

超高效液相色谱-质谱/质谱测定

禽蛋制品中三聚氰胺

胡梅,王骏*,张卉,张喜琦,祝建华

(山东省产品质量监督检验研究院/国家加工食品质量监督检验中心,山东 济南 250100)

摘要:建立了超高效液相色谱-质谱/质谱测定禽蛋制品中三聚氰胺的方法。用2%乙酸溶液提取试样中的三聚氰胺,提取液经乙腈稀释后,以超高效液相色谱-质谱/质谱法测定。三聚氰胺的最低检测限为0.05 mg/kg,加标回收率为89.4%~98.3%,相对标准偏差为3.35%~6.37%。

关键词:超高效液相色谱-质谱/质谱;禽蛋制品;三聚氰胺

中图分类号:0657.7⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-4942(2010)01-0090-04

Determination of Melamine in Poultry Egg Products by UPLC-MS/MS

HU Mei, WANG Jun*, ZHANG Hui, ZHANG Xi-qi, ZHU Jian-hua

(Shandong Supervision & Inspection Institute for Product Quality /

National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food, Jinan 250100, China)

Abstract A method for determination of melamine in poultry egg products by UPLC-MS/MS was established. The sample was extracted with 2% acetic acid solution, diluted with acetonitrile, and then detected by UPLC-MS/MS. The detectable limit of melamine was 0.05 mg/kg. The recovery of melamine was 89.4%~98.3% with the RSD of 3.35%~6.37%.

Key words UPLC-MS/MS; Poultry egg products; Melamine

禽蛋制品包括咸鸭蛋、松花蛋等,作为我国传统食品,由于味道鲜美、营养丰富,长期以来受到广大群众的喜爱。三聚氰胺简称三胺,学名三氨基三嗪,别名蜜胺、氰尿酸胺,是一种重要的氮杂环有机化工原料,白色结晶粉末,无味,常用于生产塑料、胶水、阻燃剂和化肥。由于不法商贩将三聚氰胺添加到禽类饲料中,通过禽类的代谢而残留于禽蛋中。关于禽蛋中三聚氰胺的检测方法,国内外尚无相关的研究报道。目前报道的食品或饲料中三聚氰胺的检测方法主要有液相色谱法^[1,2]、液质联用法^[1,3,4]、气质联用法^[1,5]、酶联免疫法^[6]等,由于基质复杂,均需经过固相萃取净化或衍生化,操作繁琐。本文在前人研究的基础上,通过大量试验,探索了禽蛋制品中三聚氰胺的

快速测定方法,确定了以酸性提取剂提取,乙腈沉淀蛋白,免固相萃取净化,超高效液相色谱-质谱/质谱定性、定量测定和确证的方法,应用于大量样品检测,效果理想。

1 材料与方

1.1 试剂与材料

乙腈:色谱纯;冰乙酸:分析纯;2.0%乙酸溶液;乙酸铵:LC-MS用添加剂;微孔滤膜:孔径0.22 μm,有机相;三聚氰胺标准品:纯度为99.7%;三聚氰胺标准储备溶液:准确称取100.0 mg(精确到0.1 mg)三聚氰胺标准品于100 ml容量瓶中,加入50 ml水溶解,用乙腈定容至刻度,配制浓度为1.0 mg/ml的标准储备液,于4℃

收稿日期:2009-10-30

作者简介:胡梅(1968-),女,高级工程师,理学学士,主要从事食品安全检测与研究。E-mail:sdzjyh@163.com

*通讯作者:王骏(1972-),男,高级工程师,主要从事食品中化学污染物的检测技术研究。E-mail:sdzjyw@163.com

避光保存。

1.2 仪器

ACQUITY UPLC™ - Waters Quattro Premier XE 型超高效液相色谱-质谱/质谱仪,配有电喷雾离子源;分析天平:感量 0.1 mg;均质机;漩涡混合器;低温高速离心机:4℃,10 000 r/min。

1.3 样品制备

鲜蛋类取 10 枚,去壳打成均匀蛋液;松花蛋及熟制蛋类各取 10 枚,去壳充分搅碎、混匀。分别置于可密封的洁净容器中,编号,储存于 4℃ 冰箱中。

1.4 样品处理

准确称取 2.00 g 试样(精确到 0.01 g)置于 50 ml 离心管中,准确加入 2.0% 乙酸溶液 20 ml,鲜蛋类样品振摇、漩涡混合 2 min,其它类样品 10 000 r/min 均质 2 min,4℃、10 000 r/min 离心 5 min。取出恢复至室温备用。

准确移取 0.5 ml 离心后提取液至 10 ml 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,充分混匀后静置 5 min,经 0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤后待测。

1.5 标准曲线

精确量取三聚氰胺标准储备液适量,分别添加到 2.00 g 空白试样中,添加浓度分别为 0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、5.00 mg/kg,混匀后放置 10 min。按照与试样相同的步骤处理后待测。

1.6 操作条件

1.6.1 色谱操作条件 色谱柱 ACQUITY UP-

LC™ BEH HILIC (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A 相为乙腈,B 相为 10 mmol/L 乙酸铵水溶液;柱温:40℃;进样量:5 μl;梯度洗脱条件见表 1。

时间(min)	流速(ml/min)	A(%)	B(%)
0.0	0.30	96.0	4.0
3.5	0.30	88.0	12.0
3.6	0.40	40.0	60.0
6.5	0.40	96.0	4.0
5.9	0.40	96.0	4.0
6.0	0.30	96.0	4.0

注:以上流速和流动相比例变化均为线性变化。

1.6.2 质谱操作条件 离子源:电喷雾离子源,正离子;扫描方式:多反应监测;电离电压:3.2 kV;离子源温度:110℃;雾化温度:400℃;锥孔气流速:50 L/h;雾化气流速:600 L/h;碰撞室压力: 3.6×10^{-3} mPa。

1.6.3 其它参数 三聚氰胺的保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表 2,典型的质量色谱图见图 1。

表 2 三聚氰胺参考保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

名称	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
三聚氰胺	2.55	127 > 85 127 > 68	127 > 85	35	16 25

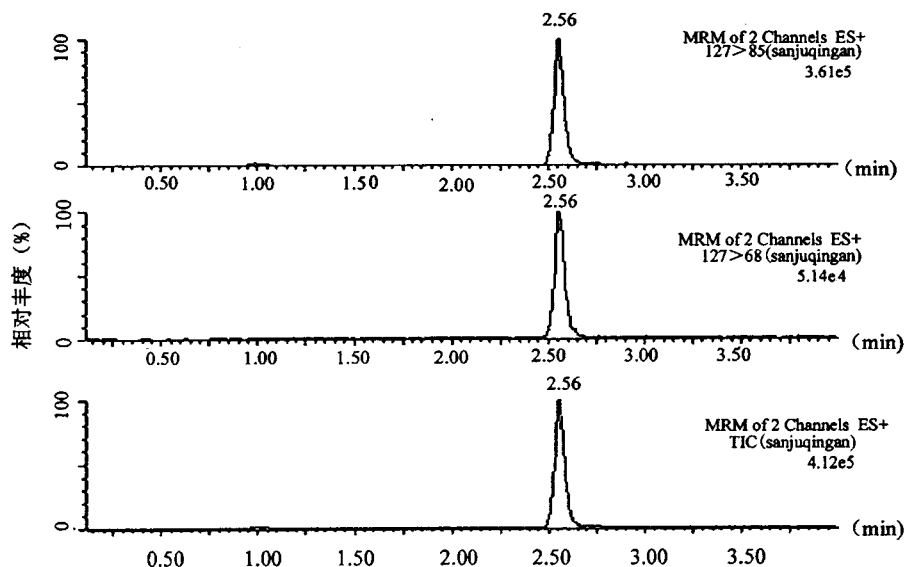


图 1 空白基质中添加 0.5 mg/kg 三聚氰胺的质量色谱图

2 结果与分析

2.1 色谱质谱条件的选择

三聚氰胺分子量为 126.12, 分子中含有 3 个氨基, 极性很强, 在普通的反相液相色谱柱上几乎没有保留, 多在死时间处出峰, 难以定性、定量测定。本文采用了 Waters 公司的 ACQUITY UPLC™ BEH HILIC 色谱柱, 该色谱柱采用亲水性填料, 对三聚氰胺等强极性化合物有较强的保留; 同时由于采用 1.7 μm 的小颗粒填料, 分离能力和分析速度大为提高。比较了乙酸铵、甲酸分别作为流动相添加剂的分离效果及对质谱信号的影响, 结果表明乙腈-0.1% 甲酸溶液作为流动相时, 三聚氰胺的峰形不佳; 以乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 分离、峰形和灵敏度俱佳, 最终决定采用该体系分离测定三聚氰胺。将浓度为 1.0 mg/L 的三聚氰胺标准溶液, 通过流动注射泵注入质谱仪, 调谐并优化锥孔电压、碰撞能量等参数, 确定以 127 > 85、127 > 68 为定性离子对, 其中 127 > 85 为定量离子对。若测得的样品溶液和相同基质的标准溶液中三聚氰胺的保留时间一致, 且定性离子对的相对丰度偏差符合表 3 的规定, 则可判定样品中存在三聚氰胺。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

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

2.2 样品前处理条件的选择

在 2008 年出台的测定乳制品中三聚氰胺的标准 (GB/T 22388 - 2008) 中, 规定了液相色谱法、液相色谱-质谱/质谱法、气相色谱-质谱/质谱法三种测定方法均需采用固相萃取净化, 以消除基质中的杂质对测定的干扰。本研究采用了免固相萃取的快速前处理方法, 经与固相萃取净化的方法比较, 定量结果无差异, 但前处理时间缩短 2/3, 仅需 15 min, 且检测成本大幅下降。虽然检出限 (0.05 mg/kg) 略高于固相萃取净化 (0.01 mg/kg) 的方法, 但仍远低于目前国内外食品中三聚氰胺的限量值 (2.5 mg/kg), 可充分满足各类检测的要求。

考虑到三聚氰胺具有弱碱性, 采用酸性提取剂有利于提高提取效率。比较了 5 种提取剂对鲜

蛋和蛋制品中三聚氰胺的提取效果, 分别为 0.1 mol/L 高氯酸溶液、0.1 mol/L 盐酸溶液、乙腈-0.1 mol/L 盐酸水溶液 (1: 1)、2% 甲酸溶液、2% 乙酸溶液。结果表明, 0.1 mol/L 高氯酸溶液和 0.1 mol/L 盐酸溶液用于提取鲜蛋中的三聚氰胺时, 虽经乙腈沉淀蛋白, 样液仍难以经微孔滤膜过滤, 易堵塞色谱柱; 乙腈-水 (1: 1) 用于鲜蛋中三聚氰胺的提取时, 蛋液凝固成胶状, 无法获得澄清的提取液; 2% 甲酸溶液和 2% 乙酸溶液用于各类样品的前处理, 效果较好, 但考虑到甲酸的挥发性强于乙酸, 最终决定采用 2% 乙酸溶液作为提取剂。样品加入 2.0% 乙酸提取后, 在低温 (4℃) 下 10 000 r/min 离心 5 min, 可获得较为澄清的提取液。

离心后的提取液中仍含有一定的蛋白质, 由于采用了 1.7 μm 的小颗粒填料色谱柱, 如不去除, 可能造成色谱柱堵塞; 另外亲水性的 HILIC 色谱柱适宜于采用较高比例的有机相 (乙腈) 作为流动相, 而提取液为 100% 水相, 直接进样导致色谱峰形不好。考虑到上述因素, 测定时移取 0.5 ml 提取液, 加入乙腈混匀并定容至 10 ml, 因乙腈可促使蛋白质变性而沉淀, 稍经放置过滤即可获得澄清的溶液, 过滤后直接用于超高效液相色谱-质谱/质谱测定, 色谱峰形、灵敏度俱佳。

2.3 线性范围和检出限

将 1.5 中制备的基质加标样品, 按照本文处理方法制备系列标准溶液, 所得各溶液中三聚氰胺浓度依次为: 0.25、0.5、2.5、5、10、25 ng/ml, 进样测定后绘制标准曲线, 回归方程为 $Y = 596.28X + 341.62$, 相关系数优于 0.995。空白样品中添加 0.05 mg/kg 三聚氰胺时, 测定三聚氰胺定量离子对信噪比 s/n 大于 20, 因此确定该方法的检出限为 0.05 mg/kg。

2.4 方法的精密度和准确度

对一个阳性松花蛋样品, 重复测定 6 次, 结果见表 4, 测定结果的相对标准偏差为 2.92%, 可见采用该方法测定禽蛋制品中三聚氰胺具有较好的精密性。

在不含三聚氰胺的鸡蛋、鸭蛋、咸鸭蛋、松花蛋等样品中分别添加 0.05、0.1、1.0 mg/kg 的三聚氰胺标样, 每个水平进行 5 次平行测定, 平均回收率为 89.4% ~ 98.3%, 相对标准偏差为 3.35% ~ 6.37%。

秸秆栽培大球盖菇安全优质生产技术规程

万鲁长¹,黄春燕¹,陈长青²,邢作山²,李洪忠²,单洪涛¹,郭惠东¹

(1. 山东省农业科学院植物保护研究所,山东 济南 250100;

2. 邹城市食用菌工作站,山东 邹城 273500)

中图分类号:S646.1*9 文献标识码:B 文章编号:1001-4942(2010)01-0093-04

本标准由山东省质量技术监督局提出。本标准由山东农业标准化技术委员会归口。

1 范围

本标准规定了安全优质大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*)的产地环境、栽培基质、生产管理、病虫害防治、质量管理和生产档案等技术要求。

本标准适用于山东省利用作物秸秆栽培大球盖菇的安全优质生产。

收稿日期:2009-12-02

基金项目:国家科技支撑计划项目“黄淮平原区农田秸秆资源综合利用技术集成研究与示范”(2007BAD89B09-14)和山东省农业良种工程“食用菌种质创新与高效利用研究”(2008LZ-008-02)课题资助。

作者简介:万鲁长(1965-),男,研究员,主要从事食用菌标准化生产与农业生物质资源循环利用技术研究。E-mail:zbsw@saas.ac.cn

表4 精密度试验结果

测定次数	测定值(mg/kg)
1	3.76
2	3.59
3	3.61
4	3.45
5	3.66
6	3.54
平均值	3.60
相对标准偏差(%)	2.92

2.5 样品测定结果

应用该方法测定了市售鲜鸡蛋、咸鸭蛋、松花蛋等样品100余批,阳性样品检出率约为20%。鲜鸡蛋中检出的三聚氰胺最高含量为2.7 mg/kg,鸭蛋、松花蛋中检出的三聚氰胺最高含量为4.6 mg/kg。

3 结论

本文建立了超高效液相色谱-质谱/质谱快

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 4285 农药安全使用标准

速测定禽蛋制品中三聚氰胺的方法。该方法不需固相萃取净化,全部前处理可在15 min内完成,精密度和灵敏度测定均可满足各类检测要求。

参 考 文 献:

- [1] GB/T 22388-2008. 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].
- [2] 杨云霞,刘 彤,周桂英,等. 小麦谷朮粉中三聚氰胺的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报,2008,27(3):322-324.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 蒋晨阳,范 倩,林德清,等. 气质联用法测定饲料中的三聚氰胺[J]. 饲料工业,2008,29(8):48-50.
- [6] 陈锡龙,黄 瑾,钱莘莘. 使用酶联免疫吸附法测定饲料中三聚氰胺的研究[J]. 饲料工业,2008,29(18):53-55.