

关键字

三聚氰胺；全自动固相萃取；液相色谱-串联质谱法

介绍

三聚氰胺 (Melamine) (化学式: $C_3H_6N_6$)，俗称密胺、蛋白精，IUPAC命名为“1,3,5-三嗪-2,4,6-三氨基”，是一种三嗪类含氮杂环有机化合物，被用作化工原料；其中常混合有结构类似的三聚氰酸，在摄入人体进入肾细胞后，三聚氰胺会与三聚氰酸结合形成结晶沉积，从而造成肾结石并堵塞肾小管，并有可能导致肾衰竭。2008年6月震惊全国的“三鹿事件”主要是由于食用了含有大量三聚氰胺的三鹿牌婴幼儿配方奶粉引起的。

本文参考GB/T 22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》中第二法建立了基于睿科Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪分析奶粉中三聚氰胺的检测方法，试样用1%三氯乙酸溶液提取，使用阳离子交换固相萃取柱净化，用液相色谱-质谱/质谱法测定和确证，内标法定量，回收率于87-97%之间，RSD=4.7。说明该方法能满足奶粉中三聚氰胺的检测。

1. 仪器、耗材与试剂

仪器、耗材

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

高效液相色谱 (HPLC) Agilent 1260, 质谱检

试剂与溶剂

取适量的三聚氰胺标准品用甲醇:水=50:50 溶液稀释成浓度为 1000 mg/L 的标准储备液, 于 4℃ 避光保存。

乙腈 (色谱纯, TEDIA), 甲醇 (色谱纯, TEDIA), 氨水 (AR): 含量为 25%~28%

乙酸铵溶液 (10 mmol/L): 准确称取 0.772 g 乙酸铵于 1 L 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度,

2. 标准曲线配置

使用睿科 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站实现标准品的全自动化配置, 可将母液 (1000 mg/L) 通过工作站的配液模式, 配置成浓度为 10 mg/L 的工作中间液, 紧接着可通过程序设置, 吸取该工作液, 配置一条浓度分别为 0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 的标

测器 (MS) Agilent 6410

离心机: 湘仪, 转速不低于 4000r/min

超声波清洗机: Scientz 新芝, SB-800D

固相萃取小柱: RayCure MCX, 60 mg/3 mL, RC-204-72855

混匀备用。

甲醇水溶液: 准确量取甲醇 50 mL 与水 50 mL, 混匀后备用。

1%三氯乙酸溶液: 称取 10 g 三氯乙酸于 1L 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度。

氨化甲醇溶液: 准确量取 5 mL 氨水和 95 mL 甲醇, 混匀备用。

准工作曲线。

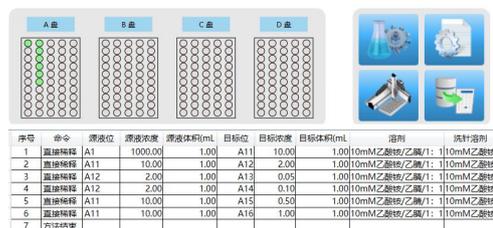


图-1. Auto Prep 200 液体工作站配标程序

3. 样品提取与前处理

样品前处理

称取 1 g (精确至 0.01 g) 试样于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 4 mL 1%的三氯乙酸与 1 mL 乙腈, 超声 10 min 后用 4000 r /min 离心 10 min,

固相萃取净化条件

表-1 固相萃取净化条件

| | |
|----------|---------------------------|
| 全自动固相萃取仪 | 睿科 Fotector Plus |
| 固相萃取柱 | MCX (RayCure, 60 mg/3 mL) |
| 淋洗 | 水、甲醇 |
| 洗脱 | 5% 氨水甲醇 |

上清液经三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤后 (或者以高于 10000 r/min 速度离心), 重复提取一次, 合并提取液, 待净化。

将 MCX 柱子安装在仪器上, 分别用 3 mL 甲醇和 5 mL 水, 以 2 mL/min 速度活化, 将上述待净化液以 1 mL/min 速度上样, 用 5 mL 水冲洗样品瓶, 然后用 3 mL 甲醇以 2 mL/min 速度淋洗固相萃取柱, 用氮气在 25 psi 压力下吹干柱子 5 min。最后用 6

mL 氯化甲醇以 1 mL/min 速度洗脱，洗脱液用睿科 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪在 50 °C、2 psi 条件下吹干，残渣用 1 mL 流动相溶解，过微孔滤膜后上机检测。

| 序号 | 命令 | 溶剂 | 排出 | 流速 (mL/min) | 体积 (mL) | 时间 (min) |
|----|--------|--------|------|-------------|---------|----------|
| 1 | 清洗样品通道 | 甲醇 | | | | 1.3 |
| 2 | 活化 | 甲醇 | 有机废液 | 2 | 3 | 1.9 |
| 3 | 活化 | 水 | 有机废液 | 2 | 5 | 2.9 |
| 4 | 上样 | | 有机废液 | 1 | 10 | 10.8 |
| 5 | 清洗样品瓶 | 水 | 有机废液 | 60 | 5 | 5.9 |
| 6 | 淋洗 | 甲醇 | 有机废液 | 2 | 3 | 1.9 |
| 7 | 气推 | | 有机废液 | 80 | 20 | 1.6 |
| 8 | 吹干 | | | | | 5 |
| 9 | 清洗注射泵 | 5%氯化甲醇 | | 60 | 3 | 0.4 |
| 10 | 洗脱 | 5%氯化甲醇 | 收集 | 1 | 6 | 6.5 |
| 11 | 气推 | | 收集 | 1 | 2 | 2.4 |
| 12 | 气推 | | 收集 | 60 | 10 | 1 |
| 13 | 结束 | | | | | |
| 14 | | | | | | |

图-2. Fotector Plus 奶粉中三聚氰胺固相萃取净化方法

4. 检测条件

液相色谱-质谱联用条件

| | |
|------|---|
| 柱子 | Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μm×21×50mm |
| 流速 | 0.200 mL/min |
| 流动相 | A: 10mM ammonium acetate B: acetonitrile |
| 柱温 | 30 °C |
| 进样体积 | 5 μL |
| 检测器 | MS/MS 6410 |
| 离子模式 | ESI ⁺ |
| 吹扫气 | 11 L/min |
| 氮气温度 | 350 °C |
| 簇电压 | 4000 |
| 雾化压力 | 35 psi |
| 洗脱梯度 | 0-1.5 min, 5%流动相 B; 2 min-3.5 70%流动相 B; 5.0-6.0 5%流动相 B |

MRM 参数

| 化合物 | 母离子 (m/z) | 定量离子 (m/z) | 定性离子 (m/z) | 碎裂电压 (v) | 碰撞能量 (ev) |
|--|-----------|------------|------------|----------|-----------|
| Melamine | 127 | 85.2 | 68.2 | 100 | 20 |
| Melamine- ¹³ C ₃ | 130 | 87 | / | 100 | 20 |

色谱图

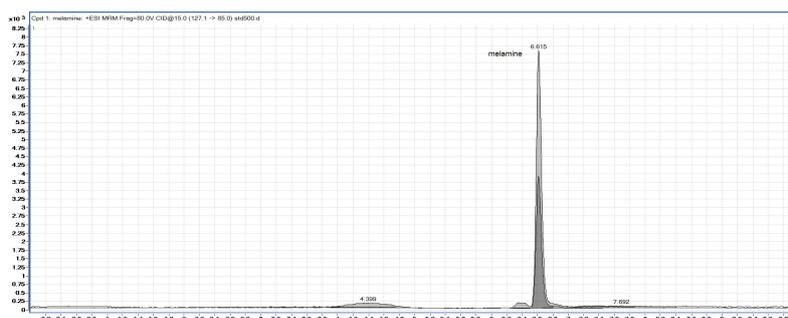


图-3. 三聚氰胺标准品色谱图 (100 μg/L)

5. 方法可行性验证

取奶粉 1 g，添加标准品（100 μ L，1 ppm）回收率在 87-97%之间，RSD=4.76%（n=4），符合回进行上述样品前处理过程，实验结果如下表-2 所示。 收率以及相对标准偏差的要求。

表-2 加标回收率及 RSD 值

| 化合物 | 回收率 (%) | | | | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------|---------|
| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | S ₄ | | |
| 三聚氰胺 | 89.81 | 93.40 | 97.21 | 100.21 | 95.16 | 4.76 |

6. 结果与讨论

相比于标准，样品提取时用 1 %三氯乙酸溶液提取两次，可以提高回收率。

按照标准，固相萃取整个上样过程流速不能超

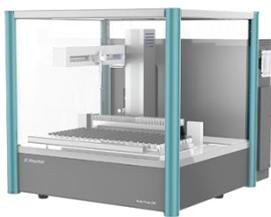
过 1 mL/min。采用睿科 Fotector Plus 全自动固相萃取仪可以设置流速，对流速进行准确控制，这是手动固相萃取无法达到的。

7. 总结

本文采用睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪，结合 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪及 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站，优化建立奶粉中三聚氰胺的测定前处理方法。Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪可同时进行 6 个样品净化，连续自动处理 60 个样品，做样通量高；可无人值守，提高实验人员工作效率。此外还可避免工作人员因操作失误导致的检测偏差，也可将实验人员更迭对检测结果的影响最小化。Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪可实现 60 个样品同时进行氮吹，

实验平行性好；氮吹针自动追随液面的设计，无需手动调节氮吹针且耗气量小，省时省力。Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站可实现混标、标准曲线的自动配置，全程无需人为值守，让实验人员远离有毒有害的化学物质，保护身体健康。

本解决方案的准确性、重复性、再现性均满足实验要求，能够用于 GB/T 22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》对奶粉中三聚氰胺的测定，且回收率于 87-97%之间，RSD=4.7。



全自动液体样品处理工作站
标液配制



高通量全自动固相萃取仪
净化



全自动平行浓缩仪
浓缩



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

自动化样品前处理解决方案领先供应商

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020年5月版