

## 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

丁 涛<sup>1</sup>, 徐锦忠<sup>1</sup>, 李健忠<sup>2</sup>, 沈崇钰<sup>1</sup>, 吴 斌<sup>1</sup>, 陈惠兰<sup>1</sup>, 李淑娟<sup>2</sup>

( 1. 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 江苏 南京 210001 ;

2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025 )

**摘要** :建立了高效液相色谱-二极管阵列检测器( HPLC-DAD )及 HPLC-电喷雾串联质谱( ESI-MS/MS )测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺的方法。利用 HPLC-DAD 进行样品中三聚氰胺的初筛,利用 HPLC-MS/MS 进行确证。采用三氯乙酸溶液沉淀样品中的蛋白,同时提取目标分析物,质谱检测时样品再经强阳离子固相萃取柱富集净化。HPLC-DAD 的检测低限为 10 mg/kg, HPLC-MS/MS 的检测低限为 0.5 mg/kg; HPLC-DA 的添加回收率为 76% ~ 88%, HPLC-MS/MS 的添加回收率为 72% ~ 82% ( 基质匹配曲线校正 ),两种方法的添加回收率的相对标准偏差 ( RSD )为 3.4% ~ 6.4%。

**关键词** :高效液相色谱-二极管阵列检测 ;高效液相色谱-电喷雾串联质谱 ;三聚氰胺残留 ;植物源性蛋白

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713( 2008 )01-0006-04 栏目类别 :研究论文

## Determination of melamine residue in plant origin protein powders using high performance liquid chromatography-diode array detection and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

DING Tao<sup>1</sup>, XU Jinzhong<sup>1</sup>, LI Jianzhong<sup>2</sup>, SHEN Chongyu<sup>1</sup>,

WU Bin<sup>1</sup>, CHEN Huilan<sup>1</sup>, LI Shujuan<sup>2</sup>

( 1. Animal, Plant and Food Inspection Center of Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China )

**Abstract** : A method for the determination of melamine residue in plant origin protein powders was developed using high performance liquid chromatography-diode array detection ( HPLC-DAD ) and HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry ( ESI-MS/MS ). HPL-DAD was used in preliminary screening of the samples for melamine, and HPLC-MS/MS was used in the confirmatory of melamine. Trichloroacetic acid solution was used to precipitate proteins and to dissociate the target analyte from the sample matrix. The supernatant was cleaned up with strong cation exchange column for HPLC-MS/MS. The HPLC-DAD separation was carried out on a C<sub>18</sub> column ( 250 mm × 4.6 mm, 5 μm ) with 0.01 mol/L sodium *n*-heptanesulfate ( pH adjusted to 4.5 with citric acid )-acetonitrile ( 90:10, v/v ) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, and detected at 240 nm. HPLC-MS/MS was performed in selected ion monitoring mode with trichloroacetic acid solution as ion pair reagent. The limits of detection were 10 mg/kg and 0.5 mg/kg for HPLC-DAD and HPLC-MS/MS, respectively. The mean recoveries were 76% - 88% for HPLC-DAD and 72% - 82% ( matrix match calibration curve ) for HPLC-MS/MS and the relative standard deviations were 3.4% - 6.4% for both HPLC-DAD and HPLC-MS/MS.

**Key words** : high performance liquid chromatography-diode array detection ( HPLC-DAD ); high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry ( HPLC-MS/MS ); melamine residue ; plant origin protein

自 2007 年 3 月中旬以来,美国发生多起宠物猫、狗中毒死亡事件。美国食品药品监督管理局(FDA)从江苏和山东两家公司出口美国的部分小麦蛋白粉和大米蛋白粉中检出三聚氰胺(melamine)成分,并初步认为宠物食品中含有的大量三聚氰胺是导致猫、狗中毒死亡的原因。

三聚氰胺(简称三胺)是一种重要的氮杂环有机化工原料。这种化学品常被用于生产塑料、胶水和阻燃剂,在部分亚洲国家也被用于制造化肥。三聚氰胺也是一种名为灭蝇胺的农药的代谢产物<sup>[1]</sup>。三聚氰胺是一种禁止用于宠物食品及动物饲料的化学物质,动物食用含有大量三聚氰胺的饲料后可发生肾衰竭而导致死亡<sup>[1]</sup>。

目前测定三聚氰胺的检测方法包括气相色谱法<sup>[2]</sup>、气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[3-4]</sup>、高效液相色谱-紫外或二极管阵列和串联质谱(HPLC-UV, DAD, MS/MS)检测方法<sup>[5-8]</sup>。GC-MS 需要衍生化过程比较繁琐。HPLC-UV 或 DAD 由于其无需衍生化是目前最为常用的检测方法。HPLC-MS/MS 灵敏度高、抗干扰能力强,在部分实验室作为确证方法使用。由于三聚氰胺一直作为灭蝇胺的代谢产物来测定,因此测定基质以农作物为主,国内外还没有关于植物源性蛋白中三聚氰胺的检测方法。

本文建立了利用 HPLC-DAD 初筛及 HPLC-电喷雾串联质谱法(ESI-MS/MS)确证植物源性蛋白中残留的三聚氰胺方法。用三氯乙酸溶液沉淀蛋白,快速高效地提取蛋白中残留的三聚氰胺,同时三氯乙酸又可以作为离子对试剂,在普通 C<sub>18</sub> 色谱柱上就可以进行 HPLC-MS/MS 分析。大量样品的分析结果表明,该方法快速、简单,可作为进出口植物源性蛋白商品中三聚氰胺残留的初筛和确证方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器。

Thermo Finnigan TSQ Quantum Ultra AM 液相色谱-高分辨串联四极杆质谱联用仪,配有电喷雾电离源和大气压化学电离源。

甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),三氯乙酸、庚烷磺酸钠、柠檬酸、氨水(含量约 28%)、氢氧化钠(分析纯,南京化学试剂厂)、强阳离子交换柱(MCX, 60 mg/3 mL, Waters 公司);水为重蒸蒸馏水。

三聚氰胺标准品购买自 Sigma-Aldrich 公司,纯度 ≥98%。

植物源性蛋白粉(小麦蛋白粉、玉米蛋白粉、大豆蛋白粉)样品为各省送检的样品。

### 1.2 HPLC-DAD 和 HPLC-MS/MS 条件

HPLC 条件:Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相:0.01 mol/L 庚烷磺酸钠(柠檬酸溶液调节 pH 至 4.5)-乙腈(体积比为 90:10),等度洗脱,流速为 1.0 mL/min;柱温:室温;进样体积:50 μL;DAD 检测波长 240 nm。

HPLC-MS/MS 条件:Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 2.1 mm 3 μm);流动相:水-甲醇(体积比为 90:10),等度洗脱,流速为 0.20 mL/min;柱温:室温;进样体积:25 μL。采用电喷雾电离源,正离子方式检测;源内诱导解离电压(SID)15 V。第一重四极杆分辨率 Q<sub>1</sub> = 0.7 u。三聚氰胺的质谱检测条件见表 1。

表 1 三聚氰胺的质谱检测条件  
Table 1 MS/MS conditions of melamine

Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Collision energy/eV	Cone voltage/eV
127	85*	21	36
	68	15	

\* the most abundance ion.

### 1.3 标准工作溶液的配制

将三聚氰胺标准品用甲醇-水(体积比为 2:8)配制成 1.0 g/L 的储备液,避光冷藏保存。按实际检测需要,HPLC-DAD 检测时用 1% 三氯乙酸溶液稀释到相应的浓度,制成标准工作溶液;HPLC-MS/MS 分析时用空白样品提取液配制相应浓度的标准工作溶液。

### 1.4 样品提取

#### 1.4.1 HPLC-DAD 分析的样品提取

称取(2.00 ± 0.05) g 样品于 50 mL 具塞离心管中,准确加入 1% 三氯乙酸溶液 10 mL,于液体混匀器上快速混合 30 s,超声波超声 30 min。于 12 000 r/min 速率下离心 5 min,取上层溶液过滤膜到进样瓶中,供 HPLC-DAD 分析。

#### 1.4.2 HPLC-MS/MS 分析的样品提取

称取(1.00 ± 0.02) g 样品于 50 mL 具塞离心管中,加入 1% 三氯乙酸溶液 10 mL,于液体混匀器上快速混合 30 s,超声波超声 30 min 后,于 2 500 r/min 速率下离心 5 min,将上层清液用过滤纸过滤到干净的离心管中,准备过柱。依次用 3 mL 水、3 mL 甲醇活化强阳离子交换柱(SCX SPE)后,将滤液上柱,分别用 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗该柱,再用 3 mL 氨水-甲醇(体积比为 95:5)洗脱,洗脱液于 50 °C 水浴中旋转蒸发至干。用 1.0 mL 1% 三氯乙酸溶液溶解并定容后,用过滤膜将其过滤至进样瓶

中,供 HPLC-MS/MS 测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取和净化条件的选择和优化

三聚氰胺属于强极性碱性化合物,因此提取溶剂一般都选用极性较强的有机溶剂、缓冲溶液或有

机溶剂和水的混合溶液。试验中选择甲醇、甲醇-水(体积比为 1:1)、乙腈、乙腈-水(体积比为 1:1)、水和 1% 三氯乙酸水溶液作为提取溶剂,在空白小麦蛋白粉、玉米蛋白粉、大豆蛋白粉中添加 20 mg/kg 水平的三聚氰胺标准品,用 HPLC-DAD 测定其回收率,并比较不同提取溶剂的提取效果,结果见表 2。

表 2 不同萃取溶剂对样品中三聚氰胺的提取效果( $n=5$ )  
Table 2 Extraction efficiency for melamine in samples by different solvents ( $n=5$ )

Sample	Methanol	Methanol-water (1:1, v/v)	Acetonitrile	Acetonitrile-water (1:1, v/v)	Water	1% Trichloroacetic acid solution	%
Corn protein powder	36	82	23	77	81	84	
Soybean protein powder	33	76	31	73	79	80	
Wheat protein powder	32	88	27	82	85	86	

The melamine was spiked in the samples at 20 mg/kg, and the recovery of melamine was determined by HPLC-DAD.

从表 2 的结果可以看出纯有机溶剂的提取回收率低,其余溶剂的提取效率接近。在大量的实际样品分析中发现,有一些蛋白粉样品在使用水或有机溶剂和水的混合溶剂提取后十分粘稠,定容后高速离心亦无法过滤或过滤困难,且某些定容样品溶液在放置 2 h 后出现沉淀,极易造成色谱分析柱或预柱堵塞。用 1% 三氯乙酸溶液沉淀样品中的蛋白,可避免该类现象的出现。在试验中,也曾经以 5% 和 10% 的三氯乙酸作为提取溶剂,三氯乙酸含量高的溶液沉淀蛋白的效果更加明显,但是提取溶剂中三氯乙酸浓度的增加,对色谱分析中的峰形产生较大的影响,甚至有不出峰的现象。综合考虑各种影响,本文最终选择以 1% 三氯乙酸溶液作为植物源性蛋白样品中三聚氰胺的提取溶剂。

由于出口蛋白粉样品成分复杂,用三氯乙酸提取后直接采用高效液相色谱-串联质谱对大量样品进行确证时,容易出现离子源喷口污染比较严重的现象导致灵敏度下降,因而需要对样品进行净化。三聚氰胺化学结构中含有 3 个伯胺基团,属于碱性化合物,在酸性条件下会形成正离子,因而可以采用强阳离子固相萃取柱对样品进行净化。通过水和甲醇的清洗可以除去样品中水溶性的杂质、无机盐和非离子化的脂溶性杂质<sup>[9]</sup>。实验中发现利用强阳离子交换柱对样品进行净化后再进行分析,分析大量样品后质谱喷雾口仍然保持清洁。

### 2.2 色谱和质谱条件的优化

由于三聚氰胺属于强极性化合物,因此其在  $C_{18}$  色谱柱上几乎无保留。为了增加三聚氰胺在  $C_{18}$  色谱柱上的保留,HPLC-DAD 分析中一般都在流动相中加入反离子对试剂,如辛烷磺酸钠<sup>[8]</sup>;在 HPLC-MS/MS 测定中,在流动相中使用挥发性的离子对试剂,如七氟正丁酸<sup>[6]</sup>。试验中发现采用

HPLC-DAD 分析,在流动相中加入辛烷磺酸钠、庚烷磺酸钠或己烷磺酸钠均可以使三聚氰胺产生很好的保留。但是在 HPLC-MS/MS 测定中如果在流动相中加入具有强电负性的七氟正丁酸,尽管可以使三聚氰胺在普通  $C_{18}$  分析柱上有很好的保留,但这将导致负离子无法正常测定,因而一般不建议使用,通常还是直接采用体积比为 90:10 的水-甲醇作为流动相。在实验中发现,使用 1% 三氯乙酸溶液定容样品和配制标准溶液,不仅可以使三聚氰胺在普通  $C_{18}$  分析柱上有良好的保留,保留时间从 1.5 min 以内推迟到 4 min 左右,而且灵敏度上升了 5~6 倍。这可能是由于三氯乙酸也具有一定的离子对功能,使三聚氰胺在普通  $C_{18}$  分析柱产生保留,同时三氯乙酸的加入促使三聚氰胺在流动相中预形成正离子,导致灵敏度上升。

实验中发现,采用 HPLC-MS/MS 测定时有基质抑制效应存在。用空白小麦蛋白粉、玉米蛋白粉、大豆蛋白粉经过提取及 SPE 净化定容后的溶液配制的标准溶液和用甲醇-水(体积比为 2:8)配制的同浓度的标准溶液相比,信号下降了 50%~70% 左右,从而直接导致回收率偏低。为了补偿由于基质抑制效应而导致的测定数值偏差问题,采用基质匹配曲线(matrix matched calibration curve)来校正最终结果。

### 2.3 线性范围和检测低限

用 1% 三氯乙酸和空白基质溶液配制相应质量浓度的系列标准溶液,以峰面积为纵坐标,待测物的质量浓度为横坐标进行线性回归。结果表明,HPLC-DAD 方法在质量浓度为 0.5~100  $\mu\text{g/mL}$  时相关系数( $r$ )为 0.999 3;HPLC-MS/MS 方法在质量浓度为 0.1~5  $\mu\text{g/mL}$  时  $r$  为 0.991 0,线性良好。在空白小麦蛋白粉、玉米蛋白粉和大豆蛋白粉中添

加三聚氰胺标准溶液, HPLC-DAD 方法(添加水平为 10 mg/kg)和 HPLC-MS/MS 方法(添加水平为 0.5 mg/kg)的检测低限分别为 10 mg/kg 和 0.5 mg/kg(按信噪比( $S/N$ )大于 10 计算)。

#### 2.4 回收率和精密度

在空白小麦蛋白粉、玉米蛋白粉和大豆蛋白粉中添加三聚氰胺标准溶液, HPLC-DAD 方法的添加水平为 10, 20 和 50 mg/kg; HPLC-MS/MS 方法添加的水平为 0.5, 1 和 2 mg/kg, 重复测定 7 次, 计算其回收率和精密度, 结果见表 3, HPLC-DAD 分析谱图见图 1, HPLC-MS/MS 分析的选择离子流色谱图及质谱图见图 2。

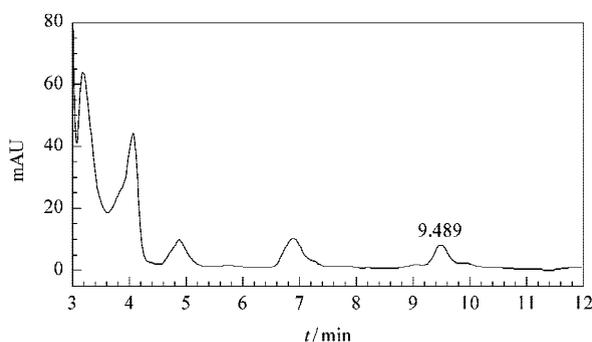


图 1 小麦蛋白粉中添加三聚氰胺(添加水平 10 mg/kg)的 HPLC-DAD 图谱

Fig. 1 Chromatogram of melamine spiked in wheat protein powder at 10 mg/kg by HPLC-DAD

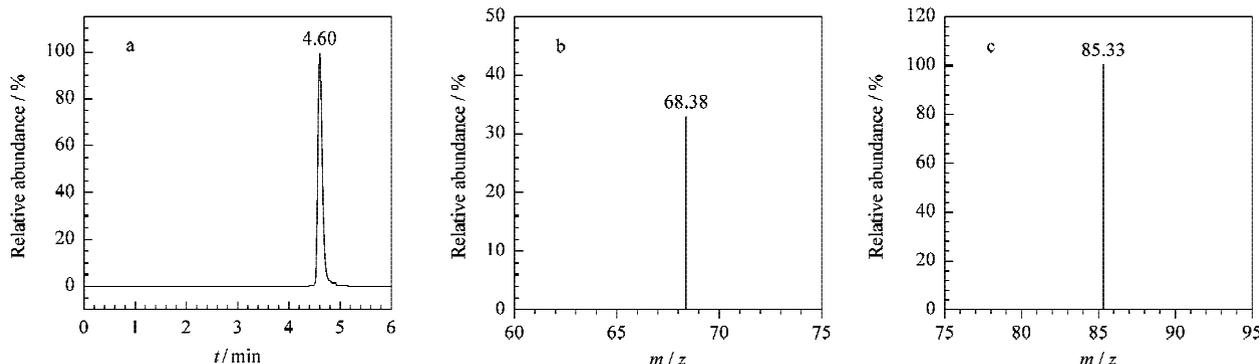


图 2 (a)小麦蛋白粉中添加三聚氰胺(添加水平 0.5 mg/kg)的选择离子流色谱图和(b, c)质谱图

Fig. 2 (a) Selected ion monitoring (SIM) chromatogram and (b, c) SIM mass spectra of melamine spiked in wheat protein powders at 0.5 mg/kg by HPLC-MS/MS

表 3 添加在空白植物蛋白粉中的三聚氰胺的回收率和精密度试验结果( $n=7$ )

Table 3 Recovery and precision of melamine spiked in blank plant origin protein powders ( $n=7$ )

Method	Added/ (mg/kg)	Corn protein powder			Soybean protein powder			Wheat protein powder		
		found/ (mg/kg)	recovery/ %	RSD/ %	found/ (mg/kg)	recovery/ %	RSD/ %	found/ (mg/kg)	recovery/ %	RSD/ %
HPLC-DAD	10	8.5	85	4.8	7.6	76	5.3	8.2	82	3.8
	20	16.4	82	4.1	15.8	79	5.4	17.2	86	3.4
	50	44.2	88	3.9	40.5	81	4.8	42.5	85	3.6
HPLC-MS/MS	0.5	0.38	75	6.4	0.36	72	5.3	0.39	78	4.8
	1	0.79	79	5.5	0.77	77	5.8	0.82	82	4.3
	2	1.54	77	5.2	1.60	80	4.7	1.58	79	4.6

### 3 结论

建立了 HPLC-DAD 和 HPLC-MS/MS 初筛和确证植物源性蛋白中残留的三聚氰胺方法。利用三氯乙酸溶液沉淀样品中的蛋白并提取三聚氰胺, 阳离子交换柱净化去除基质干扰, 方法简单快速。经大量样品实际检测证明, 该方法适合目前国内外监控和检测的要求。

#### 参考文献:

[1] <http://www.affi.com/nfpi/pdfs/US-FDA-CFSAN-Interim-Melamine-and-Analogues-Safety-Risk-Assessment.htm>. [2007-05-25]

[2] Bardalaye P C, Wheeler W B, Meister C W. J Assoc Off Anal Chem, 1987, 70(3):455  
 [3] FDA/ORF Forensic Chemistry Center SOP T015, 2007, 8:25  
 [4] Yokley R A, Mayer L C, Rezaaiyan R, et al. J Agric Food Chem, 2000, 48:3352  
 [5] Goutailler G, Valette J C, Guillard C, et al. J Photochem Photobiol A, 2001, 141:79  
 [6] Sancho J V, Ibanez M, Grimalt S, et al. Anal Chim Acta, 2005, 530:237  
 [7] Bobeldijk I, Stoks P G M, Vissers J P C, et al. J Chromatogr A, 2002, 970:167  
 [8] Updated FCC developmental melamine quantitation (HPLC-UV), FDA. (2007-04-02). <http://www.fda.gov/cvm/melamine04022007.htm>  
 [9] Stubbings G, Tarbin J, Cooper A, et al. Anal Chim Acta, 2005, 547:262