

实验技术与方法

液相色谱 - 质谱/质谱法测定乳与乳制品中的三聚氰胺

陈冬东¹ 彭涛¹ 李晓娟¹ 李淑娟¹ 邵兵² 徐娇³

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100123;2. 北京市疾病预防控制中心,北京 100013;

3. 卫生部卫生监督中心,北京 100007)

摘要:目的 建立乳与乳制品中三聚氰胺的液相色谱 - 质谱/质谱(LC - MS/MS)测定方法。方法 样品用三氯乙酸溶液和乙腈提取,经阳离子交换固相萃取柱(SPE)净化后,用液相色谱 - 质谱/质谱法测定和确证,外标法定量。结果 在0.01~0.50 μg/ml范围内呈线性相关,相关系数为0.999 2,方法测定低限(LOQ)为0.01 mg/kg。在0.01~0.10 μg/ml添加浓度范围内,方法回收率为80.4%~107.4%,相对标准偏差(RSD) 9.4%。结论 本方法操作简便,灵敏度、准确度、精密性可满足乳与乳制品中三聚氰胺的检测要求。

关键词:三聚氰胺;色谱法;液相;光谱分析;质量;食品分析;乳

Determination of Melamine in Milk and Dairy Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

CHEN Dong-dong, PENG Tao, LI Xiao-juan, LI Shu-juan, SHAO Bing, XU Jiao

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: Objective To develop a method of Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC - MS/MS) for determination of melamine in milk and dairy products. **Method** Melamines were extracted from samples with trichloroacetic acid solution and acetonitrile, and then cleaned up by cation ion exchange SPE cartridge. The analytes were determined by LC - MS/MS, and quantified by the external standard curve. **Results** The linearity was good between 0.01 and 0.5 μg/ml. Correlation coefficient was 0.999 2. The limit of quantization (LOQ) was 0.01 mg/kg. Recoveries of melamine ranged from 80.4% to 107.4%, in spiked level from 0.01 to 0.1 μg/ml, with relative standard deviations (RSDs) 9.4%. **Conclusion** This method was easy to operate. And the sensitivity, accuracy, precision of the method could satisfy the requirements for the identification and quantification of melamine in milk and dairy products.

Key words: Melamine; Chromatography; Liquid; Spectrum Analysis; Mass; Food Analysis; Milk

三聚氰胺是一种重要的氮杂环有机化工原料,其与醛反应制成的三聚氰胺树脂是一种多用途材料,防火耐热且有很高的稳定性,广泛用于木材加工、塑料、涂料、造纸、纺织、皮革、电气、医药等行业。本来三聚氰胺与食品、饲料行业毫不相干,但是2007年3月开始发生在美国的数起饲料致死宠物的事件使两者联系在一起。美国食品药品监督管理局(FDA)通过调查后发现,在回收的宠物食品、死亡动物的尿液结晶和肾脏细胞中都发现有三聚氰胺。2008年9月我国发生的“三鹿”婴幼儿奶粉事件,开始引起国内外对食品中三聚氰胺的高度关注。

三聚氰胺传统的检测方法有重量法、升华法,近几年兴盛起来的主要有高效液相色谱法(HPLC)^[3]、液相色谱 - 质谱联用法(LC - MS/MS)^[5]和气相色谱 - 质谱联用法(GC - MS)^[4]。HPLC方法不能用作确证分析,质谱方法可以提供足够的分子结构信息,是目前国际公认的确证手段,但GC - MS需要冗繁的

衍生化,LC - MS/MS是快速、准确分析三聚氰胺的最佳手段。本论文在前期植物源性蛋白中三聚氰胺检测研究的基础上,通过大量条件实验,采用三氯乙酸溶液和乙腈混合溶液提取,MCX阳离子固相萃取柱净化,建立了液态奶、奶粉、酸奶、奶酪、奶油以及冰激淋6类乳与乳制品中三聚氰胺的液相色谱 - 质谱/质谱测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

Agilent 1200SL 高效液相色谱仪和 6410 三重四极杆质谱仪(美国 Agilent 公司)、高速离心机(日本日立公司)、氮吹仪(美国 Caliper 公司)、固相萃取装置(美国 Supelco 公司),色谱柱为强阳离子交换与反相 C₁₈ 混合填料,混合比例 1:4,150 mm × 2.0 mm i. d., 5 μm(日本资生堂公司)。

三氯乙酸、海砂、氨水(含量为 25%~28%)、甲酸、乙酸铵均为分析纯;甲醇、乙腈为色谱纯;水为蒸馏水;阳离子交换固相萃取柱(OASIS MCX, 60 mg, 3 ml)购自美国 Waters 公司;0.2 μm 微孔滤膜购自美

作者简介:陈冬东 女 助理研究员

通讯作者:彭涛 男 助理研究员

国 PALL 公司;三聚氰胺标准品(99%)购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

三聚氰胺标准溶液的配制 准确称取适量的三聚氰胺标准物质,用甲醇水溶液(1+1,体积分数)配成浓度为 1.0 mg/ml 的标准储备溶液,根据需要用水稀释成适宜浓度的标准工作溶液。

1.2 仪器条件

液相色谱条件 流动相为充分混合的等体积比的 10 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙腈(用甲酸调节至 pH = 3.0);流速 0.2 ml/min;进样量 10 μ l;柱温 40 $^{\circ}$ C。

质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子扫描;离子喷雾电压 4 kV;雾化气为氮气,压力 40 psi;干燥气为氮气,流速 10 L/min,温度 350 $^{\circ}$ C;裂解电压 100 V;碰撞气为氮气。多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)参数见表 1。

表 1 多反应监测(MRM)参数

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	停留时间(s)	碰撞能量(V)
三聚氰胺	127	85*	0.30	20
		68	0.30	35

注:加*的离子用于定量。

1.3 方法

称取 1 g 样品,加入 8 ml 1% 的三氯乙酸水溶液和 2 ml 乙腈,超声提取 10 min,再振荡提取 10 min 后,以 10 000 r/min 离心 10 min。奶酪和奶油先用样品质量 4~6 倍的海砂研磨成干粉状后再提取。上清液过 MCX 固相萃取柱净化。

MCX 固相萃取柱依次用 3 ml 甲醇、5 ml 水活化。转入上清液,依次用 3 ml 水和 3 ml 甲醇洗涤,抽至近干后,用 6 ml 5% 的氯化甲醇溶液洗脱。洗脱液于 50 $^{\circ}$ C 下用氮气吹干,残留物用 1 ml 流动相定容,涡旋混合 1 min,过 0.2 μ m 微孔滤膜后,用液相色谱-质谱/质谱测定。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的优化

三聚氰胺属于弱碱性物质,能溶于甲醛、乙酸、热乙二醇、甘吡啶,微溶于水及醇,不溶于醚、苯和四氯化碳,能够与各种酸反应生成三聚氰胺盐,但在强酸或强碱液中,三聚氰胺会发生水解。考虑到乳与乳制品有一定的水溶性,因此本方法主要采用酸性溶液作为提取溶剂。对 0.1 mol/L HCl 和 1% 三氯乙酸的提取效率进行比较实验,提取回收率相当。考虑到 HCl 为无机酸,为不影响质谱检测,同时三氯乙酸具有更好的除蛋白效果,因此选用三氯乙酸作为本方法的主要提取溶液。为增加去除蛋白的能力,在提取溶液中加入一定比例的乙腈,同时,为保证乙腈比例不会影响分析物在 SPE 柱上的保留,经试验筛选,以 1% 三氯乙酸水溶液-乙腈(4+1,体积分数)提取,既能保证提取回收率,又可以在 SPE 柱上良好保留。

对于含油脂较大的奶酪和奶油,采用海砂碾磨

分散并固化后,再用溶剂提取,避免了直接提取中的乳化和现象,同时保证了提取的分散性和充分性。

2.2 净化条件的选择

乳与乳制品中的主要杂质为蛋白质和脂肪,提取溶剂中的三氯乙酸和乙腈可以初步去除部分杂质。再根据在酸性溶剂中,三聚氰胺呈阳离子状态的特点,本方法选用阳离子交换固相萃取柱进一步净化,满足液相色谱-质谱/质谱测定要求。参照国内外的有关文献,选用 OASIS MCX 阳离子交换固相萃取柱作为净化柱。用 2 ml 三聚氰胺标准溶液(5 μ g/ml)上样,进行洗脱实验。用前依次用 3 ml 甲醇、5 ml 水活化,3 ml 水和 3 ml 甲醇洗涤,抽至近干后,用 5% 的氯化甲醇进行洗脱,分别接收流出液测定,当氯化甲醇的体积为 6 ml 时,三聚氰胺的过柱回收率接近 100%。实际样品分析表明,经过 MCX 固相萃取柱净化后,在分析物出峰位置没有杂峰干扰,净化效果满足液相色谱-质谱/质谱测定要求。添加样品 MRM 质量色谱图见图 1。

2.3 质谱条件的优化

取三聚氰胺标准溶液(浓度为 1 μ g/ml),采用流动注射方式以 10 μ l/min 流速注入离子源,在 ESI 正离子检测方式下分别进行一级质谱分析(Q1),得到分子离子峰 $M + H^+$,再对分子离子进行二级质谱分析,得到碎片离子信息和二级质谱图。对去簇电压(DP)、聚焦电压(FP)、碰撞气能量(CE)及碰撞室出口电压(CXP)等参数进行优化,使分子离子与特征碎片离子强度达到最大,确定最佳质谱参数。

本方法采用“三离子”原则定性定量检测。子离子 127 > 85 用于定量,子离子 127 > 68 用于定性。当样品中两对离子同时存在,并且离子相对丰度(127 > 68/127 > 85)与浓度相近的标准溶液一致(满足表 2 规定)时,方可确定样品中含有三聚氰胺。

表 2 定性离子相对离子丰度的最大允许偏差

定性离子 相对离子丰度	> 50 %	> 20 % ~ 50 %	> 10 % ~ 20 %	10 %
允许的相对偏差	± 20 %	± 25 %	± 30 %	± 50 %

注:“定性离子相对离子丰度的最大允许偏差”,是根据“欧盟 2002/657/EC 指令”设置。

2.4 液相色谱条件的确定

三聚氰胺的极性较大,在常规反相色谱条件下,用 C_{18} 和 C_8 色谱柱都难以保留。目前已有报道通过加入离子对试剂来延长其保留时间。但本研究采用质谱分析,非挥发性盐类的加入会造成仪器的污染和灵敏度降低。通过对市售色谱柱的筛选,发现阳离子交换-反相保留(SCX C_{18} = 1:4)混合填料的 CAPCELL PAK CR 2.0 mm \times 150 mm 色谱柱在酸性条件下对三聚氰胺具有较好的保留。实验表明,当流动相为等体积比的 10 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙腈(用甲酸调节至 pH = 3.0),流速 0.2 ml/min,柱温 40 $^{\circ}$ C 时,三聚氰胺的保留时间约为 4.2 min。

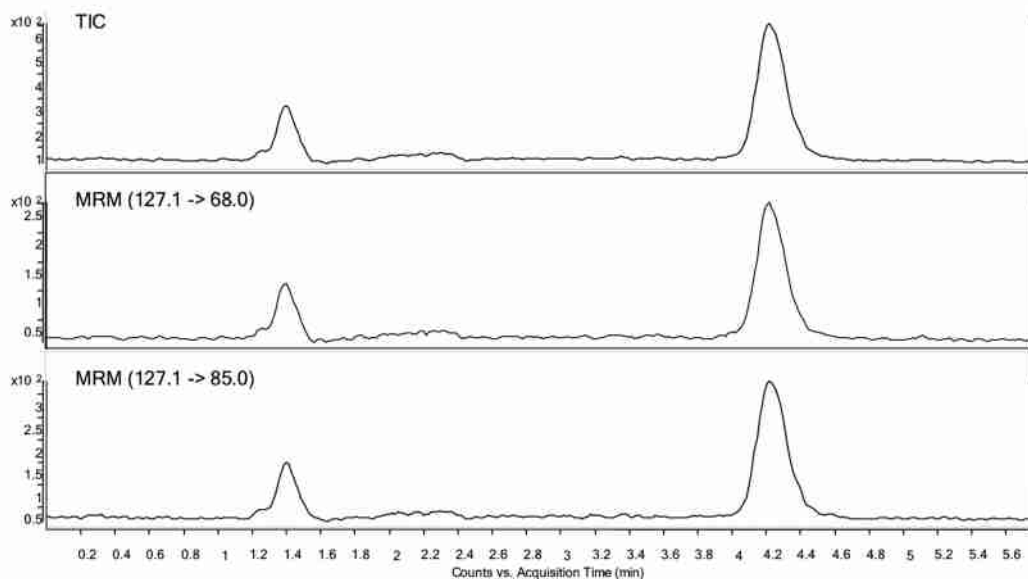


图1 液态奶中三聚氰胺加标 MRM 质量色谱图(添加浓度 0.01 mg/kg)

表3 乳与乳制品中三聚氰胺添加回收率和精密度

样品名称	添加浓度(mg/kg)	(n=9)	
		回收率范围(%)	RSD(%)
液态奶	0.01	83.2~97.3	5.5
	0.02	88.6~95.8	4.3
	0.1	86.3~99.5	7.3
奶粉	0.01	84.8~98.2	4.2
	0.02	80.4~99.7	6.8
	0.1	85.9~104.6	7.1
酸奶	0.01	88.2~101.4	7.4
	0.02	81.4~104.2	9.4
	0.1	85.7~98.4	3.6
奶酪	0.01	82.6~105.8	7.1
	0.02	85.7~100.6	5.4
	0.1	83.9~102.4	6.6
奶油	0.01	82.6~103.9	6.9
	0.02	80.7~97.2	8.8
	0.1	85.3~107.4	8.5
冰淇淋	0.01	83.5~95.9	4.7
	0.02	85.3~96.0	4.6
	0.1	81.8~98.1	3.5

2.5 线性范围

本研究采用校正曲线外标法定量,在 0.01~0.5 μg/ml 浓度范围内,线性方程为 $y = 40185x - 6944$, 相关系数 $r = 0.9992$ 。

2.6 测定低限

采用空白样品添加实验确定方法的测定低限。以不含三聚氰胺的液态奶、奶粉、酸奶、奶酪、奶油和冰淇淋为空白样品添加三聚氰胺标准溶液。当样品中三聚氰胺添加浓度为 0.01 mg/kg 时,按照本方法实验室内平行测定 20 次结果,其质量色谱峰信噪比(S/N)大于等于 10,因此确定方法测定低限为 0.01 mg/kg,满足乳与乳制品中三聚氰胺检测灵敏度要求。

2.7 添加回收率和精密度

通过向空白样品中添加三聚氰胺标准溶液,采用外标曲线定量,来验证方法的回收率。每个添加水平重复测定 9 次。在添加浓度 0.01、0.02、0.10 mg/kg 范围内,6 种乳与乳制品中三聚氰胺回收率在 80.4%~107.4% 之间,相对标准偏差 RSD 9.4%,技术指标满足化学分析要求。添加回收率和精密度见表 3。

参考文献

- [1] 谢荣国,武晓宏,杨俊华. 饲料中三聚氰胺检测及其危害[J]. 饲料广角,2008,9:20-22.
- [2] Wendy C Andersen, Sherri B. Turnipseed, Christine M Karbiwnyk, et al. Determination of melamine residues in catfish tissue by triple quadrupole LC-MS/MS with HILIC chromatography[DB/OL]. U. S. Food and Drug Administration, Animal Drugs Research Center, Denver, CO. Laboratory Information Bulletin No. 4396, May 2007.
- [3] 倪沁颜. 高效液相色谱法(HPLC)测定饲料中三聚氰胺的含量[J]. 福建分析测试,2008,17(1):57-59.
- [4] 吴惠勤,黄芳,林晓珊,等. 气相色谱-质谱法测定奶粉及奶制品中三聚氰胺[J]. 分析测试学报,2008,27(10):1044-1048.
- [5] 丁涛,徐锦忠,李建中,等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法及高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺[J]. 色谱,2008,1(26):6-9.
- [6] 赖碧清,郑晓航,韩银涛. 高效液相色谱-四极杆质谱联用测定饲料中三聚氰胺含量[J]. 饲料工业,2008,29(4):47-48.
- [7] 刘梅,李金强,田德金,等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测食品中的三聚氰胺[J]. 化学分析计量,2008,17(2):48-50.
- [8] 李伟. 液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)分析宠物食品中三聚氰胺[J]. 分析测试学报,2007,9(26):285-286.
- [9] 张俊燕,何吕兴. 三聚氰胺的样品前处理及最新检测方法[J]. 生命科学仪器,2007,5(10):57-89.
- [10] 欧盟 2002/657/EC 指令.

[收稿日期:2009-01-20]

中图分类号:R15;O652.63;O657.7;R995;TS207.5;S879.1

文献标识码:B

文章编号:1004-8456(2009)03-0253-03