

鸡蛋中环丙氨嗪及其代谢物三聚氰胺残留检测 超高效液相色谱 - 串联质谱法研究

张 骊, 孙 雷, 王树槐, 汪 霞

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2009-01-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2009)02-0020-04 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 建立了鸡蛋中环丙氨嗪及其代谢物三聚氰胺残留检测的超高效液相色谱 - 串联质谱 (UPLC - MS/MS) 方法。液相色谱条件: 色谱柱为 Waters BEH HLC 柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 - 0.01 mol/L 乙酸铵溶液, 梯度洗脱; 柱温 30 °C; 流速 0.3 mL/min; 进样量 10 μL。质谱条件为: 电喷雾离子源 (ESI⁺), 多反应监测 (MRM) 方式进行采集。结果表明: 在 2.5 ~ 100 μg/L 的基质匹配系列混合标准溶液内环丙氨嗪和三聚氰胺的相关系数 $R^2 > 0.998$; 方法检测限为 1 μg/L, 定量限为 2.5 μg/L; 从 10、50、100 μg/kg 三个添加浓度检测结果可以看出, 方法的平均回收率为 74.6% ~ 91.4%, 批内批间 RSD 值均 < 15%。

[关键词] 环丙氨嗪; 三聚氰胺; 鸡蛋; 超高效液相色谱 - 串联质谱法

Determination of Cyromazine and Its Metabolin Melamine Residues in Eggs by UPLC - MS/MS

ZHANG Li, SUN Lei, WANG Shu - huai, WANG Xia

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; China)

Abstract: A UPLC - MS/MS method was established for the determination of cyromazine and its metabolin melamine residues in eggs. UPLC condition: the chromatography column is Waters BEH HLC column of 50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm; mobile phase is acetonitrile and 0.01 mol/L ammonium acetate; column temperature is 30 °C; flow rate is 0.3 mL/min; injection volume is 10 μL. Mass spectrometry condition: ESI⁺ and MRM mode. The calibration curves were good linear between the peak areas and concentrations from 2.5 ~ 100 μg/L, the correlation coefficient R^2 was higher than 0.998. The detection limit of the method was 1 μg/L, and the limit of quantification was 2.5 μg/L. The average recoveries from spiked samples at the three concentrations of 10, 50, 100 μg/kg ranged from 74.6% ~ 91.4% ($n = 5$), and intra- and inter-batch variation coefficients were less than 15%.

Key words: cyromazine; melamine; eggs; UPLC - MS/MS

环丙氨嗪 (cyromazine) 是一种在世界范围内养殖业和种植业中广泛使用的昆虫生长抑制剂类杀虫剂, 化学结构式见图 1。该药可控制几乎所有威

胁集约化养殖场的蝇类, 包括家蝇、黄腹厕蝇、光亮扁角水虻和厩螯蝇等, 并可控制跳蚤及防止羊身上的绿蝇属幼虫等。临床上环丙氨嗪主要作为预混

作者简介: 张 骊 (1982年 -), 女, 硕士, 实习研究员, 主要从事兽药残留方面的研究工作。E-mail: zhangli@ivdc.gov.cn

剂拌入全价饲料中,通过饲喂方式进入动物体内,大部分以原形及其代谢产物三聚氰胺(melamine)的形式随粪便排出体外沉积在粪便中,从而在粪便中杀灭蝇蛆等。已有报道表明环丙氨嗪能够造成实验动物体重下降,肝脏肿大,血细胞减少,使动物胎儿体重减轻,存活率下降等。美国 EPA 在 1993 年将环丙氨嗪列为具有潜在致癌性的化合物,其代谢物三聚氰胺能够引起小鼠膀胱肿瘤等,因此美国 and 我国都对环丙氨嗪在动物性食品中的限量做了严格规定,在牛奶、羊、禽肌肉、脂肪和动物副产品中的 MRL 为 50 $\mu\text{g/kg}$ 。

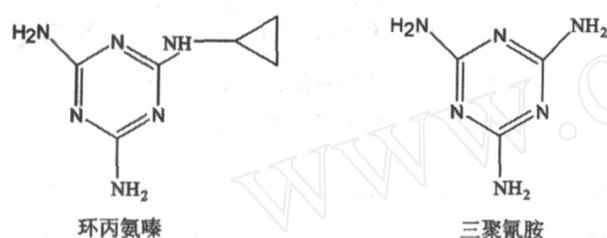


图 1 环丙氨嗪和三聚氰胺的化学结构式

国内外关于动物源食品中环丙氨嗪残留检测方法的报道较少。本文制定了鸡蛋中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺残留检测的 LC-MS/MS 确证方法,该方法简便、灵敏度高且专属性强,为该药物的残留监控提供了科学依据。

1 试剂与材料

1.1 仪器 ACQUITY UPLC - Quattro Premier XE 质谱联用仪, Waters 公司; AE260 电子天平, Mettler Toledo 公司; Biofuge Strators 高速冷冻离心机, 贺利氏公司; Organomation Associates 氮吹仪, Jnc 公司; SR4 漩涡混合器, IKA 公司。固相萃取装置, Supelco 公司; Oasis MCX 小柱, 60 mg/3cc, Water 公司。

1.2 药品和试剂 环丙氨嗪、三聚氰胺, 纯度均大于 98.0%, 均购自 Dr Ehrenstorfer 公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, MERCK 公司; 三氯乙酸为分析纯; 所用为超纯水。

1.3 对照溶液配制 精密称定环丙氨嗪和三聚氰胺适量, 置于不同 10 mL 棕色量瓶中, 用 50% 乙腈溶液溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液; 各取标准储备液适量置同一 10 mL 棕色量瓶中, 用乙腈溶液逐步稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。

1.4 测定方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 BEH HLC 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 + 0.1 mol/L 的乙酸铵水溶液, 梯度为 0 ~ 2.5 min, 95% A 线性变化至 80% A; 2.5 ~ 4 min, 维持 95% A; 流速 0.3 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI⁺), 毛细管电压为 3.0 kV, 萃取电压为 3V, RF 透镜电压为 1V, 源温为 110 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂温度为 350 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流速为 650 L/h, 锥孔反吹气流速为 50 L/h。多反应监测离子情况见表 1。

表 1 定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔 电压 /V	碰撞 能量 /eV
环丙氨嗪	166.9 > 84.6	66.9 > 84.6	35	18
	166.9 > 124.8			18

1.4.3 定性与定量 该方法定性需满足四个条件:

试剂空白和样品空白不能出现与阳性对照相同的离子峰; 特征离子色谱峰信噪比 (S/N) 都在 3:1 以上; 试样色谱峰保留时间应与校正溶液的一致, 容许偏差为 $\pm 2.5\%$; 检测到的离子丰度比应与校正溶液的一致, 容许偏差为 $\pm 50\%$ 。定量时标准和内标都以响应强度最强离子对进行计算。

1.4.4 标准曲线绘制 分别精密量取适量环丙氨嗪和三聚氰胺标准工作液, 用纯乙腈制得浓度为 2.5、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 系列对照溶液, 从中各取 1.0 mL, 分别溶解空白试料经提取、净化及浓缩后的残余物, 充分混匀, 作为基质匹配系列混合标准溶液, 以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标, 对照溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.4.5 样品前处理过程 准确称取 (2 $\pm$ 0.02) g 试料, 置 50 mL 离心管内, 加 3% 三氯乙酸溶液 18 mL, 涡旋混合 30 s, 超声提取 10 min, 取出静置 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 上层溶液作为备用溶液。MCX 小柱依次用甲醇、水各 3 mL 预洗; 取备用液 10 mL 过柱, 用 2% 甲酸水溶液、甲醇各 3 mL 淋洗, 真空抽干; 用 5% 氨化甲醇溶液 3 mL 洗脱, 真空抽干, 收集洗脱液, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干, 残余物用 95% 乙腈水溶液 1.0 mL 溶解, 过滤膜后供液相色谱 - 串联质谱仪测定。

1.4.6 方法灵敏度确定 将适量混合标准溶液加

入到空白试料中,经上述方法进行前处理后,用 LC-MS/MS 检测,观察药物特征离子质量色谱峰信噪比 (S/N) 和对应药物浓度, $S/N > 3$ 者定其为方法的检测限; $S/N > 10$ 者定其为方法的定量限。

1.4.7 准确度和精密度的测定 采用标准添加法,在空白试料中添加低、中、高三个不同浓度药物进行回收率试验;各浓度进行 5 个样品平行试验,重复 3 次,求批内、批间 RSD 。

2 结果

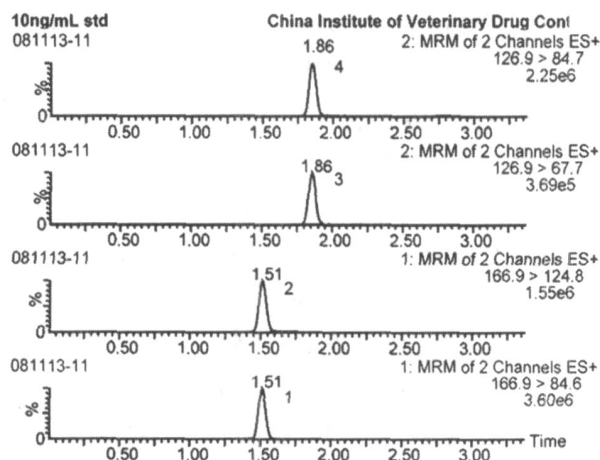
2.1 标准曲线 鸡蛋基质匹配标准溶液的回归方程及相关系数 (见表 2) 表明:环丙氨嗪和三聚氰胺在 $2.5 \mu\text{g/L} \sim 100 \mu\text{g/L}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系,相关系数 R^2 大于 0.998。

表 2 环丙氨嗪和三聚氰胺的回归方程和相关系数

药物	浓度范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回归方程	相关系数 R^2
环丙氨嗪	2.5 ~ 100	$Y = 8658.5X + 34318$	0.9990
三聚氰胺	2.5 ~ 100	$Y = 4990.8X + 19580$	0.9984

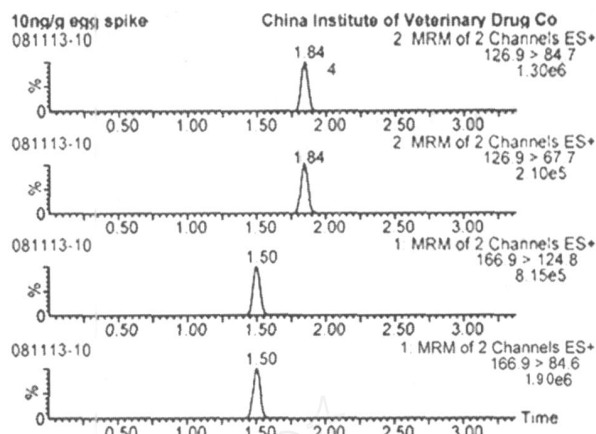
2.2 方法灵敏度 将适量混合标准溶液加入到空白试料中,经上述方法进行前处理后,测得环丙氨嗪和三聚氰胺在鸡蛋中的检测限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $2.5 \mu\text{g/kg}$ 。

$10 \mu\text{g/L}$ 对照溶液和 $10 \mu\text{g/kg}$ 鸡蛋添加试液中环丙氨嗪和三聚氰胺特征离子质量色谱图见图 2 和图 3。



1 - 环丙氨嗪得到的特征离子 ($166.9 > 84.6$); 2 - 环丙氨嗪得到的特征离子 ($166.9 > 124.8$); 3 - 三聚氰胺得到的特征离子 ($126.9 > 67.7$); 4 - 三聚氰胺得到的特征离子 ($126.9 > 84.7$)

图 2 $10 \mu\text{g/L}$ 对照溶液中药物特征离子质量色谱图



1 - 环丙氨嗪得到的特征离子 ($166.9 > 84.6$); 2 - 环丙氨嗪得到的特征离子 ($166.9 > 124.8$); 3 - 三聚氰胺得到的特征离子 ($126.9 > 67.7$); 4 - 三聚氰胺得到的特征离子 ($126.9 > 84.7$)

图 3 空白鸡蛋中添加 $10 \mu\text{g/kg}$ 药物得到的特征离子质量色谱图

2.3 方法精确度 采用标准添加法,在空白鸡蛋中添加 $10, 50, 100 \text{ ng/g}$ 3 个不同浓度的两种混合组分进行回收率试验,平均回收率为 $74.6\% \sim 91.4\%$,批内批间 RSD 值均小于 15% 。结果见表 3。

3 讨论

3.1 前处理条件的确定 环丙氨嗪和三聚氰胺的强极性和碱性决定了其提取溶剂一般都选用极性较强的有机溶剂、缓冲溶液、有机溶剂与水的混合溶液等,已报道的提取溶剂有甲醇、己烷磺酸钠缓冲液、乙腈 + 水溶液 (1:1)、甲醇 + 水溶液 (9:1)、稀盐酸溶液等^[1-4]。由于样品中含有大量的蛋白质等干扰,因此在进行提取时要加入蛋白质沉淀剂来除去蛋白质,已报道的蛋白质沉淀剂有三氯乙酸、醋酸铅、醋酸锌、亚铁氰化钾等。对于基质复杂的样品,还需用固相萃取方法做进一步净化,常用的固相萃取柱有 Oasis MCX 小柱、Strata-X-C 小柱和 Cleanert PCX 小柱等阳离子交换柱^[5-8]。本方法先后尝试了用乙腈、不同浓度的三氯乙酸溶液和缓冲液等多种提取方法,最终确定了以 3% 三氯乙酸溶液提取, Oasis MCX 固相萃取柱进行净化的前处理方法,获得了满意的结果。

3.2 色谱柱的选择 由于环丙氨嗪和三聚氰胺属于强极性碱性药物,在普通 C_{18} 等色谱柱上几乎没有保留,本方法采用 Waters 公司的针对强极性碱性化合物的 HLC 色谱柱,采用大比例的有机溶剂作为流动相,溶解样品时也使用大比例的有机溶剂,有效地保留和分离了鸡蛋中这两种药物。

表 3 空白鸡蛋中添加药物后得到的回收率及批内批间 RSD

药物名称	添加浓度 / (ng · g ⁻¹)	测定批次	平均回收率 / %	批内 RSD / %	批间 RSD / %
环丙氨嗪	10	1	83.5	9.8	12.6
		2	80.1	6.9	
		3	78.4	7.5	
	50	1	84.7	8.7	8.4
		2	86.9	10.5	
		3	82.3	9.2	
	100	1	88.6	7.9	6.7
		2	90.0	8.0	
		3	91.4	5.8	
三聚氰胺	10	1	74.6	11.6	9.7
		2	75.8	13.4	
		3	79.7	8.8	
	50	1	80.3	6.4	7.3
		2	78.9	9.9	
		3	83.2	10.2	
	100	1	86.6	9.0	5.9
		2	88.9	6.3	
		3	89.4	8.1	

参考文献:

- [1] Sancho J V, M Ibanez, S Grimalt, *et al* Residue Determination of Cyromazine and Its Metabolite Melamine in Orchard Samples by On-line Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530: 237 - 243.
- [2] Filigenzi M S, Tor E R, Poppenga R H, *et al* The Determination of Melamine in Muscle Tissue by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21 (24): 4027 - 4032.
- [3] Andersen W C, Tumpseed SB, Karbiwnyk CM, *et al* Determination and Confirmation of Melamine Residues in Catfish, Trout, Tilapia, Salmon and Shrimp by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(12): 4340 - 4347.
- [4] Filigenzi M S, Puschner B, Aston L S, *et al* Diagnostic Determination of Melamine and Related Compounds in Kidney Tissue by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17): 7593 - 7599.
- [5] 丁涛, 徐锦忠, 李健忠, 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, 26(1): 6 - 9.
- [6] 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺 [J]. *色谱*, 2008, 26(3): 339 - 342.
- [7] 黄芳, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 高效液相色谱 - 质谱法对饲料及食品添加剂中三聚氰胺的测定 [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(3): 313 - 315.
- [8] 李爱军, 张代辉, 马书民, 等. 液相色谱 - 串联质谱法测定饲料中三聚氰胺残留 [J]. *分析化学*, 2008, 36(5): 699 - 701.

中华人民共和国农业部公告第 1149号

公布的人畜共患传染病名录

牛海绵状脑病、高致病性禽流感、狂犬病、炭疽、布鲁氏菌病、弓形虫病、棘球蚴病、钩端螺旋体病、沙门氏菌病、牛结核病、日本血吸虫病、猪乙型脑炎、猪链球菌病、旋毛虫病、猪囊尾蚴病、马鼻疽、野兔热、大肠杆菌病 (O₁₅₇: H₇)、李氏杆菌病、类鼻疽、放线菌病、肝片吸虫病、丝虫病、Q热、禽结核病、利什曼病

来自中国兽药信息网: http://www.ivdc.gov.cn/gg/200902/t20090209_31549.htm [2009 - 02 - 04]