

Determination of melamine in plant protein by liquid chromatography-mass spectrometry

Zhu Xianfeng

Henan University of Technology, Zhengzhou

Abstract: An inspection method of triple quadruple liquid chromatography-mass spectrometry was developed for the determination of melamine in plant protein. Methods: samples were extracted with 1% acetic acid + acetonitrile (4:1, V / V), and purified through a solid phase extraction column. Qualitative and quantitative analysis of melamine was performed by using the multiple reaction monitoring (MRM) technology of liquid chromatography-mass spectrometry, and the ion pairs $m/z 127 > 65$ and $m/z 127 > 85$ of melamine were used for qualification and quantification respectively. Results: the developed method presented good linearity in the range of 0.025 $\mu\text{g/mL}$ to 0.400 $\mu\text{g/mL}$. The average recoveries were 87.2 % to 99.9 %, and the RSD was 0.51 % to 1.23 %. Conclusion: by using the optimal instruments, the method has the advantages of easy operation, good reproducibility, high recovery rate and accurate results for the detection of melamine.

Key words: Liquid chromatography-mass spectrometry; plant protein; melamine

Received: 2020-03-27; Accepted: 2020-04-11; Published: 2020-04-13

利用液相色谱质谱法用于植物性蛋白中三聚氰胺的测定

祝险峰

河南工业大学，郑州

邮箱: xfzhu.1988@163.com

摘 要: 建立三重四极杆液相色谱质谱联用分析植物性蛋白中三聚氰胺的检测方法。方法: 样品用 1% 乙酸 + 乙腈 (4 : 1, V/V) 提取, 固相萃取柱净化, 利用液质联用的多反应监测 (MRM) 技术, 对三聚氰胺进行定性定量分析, 以三聚氰胺的离子对 m/z 127/65 进行定性, 以离子对 m/z 127/85 进行定量。结果: 方法在 0.025 $\mu\text{g/mL}$ ~ 0.400 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内呈良好的线性关系, 加标平均回收率为 87.2% ~ 99.9%, 试验的 RSD 为 0.51% ~ 1.23%。结论: 该方法通过优化仪器分析条件, 操作方便, 重现性好, 回收率高, 结果准确, 为三聚氰胺的检测提供了准确可靠的方法。

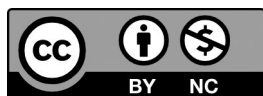
关键词: 液相色谱质谱法; 植物性蛋白; 三聚氰胺

收稿日期: 2020-03-27; 录用日期: 2020-04-11; 发表日期: 2020-04-13

Copyright © 2019 by author(s) and SciScan Publishing Limited

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



蛋白质是生物体的基本成分,生物体内所有组织和细胞都含有蛋白质,而且体内所有的代谢活动也都离不开蛋白质。从营养学的角度来看,人体过量食用动物性蛋白质易导致人体脂肪和胆固醇升高,导致心血管疾病的发生。现代营养学家提倡每天应摄取一定量的植物性蛋白质,这种健康的饮食方式现已开始流行,因此如花生蛋白粉、大豆蛋白粉等植物性蛋白在营养保健食品中得到广泛使用。此外另一种植物性蛋白玉米蛋白粉由于其蛋白质营养成分丰富,并具有特殊的味道和色泽,也广泛直接用于做饲料蛋白原料。

三聚氰胺属非蛋白类含氮有机化学品,作为化工原料,可用于塑料、食品包装材料等的生产,资料表明,三聚氰胺可能从环境、食品包装材料等途径进入到食品中,其含量很低。三聚氰胺不是食品原料,更不是食品添加剂,因此是绝对不允许人为添加到食品或动物饲料中的。由于三聚氰胺含氮量高达66%,每增加1%的三聚氰胺,采用凯氏定氮法测定,折算蛋白含量可虚涨4%。因此,一些不法分子为了降低生产成本,人为在食品或动物饲料中添加三聚氰胺,造成蛋白质含量增高的假象,如2007年3月美国发生的猫、狗饲料受三聚氰胺污染事件和2008年9月我国发生造成多起婴儿肾结石病例的三聚氰胺奶粉事件。目前,食品中三聚氰胺质量安全问题已成为国内外关注焦点[4]。因此,研究快速检测三聚氰胺的方法具有十分广泛的意义。实验根据现阶段植物性蛋白被广泛使用的现实特点,采用固相萃取-液相色谱质谱法对植物性蛋白中三聚氰胺的检测方法进行研究。

1 实验部分

1.1 主要仪器、材料

仪器:安捷伦 1200 Series/6410 Triple Quad LC/MS; EL-320S 电子天平(常州天之平仪器设备有限公司); XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);

9690A 型超声仪（天津科贝尔光电技术有限公司）；恒温水浴锅（广东环凯微生物科技有限公司）；TGW16 台式微量高速离心机（长沙英泰仪器有限公司）；固相萃取装置（艾贝尔科技有限公司）；AP-01P 真空泵（天津奥特赛恩斯仪器有限公司）；HGC-12A 氮吹仪。

材料：花生蛋白粉、大豆蛋白粉、玉米蛋白粉；BOND ELUT PLEXA PCX 固相萃取柱（60 mg, 3 mL）。

1.2 试剂与标准品

乙酸（分析纯）、乙酸铵（分析纯）、氨水（分析纯，含量：25% ~ 28%）、乙腈（色谱纯）、甲醇（色谱纯）；盐酸（分析纯）、三聚氰胺标准物质（BW3831 中国计量科学研究院纯度：99.6%）。

1.3 溶液配制

1.3.1 标准储备液

准确称取三聚氰胺标准品 0.0500 g，用 20% 甲醇水溶解并定容至 50 mL，此溶液浓度为 1 mg/mL，于 4℃ 冰箱中保存，有效期 3 个月。实验用水为 GB/T6682 规定的一级水。

1.3.2 标准工作液

根据需要，将标准储备液配制适当浓度的标准工作液，标准工作液在使用前配制。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo ODS HYPERSIL（100 mm × 4.6 mm, 5 μm）；进样量：2.5 μL；流速为 0.3 mL/min；柱温为 40℃；流动相为 A-5 mmol/L 乙酸铵：B- 甲醇（40 : 60），等度洗脱。

1.4.2 质谱条件

干燥气为氮气，流速 10 L/min，温度 350℃；雾化气：氮气，40 psi；电喷

雾电离正离子模式 ESI (+)；离子喷雾电压 4000 V；质谱扫描方式：多反应离子监测 (MRM)。

1.5 样品处理

1.5.1 提取

称取均匀的样品 2.00 g 到 50 mL 具塞比色管中，加 30 mL 1% 乙酸溶液和 10 mL 乙腈，漩涡震荡 5 min，再超声提取 15 min，取出冷却后用 1% 乙酸溶液定容至 50 mL，定性滤纸过滤，滤液于高速离心机中 10000 r/min 离心 10 min，取上清液待过 PCX 固相萃取柱。

1.5.2 净化

PCX 固相萃取柱，使用前用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化。取 1.5.1 制得的上清液 3 mL 过柱，弃去滤液，依次用 5 mL 水，5 mL 甲醇淋洗，最后用 5 mL 5% 甲醇氨洗脱，整个过程流速控制不超过 1 mL/min，洗脱液在 50℃ 下氮气吹干后，用 20% 甲醇水定容至 3 mL，用于 LC/MS 测定。

2 定性与定量

选择 m/z 127/65 作为定性离子对， m/z 127/85 作为定量离子对进行测定，依据质谱图特征并结合保留时间定性、确证，峰面积外标法定量。

三聚氰胺检测结果计算公式为：

$$X = \frac{c \times v}{m \times 1000}$$

X- 样品中三聚氰胺含量 (mg/kg)，c- 标准曲线校准后试液中三聚氰胺的浓度 (ng/mL)，v- 试液定容体积 (mL)，m- 试样质量 (g)。

3 结果

3.1 工作曲线

按选定的仪器条件对已配制的三聚氰胺标准系列溶液进行测量，以组分的

质量浓度为横坐标, 组分的色谱峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线, 校准曲线的回归方程为 $Y=230.1308 \cdot X+1714.1250$, 相关系数 $R^2=0.9997$, 校准曲线见图 1。

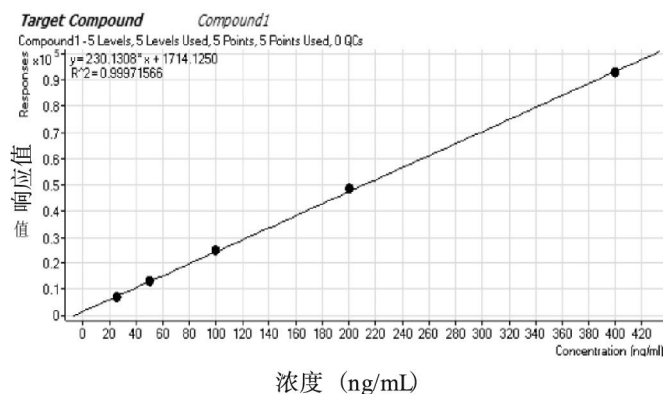


图 1 三聚氰胺标准曲线

3.2 分析方法的准确度（回收率试验）及精密度

以花生蛋白粉、大豆蛋白粉、玉米蛋白粉为实验样品, 每样品分别称取约 2.00g 各 3 份, 分别加入不同体积的 $2 \mu\text{g/mL}$ 的三聚氰胺标准溶液, 按 1.5 的步骤进行样品处理, 处理成 3 个不同的加标浓度, 分别为 120 ng/mL、200 ng/mL、280 ng/mL, 每个质量浓度测 6 次, 测试标准品和样品加标回收的色谱图分别见图 2 和图 3。测试的实验数据见表 1。

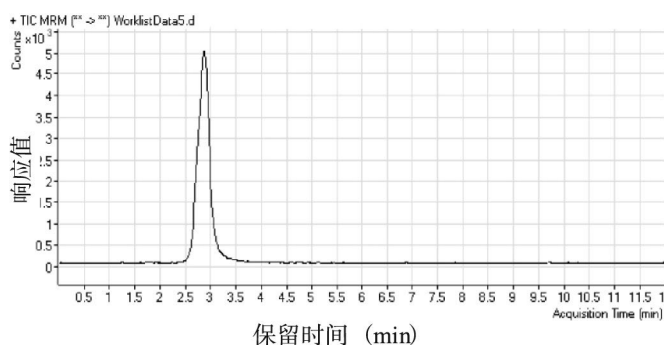


图 2 三聚氰胺标准品色谱图

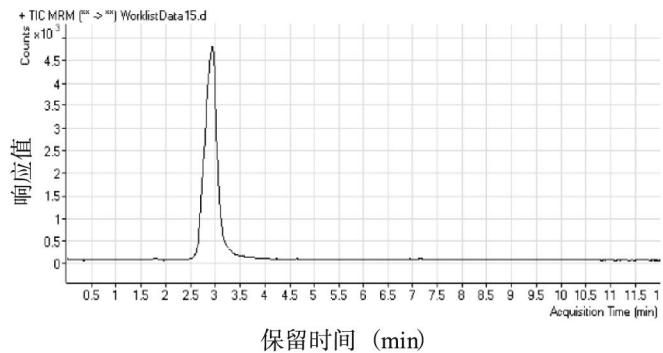


图 3 空白试样中三聚氰胺加标色谱图

表 1 加标回收试验结果及精密度 (n=6)

样品名称	本底浓度 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	测得浓度 (ng/mL)						RSD (%)	平均回收率 (%)
			1	2	3	4	5	6		
花生蛋白粉	0	120	105.9968	104.0962	104.2698	105.9278	103.5001	104.0058	1.01	87.2
		200	201.9941	198.2355	203.2969	198.2547	197.5684	197.0044	1.05	99.9
		280	246.281	243.2183	244.1157	245.3319	243.8814	243.1012	0.51	87.3
大豆蛋白粉	0	120	110.2689	111.2422	112.6972	113.0567	113.2431	110.2547	1.23	93.2
		200	189.2547	190.2246	188.567	187.226	191.2675	191.2048	0.84	94.8
		280	250.2841	251.3271	249.3354	248.0123	251.5841	253.3392	0.74	89.5
玉米蛋白粉	0	120	112.1258	115.2369	114.2389	114.7701	113.5612	113.2275	0.99	94.9
		200	187.2658	186.2201	187.3691	185.7915	188.3254	185.2247	0.62	93.3
		280	255.1282	253.1547	254.0609	254.6712	256.3712	257.0014	0.56	91.1

4 讨论

目前，检测三聚氰胺主要有高效液相色谱法、气相色谱质谱法和液相色谱质谱法等。液相色谱质谱法相对于气相色谱质谱法的优点是样品无需衍生化，离子的特征性也较强，提供的信息丰富，也比高效液相色谱法具有更强的定性功能且检出限更低。

由于三聚氰胺是属于弱碱性化合物，固使提取溶液呈弱酸性可增大三聚氰胺在溶液中的溶解度，提高提取效率。酸溶液不仅可以有效沉淀样品中的蛋白质，避免过固相萃取柱时出现堵柱现象，还可获得较高的回收率。

样品在测定中常会受到比较大的背景干扰，采用固相萃取法对样品进行净

化,大大降低了杂质(主要是脂肪类物质)的干扰,起到良好的效果。由于三聚氰胺属于弱碱性化合物,在酸性条件下会形成正离子,因此,在样品前处理过程中采用了强阳离子固相萃取柱对样品进行净化处理,有效的除去干扰杂质,使色谱基线平稳且获得较高的回收率。实验结果证明目标化合物是低浓度的情况下,也有足够的检测离子进行定量分析,不影响检测效果。采用固相萃取法的另一个好处是在实验过程中,相比于液液萃取法来说减少了试剂的使用量,降低实验成本,方便操作,也减低了有机溶剂的毒性对实验操作者身体健康的危害。

研究用液相色谱质谱法测定植物性蛋白中三聚氰胺的残留量,样品处理过程简单,方法的灵敏度高,精密度及回收率均可满足实际工作的要求,具有一定的实际应用意义。通过质谱对样品进行准确定性,多反应离子监测模式(MRM)进行定量,分析精度好,回收率和重现性高,应用于质量检测部门对三聚氰胺残留量的检测,效果满意。

参考文献

- [1] 李东刚,鞠福龙,李春娟.三重四级杆气质联用法分析乳粉中三聚氰酸和三聚氰胺[J].食品科学,2010,31(6):180-184.
- [2] 赵慧芬,水明,张雪林,等.液相色谱-质谱/质谱法测定乳品中三聚氰胺含量的简便方法[J].中国牛奶,2009(4):43-46.
- [3] 戴玉子,刘洁,赵君,等.改进的食品中三聚氰胺高效液相色谱串联质谱检测法[J].食品工业科技,2009,30(3):325-327.
- [4] 马丽莎,郑光明,朱新平,等.食品中三聚氰胺与三聚氰酸残留检测研究进展[J].中国兽药杂志,2010,44(8):48-51.
- [5] 全国食品安全应急标准化工作组. GB/T22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].北京:中国标准出版社,2008.