

超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺

蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 彭玉芬

(珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东 珠海 519015)

摘要 :饲料样品经1%三氯乙酸-二甲基亚砷提取, Waters Oasis MCX柱净化, 超高效液相色谱分离, 最终采用电喷雾串联四级杆质谱进行检测。结果表明, 三聚氰胺在饲料中的含量范围为10~5 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 线性关系良好($r > 0.99$)。在10~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加水平范围内的平均回收率为83%~94%, 相对标准偏差为4.2%~6.5%。该方法的检出限为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

关键词 :超高效液相色谱-串联质谱; 三聚氰胺; 饲料

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)03-0339-04 栏目类别 :研究论文

Determination of melamine residue in feeds by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry

CAI Qinren, OUYANG Yingyu, QIAN Zhenjie, PENG Yufen

(Technical Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract : A method for fast determination melamine residue in feeds was established. An ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) was used. The residue was quantified with multiple reaction monitoring (MRM) mode. The method was validated and good results were obtained with respect to precision, repeatability and spiked recovery. The limit of detection was 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for melamine, and the linear range was from 10 to 5 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries were between 83% and 94% in the spiked range of 10 - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the relative standard deviations (RSDs) were between 4.2% and 6.5%. The method has good repeatability and high sensitivity, and can be applied for the determination of melamine residue in feeds.

Key words : ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); melamine; feed

三聚氰胺(melamine) (结构式见图1), 简称三胺, 学名三氨基嘧啶, 别名蜜胺、氰尿酸胺、三聚酰胺, 是一种重要的氮杂环有机化工原料, 常被用于生产塑料、胶水和阻燃剂, 在部分亚洲国家也被用于制造化肥。近年来, 宠物饲料中发现三聚氰胺并导致宠物死亡的案例时有发生。美国食品和药品管理局(FDA)禁止将三聚氰胺用于宠物食品及动物饲料。因此, 建立一种快速的定性定量饲料中三聚氰胺残留的分析方法是十分必要的。

目前用于三聚氰胺的检测方法有高效液相色谱法(HPLC)^[1,2]、气相色谱-质谱法^[3]、液相色谱-质谱法^[4,5]等。根据欧盟委员会非强制执行法案

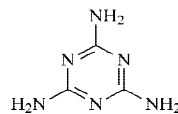


图1 三聚氰胺的结构式
Fig. 1 Structure of melamine

2002/657/EC的规定, 对禁用药物进行确证检测的方法必须能提供结构方面的信息, 且要达到该法案规定的4个确证点。而液相色谱法的灵敏度较低且无法提供结构信息, 不能满足这一要求; 气相色谱-质谱法能够进行确证分析, 但样品需经过复杂的前处理且需要衍生化; 液相色谱-质谱法灵敏度高, 抗

干扰能力强,可提供待测物的结构信息,因而是理想的三聚氰胺分析方法,但国内外关于三聚氰胺的液相色谱-质谱法报道不多,且都是采用传统的高效液相色谱技术进行分离,比较费时。本项研究工作采用超高效液相色谱(UPLC)进行分离,建立了饲料中三聚氰胺的超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)测定方法。该方法具有快速、准确、灵敏等优点,适合于生产过程监控和出口把关检测的高灵敏度确证分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪; Waters Micromass Quattro Premier XE 三重四极杆质谱仪,配电喷雾离子源(ESI); Agilent 固相萃取仪; JOUAN MR23i 离心机。

Waters Oasis MCX 萃取小柱(3 mL, 60 mg)。三氯乙酸、二甲基亚砷等均为分析纯; 乙酸铵、乙腈等均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。水为超纯水。

1.2 标准工作液的配制

将三聚氰胺标准品(Sigma 公司,纯度大于 99%)用少量二甲基亚砷溶解,再用甲醇(色谱纯)配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,并根据需要稀释成适当质量浓度的标准工作液,于 4 °C 下保存,有效期为 2 个月。

1.3 色谱条件

色谱柱:Acquity BEH HILIC(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm)。流动相:溶剂 A 为水,溶剂 B 为乙腈;梯度洗脱程序:在 0 至 1.5 min 内溶剂 A 的体积分数从 98% 线性减少到 50%,1.6 min 时溶剂 A 的体积分数增至 98%,平衡 1.5 min;流速 0.3 mL/min。柱温 35 °C,进样量 2 μL。

1.4 质谱条件

离子源:ESI(+);毛细管电压:3.20 kV;离子源温度:100 °C;锥孔反吹气流量:40 L/h;脱溶剂气温度:350 °C;脱溶剂气流量:900 L/h。第一重四极杆和第二重四极杆的低端分辨率及高端分辨率均为 15 V;锥孔电压和碰撞能量见表 1。检测方式为多反应监测扫描模式(MRM)。

表 1 多反应监测扫描模式检测三聚氰胺的部分质谱参数

Table 1 Some parameters of multiple reaction monitoring detection for melamine

Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Cone voltage/eV	Collision energy/eV	Relative abundance/%
127.1	85.1*	37	17	100
	68.2	37	25	18

* The ion was used for quantification.

1.5 样品处理

准确称取 5.00 g 已粉碎好的饲料样品,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 20 mL 1% 三氯乙酸(含 10% 二甲基亚砷),超声提取 15 min,旋涡振摇 5 min,以 6 000 r/min 的速率离心 5 min。取 1 mL 上清液与 3 mL 水混合后待净化。将 Waters Oasis MCX 萃取小柱依次用 3 mL 的甲醇、水、0.03 mol/L 盐酸平衡后,加入待净化的上清液,依次用 3 mL 0.03 mol/L 盐酸、甲醇淋洗,再用 3 mL 5% 氨水甲醇洗脱,于 45 °C 下吹氮浓缩至近干。准确加入 5 mL 10% 乙腈溶解,旋涡混匀 15 s,过 0.22 μm 滤膜,滤液供液相色谱与质谱联用仪测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

首先采用 1 mg/L 的三聚氰胺标准溶液以手动注射的方式在 ESI 正离子模式下进行母离子全扫描,确定三聚氰胺的分子离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 127.1,与文献[3]报道一致。然后,以 m/z 127.1 为母离子,对其子离子进行全扫描(见图 2),在“1.4”节所述质谱条件下,主要产生 m/z 109.9, 85.1, 68.2, 60.2 等子离子。其中, m/z 109.9 为脱 NH_3 峰($[M + H - NH_3]^+$), m/z 85.1 为三聚氰胺开环分子重排失去 H_2N-CN 的碎片离子峰($[M + H - H_2N-CN]^+$), m/z 68.2 应为 m/z 85.1 脱去 NH_3 的碎片离子峰($[M + H - H_2N-CN - NH_3]^+$), m/z 60.2 应为三聚氰胺开环分子重排失去 $HNCN-CN$ 的碎片离子峰($[M + H - HNCN-CN]^+$)。选取丰度最强的子离子 m/z 85.1 和 m/z 68.2 作为三聚氰胺的监测离子,最后以多反应监测正离子模式优化毛细管电压、锥孔电压、源温度、脱溶剂温度、碰撞能量、质谱分辨率等质谱参数。三聚氰胺以子离子 m/z 85.1 和 m/z 68.2 及二者的相对丰度比(100:18,见表 1)来定性,以子离子 m/z 85.1 为定量离子,峰面积外标法定量。

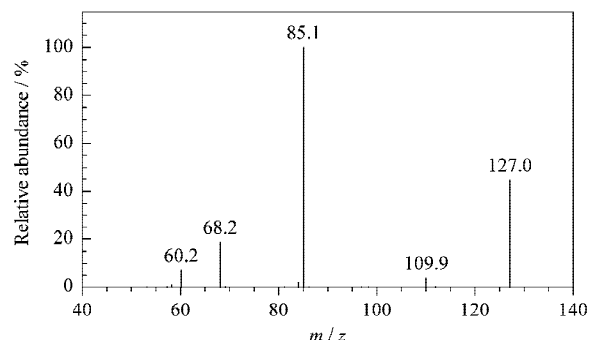


图 2 三聚氰胺的二级质谱图

Fig. 2 MS/MS spectrum of melamine

2.2 色谱条件的优化

三聚氰胺是强极性化合物,在普通的 C_{18} 柱上保留值很低,接近于死时间流出,很难进行分析^[6]。为了增加三聚氰胺在 C_{18} 柱上的保留,必须选用洗脱能力非常弱的流动相,这是因为含水量越高的流动相其分析物与固定相之间的疏水作用越强,通常选用的流动相有水-甲醇、水-乙腈、醋酸铵缓冲液-甲醇、0.1% 甲酸溶液-甲醇等。由于三聚氰胺极易与 C_{18} 柱上残余的硅羟基形成氢键,使得峰形拖尾,因此需要在流动相中加入辛烷磺酸钠、TFHA(tridecafluoroheptanoic acid)等离子对试剂来改善峰形^[4,5,7],也有报道在样品液或流动相中加酸可以增加 C_{18} 柱对三聚氰胺的保留和改善峰形^[8]。本研究发现三聚氰胺在 C_{18} 柱上的保留时间变化比较大,可能是流动相含水比例太高(> 90%)使得样品溶液中有有机相比例的细微变化就能对保留时间造成比较大影响的缘故;同时发现,在流动相中加入离子对试剂或高浓度盐后离子抑制现象非常明显,这些因素都对三聚氰胺的定量和定性分析造成一定的干扰。因此本研究选择对极性化合物有很好保留的 ACQUITY BEH HILIC 色谱柱进行分离,获得了稳定的保留时间;采用纯水与乙腈作为流动相梯度洗脱,获得了理想的峰形(见图3)。研究结果表明,采用纯水与乙腈作为流动相时质谱信号最强,若在流动相中添加甲酸、乙酸或醋酸铵都会使信号降低,这可能是三聚氰胺极易电离,离子源中离子浓度过高会抑制三聚氰胺的电离,从而导致离子化效率下降的缘故。与传统的 HPLC 分离方法比较,UPLC 的分离使得分析时间大大缩短。

2.3 样品处理条件的选择

三聚氰胺是极性化合物,不溶于水,微溶于弱酸或弱碱、甲醇、乙醇等,在二甲基亚砷中有很好的溶解性^[9]。常见的提取方法有:磷酸盐缓冲溶液(pH 2)提取、稀盐酸提取、20% 二乙胺提取、甲醇提取等,本研究工作中以 1% 三氯乙酸作为提取溶剂,能有效地沉淀蛋白,同时加入 10% 二甲基亚砷来提高提取回收率。由于三聚氰胺溶解性很弱,提取时间对回收率影响很大,因此比较了不同时间的提取效率,最终确定超声提取 15 min 效果最佳。三聚氰胺是碱性化合物,在 Waters Oasis MCX 固相萃取小柱上净化效果最好。在酸性条件下上样,使待测物保持正离子态而被吸附在固相萃取柱上,依次用 3 mL 0.03 mol/L 盐酸、甲醇淋洗,再用 3 mL 5% 氨水甲醇洗脱能有效去除基质干扰,可获得较高的回收率和较好的重现性。

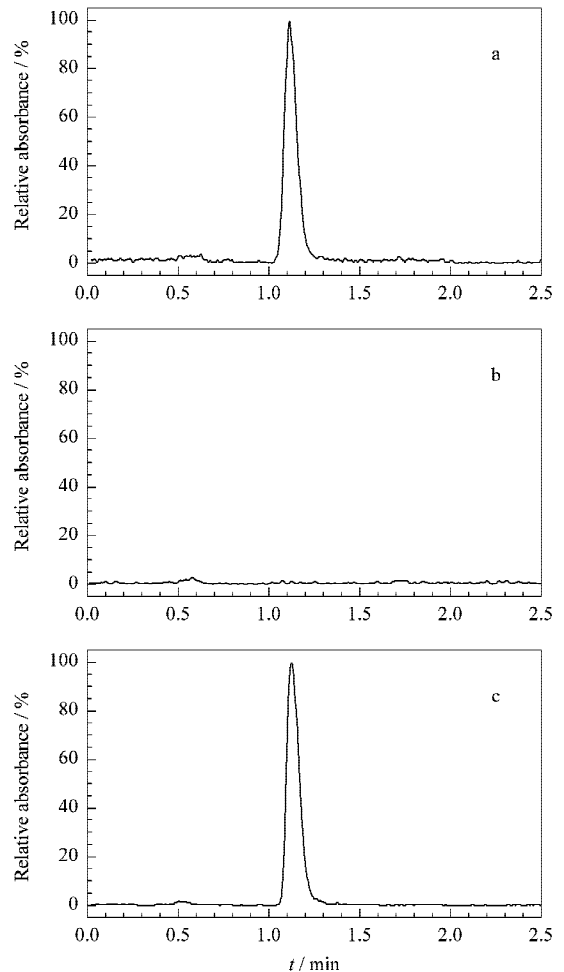


图3 (a)三聚氰胺标准溶液、(b)空白饲料及(c)加标饲料(加标水平为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion current chromatograms of (a) melamine standard solution, (b) a blank feed sample and (c) a feed sample spiked with 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of the standard

2.4 方法的检出限、线性范围及重现性

按“1.2”节所述方法分别配制质量浓度为 0.5, 1, 5, 10, 50, 250 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的三聚氰胺标准溶液,按照上述实验方法在 0.5 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{L}$ 质量浓度范围(相当于饲料样品中三聚氰胺的残留量为 10 ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)内得到三聚氰胺的线性回归方程为 $Y = 700.3X - 32$, $r = 0.9996$ 。式中 X 表示相应的三聚氰胺的质量浓度($\mu\text{g}/\text{L}$), Y 表示质谱响应值, r 表示相关系数。在空白饲料样品中添加三聚氰胺标准溶液,按信噪比(S/N)大于 10 计算,本方法的检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

取经检验不含三聚氰胺的样品,分别按样品中 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 含量水平添加一定量的三聚氰胺标准溶液,每一添加浓度重复 10 份样品,按上述实验方法测定,得到 10 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平范围的回收率见表 2。

表 2 三聚氰胺的回收率和重现性(n = 10)

Table 2 Recovery and repeatability of melamine (n = 10)

Spiked/(μg/kg)	Recovery/%	RSD/%
10	83	6.5
50	87	5.2
100	94	4.2

3 结论

实验结果表明,本文建立的 UPLC-ESI-MS/MS 方法具有特异性强、前处理简单、重复性好等特点,与传统的 HPLC 分离方法比较,分析时间大大缩短,定量下限为 10 μg/kg。该方法非常适合饲料中三聚氰胺的快速检测。

参考文献:

[1] Tadeo J L , Sanchez-Brunete C , Perez R A , et al. J Chroma-

togr A , 2000 , 882(1/2) : 175

[2] Sugita T , Ishiwata H , Yoshihira K , et al. Bull Environ Contam Toxicol , 1990 , 44 : 567

[3] FDA/OR A Forensic Chemistry Center. GC-MS screen for the presence of melamine and cyanuric acid. [2007-04-10]. [http : // www . fda . gov / cvm / MelaminePresence . htm](http://www.fda.gov/cvm/MelaminePresence.htm)

[4] Sancho J V , Ibanez M , Grimalt S , et al. Anal Chim Acta , 2005 , 530 : 237

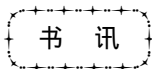
[5] Sancho J V , Pozo O J , Zamora T , et al. J Agric Food Chem , 2003 , 51(15) : 4 202

[6] Ni Q Y. Fujian Analysis & Testing (倪沁颜. 福建分析测试) , 2008 , 17(1) : 57

[7] Yokley R A , Mayer L C , Rezaaiyan R , et al. J Agric Food Chem , 2000 , 48 : 3 352

[8] Ding T , Xu J Z , Li J Z , et al. Chinese Journal of Chromatography (丁涛,徐锦忠,李健忠,等. 色谱) , 2008 , 26(1) : 6

[9] Ren B Z , Li C , Yuan X L , et al. Journal of Chemical Industry and Engineering (China) (任保增,李晨,袁晓亮,等. 化工学报) , 2003 , 54(7) : 1 001



液相色谱溶剂系统的选择与优化

由沈阳药科大学孙毓庆教授与中国药科大学胡育筑教授主编、华夏英才基金(第十一批) 资助的《液相色谱溶剂系统的选择与优化》已于 2008 年 1 月由化学工业出版社出版。

液相色谱法中溶剂系统(或背景电解质溶液) 常是分离成败的关键。本书是国内第一本阐述液相色谱溶剂系统的权威论著,其中详细论述了如何根据样品性质与分析要求,按照分子间作用力的关系,正确地选择溶剂并组成溶剂系统并进行优化,选出最佳溶剂系统,以获得事半功倍的分析效果。本书共三篇 12 章。第一篇“ 各类液相色谱法的基础理论与溶剂系统 ”,主要介绍液相色谱法分离基础,各类高效液相色谱法、薄层色谱法及液相色谱-质谱法(LC-MS) 的溶剂系统,溶剂的基本性质与应用,以及溶剂的性质对色谱法分析结果的影响等;第二篇“ 溶剂系统的优化方法 ”,介绍溶剂系统的分类、选择、优化方法及色谱方法的标准化与验证;第三篇“ 电动微分析法的基本原理与溶剂系统 ”,简介毛细管电泳法(CE) 及毛细管电色谱法(CEC) 的溶剂系统的选择与优化方法。各章中还包括大量分析样品的色谱分析条件,如《中华人民共和国药典》与《美国药典》品种的法定高效液相色谱分析方法以及某些应用实例。本书涵盖了各种色谱法常用溶剂的物理性质与色谱性质、溶剂系统的组成原则及最常用的优化方法等。可供广大液相色谱及药物分析工作者学习参考。

本书 B5 开本 432 页;书号 978-7-122-00075-0,定价 59 元,由化学工业出版社出版(100011,北京东城区青年湖南街 13 号)。详情可登录 [www . cip . com . cn](http://www.cip.com.cn) 查询。联系电话 : 010-64518888 , 64518899。