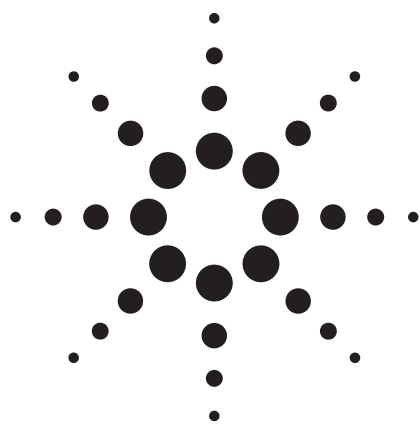




用Agilent 7890A/5975C和Agilent J&W HP-5ms GC色谱柱以色谱柱反吹技术快速筛查乳制品中的三聚氰胺和三聚氰酸

应用指南

食品安全

作者

蔡敏, 俞翀天, 邹芸, 栾伟
安捷伦科技公司 (上海)
上海市外高桥保税区
英伦路412号
邮编 200131

摘要

使用Agilent 7890A/5975C GC/MSD和Agilent J&W HP-5ms GC色谱柱建立了测定乳制品中三聚氰胺和三聚氰酸的快速筛查方法。该方法通过微板流路控制技术的反吹, 无需在目标化合物洗脱后进行耗时的色谱柱烘烤, 从而显著缩短气相色谱运行时间, 从原来的70分钟减至14.5分钟。该方法在10-200 $\mu\text{g/g}$ 范围内线性良好, 相关系数大于0.9996。两种目标化合物的回收率高于95%。



Agilent Technologies

引言

食品受到三聚氰胺和三聚氰酸污染的情况引起全世界的密切关注。乳制品分析的主要问题在于低挥发性和不挥发的基质组分的存在，如蛋白质和脂肪。如果不经选择性的样品制备，而将样品直接引入分析系统，样品中的这些成分可能使分析系统受到污染。去除这些基质的常用方法是在高温下烘烤色谱柱，这种方法所费时间比真正用于分析样品的运行时间长得多。例如，用于牛奶提取物测定的FDA方法通常耗时约70分钟。由于目标化合物的挥发性和极性范围较宽，要做到选择性提取或选择性进样并非易事。此外，作为一种常规的QC分析，为提高效率，实验室希望将标准运行周期缩短至25~60分钟。Agilent 7890A/5975C GC/MSD系统能够通过使用反吹和快速冷却技术来满足这些要求。

本文中，使用标准分流/不分流进样口和安捷伦微板流路控制技术对美国FDA的方法作了改进。在色谱柱的末端装有一个带尾吹气的三通分流装置，通过限流器与质谱检测器相连，这样，可以通过辅助EPC控制色谱柱出口的压力。当最后一个目标物色谱峰从色谱柱中洗脱后，降低色谱柱入口端的压力，提高出口端的压力，色谱柱中的气流方向即发生改变，基质干扰物，尤其是高沸点的干扰物可以从色谱柱入口端排除。

实验部分

标准物质和试剂

实验中用到的标准物质和试剂列于表1。浓度为1000 µg/mL的三聚氰胺和三聚氰酸贮备液分别由甲醇制备而得。标准贮备液置于冰箱保存。

表1. 市标准物质和试剂

标准物质	三聚氰胺	Sigma-Aldrich	纯度>99%
	三聚氰酸	Sigma-Aldrich	纯度>99%
溶剂	甲醇	Fisher Scientific	HPLC级纯
	吡啶	Fisher Scientific	A.C.S.试剂
硅烷化试剂	含1% TMCS的BSTFA *	Supelco	/

* BSTFA: 双(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺, TMCS: 三甲基氯硅烷

仪器

实验所用仪器为装有分流/不分流毛细管进样口的Agilent 7890A气相色谱仪、具备二次离轴检测器的Agilent 5975C GC/MSD, 和Agilent 7683B自动液体进样器(ALS)。分流/不分流进样口装有长寿命隔垫(P/N 5183-4761)和分流进样衬管(部件号5188-4647)。使用10-µL进样针(部件号9301-0714)进样。仪器条件列于表2。

表2. 气相色谱和质谱条件

气相色谱条件	
色谱柱:	HP-5ms, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm (P/N 19091S-433)
进样口温度	EPC, 分流/不分流 @ 250 °C
进样量	1 µL, 分流比为3:1
载气	氮气, 恒流模式, 1.3 mL/min
柱温程序	75 °C (1分钟), 30 °C/分钟升至300 °C (1分钟)
运行结束后	280 °C, 保持5分钟(持续反吹)
传输管线	280 °C
质谱条件	
质谱仪	电喷雾电离, SIM/scan
溶剂延迟	4.2 min
MS温度	230 °C (离子源), 150 °C (四极杆)
扫描模式	质量范围 (40~450 amu)
SIM模式	离子 (三聚氰胺: 342, 327*, 171, 99; 三聚氰酸: 345*, 330, 188)
反吹条件	
装置	三通分流器 (P/N G3183B)
限流器	0.706 m x 180 µm id
出口	PCM (部件号 G1530-63309)
出口端压力	2 psi (运行结束后为60 psi)
入口端压力	2 psi (运行结束后)

* 定量离子

样品制备

提取

称取样品(粉末或液体) 0.5 g, 置20 mL聚丙烯离心管中, 加入甲醇5 mL, 加盖, 涡旋混合后, 超声10分钟。然后再以4000 rpm转速离心6分钟, 取上清液, 以0.45 µm PTFE过滤器滤入玻璃GC样品瓶中。

衍生化

取上述提取液 40 μL ，置玻璃 GC 样品瓶中，在约 70 $^{\circ}\text{C}$ 的氮气流中蒸干，加入吡啶 50 μL 和 BSTFA 50 μL 。样品经涡旋混合后，在 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 分钟。

结果与讨论

带反吹系统的 7890A/5975C GC/MSD 用于牛奶提取物测定

牛奶提取物中通常含有许多低挥发性或不挥发的组分。这些化合物可能存留于色谱柱的前端，除非以很高的柱温才能将它们除去。本次应用中，使用一种带尾吹气的三通分流器进行反吹。该装置由尾吹气供气管路和四个接头组成，一个接头连接色谱柱，另三个接头可与三个检测器的限流管相连。由于此处仅用到一个质谱检测器（MSD），尾吹气流方向的前两个接头被密封，第三个接头接入色谱柱，最后接头与 MSD 的限流管相连。这种流向设置可避免由于不当的气流吹扫而引起的峰展宽。限流管的长度和内径分别为 0.706 m 和 0.18 mm。GC/MS 系统设置和三通分流器的管路示意图见图 1。

首先，用传统的非反吹模式对牛奶提取物进行分析，为确保将最后的洗脱物洗脱，通过程序升温将柱温升至 300 $^{\circ}\text{C}$ ，用了 70 多分钟才将提取物中所有的组分洗脱（图 2A）。然后，用 5 分钟反吹模式对提取物进行分析（图 2B）。通过增加出口端的压力，同时降低入口端的压力形成反吹。色谱柱中的气流变为相反方向，将“沸点高”的组分从色谱柱入口端冲出分流排气口。图 2C 为反吹后运行空白溶剂 7 分钟。该空白试验显示，经过反吹，色谱柱是干净的，只有样品瓶隔垫中出来的一些峰。不易挥发的基质组分能够通过反吹有效地从色谱柱中除去，可以代替在 300 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤色谱柱 55 分钟。这种方法将运行时间从 70 分钟缩短至 14.5 分钟，速度加快 4.8 倍。

对于复杂基质，即使长时间烘烤仍无法完全去除高沸点化合物，这有可能导致在随后的进样中色谱峰保留时间发生漂移。以 5 分钟反吹对提取物进行连续两次进样的图谱见图 3，显示了出色的保留时间和峰面积重现性，未见交叉污染，没有出现鬼峰，基线也没有提升。

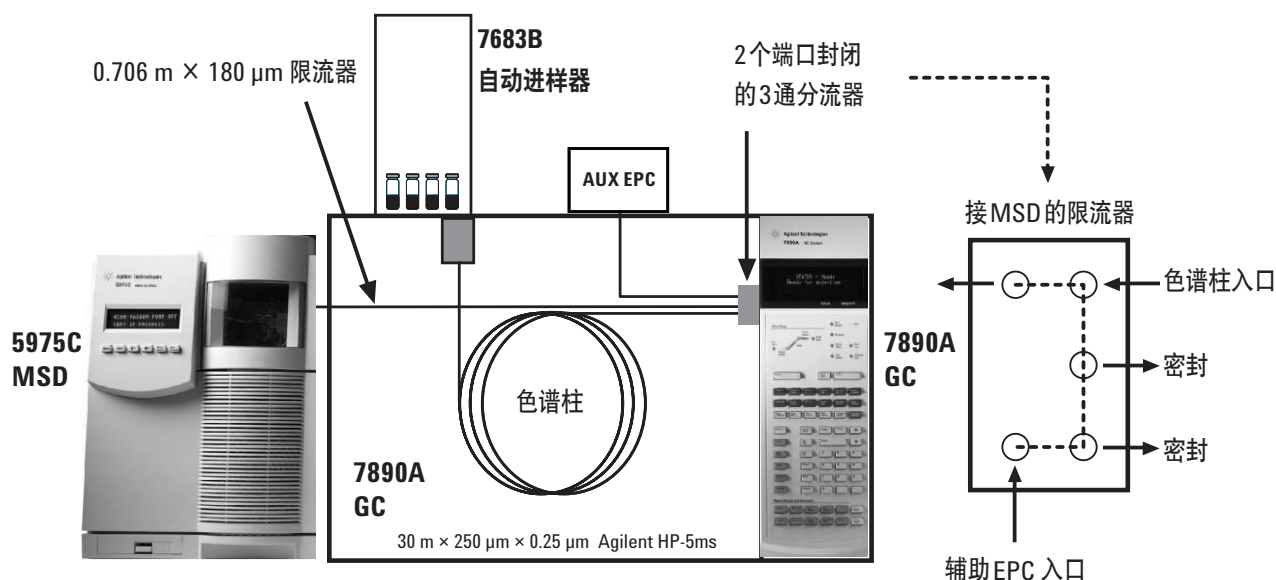


图1. GC/MS系统设置以及三通分流器管路连接示意图

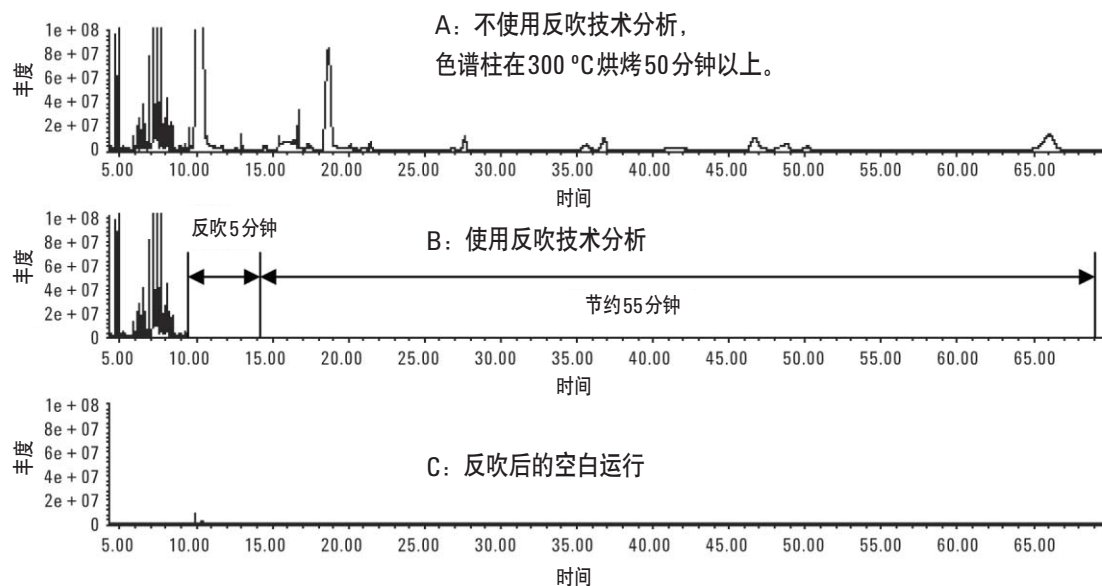


图2. 使用反吹技术节省分析时间

这证明了反吹技术是同时避免高温烘烤和两次运行之间保留时间漂移的完美解决方案。同时, Agilent 7890A的柱温快速冷却功能可以缩短运行周期。通过使用本文所述的三通分流器, 能够进一步节约分析时间, 而且无需放空MSD即可更换衬管和色谱柱。

图4为加标奶粉样品的总离子色谱图 (TIC)。使用同步选择性离子检测/全扫描 (SIM/scan), 以高灵敏的SIM模式对目标离子进行检测, 同时在同一次运行中获得可进行谱库检索的扫描数据。这有助于简化阳性或阴性结果的确认过程。图5分别为三聚氰酸及其tri-TMS衍生物 (6.335分钟) 和三聚氰胺及其tri-TMS衍生物 (7.341) 的质谱图。

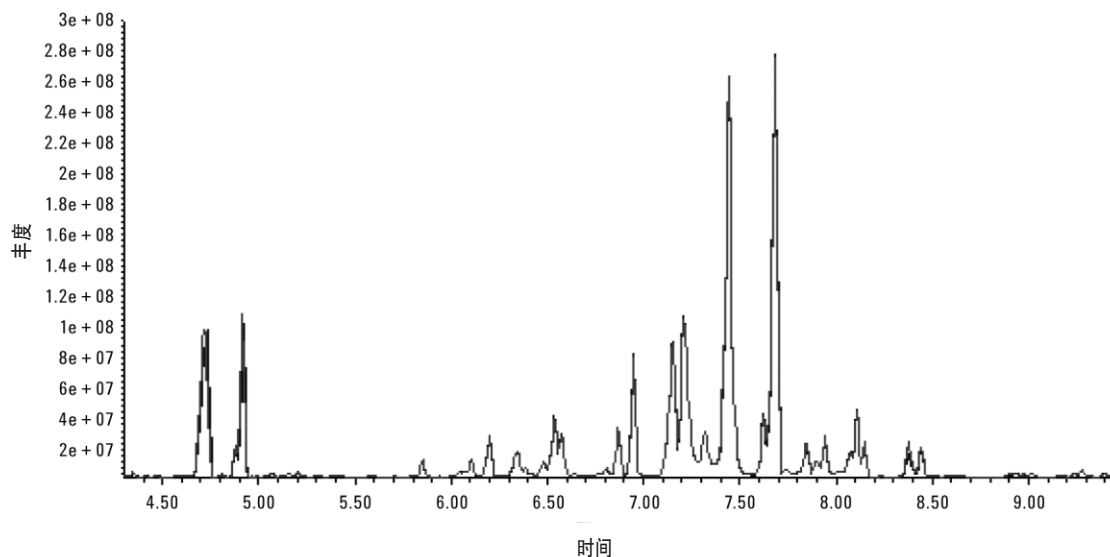


图3. 婴儿配方奶粉提取物两次连续进样的叠加总离子色谱图

线性与回收率

用一种空白牛奶样品进行线性试验。取0.5 g 牛奶样品，分别制成4种浓度水平（10、20、80和200 $\mu\text{g/g}$ ）的三聚氰酸和三聚氰胺加标样品。两种化合物在10~200 g/g 范围内都表现出很好的线性，相关系数大于0.9996。

为检查方法的适用性，对加有40 $\mu\text{g/g}$ 目标分析物的婴儿配方奶粉（空白基质）加标样品进行了分析，得到了极好的回收率，三聚氰酸为96.1%，三聚氰胺为95.6%（见表3）。

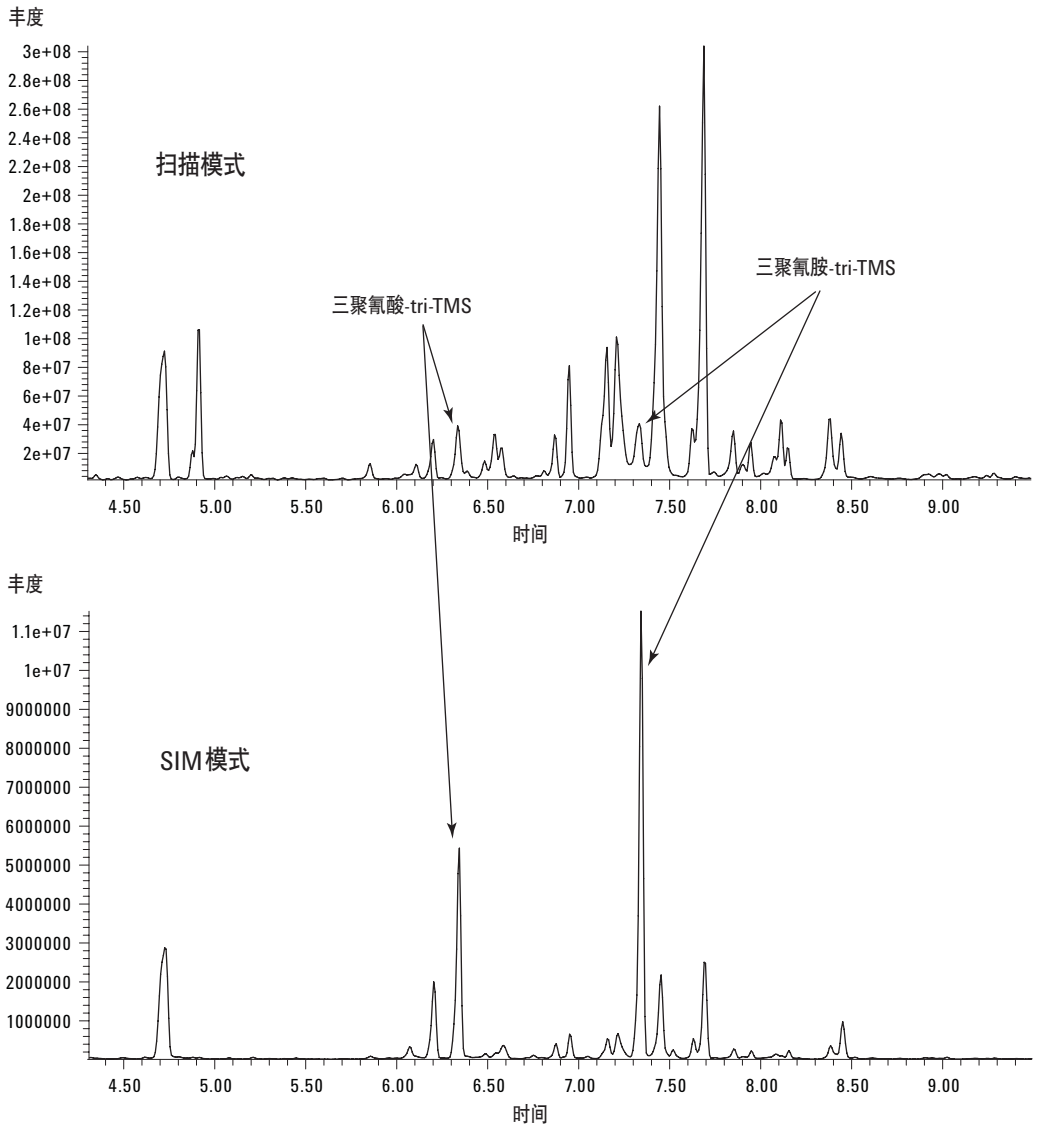


图4. 婴儿配方奶粉样品的总离子色谱图

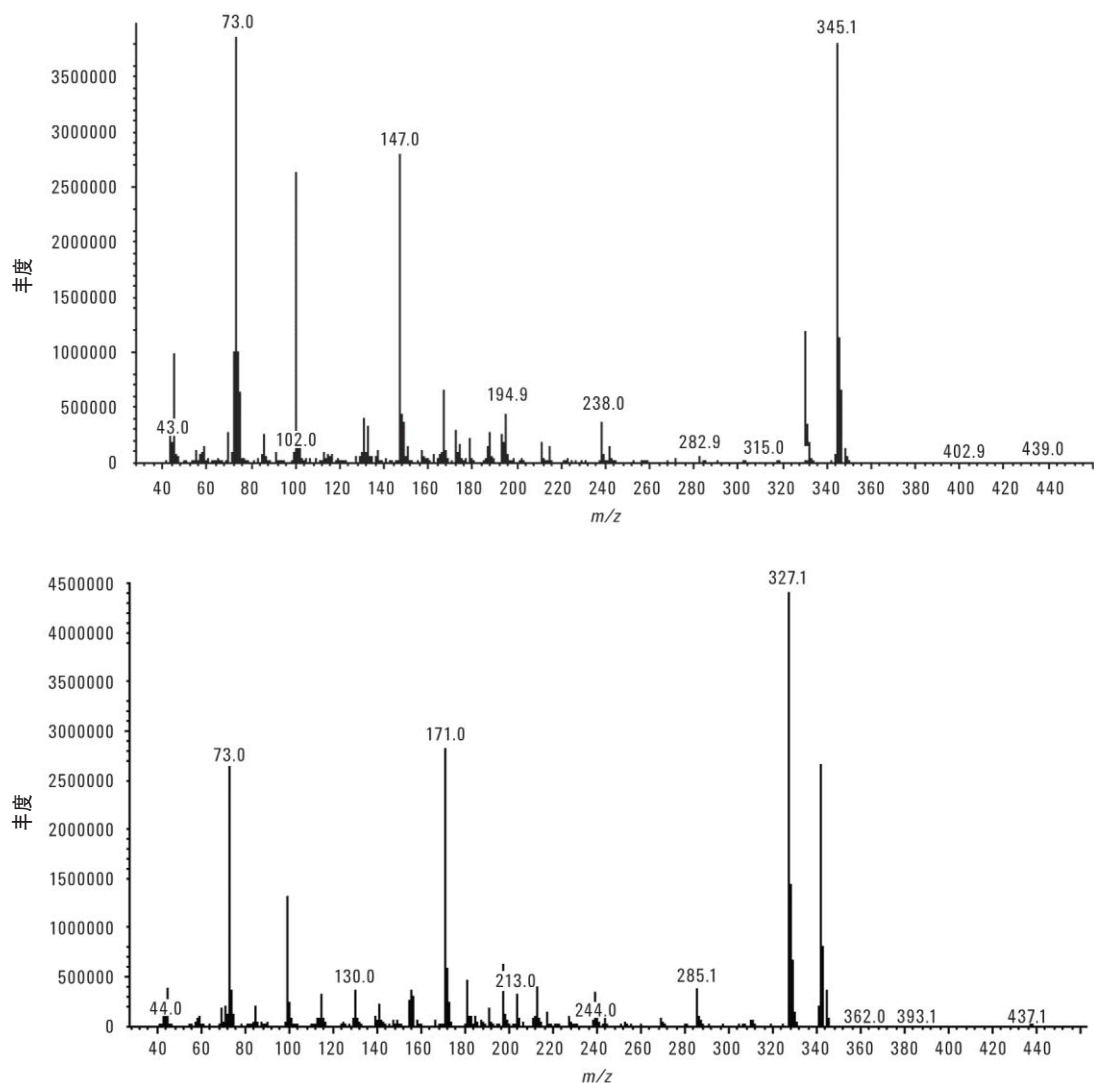


图5. 三聚氰胺 tri-TMS 衍生物 (上) 和三聚氰酸 tri-TMS 衍生物 (下) 质谱图

表3. 加标样品的回收率

化合物	保留时间 (min)	加标浓度 ($\mu\text{g/g}$)	测得浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)
三聚氰胺 tri-TMS	6.319	40	38.42	96.1
三聚氰酸 tri-TMS	7.333	40	38.23	95.6

实样分析

使用上文所述方法以反吹方式对某品牌液态奶进行了分析。两种目标化合物在10分钟以内得到了鉴定，其中，三聚氰酸含量为34.90 $\mu\text{g/g}$ ，三聚氰胺含量为3.72 $\mu\text{g/g}$ （见图6）。

结论

本文阐述了用于乳制品中三聚氰胺和三聚氰酸的快速筛查和定量分析方法，该方法有极好的线性和回收率。使用结合了反吹技术的Agilent 7890A/5975C GC/MSD，分析时间比传统方法缩短五倍。该方法适用于乳制品质量控制中三聚氰胺和三聚氰酸的快速测定。

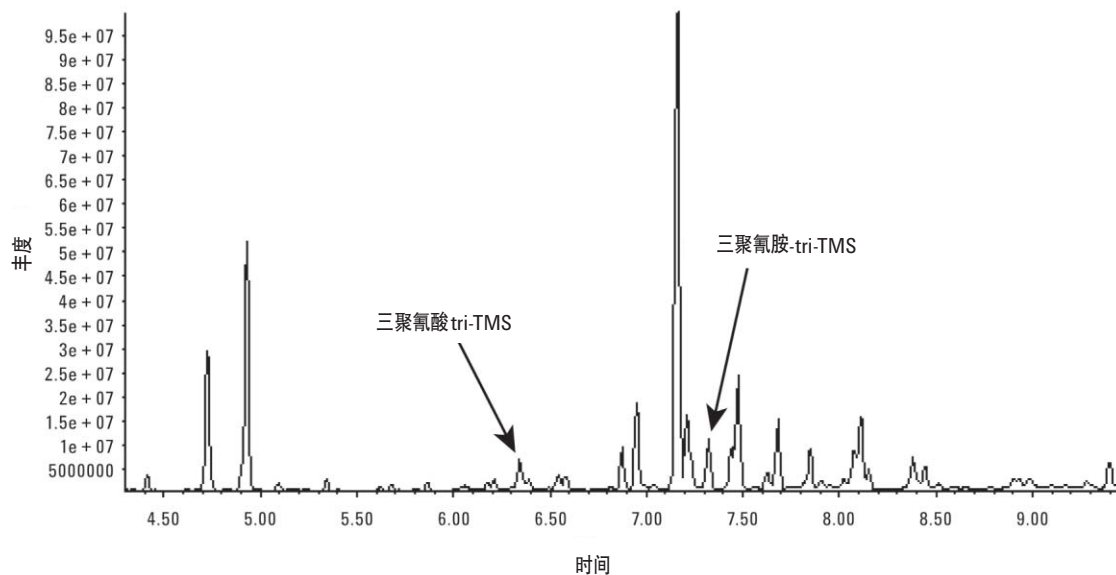


图6. 某品牌受污染液态奶的总离子色谱图

参考文献

1. 美国食品药品监督管理局, “用于三聚氰胺及其类似物的GC-MS筛查和确认方法”, Version 2, May 7, 2007。
2. Mike Szelewski, “复杂基质样品中杀虫剂快速分析的新工具”, Agilent Technologies publication 5989-1716EN, Oct.13, 2004。

更多信息

如需了解有关我们的产品和服务的详细信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

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、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2008

中国印刷

2008年10月8日

5989-9866CHCN



Agilent Technologies