

文章编号:1001-5132 (2010) 01-0023-06

膨化食品中三聚氰胺及其类似物的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

陈德莹, 徐继林*, 严小军

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 建立了膨化食品中三聚氰胺及其类似物的超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱联用检测法. 向样品中加入内标, 用 2.5% 的甲酸提取, 乙腈去除蛋白后直接上机分析. TOF 采用 V 飞行模式, 正离子模式下检测三聚氰胺、三聚氰酸二酰胺和三聚氰酸一酰胺, 负离子模式下检测三聚氰酸. 研究表明: 4 种化合物在 HILIC 色谱柱上分离良好, 其中三聚氰胺、三聚氰酸在 5~200 ng·mL⁻¹ 质量浓度范围内线性良好; 三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺在 5~500 ng·mL⁻¹ 质量浓度范围内呈良好的线性, 方法绝对回收率达 80.23%~96.52%, 相对标准偏差小于 6%, 4 种化合物的检测限均小于 2 ng·mL⁻¹. 该方法无需复杂的前处理过程, 适合于食品中三聚氰胺及其类似物超标样品的快速筛查和低含量定量分析.

关键词: 三聚氰胺; 三聚氰酸二酰胺; 三聚氰酸一酰胺; 三聚氰酸; UPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: TS207

文献标识码: A

动物饲料和人类食物中掺入三聚氰胺严重危害公众的健康, 为了保证食品和动物饲料的安全, 必须建立三聚氰胺(melamine)及其类似物三聚氰酸二酰胺(ammelidene)、三聚氰酸一酰胺(ammelide)和三聚氰酸(cyanuric acid)的快速、灵敏的检测方法, 4 种化合物的结构如图 1 所示. 目前三聚氰胺的检测方法主要有高效液相色谱 - 四级杆质谱联用

(HPLC-Q-MS)、高效液相色谱 - 三重四级杆质谱联用(HPLC-QqQ-MS)、气相色谱 - 质谱联用(GC-MS)和 ELISA 试剂盒法等^[1-8]. 其中, GC-MS 方法需要将样品进行衍生化处理, HPLC-Q-MS 和 HPLC-QqQ-MS 方法需要将样品过固相萃取柱富集净化后, 再利用电喷雾串联质谱进行检测, 这 2 种方法处理过程繁琐; 而试剂盒的成本比较高, 方法选择

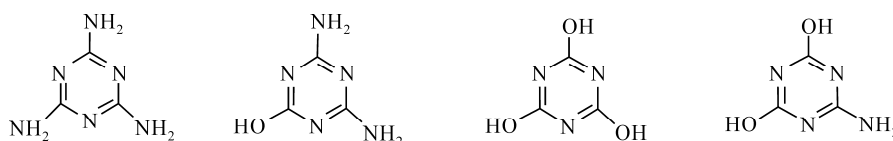


图 1 三聚氰胺、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺的结构

收稿日期: 2009-04-28.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 教育部长江学者与创新团队项目(IRT0734).

第一作者: 陈德莹(1983-), 女, 安徽霍邱人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 生物化学分析. E-mail: deyingchen0913@gmail.com

*通讯作者: 徐继林(1965-), 男, 江苏泰州人, 副研究员, 主要研究方向: 海洋生物化学. E-mail: xujilin@nbu.edu.cn

性和灵敏度有一定限制. 笔者在前人工作的基础上, 利用超高效液相色谱 - 四级杆 - 飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)联用系统对膨化食品中三聚氰胺及其类似化合物进行分析, 旨在为食品质量控制提供一种快速、简便、灵敏的检测方法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备

ACQUITY 超高效液相色谱分析系统, 配置 ACQUITY 自动进样器; Q-TOF Premier 高分辨四极杆与飞行时间串联质谱仪(美国 Waters 公司); 超纯水仪(法国 Millipore 公司). 另外, 旋转蒸发器(RE-6000 上海亚荣生化仪器厂)、旋涡混合仪(WH-966 上海骥辉科学分析仪器有限公司)、高速离心机(H1650 湖南湘仪离心机仪器有限公司)、电子天平(ML104 上海君达仪器厂)等. MCX 固相萃取柱($3\text{cc}\cdot(60\text{mg})^{-1}$)、MAX 固相萃取柱($3\text{cc}\cdot(60\text{mg})^{-1}$)和 HLB 固相萃取小柱($3\text{cc}\cdot(60\text{mg})^{-1}$) (美国 Waters 公司).

1.1.2 试剂

三聚氰胺、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸标准品(纯度 > 98%, Dr. Ehrenstorfer 实验室); 色谱纯甲酸、醋酸铵、质谱纯乙腈(美国 Sigma-Aldrich 公司); 纯水由纯水仪制备.

1.1.3 样品

超市购得某品牌膨化小馒头, 磨成粉末, -20 冷藏备用.

1.2 方法

1.2.1 标准工作曲线制作

三聚氰酸直接溶于水, 三聚氰胺、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺溶解在 0.2% 的 NaOH 溶液中, 配制成 $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准储备液, 按需要用 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液配制到所需浓度.

1.2.2 样品预处理及定量分析

准确称取 0.5 g 样品, 加入 5.0 mL 2.5% 甲酸溶液, 漩涡震荡 30 s, 超声提取 5 min, $4000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 100 μL 上清液至 1.5 mL 离心管中, 加入 900 μL 乙腈, 摇匀, $12000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 准确移取上清液上机分析.

比较不同前处理方法进行回收率实验时, 准确称取 0.5 g 样品(预先经检测不含三聚氰胺及其类似物), 向每份样品中分别加入 $1.0\text{ }\mu\text{g}\text{ mL}^{-1}$ 4 种标准品混合溶液 10 μL , 加入 5 mL 2.5% 甲酸提取液, 漩涡震荡 30 s, 超声 5 min, 以 $4000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 500 μL 上清液分别过 MCX 酸性固相萃取柱、MAX 碱性固相萃取柱, HLB 固相萃取柱. 样品过柱前, 分别用 2 mL 甲醇、2 mL 水活化. 过 MCX 柱, 活化平衡后将样品溶液上柱, 先用 2 mL 含 2% 甲酸水溶液、2 mL 甲醇清洗, 抽干 1 min 后, 用 2 mL 5% 氨水甲醇溶液洗脱, 洗脱液经旋转蒸发后, 用氮气吹干, $1.0\text{ mL } 10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵复溶后上机测定; 过 MAX 柱时, 活化平衡后将样品溶液上柱, 先用 2 mL 含 5% 氨水的水溶液、2 mL 甲醇清洗, 抽干 1 min 后, 再用 2 mL 含 2% 甲酸的甲醇洗脱, 洗脱液旋转蒸发后, 氮气吹干, $1.0\text{ mL } 10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵复溶后上机测定; 过 HLB 柱时, 活化平衡后将样品溶液上柱, 2 mL 含 5% 甲醇的水溶液清洗, 抽干 1 min 后, 用 2 mL 甲醇洗脱, 洗脱液旋转蒸发后, 氮气吹干, 用 $1.0\text{ mL } 10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶解, 混匀, 上机测定.

1.2.3 分析条件

UPLC 条件: ACQUITY UPLC HILIC 色谱柱 ($1.7\text{ }\mu\text{m}, 2.1\times 100\text{ mm}$)(美国 Waters 公司), 自动进样 $1\text{ }\mu\text{L}$, 柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流动相 A 为 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液, B 为乙腈, 7.4:92.6(A:B)等度洗脱 5 min.

Q-TOF MS 条件: 采用电喷雾电离源(ESI), 正、负离子电离模式, 毛细管电离电压 2.3 kV, 锥孔电压 35 V, 离子源温度 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂氮气流速 $400\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 锥孔反吹氮气 0. 四极杆扫描范围 m/z 100~1000, 碰撞室能量 10 V,

TOF 离子飞行方式采用 V 模式. 正离子模式下, 分别取 m/z 127.07、128.06、129.04 作为三聚氰胺、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺定量目标离子, 使用亮脑啡肽(m/z 556.277 1)作为外标物对目标离子进行精确质量锁定; 负离子模式下, 取 m/z 128.01 作为三聚氰酸的定量目标离子, 使用亮脑啡肽(m/z 554.261 5)作为外标物对目标离子进行精确质量锁定.

2 结果

2.1 LC/MS 对 4 种化合物的分离

含有 4 种标准品的混合标样, 采用 1.2.3 中分析条件, 各组分可以获得良好的分离. 图 2 是含量为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4 种化合物的混合标样的测定结果, 4

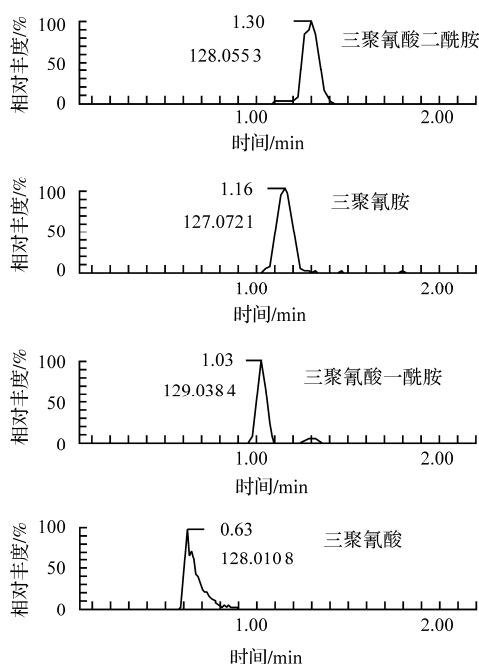


图 2 标准物的 UPLC-Q-TOF MS 分离

标准物保留时间分别为 0.63 min、1.03 min、1.16 min 和 1.30 min.

2.2 定量标准曲线

分别配制含 $5.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $10.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $100.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $200.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $500.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 各标准品的标样, 在 1.2.3 分析条件下进行 LC/MS 分析, 以各组分所选定量用目标离子的峰面积对浓度做工作曲线, 在 $5\sim 200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内三聚氰胺、三聚氰酸(均)呈良好的线性; 三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺在 $5\sim 500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性(表 1).

表 1 化合物的线性方程

化合物	线性方程	回归系数	浓度范围 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
三聚氰酸二酰胺	$Y=79.358x$	0.999 2	5~500
三聚氰酸一酰胺	$Y=12.100x$	0.986 7	5~500
三聚氰胺	$Y=34.369x$	0.960 9	5~200
三聚氰酸	$Y=51.662x$	0.998 7	5~200

2.3 回收率和精密度的测定

向 0.5 g 空白样品中(预先未检测到相关化合物的样品), 加入含 $1.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4 种化合物的混合标样 $10 \mu\text{L}$, 按照 1.2.2 步骤和 1.2.3 分析条件测定该样品中各化合物的含量, 平行测定 3 次, 求得方法的绝对回收率和精密度(表 2). 可见, 乙腈去蛋白后直接进样的回收率最好, HLB 柱的回收率其次, MCX、MAX 固相萃取小柱的回收率比较差. 精密度也是乙腈去蛋白后直接进样的结果最好, 4 种物质测定的相对标准偏差均小于 6%.

2.4 方法检测限

可将对应信噪比为 2 的标准物浓度作为最低检测限^[9-10], 也有将对应信噪比为 3 的标准物浓度

表 2 方法回收率的测定比较($n=3$)

化合物	乙腈去蛋白		HLB		MCX		MAX	
	$\bar{X} \pm SD$	RSD	$\bar{X} \pm SD$	RSD	$\bar{X} \pm SD$	RSD	$\bar{X} \pm SD$	RSD
三聚氰酸二酰胺	86.32 ± 3.62	4.19	83.21 ± 6.28	7.54	75.60 ± 10.26	13.57	70.32 ± 2.53	3.60
三聚氰胺	96.52 ± 5.25	5.44	87.25 ± 9.10	10.43	83.56 ± 2.01	2.41	78.96 ± 8.24	10.44
三聚氰酸一酰胺	80.23 ± 4.21	5.25	76.52 ± 2.28	2.98	71.59 ± 6.29	8.79	65.32 ± 4.29	6.57
三聚氰酸	85.21 ± 3.51	4.12	70.77 ± 7.26	10.26	69.25 ± 5.26	7.60	68.28 ± 7.59	11.12

作为最低检测限^[11],我们采用后者作为仪器检测限计算依据.用质谱分析仪随机所载 Masslynx 软件,计算出各标准物浓度 C 为 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的信噪比(S/N),按式 $MDL=3CN/S$ 计算出仪器的最低检测限(表 3).可见,在 1.2.3 测定条件下,对 4 种化合物而言,仪器检测限均小于 $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

表 3 三聚氰胺及其相关化合物的检测限

化合物	信噪比	检测限/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
三聚氰酸二酰胺	11.54	1.30
三聚氰胺	19.65	0.76
三聚氰酸一酰胺	23.18	0.65
三聚氰酸	8.39	1.79

2.5 样品的分析结果

2009 年 3 月从超市随机购买了 3 批不同品牌的膨化小馒头,经过检测,在 1 个批次的样品中检测到含 $0.001\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的三聚氰胺,其他类似物均未检验到.

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

三聚氰胺及其类似物为小分子极性化合物,在反相 C_{18} 色谱柱上基本没有保留,单纯使用反相色谱分离,三聚氰胺会和流动相共流出.传统的在反相柱上保留强极性化合物的方法主要有 2 种:一种是通过化学衍生的方法,使被测化合物的极性降低而能够在反相柱上保留,但衍生过程很繁琐,而且衍生率的差异会直接影响定量结果.另一种方法是用离子对的方法增加化合物在反相柱上的保留,但流动相中加入的缓冲盐,会导致介质离子强度过高干扰质谱检测.亲水相互作用色谱(HILIC)柱采用没有键合的亚乙基桥杂化颗粒(BEH),特别适合于亲水性化合物的分离.实验中采用 HILIC 柱,4 种物质均有良好的保留,在流动相中添加乙酸铵作为离子对试剂,可以改善分离效果.通过比较发现,流动相中加入高浓度缓冲盐($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

以后,三聚氰胺的信号强度会减低,可能是溶液中高的离子浓度抑制了三聚氰胺的电离.通过比较,色谱条件最后优化为 1.2.3 中条件.

3.2 质谱条件的优化

用 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的三聚氰胺及其类似物的标准溶液,以流动注射方式 ESI 源质谱.分别在正离子、负离子模式下检测 4 种化合物,对比 2 种模式,三聚氰胺、三聚氰胺一酰胺和三聚氰酸二酰胺在正离子模式的离子峰强度比负离子峰强度高 2 个数量级;负离子模式下,三聚氰胺的信号很强.因此选择正离子模式检测三聚氰胺、三聚氰胺一酰胺和三聚氰酸二酰胺,而在负离子模式下检测三聚氰酸.

3.3 样品提取方法的选择

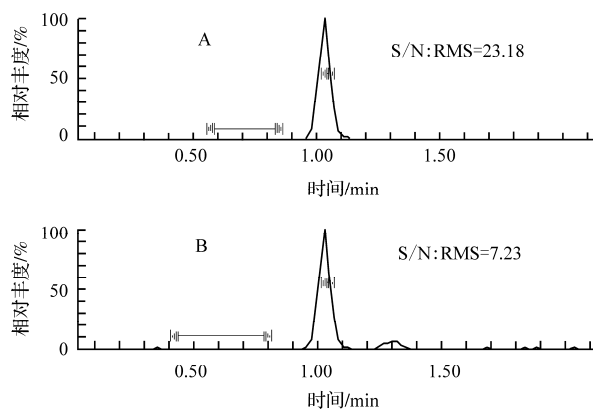
现有文献中提取三聚氰胺及其类似物的溶液有 1%三氯乙酸^[12]、2%氨水^[13]和 2.5%甲酸^[2]、1:1 乙腈/水^[14].分别采用这 4 种提取方式,用乙腈去蛋白后直接上机分析,比较 4 种物质的信号强度可见,采用 2.5%的甲酸对 4 种物质的综合提取率最高,所以选择 2.5%的甲酸溶液作为提取液.常规液质分析和气质分析中,为了排除基质干扰,常将提取液通过固相萃取小柱进行纯化^[14-15].但通过比较发现(表 2),无论采用哪种固相萃取柱,其直接回收率均不如用乙腈去蛋白后直接上机分析的回收率高,说明样品在柱子上均有所保留.所以提取液不再过萃取小柱,只采用乙腈去除蛋白处理.

3.4 高分辨质谱在样品测定中的应用

对于食品或饲料等复杂样品,定量分析时,需要采取一定技术手段来排除基质干扰提高灵敏度.常规液质分析可根据化合物质荷比不同用选择离子检测(SIM 模式)来排除,但如果质量数非常接近,常规质谱就只有针对结构不同或者元素组成的不一样用多级反应离子检测(MRM 模式)排除干扰,但由于传输效率的限制势必会降低被检测物的灵敏度.此时可以用高分辨质谱来排除干扰.例如,在含 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三聚氰胺一酰胺样品分析中,如果以 $\pm 0.5\text{ Da}$ 质量精度计算 m/z 129.04 离子的信噪比,

结果为 7.23, 而采用 ± 0.01 Da 质量精度计算, 样品信号强度虽然有所降低(图 3), 但由于本底噪音的减少而使信噪比增加到 23.18.

由于线性范围的局限性, 一般认为用飞行时间质谱定量效果不如三通四极杆质谱. 但从表 1 可知, 在较低的浓度范围内, 飞行时间质谱也可以获得良好的线性效果. 由于此方法省去了常规四极杆质谱分析中繁琐的前处理过程, 所以在快速筛选和排查超标样品时, 具有其他方法无可比拟的优势.



A: 选择离子质量窗口 ± 0.01 Da; B: 选择离子质量窗口 ± 0.5 Da

图 3 分辨率对三聚氰胺灵敏度影响

4 结论

建立了一种方便快捷的检测食品中三聚氰胺及其类似化合物的方法. 样品通过加酸提取, 用乙腈去除蛋白后直接上机分析, 绝对回收率达到 80.23%~96.52%, 相对标准偏差小于 6%. UPLC 与 Q-TOF-MS 相结合, 不仅可以使 4 种化合物得到有效的分离, 同时飞行时间质谱的高分辨能力可以有效去除基质干扰, 大大提高方法灵敏度, 4 种化合物的检测限均小于 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. 该方法无需复杂的前处理过程, 适合于食品中三聚氰胺及其类似化合物的快速筛查和低含量定量分析.

参考文献:

[1] Filigenzi M S, Puschner B, Aston L S, et al. Diagnostic

determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17): 7 593-7 599.

- [2] 黄芳, 黄晓兰, 吴惠勤. 高效液相色谱 - 质谱法对饲料及食品添加剂中三聚氰胺的测定[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(3):313-315.
- [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] Heller D N, Nochetto C B. 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(22):3 624- 3 632.
- [5] Hamilton D W, O'Neal P A. Analytical methods for the quantification of free melamine and cyanuric acid in Nylon 6/6, 6 copolymer[J]. *J Sep Sci*, 2003, 26(6-7): 510-514.
- [6] Sancho J V, Ibanez M, Grimalt S, et al. Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530(2):237-243.
- [7] 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(1):285- 286.
- [8] Reimschuessel R, Giesecker C M, Miller R A, et al. Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fish and pigs[J]. *Am J Vet Res*, 2008, 69(9):1 217-1 228.
- [9] Weber L. Trace analysis of chloramphenicol residues in egg powders by capillary gas chromatography-electron capture detection[J]. *J Chromatogr Sci*, 1990, 28(10): 501-504.
- [10] Zhao W Y, Shen M F, Xu X L, et al. Determination of chloramphenicol residues in aquatic products by gas chromatography[J]. *J Fish China*, 2003, 27(3):278-282.
- [11] Whitfield F B, Helidoniotis F, Shaw K J, et al. Distribution of bromophenols in Australian wild-harvested and cultivated prawns[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45 (11):4 398-4 405.
- [12] 丁涛, 李建忠, 徐锦. 高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱联用测定植物源性蛋白中三聚氰胺残[EB/OL]. [2007-09-15]. www.thermo.com.cn/Resources/200901/211129566

46. pdf Benvenuti M, O'Connor A. Melamine, ammeline, and cyanuric acid analysis by UPLC/MS/MS and UPLC/PDA. 2007.09. http://www.waters.com/waters/library.htm?locale=zh_TW&cid=514887&lid=1517984.
- [13] Benvenuti M, O'Connor A. Melamine, ammeline, and cyanuric acid analysis by UPLC/MS/MS and UPLC/PDA[EB/OL]. [2007-09-02]. http://www.waters.com/waters/library.htm?locale=zh_TW&cid=514887&lid=1517984.
- [14] 赖碧清, 郑晓航, 韩银涛. 高效液相色谱 - 四极杆质谱联用测定饲料中三聚氰胺含量[J]. 饲料工业, 2008, 29(4):47-48.
- [15] Smoker M, Krynitsky A J. Interim method for determination of melamine and cyanuric acid residues in foods using LC-MS/MS[EB/OL]. [2008-10-12]. <http://www.fda.gov/ood/ScienceResearch/LaboratoryMethods/DrugChemicalResiduesMethodology/ucm071673.htm>.

Analysis of UPLC-Q-TOF-MS on Melamine and Similar Compounds in Puffed Food

CHEN De-ying, XU Ji-lin^{*}, YAN Xiao-jun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: An Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) method for residues of melamine and related compounds is adopted for use with puffed food. Four standard compounds as internal standard in puffed food are extracted with 2.5% aqueous formic acid. The cleaned-up extracts from the four compounds are identified as acetonitrile. The mass spectrometry is performed on reflective time-of-flight, and electrospray ionization is used in both the negative ion (cyanuric acid) and positive ion (melamine, ammeline and ammelide) modes. The results showing efficient separation of four compounds is achieved on ACQUITY UPLC HILIC column, indicating that the linear concentration range is within 0~200 ppb for melamine and cyanuric acid, and the linear concentration range of application is within 0~500 ng·mL⁻¹ for ammeline and ammelide. The absolute recovery ranges from 80.23% to 96.52%, and the relative standard deviation is found to be less than 6%, with low detection limit of 2 ng·mL⁻¹. The UPLC-Q-TOF-MS method has been established for rapid screening and quantitative analysis of melamine and similar compounds in puffed food.

Key words: melamine; ammeline; ammelide; cyanuric acid; UPLC-Q-TOF-MS

CLC number: TS207

Document code: A

(责任编辑 史小丽)