

高效液相色谱 - 四极杆质谱联用 测定饲料中三聚氰胺含量

赖碧清 郑晓航 韩银涛

摘要 试验采用自动固相萃取装置, 建立合适的过柱程序; 运用 Agilent HP1100 高效液相色谱-四极杆质谱联用仪, 优化质谱条件, 建立饲料中三聚氰胺残留检测方法。方法的线性范围为 0.010~0.500 $\mu\text{g/ml}$, 相对标准偏差在 3.2%~7.7%之间, 回收率在 72.4%~91.2%之间, 具有较好的准确度和精密性。

关键词 三聚氰胺; 高效液相色谱-四极杆质谱联用; 饲料

中图分类号 S816.17

三聚氰胺(melamine)简称三胺, 学名三氨三嗪, 是一种重要的氮杂环有机化工原料, 在饲料工业中作为粘合剂使用。在饲料中少量添加三聚氰胺即可大大提高蛋白含量, 因为每个三聚氰胺分子中都含有 6 个氮原子, 而在原料的粗蛋白检测过程中, 用浓硫酸消化这一过程可以将三聚氰胺分解掉, 这样在最后的计算中, 三聚氰胺中的氮原子即可提高粗蛋白的比率, 造成蛋白含量虚假增高。

动物食入三聚氰胺可发生肾衰竭并导致死亡, 所以农业部“关于严厉打击非法生产经营和使用“蛋白精”违法行为的通知”(农牧发[2007]8号)中明确规定, 以三聚氰胺等为原料的“蛋白精”已经被列为我国明令禁止的非法添加物, 禁止在任何饲料中使用。本试验在借鉴国内外方法的基础上, 运用 Agilent HP1100 高效液相色谱-四极杆质谱联用仪, 优化质谱条件, 建立了饲料中三聚氰胺残留检测方法, 并对方法进行了验证。

1 材料和方法

1.1 方法原理

用乙腈: 水(1: 1)为提取剂提取饲料中三聚氰胺, 提取后过强阳离子交换柱富集和净化, 用质谱在电喷雾选择反应监测离子的模式下, 进行质谱定量和确证, 外标法定量。

1.2 仪器和设备

Agilent HP1100 高效液相色谱-四极杆质谱联用仪、AG204 分析天平、Gilson ASPEC XL4 自动固相萃取仪、Universal 32R 高速离心机、涡旋振荡混合器、N-EVAP24 氮吹仪、Oasis MCX 固相萃取小柱(6 ml/150 mg)。

1.3 试剂和材料

三聚氰胺标准品: 纯度 99.0%, Sigma 公司; 甲醇: HPLC 级; 乙腈: HPLC 级; 氨水: 36%分析纯; 提取液: 乙腈: 水=1: 1; 液氮。

1.4 标准溶液的配制

精密称取三聚氰胺标准品 100 mg(精确到 0.1 mg), 用甲醇: 水=7: 3(v: v)溶解并定容于 100 ml 容量瓶中, 制成浓度为 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 标准贮备液, 可冷藏保存 3 个月。标准工作液按照需要用流动相逐级进行稀释配制。

1.5 样品预处理

称取 5 g(精确到 0.01 g)均质样品到 50 ml 塑料离心管, 加入 25 ml 提取液, 旋涡混匀 30 s, 充分震荡 1 min, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 吸取 5 ml 上清液转移入 15 ml 离心管中, 加入 10 ml 二氯甲烷, 充分震荡 2 min, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液转移入玻璃离心管中备用。分别用 5 ml 甲醇、5 ml 水活化 MCX 柱, 将样品溶液上柱, 再用 5 ml 水和 5 ml 甲醇洗涤 MCX 柱, 抽干 1 min 后, 用 5 ml 5%氨水甲醇溶液洗脱。洗脱液于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮吹至干, 用 1 ml 流动相溶解, 混匀, 过 0.2 μm 滤膜, 上机测定。

1.6 仪器分析条件

1.6.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C18 柱, 2.1 mm \times 150 mm, 粒径 5 μm , 或相当者; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 50 mmol/l 乙酸铵水溶液-甲醇(90: 10), 用前过滤膜; 流速: 0.25 ml/min; 进样量: 25 μl 。

1.6.2 质谱条件

电离方式: 电喷雾电离源(ESI⁺); 干燥气温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气压力: 35 psig; 碎裂电压: 100 V; 干燥气流速: 12 L/min; 毛细管电压: 3 500 V; 选择离子检测(SIR) 质荷比(m/z): 127, 85, 60。

赖碧清, 深圳市肉品卫生检验所, 518000, 深圳。

郑晓航、韩银涛, 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2008-01-07

2 结果与讨论

2.1 仪器条件的优化

根据三聚氰胺总离子扫描质谱图,选择特征离子 m/z 127,85,60。本实验选用 50 mmol/l 乙酸铵溶液-甲醇作为流动相,有助于 ESI⁺正离子的形成;通过调整配比,当 50 mmol/l 乙酸铵溶液与甲醇体积比为 90:10 时,三聚氰胺的保留时间 $T=1.425$ min,避免了杂质峰的干扰,有利于基体中复杂成分的色谱分离。分别摸索不同的碎裂电压、毛细管电压下可以得到不同比例

的三聚氰胺碎片离子,在碎裂电压 100 V、毛细管电压 3 500 V 时, m/z 127 的 $[M+H]^+$ 基峰的丰度较高,定量重现性好。

2.2 不同固相萃取小柱净化效果的比较

本实验对 C18、MCX 2 种 SPE 净化柱进行除杂及过柱回收率比较,结果见表 1(添加量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。经过回收结果比较,选择 MCX 型 SPE 净化柱作为饲料中三聚氰胺残留测定净化柱,可以达到较好的净化目的,且过柱回收率较高。

表 1 不同固相萃取柱的效果比较

固相萃取柱	回收率 (%)	效果
MCX	74-95	回收率较高,重现性好,且除杂效果好,净化后目标峰附近干扰少
C18	42-58	回收率低,除杂效果稍差,净化后目标峰附近干扰峰较多。

2.3 过柱流速的控制

实验过程中发现,净化过程中流速的控制对净化效果和回收率的影响很大。本实验采用自动固相萃取仪,针对影响净化效果和回收率的 3 大因素:柱子活化速度、样液上柱速度和洗脱速度进行一系列的实验摸索,首先是固定样液上柱速度和洗脱速度,改变柱子活化速度分别为 1.5、1.2、1.0 ml/min,比较不同柱子活化速度下的回收率和质谱图。按上述方法优化样液上柱速度和洗脱速度。实验结果表明,当设置活化速度为 1.2 ml/min,样液上柱速度为 1 ml/min,洗脱速度为 1 ml/min 时,回收率较高且稳定。同时自动固相萃取仪的使用,不仅避免了以前手工过柱的手忙脚乱,而且检测结果平行性好,重现性好。

2.4 线性范围

配制一系列浓度的标准工作液。待仪器基线稳定后进行测定,用峰面积(Y)对标准浓度(X)进行线性回归,线性系数 $R=0.9994$,回归方程为 $Y=2.37 \times 10^5 X + 4748.05$ 。实验结果表明,三聚氰胺浓度在 0.010 ~ 0.500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,质谱均有着良好的线性响应。

2.5 方法的加标回收实验

取一份饲料样品作为空白样品,将其制成加标浓度分别为 25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标试样。将空白样品与加标试样进行同样的预处理后,上机测定。加标回收实验结果见表 2。实验结果表明此方法的加标回收率在 72.4% ~ 91.2% 之间,具有较好的准确度,满足检测要求。

表 2 不同添加浓度样品回收实验

加标浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定结果($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	变异系数(%)	回收率(%)
25	18.1, 20.7, 20.1, 21.8, 22.8, 21.2	20.8	7.7	72.4-91.2
50	37.8, 39.6, 38.9, 36.2, 40.1, 38.2	38.5	3.6	72.4-80.2
100	75.4, 75.5, 75.0, 80.4, 74.9, 73.1	75.7	3.2	73.1-80.4

3 小结

经过上述实验验证,本方法用于测定动物尿液中的三聚氰胺残留量,相对标准偏差在 3.2% ~ 7.7% 之间,回收率在 72.4% ~ 91.2% 之间,具有较好的准确度和精密度。

参考文献

[1] W. C. Andersen, S. B. Turnipseed, Determination of Melamine Residues in Catfish Tissue by Triple Quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography[J]. Laboratory Information Bulletin. 2007,23: 4396.

[2] D.W. Hamilton, P. A. O'Neal, Analytical methods for the quantification of free melamine and cyanuric acid in Nylon 6/6,6 copolymer[J]. J. Sep. Sci., 2003, 26: 510-514.
[3] J. V. Sancho, M. Ibanez, Residue determination of cyromazine and its metabdite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta. 2005, 530: 237-243.
[4] 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.
[5] SANCHO J V, IBAÑEZ M, GRIMALT S, et al. Anal Chim Acta, 2005, 30(5): 237-243.

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)