

技术交流

三重串联四级杆液质联用仪检测糖果中三聚氰胺

许彩霞, 吴文¹, 董健¹, 张志灵²

(1.泉州出入境检验检疫局, 福建 泉州 362000 2.厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 本文建立了高效液相色谱串联质谱检测糖果中三聚氰胺的方法。以糖果为基质, 采用三氯乙酸水溶液超声提取目标分析物, 提取液经过离心、净化处理后, 用强阳离子交换与反相 C_{18} 混合填料色谱柱分离, 乙腈和10mmol/L乙酸铵作为流动相(1:1), 用串联质谱在多级反应监测模式下定量检测。LC-MS/MS定量限为0.01mg/kg, 线性范围为10~500 μ g/L, 相关系数 $r^2 > 0.99$, 平均回收率为66.8%~98.7%, 相对标准偏差为1.9%~7.6%(n=6)。

关键词: 糖果; 三聚氰胺; 液相色谱串联质谱; 定量分析

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1009-8143(2010)02-0026-05

Determination of Melamine in Candies by Triple Quadrupole Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Xu cai-xia¹, Wu wen¹, Dong jian¹, Zhang zhi-ling²

(1.Quanzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Quanzhou, Fujian 362000, China;

2.Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

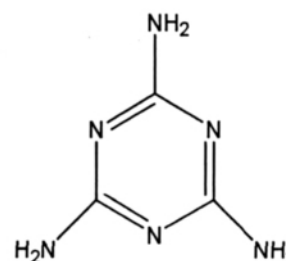
Abstract: A method to analyze melamine residue in candies was established by using triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Trichloroacetic acid was used to extract the target analyte. The CAPCELL PAK CR column was used for separation and the multiple reaction monitoring (MRM) positive ion mode was used for the determination. The limit of detection was 0.01mg/kg for LC-MS/MS. The coefficient of linear calibration curve was over 0.99 within the melamine concentration range of 10~500 μ g/L. The average recoveries of melamine by this method were 66.8%~98.7%, and the RSDs ranged from 1.9%~7.6%(n=6)

Keywords: candies; melamine; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; quantity analyze

1 前言

三聚氰胺(melamine), 学名三氨基三嗪, 简称三胺, 白色无味结晶粉末, 分子式为 $C_3N_6H_6$, 分子结构式见图1。三聚氰胺作为一种重要的氮杂环有机化工原料, 主要用于生产塑料、胶水、厨房用具和阻燃剂^[1-2]。由于三聚氰胺分子量中氮含量达到66%, 不法厂商为了增加产品的表观蛋白质含量, 将三聚氰胺非法添加到淀粉、古朊粉、蛋白粉中。2008年9月, 我国发生了婴幼儿因食用三聚氰胺污染的奶粉

导致肾结石甚至死亡的现象, 在社会上引起高度关注。



Melamine

图1 三聚氰胺结构式

收稿日期 2009-12-24

作者简介 许彩霞(1981~), 女, 硕士, 助理工程师, 从事食品检测。E-mail: xucaixia088@163.com

目前制定的国内外标准主要用于奶粉、古元蛋白、宠物食品、鲑鱼、猪肉及畜类组织中三聚氰胺的检测^[3-7],其检测方法有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、液相色谱-质谱法等(LC-MS/MS)。液相色谱法的灵敏度较低(一般为1mg/kg),无法进行确证分析。质谱法灵敏度高,抗干扰能力强,是分析三聚氰胺的理想方法。

糖果主要原料有糖类原料、脂类、乳品、胶体原料和其他食品添加剂。一般糖果都添加了乳成分,如乳脂糖果以白砂糖、淀粉糖浆(或其他食糖)、油脂和乳制品为主料制成的,蛋白质不低于1.5%。目前各国对糖果中三聚氰胺的限量做了规定,例如欧盟对从中国进口的乳含量超过15%的所有食品(如巧克力、糖果、饼干等)设定了三聚氰胺的最大残留限量为2.5mg/kg,美国对含乳食品、高蛋白食品设定了三聚氰胺的最大残留限量为0.25mg/kg,而目前国内还没有关于糖果中三聚氰胺残留检测的标准,因此建立一种准确测定糖果中三聚氰胺残留的方法对于糖果的卫生安全有着重要意义。本文研究建立了利用LC-MS/MS法确认糖果中残留的三聚氰胺的分析方法。大量样品的分析结果表明,该方法可用于糖果中三聚氰胺的确证和检测。

2 实验部分

2.1 主要仪器与试剂

Agilent G6460 LC-MSDQQQ 三重串联四级杆液质联用仪,美国 Agilent 公司;高速离心机 10000rpm, Xiangyi H-1650,长沙湘仪;数控超声清洗仪器, KQ-500DE, 昆山;分析天平(感量 0.01g), PL1502-S 梅特勒-托利多;涡旋振荡器,广州。

三聚氰胺标准品(纯度 ≥ 99.5%);乙腈、甲醇、甲酸、醋酸均为农残级,购于美国天地;水为超纯水;有机相滤膜(0.22μm),PCX 固相萃取柱, CX0603, 60mg/3mL。

2.2 三聚氰胺标准溶液的配制

准确称量 100mg(精确至 0.0001g)三聚氰胺标准品于 100mL 容量瓶中,用 20%甲醇水溶液溶解并定容至刻度,配制成 1mg/mL 的标准储备液。逐级稀释得到浓度为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5μg/L 的标准工作液。

2.3 样品前处理

取样品 2.00g 均质样品置于 50mL 具塞离心管中,加入 20mL 1%乙酸水溶液,超声提取 10min,再振荡提取 10min,以 10000 r/min 离心 5min,移取上清液 10mL 作待净化液。将待净化液转移到固相萃取柱 PCX 中,依次用 3mL 水和 3mL 甲醇洗涤,抽近干后,用 3mL 5%氯化甲醇洗脱。洗脱液于 50℃ 下用氮气吹干,残留物用 1mL 甲醇水(1:4)溶液定容,涡旋振荡 1min,过 0.22μm 微孔滤膜后,供 LC-MS/MS 测定。

2.4 色谱条件

2.4.1 液相色谱条件 色谱柱为强阳离子交换与反相 C₁₈ 混合填料,150mm×2.0mm(id),5μm;进样量 10μL;柱温为 40℃;流速为 0.4ml/min;流动相为等体积的乙酸铵溶液(10mmol/L)和乙腈,用乙酸调节 pH=3.0 等梯度洗脱。

2.4.2 质谱条件 电离方式为电喷雾电离,正离子模式;离子喷雾电压 4kV;雾化气和干燥气都为氮气,雾化气 40psi;干燥气 8 l/min,温度 350℃;碰撞气为氮气,压力为 0.2MPa;扫描方式为多反应监测(MRM)。

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化^[8-9]

在未接入色谱柱下,先优化质谱,即以 0.1ml/min 的流速注入 0.1μg/mL 的三聚氰胺标准溶液,在 ESI 正离子模式下进行一级质谱扫描(MS2 scan),确定三聚氰胺的分子离子峰为[M+H]⁺。以其分子离子峰作为母离子,进行子离子扫描(product scan),主要产生 85、68 等离子。其中 m/z 85 为三聚氰胺开环分子重排的碎片离子峰,m/z 68 为 m/z 85 脱去 NH₃ 的碎片离子峰。以丰度最强的碎片离子 85 为定量离子,次强的碎片离子 68 为定性离子。在多反应监测模式下优化裂解电压和碰撞能等参数,优化后的质谱条件见表 1。

3.2 色谱条件优化

由于三聚氰胺含有 3 个有机氮基团,具有较强的极性。比较了流动相中乙腈的体积分数(40%, 50%, 60%, 70%, 80%)对三聚氰胺出峰时间的影响。结果表明,乙腈的体积分数从小逐渐增大时,峰型

表1 三聚氰胺的质谱条件

分析物 Analyte	母离子 Precursor ion//m/z	裂解电压 energy	Fragment MS1 Res	子离子 Product ion /m/z	MS2 Res	停留时间 Dell time	碰撞能 Collision energy//eV
三聚氰胺 melamine	127	100	unite	*85 68	unite unite	200 200	20 30

注:* 定量离子

越尖锐,三聚氰胺的保留时间由 7.5min 逐渐提前到 2.4min。根据相似相溶原理,流动相中乙腈的比例越大,出峰时间越快。但为了更好地分离杂质和目标物,要选用三聚氰胺适宜的出峰时间。当流动相中乙腈体积分数为 50%时,出峰时间为 5.6 min 左右,相对比较理想。

3.3 提取及净化条件的优化

三聚氰胺属于强极性的弱碱化合物,因此提取溶剂一般选用极性较强的有机溶剂(甲醇、乙腈)、缓冲溶液或水和有机溶剂的混合溶液。常见的提取溶剂有稀盐酸、乙腈、甲醇:水(体积比为 1:1)、1%三氯乙酸水溶液作为提取剂。考虑到盐酸溶液对质谱的影响及乙腈成本高、毒性大,本研究直接采用三氯乙酸提取。提取效果将在 3.5 回收率和精密度试验中进一步讨论。

3.4 线性范围和检测低限

以三聚氰胺的质量浓度为横坐标, m/z 127>85 峰面积为纵坐标,进行线性回归(图 2),结果表明,在

10~500 μ g/L 的线性范围内三聚氰胺的质量浓度与 m/z 127>85 峰面积线性关系良好,相关系数大于 0.99。

分别选用阴性胶基糖果、硬质糖、乳脂糖添加三聚氰胺进行添加试验,添加水平为 10 μ g/kg 三聚氰胺,胶基糖果、硬质糖、乳脂糖,三聚氰胺的信噪比(S/N)均大于 10,表明方法的定量限可以达到 10 μ g/kg。

3.5 回收率和精密度试验

分别选取阴性 1g 胶基糖果、硬质糖、乳脂糖样品,添加 1 mL 10.0 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L 三聚氰胺标准溶液。每个添加水平平行 6 次,如胶基糖果记为 jj10-①、jj10-②、jj10-③、jj10-④、jj10-⑤、jj10-⑥ jj50-①、jj50-②、jj50-③、jj50-④、jj50-⑤、jj50-⑥ jj100-①、jj100-②、jj100-③、jj100-④、jj100-⑤、jj100-⑥。硬质糖和乳脂糖也类似,共 54 个试样,考察该方法的平均回收率和精密度,结果见表 2。

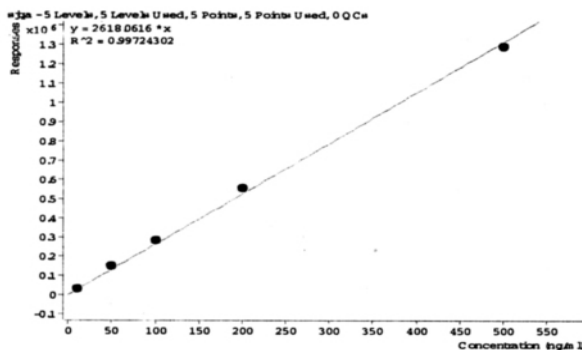


图2 三聚氰胺标准曲线图

表2 胶基糖果、硬质糖、乳脂糖样品中三聚氰胺的添加回收率(n=6)

三聚氰胺添加水平 // μ g/kg	胶基糖果		硬质糖		乳脂糖果	
	平均回收率 //%	相对标准偏差 RSD//%	平均回收率 //%	相对标准偏差 RSD//%	平均回收率 //%	相对标准偏差 RSD//%
10	66.8	7.6%	76.0	3.4%	69.4	0.8%
50	85.6	7.0%	98.7	6.3%	86.8	1.9%
100	70.7	6.3%	97.0	5.5%	90.1	3.7%

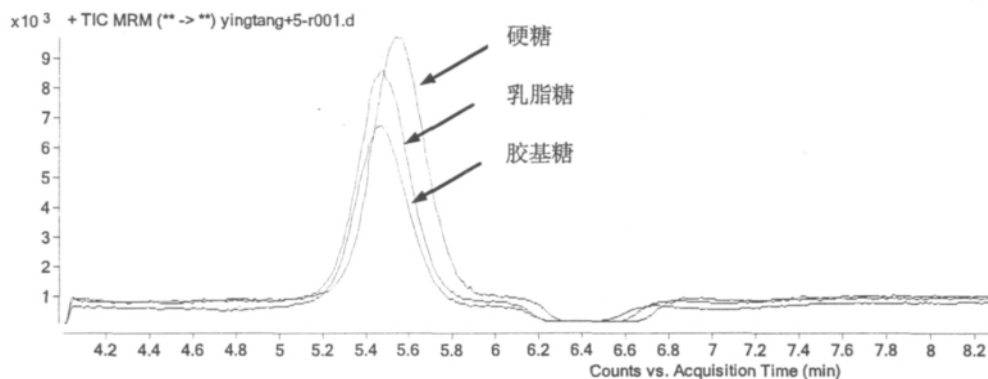


图3 硬糖、乳质糖、软糖分别添加 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 三聚氰胺的TIC图

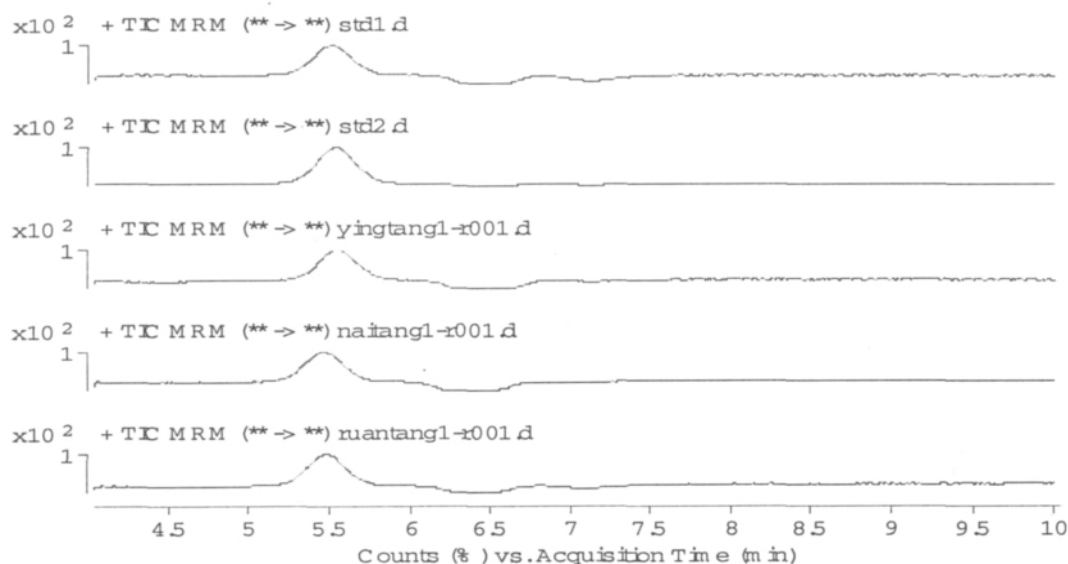


图4 三聚氰胺标样、硬糖、奶糖、软糖TIC图(std1: $10.0\text{ng}/\text{mL}$, std: $50.0\text{ng}/\text{mL}$)

从回收率结果看,用三氯乙酸提取胶基糖果、硬质糖、乳脂糖效果都比较好,回收率在66.8%~98.7%。不同种类的糖果回收率略有差别。硬质糖、乳脂糖的回收较高,胶基糖果的回收率相对较低,可能是糖果中的胶质对三聚氰胺包覆,从而影响提取、过柱的效果。图3进一步比较了胶基糖果、硬质糖、乳脂糖在 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平的TIC图峰面积。从图3中可以明显看出,对于相同的添加水平,硬糖、乳脂糖的TIC峰面积高于胶基糖果的TIC峰面积,说明不同的糖果基质对样品的前处理有影响,从而导致不同的回收率。

在低添加水平下,回收率比较低。这是因为在整个样品的前处理中,稀释倍数为2,对于添加 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、三聚氰胺相当于预期的检测浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的低添加水平下,前处理的微小变化(过柱、取样)都会影响检测的结果,因此回收

率比较低。但从总体看,回收率为66.8%~98.7%,相对标准偏差为1.9%~7.6%,与文献中串联质谱法检测禽蛋、水产品回收率相近^[10,11]。以HPLC-MS/MS检测糖果中三聚氰胺具有较好的精密度和重复性。

3.6 样品测定

图4为三聚氰胺标样和实际检测样品硬糖、软糖、乳糖的TIC比照图。标准样品质量色谱峰保留时间为5.53,样品的质量色谱峰保留时间为5.55,变化范围在 $\pm 2.5\%$ 之内。从 $10.0 \mu\text{g}/\text{L}$ 标样和硬糖提取的平均质谱图如图5所示,定性离子和定量离子的相对丰度比分别为57.5和55.5。相对丰度偏差小于 $\pm 20\%$ 。从保留时间和两个子离子的相对丰度可以判断样品中存在三聚氰胺。该方法适合于糖果中三聚氰胺的确认和检测。在50批次糖果检测中,20批次糖果三聚氰胺含量小于 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$,11批次糖

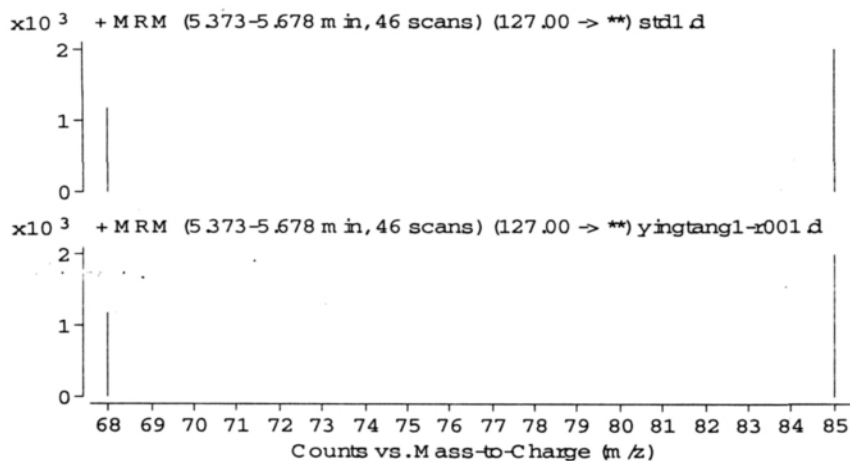


图5 三聚氰胺标样与硬糖的质谱图

果三聚氰胺含量为 $20\mu\text{g/kg}$,8 批次糖果三聚氰胺含量为 $30\mu\text{g/kg}$,1 批次糖果三聚氰胺含量为 $130\mu\text{g/kg}$ 。

4 结 论

该实验建立了确认糖果中三聚氰胺残留量的 HPLC-MS/MS 测试方法。该方法检测的限量为 $10\mu\text{g/kg}$,平均回收率为 66.8%~98.7% 相对标准偏差为 1.9%~7.6%(n=6)。可用于糖果中三聚氰胺残留的确证和检测。

参考文献

- [1] 史焯弘, 石欲容. 超高速液相色谱测定奶粉中的三聚氰胺 [J]. 分析科学学报, 2005, 25(2): 214- 216.
- [2] 王会串. 三聚氰胺的生产技术和应用前景 [J]. 精细与专用化学品, 2007, 15(11): 33- 36.
- [3] GB/T22388- 2008. 原料乳及乳制品中三聚氰胺检测方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [5] David N.Heller, Cristina B.Nochetto. Simultaneous determination and confirmation of melamine and cyanuric acid in animal feed by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun. Mass Spectrom, 2008, 22: 3624- 3632.
- [6] Liang Zhu, Gerardo Gamez, Huanwen Chen, et al. Rapid detection of melamine in untreated milk and wheat gluten by ultrasound-assisted extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI- MS) [J]. Chem. Commun, 2009, 559- 561.
- [7] Toth, J.P., Bardalaye, P.C. Capillary gas- chromatographic separation and mass- spectrometric detection of cyromazine and its metabolite melamine [J]. Journal of Chromatography, 1987, 408: 335- 340.
- [8] Shuiping Yang, Jianhua Ding, Jian Zheng, et al. Detection of melamine in milk products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81.
- [9] Cyfec Research Division, Cyfec Industries. Characterization of (Methoxymethyl) melamine resins by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Anal. Chem, 1994, 66: 3261- 3213.
- [10] 孙伟红, 冷凯良, 邢丽红, 等. 高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱法快速确证水产品中残留的三聚氰胺 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 3872- 3873.
- [11] 戴玉子, 刘洁, 赵君, 等. 改进的食品中三聚氰胺的高效液相色谱串联质谱检测法 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(03): 325- 327.