

【论著】

超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC - MS/MS) 测定多种食品中三聚氰胺的残留量

冯楠, 路勇, 吴颖, 姜洁, 谢文东, 肖辉, 刘丽娟, 周新

(北京市食品安全监控中心, 北京 100041)

[摘要] 目的:建立多种食品中三聚氰胺残留量的 UPLC - MS/MS测定方法和样品前处理方法。方法:样品经 1%三氯乙酸溶液提取后,阳离子交换固相萃取柱净化,进行 UPLC - MS/MS分析,采用多反应监测模式,外标法定量。采用 BEH HLC 色谱柱,以 10 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈为流动相。结果:在 50 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平范围内,三聚氰胺回收率为 76.6% ~ 103.9%,相对标准偏差为 6.6% ~ 10.6%,方法测定低限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论:方法准确度和稳定性较好,操作简单快捷,样品净化效果好,测定低限能够满足限量要求。

[关键词] UPLC - MS/MS; 食品; 三聚氰胺; 残留; 测定

[中图分类号] O657.7⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004 - 8685 (2009) 02 - 0248 - 03

Determination of melamine residue in foods by ultra performance liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry

FENG Nan, LU Yong, WU Ying, JIANG Jie, XIE Wen-dong, XIAO Hui, LIU Li-juan, ZHOU Xin
(Beijing Foods Safety Monitoring Center, Beijing 100041, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a UPLC - MS/MS method for the determination of melamine residue in foods. **Methods:** The melamine in samples was extracted with 1% acetocastin and cleaned up with MCX SPE cartridge, the analyte was determined by UPLC - MS/MS, multi - reaction monitoring (MRM) mode was employed for the quantitative determination, and quantified by the external standard curve. The separation was performed on a UPLC BEH HLC column with a system of water (containing 10mmol/L ammonium acetate buffer) - acetonitrile as mobile phase at a flow rate of 0.3 ml/min. **Results:** The limit of determination of this method was 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The detection limits of 50 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ proved to be much better than the previously reported ones. Average recoveries of melamine ranged from 76.6% to 103.9%, with relative standard deviations between 6.6% and 10.6%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and suitable for the identification and quantification of melamine residue in foods.

[Key words] UPLC - MS/MS; Food; Melamine; Residue; Determination

三聚氰胺 (melamine) 是一种重要的氮杂环有机化工原料,主要用于生产三聚氰胺 - 甲醛树脂,广泛用于木材加工、塑料、涂料、造纸、纺织、皮革、电气、医药等行业。近期,部分食品生产企业非法向产品中添加三聚氰胺化工原料,以达到提高产品蛋白质含量的目的。这种做法严重危害了广大消费者的利益,尤其是婴幼儿的身体健康,损害了食品安全监控体系的可信度,影响了我国对外出口贸易的形象,在这样的背景下,实验室通过试验研究建立了食品中违禁添加物三聚氰胺残留量检测的 UPLC - MS/MS 测定方法。

超高效液相色谱 (UPLC) 是近年来液相色谱技术的新发展,通过增加液相系统耐高压性能,降低色谱柱固定相粒径、色谱柱内径及长度,从而减小了理论塔板高度,增加了理论塔板数,实现了缩短分析时间,增加色谱峰容量,提高分离度和

灵敏度的作用,满足了对色谱分析的高效、快速、高通量等性能的要求。同时,超高效液相色谱与质谱的联用,也使得质谱检测的灵敏度显著提高。

目前报道的有关三聚氰胺残留量的检测方法主要有气相色谱 - 质谱法^[1]、液相色谱法^[2,3]、液相色谱 - 质谱法^[4,5]等。但各类分析方法都存在着样品前处理过程复杂、溶剂消耗多、耗时长、选择性不好、灵敏度不高、分析时间长等问题,无法满足对含三聚氰胺食品的市场监管和进出口贸易要求。

本研究采用 UPLC - MS/MS 系统建立了奶粉、鸡蛋、鸭肝、猪肉和螃蟹等 5 种食品中三聚氰胺的快速检测方法,该仪器方法操作简便、准确,能够在 4 min 内完成样品分析,大大缩短了分析时间。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪, Waters ACQU-

[作者简介] 冯楠 (1981 -), 女, 硕士, 助理工程师, 主要从事食品安全检测技术研究。

ITV TQD 质谱仪 (Waters, USA); 高速冷冻离心机 (SIGMA, 德国); 固相萃取装置 (Waters, USA); Waters Oasis MCX 固相萃取 (SPE) 小柱 (6 cc, 150 mg); 乙腈 (色谱纯), 氨水、三氯乙酸、乙酸铅和乙酸铵均为分析纯, 实验用水为超纯水。三聚氰胺标准品购于 D KMA 公司, 纯度为 99.5%。

三聚氰胺标准储备液的配制: 准确称取三聚氰胺标准品 0.0100 g, 用水溶解并定容至 100 ml 棕色容量瓶中, 配制成 100 μg/ml 的标准储备液, 在 4 条件下避光保存, 有效期 3 个月。

1.2 分析条件

液相色谱条件: 色谱柱: BEH HLC, 2.1 × 50 mm D, 1.7 μm; 流动相: A 为乙腈, B 为 10 mmol/L 乙酸铵溶液; 流速: 0.3 ml/min; 进样量: 5 μl; 柱温: 35 °C。梯度洗脱条件如下: (B% /min): 5/0, 50/2, 50/3, 5/4。

质谱条件: 见表 1 和表 2。

表 1 质谱条件

离子化模式	ESI+
毛细管电压	3.0 kV
离子源温度	110
去溶剂气温度	350
锥孔气流量	50L/h
去溶剂气流量	700L/h
碰撞气压力	氩气, 3.40 × 10 ⁻⁶ Pa
采集方式	多反应监测 (MRM)

表 2 多反应监测条件

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间	锥孔电压	碰撞能量
三聚氰胺	126.97	67.8	0.10 s	35V	20 eV
		84.9*	0.10 s	35V	15 eV

注: * 标注的子离子为定量离子

1.3 样品前处理

称取样品 5 g (精确至 1 mg) 于聚四氟乙烯离心管中, 加入 30 ml 1% 三氯乙酸溶液、2 ml 乙酸铅溶液 (22 g/L), 超声提取 15 min, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液 6 ml 待净化。

依次用 3 ml 甲醇、3 ml 水活化 MCX 小柱, 将上述溶液全部转移至 MCX 柱上, 控制流速在 1~2 ml/min。上样液全部通过后, 依次用 3 ml 水、3 ml 甲醇进行淋洗。最后用 3 ml 5% 氯化甲醇溶液洗脱, 控制滴速在 1 ml (20 滴) /min 左右, 收集洗脱液, 于氮吹仪上 40 °C 吹干, 用 1.0 ml 90% 乙腈水溶解并定容, 待仪器分析。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的确定

三聚氰胺分子结构中带有氨基, 呈弱碱性, 能够与酸形成三聚氰胺盐, 遇强酸或强碱水溶液水解。试验分别选用乙腈、甲醇和 1% 三氯乙酸溶液进行提取效率实验, 结果表明三者提

取效率均能满足要求, 其中用乙腈、甲醇提取奶粉、鸡蛋等样品基质时, 样品中油脂较多, 对后续的净化和仪器测定有一定的影响; 1% 三氯乙酸溶液提取时, 提取效率高, 且溶出杂质少, 对大分子基质具有一定的沉降作用, 同时可以缩短样品处理时间, 实验最终采用 1% 三氯乙酸溶液作为提取溶剂。

实验根据三聚氰胺化学结构中带有氨基的特性, 利用其在酸性条件下带正电, 具有阳离子交换特性, 选择混合型强阳离子交换反相吸附剂 (MCX) 固相萃取柱进行选择交换吸附, 先除去脂类、色素、蛋白等基质杂质, 再通过氯化甲醇将其替换洗脱下来, 达到了净化富集浓缩的目的。由于离子交换固相萃取柱的选择特性, 解决的复杂基质样品的高效净化, 提高了检测灵敏度和准确性, 操作简便快速, 消耗试剂少, 重现性、稳定性较好。

2.2 液相色谱 - 质谱条件的选择

采用 UPLC 系统进行色谱分离条件的优化。由于三聚氰胺化合物极性很强, 所以普通 C18 色谱柱对其无法保留, 需要使用离子对试剂作为流动相才能对其进行分析, 然而使用离子对试剂作为流动相后, 样品保留时间较长, 且无法进行质谱分析, 考虑到三聚氰胺分子结构中含有氨基活性基团, 所以最终试验选择专用于极性碱性化合物分析的 BEH HLC 色谱柱进行分析。超高效液相色谱小尺寸色谱柱对进样体积有较高的敏感度, 进样体积过大会对色谱峰形和分离度有影响, 所以在保证方法灵敏度的前提下, 尽量减少进样体积, 最终试验优化进样体积为 5 μl。

采用 UPLC - MS/MS 对三聚氰胺的质谱条件进行了优化。由于三聚氰胺化学结构在电喷雾条件下易产生正离子, 实验结果也与此完全符合。故在 ESI+ 电离方式下, 对仪器的毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等参数进行了优化选择。液相流动相采用乙腈和含有微量乙酸铵的水溶液, 在等度条件下进行分析。标准物质、空白样品和添加样品谱图分别见图 1、图 2、图 3。

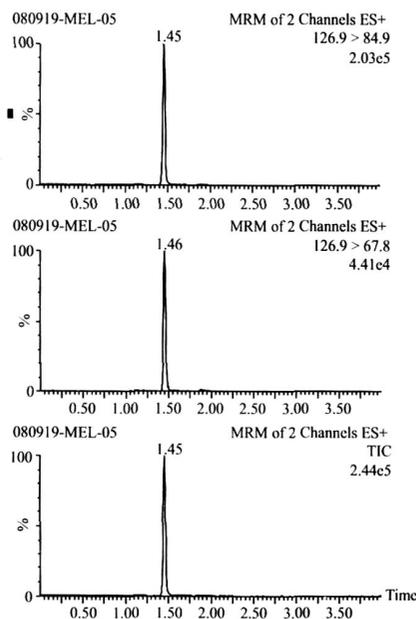


图 1 标准品多反应监测色谱图

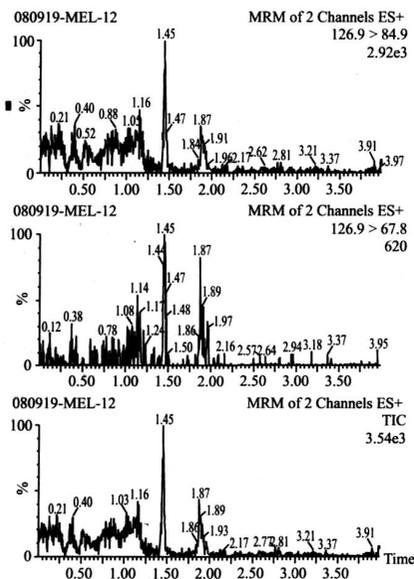


图2 空白样品多反应监测色谱图

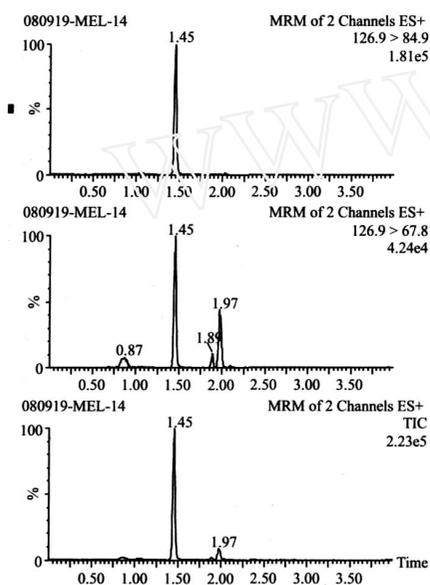


图3 添加样品多反应监测色谱图

2.3 方法线性范围、测定低限、回收率及精密度

对三聚氰胺在 50 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内进行分析,得到线性方程 (Y 为峰面积, x 含量, $\mu\text{g/L}$) $Y = 349.4x - 916.5$, 相关系数 0.9916。以 $S/N = 10$ 计的测定低限 (LOQ) 为 50 $\mu\text{g/kg}$ 。分别选用奶粉、鸡蛋、鸭肝、猪肉和螃蟹空白样品在 50、300、500 $\mu\text{g/kg}$ 3个水平浓度的添加, 每个浓度水平重复 6次, 得到添加回收率及精密度 (RSD), 结果见表 3。

表 3 添加回收率和相对标准偏差 (RSD) ($n = 6$)

化合物	添加浓度 50 $\mu\text{g/kg}$		添加浓度 300 $\mu\text{g/kg}$		添加浓度 500 $\mu\text{g/kg}$		
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	
三聚氰胺	奶粉	89.4	7.3	81.3	9.8	95.4	7.2
	鸡蛋	79.8	7.6	80.7	7.9	89.0	8.5
	鸭肝	76.6	9.3	87.1	7.0	89.0	6.6
	猪肉	91.2	7.8	87.5	9.2	93.6	6.7
	蟹	103.9	10.6	97.6	8.7	98.9	6.9

3 结论

本研究建立了奶粉、鸡蛋、鸭肝、猪肉、螃蟹等 5种食品中三聚氰胺残留量的检测确证技术, 通过复合阳离子交换柱净化, 超高效液相色谱分离, 电喷雾电离 ($ESI+$ 模式), MRM 多反应监测, 实现了复杂样品基质中三聚氰胺的分析。方法具有较宽的线性范围, 准确度和稳定性较好, 操作简单快捷, 样品净化效果好, 测定低限能够满足限量要求。

[参考文献]

- [1] 王征. GC-MS法测定动物食品中的三聚氰胺[J]. 福建分析测试, 2008, 17(2): 1-4.
- [2] 汪辉, 曹小彦, 彭新凯, 等. 高效液相色谱-二极管阵列法测定高蛋白食品中的三聚氰胺[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 114-115.
- [3] 王浩, 刘艳琴, 曹红, 等. 固相萃取与高效液相色谱联用测定宠物食品中三聚氰胺[J]. 分析化学, 2008, 36(2): 273.
- [4] 栾伟. 液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 分析宠物食品中三聚氰胺[J]. 分析测试学报, 2007, 26: 285-286.
- [5] 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): 699-670.

(收稿日期: 2008-11-14)

(上接第 247页)

- [7] Lima EC, Krug FJ, Jackson K. Evaluation of tungsten-rhodium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, lead and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry [J]. Spectrochim Acta, 1998, 53B (13): 1791-1804.
- [8] Lima EC, Barbosa F, Krug FJ, et al. Tungsten-rhodium permanent chemical modifier for lead determination in digests of biological materials and sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry [J]. J Anal At Spectrom, 1999, 14 (10): 1601-1605.
- [9] Lima EC, Barbosa F, Krug FJ. The use of tungsten-rhodium permanent chemical modifier for cadmium determination in decomposed samples of biological materials and sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2000, (409): 267-274.

- [10] Grinberg P, Campos RC. Iridium as permanent modifier in the determination of lead in whole blood and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry [J]. Spectrochimica Acta Part B, 2001, 56 (10): 1831-1843.
- [11] Barbosa F, Lima EC, Zanao RA, et al. The use of a W-Rh permanent modifier for direct determination of bismuth in urine and whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry [J]. J Anal At Spectrom, 2001, 16(8): 842-846.
- [12] Acar O. ETAAS determination of cadmium and lead in environmental, botanic and biological samples by different permanent modifiers [J]. J Anal At Spectrom, 2004, 19(5): 709-711.
- [13] 陶锐, 高舸. 电热原子吸收光谱分析中的持久性化学改进剂 [J]. 理化检验-化学分册, 2007, 43(1): 85-89.

(收稿日期: 2008-10-28)