

亲水作用色谱-串联质谱法测定化妆品中三聚氰胺残留量

梅少博, 侯晋*, 张文国, 倪鹏, 殷烈, 丁黎

(南通出入境检验检疫局, 江苏南通 226005)

摘要:建立了化妆品中三聚氰胺的亲水作用色谱-质谱联用(HILIC-MS/MS)检测方法。样品经三氯乙酸溶液提取(脂溶性样品再经正己烷萃取)后,用混合型阳离子交换(MCX)反相固相萃取柱富集净化,用5 mmol/L乙酸铵水溶液(含0.1%甲酸)和乙腈作为流动相,以梯度洗脱方式在ZIC-HILIC色谱柱上实现分离,以电喷雾离子源正离子(ESI⁺)模式进行质谱分析。三聚氰胺在0.02~0.5 mg/L范围内呈良好线性关系,相关系数为0.998 5;方法的检出限(LOD,信噪比(S/N)≥3)为5.0 μg/kg,定量限(LOQ, S/N>10)为20.0 μg/kg,在0.01~0.1 mg/kg添加浓度范围内,三聚氰胺的平均回收率为84.7%~93.4%,相对标准偏差为4.5%~8.4%。该方法能满足化妆品中三聚氰胺残留量的检测。

关键词:亲水作用色谱-串联质谱联用法;三聚氰胺;残留;化妆品

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)12-1189-03

Determination of melamine in cosmetics by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry

MEI Shaobo, HOU Jin*, ZHANG Wenguo, NI Peng, YIN Lie, DING Li

(Nantong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nantong 226005, China)

Abstract: A method for the determination of melamine in cosmetics was developed by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS). The sample was extracted in turn by aqueous solution of trichloroacetic acid and hexane, and then cleaned-up by the mixed-mode cation exchange (MCX) solid-phase extraction (SPE) cartridge. A ZIC-HILIC column was used for the separation by gradient elution, and an electrospray ion trap mass spectrometer was used in the positive ion mode. The linear range of melamine was from 0.02 mg/L to 0.5 mg/L with a correlation coefficient of 0.998 5. The limit of detection (LOD, S/N≥3) and limit of quantification (LOQ, S/N>10) were 5.0 μg/kg and 20.0 μg/kg, respectively. The average recoveries and the relative standard deviations ranged from 84.7% to 93.4% and from 4.5% to 8.4%, respectively, in spiked samples at the concentrations from 0.01 mg/kg to 0.1 mg/kg. The method is suitable for the determination of melamine in cosmetics.

Key words: hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS); melamine; residue; cosmetics

三聚氰胺(melamine)学名三氨三嗪,俗称蛋白精,常温下为一种无臭无味的白色结晶粉末,是一种用途广泛的氮杂环有机化工原料。2007年的出口美国宠物食品中毒事件及2008年曝光的“毒奶粉”事件使其为人们熟知^[1]。三聚氰胺既不是食品原料,也不是食品添加剂,但因其含氮量高(66.7%)而被某些不法商人添加至食品、饲料中,使测定过程中蛋白质含量出现虚假增高。实验数据显示,三聚氰

胺主要的毒性是造成膀胱炎症、结石等,摄入三聚氰胺和三聚氰酸可能是造成急性肾衰的原因^[2]。

按有关规定,被三聚氰胺污染的食品和饲料等应作销毁处理,但新近报道的几起三聚氰胺超标乳制品事件再次引起社会警示,彻查未被销毁的问题乳制品流向的工作显得尤为重要。除饲料、食品添加剂、食品饮料等领域外,牛奶和奶制品作为蛋白质来源或营养添加剂在化妆品行业中也有较广泛的应

* 通讯联系人:侯晋,高级工程师,博士,研究方向为微量物质分析。Tel:(0513)83517973, E-mail:houljintt@yahoo.com.cn.

基金项目:江苏检验检疫系统重点科研资助计划项目(No. 2007KJ54).

收稿日期:2010-08-25

用很多美白、护肤类以及婴幼儿用化妆品中都使用牛奶、奶制品为原料或添加成分,达到美白、保湿等功效^[3],因此有必要建立以此类化妆品为基质的三聚氰胺检测方法。

三聚氰胺的测定方法已有相关的标准出台和文献报道。2007年6月农业部发布了《饲料中三聚氰胺的测定》(NY/T 1372-2007)。2008年10月国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会批准发布了《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》国家标准(GB/T 22388-2008)。该标准规定了高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-质谱/质联用法(HPLC-MS/MS)3种方法为三聚氰胺的检测方法。针对某一种或一类基质中的三聚氰胺含量的测定方法也有报道^[4-8]。但检测化妆品中三聚氰胺的方法却未见报道。为此本文建立了运用亲水作用色谱-串联质谱联用(HILIC-MS/MS)定量检测化妆品中三聚氰胺含量的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Thermo TSQ Ultra 液相色谱-串联四极杆质谱联用仪,带电喷雾电离源(ESI)(美国 Thermo Fisher 公司)。超声波清洗仪、高速离心机、氮吹仪、固相萃取装置(美国 Supelco 公司),涡旋均质器(德国 IKA 公司)。混合型阳离子交换(MCX)固相萃取小柱(60 mg/3 mL,上海安谱科学仪器有限公司)。乙腈、甲醇、甲酸、乙酸铵均为色谱纯,水为去离子水,其余试剂为分析纯;三聚氰胺标准品(纯度 $\geq 99.5\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

三聚氰胺标准储备液:称取 100 mg 三聚氰胺标准品,用甲醇-水(1:1, v/v)溶解稀释,配成质量浓度为 1 g/L 的标准储备液。 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。

1.2 样品处理

1.2.1 水溶性样品的处理

准确称取 2.00 g 均质样品于 50 mL 具塞离心管中,加入 5% 三氯乙酸溶液 20 mL,于涡旋混匀器上快速混合 1 min,超声 15 min,试液过滤至干净离心管中,准备过柱净化。依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化 MCX 固相萃取小柱,取 10 mL 滤液上柱,再依次用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗固相萃取小柱,最后用 3 mL 氨水-甲醇(5:95, v/v)溶液洗脱,收集洗脱液至玻璃试管中,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,残留物用 1 mL 乙腈定容并涡旋混匀,过 0.22 μm 滤膜,滤液供 HILIC-MS/MS 测定。

1.2.2 脂溶性样品的处理

准确称取 2.00 g 均质样品于 50 mL 具塞离心管中,加入 5% 三氯乙酸溶液 20 mL,于涡旋混匀器上快速混合 1 min,超声 15 min,再加入正己烷 10 mL,盖塞充分混合后以 8 000 r/min 离心 5 min,弃去上层正己烷相,余下试液过滤至干净离心管中,准备过柱净化。净化操作同 1.2.1 节的净化操作。

1.3 HILIC-MS/MS 条件

色谱柱:ZIC-HILIC 亲水色谱柱(150 mm \times 2.1 mm, 5 μm ,德国 Merck 公司);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。流动相:A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸),B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~1.0 min, 95% B;1.0~4.0 min, 95% B~80% B;4.0~7.0 min, 80% B;7.0~7.5 min, 80% B~70% B;7.5~9.0 min, 70% B;9.0~9.5 min, 70% B~95% B;9.5~12.0 min, 95% B。流速:0.4 mL/min。所有流动相经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,超声波脱气后使用。

加热电喷雾电离源(HESI),正离子模式;离子源温度:500 $^{\circ}\text{C}$;喷雾电压:4 000 V;鞘气流速:35 L/min;辅助气流速:8 L/min;毛细管温度:350 $^{\circ}\text{C}$;扫描模式:选择反应监测(SRM)。三聚氰胺母离子: m/z 127,定量离子: m/z 85,碰撞能量:20 eV;定性离子: m/z 69,碰撞能量:20 eV。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

三聚氰胺含有 3 个有机氮基团,是一种强极性化合物,采用普通 C_{18} 色谱柱分离时三聚氰胺大多随溶剂在死时间流出,难以有效保留;在利用 HPLC 检测极性小分子时常采用加入反相离子对的流动相来改善三聚氰胺的保留行为^[9],但这些试剂不适用于 ESI 源的 LC-MS/MS 分析,会严重影响离子化效率。参考相关资料^[10,11],本实验选用 HILIC 柱,取得了很好的分离效果。HILIC 技术采用极性固定相,以高含量极性有机溶剂-水相缓冲液为流动相,适宜分离在反相液相色谱中保留弱或无保留的强极性物质。

2.2 前处理条件的选择

化妆品种类繁多,基料和主要成分也不同。根据基质的不同,分别建立了水溶性和脂溶性样品的提取条件。对于水溶性样品,以水溶液为提取剂可得到较高的提取效率。而市场上以牛奶或奶制品为原料或添加成分的化妆品多为脂溶性,含有较多的油脂、蜡等成分^[12],在仪器测定时,为了保证质谱离

子源的清洁,需要对样品进行去脂净化,而且脂类含量高的样品直接用水溶液提取不能有效溶解样品基质,提取效果不理想,在固相萃取净化时,直接过柱还会导致固相萃取小柱堵塞。参考相关文献^[13,14]和经过比较试验,本实验对脂溶性样品采用正己烷去脂后进行固相萃取净化的前处理方法。

2.3 线性范围、检出限(LOD)和定量限(LOQ)

将三聚氰胺标准溶液用流动相逐级稀释为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 mg/L 的标准溶液,按上述仪器条件分析测定,以峰面积(Y)和质量浓度(X , mg/L)做线性回归,得到三聚氰胺回归方程为 $Y = 3.79 \times 10^7 X + 8.29 \times 10^6$,三聚氰胺在 0.02 ~ 0.5 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好,相关系数(r)为 0.998 5。

根据仪器的信噪比(S/N) ≥ 3 时的响应值,确定方法的检出限可达到 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;由空白样品添加回收试验中最低添加水平 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的响应值满足 $S/N > 10$,表明方法的定量限可达到 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。图 1 为空白基质添加三聚氰胺的 SRM 色谱图。

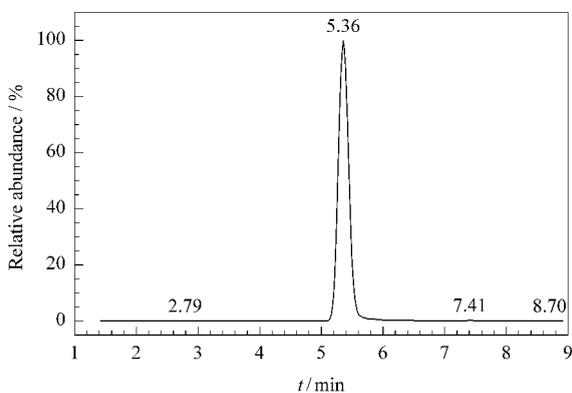


图 1 空白基质添加三聚氰胺(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的选择反应监测色谱图

Fig. 1 SRM chromatogram of a blank sample spiked with melamine at 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

2.4 回收率和精密度

选取经测定不含三聚氰胺的膏霜、水剂、唇膏等不同剂型的化妆品样品为基质,分别在 20、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度水平添加三聚氰胺标准溶液,按 1.2 节所述方法处理样品,考察方法回收率。每个样品重复测定 6 次,考察方法精密度。结果见表 1。

2.5 样品测定

在工作条件下,应用本方法对护理类、清洁类等不同功能和不同剂型的润肤膏、发乳、沐浴液、洁肤膏、美白精华液、唇膏等化妆品共 20 件进行分析测定,均未检出含有三聚氰胺。

表 1 三聚氰胺在化妆品中的回收率($n=6$)

Sample	Spiked/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/%	RSD/%
Cream	20	85.6	7.8
	50	85.3	8.3
	100	91.2	4.5
Lotion	20	84.7	8.2
	50	90.1	7.1
	100	93.4	5.6
Lipstick	20	85.1	8.4
	50	85.6	7.8
	100	89.3	3.9

3 结语

通过对样品前处理方法的优化,建立了成分中含有牛奶或奶制品的化妆品中三聚氰胺的 HILIC-MS/MS 检测方法。方法应用于实际化妆品样品分析,加标回收率为 84.7% ~ 93.4%。该测定方法具有灵敏、准确等优点,在化妆品质量监测及类似基质中三聚氰胺检测方面有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Yan L J, Wu M, Zhang Z G, et al. Chinese Journal of Chromatography (严丽娟,吴敏,张志刚,等. 色谱), 2008, 26(6): 759
- [2] Zhu L P, Sun J Q, Yan S G. China Dairy Industry (朱丽萍,孙建全,颜世敬. 中国乳品工业), 2010, 38(3): 51
- [3] Liang M Z. Guangdong Chemical Industry (梁楣珍. 广东化工), 2009, 36(12): 104
- [4] Sun W H, Leng K L, Xing L H, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (孙伟红,冷凯良,邢丽红,等. 分析试验室), 2009, 28(10): 59
- [5] Li X Q, Zhang Q H, Quan C, et al. Journal of Instrumental Analysis (李秀琴,张庆合,全灿,等. 分析测试学报), 2009, 28(11): 1260
- [6] Huang F, Huang X L, Wu H Q, et al. Journal of Instrumental Analysis (黄芳,黄晓兰,吴惠勤,等. 分析测试学报), 2008, 27(3): 313
- [7] Li F G, Yao W Q, Su M, et al. Chinese Journal of Chromatography (李锋格,姚伟琴,苏敏,等. 色谱), 2009, 27(2): 233
- [8] Cai Q R, Ouyang Y Y, Qian Z J, et al. Chinese Journal of Chromatography (蔡勤仁,欧阳颖瑜,钱振杰,等. 色谱), 2008, 26(3): 339
- [9] Rao Q X, Tong J, Wang J F, et al. Feed Industry (饶钦雄,童敬,王金芳,等. 饲料工业), 2009, 30(11): 34
- [10] FDA. Laboratory Information Bulletin No. 4421 of U. S. Food and Drug Administration. (2008-10-06)[2010-07-02]. <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4421.html>
- [11] Li R P, Huang J X. Progress in Chemistry (李瑞萍,黄骏雄. 化学进展), 2006, 18(11): 1508
- [12] Zhao T G. Hygienic Standard for Cosmetics. 2007 ed. Beijing: Military Medical Science Press (赵同刚. 化妆品卫生规范. 2007 版. 北京:军事医学科学出版社), 2007: 165
- [13] Ma Q, Wang C, Bai H, et al. Chinese Journal of Chromatography (马强,王超,白桦,等. 色谱), 2009, 27(6): 856
- [14] Sun X Y, Li Y, Liu L, et al. Chinese Journal of Chromatography (孙小颖,李英,刘丽,等. 色谱), 2009, 27(6): 852