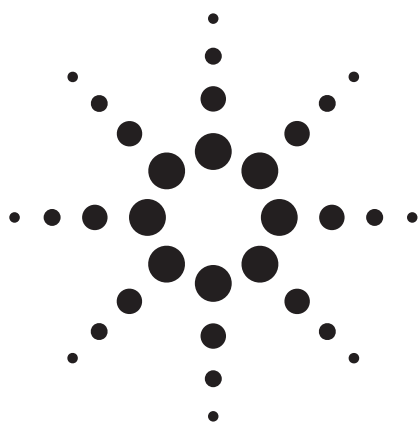


用 GC/MS 和含水正相 LC/MS/MS 分析宠物食品中三聚氰胺和氰尿酸的总解决方案



应用

食品

作者

栾伟 方晏燕，
安捷伦科技公司（上海），
中国上海外高桥保税区，
英伦路 412 号，200131

Jerry Zweigenbaum，
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington DE 19808
USA

摘要

用 Agilent 7890A-5975C GC/MS 和 1200SL-6410 三重串联四极杆液质联用系统，分析宠物食品及相关原料中的三聚氰胺和氰尿酸。GC/MS 方法采用了萃取和三甲基硅烷衍生化法，将该方法用于筛查。检测限为 10 $\mu\text{g/g}$ 。LC/MS/MS 方法只需要提取，然后用含 5 mM 醋酸铵的水和乙腈为流动相，在正相硅胶柱(Rx-Sil) 上进行简单的等梯度洗脱。分离两个化合物仅用 5 分钟。三聚氰胺的线性范围从 50 pg/mL 到 50 ng/mL ，氰尿酸从 1 ng/mL 到 100 ng/mL 。用 LC/MS/MS 方法分析了复杂食品基质中的目标化合物。

引言

宠物食品中的非法添加剂三聚氰胺和氰尿酸导致了猫和狗的死亡。从而使美国 FDA 在去年召回了几百万包宠物食品。因此，测定宠物食品及相关原料中三聚氰胺和氰尿酸的含量已经成为全球的热点问题。

美国 FDA 发布了一种用 GC/MS 筛查这两种化合物的方法[1]。这种方法 GC/MS 筛查在进样前用三甲基硅烷 (TMS) 进行衍生，其检测限为 10 $\mu\text{g/g}$ 。虽然这是一种筛查方法，但也可以利用 Agilent 5975 的 SIM/全扫描功能进行确证和定量。与 GC/MS 方法相比，本文报导的 LC/MS/MS 方法不需要衍生化，简化了样品处理步骤，让确证和定量一步完成。另外，LC/MS/MS 方法具有高灵敏度和选择性，可进行从动物体液和组织中的痕量分析，也可以进行食品和食品添加剂中高浓度添加剂的分析。

实验部分

样品制备

GC/MS 的样品制备参照 FDA 方法[1]。取 0.5 g 样品，加入混合溶剂(10:40:50 二乙胺：水：乙腈)，混合至



彻底润湿整个样品。混合物超声处理 10 分钟，于 5000 rpm 转速下离心 10 分钟，然后用 0.45 μm 尼龙滤膜过滤。将 200 μL 提取物转至自动进样器样品管中进行衍生，在低流速氮气下于 70 °C 将溶剂挥干。

向已挥干溶剂的提取物中加入 200 μL 吡啶和 200 μL N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)。混合物涡旋混合，并在 70 °C 下温浴 45 分钟。LC/MS/MS

样品的制备，取 5 g 样品用粉碎机粉碎并充分混合。取 0.5 g 样品，加入 20 mL 乙腈/水 (50: 50)，盖封，涡旋混合。将溶液超声处理 30 分钟，然后用 0.20 μm PTFE 注射式过滤器 (安捷伦部件号 5185-5843) 过滤。如果目标化合物的浓度在方法的线性范围以外，需用乙腈: 水对提取物进一步稀释。注意，高浓度氰尿酸和三聚氰胺都在同一溶液中，需要用 10:40:50 二乙胺: 水: 乙腈干扰离子对。

GC/MS 方法

仪器: 7890A GC/5975C MSD
 软件: MSD 化学工作站 E.01.00, 带 NIST 05a MS 谱库 2.0d

GC 条件

色谱柱: DB-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm (部件号: 122-5532)
 进样口温度: 290 °C
 进样方式: 不分流或分流(1:20)
 进样体积: 1 μL
 载气流量: He (恒流) 1.3 mL/min
 升温程序: 75 °C (保持 1 分钟)以 30 °C /分钟的速度升至 300 °C (保持 2 分钟)
 总分析时间: 10.5 分钟
 传输管线温度: 280 °C

MS 条件 (SIM/扫描模式)

调谐: 自动调谐
 采集模式: EI; SIM/全扫描模式
 溶剂延迟: 3.5 分钟
 MS 温度: 230 °C (离子源); 150 °C (四极杆)

扫描参数

扫描范围: 40-450 amu
 采集速率: 2 (扫描速度为 约 3.6 次扫描/秒)
 阈值: 100

SIM 参数

1 组

组识别: 自动_1
 分辨: 低
 Plot 1 离子: 345.10
 组内离子/驻留:

质量	驻留	质量	驻留	质量	驻留
188.00	25	330.10	25	345.10	25

2 组

组识别: 自动_2
 分辨: 低
 组起始时间: 6.76
 Plot 1 离子: 327.20
 组内离子/停留:

质量	驻留	质量	驻留	质量	驻留	质量	驻留
197.00	25	285.10	25	327.20	25	342.20	25

LC/MS 方法

仪器: 1200 SL RRLC 配置 6410 三重串联四极杆质谱仪
软件: MassHunter B.01.03

LC 条件

色谱柱: ZORBAX Rx-Sil, 2.1 mm x 150 mm, 5 µm (部件号 883700-901)
柱温: 40 °C
流动相: A = 5 mM 醋酸铵水溶液
B = 5 mM 醋酸铵乙腈
流速: 0.4 mL/min
进样体积: 10 µL
等梯度: 95% B
停止时间: 5.5 分钟
针头清洗: 50:50 乙腈/水; 冲洗口 10 秒

MS 条件

离子源: ESI
极性: 正与负
雾化器气体: 氮气
离子喷雾电压: 4000 V
离子源温度: 350 °C
分辨率: Q1 (单位) Q3 (单位)
扫描模式: 多反应监测 (MRM)
分段: 片段 1 = 0~2 分钟负模式分析氰尿酸
片段 2 = 2~5.5 分钟正模式分析三聚氰胺
Delta EMV: 600 V

多反应监测 (MRM) 参数见表 1。

表 1. 氰尿酸和三聚氰胺的 MRM 参数

时间	化合物	母离子	子离子	停留(ms)	裂解电压(V)	碰撞能量(V)
1.45	氰尿酸	128	42	200	100	30
		128	85	200	100	5
4.92	三聚氰胺	127	85	200	100	20
		127	68	200	100	35

结果与讨论

GC/MS SIM 模式监测离子的选择

选择性离子检测(SIM) 经常被用于提高检测限和定量重现性。SIM 模式下, 在各目标化合物从色谱柱中洗脱的保留时间(RT)范围内, MS 只监测其几个离子。由于只监测几个特定离子, 显著提高了信噪比(S/N)。所以, SIM 模式监测离子的选择对得到良好的分析结

果非常重要。为了使目标化合物的响应最大化, 通常选择丰度最高的几个离子。但是, 如果存在明显的基质干扰, 选择特征离子应减少信号波动, 即使这些离子的丰度相对较低。本应用中离子选择的影响见图 1。用更特征的离子, 与用最高丰度离子所得到的色谱图相比, 干扰要小得多。使用 SIM/SCAN 模式, 既可以得到最高的灵敏度和重复性, 又能得到分析物的全质谱图, 获得全面的鉴定信息。

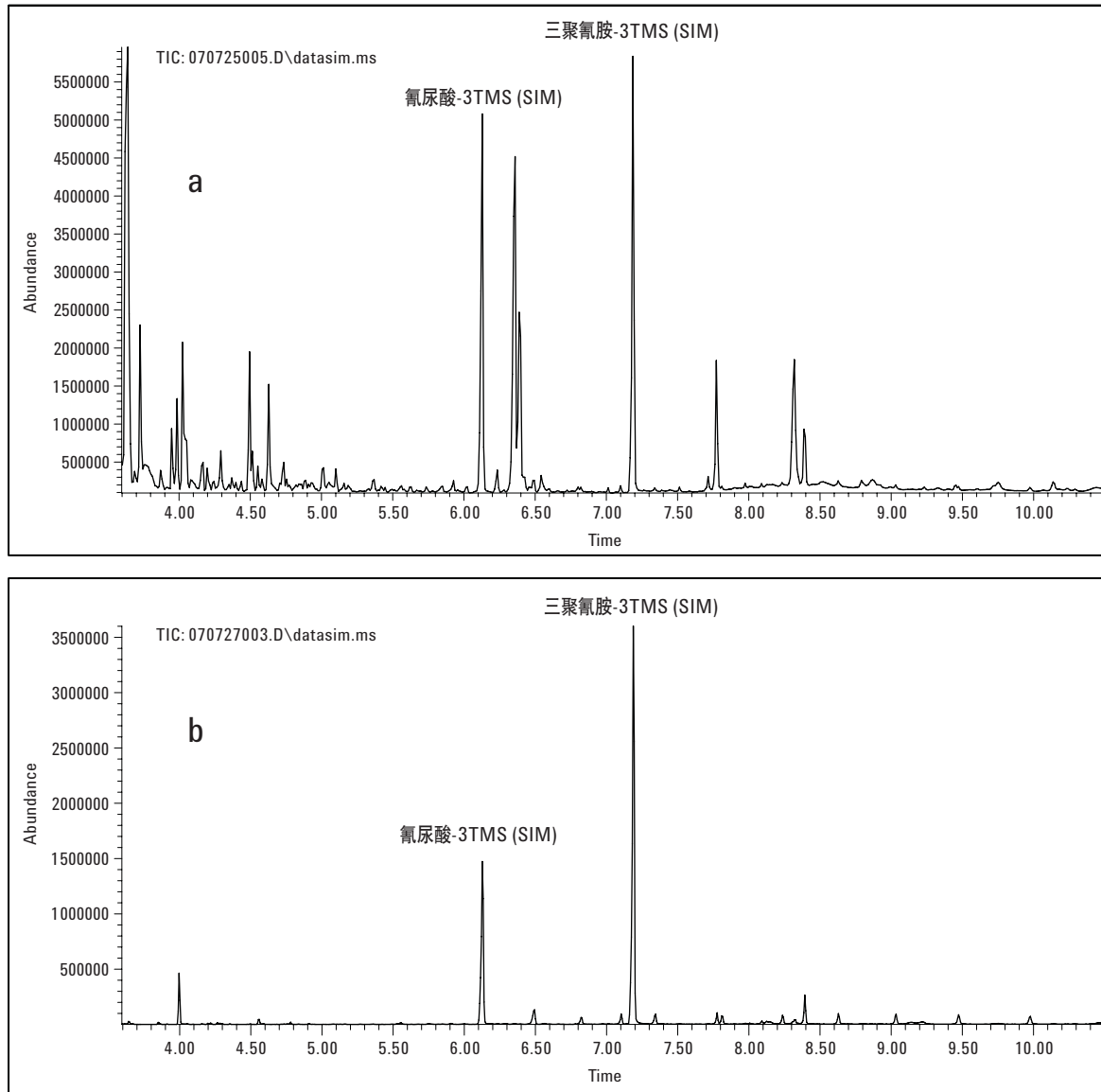


图 1. 选择 SIM 模式监测离子对猫食品中添加物测定的影响: a)采用最高丰度离子(氰尿酸: m/z 73, 147, 171; 三聚氰胺: m/z 327, 330, 342, 345) 和 b)采用特征离子(氰尿酸: m/z 188, 330, 345; 三聚氰胺: m/z 197, 285, 327, 342)

三聚氰胺和氰尿酸在正相柱上的保留

高极性小分子化合物(如三聚氰胺和氰尿酸)的液相色谱分离,保留机制可以采取离子交换和离子对反相色谱(IP-RPLC)。一般来说,离子交换法不是很适合电喷雾接口(ESI),因为其使用的是高离子强度缓冲液。同样,挥发性离子对试剂虽然可以得到满意的结果,但也不是很适合与LC/MS常规联用。此外,一种酸和一种碱在同一次分析中的离子对分离也比较难实现。

这两种化合物更适宜的分离方法是含水正相色谱,或称亲水相互作用色谱(HILIC)[2]。这种分离模式定义为,极性分析物在相对弱极性流动相和极性半固体液态固定相之间的分配。正相色谱通常与分析物在固定相上的吸附有关。所以认为,在这种模式中,水在固定相表面被捕集,形成分配而不是吸附。在这种条件下,氰尿酸和三聚氰胺都成功地在Rx-Sil柱上得到保留,保留时间分别为1.45分钟和4.92分钟。

不同基质中三聚氰胺和氰尿酸的定量分析

用时间分段程序进行切换，分析氰尿酸时用负模式，分析三聚氰胺时用正模式。各浓度重复进样3次考察方法的线性。三聚氰胺和氰尿酸的校正曲线见图2。方法的线性范围，三聚氰胺为50 pg/mL到50 ng/mL，氰尿酸为1 ng/mL到100 ng/mL。三聚氰胺和氰尿酸的检测限如图3所示。50 pg/mL三聚氰胺的信噪比（峰比峰）为12.7，1 ng/mL氰尿酸的信噪比为12.8。

对宠物食品、面筋粉、玉米粉和大米蛋白样品进行了提取，分析了两种目标化合物。面筋粉样品中添加标样的分析实例见图4。乙腈和水的混合溶剂（50：50）对从不同基质中提取三聚氰胺和氰尿酸的效果最好。进样10 μL时，提取物必须稀释至5%或以下，否则色谱峰将变形。也可以将进样量减至1 μL，这是消除变形的最好方法。

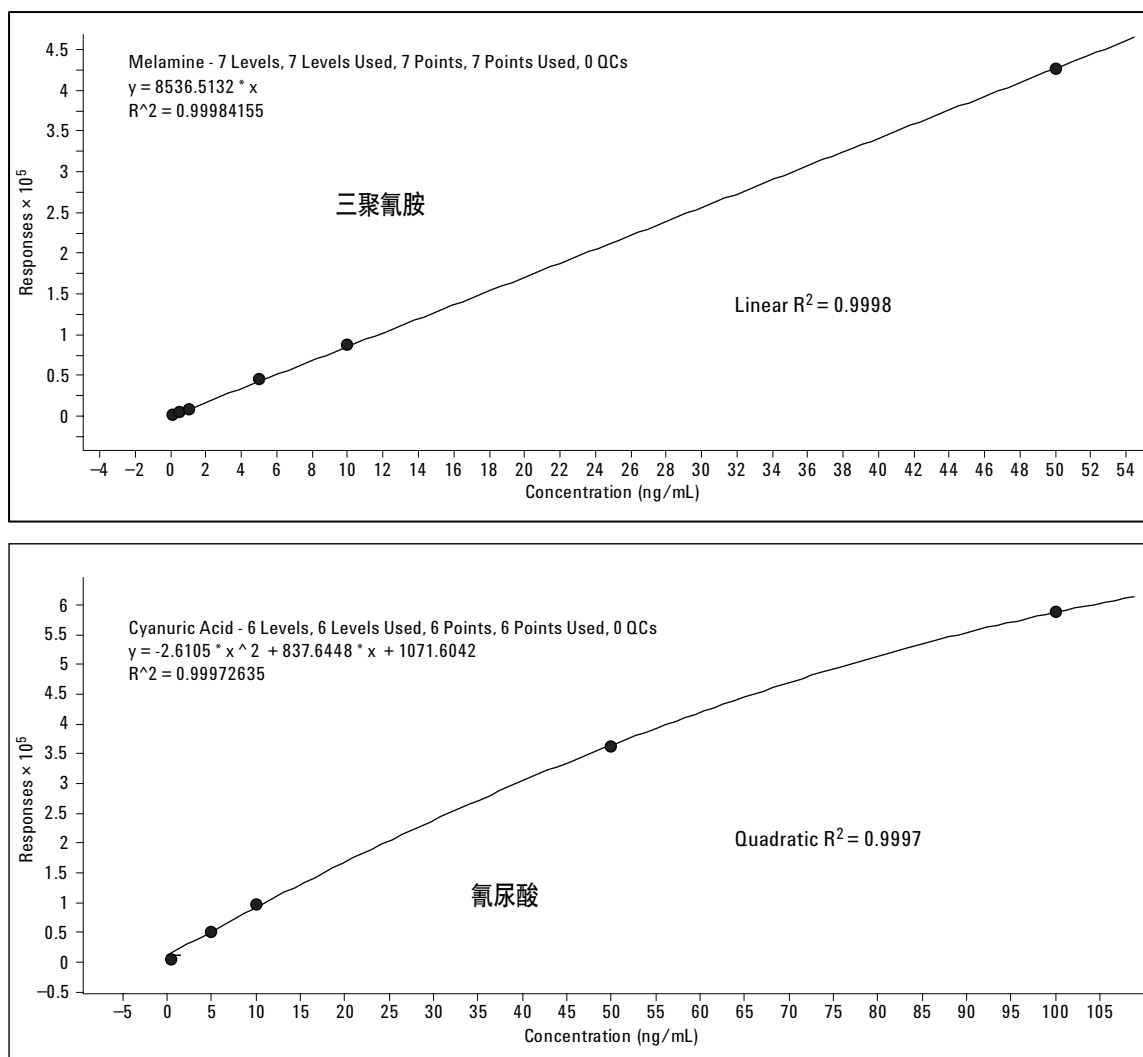


图2. 三聚氰胺和氰尿酸的线性

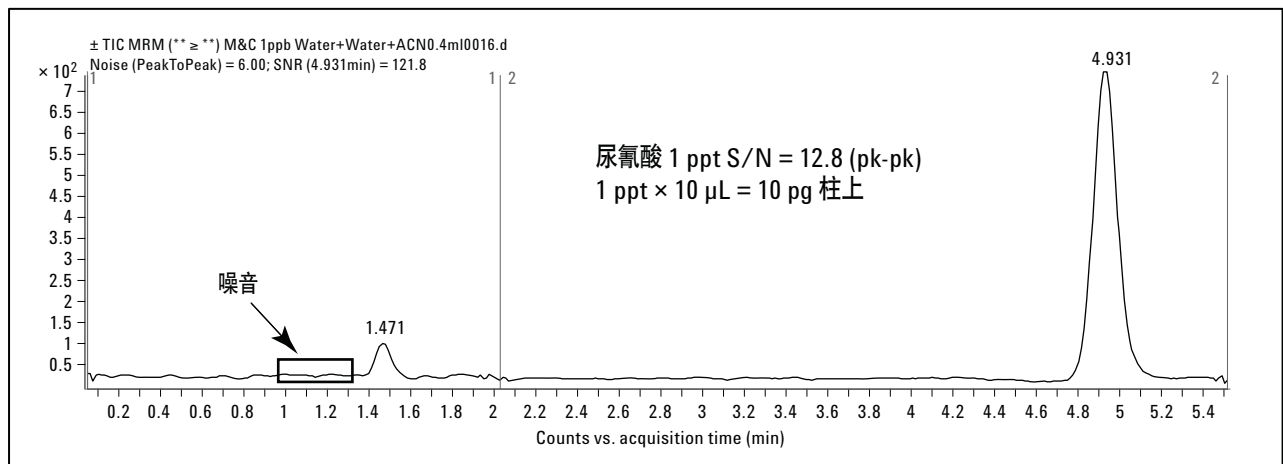
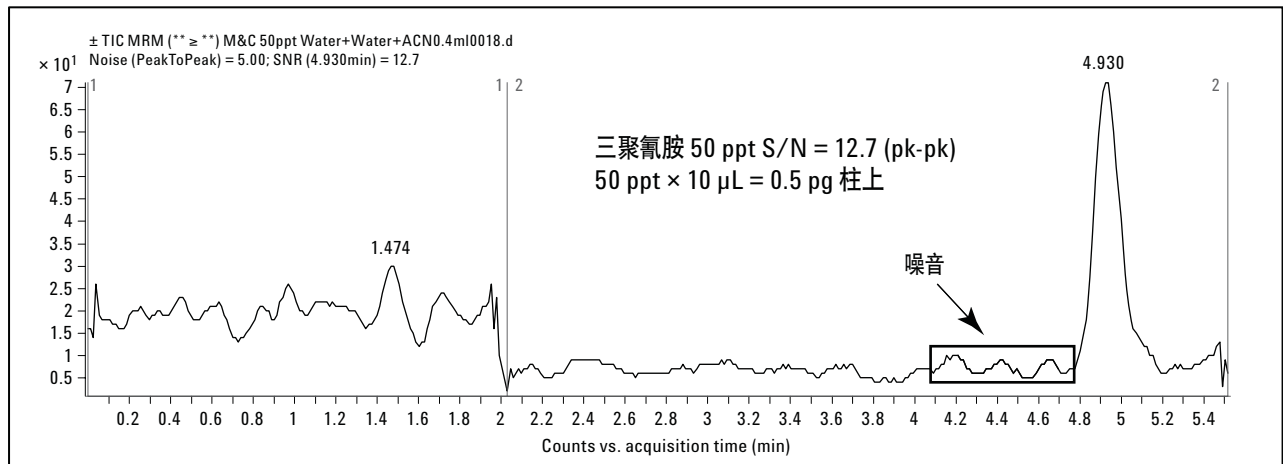


图 3. 三聚氰胺和尿酸的检测限

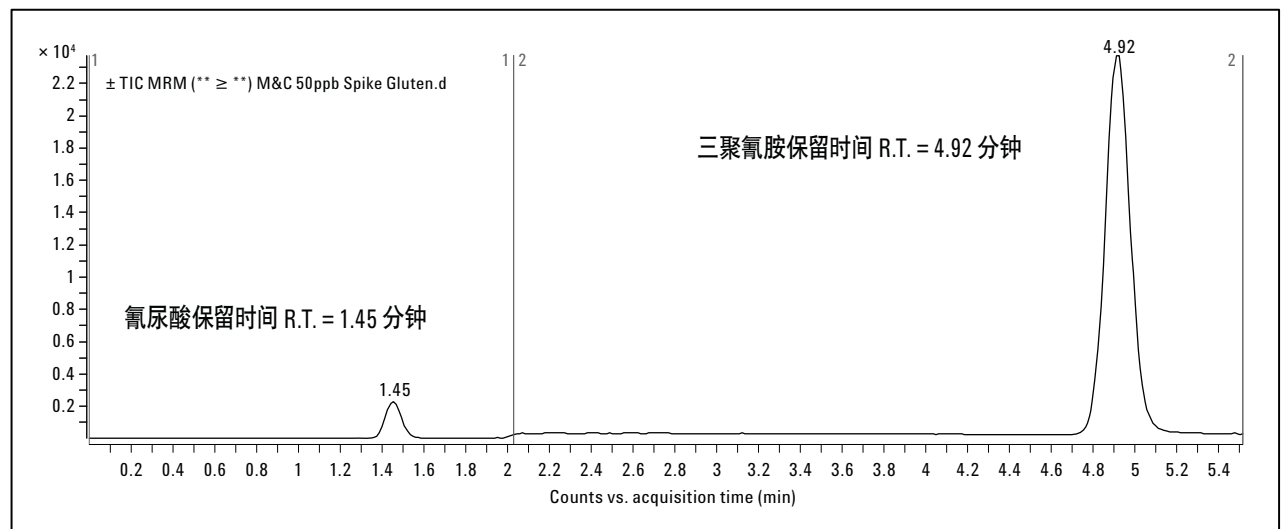


图 4. 面粉添加样品的总反应监测色谱图

结论

本应用表明，GC/MS 或 LC/MS/MS 方法能够用于分析宠物食品及其添加剂中的三聚氰胺和氰尿酸。在显示的分析实例中，用 GC/MS 方法 SIM 模式筛查宠物食品中是否存在三聚氰胺和氰尿酸。但是，如果不需要很低的检测水平，用 SIM/SCAN 模式也可以既定量又定性。另外，本文还显示了一种 LC/MS/MS 方法，采用简单的样品提取步骤，含水正相分离。该方法具有高灵敏度和选择性，可用于宠物食品及相关原料中三聚氰胺和氰尿酸的定性和定量。三聚氰胺的检测限为 50 pg/mL，氰尿酸为 1 ng/mL，可以分析动物体液和组织中的这些痕量化合物。

参考文献

1. GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid, Version 2, May 7, 2007.
<http://www.fda.gov/cvm/MelaminePresence.htm>
2. K. I. Petrus Hemström, "Hydrophilic interaction chromatography." *Journal of Separation Science* **2006**, 29, (12), 1784-1821.

更多信息

如果需要进一步了解我们的产品和服务，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和规格，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2007 年

2007 年 10 月 31 日中国印刷
5989-7546CHCN