

# 采用 GC/MS 筛选参杂三聚氰胺的假冒蛋白质食品

## 前言

三聚氰胺是一种富含氮工业化学品，有多种用途，最常见的是用于制造三聚氰胺树脂——一种非常耐用的聚合物。在 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<sup>1</sup>，三聚氰胺这一名字很快被人们所知。进一步的研究结果令科学家们相信就是这些三聚氰胺及其类似物——三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺及三聚氰酸综合导致宠物生病<sup>2</sup>。为完成对宠物饲料原材料的调查，需要测定三聚氰胺是否被故意添加至小麦麸质假冒蛋白质以提高蛋白检测含量。因为工业标准的蛋白含量测试仅仅通过氮含量测试推断蛋白含量，而三聚氰胺正好是一个廉价的含氮丰富的原料，如果采用定氮方式测量蛋白含量，添加三聚氰胺蛋白含量的测试结果就会显著增加。

对三聚氰胺掺假蛋白的关注很自然会延伸到对各种不同类型干蛋白粉原料的关注，无论这些干蛋白粉是作为动物饲料还是人类食品原料。显著的事实和潜在的公众健康危害性促使美国食品药品监督管理局 (FDA) 迅速发行关于蛋白原料中三聚氰胺分析的标准测试方法。此方法命名为：“GC/MS 方法筛查三聚氰胺、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺及三聚氰酸”<sup>3</sup>，它与定氮法测试蛋白含量相结合确定原材料是否确实富含蛋白质，还是含有其他非蛋白质氮元素。一旦检出产品中含有任何三聚氰胺或其类似物，此产品即刻标示为掺假物不允许非法出售。美国食品药品监督管理局 (FDA) 目前的分析方法仅涉及对三聚氰胺及其类似物的定性判断和半定量估算。

本文提供了一种分析三聚氰胺及其类似物的耐用、有效且确定性方案。除优化的 GC/MS 方法外，还讨论了样品准备方案，包括提取和衍生。

## 作者

James Neal-Kababick  
Flora Research Laboratories  
1000 SE M Street - Unit B  
Grants Pass, OR 97526

William Goodman  
PerkinElmer, Inc.  
710 Bridgeport Ave  
Shelton, CT 06484

## 实验部分

整个实验包括三个主要部分：提取、衍生和 GC/MS 分析，这些方法严格参考 US.FDA 出版发行的测试方法。

从干燥蛋白质原料中提取三聚氰胺相对比较简单，取 0.5g 样品置于 20 ml 按 10:40:50 体积比制成的二乙胺 (DEA)、水和乙腈混合溶液中超声提取 30 min。超声提取后置于 3500 转/min 下离心 10 min，以去除样品基质中细颗粒物，悬浮液通过 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE 滤膜过滤，PTFE 作为首选材料是因为食品类型基质中的很多化合物容易被其他材料滤膜吸附。经滤膜过滤后，取 200  $\mu\text{l}$  溶液在 70  $^{\circ}\text{C}$  温度置于干燥清洁氮气气流下干燥蒸发，干燥之后的样品等待衍生化处理。

干燥的样品置于自动进样器小瓶里，加入 200  $\mu\text{l}$  吡啶和 100  $\mu\text{l}$  浓度为 0.5  $\mu\text{g/ml}$  的内标溶液。三聚氰胺和相关化合物被衍生化试剂 Sylon-BFT (Supelco) 转化为三甲基硅 (TMS) 衍生物，衍生试剂 Sylon-BFT 由含 1%TMCS (三甲基氯硅烷) 的 BSTFA (双三甲基硅三氟乙酰胺) 组成，添加 200  $\mu\text{l}$  此溶液至样品溶液中，70  $^{\circ}\text{C}$  下保温 45 min。衍生化重要的一点需要注意的是要考虑到样品的基质如何很好的与试剂进行反应。如果衍生化样品基质富含氨基酸，那么有必要加入少量样品或者更多的试剂进行反应，以补偿氨基酸对 Sylon-BFT 的消耗，还可能需要进行一些条件性实验。内标物 (ISTD) 为 2,6-二氨基-4-氯嘧啶 (DACP)，用于监测衍生化过程，糟糕的内标回收率预示着衍生化反应进行的不够完全，很有可能是由残留的水或活性基质引起的。

干燥的样品置于自动进样器小瓶里，加入 200  $\mu\text{l}$  吡啶和 100  $\mu\text{l}$  浓度为 0.5  $\mu\text{g/ml}$  的内标溶液。三聚氰胺和相关化合物被衍生化试剂 Sylon-BFT (Supelco) 转化为三甲基硅 (TMS) 衍生物，衍生试剂 Sylon-BFT 由含 1%TMCS (三甲基氯硅烷) 的 BSTFA (双三甲基硅三氟乙酰胺) 组成，添加 200  $\mu\text{l}$  此溶液至样品溶液中，70  $^{\circ}\text{C}$  下保温 45 min。衍生化重要的一点需要注意的是要考虑到样品的基质如何很好的与试剂进行反应。如果衍生化样品基质富含氨基酸，那么有必要加入少量样品或者更多的试剂进行反应，以补偿氨基酸对 Sylon-BFT 的消耗，还可能需要进行一些条件性实验。内标物 (ISTD) 为 2,6-二氨基-4-氯嘧啶 (DACP)。

本文采用的 GC/MS 系统是 PerkinElmer Clarus 500 GC/MS，仪器设置的参数总结于表 1 和表 2。GC 采用可程序升温的分流/不分流进样口，280  $^{\circ}\text{C}$  恒温。衬管采用 2 mm 内径的，进样体积为 0.5  $\mu\text{L}$ ，与溶剂在进样口衬管内膨胀体积相匹配，更大体积的进样量将导致溶剂由衬管中膨胀溢出，若溶剂膨胀体积超过衬管容积，色谱峰形会变差。

本文采用的优化的仪器分析条件用于分析大米蛋白质中的三聚氰胺，在这个分析案例中，有必要延长 GC 柱温箱程序以便于将三聚氰酸二酰胺和三聚氰胺从样品基质峰中分离出来。根据样品基质复杂程度的变化，可能需要修改 GC 分析条件以达到分析物与干扰基质之间的分离，达到更好分离效果的修正方法必须基于每种不同的基质。匹配不同基质分离的最好技术是将空白加标与样品加标对比。如果样品基质中的杂质峰流出时间不同于分析物的保留时间，就不需要对方法进行修改。当然，如果存在样品基质峰与目标分析物共流出现象，就需要对 GC 柱温升温条件进行修改以达到更好的分离。

在这个方法中，MS 扫描质量属范围为 50-450 u，全扫描方式采集质谱数据。质谱数据帮助所有分析物的定性确认。传输线和离子源的温度分别设为 280  $^{\circ}\text{C}$  和 230  $^{\circ}\text{C}$ 。将扣除了背景的高浓度标准品分析的质谱图作为化合物定性的参考。

气相色谱仪:	PerkinElmer Clarus 500 GC		
分析色谱柱:	Elite -5MS (30m*0.25mm*0.25 $\mu\text{m}$ )		
进样口类型:	PSSI		
进样口温度:	280 $^{\circ}\text{C}$		
进样方式:	不分流		
进样针容量:	5 $\mu\text{L}$		
进样体积:	0.5 $\mu\text{L}$		
进样速度:	快速		
载气类型:	He		
载气流速:	1 ml/min		
柱温程序:	温度	持续时间	速率
	100 $^{\circ}\text{C}$	1 min	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
	210 $^{\circ}\text{C}$	1 min	30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
	300 $^{\circ}\text{C}$	10 min	End
仪器时间事件:	-0.5 min	Spl1 = 0 mL/min	
	1.0 min	Spl1 = 50 mL/min	

质谱仪:	PerkinElmer Clarus 500 MS
GC 传输线温度:	280 $^{\circ}\text{C}$
离子源温度:	230 $^{\circ}\text{C}$
数据采集方式:	全扫描
全扫描范围:	50-450 u
溶剂延迟:	6 min
全扫描时间:	0.2 s
扫描时间间隔:	0.05 s

## 结论

如前所述，一旦检测到三聚氰胺或其类似物就表明该产品为掺假品，不得作为食品或食品添加剂非法出售。由于对食品行业存在潜在的经济影响，对人与动物的健康存在潜在威胁，测试数据必须有严格的质量控制 (QC) 以确保结果的准确性。除了高低浓度水平的标准样品测试，此方案的 QC 还包括溶剂空白、方法空白和样品加标：溶剂空白指嘧啶溶剂分析和衍生化试剂分析；方法空白指不加标样品经过提取过程后分析；样品加标包括低浓度和高浓度加标。尽管这是一个过与不过筛选式方案，仍然需要在样品批量分析前和后进行低浓度 (0.1 ug/mL) 和高浓度 (1.0 ug/mL) 校准样分析——用于确定半定量分析结果。图 1 为低浓度标样分析的色谱图。从图中可见，即使是低浓度水平，分析物响应仍然很显著——GC/MS 能够提供足够的灵敏度！

正如在实验描述部分讨论的，样品基质在进行掺假蛋白分析时会遇到非常广泛的干扰，因此必须修改 GC 柱温箱升温程序将三聚氰胺及相关目标化合物与干扰基质峰分离开来。另外一个降低基质影响的办法是提取少量样品。提取少量样品可以降低样品基质中高沸点化合物对 GC/MS 系统的影响。由于样品量减少，势必需要提高 GC/MS 的灵敏度来检测低浓度水平样品。SIFI (选择离子扫描与全扫描) 是一种 MS 数据采集方式，在此模式下，全扫描与选择离子扫描同时进行，这样不仅可以达到最大的灵敏度，还保持了全扫描数据的采集。本方法中全扫描方式已经提供足够的灵敏度，但是某些情况下可能需要更高的灵敏度，SIFI 就能满足。

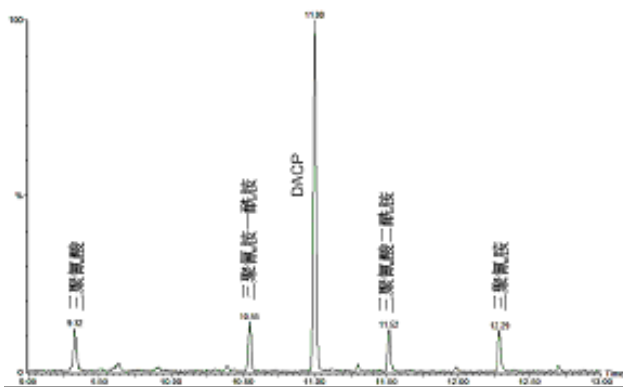


图 1. TMS-衍生化三聚氰胺及类似物加标 0.1 ug/ml 分析色谱图

本方法不仅分析了标准样品和 QC 样品，还分析了大量蛋白质原料样。图 2 是一张大米蛋白样品的分析图，其中掺假物呈现高浓度水平。在这个样品中存在很高浓度的污染，正好体现了之前讨论的 QC 程序的有效性。内标化合物 DACP 验证了衍生化反应已经进行完全，样品中 DACP 的峰面积与标准样中 DACP 峰面积相当。在这个分析案例中，标准样中 DACP 的平均峰面积为 643, 161，样品中 DACP 平均峰面积为 646, 585，表明衍生化反应已经进行完全。

在图 2 中该样品污染到色谱柱容量过载的程度，色谱柱容量过载可通过拖尾的色谱峰和及三聚氰胺与三聚氰胺一酰胺漂移的保留时间看出。此外，此样品需要重新进行提取分析，而且只能提取更少量样品是因为目标分析物的响应也超出了低浓度和高浓度的标样响应范围。相比其他目标类似物和样品基质三聚氰胺被检测出很低浓度水平，GC 的方法进行优化之后，三聚氰胺的峰可以完全从周围干扰峰中分离出来，易于辨认。加上与标准谱图的对照，可以帮助三聚氰胺的定性。图 3 显示了三聚氰胺标样质谱图与样品分析质谱图的对比，质谱图和保留时间都非常匹配。

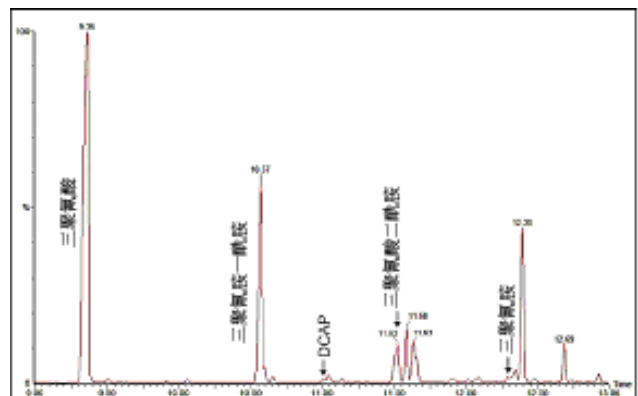


图 2. 大米蛋白粉末显示掺假物，三聚氰胺及其 4 种类似化合物大峰检出

## 结论

全世界范围内有大量蛋白原料被用于食品和饲料，而最近三聚氰胺及其类似物掺假蛋白促使了对蛋白食品和饲料成分更详细分析测试的需要。这个分析是非常重要的，它可以检测到一些通用的掺假物，与总氮测试相结合可以验证食品产品中真实的蛋白含量。

本文阐述了基于新出版的 U.S.FDA 方法建立的三聚氰胺及其类似物的分析方案，包括样品前处理和仪器分析技术。样品前处理包括溶剂萃取和衍生化，内标化合物作为基质衍生化过程指示剂验证衍生化反应是否进行完全。GC/MS 分析是一种半定量筛选方法，低浓度和高浓度标样支持样品分析。除标样分析外，多次空白基质加标分析用于整个测试的质量控制。Clarus GC/MS 系统可在全扫描模式下检测到低浓度加标掺假物，意味着可达到日常复杂样品基体筛选分析要求的预期灵敏度。

## 参考文献

1. <http://www.fda.gov/cvm/MenuFoodRecallFAQ.htm>
2. Barboza, David, "Another Chemical Emerges in Pet Food Case", New York Times, May 9, 2007。  
(<http://www.nytimes.com/2007/05/09/business/worldbusiness/09food.html?ex=1187409600&en=6cbd69b801ca5709&ei=5070>)
3. <http://www.fda.gov/cvm/MelaminePresence.htm>

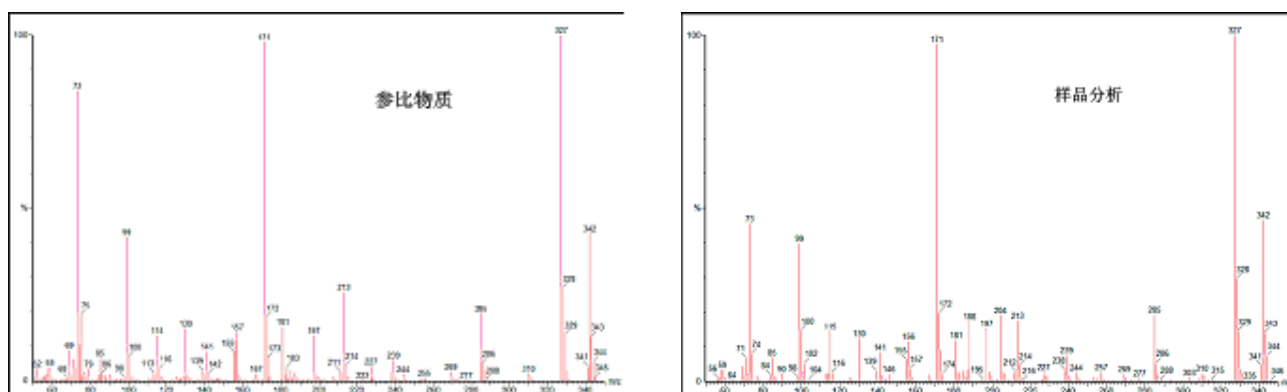


图 3. 标样与样品中三聚氰胺 (tri-TMS) 质谱图对比

PerkinElmer, Inc.  
940 Winter Street  
Waltham, MA 02451 USA  
电话: (800) 762-4000 或  
(+1) 203-925-4602  
[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)



要获取全球办事处的完整列表，请访问 [www.perkinelmer.com/lasoffices](http://www.perkinelmer.com/lasoffices)

©2007 PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。珀金埃尔默徽标和外观设计是珀金埃尔默有限公司的注册商标。SIFI 是珀金埃尔默有限公司及其子公司在美国或其它国家和地区的商标，Clarus 和 PerkinElmer 是珀金埃尔默有限公司及其子公司在美国或其它国家和地区的注册商标。文中提及的其它非珀金埃尔默有限公司及其子公司所有的其它商标均为其各自所有者的财产。珀金埃尔默保留随时更改此文档的权利，恕不另行通知。对于编辑、图片或排版错误概不承担任何责任。