

固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测食品中的三聚氰胺

刘梅¹ 李金强² 田德金¹ 李佩暖² 曹鹏² 付建¹ 娄喜山¹

(1. 龙大食品集团检测中心, 莱阳 265231; 2. 烟台出入境检验检疫局技术中心, 烟台 264000)

摘要 样品经均质, 1% 三氯乙酸溶液提取, 用 OASIS MCX 固相萃取小柱净化, 减压浓缩后以甲醇溶解定容, 用 Waters BEH-C₈ 柱分离, 乙腈和水为流动相, 经液相色谱-串联质谱法检测。三聚氰胺线性范围为 0.1 ~ 10.0 mg/kg, 相关系数 r 为 0.9999, 平均回收率为 71% ~ 95%, 相对标准偏差为 4.56% ~ 9.82% ($n=6$), 方法的检出限为 0.5 mg/kg。

关键词 固相萃取 高效液相色谱串联质谱法 三聚氰胺

三聚氰胺简称三胺, 别名蜜胺、氰脲酰胺, 是一种用途广泛的具有氮杂环结构的有机化工原料, 因其结构中含有多个氨基氮, 因而被一些不法商贩添加到植物蛋白中以提高蛋白的含量^[1]。2007年3月开始美国相继发生了多起猫狗宠物非正常死亡事件。美国 FDA 经过调查后认为是宠物食品的原料受三聚氰胺污染, 并指出其中的小麦麸蛋白原料来自中国, 由此引起了国内外对三聚氰胺的高度关注。

三聚氰胺传统的检测方法有重量法、升华法。近几年发展起来的检测三聚氰胺的方法有高效液相色谱法和气质联用法, 但这些方法的检出限较高^[1-3] (5 mg/kg 或更高) 或仅能检测简单的基质^[4], 不能完全满足食品中三聚氰胺残留检测需要。笔者采用固相萃取净化, LC-MS-MS 检测, 建立了一套准确、可靠、灵敏度更高的检测食品中三聚氰胺的方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

液质联用仪: Quattro Premier XE 型, 美国 Waters 公司;

电子秤: PL60IS 型, 梅特勒-托利多仪器有限公司;

旋转蒸发仪: LABOROTA 4000 型, 德国 Heidolph 公司;

漩涡混合仪: XW-80A 型, 上海青浦沪西仪器厂;

固相萃取柱: OASIS MCX, 6 mL, 500 mg, 美国 Waters 公司;

三聚氰胺标准品: 纯度 98%, 日本? 关东化学株式会社;

乙腈、甲醇: 色谱纯;

实验所用其它试剂均为分析纯;

实验用水为 Milli-Q 系统制纯水。

1.2 样品溶液的制备

准确称取粉碎后的样品 2.0 g 至 50 mL 塑料离心管中, 加入 1% 三氯乙酸溶液 15 mL, 超声提取 30 min 后, 以 5000 r/min 离心 10 min, 将上清液经滤纸过滤后转入另一 50 mL 离心管中。分别用 10 mL 甲醇、10 mL 水活化 SPE 柱, 将样品溶液上柱, 再用 10 mL 水、10 mL 甲醇洗涤 SPE 柱, 弃去洗脱液。抽干 SPE 柱后用 5% 氨水-甲醇溶液 (体积比为 5:95) 15 mL 洗脱, 收集洗脱液。把上述洗脱液于 40℃ 水浴旋转蒸发至近干, 氮气吹干。用甲醇-水 (体积比为 2:8) 定容至 1.0 mL, 过 0.2 μm 滤膜, 上机测试。

1.3 仪器条件

1.3.1 液相色谱条件

色谱柱: Waters BEH-C₈ (50 mm × 2.1 mm i. d., 1.7 μm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸水, B 为 0.1% 甲酸乙腈; 梯度: 0 ~ 0.8 min, A 为 90%, 0.8 ~ 32.5 min, A 从 90% 变为 20%, 3.5 ~ 5.0 min, A 从 20% 变为 90%; 柱温: 30℃; 进样量: 2 μL。

1.3.2 质谱条件

离子化方式: 电喷雾电离-正离子模式 ESI (+); 电离电压: 3.2 kV; 离子源温度: 120℃; 脱溶剂气温度: 350℃; 锥孔电压: 30 V; 采集方式: 多反应监测 (MRM); 选择离子: 127 > 85 (定量离子), 127 > 68 (辅助定性离子); 碰撞能量均为 20 eV。

1.4 离子谱图

图 1 为三聚氰胺标准提取离子谱图。

2 结果与讨论

2.1 三聚氰胺标准溶液的配制

三聚氰胺能溶于甲醇, 微溶于水^[1]。但在配制

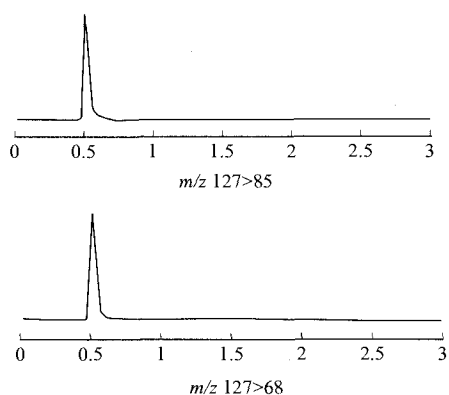


图1 三聚氰胺标准提取离子谱图

标准溶液的过程中发现:三聚氰胺在甲醇中较难溶解,而在甲醇-水体系中却比较容易溶解。因此,实验采用甲醇-水(体积比为7:3)作为溶剂配制标准溶液。

2.2 样品预处理条件

由于三氯乙酸有沉淀蛋白的作用并在酸性条件下有助于溶解三聚氰胺,因此选择1%三氯乙酸溶液作为提取液。对于固相萃取柱,先后试验了AccuBOND II ODS C₁₈ Cartridges (3 mL, 500 mg)、AccuBOND II SCX Cartridges (3 mL, 500 mg)、OASIS MCX (6 mL, 500 mg) LP Extraction Cartridges 小柱,发现OASIS MCX (6 mL, 500 mg)的净化作用及回收率最好,因此采用OASIS MCX作净化柱。

2.3 电喷雾串联质谱条件的优化

通过预试验发现,子离子 m/z 85 是母离子 m/z 127 脱掉 NCNH_2 得到的,具有较高的离子丰度,当碰撞能量为 20 eV 时达到最大值,其他的子离子在最优化的条件下离子丰度仍不如 m/z 85 的大,因此选择 m/z 85 作为定量离子。子离子 m/z 68 是子离子 m/z 85 进一步脱 NH_3 得到的,离子丰度相对于其他的子离子要高,因此选择 m/z 68 作为辅助定性离子。同时,在流动相中添加 0.1% 甲酸,来改善质谱的离子化效果,从而提高质谱检测的灵敏度。

2.4 线性范围与检出限

将浓度分别为 0.1、0.5、1.5、3.0、10.0 mg/L 的三聚氰胺标准系列溶液依次进样,进样量均为 2 μL ,

外标法定量。以峰面积 A 为纵坐标,浓度 c 为横坐标进行线性回归,得线性方程为 $A = 42\,617c + 5\,168$,相关系数 0.999 9。经实验测定,方法最低检出限为 0.5 mg/kg。

2.5 精密度和准确度

分别向小麦粉、大豆蛋白粉、饲料、肉及肉制品等基质中添加浓度为 0.5、1.0、5.0 mg/kg 的三聚氰胺进行加标回收试验,回收率及相对标准偏差计算结果列于表 1。

表1 相对标准偏差 ($n=6$) 与加标回收试验结果

样品	添加浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
大豆蛋白	0.5 ~ 5.0	84 ~ 95	6.47
小麦粉	0.5 ~ 5.0	71 ~ 95	9.82
肉及肉制品	0.5 ~ 5.0	70 ~ 81	4.56
饲料	0.5 ~ 5.0	73 ~ 86	5.13

2.6 样品检测

运用本方法对蛋白粉、面粉、饲料、肉及肉制品等共 78 个样本进行了检测,结果良好。共检出 3 个阳性结果,浓度在 0.5 ~ 5.0 mg/kg。

3 结语

固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测食品中的三聚氰胺,在样品预处理中采用阳离子交换柱,净化效果好,同时使用液相色谱-四极杆串联质谱来检测食品中的三聚氰胺。串联质谱 MRM 采集方式的高选择性使得方法的准确度更高,同时采用 Waters BEH-C₈ 色谱柱使目标物和杂质得到较好的分离。用该法测定食品中三聚氰胺含量,准确可靠,重复性好,灵敏度高,满足出口食品检测的需要。

参考文献

- [1] 侯艳丽,张惠茹,刘来亭,等.三聚氰胺的检测方法[J].河南畜牧兽医,2007,28(9):32-33.
- [2] Updated FCC Developmental Melamine Quantitation (HPLC-UV). U. S. Food and Drug Administration. http://www.fda.gov/cvm/melamine_04022007.htm.
- [3] 吴明礼,陈彩虹.高效液相色谱法(HPLC)测定单氰胺中三聚氰胺的含量[J].宁夏石油化工,2005,(2):24-26.
- [4] 辜雪英,吴小花,仇满珍.饲料中三聚氰胺残留量高效液相色谱测定的研究[J].江西化工,2007,(2):70-73.

DETERMINATION OF MELAMINE IN FOODS BY SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Liu Mei¹, Li Jinqiang², Tian Dejin¹, Li Peinuan², Cao Peng², Fu Jian¹, Lou Xishan¹

(1. Longda Foodstuffs Group Co. Ltd. Inspection Center, Laiyang 265231, China;

2. Yantai Entry-Exit Inspection And Quarantine Bureau Technology Center, Yantai 264000, China)

ABSTRACT After homogenization, the sample was extracted with 1% trichloroacetic acid solution, then cleaned with OASIS

MCX LP extraction column. The extracted solution was concentrated at low - pressure and dissolved with methanol. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC - MS - MS) analysis was performed on a Waters BEH - C8 column, acetonitrile and water were used as mobile phase. The linear ranges were from 0.1 mg/kg to 10.0 mg/kg with correlation coefficient of 0.9999. The mean recoveries were from 71% to 95%, and the RSD was 4.56% - 9.82% ($n=6$). The limit of determination was 0.5 mg/kg.

KEYWORDS solid phase extraction, liquid chromatography tandem mass spectrometry, melamine

化学发光检测仪研制成功

电化学发光检测是近几年发展起来的毛细管电泳分析中的一种新的检测方法,它将毛细管的分离技术与电化学发光检测相结合,在临床分析及医药、病毒、免疫等科学实验中大大简化分析的技术难度,提高分析的准确性。目前,国际上尚未有关于电化学发光检测仪器的报道,相关的应用研究和有效地在电极表面固定电化学发光试剂的技术报道也很少。根据“十五”国家科技攻关重大项目《科学仪器研制与开发》计划安排,该所于2001年12月承担了“毛细管电泳电化学发光检测仪”的研制与开发任务,他们与西安瑞迈公司紧密合作,经过一年半的攻关,解决了仪器研制中毛细管电泳分离单元设计、电化学单元与发光检测单元的一体化、将分离毛细管与检测器方便安装在一起的电化学检测池的设计、器件组装等关键技术,研制成功了集毛细管电泳分离和电化学发光检测各自特点于一身的“毛细管电泳电化学发光检测仪”。仪器的电流随电位变化的同步性,电化学控制单元的响应速度、灵敏度和分离效率等性能,得到了有效提高,并且实现了CE/ECL在线分离,实时检测。仪器的毛细管电泳系统、电化学发光系统及其接口技术同时具有可分别或联合使用等功能。这种电化学分析仪器可用于药物、氨基酸、多肽、蛋白质及核酸等检测分析,并可适用于蛋白质与药物、核酸相互作用的研究,在生化、医药、临床、免疫等方面有着更为广阔的市场前景。同时,它比相关领域通常应用的进口“毛细管电泳激光诱导荧光分析仪”大大降低了成本。目前,该仪器已应用于药物、医学等方面的科学分析工作。

(仪器信息网)

美研发微型有毒气体探测传感器

美国麻省理工学院研究人员正在全力开发一种微型传感器,该传感器能对微量有毒气体做出相当强烈的反应,能比以往任何装置都更加迅速地检测有毒工业化学品和生化战剂。研究人员在2008年微型机电系统(MEMS)大会上介绍了这一研究计划。有别于以往的实验室设备,这种微型气体探测器在现实环境中更易于使用,可以分散布置在室内或室外任何区域。该小型装置既减少了额定功率的消耗,还能对更为微量的气体做出敏感反应。

研究人员计划制造出的整个探测装置仅为一个火柴盒大小。探测装置将利用气相色谱—质谱技术感受识别气体分子,并将检验结果转化成电子报警信号。目前世界上已有的便携式气相色谱—质谱仪需要耗时15 min才能给出结果,且有效探测范围只有约一个食品袋容积大小。在耗能方面,已有的便携式气体传感器需要耗用上千焦耳的能量,而

新型传感器耗能只有约4 J,且只用4 s就能给出结果。研究人员计划在两年内完成开发,研发成功后将主要适用于保护供水系统和医疗诊断系统。

(仪器信息网)

中国将修订《药典》推出中药标准规范技术体系

国家食品药品监督管理局药品注册司司长张伟1月8日透露,第九届中国药典委员会于去年底正式成立,目前已开始研究制定2010年版中国药典修订原则,并提出建立中药标准规范技术体系。

张伟在北京举行的新闻发布会上称,将建立的中药标准规范技术体系包括:中药材资源与生产标准;符合中药特点的质量控制标准;中药研发流程;上市后安全监测与再评价、不良反应监测;中药注册管理及技术审评。他说,中药质量管理环节多、涉及面广,与化学药相比,其标准规范技术尚不完善且没有现成的国际经验可借鉴。因此,需要下大力气进行系统研究。此前推出的指纹图谱控制技术就是开展中药标准控制检测研究的成果之一。

(林)

美国国家工程院评出21世纪14大科技挑战

美国国家工程院(NAE)2月15日公布专家评选出的人类在21世纪面临的14大科技挑战。专家认为,如果这些难题被攻克,人类生活质量将有所提高。

这些挑战由美国全国科学基金会邀请来自各个领域的专家评选。评选结果已由来自50多个领域的其它专家审阅。评审专家说,评选结果有4大主题:环境的可持续性、健康、减少易被攻击性和生活乐趣。

最终入选的重大挑战包括:太阳能的普遍应用、利用核聚变能量、使全球民众喝上洁净水、防止核恐怖事件发生、保障网络空间安全、提高人类自学能力、在工农业生产中合理使用氮制品等。

美国国家工程院院长查尔斯·维斯特说:“任何一个难题的攻克都会极大提高全球每一个人的生活质量。”

(林)

2007年我国仪器仪表进出口简况

据机电商会整理中国海关统计数据,出口方面:我国仪器仪表1~12月出口额为345.44亿美元,比上年同期增长12.7%,12月仪器仪表出口额为36.04亿美元,同比增长25.9%;进口方面:我国仪器仪表1~12月进口额为678.76亿美元,比上年同期增长18%,12月进口额为70.42亿美元,同比增长32.6%。重点产品进口数量和金额:1~12月,液晶显示板进口数量19.5亿片,同比增长9.5%,进口金额为405.85亿美元,同比增长25.9%;偏振材料制的片及板进口数量2399.37万片,同比增长48.9%,进口金额为16.17亿美元,同比增长37.6%。

(林)