

实验技术与方法

HPLC-MS/MS 同时检测大鼠体内三聚氰胺和三聚氰酸含量

何君,高虹,李岩,秦超,陈威,舒健明,孙继超,王皎,秦川

(中国医学科学院医学实验动物研究所 北京协和医学院比较医学中心,北京 100021)

摘要:目的 建立 HPLC-MS/MS 同时检测大鼠血浆和组织中三聚氰胺和三聚氰酸含量的方法。方法 以同位素标记的三聚氰胺和三聚氰酸作为内标物,大鼠血浆和组织经二氯甲烷-乙腈前处理后,经色谱柱分离,串联离子阱质谱采用 ESI 源按运行时间段切换正、负离子模式进行测定。结果 在 0.3~75 μg/ml 范围内,三聚氰酸和三聚氰胺具有良好的线性($r \geq 0.998$)。在 0.9、5.0、50 μg/ml 的给药大鼠的血浆样本中,三聚氰酸和三聚氰胺的回收率分别为 97.4%~99.4%、96.8%~98.9%,两者的变异系数为 2.43%~6.35% (日内)、1.70%~4.12% (日间)和 0.30%~9.17% (日内)、0.75%~3.39% (日间);在 0.9、5.0、50 μg/ml 的给药大鼠肝组织样本中,三聚氰酸和三聚氰胺的回收率分别为 90.8%~104.6%、91.7%~106.0%,对应的变异系数为 3.70%~5.14% (日内)、2.84%~4.50% (日间)和 1.31%~2.21% (日内)、1.12%~3.36% (日间)。结论 该方法样品前处理简单,基质干扰小,分析效率高,具有良好的精密度、准确度和特异性,是进行三聚氰酸、三聚氰胺在动物体内的组织代谢和毒性研究的理想分析方法。

关键词:三聚氰酸;三聚氰胺;血浆;组织;HPLC-MS/MS

中图分类号:R969 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)04-0322-08

Simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in rat by HPLC-MS/MS

He Jun, Gao Hong, Li Yan, Qin Chao, Chen Wei, Shu Jianming, Sun Jichao, Wang Jiao, Qin Chuan

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science, Center of Comparative Medicine of Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in rat by HPLC-MS/MS. **Methods** Using isotope-labelled melamine and cyanuric acid as internal standard, rat plasma and tissue samples were pretreated with dichloromethane-acetonitrile, and separated by chromatographic column switching technique. Detection was carried out by HPLC coupled with electrospray ionization (ESI) working on segment ESI⁻ and ESI⁺ switching mode. **Results** The calibration curve of melamine and cyanuric acid were linear ($r \leq 0.998$) in the range of 0.3-75 μg/ml. The average recovery rates of melamine and cyanuric acid (added with 0.9, 5.0 and 50 μg/ml) in rat plasma were 97.4%-99.4% and 96.8%-98.9%, respectively; while the relative standard deviations (RSD) of the method were 2.43%-6.35% (inter-day), 1.70%-4.12% (intra-day), 0.30%-9.17% (inter-day) and 0.75%-3.39% (intra-day), respectively. The average recovery rates of rat liver tissue (added with 0.9, 5.0 and 50 μg/ml) were 90.8%-104.6% and 91.7%-106.0%, respectively; while the relative standard deviations (RSD) of the method were 3.70%-5.14% (inter-day), 2.84%-4.50% (intra-day), 1.31%-2.21% (inter-day) and 1.12%-3.36% (intra-day), respectively. **Conclusion** The method was simple in sample pretreatment, less matrix interference, efficient, precise, accurate and specific. It was ideal to study the mechanism of metabolic behavior and toxicology of melamine and cyanuric acid in animals.

Key words: Melamine; cyanuric acid; plasma; tissue; HPLC-MS/MS

三聚氰胺 (melamine, MEL) 和三聚氰酸

(cyanuric acid, CYA) 均为三嗪类含氮杂环化合物,主要用于生产塑料、胶水和阻燃剂,但自 2007 年美国报道成千计的猫狗因食用含三聚氰胺、三聚氰酸的饲料而致病或死亡事件后,进一步调查研究发现受二者污染的饲料已经被用于人所食用的动物喂养或者人用食品^[1-2],因此通过动物实验探讨三聚

收稿日期:2012-03-23

基金项目:卫生部公益性行业科研专项经费(200902009-04)

作者简介:何君 女 副研究员/博士 研究方向为药理学和毒理学

通信作者:秦川 女 教授/博士生导师 研究方向为病理学

氰胺和三聚氰酸在机体内的代谢过程、评估毒性风险已成为当前的研究重点。同时检测三聚氰胺和三聚氰酸的方法目前已有高效液相色谱-质谱法、气相色谱-质谱法等,但主要应用于牛奶和奶粉^[3-8];对于动物体液和组织单独测定三聚氰胺或者三聚氰酸的方法较多^[9-11],但同时检测三聚氰胺和三聚氰酸的方法还鲜见报道。本文以大鼠的血浆和肝组织为样本,采用两根色谱柱串联、同位素标记内标物方式,建立了一个快速、准确的同时分析动物体内三聚氰胺和三聚氰酸含量的液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

API5000 LC-MS/MS 串联质谱(美国 AB 公司); T18 型分散机(德国 IKA 公司);GPRS 离心机(美国 Beckman 公司);TurboVap LV 氮吹仪(美国 Zymark 公司)。

三聚氰胺(分析纯,含量 >99.5%)、三聚氰酸(化学纯,含量 >98.0%)购自国药集团化学试剂有限公司生产;三聚氰酸标准品(纯度 99%)由德国 Dr. Ehrenstorfer 惠赠;三聚氰胺标准品(纯度 99.5%)购自美国 DIMA TECHNOLOGY INC;内标物三聚氰酸-¹³C₃(纯度 ≥99%)购自德国 WITEGA、三聚氰胺-¹⁵N₃(纯度 97.3%)购自美国 SIGMA-ALDRICH;其他试剂均为分析纯或 HPLC 级。

1.2 标准和内标储备液的配制

标准储备液配制:准确称取三聚氰胺和三聚氰酸标准品各 5 mg,加入 0.05% 甲酸水溶液溶解并稀释定容到 50 ml,配制成浓度为 100 μg/ml 的混标储备液,4℃ 保存。

内标储备液的配制:准确称取内标物三聚氰酸-¹³C₃、内标物三聚氰胺-¹⁵N₃ 各 2 mg,加入 50% 的乙腈水溶液溶解并稀释定容至 2 ml,配制成浓度为 1 mg/ml 的内标储备液,4℃ 保存。

1.3 样品处理

取大鼠血浆(或者尿液、组织匀浆液)50 μl 置于玻璃试管中,加入 150 μl 0.05% 甲酸水溶液,涡旋混合 30 s,加入 50 μl 浓度为 5 μg/ml 的同位素内标溶液,涡旋混合 30 s,再加入 1 ml 二氯甲烷,涡旋混合 20 s,于 3 000 r/min 下离心 5 min,取上清液 10 μl,加入 200 μl 乙腈,涡旋 20 s,再于 10 000 r/min 下高速离心 5 min,取上清液进行 LC-MS/MS 分析。组织匀浆液是将一定量的组织,按照 1:9 的比例加入 0.9% 氯化钠溶液,在分散机中以 10 000 r/min 速度搅拌 5 min 制备而成。

1.4 液相色谱条件

色谱柱为 Inertsil Silica(5 μm,50 mm × 3mm) 串联 Phenomenex Luna (5 μm,Silica (2) 100A,50 mm × 2 mm);流动相为乙腈:水 = 90%:10%,并混有 5 mM 的醋酸铵和 0.1% 的醋酸;柱温为常温;进样温度为 4℃;流速为 0.3 ml/min;进样体积为 1.5 μl。

1.5 质谱条件

采用 ESI 离子源;离子监测模式为多反应监测(MRM),采用按运行时间段切换正、负离子模式,三聚氰胺采用正离子模式,三聚氰酸采用负离子模式;喷雾气(Gas1)为空气,辅助气(Gas2)为高纯氮气;其他参数如下:(1)三聚氰酸测定时,Time Segment 1:0 ~ 2.8 min, Cyanuric acid (128-42), Cyanuric-¹³C₃ (131.0-43.1); Gas1 电压为 55 psi; Gas2 电压为 55 psi;去簇电压(DP)为 -25 V;碰撞电压(CE)为 -20 V;入口电压(EP)为 -10 V;源温度为 400℃;喷雾电压(IS)为 -3 500 V。(2)三聚氰胺测定时,Time Segment 2:2.8 ~ 4.8 min, Melamine (127-85); Melamine-¹⁵N₃ (130-87); Gas1 电压为 55 psi; Gas2 电压为 55 psi;去簇电压(DP)为 106 V;碰撞电压(CE)为 20 V;入口电压(EP)为 10 V;源温度为 400℃;喷雾电压(IS)为 4 000 V。

2 结果

2.1 血浆分析方法确证

2.1.1 方法特异性

取未给受试物的大鼠血浆(空白血浆),按照“样品处理”项所述进行处理后,进样检测得色谱图 1a、图 1b;空白血浆加入一定量三聚氰胺标准品、三聚氰酸标准品及其内标物的混合液(即混合标准溶液)经处理后检测,得到色谱图 2a、图 2b;灌胃三聚氰胺和三聚氰酸后的大鼠血浆,加入一定量内标物经处理后检测,得到色谱图 3a、图 3b。结果表明,大鼠血浆中的内源性物质在测定条件下不产生信号响应,不干扰三聚氰胺和三聚氰酸的测定,检测具有高特异性。

2.1.2 标准曲线及其线性范围

将一定体积的标准品储备液用空白血浆稀释成含三聚氰胺和三聚氰酸浓度均为 0.3、0.6、1.2、3.0、6.0、12.0、30.0 和 75.0 μg/ml 标准工作曲线应用液,按“样品处理”项下操作后,制备标准曲线。以待测物与内标物的浓度比为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,进行回归运算,求得直线回归方程。三聚氰酸的标准曲线方程为 $y = 0.177x + 0.00131$ ($r = 0.9979$),线性范围为 0.3 ~ 75 μg/ml,定量下限为 0.3 μg/ml ($S/N = 10$);三聚

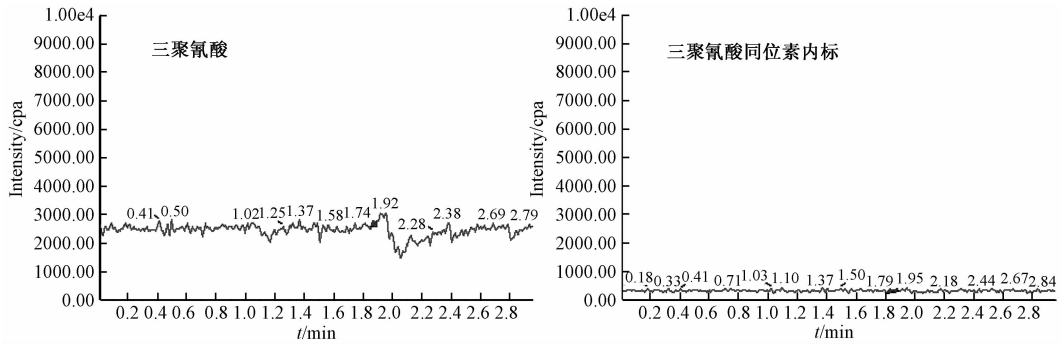


图 1a 空白血浆定量离子色谱图——三聚氰酸

Figure 1a Quantitative ion chromatograph of blank plasma-cyanuric acid

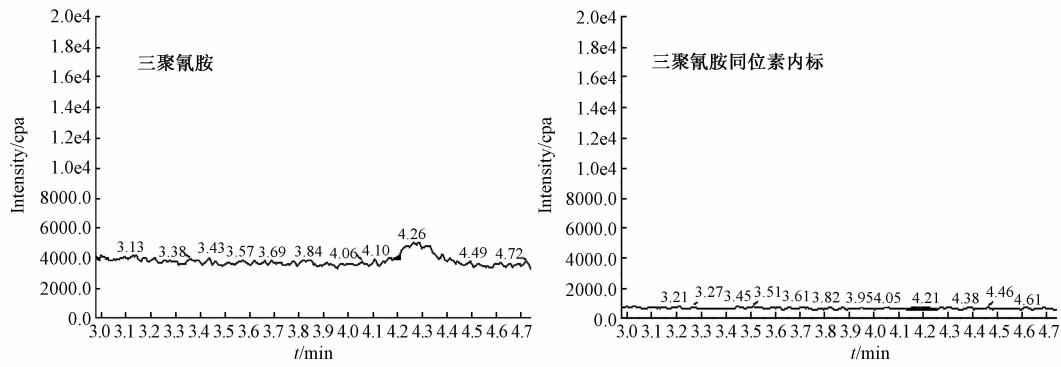


图 1b 空白血浆定量离子色谱图——三聚氰胺

Figure 1b Quantitative ion chromatograph of blank plasma-melamine

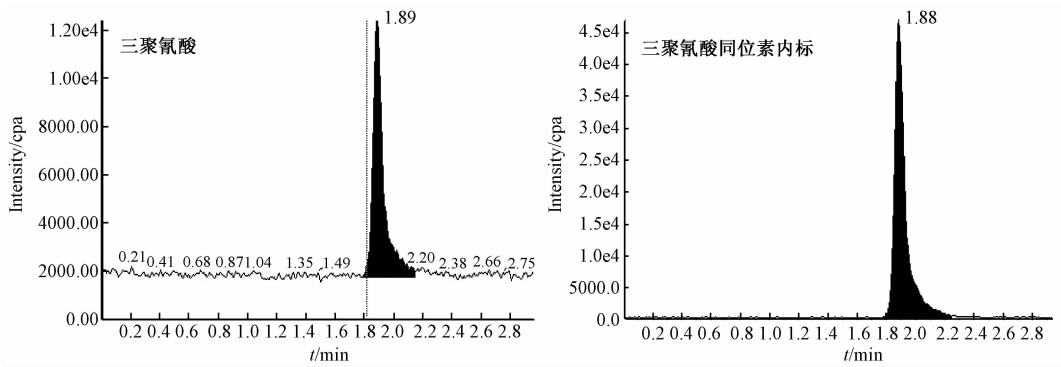


图 2a 空白血浆 + 混合标准品定量离子色谱图——三聚氰酸

Figure 2a Quantitative ion chromatograph of blank plasma spiked with standard substances vs internal standards-cyanuric acid

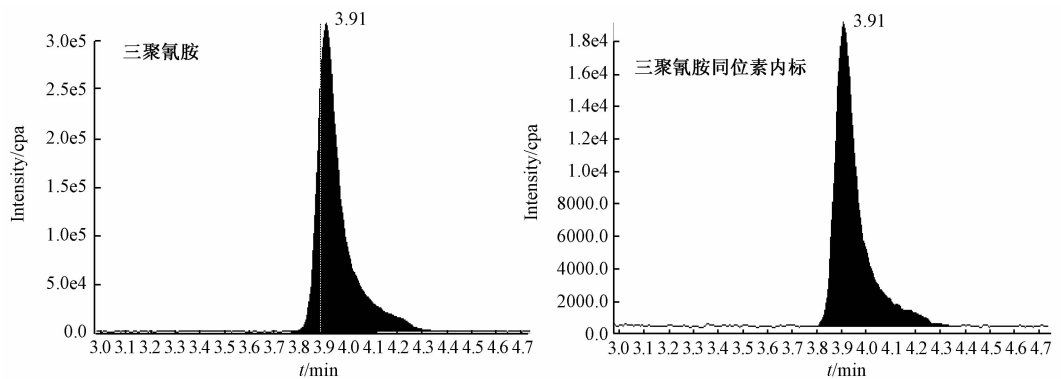


图 2b 空白血浆 + 混合标准品定量离子色谱图——三聚氰胺

Figure 2b Quantitative ion chromatograph of blank plasma spiked with standard substances vs internal standards-melamine

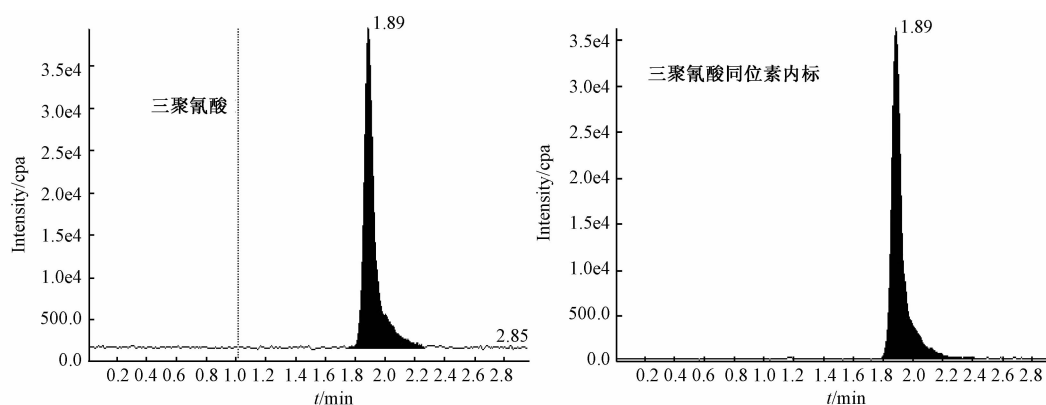


图 3a 灌胃大鼠血浆 + 内标物定量离子色谱图——三聚氰酸

Figure 3a Quantitative ion chromatograph of rat plasma sample (after administration of cyanuric acid) spiked with internal standards-cyanuric acid

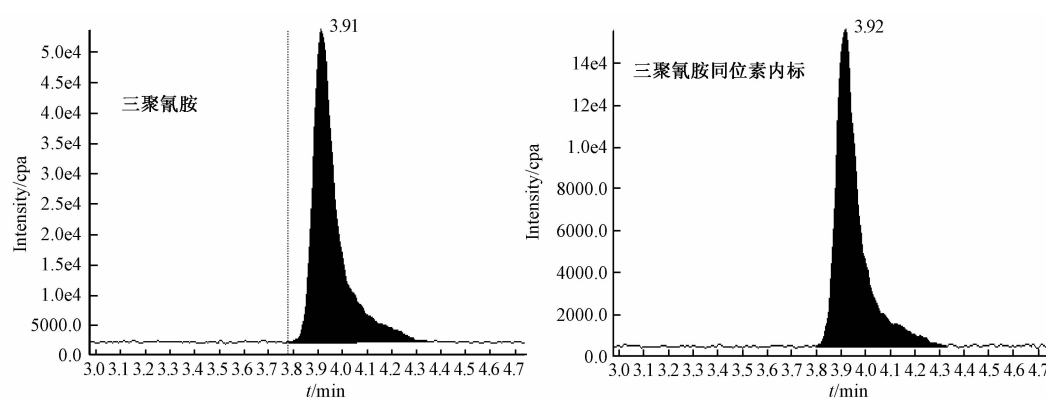


图 3b 灌胃大鼠血浆 + 内标物定量离子色谱图——三聚氰胺

Figure 3b Quantitative ion chromatograph of rat plasma sample (after administration of melamine) spiked with internal standards-melamine

氰胺的标准曲线方程为 $y = 0.238x + 0.00742$ ($r = 0.9990$), 线性范围为 $0.3 \sim 75 \mu\text{g/ml}$, 定量下限为 $0.3 \mu\text{g/ml}$ ($S/N = 10$)。

2.1.3 精密度

根据所得标准曲线范围, 制备低、中、高 3 个浓

度的三聚氰酸和三聚氰胺的质量控制 (QC) 血浆样品, 按“样品处理”项下操作, 每一浓度进行 5 次分析, 连续测定 3 d, 根据当日的标准曲线, 计算 QC 样品的测得浓度, 根据 QC 样品结果计算本法的精密度, 结果见表 1。

表 1 LC-MS/MS 测定血浆中三聚氰酸和三聚氰胺含量的精密度、回收率

Table 1 Precision and Recovery rate of cyanuric acid and melamine in plasma by LC-MS/MS ($n = 5$)

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	三聚氰酸			三聚氰胺		
	日内精密度	日间精密度	回收率	日内精密度	日间精密度	回收率
0.9	0.91 ± 0.03	3.74%	97.4%	0.95 ± 0.09	9.17%	96.8%
5.0	5.43 ± 0.34	6.35%	98.6%	5.22 ± 0.31	5.86%	98.9%
50	54.35 ± 1.25	2.43%	99.4%	49.28 ± 0.13	0.30%	98.0%
平均		4.17%	98.5%		5.11%	97.9%

2.1.4 回收率

根据所得标准曲线范围, 制备低、中、高 3 个浓度的三聚氰酸和三聚氰胺的质量控制 (QC) 血浆样品, 加入一定浓度的三聚氰酸和三聚氰胺标准溶液, 涡流混合, 按“样品处理”项下操作, 获得相应峰面积。计算得到高、中、低 3 个浓度的提取回收率 (5 次测定的平均值) 及平均回收率, 结果见表 1。

2.2 肝组织分析方法确证

2.2.1 方法特异性

取未给受试物的大鼠肝组织匀浆 (空白肝组织), 按照血样品方法特异性项所述进行处理后, 进样检测得色谱图 4a、图 4b; 空白肝组织加入一定量三聚氰胺标准品、三聚氰酸标准品及其内标物的混合液 (即混合标准溶液) 经处理后检测, 得到色谱图

5a、图 5b;灌胃三聚氰胺和三聚氰酸后的大鼠肝组织匀浆,加入一定量内标物经处理后检测,得到色谱图 6a、图 6b。结果表明,大鼠肝组织中的内源性

物质在测定条件下不产生信号响应,不干扰三聚氰胺和三聚氰酸的测定,表明该方法测定肝组织中三聚氰胺和三聚氰酸有较高特异性。

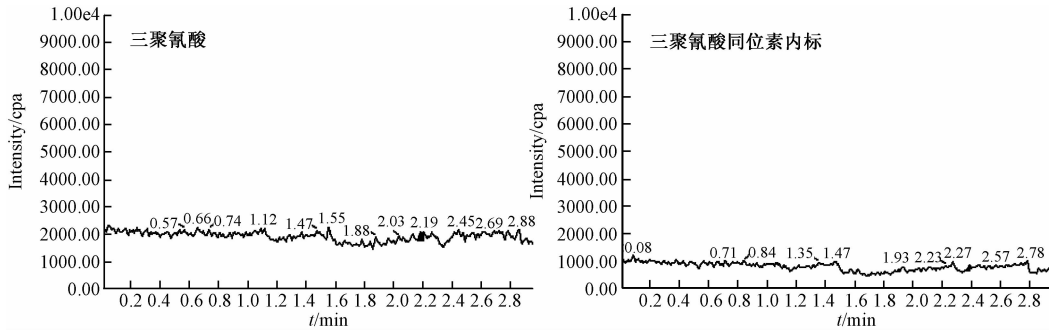


图 4a 空白肝组织定量离子色谱图——三聚氰酸

Figure 4a Quantitative ion chromatograph of blank liver tissue-cyanuric acid

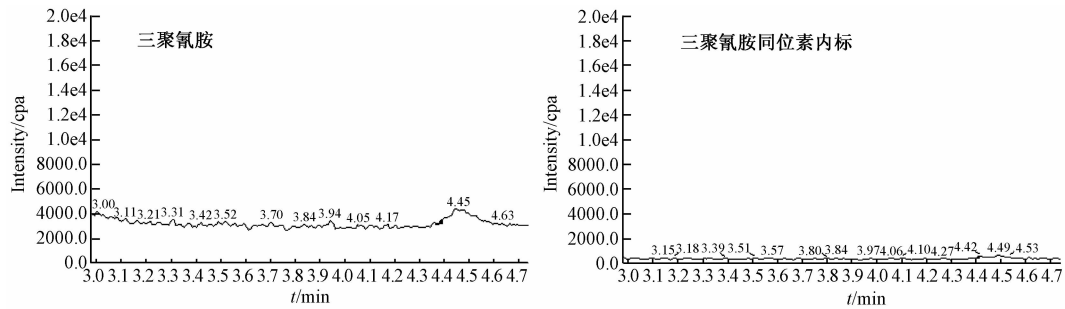


图 4b 空白肝组织定量离子色谱图——三聚氰胺

Figure 4b Quantitative ion chromatograph of blank liver tissue-melamine

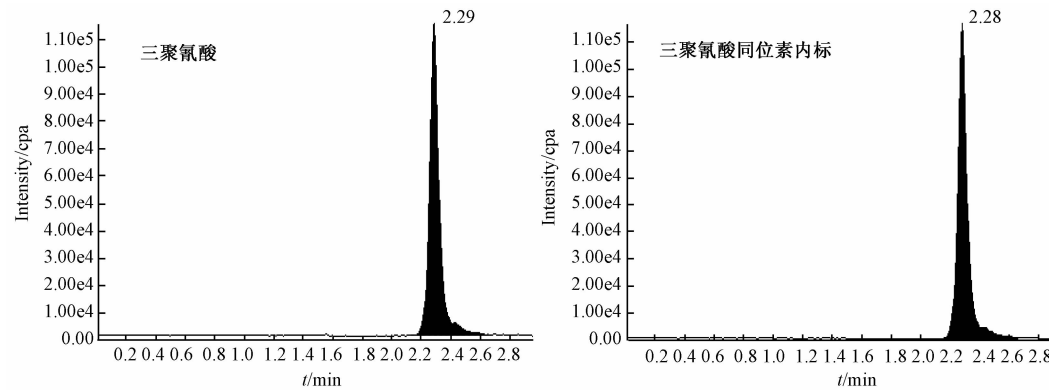


图 5a 空白肝组织 + 混合标准品定量离子色谱图——三聚氰酸

Figure 5a Quantitative ion chromatograph of blank liver tissue spiked with standard substances vs internal standards-cyanuric acid

2.2.2 标准曲线及其线性范围

将空白肝组织匀浆代替空白血浆,按照血浆样品的“标准曲线及其线性范围”项方法进行,所得三聚氰酸的标准曲线方程为 $y = 0.176x + 0.0108$ ($r = 0.9984$),线性范围为 $0.3 \sim 75 \mu\text{g/ml}$,定量下限为 $0.3 \mu\text{g/ml}$ ($S/N = 10$);三聚氰胺的标准曲线方程为 $y = 0.267x + 0.021$ ($r = 0.9985$),线性范围为 0.3

$\sim 75 \mu\text{g/ml}$,定量下限为 $0.3 \mu\text{g/ml}$ ($S/N = 10$)。

2.2.3 精密度

将空白肝组织匀浆代替空白血浆,按照血浆样品的“精密度”项方法进行,结果见表 2。

2.2.4 回收率

将空白肝组织匀浆代替空白血浆,按照血浆样品的“回收率”项方法进行,结果见表 2。

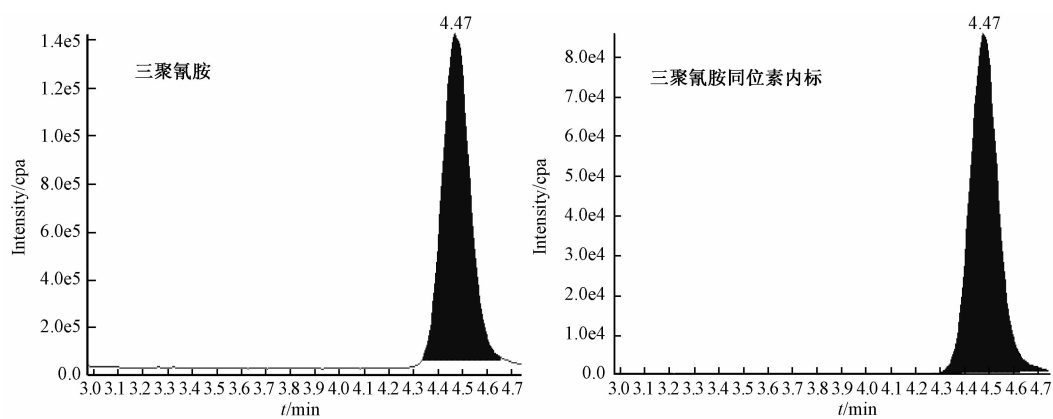


图 5b 空白肝组织 + 混合标准品定量离子色谱图——三聚氰胺

Figure 5b Quantitative ion chromatograph of blank liver tissue spiked with standard substances vs internal standards-melamine

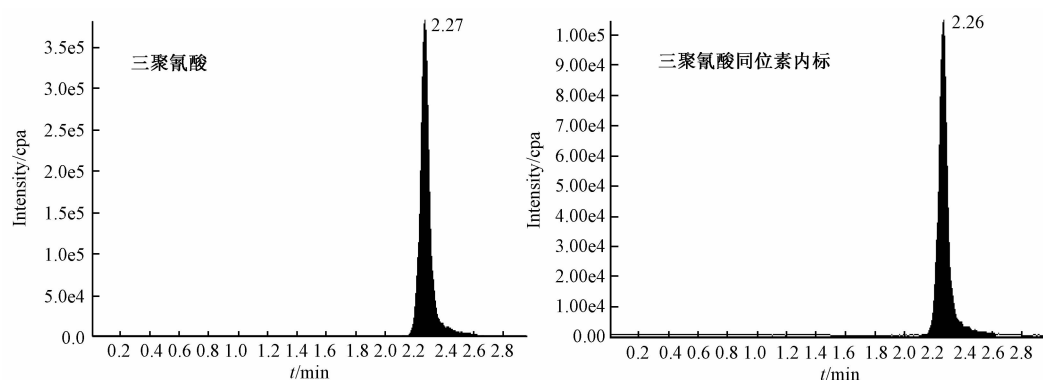


图 6a 灌胃大鼠肝组织 + 内标物定量离子色谱图——三聚氰酸

Figure 6a Quantitative ion chromatograph of rat liver tissue sample (after administration of cyanuric acid) spiked with internal standards-cyanuric acid

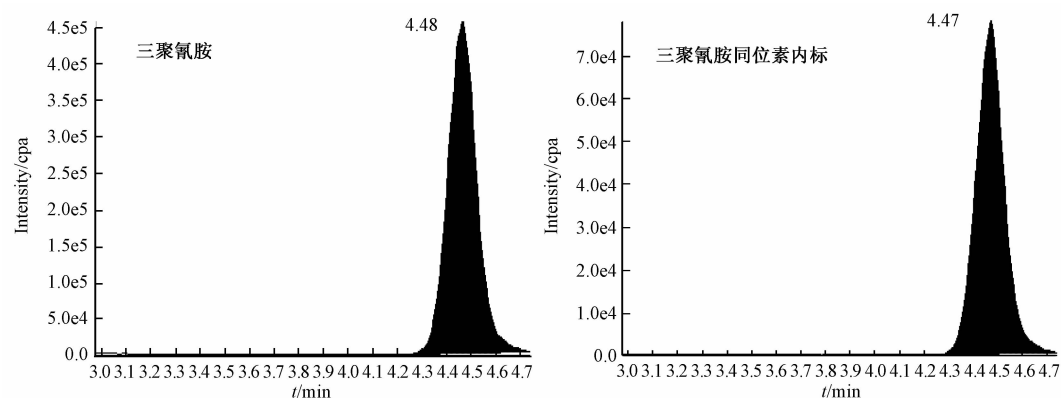


图 6b 灌胃大鼠肝组织 + 内标物定量离子色谱图——三聚氰胺

Figure 6b Quantitative ion chromatograph of rat liver tissue sample (after administration of melamine) spiked with internal standards-melamine

表 2 LC-MS/MS 测定大鼠肝组织中三聚氰酸和三聚氰胺的精密度、回收率

Table 2 Precision and Recovery rate of cyanuric acid and melamine in liver tissue by LC-MS/MS ($n = 5$)

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	三聚氰酸					三聚氰胺				
	日内精密度		日间精密度	回收率 (%)		日内精密度		日间精密度	回收率 (%)	
0.9	0.85 ± 0.04	5.14%	0.93 ± 0.08	4.50%	104.6	0.99 ± 0.02	2.21%	0.98 ± 0.03	3.36%	106.0
5.0	4.97 ± 0.23	4.55%	5.26 ± 0.29	4.03%	95.6	5.47 ± 0.13	1.42%	5.37 ± 0.31	3.27%	96.7
50	48.05 ± 1.78	3.70%	51.54 ± 3.82	2.84%	90.8	53.38 ± 2.55	1.31%	52.30 ± 3.52	1.12%	91.7
平均		4.46%		3.79%	97.0		1.65%		2.58%	98.1

3 讨论

目前对三聚氰胺和三聚氰酸同时检测的方法有气相色谱-质谱联用法(GC-MS)和液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)。采用GC-MS法需经过衍生,检测过程较为繁琐,衍生过程也会影响到检测的灵敏度和重复性^[8]。在已报道的HPLC-MS方法中,前处理一般都是采用三氯乙酸-乙腈提取,过滤,过柱,洗脱,这些方法在样品处理与净化阶段耗时耗人力,处理后样品浓度被稀释多倍,不利于痕量检测^[3-4];最近也出现了离心后经过滤膜直接进样测定,或者采用微透析方法进样,这样处理花费成本较高,而且有些方法所应用的色谱柱比较特殊、价格昂贵^[5-7]。本文采用二氯甲烷萃取,然后用乙腈沉淀蛋白,离心后取上清液进样,简化了样本处理过程,并在分析过程中采用两根普通色谱柱串联,让样本先经过前面的柱子进行粗分,使待测组分三聚氰胺、三聚氰酸与样本中其他在柱中有较强保留作用的杂质分离,粗分后的组份再经过后面柱子上分离,在短时间内将动物血浆和组织中与目标测定物结构相似的基质分离,避免了干扰。

在色谱条件选择时,考虑到三聚氰胺的极性较强,用RP-HPLC检测时需在流动相中加入离子对试剂,以改善其在反相柱上的保留行为,流动相若使用磺酸钠、庚烷磺酸钠、三氟乙酸等离子对试剂来增加保留性,由于这些离子对试剂与电喷雾接口兼容性较差,容易污染离子源,因此本实验通过色谱条件优化考察,选择加入甲酸的方法,以提高离子化效率,使三聚氰胺在色谱柱上能够较好保留,得到了较好的色谱峰和较高的灵敏度。另外,三聚氰胺的一级质谱的分子离子峰为 $m/z127$,以流动注射方式注入电喷雾后,分别在正离子、负离子模式下进行母离子全扫描后对比发现,三聚氰胺正离子模式的离子峰强度比负离子峰强度高约3个数量级;而三聚氰酸的一级质谱的分子离子峰 $m/z128$,则在负离子模式下的离子峰强度较高,因此采用按运行时间段切换正、负离子模式,对样本中的三聚氰胺、三聚氰酸可同时进行定量检测。

本文采用了同位素标记的三聚氰胺和三聚氰酸作为内标物,内标物和测定目标物在色谱柱的保留行为非常接近,二者在相同时间出峰,采用内标标准曲线法定量,提高了定量的准确度。对于给药大鼠的血浆样本,在 $0.3 \sim 75 \mu\text{g/ml}$ 范围内,三聚氰酸的标准曲线方程为 $y = 0.177x + 0.00131$ ($r = 0.9979$),三聚氰胺的标准曲线方程为 $y = 0.238x + 0.00742$ ($r = 0.9990$);在 $0.9, 5.0, 50 \mu\text{g/ml}$ 的添加水平,三聚氰酸的回收率为 $97.4\% \sim 99.4\%$,

变异系数为 $2.43\% \sim 6.35\%$ (日内)、 $1.70\% \sim 4.12\%$ (日间),三聚氰胺的回收率为 $96.8\% \sim 98.9\%$,变异系数为 $0.30\% \sim 9.17\%$ (日内)、 $0.75\% \sim 3.39\%$ (日间)。对于给药大鼠的肝组织样本,在 $0.3 \sim 75 \mu\text{g/ml}$ 范围内,三聚氰酸的标准曲线方程为 $y = 0.176x + 0.0108$ ($r = 0.9984$),三聚氰胺的标准曲线方程为 $y = 0.267x + 0.021$ ($r = 0.9985$);在 $0.9, 5.0, 50 \mu\text{g/ml}$ 的给药大鼠的血浆样本中,三聚氰酸和三聚氰胺的回收率分别为 $97.4\% \sim 99.4\%$ 、 $96.8\% \sim 98.9\%$,两者的变异系数为 $2.43\% \sim 6.35\%$ (日内)、 $1.70\% \sim 4.12\%$ (日间)和 $0.30\% \sim 9.17\%$ (日内)、 $0.75\% \sim 3.39\%$ (日间);在 $0.9, 5.0, 50 \mu\text{g/ml}$ 的给药大鼠肝组织样本中,三聚氰酸和三聚氰胺的回收率分别为 $90.8\% \sim 104.6\%$ 、 $91.7\% \sim 106.0\%$,对应的变异系数为 $3.70\% \sim 5.14\%$ (日内)、 $2.84\% \sim 4.50\%$ (日间)和 $1.31\% \sim 2.21\%$ (日内)、 $1.12\% \sim 3.36\%$ (日间)。综合以上所测得的方法学数据,可见均满足方法学验证的相关要求,低、中、高浓度的血浆和肝组织样品回收率均在 $90\% \sim 110\%$ 范围内,变异数值也均小于 10% 。因此该方法是同时检测动物体内三聚氰酸、三聚氰胺含量的较理想方法,可用于动物组织代谢和毒性研究中的含量监测和分析。

4 结论

本文建立了HPLC-MS/MS同时检测动物血浆、组织中三聚氰酸和三聚氰胺的方法,该方法样品前处理简单,基质干扰小,分析效率高,具有良好的精密度、准确度和特异性,是进行三聚氰酸、三聚氰胺在动物体内代谢和毒性研究的理想分析方法。

参考文献

- [1] RODRIGUEZ MONDAL A M, DESMARCHELIER A, KONINGS E, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method extension to quantify simultaneously melamine and cyanuric acid in egg powder and soy protein in addition to milk products [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58 (22): 11574-11579.
- [2] BATTAGLIA M, CRUYWAGEN C W, BERTUZZI T, et al. Transfer of melamine from feed to milk and from milk to cheese and whey in lactating dairy cows fed single oral doses [J]. J Dairy Sci, 2010, 93(11): 5338-5347.
- [3] BRAEKEVELT B P, LAU Y, FENG S, et al. Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant formula purchased in Canada by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Additives Contaminants: Part A, 2011, 28(6): 698-704.
- [4] CHAO Y Y, LEE C T, WEI Y T, et al. Using an on-line

- microdialysis/HPLC system for the simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy creamer[J]. *Anal Chim Acta*,2011,702:56-61.
- [5] CHAO Y Y, WEI Y T, LEE C T, et al. Membrane sampling with microdialysis coupled to HPLC/UV for on-line simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy coffee creamer[J]. *Anal Sci*,2011,27(10):1025-1030.
- [6] SUN H, QIN X, GE X, et al. Effective separation and sensitive determination of cyanuric acid, melamine and cyromazine in environmental water by reversed phase high-performance liquid chromatography[J]. *Environ Technol*,2011,32(3-4):317-323.
- [7] SUN P, WANG J Q, SHEN J S, et al. Residues of melamine and cyanuric acid in milk and tissues of dairy cows fed different doses of melamine[J]. *J Dairy Sci*, 2011,94(7):3575-3582.
- [8] TZING S H, DING W H. Determination of melamine and cyanuric acid in powdered milk using injection-port derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry with furan chemical ionization[J]. *J Chromatogr A*,2010,1217(40):6267-6273.
- [9] ZHANG M, LI S, YU C, et al. Determination of melamine and cyanuric acid in human urine by a liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,2010,878(9-10):758-762.
- [10] TZING S H, DING W H. Determination of melamine in rat plasma, liver, kidney, spleen, bladder and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2009,1216(44):7595-7601.
- [11] YANG F, MAO Y, ZHANG X, et al. LC-MS/MS method for the determination of melamine in rat plasma: Toxicokinetic study in Sprague-Dawley rats[J]. *J Dairy Sci*,2009,32(17):2974-2978.

实验技术与方法

超高效液相色谱同时测定食品中4种工业染料

谢维平, 欧阳燕玲, 黄盈煜, 陈春祝

(泉州市疾病预防控制中心理化检验科, 福建 泉州 362000)

摘要:目的 建立同时测定食品中酸性橙、碱性橙、碱性嫩黄、罗丹明 B 工业染料的方法。方法 样品用水-5% 氨水乙腈-正己烷混合溶剂提取净化, 采用 ZORBAX Extend C₁₈ (2.1 mm i. d. × 50 mm, 1.8 μm) 分离, 以乙腈—乙酸铵缓冲液梯度洗脱, 流速为 0.5 ml/min, 二极管阵列检测器检测酸性橙 (λ = 485 nm)、碱性橙及碱性嫩黄 (λ = 435 nm)、罗丹明 B (λ = 548 nm)。结果 4 种组分在 0.1 ~ 10.0 mg/L 范围内有良好的线性关系 (r > 0.999), 检测限为 0.006 4 ~ 0.019 mg/kg。在番茄沙司、腊肠、辣椒油 3 种不同食品基质中平均加标回收率为 70.0% ~ 102.7%, 相对标准偏差为 0.5% ~ 3.1%。结论 方法快速, 简单, 可应用于食品中酸性橙、碱性橙、碱性嫩黄、罗丹明 B 4 种工业染料的同时检测。

关键词:超高效液相色谱; 酸性橙; 碱性橙; 碱性嫩黄; 罗丹明 B; 食品

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)04-0329-04

Simultaneous determination of four industrial dyes in foods by ultra high performance liquid chromatography

Xie Weiping, Ouyang Yanling, Huang Yingyu, Chen Chunzhu

(Department of physical and chemical analysis, Quanzhou center for disease control
and prevention, Fujian Quanzhou, 362000, China)

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous determination of Orange 2, Aurine O, Chrysoidine G and Rhodamine B in foods by Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). **Methods** Samples were extracted and cleaned up with water - 5% ammonia acetonitrile-n-Hexane mixture solvents. UHPLC separation was achieved by using ZORBAX Extend C₁₈ (2.1 mm i. d. × 50 mm, 1.8 μm) with an mobile phase consisting of acetonitrile and acetate buffer, and gradient program was used at a flow rate of 0.5 ml/min. The detection wavelength was set at 485 nm for Orange 2, 435 nm for aurine O and chrysoidine G, while 548 nm for rhodamine B. **Results** There was a good linear relationship (r > 0.999) in the range of 0.1-10 mg/L for these four dyes. The limits of detection (LOD) were from 0.006 4 to 0.019 mg/kg respectively. The average recoveries for all four dyes in tomato sauce, sausage and chili powder

收稿日期: 2012-03-05

作者简介: 谢维平 男 副主任检验师 研究方向为理化检验 E-mail: xweiping2000@163.com