

分析测试技术和方法

表面解吸常压化学电离质谱法直接测定宠物食品中三聚氰胺

张燕¹ 沈燕*² 韩超³ 陈焕文¹ 张兴磊*¹

(¹ 东华理工大学 / 江西省质谱科学与仪器重点实验室 江西南昌 330013; ² 温州大学化学与材料工程学院 浙江温州 325035; ³ 温州出入境检验检疫局 浙江温州 325027)

摘要 采用表面解吸常压化学电离 (SDAPCI) 质谱法, 在无需复杂样品预处理的情况下, 建立直接、快速的宠物食品中三聚氰胺测定方法, 并用串联质谱对测定结果进行鉴定。采用手动进样, 单个样品获取信息时间少于 30 s, 对狗咬胶样品中三聚氰胺的回收率为 89.2% ~ 113.1%; 相对标准偏差 (RSD) 在 7.4% ~ 9.5% 之间; 检出限为 3.05 μg/kg。应用本方法对 A、B、C、D、E、F 六种狗咬胶样品进行测定, 测得三聚氰胺含量分别为 25.4、17.3、148.4、130.6、10493.9、1168.0 μg/kg, 六种狗咬胶样品中三聚氰胺信号强度的相对标准偏差在 4.7% ~ 12.6% 之间。本方法无需复杂的样品预处理, 分析速度快, 灵敏度高, 在检测复杂基体样品时, 特异性强, 适用于批量样品的快速检测。

关键词 表面解吸常压化学电离源; 质谱; 三聚氰胺; 宠物食品; 快速检测

中图分类号 O657.63

Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry for Direct Detection Melamine in Pet Foods

Zhang Yan¹, Shen Yan*², Han Chao³, Chen Huanwen¹, Zhang Xinglei*¹

(¹ East China Institute of Technology, Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, Jiangxi Nanchang 330013;

² Wenzhou University, College of Chemistry and Materials Engineering, Zhejiang Wenzhou 325035;

³ Wenzhou Entry-Exit Inspection And Quarantine Bureau of P.R.C, Zhejiang Wenzhou 325027)

Abstract A novel method was developed for direct and rapid detection of trace amounts of melamine in pet foods based on surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (SDAPCI-MS) without complicated sample pretreatment. Taking the advantages of multiple-stage tandem MS capability of an ion trap mass analyzer, all the m/z signals detected from dog chewing foods were simultaneously identified using the characteristic fragments of melamine, which result in confident validation of the analytical results. The average time for a single sample analysis was less than 30 seconds; the speed was largely determined by the sample loading which took about 28 s for each manual delivery. The recoveries were 89.2%~113.1%, and the relative standard deviations were 7.4%~9.5%. The limit of detection of melamine in pet foods was 3.05 μg/kg. The concentrations of melamine in six dog chewing foods, which are labelled A, B, C, D, E and F, are 25.4, 17.3, 148.4, 130.6, 10493.9, 1168.0 μg/kg by the developed method. The relative standard deviations of melamine's signal intensity were 4.7%~12.6%. This method has the advantages of without complicated sample pretreatment, fast analysis speed, high sensitivity and specificity. Taking together SDAPCI-MSⁿ is a powerful tool for rapid, semi-quantitative detection method for melamine analysis in pet foods.

Key words Surface desorption atmospheric chemical ionization; Mass spectrometry; Melamine; Pet foods; Rapid detection

2007年春季北美地区, 自从有报道表明出现在小麦麸质中的三聚氰胺可能引起宠物猫和狗的肾衰竭之后^[1-2], 宠物食品中三聚氰胺的实时、快速检测就成为迫切需求。三聚氰胺(melamine), 学名 1,3,5-三氨基-2,4,6-三嗪(1,3,5-triazine-2,4,6-triazine), 简称三胺、蜜胺等, 是一种三嗪类含氮杂环化合物, 可用于制造三聚氰胺树脂, 禁止添加于

食品及动物饲料中。但是, 由于三聚氰胺的含氮量高达 66.6%, 又为白色粉末, 已被染色, 很容易混入食品及动物饲料中, 使得凯氏定氮法测得的“蛋白质”含量达标。

目前检测三聚氰胺的常规方法有气相色谱-质谱法(GC-MS)^[3]、高效液相色谱-质谱法(LC-MS/MS)^[4-5]、高效液相色谱法(HPLC)^[6-8]、电化学

收稿日期: 2011-09-19

基金资助: 温州市科技局科研(G20090150)和江西省自然科学基金(2010GZH0002)项目资助

作者简介: 张燕(1988-), 女, 甘肃兰州人, 在读硕士研究生, 有机生物质谱

通讯作者: 沈燕(1978-), 女, 宁夏灵武人, 讲师, 主要从事分析化学研究; 张兴磊(1986-)男, 山东泰安人, 讲师, 主要从事分析化学研究

发光法^[9]、拉曼光谱法^[10]和表面解吸常压化学电离质谱法(SDAPCI-MS)^[11,14,15]等。关于饲料中三聚氰胺的测定,农业部标准NY/T1372-2007规定HPLC法和GC-MS法。但这些方法需要衍生、提取、净化等复杂的样品预处理过程,操作繁琐且灵敏度不高,很难用于复杂基体样品中目标物质的快速、灵敏检测。本实验采用表面解吸常压化学电离质谱(SDAPCI-MS)^[11-18],在无需复杂的样品预处理条件下对宠物食品中三聚氰胺快速检测,具有分析速度快,灵敏度高,回收率较好等特点,适用于大量样品的快速检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SDAPCI离子源:实验室自制^[11-13]。LTQ-XL型线性离子阱质谱仪(美国Finnigan公司),配有Xcalibur数据处理系统。

三聚氰胺(分析纯,含量大于99.5%,天津市光复精细化工研究所),使用时配置成100.0 mg/kg甲醇溶液备用;重水(核磁试剂,含量大于99.9%,北京崇熙科技孵化器有限公司),直接使用;狗咬胶样品(企业委托),实验时将其在甲酸(分析纯,含量大于等于88.0%,天津市科密欧化学试剂开发中心监制)溶液(甲酸:水=4:1)中溶解,并放入超声波清洗器中进行震荡和加热,约2小时,狗咬胶固体溶解为液体。

1.2 实验方法

设置SDAPCI离子源为正离子模式,质量范围30-200Da,电离电压2.2kV,离子传输管温度为150℃,放电针针尖与质谱进样口水平,解吸气(N₂)气压为0.1MPa,从装有水的锥形瓶通出,以 α 为30°角流出,在出口处形成大量高活性试剂离子,将承载在铝箔纸(面积不少于1cm²)上的狗咬胶样品(实验前用甲酸溶解)或标准液中的三聚氰胺解吸和电离,并用电烙铁(实验时用铝箔纸包住尖端)辅助加热,解吸和电离出的离子被引入质谱进行分析。实验中,一级质谱测定时间少于1秒,但二级质谱记录时间可为0.5min。碰撞诱导解离(CID)的时间为100ms,离子的选择窗口为1.3 Da,碰撞能量为28%,其它条件系统自动优化。

2 结果与讨论

2.1 三聚氰胺标样的SDAPCI质谱分析

在直接检测复杂样品中目标物质时,一般需要

通过串联质谱排除假阳性结果^[16,17]。为此,首先将三聚氰胺标准溶液滴在铝箔纸上,并用铝箔纸包住尖端的电烙铁进行加热,研究在实验条件下三聚氰胺的信号及其分裂模式。由图1可见,在SDAPCI正离子模式下,试剂离子主要是水团簇离子^[17],如质谱峰 m/z 37为H₃O⁺(H₂O)和 m/z 55为H₃O⁺(H₂O)₂。在本实验条件下,三聚氰胺易形成质子化的离子[M+H]⁺,因而在质谱中获得较强的信号峰(m/z 127)。选择 m/z 127分子离子峰进行二级质谱研究,主要得到特征离子 m/z 85、110、43和60(如图2所示),是母离子分别丢失NH₂CN、NH₃、C₂N₄H₄和C₂HN₃所致。而谱图中的较高峰 m/z 109,可能是铝箔纸上的一些物质解吸电离,离子化而被检测到,也可能是三聚氰胺裂解产生的碎片。

为了进一步鉴定三聚氰胺的裂解模式,实验中采用ESI-MS对氘代三聚氰胺进行试验,如图3,选用 m/z 134分子离子峰进行二级质谱研究,主要得到特征离子 m/z 90、114、46和66,是母离子分别丢失ND₂CN、ND₃、C₂N₄D₄、C₂DN₃所致。这些碎片的产生形式与质子化三聚氰胺(m/z 127)碎片的产生形式一致。而谱图中出现的其他较高的峰,如 m/z 48、89、105、116等峰,可能是由没有氘代完全的三聚氰胺裂解产生。并且在 m/z 134的三级质谱图中可见, m/z 134丢失ND₂CN得到离子峰 m/z 90,进而丢失ND₃或ND₂CN得到离子峰 m/z 70或46(如图4所示); m/z 134丢失ND₃得到离子峰 m/z 114,进而丢失ND₂CN得到离子峰 m/z 70(如图5所示)。这些碎片的合理丢失,进一步佐证了 m/z 109并非是三聚氰胺裂解得到的碎片,而是铝箔纸上的物质解吸电离,被检测到的。

因此,如果在样品中检测到信号峰 m/z 127,并且在该离子MS/MS谱中观察到主要特征离子 m/z 85、110、43和60,则可以判断该样品中含有三聚氰胺。

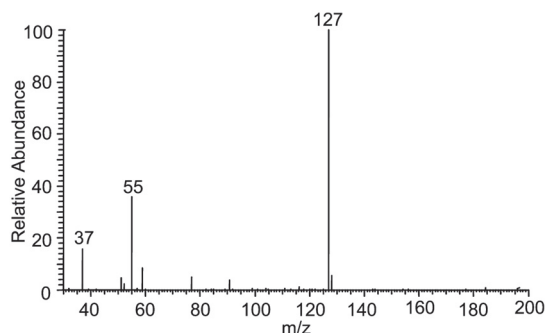


图1 三聚氰胺的SDAPCI质谱图

Fig.1 Mass spectra of melamine recorded by SDAPCI

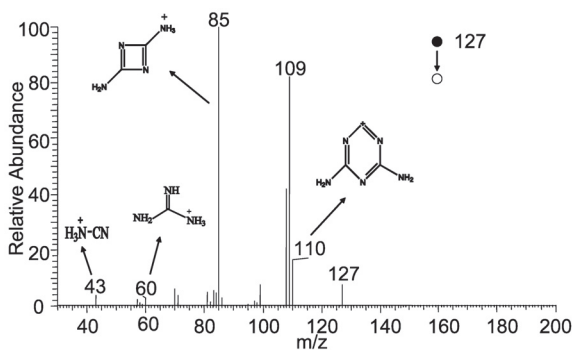


图2 三聚氰胺 m/z 127 的二级串联质谱图

Fig.2 MS² spectrum of protonated melamine (m/z 127)

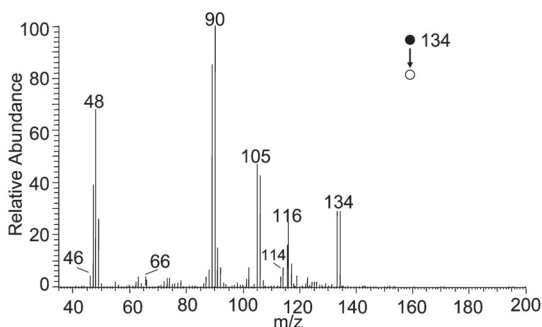


图3 氘代三聚氰胺 m/z 134 的二级质谱图

Fig.3 MS² spectrum of protonated deuterium melamine (m/z 134)

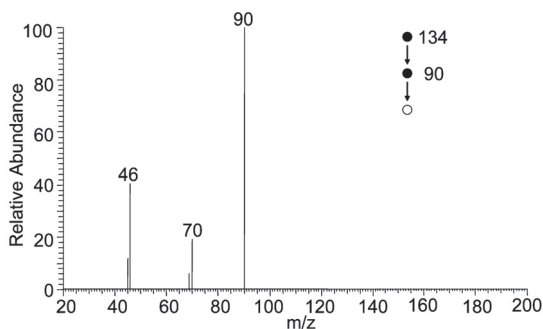


图4 氘代三聚氰胺 m/z 134 的三级质谱图

Fig.4 MS³ spectrum of the ionic fragments (m/z 90) produced from protonated deuterium melamine (m/z 134)

2.2 线性范围和检出限

配制浓度为 1、10、100、1000、10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的三聚氰胺标准甲醇溶液,按前述实验方法进行 SDAP-CI-MS 实验。将二级质谱中获得的信号扣除背景后以 m/z 85 净响应信号强度表示,每个浓度的标准样品测定 6 次,测定净响应信号强度平均值及相应的相对标准偏差(括号内)依次为:46.8 (9.8%)、66.8 (8.9%)、89.3 (7.5%)、118.6 (6.2%)、141.5 (6.3%)。信号强度与样品浓度分别取对数,绘制工作曲线,结果如图 6 所示。在 1 ~ 10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内,信号

强度的对数 (Y) 与浓度的对数 (X) 具有较好的线性关系。线性回归方程, $Y=0.121X+1.6923$, 相关系数 $R=0.99$ 。这可能是由于手动进样时的不稳定性(如抖动等原因)造成的。

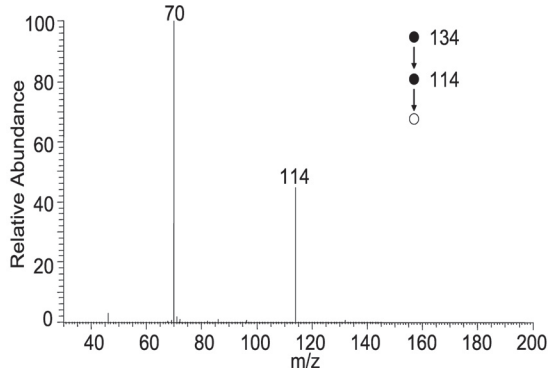


图5 氘代三聚氰胺 m/z 134 的三级质谱图

Fig.5 MS³ spectrum of the ionic fragments (m/z 114)

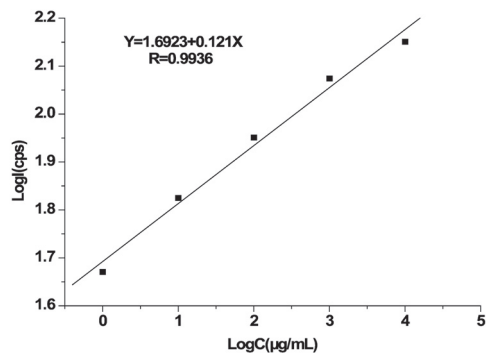


图6 样品信号强度对数与样品浓度对数的工作曲线

Fig.6 Calibration curve of melamine

produced from protonated deuterium melamine (m/z 134)

对 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 标准品进行测定,获得净相应信号强度为 75.3 ($n=15$),并测得 3 倍标准偏差为 23.0 ($S/N \geq 3$, $n=15$)。根据^[19] $LOD=c3\sigma/S$ (c 为标准品的浓度, σ 为标准偏差, S 为净相应信号强度平均值),计算得本方法对三聚氰胺检出限为 3.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 实际样品分析

采用本方法对狗咬胶样品进行测定,每个样品在 0.5 min 内即获得了检测结果。图 7 为某狗咬胶样品的一级质谱图,观测到样品中三聚氰胺的质子化离子 m/z 127 的信号,由于样品的基体复杂,为了排除假阳性信号,需要进行串联质谱鉴定。选择离子 m/z 127 在与标准品相同的实验条件下进行 CID 获得的二级串联质谱如图 8 所示,获得特征碎片离子与标准谱图一致。相对于标准谱图,样品的二级质谱图中 m/z 109 的峰强度升高,可能是由于样品

的基体复杂,在加热的过程中使一些杂质更容易解吸和电离,离子化而被检测到。此外相对于标准谱图 m/z 85 的信号强度显著下降,而 m/z 60 的峰不可见,这可能是由于 m/z 109 杂质峰信号强度的大幅度升高,使得其他峰信号强度的降低,甚至不可见。

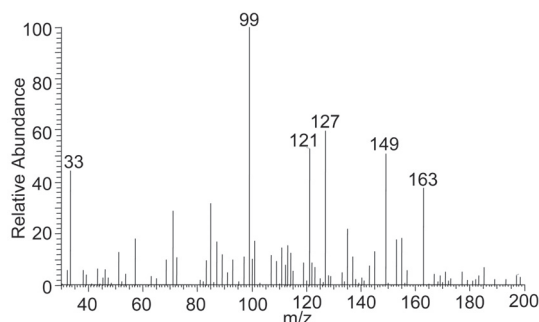
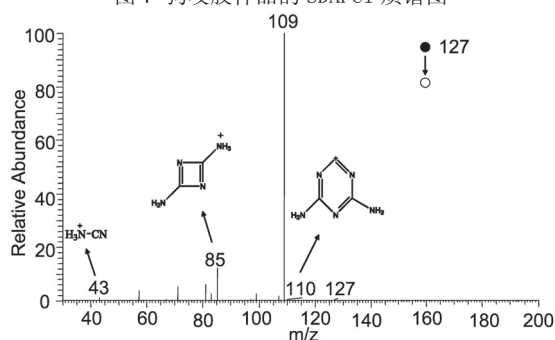


图7 狗咬胶样品的SDAPCI质谱图

图8 狗咬胶样品 m/z 127 的二级串联质谱图

为了获得这些样品中三聚氰胺的定量信息,单个样品连续测定6次,分别得到三聚氰胺的净响应信号强度,通过工作曲线,由线性回归方程求的三聚氰胺含量,经过二级质谱鉴定排除假阳性,所检测六种样品中三聚氰胺含量分别为:25.4、17.3、148.4、130.6、10493.9、1168.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果发现,这六种狗咬胶样品中三聚氰胺信号强度的相对标准偏差(RSD)在4.7%~12.6%之间,如表1所示。

表1 实际样品中的三聚氰胺含量及相对标准偏差

Tab.1 The content and relative standard deviation of melamine in the actual samples

样品名称 Sample	平均强度 Average intensity	三聚氰胺含量 Content of melamine ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相对标准偏差 RSD(%)
A	72.8	25.4	12.6
B	69.5	17.3	8.2
C	90.2	148.4	8.9
D	88.8	130.6	4.7
E	151.0	10493.9	9.0
F	115.7	1168.0	6.5

回收率实验,在7份1mL狗咬胶样品中,向1份样品中加入10 μL 的甲醇溶液,向3份样品中分别加入10 μL 浓度为1mg/kg三聚氰胺标准溶液,向另3份样品中分别加入10 μL 浓度为10mg/kg

三聚氰胺标准溶液,按照试验方法进行测定。加标回收率89.2%~113.1%,相对标准偏差(RSD)在7.0%~9.5%之间,见表2。采用手动进样,单个样品测定时间少于30s,分析速度较快。实验结果中相对偏差较大的原因可能是由于手动进样时的不稳定性造成的。

表2 实际样品测定的回收率

Tab.2 Recovery for rapid analysis of actual samples

样品编号 Sample	加标量 Amounts spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测得总量 Amounts found ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
1		140.9		8.0
2	9.9	150.5	96.9	9.5
3	9.9	152.1	113.1	7.3
4	9.9	151.2	103.8	8.4
5	99.0	236.6	96.7	7.0
6	99.0	230.8	90.9	8.0
7	99.0	229.2	89.2	7.4

实验结果表明,本方法灵敏、快速,在大批量复杂基体样品的快速分析方面具有较好的应用前景。

对宠物食品进行三聚氰胺的检测,对保证宠物的质量安全、保护动物,间接维护人体健康具有重要意义。表面解吸常压化学电离质谱法具有高灵敏度、耐高浓度样品、操作简便、快速、无需复杂的样品预处理及对样品无污染等特点,比较适合对大批量样品中掺杂物质进行快速半定量分析。如果结合小型质谱仪还可用于现场快速分析,具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] <http://www.fda.gov/cvm/MenuFoodRecallFAQ.htm>
- [2] 林祥海, 王建峰, 等. 三聚氰胺的独立研究[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(3): 216-218
- [3] 李锋格, 姚伟琴, 等. 气相色谱-质谱法快速测定牛奶中的三聚氰胺和三聚氰酸[J]. 色谱, 2009, 27(2): 233-236
- [4] 付登洲, 杨雪娇, 等. 超高效液相色谱-串联质谱内标法测定饲料中三聚氰胺含量[J]. 食品工业, 2009, 5: 58-60
- [5] 吴庆庆, 范可心, 等. 基于反相液相色谱-质谱联用的高灵敏度三聚氰胺检测新方法[J]. 科学通报, 2009, 54(2): 171-176
- [6] 汪辉, 彭新凯, 等. 高效液相色谱测定生鲜乳及乳制品中三聚氰胺的方法研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 531-535
- [7] 田玉平, 王虎, 等. 高效液相色谱法测定乳及乳制品中三聚氰胺含量的不确定度评价[J]. 实验室研究与探索, 2010, 29(1): 41-43
- [8] 李巧玲, 安源, 等. 牛羊肉中三聚氰胺的HPLC快速测定[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 196-199
- [9] 刘凤玉, 杨雪. 电化学发光法检测三聚氰胺[J]. 化工学报, 2010, 61(S1): 51-55
- [10] 程劫, 苏晓鸥. 纳米银离子表面增强拉曼光谱在宠物饲料中三聚氰胺的速测研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(1): 131-135
- [11] 杨水平, 陈焕文, 等. 鸡蛋中三聚氰胺的表面解吸常压化学电离串联质谱法成像[J]. 分析化学研究快报, 2009, 37(3): 315-318

- [12] WU Zhongchen, CHEN Huanwen, WANG Weiling, JIA Bin, YANG Tianlin, ZHAO Zhanfeng, DING Jianhua, XIAO Xuxian. Differentiation of Dried Sea Cucumber Products from Different Geographical Areas by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry [J]. J. Agric. Food Chem., 2009, 57(20): 9356-9364
- [13] WANG Jiang, YANG Shuiping, YAN Feiyan, LIU Yan, LI Ming, SONG Yuhang, ZHAN Yebing, CHEN Huanwen. Rapid Determination of Dimethoate in Nanoliter of Juice Using Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry [J]. Chin. J. Anal. Chem., 2010, 38(4): 453-457
- [14] 杨水平, 胡斌, 等. 表面解析常压化学电离质谱法直接测定奶粉中三聚氰胺[J]. 分析化学研究简报, 2009, 37(5): 691-694
- [15] YANG Shuiping, DING Jianhua, ZHENG Jian, HU Bin, LI Jianqiang, CHEN Huanwen, ZHOU Zhiqian, QIAO Xiaolin. Detection of Melamine in Milk Products by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry [J]. Anal. Chem., 2009, 81(7): 2426-2436
- [16] CHEN Huanwen, ZHENG Jian, ZHANG Xie, LUO Mingbiao, WANG Zhichang, QIAO Xiaolin. Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination [J]. Chinese J. Anal. Chem., 2007, 42(8): 1045-1056
- [17] CHEN Huanwen, HU Bin, ZHANG Xie. Principle and Application of Ambient Mass Spectrometry for Direct Analysis of Complex Samples [J]. Chin. J. Anal. Chem., 2010, 38(8): 1069-1088
- [18] CHEN Huanwen, LIANG Huazheng, DING Jianhua, LAI Jinhua, HUAN Yanfu, QIAO Xiaolin. Rapid Differentiation of Tea Products by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry [J]. J. Agric. Food Chem., 2007, 55(25): 10093-10100
- [19] Ding Jianhua, Gu Haiwei, Yang Shuiping, Li Ming, Li Jianqiang, Chen Huanwen. Selective Detection of Diethylene Glycol in Toothpaste Products Using Neutral Desorption Reactive Extractive Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry [J]. Anal. Chem., 2009, 81: 8632-8638

兰州石化在线光谱分析仪应用成功

兰州石化公司研究院研制的“在线光谱分析仪样机”在橡胶厂丁苯装置成功应用。这项技术填补了国内空白,是具有自主知识产权的新技术。在线光谱检测技术替代了传统的人工检测技术,具有更加快速、精确、易操作的特性。

兰州石化研究院根据生产装置实际需求,结合自身在光谱技术领域的研究成果,首次将光谱技术应用于在线检测领域。由于丁苯橡胶生产装置采用人工采样分析方式,每4小时对回收的丁二烯物料进行氧含量分析,装置的操作压力是微负压,渗入空气不能及时发现,装置急需一种能连续快速在线检测丁二烯中氧含量的分析设备和手段。

在线光谱分析仪用于检测橡胶厂丁苯装置丁二烯氧含量,能够在线实时检测原料的氧含量和数据曲线。在装置现场,科研人员采用国标法和在线光谱分析仪测量结果进行准确度反复跟踪对比,两者测量结果完全吻合,在线光谱分析仪以快速、精确、易操作的特性优于人工测量。