼有反相/强阳离子交换的混合作用模式 ,因此可以有效地去除复杂基质干扰 ,达到目标样品的选择性富集和净化的目的。方法学结果表明 ,该方法在 0.25 ~ 50 $\mu\text{g/kg}$ 范围内具有良好的线性关系 ,相关系数 r 为 0.998 2 ; 3 个添加水平(1.25、12.5、50 $\mu\text{g/kg}$)的平均回收率为 62.2% ~ 72.0% ,相对标准偏差(RSDs)为 4.2% ~ 6.1% ,检出限($S/N=3$)为 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 。所发展的样品前处理和检测方法简单、快速 ,可用于瘦肉精类成分的选择性富集和分离检测。

关键词 :固相萃取 ;超高效液相色谱-串联质谱 ;SMCX 柱 ;盐酸克伦特罗 ;猪肉

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2012)02-0141-05

A novel solid phase extraction column combined with ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for selective enrichment and determination of clenbuterol in pork

MENG Wenying¹, GUO Zhimou², SHEN Weijian³, SHEN Chongyu³, WU Bin³,
LIU Yanming⁴, ZHANG Feifang^{1*}, LIANG Xinmiao^{1,2}

(1. School of Pharmacy , East China University of Science and Technology , Shanghai 200237 , China ;
2. Dalian Institute of Chemical Physics , Chinese Academy of Sciences , Dalian 116023 , China ;
3. Food Laboratory , Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Nanjing 210001 , China ;
4. Shandong Supervision and Inspection Institute of Product Quality , Jinan 250103 , China)

Abstract : A simple and efficient method based on a novel solid phase extraction (SPE) cartridge and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed for the determination of clenbuterol residue in pork. The minced pork sample was ultrasonically extracted by 5% (v/v) perchloric acid and centrifuged at 10 000 r/min for 15 min , then the supernatant was purified by an SMCX cartridge , which is a novel SPE column based on homemade silica matrix with two mixed modes of reversed-phase and strong cation exchange , for the selective enrichment and purification of the analyte. The linear range of the method was 0.25 – 50 $\mu\text{g/kg}$ with a correlation coefficient of 0.998 2. The average recoveries ranged from 62.2% to 72.0% at the three spiked levels of 1.25 , 12.5 and 50 $\mu\text{g/kg}$ with the relative standard deviations (RSDs) between 4.2% and 6.1%. The limit of detection ($S/N=3$) was 0.05 $\mu\text{g/kg}$. The method is simple , fast and can be extended to enrich and determine β -

* 通讯联系人 :章飞芳 ,博士 ,副教授 ,主要研究方向为食品安全分析。E-mail : zhangff@ecust.edu.cn.

基金项目 :国家科技支撑计划项目(No. 2009BADB9B02)、国家自然科学基金项目(No. 21177040)和上海市科委重点基础研究项目(No. 09JC1403900).

收稿日期 2011-09-29

agonist drugs.

Key words : solid phase extraction (SPE); ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); SMCX cartridge ; clenbuterol ; pork

盐酸克伦特罗(clenbuterol)是 β -受体激动剂(β -agonist)类药物,因能够促进蛋白质的合成,提高猪瘦肉比率^[1-3],故被作为饲料添加剂,俗称瘦肉精。盐酸克伦特罗的化学性质稳定,化学结构式见图 1,其极易随食物进入人体,除对心脏有刺激作用外,长期食用还会导致染色体畸变,诱发恶性肿瘤,甚至致人死亡^[4,5]。自出现了多起瘦肉精中毒事件后,已经禁止在饲料中添加盐酸克伦特罗。但瘦肉精滥用事件还是屡见不鲜,因此发展一种简便、高效的用于测定肉类中盐酸克伦特罗的方法具有重要的实际价值。

图 1 盐酸克伦特罗的结构式

Fig. 1 Chemical structure of clenbuterol

相对于血液和尿液等生物样品,猪肉样品因其基质极其复杂,需采取有效的样品前处理方法。文献报道的用于以瘦肉精为目标成分的样品前处理包括 C_{18} ^[3,6]、HLB^[7,8]、SCX^[2,6,9]、MCX^[10-13]、PCX^[14,15]等多种作用模式的 SPE 柱。 C_{18} 固相萃取柱主要吸附疏水性目标物质,但易对脂溶性杂质形成部分死吸附,导致目标物质与固定相作用位点减少,且易干涸不浸润,从而使目标成分丧失保留作用。HLB 的填料是亲水性和亲油性单体的共聚物,具有高比表面积、强吸附性,也属于反相吸附机理,能够克服传统 C_{18} 填料的缺点。SCX 和 MCX 则是在硅胶上键合了磺酸基离子交换基团,能与瘦肉精的仲胺基团作用,通过调节洗脱液 pH 的方法洗脱目标物,从而起到富集净化的作用。PCX 是以聚苯乙烯/二乙烯苯为基质的阳离子交换和反相机理混合的萃取柱,具有反相吸附作用和类似于 SCX、MCX 的键合磺酸基的离子交换作用的双重保留模式。本文应用一种具有反相/强阳离子交换的混合作用模式的新型 SPE 柱(SMCX),其填料是在硅胶基质上同时引入 C_{18} 疏水长链和苯磺酸离子交换基团,实现对盐酸克伦特罗的高效、快速的选择性净化处理。

目前用于检测克伦特罗的方法有电化学法^[16]、

酶联免疫法(ELISA)^[17,18]、高效液相色谱法(HPLC)^[19,20]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[8,9,21]、超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)^[11,15,18]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[12,22,23]等。酶联免疫法检测瘦肉精便捷快速,但易出现假阳性;HPLC 灵敏度相对较低,易受基底杂质的干扰,不能满足痕量检测的要求;而 GC-MS 则要求进样前进行样品衍生化,步骤相对复杂。UPLC-MS/MS 由于具有高效的分离能力和精确的定性、定量等特点,在盐酸克伦特罗的检测中已得到了广泛的应用^[11,15,18]。本文采用 SMCX 固相萃取柱为前处理手段,发展了一种用于检测猪肉中盐酸克伦特罗的简单、高效的 UPLC-MS/MS 分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC 超高效液相色谱-QuattroPremier XE 质谱联用仪(Waters 公司,美国); H-1850 台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司); Milli-Q 超纯水发生器(美国 Millipore 公司); SMCX 固相萃取柱(100 mg, 3 mL, 华谱新创科技有限公司)。

盐酸克伦特罗(纯度 99.5%, 中国药品生物制品检定所); 甲醇(色谱醇, 山东禹王实业有限公司化工分公司); 甲酸(分析纯, 纯度 > 98%, Acros Organics); 高氯酸(分析纯, 质量分数 70.0% ~ 72.0%, 上海金鹿化工有限公司); 氨水(分析纯, 质量分数 25.0% ~ 28.0%, 上海凌峰化学试剂有限公司); 猪肉为市售品。

1.2 标准溶液的配制

准确称取盐酸克伦特罗标准品 1 mg, 用甲醇定容至 10 mL, 配成 0.1 g/L 的盐酸克伦特罗贮备液, 置于 4 °C 冰箱中避光保存。使用时用甲醇逐级稀释盐酸克伦特罗储备液, 配制成 1、2.5、5、25、100、250、500、1 000 μ g/L 的系列标准溶液。

1.3 样品提取

准确称取捣碎的鲜肉 2 g(精确到 0.01 g)于 30 mL 离心管中, 加入标准溶液(1 000 μ g/L)100 μ L, 涡旋混合后再加入 5% (v/v)的高氯酸 10 mL, 超声提取 30 min, 于 10 000 r/min 离心 15 min, 倾出上清液后再用 5% (v/v)的高氯酸 10 mL 重复提取, 合

并上清液 ,待 SMCX 固相萃取柱处理。

1.4 样品净化

取 SMCX 柱 ,先后用 3 mL 甲醇和 3 mL 去离子水活化平衡 ,然后以 1 mL/min 的流速将提取液上样 ,然后分别用 3 mL 去离子水和 3 mL 甲醇淋洗 SPE 柱 ,真空泵抽干后用 5% (v/v) 的氯化甲醇 5 mL 洗脱。洗脱液经氮气吹干后 ,再用甲醇定容至 1 mL ,经 0.22 μm 有机滤膜过滤后待分析。

1.5 色谱条件

色谱柱 :Waters Acquity™ BEH C₁₈(100 mm × 2.1 mm , 1.7 μm) ;柱温 :30 ℃ ;进样量 :5 μL ;流速 0.35 mL/min ;检测波长 :244 nm ;流动相 A :甲醇 ;流动相 B :0.2% (v/v) 甲酸水溶液 ,梯度洗脱 ;洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱的梯度洗脱程序
Table 1 Elution process of HPLC

Step	Time/ min	φ(Mobile phase A)/ %	φ(Mobile phase B)/ %
0	0	5	95
1	3.0	20	80
2	4.0	50	50
3	5.5	100	0
4	9.5	100	0
5	13.0	5	95

Mobile phases : A. methanol ; B. 0.2% (v/v) formic acid aqueous solution.

1.6 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI) ,正离子扫描多反应监测(MRM)模式 ;毛细管电压为 3.50 kV ;离子源温度为 110 ℃ ;脱溶剂气温度为 450 ℃ ;锥孔电压为 26 V ;碰撞能量为 26 eV 和 10 eV ;碰撞气流量为 0.16 mL/min ;监测离子为 m/z 203 , m/z 259 ,其中 m/z 203 为定量离子。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的确定

用流动注射的方式将目标物标准溶液直接注入质谱仪 ,进行全扫描 ,得到一级质谱图和准分子离子峰[$M + H$]⁺(母离子) ,再用惰性气体轰击该母离子 ,获得其二级质谱图及相应子离子。选择该母离子和 2 ~ 3 个信号强度适宜的子离子组成监测离子对 ,通过优化离子源温度、锥孔电压及碰撞能量 ,使各监测离子丰度和信号达到最佳 ,用于后续的定性和定量工作。盐酸克伦特罗的典型质谱图及离子流色谱图见图 2。

2.2 固相萃取柱的选择

首先考察了 3 种常用于含瘦肉精样品处理的

图 2 MRM 模式下的盐酸克伦特罗标准溶液 (5 μg/kg) 的 (a) 质谱图和 (b) 色谱图
Fig. 2 (a) Mass spectrum and (b) chromatogram of clenbuterol standard at 5 μg/kg in MRM mode

SPE 柱(C₁₈(100 mg , 3 mL ,华谱新创科技有限公司)、Oasis® HLB(30 mg , 1 mL ,美国 Waters 公司) 和 SMCX)对瘦肉精萃取效果的影响。样品经高氯酸提取后 ,固相萃取操作步骤分别如下 :C₁₈ 和 HLB 柱在上样前 ,先后分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 去离子水活化平衡 ,将提取液以 1 mL/min 的流速上样 ,然后用 3 mL 去离子水淋洗 SPE 柱 ,待真空泵抽干后 ,用 5 mL 甲醇洗脱 ;SMCX 柱的操作步骤见 1.4 节。3 种 SPE 柱的洗脱液均经氮气吹干后 ,用甲醇定容至 1 mL ,经 0.22 μm 有机滤膜过滤后进行检测。结果显示 ,SMCX 固相萃取柱的回收率与常规 C₁₈ 及 HLB 的回收率相当。我们比较了 3 种经固相萃取柱富集净化的样品的总离子流图(见图 3) ,发现经过 SMCX 处理后的样品 ,其谱图基线平稳 ,目标物色谱峰的信噪比(S/N)为 370 ,而经由 C₁₈ 和 HLB 处理的样品谱图噪声水平较高 ,目标物色谱峰的信噪比分别是 227 和 253 ,提示 SMCX 柱更适用于含瘦肉精样品的前处理。

一般的混合模式固定相有以下两种 :一是早期发展的将两种不同基团的固定相以一定比例进行物理混合后再填充成 SPE 柱 ;另外则是以聚合物为基质的混合模式固定相。本文选用的 SMCX 柱是采用极性共聚技术在传统 C₁₈ 反相固定相的基础上再引入苯磺酸基 ,该离子交换基团的引入提供了 SPE 材料对目标成分的静电作用力 ,同时也改善了反相

图 3 经 3 种固相萃取柱净化的样品提取液的总离子流图
Fig. 3 Total ion current (TIC) chromatograms of the sample extracts purified by three kinds of SPE cartridges

The sample contained 5 $\mu\text{g/kg}$ clenbuterol standard.

固定相的极性选择性、浸润性。盐酸克伦特罗主要是通过其苯磺基的负电荷之间的静电作用富集于固定相表面,而 C_{18} 对盐酸克伦特罗又有一定的疏水作用力,虽然也吸附脂溶性杂质,不过吸附力小的杂质、目的物质、形成死吸附的杂质在后续的淋洗与洗脱步骤被逐一分离,从而实现了样品净化的目的。另外,与单纯离子交换模式的 SPE 柱相比,SMCX 柱可以避免复杂的缓冲盐体系的使用,仅需 5% 的氯化甲醇即可实现对目标组分的完全洗脱。

2.3 样品提取溶剂的考察

实际猪肉样品基质复杂,含有大量蛋白质等内源性干扰物质,需采用适当的溶剂对猪肉中的目标成分进行提取,最大限度地提取猪肉中的盐酸克伦特罗而不保留干扰物。参考文献报道的方法^[11,13,24,25]及本文建立的方法,考察了以下 3 种提取方法的提取回收率。样品在经过相同的称量,加入标准溶液及涡旋混合步骤后,分别按照如下 3 种方法进行提取:①加入 0.2 mol/L 乙酸铵溶液(pH

5.2)10 mL,超声提取 30 min 后,于 10 000 r/min 离心 15 min,倾出上清液,在上清液中加入 1 mol/L 高氯酸 1 mL 重复提取,倾出上清液备用;②加入乙酸乙酯 10 mL 和 150 g/L 碳酸钠溶液 2 mL,超声提取 30 min,于 10 000 r/min 离心 15 min,收集上层有机相,再加入乙酸乙酯 10 mL 重复提取,超声提取 30 min,收集并合并有机相,有机相中加入 0.2 mol/L 的稀酸溶液 2 mL,旋涡混合,于 10 000 r/min 离心 15 min,吸取下层水相,重复萃取一次,合并萃取液,用稀 NaOH 溶液调节 pH 为 5.5;③同本文提取方法。各个提取液再经相同的 SMCX 净化处理步骤后,采用相同的分离检测方法,计算得到提取回收率。结果表明,方法①的回收率为 39.2%,方法②为 6.6%,而方法③采用高氯酸提取法回收率为 72%,明显高于其他两种溶剂。

2.4 线性范围和检出限

实际样品的内源性组分以及提取纯化等操作带来的外源性组分都是产生基质效应的原因,可以导致定性和定量结果的误差。为尽量减少这种误差,参照本文所建立的提取净化方法,以 2 g 阴性猪肉样品进行高氯酸提取-SMCX 净化,将所得洗脱液吹干,即得到猪肉空白基质。在该空白基质中分别加入事先配制的系列标准溶液(1、2.5、5、25、100、250、500、1 000 $\mu\text{g/L}$)各 100 μL ,用甲醇定容至 1 mL,超声提取,过 0.22 μm 有机膜,得到含量为 0.05、0.125、0.25、1.25、5、12.5、25、50 $\mu\text{g/kg}$ 的猪肉基质添加溶液,作为标准曲线工作溶液。将每份溶液重复分析 3 次,以平均峰面积(A)为纵坐标,盐酸克伦特罗的含量($\mu\text{g/kg}$)为横坐标建立回归方程。结果表明,盐酸克伦特罗在 0.25 ~ 50 $\mu\text{g/kg}$ 的范围内线性关系良好,相关系数 R 为 0.998 2,回归方程为 $y = 3\,041.2x + 1\,833$ 。

在空白猪肉基质中添加盐酸克伦特罗,按信噪比(S/N)=3 时的最低添加浓度为检出限(LOD),则本方法的 LOD 为 0.05 $\mu\text{g/kg}$,而 $S/N = 10$ 时的定量限(LOQ)为 0.17 $\mu\text{g/kg}$ 。国家标准 GB/T 5009.192-2003 以及 SN/T 1924-2007 中规定的盐酸克伦特罗的定量限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$,本方法能够满足国家标准对克伦特罗的检测要求,且检出限更低,可见,SMCX 小柱可以有效地去除猪肉中复杂基质的干扰,达到了样品纯化富集的目的。

2.5 回收率和精密度

在空白猪肉中分别添加 1.25、12.5 及 50 $\mu\text{g/kg}$ 3 个含量水平的盐酸克伦特罗标准溶液,每个含量水平平行处理 3 份,按照 1.3 节中所述的提

取方法及 1.4 节中的富集净化方法 ,采用建立的 UPLC-MS/MS 方法进行检测 ,通过回归方程计算含量 ,得到加标回收率和相对标准偏差(RSD)。结果显示 ,猪肉中盐酸克伦特罗的平均回收率为 62.2% ~ 72.0% ,RSD 为 4.2% ~ 6.1%(见表 2)。

表 2 猪肉基质中盐酸克伦特罗的加标回收率和精密度(*n* = 3)

Table 2 Recoveries and precisions (RSD) of clenbuterol spiked in pork matrix (*n* = 3)

Added/(μg/kg)	Recovery/%	RSD/%
50	72.0	4.2
12.5	67.8	6.1
1.25	62.2	5.2

2.6 SMCX 与 PCX 柱处理效果的比较

为了进一步验证 SMCX 混合型填料的性能 ,我们利用安捷伦 1200 液相色谱-串联 API 4000 型质谱仪 ,采用同位素内标法 ,通过检测猪肠衣样品中的盐酸克伦特罗 ,对比考察了 SMCX 柱及目前行业内普遍采用的商品化 PCX 型柱(Cleanert PCX 阳离子交换柱 ,60 mg/3 mL ,博纳艾杰尔科技有限公司)对目标样品的处理效果。以目的物质与内标物质峰面积比为纵坐标 *Y* ,盐酸克伦特罗目的物质的含量(μg/kg)为横坐标 *X* ,内标法标准曲线方程为 $Y = -0.002\,798\,8 + 0.239\,062X$ 。结果显示 ,在相同的前处理条件下 ,SMCX 柱与 PCX 柱的回收率相当(见表 3)。但考虑到 SMCX 复合材料以硅胶为基质 ,在有机相条件下无溶胀现象、且制备过程相对简单 ,故其具有很好的发展前景及应用价值。

表 3 猪肠衣中盐酸克伦特罗在不同 SPE 柱上的加标回收率和精密度(*n* = 3)

Table 3 Recoveries and precisions (RSD) of clenbuterol spiked in pig casing sample pretreated by different SPE cartridges (*n* = 3)

SPE column	Added/(μg/kg)	Found/(μg/kg)	Recovery/%	RSD/%
PCX	1	1.23	123.2	10.47
SMCX	1	1.29	128.6	12.81

2.7 实际样品的检测

按照本文建立的提取、净化、检测方法 ,对从市场上购买的 3 种猪肉和 2 种牛肉样品进行了测定。发现 :其中 2 种猪肉中检测到了盐酸克伦特罗 ,含量分别为 1.35 μg/kg 和 0.7 μg/kg ,其他样品未检测到目标成分。

3 结论

本文采用以硅胶为基质的反相/强阳离子交换混合模式固相萃取柱(SMCX) ,达到了净化及富集猪肉样品中盐酸克伦特罗的目的 ,以此为前处理手段 ,结合 UPLC-MS/MS 法 ,发展了一种高效、简便、

灵敏的测定盐酸克伦特罗的方法。SMCX 固定相兼有疏水性和阳离子交换基团 ,而瘦肉精类物质都具有苯环母核以及连接于脂肪链的仲胺基团的类似结构 ,可以推测本方法可推广到其他瘦肉精类样品的选择性富集和分离检测。

参考文献 :

[1] Shishani E , Chai S C , Jamokha S , et al. Anal Chim Acta , 2003 , 483(1/2) : 137

[2] He L M , Su Y J , Zeng Z L , et al. Anim Feed Sci Tech , 2007 , 132(3/4) : 316

[3] Qu C H , Li X L , Zhang L , et al. Chromatographia , 2011 , 73 : 243

[4] Jia Q , Zhang Z L , Wang X F , et al. Journal of Toxicology (贾强 , 张振玲 , 王筱芬 , 等. 毒理学杂志) , 2005 , 19(1) : 75

[5] Yang H F , Yan L. Endemic Diseases Bulletin (杨浩峰 , 严蕾. 地方病通报) , 2006 , 21(1) : 101

[6] Zhu J , Yang J X , Li B , et al. Journal of Instrumental Analysis (朱坚 , 杨景贤 , 李波 , 等. 分析测试学报) , 2004 , 23 (z1) : 223

[7] Nie J R , Zhu M L , Lian J , et al. Chinese Journal of Chromatography (聂建荣 , 朱铭立 , 连瑾 , 等. 色谱) , 2010 , 28(8) : 759

[8] Li C , Wu Y L , Yang T , et al. J Chromatogr A , 2010 , 1217 : 7873

[9] Nie J R , Hong Z T , Lian J , et al. Chinese Journal of Veterinary Drug (聂建荣 , 洪振涛 , 连瑾 , 等. 中国兽药杂志) , 2008 , 42(8) : 17

[10] Su X O , Shen J Z. Chinese Journal of Animal Science (苏晓鸥 , 沈建忠. 中国畜牧杂志) , 2008 , 44(11) : 41

[11] Sun L , Zhang L , Zhu Y L , et al. Chinese Journal of Chromatography (孙雷 , 张骊 , 朱永林 , 等. 色谱) , 2008 , 26 (6) : 709

[12] Wang L , Li Y Q , Zhou Y K , et al. Chromatographia , 2010 , 71 : 737

[13] Xu J Z , Ding T , Liu F. LaborPraxis (徐锦忠 , 丁涛 , 刘飞. 实验与分析) , 2008(4) : 30

[14] Liu C , Ling W T , Xu W D , et al. J AOAC Int , 2011 , 94 (2) : 420

[15] Zheng H , Deng L G , Lu X , et al. Chromatographia , 2010 , 72 : 79

[16] Wang W Y , Zhang Y L , Xing X P , et al. Chinese Journal of Chromatography (王伟宇 , 张玉莲 , 邢晓平 , 等. 色谱) , 2008 , 26(2) : 228

[17] Jiang J Q , Wang Z L , Zhang H T , et al. J Agric Food Chem , 2011 , 59 : 9763

[18] Shelver W L , Thorson J F , Hammer C J , et al. J Agric Food Chem , 2010 , 58 : 4077

[19] Liu B M , Yan H Y , Qiao F X , et al. J Chromatogr B , 2011 , 879 : 90

[20] Geng Y , Zhang M , Yuan W , et al. Food Addit Contam , 2011 , 28(8) : 1006

[21] Garcia P , Paris A C , Gil J , et al. Biomed Chromatogr , 2011 , 25 : 147

[22] Liu W , Zhang L , Wei Z Y , et al. J Chromatogr A , 2009 , 1216 : 5340

[23] Wu P G , Chen H H , Wang Q , et al. Chinese Journal of Chromatography (吴平谷 , 陈慧华 , 王强 , 等. 色谱) , 2008 , 26(1) : 39

[24] NY/T 468-2006

[25] Wang H. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (王红. 中国卫生检验杂志) , 2007 , 17(8) : 1409