

HPLC-MS-ESI 法快速测定乳粉及乳制品中三聚氰胺的方法研究

黄宏南¹, 林宏琳¹, 华永有¹, 庄宛³, 邓婧², 郑奎城¹

1 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001; 2 福建中医药大学; 3. 厦门出入境检验检疫局

摘要: 目的 建立乳粉及乳制品中三聚氰胺含量的 HPLC 初筛、离子阱质谱确证的测定方法。方法 液相色谱以离子对缓冲液: 乙腈= 90: 10(V/V) 为流动相, Xtimate-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 240 nm 检测波长, 离子阱质谱电离方式: 电喷雾电离(ESI), 正离子。结果 回归方程为: $y = 1.085517 \times 10^4 x + 8.576547 \times 10^4$ ($r^2 = 0.999925$); 添加浓度 0.8~2.0 mg/kg, 回收率 82.0%~94.1%, 相对标准偏差 < 5.8%。结论 用 HPLC 进行粗筛, 以 LG-MS-ESI 确证乳粉及乳制品中三聚氰胺的含量, 方法简便, 重现性好, 灵敏度高, 定性准确, 定量精确。

关键词: 乳粉卫生; 乳制品; 三聚氰胺; 高效液相色谱; LG-MS-ESI

中图分类号: R 155.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-2705(2011)01-0001-03

Research on rapid determination of melamine in milk powder and dairy products by HPLC-MS-ESI

HUANG Hong-nan, LIN Hong-lin, HU A Yong-you, et al

Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China

Abstract: Objective To establish a determination method of melamine in milk powder and dairy products by HPLC and confirmed by LG-MS. **Methods** With Xtimate-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) as chromatographic column, mobile phase of buffer: acetonitrile = 90: 10, PDA and Finnigan LCQ Deca XP MAX MS detector was performed. **Results** The linear regression function was as follows: $y = 1.085517 \times 10^4 x + 8.576547 \times 10^4$ ($r^2 = 0.999925$). The average recovery rates were 82.0%~94.1% with added 0.8~2.0 mg/kg, relative standard deviation < 5.8%. **Conclusion** The HPLC-PDA method is simple, sensitive, reliable and accurate for detection of melamine in milk powder and dairy products

Key Words: Milk Health; Dairy Products; Melamine; HPLC; LG-MS-ESI

三聚氰胺是一种重要的氮杂环有机化工原料, 白色结晶粉末, 无味。2007年初, 美国发生多起宠物中毒死亡事件, 美国食品药品监督管理局(FDA)调查发现宠物食品所用的小麦麸蛋白添加物中有较多三聚氰胺存在, 动物食用后可发生肾衰竭并导致死亡。

目前各机构开发的检测方法有: 气相色谱质谱法(GC-MS)、液相色谱串联质谱法(LG-MS-MS)和液相色谱法等。前两种方法可以在定量的同时进行定性, 准确度高, 误判可能性小; GC-MS法需要衍生化处理, 但灵敏度高, 方法稳定; LG-MS-MS法不用衍生, 但样品基质干扰较严重, 通常需要建立一整套严格而又烦琐的样品净化步骤。

本文方法采用三氯乙酸和乙腈的混合溶液提取, 经超声振荡提取、高速离心后过阳离子交换固相萃取

柱, 氮吹法处理后由 HPLC 仪检测粗筛, 离子阱质谱确证。方法处理简单快速, 能有效的排除假阳性, 定性准确, 结果可靠。

1 材料与方 法

1.1 仪器 高效液相色谱仪系统(Waters 2695型), 配全自动进样器, 二极管阵列检测器(Waters 2996型); KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Beckman Coulter离心机; MILLIPORE direct-Q 纯水系统; 0.45 μm 微孔过滤膜。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯); 乙腈(色谱纯); 三氯乙酸; 柠檬酸; 辛酸磺酸钠; 离子对试剂缓冲液: 准确称取 2.10 g 柠檬酸和 2.16 g 辛酸磺酸钠, 加入约 980 mL 水溶解, 调节 pH 至 3.0 后, 定容至 1 L 备用; 三聚氰胺标准品(纯度 99.0%, 美国 sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Xtimate-C₁₈(4.6 mm×

基金项目: 福建省医学创新课题(No. 2009-CXB-35)。

第一作者简介: 黄宏南(1960-), 男, 博士, 主任技师。专业: 营养与食品安全研究。

250 mm, 5 μm); 流动相: 离子对缓冲液: 乙腈= 90:10(V/V); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL ; 检测波长: 240 nm。

离子阱质谱条件: 电离方式: 电喷雾电离(ESI), 正离子; 离子喷雾电压: 4 kV; 扫描模式: full, 母离子 m/z 127, 子离子 m/z 85, 碰撞能量 m/z 127 > 85 为 38。

1.3.2 标准曲线的制备 精密称取三聚氰胺标准品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即成浓度为 1.0 mg/mL 的储备液。测定前用流动相分别稀释配成 0.8、2、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准系列溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜后进样 20 μL 测定, 以峰面积-浓度绘制标准曲线。

1.3.3 试样处理 精密称取试样 2 g, 于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 1% 三氯乙酸 15 mL 和 5 mL 乙腈, 超声提取 10 min, 4 000 r/min 离心 10 min。上清液经三氯乙酸溶液湿润的滤纸过滤后, 用三氯乙酸溶液定容至 25 mL, 移取 5 mL 水混匀, 移至固相萃取柱中, 依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗涤, 抽至近干后, 用 6 mL 氨化甲醇溶液(氨水: 甲醇= 5: 95) 洗脱。洗脱液于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干, 残留物用 1 mL 流动相定容, 涡旋混合 1 min, 过微孔滤膜后, 供 HPLC 测定。

1.3.4 测定及计算 取 1.3.3 项下处理好的试样进样 20 μL , 与标准品保留时间比较进行初步定性, 以 PDA 光谱图比较做进一步定性, 据样品测定的色谱峰面积, 在相应的标准曲线上计算出对应的含量, 根据公式计算样品中三聚氰胺的含量。计算公式: $X = A \times V_1 / (m \times V_2)$, 式中: X 为试样中三聚氰胺的含量 (mg/kg); A 为进样体中三聚氰胺的质量 (mg); V_1 为试样定容体积 (mL); V_2 为进样体积; m 为试样的质量 (g)。

2 结果分析

2.1 HPLC 色谱图 按照 1.3.1 的色谱条件测定, 得到三聚氰胺标准品 HPLC 色谱图和样品 HPLC 色谱图, 分别见图 1、2。可见三聚氰胺标准品的保留时间 (R_t) 为 22.202 min, 样品的保留时间 (R_t) 为 20.985 min。

2.2 PDA 光谱图 将三聚氰胺标准品在 200~500 nm 波长范围内扫描, 在 236.3 nm 处测得最大吸收, 见图 3, 确定三聚氰胺的检测波长为 240 nm。样品的 PDA 光谱见图 4, 可见样品在 237.4 nm 处有最大吸收。

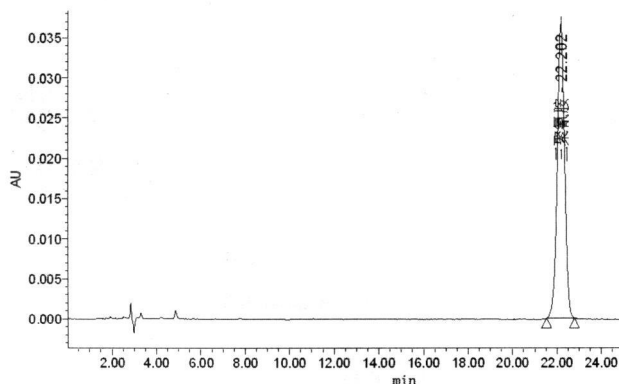


图 1 三聚氰胺标准品 HPLC 色谱

Figure 1 HPLC chromatogram of standard melamine

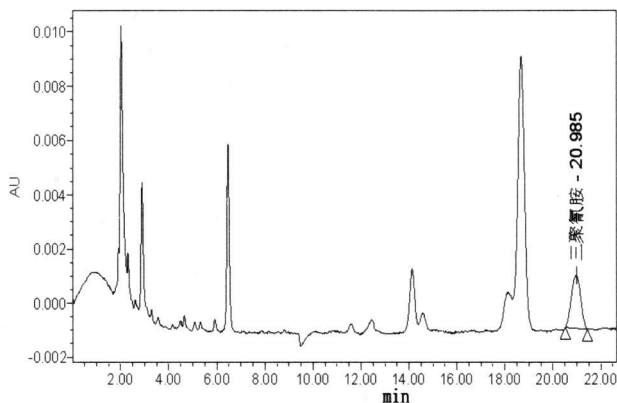


图 2 奶粉样品 HPLC 色谱

Figure 2 HPLC chromatogram of milk sample

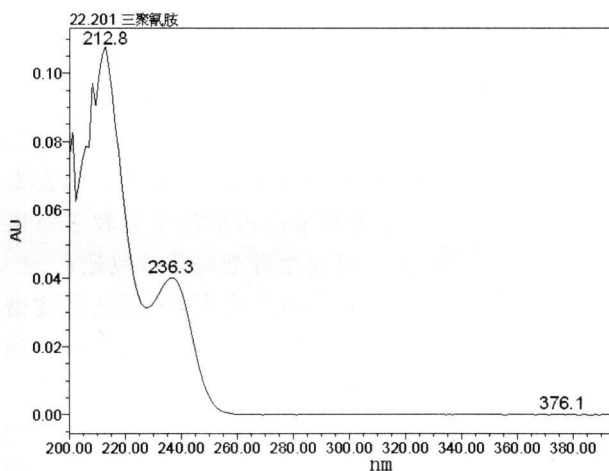


图 3 三聚氰胺标准品 PDA 光谱

Figure 3 PDA spectrum of standard melamine

2.3 离子阱质谱确认实验 按前述质谱仪设定条件测定, 获得三聚氰胺标准品母离子色谱图(图 5), 样品中三聚氰胺标准品母离子选择离子质谱图(图 6)和样品中三聚氰胺标准品子离子选择离子质谱图(图 7), 与标准比较一致, 确认为三聚氰胺。

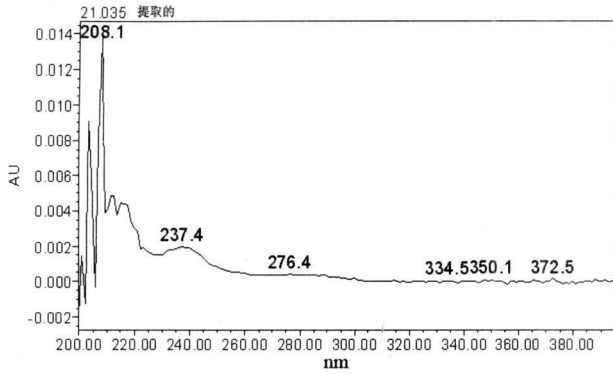


图4 样品中三聚氰胺标准品 PDA 光谱

Figure 4 PDA spectrum of standard melamine

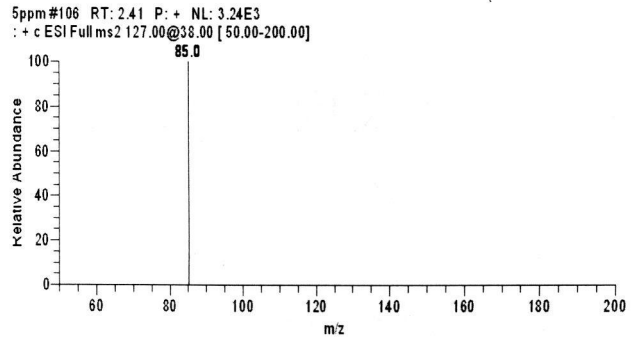


图7 样品中三聚氰胺标准品子离子选择离子质谱

Figure 7 Mass spectrum of daughter ion of standard melamine in sample

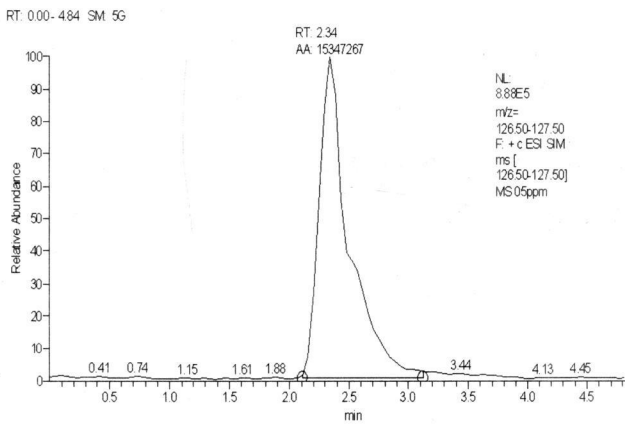


图5 样品中三聚氰胺标准品母离子色谱

Figure 5 Chromatogram of parent ion of standard melamine in sample

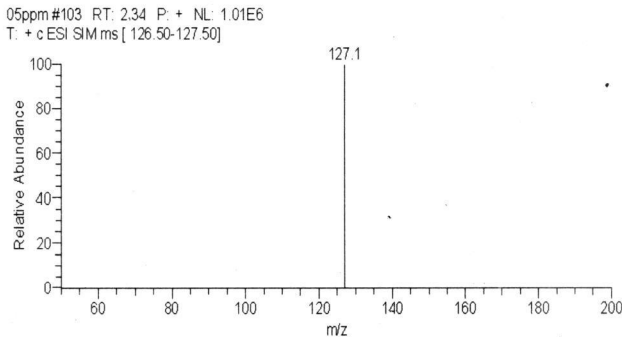


图6 样品中三聚氰胺标准品母离子选择离子质谱

Figure 6 Mass spectrum of parent ion of standard melamine in sample

2.4 方法性能指标的考察

2.4.1 标准曲线的线性和检测限 按 1.3.2 绘制标准曲线, 计算得回归方程 $y = 1.085517 \times 10^4 x + 8.576547 \times 10^4$, 相关系数 $r = 0.999925$ 。结果表明: 三聚氰胺溶液在 0.8~80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内具有良好的线性关系, 当信噪比为 3:1 时, 三聚氰胺的检测限为 0.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4.2 方法准确度和精密度 在未检出三聚氰胺的空白奶粉中分别添加 0.8、1.5、2.0 mg/kg 标准溶液进行实验, 每个水平作 3 个平行实验, 按 1.3.3 项进行处理, 计算平均回收率和相对标准偏差 (RSD), 以考察方法的准确度和精密度, 结果见表 1。

表 1 空白奶粉中不同水平三聚氰胺回收率和相对标准偏差

Table 1 Recovery and relative standard deviation of melamine at different levels in blank milk powder

添加量 (mg/kg)	实测量 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
0.80	0.656	82.0	5.8
1.5	1.45	97.0	3.2
2.0	1.88	94.1	2.1

3 讨论

本法在混合液提取、超声振荡、高速离心后, 部分去除了基质所带来的干扰, 混合形阳离子交换固相萃取柱的吸附解脱, 进一步去除了奶粉中杂质的干扰, 且富集浓缩了目标物, 提高了检测的灵敏度。奶粉中添加三聚氰胺回收率在 82.0%~94.1%, 方法的稳定性高, RSD 不大于 5.8%。疑似样品经液质联用仪检测与标准品比较母离子 m/z 127, 子离子 m/z 85 相一致, 判定为阳性, 大大提高该法的定性准确性, 故本法适用于乳粉及乳制品中三聚氰胺含量的常规检测。

参考文献

- [1] GB/T 22388-2008. 原料乳与乳制品中三聚氰胺检验方法[S].
- [2] 丁涛, 徐锦忠, 李健忠, 等. 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[J]. 色谱, 2008, 26(1): 6-9.

收稿日期: 2010-08-20; 修回日期: 2010-12-17

责任编辑: 方林; 英文编辑: 范新宇