

气相色谱-串联质谱法测定食品中的三聚氰胺

卢业举, 舒 勇, 赵成仕

(国家农副加工食品质量监督检验中心, 安徽 合肥 230051)

摘要 :建立了使用气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)测定食品中三聚氰胺含量的分析方法。利用三氯乙酸超声萃取样品中的三聚氰胺,经乙酸锌溶液沉淀蛋白质后,将提取液离心、过滤、净化、衍生后采用 GC-MS/MS 的多反应监测模式(MRM)进行检测。方法的重现性良好,6 次重复测定的峰面积的相对标准偏差小于 9% ,最低定量检测限($S/N = 10$)为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$,在 $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{L}$ 范围内具有良好的线性关系。应用所建立的方法测定了奶粉、奶糖、含乳饮料、饼干等食品中的三聚氰胺含量,为三聚氰胺滥用的检测和判断提供了方法。

关键词 :气相色谱-串联质谱法 ;三聚氰胺 ;奶粉 ;奶糖 ;含乳饮料 ;饼干

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)06-0749-03 栏目类别 :技术与应用

Determination of melamine residue in foods using gas chromatography-tandem mass spectrometry

LU Yaju, SHU Yong, ZHAO Chengshi

(National Center for Quality Supervision and Test of Agricultural-Avocation Processed Food, Hefei 230051, China)

Abstract : A method of gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was developed for melamine residue in foods. The sample was extracted under ultrasonication with trichloroacetic acid (TCA), the protein in the sample was precipitated with zinc acetate solution. The extract was centrifuged, filtered, purified, derivatized and detected using GC-MS/MS in multiple-reaction monitoring mode. The limit of detection for melamine was $1 \mu\text{g}/\text{kg}$. The good linearity in the range of $0.1 - 100 \mu\text{g}/\text{L}$ was obtained. The relative standard deviation (RSD) of peak area was less than 9%. This method has been applied to the analysis of melamine in milk powder, toffee, milk beverages, biscuits and other foods. It provides a method for the detection of abuse of melamine.

Key words : gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS); melamine ; milk powder ; toffee ; milk beverages ; biscuits

三聚氰胺简称三胺,是一种用途广泛的氮杂环有机化工原料。因其结构中含有多个氨基氮而被一些不法商贩添加到植物蛋白中以提高样品的表观蛋白质含量。2007 年 3 月发生的美国毒宠物粮事件造成多起猫狗宠物死亡,经查是由于在宠物食品的原料中添加了三聚氰胺。2008 年 9 月我国发生了因在婴幼儿奶粉中非法添加三聚氰胺而导致食用此类奶粉的一些婴幼儿患病甚至死亡的毒奶粉事件,由此引起了国内外对食品中三聚氰胺的高度关注。

2007 年 6 月,中国农业部发布了编号为 NY/T 1372-2007 的《饲料中三聚氰胺的测定》的行业标准。这一标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、植物性蛋白饲料、宠物饲料(干粮、罐头)中三聚氰胺的测定^[1]。2007 年 5 月,在美国召回被

三聚氰胺污染的宠物饲料仅两个月后,美国食品药品监督管理局(FDA)就向食品生产厂商提出了保证食品成分安全的要求,提供了可用于三聚氰胺检测的气相色谱-质谱联用法(GC-MS),并很快得到了美国农业部食品安全与监督署(FSIS)的认可^[2]。2007 年 11 月, FDA 又提出高效液相色谱(HPLC)的检测方法^[3]。该方法能够检测出融入小麦和小米蛋白粉中的三聚氰胺、三聚氰酸等多种化合物。此外,一种定量的液相色谱-质谱联用(LC-MS)检测三聚氰胺的方法^[4]也开始被应用。美国国家食品安全与技术中心(NCFST)借助 Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra™ 三重四极杆质谱仪的先进分析技术,建立了一个新的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法测定食品中的三聚氰胺^[5]。HPLC-紫

外(UV)检测样品的前处理简单^[6-8],但检出限较高且易受干扰。LC-MS/MS 可以弥补 HPLC-UV 的缺点,但仪器成本高昂,操作复杂^[9-11]。FDA 和部分文献^[1,12,13]提供的 GC-MS 检测方法具有灵敏度较高、可靠性较高等优点,缺点是样品前处理繁琐,抗干扰性不是很强。本文建立的 GC-MS/MS 测定食品中三聚氰胺含量的方法文献中尚未见报道。该方法比国家标准 GB/T 22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》^[8]中所规定的 GC-MS 方法在样品前处理方面做了改进,扩大了应用范围,上机分析时间缩短到 10 min 之内,检出限达到 1 $\mu\text{g/kg}$,较国家标准(5 $\mu\text{g/kg}$)低,对基质复杂的食物样品也一样具有较低的定量检测限。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Trace Ultra 气相色谱仪(配 AS 3000 自动进样器)、TSQ-45000 TSQ Quantum 三重四极杆质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);电子分析天平(感量 0.01 g 和 0.0001 g,梅特勒公司);FE130 高速万能粉碎机(西安利达仪器成套设备有限公司);XW-80A 旋涡混合器(西安利达仪器成套设备有限公司);KQ5200DE 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TG16-WS 高速离心机(湘仪仪器有限公司);N-EVAP 氮吹仪(美国 Organomation 公司);303-AO 型烘箱(南通科学仪器厂)。

甲醇(色谱纯),吡啶(优级纯),实验用水为去离子水,三聚氰胺标准品(纯度 $\geq 99.9\%$)。衍生化试剂:甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)+1% 三甲硅烷(TMCS)(色谱纯)。

10 g/L 三氯乙酸溶液的配制:称取 10 g 分析纯三氯乙酸,加水至 1 000 mL 即得。

219 g/L 乙酸锌溶液的配制:称取 219 g 分析纯乙酸锌,用 300 mL 水溶解后,定容至 1 L 即得。

三聚氰胺标准储备液的配制:准确称取三聚氰胺标准品 0.1 g(精确到 0.0001 g),置于 100 mL 容量瓶中,用 50%(体积分数,下同)甲醇水溶液定容至刻度,超声混匀,得 1 g/L 三聚氰胺储备液。贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,有效期 1 年。

三聚氰胺标准工作液的配制:准确吸取三聚氰胺标准储备液 1.0 mL 至 100 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇水溶液定容至 100 mL,充分混匀,得 10 mg/L 三聚氰胺标准工作液。贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,有效期 3 个月。

基质标准溶液的制备:在空白基质提取液中添加适量的三聚氰胺标准工作液,使其质量浓度分别

为 0.1,1.0,10.0,20.0,50.0 和 100.0 $\mu\text{g/L}$ 。

1.2 样品的制备

1.2.1 提取和净化

将固体试样(需要时用高速万能粉碎机粉碎)或液体样品充分混匀后,准确称取 5 g,加入 5 mL 乙酸锌溶液,再加入三氯乙酸溶液至 50 mL,旋涡振荡 2 min,超声萃取 20 min。以 5000 r/min 速率离心 10 min,取上清液 200 μL 用 0.45 μm 有机滤膜过滤,氮气吹干,用 20% 甲醇水溶液溶解残留物并定容至 1 mL,待衍生化。

1.2.2 衍生化反应

在待衍生化试液中依次加入 200 μL 吡啶和 200 μL 衍生化试剂混匀后,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中衍生化 30 min。

1.3 GC-MS/MS 条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:TR-5MS 石英毛细管色谱柱(15 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm);载气:高纯氦气(纯度 $\geq 99.999\%$),恒流模式,流速 1.5 mL/min;进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$;进样量:1 μL ;进样方式:不分流进样。柱温升温程序:柱初始温度 75 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至 300 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min。

1.3.2 质谱条件

电子轰击离子源(EI),电离能量 30 eV,正离子化模式;离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$;碰撞气:高纯氦气(纯度 $\geq 99.999\%$),碰撞气压力:0.16 Pa(1.2 mTorr)。扫描方式:采用多反应离子监测(MRM)模式,选择母离子 m/z 342,选择二级离子 m/z 327 及 171,定量离子 m/z 327。

2 结果与讨论

2.1 定性分析

在“1.3”节条件下,待测液和三聚氰胺标准品的目标化合物在相同保留时间($\pm 0.5\%$)处出现,并且对应的二级质谱碎片离子的质荷比与标准品的一致,碎片离子 m/z 327 与 m/z 171 的相对丰度比为 100/25,当试样中目标化合物的碎片离子丰度比与标准品相比其最大偏差小于或等于 15%,可定性确证目标分析物。

2.2 定量分析

分别准确吸取质量浓度分别为 0.1,1.0,10.0,20.0,50.0 和 100.0 $\mu\text{g/L}$ 的三聚氰胺基质标准工作液各 1.0 mL,依次加入 200 μL 吡啶和 200 μL 衍生化试剂于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中衍生化 30 min,衍生化产物进气相色谱-串联质谱仪分析。以三聚氰胺标准工作液的质量浓度 X ($\mu\text{g/L}$)为横坐标,以 m/z 327

基峰的峰面积 Y 为纵坐标,做线性回归,得到线性方程为 $Y=16\,113X-7\,692.4$,相关系数 $r=0.998$ 。

对 $0.1\,\mu\text{g/L}$ 基质标准溶液进行测定,色谱图见图 1。通过软件计算仪器的定量检测限(10 倍信噪比)为 $1\,\mu\text{g/L}$ 。按上述样品前处理过程计算出奶粉和奶制品中三聚氰胺的定量检测限为 $1\,\mu\text{g/kg}$ 。

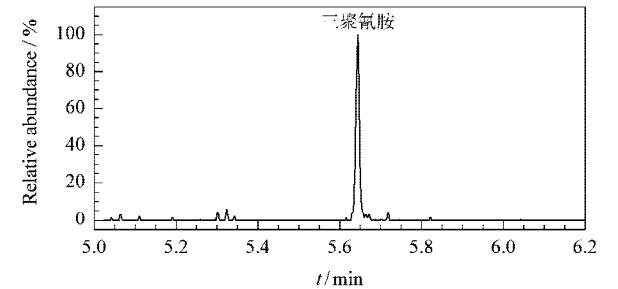


图 1 $0.1\,\mu\text{g/L}$ 三聚氰胺基质标准溶液的 MRM 色谱图

2.3 准确度和精密度

取等量空白奶粉样品 6 份,在其中加入三聚氰胺标准溶液,添加质量浓度为 $1.0\,\mu\text{g/L}$,按所建立的方法要求进行离心、过滤、净化、衍生后进样测定,得到三聚氰胺峰面积的相对标准偏差(RSD)为 8.6%,表明方法的重现性良好。

2.4 回收率

在经检测不含三聚氰胺的空白奶粉、饼干、雪糕、奶糖及巧克力等样品中添加 $10\,\mu\text{g/L}$ 的三聚氰胺标准溶液,考察其回收率,结果见表 1。

表 1 不同样品基质中三聚氰胺的加标回收率			
样品	添加量/($\mu\text{g/L}$)	测定值/($\mu\text{g/L}$)	回收率/%
奶粉	10.0	9.72	97.2
巧克力	10.0	11.20	112.0
奶糖	10.0	9.08	90.8
饼干	10.0	9.36	93.6
雪糕	10.0	10.05	100.5

2.5 样品测定

采用本方法对近期(2008 年 9 月起)奶粉、液体乳、冷冻饮品、饼干、奶糖及巧克力等多个品种样品进行检测,总计检测了 520 多组样品,部分样品中检出含有三聚氰胺(见表 2)。图 2 为采用子离子全扫

表 2 部分样品中三聚氰胺检测结果 mg/kg			
样品	测定结果	样品	测定结果
婴儿成长奶粉	1.7	巧克力	0.2
中老年奶粉	33.2	奶糖 1	0.01
学生营养奶粉	96.3	奶糖 2	2.9
全脂奶粉	2.4	奶油饼干	0.07
原料奶 1	0.8	蛋白粉	0.14
原料奶 2	14.5	面包	0.03
高温灭菌乳	2.3	奶茶	0.5
酸牛乳	1.9	雪糕	1.4

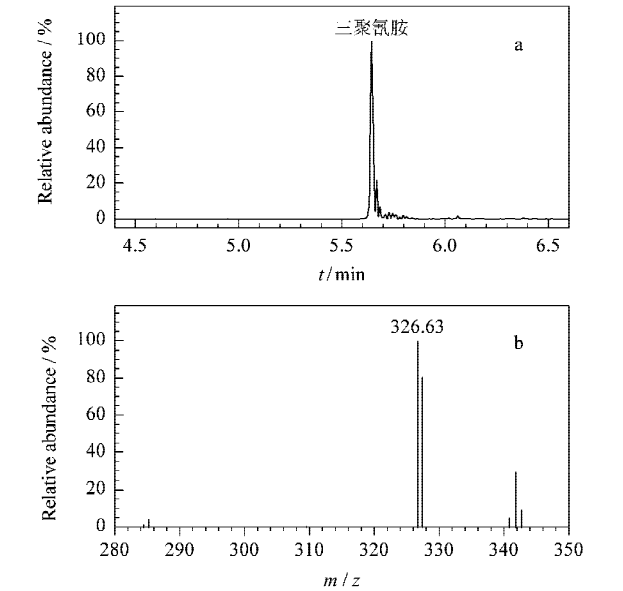


图 2 某奶粉样品的(a)子离子扫描的 MRM 色谱图和(b)子离子全扫描的质谱图

描所得到的某奶粉样品的 MRM 色谱图和质谱图,从图 2 可以看到在 10 min 内即可完成分析。

3 结论

使用 GC-MS/MS 检测奶粉和奶制品等食品中的三聚氰胺具有灵敏度高、重现性好和可靠性高等优点。本方法扩大了 GC-MS/MS 的应用范围,检测时间缩短,对基质复杂的食品样品也一样具有较低的定量检测限。本方法中在三聚氰胺质量浓度为 $0.1\sim 100\,\mu\text{g/L}$ 时线性关系良好,定量检测限可达 $1\,\mu\text{g/kg}$ 。

参考文献:

[1] NY/T 1372-2007

[2] FDA/OR A Forensic Chemistry Center. GC-MS screen for the presence of melamine. (2007-04-25). <http://www.fda.gov/cvm/MelaminePresence.htm>

[3] Updated FCC developmental melamine quantitation (HPLC-UV) laboratory information bulletin No. 4396. (2007-04-02). <http://www.fda.gov/cvm/melanaine04022007.htm>

[4] 黄芳,黄晓兰,吴惠勤,等. 分析测试学报,2008,27(3): 313

[5] 赛默飞世尔科技(原热电公司)色谱质谱部. Determination of melamine residues in catfish tissue by triple quadrupole LC-MS/MS with HILIC Chromatography. (2008-10-17). <http://www.chemshow.cn/productshow/CS10098/download.html>

[6] 王浩,刘艳琴,曹红,等. 分析化学,2008,36(2): 273

[7] 辜雪英,吴小花,仇满珍. 江西化工,2007(2): 70

[8] GB/T 22388-2008

[9] 丁涛,徐锦忠,李健忠,等. 色谱,2008,26(1): 6

[10] 蔡勤仁,欧阳颖瑜,钱振杰,等. 色谱,2008,26(3): 339

[11] 李爱军,张代辉,马书民,等. 分析化学,2008,36(5): 699

[12] 王征. 福建分析测试,2008,17(2): 1

[13] 蒋晨阳,范倩,林德清,等. 饲料工业,2008,8: 48