

超高效液相色谱-串联质谱法测定原料乳和奶粉中三聚氰胺的含量

方忠意,刘素梅,宋志超,谭旭信,陈 蕾,杜红鸽,朱红继

(河南省畜产品质量监测检验中心,河南 郑州 450008)

摘要:该试验建立了使用超高效液相色谱-串联四极杆质谱测定原料乳和奶粉中三聚氰胺含量的检测方法。用三氯乙酸溶液和乙酸铅提取,提取液经MCX固相萃取柱净化后用UPLC-MS-MS进行检测。色谱条件:CAPCELL PAK CR1:4柱(2.0 mm×100 mm i.d., 5 μm),流动相:乙腈-0.01 mol/L 乙酸铵溶液,梯度洗脱流速0.3 ml/min。采用正离子模式的电喷雾质谱检测,以一级质谱得到的准分子离子m/z 126.8作为母离子,进行碰撞诱导解离(CID)二级质谱(MS2)分析,选择母离子和MS2的碎片离子m/z 84.9,67.8定性确证,提取m/z 84.9离子质量色谱峰面积定量。基质标准线性范围为0.01~1.00 μg/ml,检出限10 μg/kg (S/N=10),原料乳回收率为82.4%~97.8%,奶粉回收率为80.7%~95.7%。

关键词:三聚氰胺;LC-MS-MS;原料乳;奶粉

中图分类号:S851.347.5

文献标识码:B

文章编号:1004-5090(2009)04-0007-03

三聚氰胺(melamine)简称三胺,学名三氨基三嗪,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^[1]。使用常用的粗蛋白测定方法“凯氏定氮法”只能测出样品的含氮量,不能鉴定是有机氮还是无机氮,由于三聚氰胺无色无味,含氮比例为66%,易于生产和购买,成本低,添加了三聚氰胺的食品用“凯氏定氮法”可测出较高的蛋白含量,从感官上无法鉴别,因而常被不法分子添加进食品和动物饲料中冒充蛋白质。大量试验研究表明,哺乳动物长期摄入大量的三聚氰胺会造成肾脏损伤^[2,3],2007年3月发生于美国的宠物中毒死亡事件FDA调查结果认定是中国输入的小麦蛋白粉和米浓缩物里含有三聚氰胺,2008年9月份国内三鹿奶粉事件的罪魁祸首也是三聚氰胺。

1 材料与方

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);Waters 固相萃取装置;梅特勒320型酸度计。

Waters Oasis MCX 固相萃取小柱(3 ml,60 mg);三聚氰胺对照品;乙腈、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,实验室用一级水由Millipore-Q超纯水系统制备。

1.2 仪器条件

1.2.1 液相色谱条件 流动相:溶剂A为乙腈,溶剂B为0.01 mol/L 乙酸铵溶液(pH值=4.4),梯度洗脱,洗脱程序见表1。柱温30℃,进样量10 μl。

表1 梯度洗脱程序

时间(min)	流速(ml/min)	乙腈(%)	乙酸铵溶液(%)	曲线
0	0.3	45	55	1
2	0.3	45	50	6
4	0.3	80	20	6
5	0.3	45	55	1

1.2.2 质谱条件 离子源ESI(+);毛细管电压3.0 kV;锥孔电压30 V;离子源温度110℃;脱溶剂气温度400℃;脱溶剂气流量600 L/h;锥孔反吹气流量50 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15V;锥孔电压和碰撞能量见表2。检测方式为多反应监测(MRM)扫描模式,其参数见表2。

表2 多反应监测扫描模式的参数

Parent ion (m/z)	Dauter ion (m/z)	Cone voltage (eV)	Collision energy(eV)
126.8	84.90	30	17
126.8	67.80	30	25

1.3 溶液的配制

1.3.1 标准溶液的配制 准确称取三聚氰胺对照品50 mg于50 ml容量瓶中,加20%(V/V)甲醇溶液超声溶解,放冷至室温后定容,配制成含三聚氰胺1 mg/ml的标准贮备液,4℃保存。

1.3.2 提取液的配制 取480 ml 10 g/L三氯乙酸溶液,加入20 ml 22 g/L乙酸铅溶液,混匀,临用前配制。

1.4 样品的提取

1.4.1 原料乳的提取方法 准确量取2 ml原料乳于50 ml圆底离心管中,准确加入18 ml提取液,涡动30 s,超声20 min,15000 r/min离心10 min,准确移取10 ml上清液备用,如果上层溶液浑浊,可用快速滤纸过滤,取10 ml滤液备用。

1.4.2 奶粉的提取方法 准确称取2 g奶粉于50 ml圆底离心管中,准确加入20 ml提取液,涡动30 s,超声20 min,15000 r/min离心10 min,准确移取10 ml上清液备用,如果上层溶液浑浊,可用快速滤纸过滤,取10 ml滤液备用。

1.5 净化

分别用3 ml甲醇、3 ml水活化混合型阳离子交换固相萃取柱,将1.4.1或1.4.2所得10 ml提取液过柱,控制过



柱速度在 1 ml/min 以内。再分别用 3 ml 水和 3 ml 甲醇洗涤混合型阳离子交换固相萃取柱, 抽干后用 3 ml 5% 氨化甲醇溶液洗脱。洗脱液在 50℃ 水浴中用氮气吹干。精确量取 1 ml 初始比例的流动相溶解残留物, 涡旋 1 min, 过 0.22 μm 滤膜, 供超高效液相色谱-串联质谱联用仪测定。

1.6 空白对照的制备

取空白原料乳或空白奶粉, 按 1.4 和 1.5 项下样品的提取和净化方法进行处理后上机。

1.7 标准曲线制备

取标准储备液适量, 用 20% 甲醇溶液稀释成 10 μg/ml、5 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml、0.5 μg/ml、0.2 μg/ml、0.1 μg/ml 的中间液。取空白原料乳或空白奶粉 7 份, 按 1.4 和 1.5 项下样品的提取和净化, 在洗脱后向洗脱液中分别加入上述系列浓度的标准中间液 100 μl, 氮气吹干后用 1 ml 初始比例的流动相溶解, 制成 1.00 μg/ml、0.50 μg/ml、0.20 μg/ml、0.10 μg/ml、0.05 μg/ml、0.02 μg/ml、0.01 μg/ml 基质标准溶液。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

首先用 1 μg/ml 的三聚氰胺标准溶液, 以蠕动泵注射的方式注入质谱, 离子源为 ESI 源, 分别在正、负离子模式下进行母离子全扫描, 发现正离子模式下能够得到三聚氰胺母离子峰(见图 1), 因而确定三聚氰胺的准分子离子 m/z 为 126.8。然后以 m/z 126.8 为母离子进行二级质谱扫描, 得到了 M/Z 109.8、84.9、67.8、59.8(见图 2) 四个主要子离子。选择丰度相对较强的 m/z 84.9、 m/z 67.8 的离子作为监测离子, 以多反应监测(MRM)正离子模式优化毛细管电压源温度、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气温度、脱溶剂气流量。三聚氰胺以子离子 m/z 84.9、 m/z 67.8 的丰度比(6:1)来定性, 以子离子 m/z 84.9 为定量离子, 峰面积外标法定量。

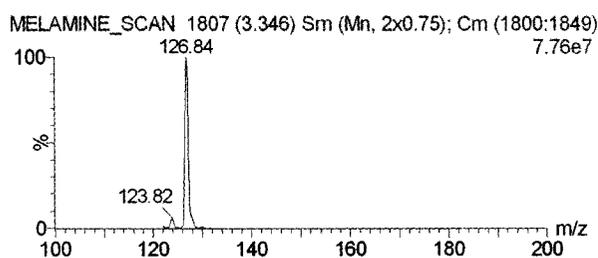


图 1 三聚氰胺标准溶液的一级质谱图(ESI+)

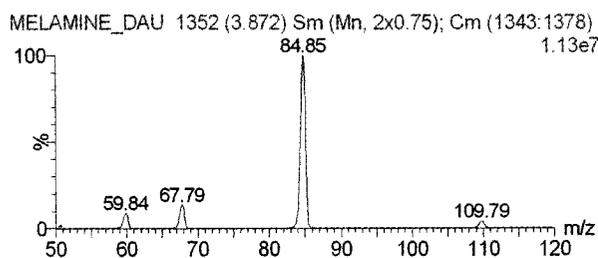


图 2 三聚氰胺标准溶液的二级质谱图

2.2 色谱条件的优化

三聚氰胺是强极性化合物, 在普通反相柱上几乎没有保留, 所以高效液相色谱分析中常常在流动相中加入离子对试剂来增加三聚氰胺在 C18 柱或 C8 柱上的保留。在液质联用分析中, 因为流动相受到限制, 所以分析三聚氰胺

需要选择合适的色谱柱。该试验在研究过程中, 考察了 Waters 公司的 ACQUITY UPLC™ BEH HILIC 柱(2.1 mm×50 mm i.d., 1.7 μm) 和日本资生堂的 CAPCELL PAK CR1:4 柱(2.0 mm×100 mm i.d., 5 μm)。Waters 公司的 HILIC 柱采用乙腈和纯水作为流动相标准溶液能够获得较好的色谱峰, 信噪比较高, 而流动相中加入甲酸、乙酸、乙酸铵都会使响应值降低, 这与文献^[4]报道一致, 但是用于样品分析时, 离子抑制很严重, 这可能是由于三聚氰胺在 HILIC 柱几乎无保留, 与杂质同时流出, 离子受到抑制有关。日本资生堂的 CAPCELL PAK CR 1:4 柱的填料是 C18 填料和阳离子交换填料按照 1:4 混合而成, 由于三聚氰胺是强极性化合物, 在该柱上的保留主要与阳离子交换填料有关, 因此, 流动相的酸碱度跟三聚氰胺在该柱上的保留时间密切相关。该研究过程中, 使用 CAPCELL PAK CR 1:4 柱, 用乙腈和 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(等体积混合)作为流动相, 流速为 0.3 ml/min, 调整流动相的酸碱度, 得到三聚氰胺的保留时间与 pH 值的关系(见表 3)。由于加大流动相中有机相的比例会加速三聚氰胺的洗脱, 该研究最终选择了 pH 值=4.4 乙酸铵溶液和乙腈进行梯度洗脱(见表 1), 即保证了目标峰不受杂质峰的干扰, 而且能够出峰较快、节约分析时间。

表 3 三聚氰胺的保留时间与流动相 pH 值的关系

流动相的 pH 值	7.0	6.0	5.0	4.5	4.4	4.0
保留时间(min)	0.7	0.9	1.2	2.2	2.8	9.3

2.3 提取与净化条件的优化

提取过程中参考了有关文献^[5,6], 比较了三氯乙酸溶液、乙腈-甲醇-水、乙腈-水等作为提取液, 结果表明, 在三氯乙酸溶液中加入 4%(V/V) 的乙酸铅溶液作为提取液, 既能够沉淀原料乳和奶粉中的蛋白质, 回收率也相对较高, 同时也便于后续的净化。由于原料乳和奶粉的基质复杂, 该研究采用混合型阳离子交换柱对样品进一步净化, 消除了杂质峰对目标峰的干扰, 降低了基质的离子抑制效应。

2.4 线性范围与检测限

研究过程中发现, 使用 LC-MS-MS 法检测样品中的三聚氰胺时阳性添加回收率较低, 而用高效液相色谱法检测较高, 因而确定 LC-MS-MS 法基质抑制比较强, 奶粉样品抑制大于原料奶样品, 因此该研究分别配制了不含基质的标准曲线工作液和分别用空白原料奶和空白奶粉制成的基质标准曲线工作液供 LC-MS-MS 分析, 以峰面积为纵坐标, 待测物质量浓度为横坐标进行线性回归, 得到的回归方程分别为 $y=281.47x+56.07$ ($r=0.999$)、 $y=281.45x+48.03$ ($r=0.99$)、 $y=188.68x+2239.04$ ($r=0.99$)。由此结果可知, 浓度在 0.01~1.00 μg/ml 范围内三聚氰胺的峰面积与浓度呈良好的线性相关。由回归方程可以看出, 原料奶基质标准曲线的斜率与无基质的标准曲线接近, 两条曲线几乎平行, 说明原料奶样品在该研究的分析条件下, 基质抑制效应较弱; 而奶粉基质标准曲线的斜率较小, 说明奶粉样品基质抑制效应相对较强。

在空白原料奶和空白奶粉中添加三聚氰胺标准溶液, 添加浓度为 10 μg/kg, 经过提取和净化上机测试, 得到原料奶阳性添加的色谱图中, 定量离子 126.8>84.9 的色谱峰信





抗 菌 肽 研 究 进 展

岳道友

(中国农业大学,北京 100083)

中图分类号:S859.79

文献标识码:B

文章编号:1004-5090(2009)04-0009-03

抗菌肽(Antibacterial peptides, ABP),又称抗微生物肽或肽抗生素,是生物体免疫防卫系统产生的一类对抗外源性病原体致病作用的防御性多肽活性物质,是生物体先天免疫的重要组成成分,与干扰素、补体等组成了宿主的免疫防御系统,广泛分布于细菌、病毒和各种动植物体内。由于其广谱抗菌,能杀死抗生素耐药菌株,且其杀菌机制使病原菌不易产生耐药性突变,以及能抑杀一些真菌、病毒、寄生虫及肿瘤细胞和实体瘤等特点,因此,抗菌肽有望开发成为新一代抗细菌、真菌、病毒和抗癌的药物。由于其应用前景广阔,现已成为生命科学领域一个研究热点,研究主要集中在抗菌肽的分离与提纯、氨基酸序列分析、蛋白质构型与功能的关系、抗菌肽的作用机理、基因工程克隆与表达、改造合成抗菌肽基因及动植物的转抗菌肽基因工程。

1 抗菌肽分类

最早对抗菌肽分类的主要依据是抗菌肽的来源,随着越来越多的抗菌肽被发现,又根据其化学组成、二级或三级空间结构以及其功能进行分类。目前,根据抗菌肽的氨基酸组成和结构特征可分为4类,即天蚕素(cecropins)、

防御素(defensins)、蛙皮素(magainins,富含脯氨酸的抗菌肽)和蜂毒素(melittins,富含甘氨酸的抗菌肽)。

1.1 天蚕素

目前报道的天蚕素约有30种。这类抗菌肽的结构已比较明确,由31~39个氨基酸残基组成,分子量约4kD左右,含较少的半胱氨酸(Cys),不能形成分子内的二硫键,有强碱性的N端和强疏水性的C端,C末端酰胺化。在肽的许多特定位置有较保守的残基,如2位上的色氨酸,5、8和9位有1个或2个赖氨酸(Lys),11位是天门冬氨酸(Asp),12位是精氨酸(Arg)。有些位置尽管残基不同,但仍为保守替换。

1.2 防御素

防御素是美国Leherer实验室首次从兔肺巨噬细胞中分离得到的两个阳离子性极强的小分子抗菌肽。现已在不同种属动物的吞噬细胞中发现了20多种。大多数防御素由38~43个氨基酸残基组成,带有一个净正电荷,含有6个位置保守的半胱氨酸,并构成3个分子内二硫键,二硫键与抗菌活性密切相关。

1.3 蛙皮素

噪比(S/N)为34.16,定性离子126.8>67.8的色谱峰信噪比(S/N)为13.1;奶粉阳性添加的色谱图中,定量离子126.8>84.9的色谱峰信噪比(S/N)为18.33,定性离子126.8>67.8的色谱峰信噪比(S/N)为11.4,因此本方法将检测限确定为10 μg/kg。

2.5 方法的准确度和精密度

在空白原料乳和空白奶粉中添加三聚氰胺标准溶液,添加水平分别为10 μg/kg、20 μg/kg和50 μg/kg,每个浓度做5个平行,用基质标准曲线校正定量,计算其回收率和精密度,结果见表4。

表4 阳性添加回收率试验结果

样品	添加水平(μg/kg)	平均回收率(%)	RSD(%)
牛奶	10	82.4	6.4
	20	94.3	3.9
	50	97.8	3.2
奶粉	10	80.7	5.2
	20	92.9	6.0
	50	95.7	4.5

3 结论

本研究建立了检测原料奶和奶粉中的三聚氰胺的

LC-MS-MS方法,大量的实际样品检测表明,该方法操作简单、专属性强,完全可以用于原料奶和奶粉中三聚氰胺的测定。

参考文献:

- 冯建民, 嵇俊红. 中国三聚氰胺生产应用现状及产业技术分析[J]. 化工科技市场, 2006, 29(5): 11~16.
- 林祥梅, 王建峰, 贾广乐, 等. 三聚氰胺的毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(3): 216~218.
- 邵静君, 温家琪, 徐世文. 三聚氰胺毒理学研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2007, (12): 52~54.
- 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 等. 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[J]. 色谱, 2008, 26(3): 339~342.
- 高效液相色谱法-二极管阵列检测法及高效液相色谱-超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定植物性蛋白中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(1): 6~9.
- 离子交换色谱-紫外检测法测定乳制品中三聚氰胺[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(6): 55~57.

(收稿日期:2009-02-13)

