

超高压液相色谱-串联质谱法测定腐竹、 米线、年糕中的乌洛托品

张爱芝, 张书芬, 王全林*, 沈 坚

(宁波市产品质量监督检验研究院, 宁波 315041)

摘要: **目的** 建立腐竹、米线、年糕中乌洛托品的超高压液相色谱-串联质谱分析方法。**方法** 样品经粉碎后, 用乙腈提取, MCX小柱净化, Waters ACQUITY™ UPLC BEH HILIC色谱柱分离, 最后在电喷雾正离子多反应监测模式下, 用超高压液相色谱-串联质谱仪进行分析。**结果** 乌洛托品在 1.00~100.00 μg/L 的范围内呈现良好的线性关系良好, 线性方程为 $Y=2391.11X+253.197$, R^2 大于 0.99。该方法检出限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)分别为 0.30 μg/kg 和 1.00 μg/kg。在 1.00、10.00、50.00 μg/kg 三个添加水平下, 乌洛托品平均回收率为 82.0%~107.0%, 相对标准偏差为 6.3%~15.6%。**结论** 该方法操作简便、检出限低, 能够满足腐竹、米线、年糕中乌洛托品检测的要求。

关键词: 腐竹、米线、年糕; 超高压液相色谱-质谱/质谱; 正离子模式

Determination of urotropine in dried beancurd stick, rice flour and rice pastry by ultra pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry

ZHANG Ai-Zhi, ZHANG Shu-Fen, WANG Quan-Lin*, SHEN Jian

(Ningbo Academy of Product Quality Supervision & Inspection, Ningbo 315041, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of urotropine in dried beancurd stick, rice noodle and rice pastry by ultra pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were ground and extracted by acetonitrile, further purified by MCX solid phase extraction column, and separated by Waters ACQUITY™ UPLC BEH HILIC column. The target compound was detected by UPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode with positive electrospray ionization. **Results** The method showed a good linearity at the range of 1.00~100.00 μg/L for urotropine with $R^2 > 0.99$. The limits of detection (LOD) was 0.30 μg/kg and the limits of quantification (LOQ) was 1.00 μg/kg for urotropine. Average recoveries of urotropine varied from 82.0% to 107.0% with relative standard deviations of 6.3%~15.6% at three fortification levels of 1.00, 10.00 μg/kg and 50.00 μg/kg. **Conclusion** This method has the advantages of simple pretreatment, low detection limit and it is suitable for the determination of urotropine in dried beancurd stick, rice flour and rice pastry.

KEY WORDS: dried beancurd stick, rice flour, rice pastry; ultra pressure liquid chromatography-electrospray

*通讯作者: 王全林, 教授级高工, 主要研究方向为食品安全检测技术及标准化。E-mail: quanlinwang@163.com

*Corresponding author: WANG Quan-Lin, Professional Senior Engineer, Ningbo Academy of Product Quality Supervision & Inspection, No.1588, Jiangnan Road, Gaoxin District, Ningbo 315041, China. E-mail: quanlinwang@163.com

tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS); positive mode

乌洛托品, 学名六亚甲基四胺, 结构式见图 1, 是一种白色吸湿性结晶粉末或无色有光泽的菱形晶体。医学研究表明, 皮肤反复接触乌洛托品后会出现湿疹性皮炎、过敏性接触性皮炎等疾病, 而且乌洛托品在酸性溶液中能分解释放出甲醛, 具有一定的致癌作用^[1], 所以一直被作为非法添加物禁止在食品中使用。国家卫生部最新公布的食品中可能违法添加的非食用物质名单, 明确禁止将乌洛托品用于腐竹、米线等食品中。

近年来随着国家对腐竹生产厂家违禁添加吊白块行为的严厉打击, 一些不法腐竹生产厂家改变配方, 违禁使用乌洛托品替代吊白块的作用, 以起到保持产品的色泽和延长保质期等目的^[2,3], 严重危害着消费者的身体健康。从国内外最新的研究成果来看, 目前, 文献报道的乌洛托品的检测方法主要有滴定法、气相色谱法、分光光度法和液质联用法等方法^[4-14], 研究多集中在乌洛托品片中乌洛托品纯度的检测, 涉及到腐竹、米线、年糕等食品中乌洛托品的检测方法报道较少^[5,15]; 标准方面, 仅有标准 S N/T 2226-2008 (进出口动物源性食品中乌洛托品残留量的检测方法液相色谱—质谱/质谱), 适用于鸡肉、鸡肝脏、鸡肾脏和猪肉中乌洛残留量的检测和确证^[14], 尚无腐竹类食品中乌洛托品检测的国家、地方标准。因此, 为加强该类食品的安全监管, 保护消费者利益, 开展腐竹类食品中乌洛托品检测方法的研究具有十分重要的意义。

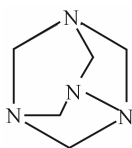


图 1 乌洛托品的结构式

Fig.1 Constitutional formulas of urotropine

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

ACQUITY™ 超高压液相色谱仪、Quattro Premier XE 质谱仪(美国 Waters 公司); 超声波清洗器(宁波海曙超声仪器公司); TGL-20M 高速台式冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); SC-8L-150 数控固相萃取仪(广州智真生物科技有限公司); CM-24 氮吹仪(北京成萌科技有限公司)。

乌洛托品标准品(购于 Sigma, 纯度 > 99.0%)

甲醇、乙腈为色谱纯(德国 Merck 集团); 实验用水均为超纯水(Millipore 公司超纯水器制备, 电阻率为 18.2 MΩ·cm); 甲酸铵为优级纯; 乙酸铵、正己烷为分析纯。

乌洛托品标准溶液配制: 称取 0.0100 g 乌洛托品标准品于 10.00 mL 容量瓶中, 配制成 1.00 mg/mL 乌洛托品标准储备液于 0℃~4℃ 冰箱避光保存, 可使用 6 个月。

1.2 色谱质谱条件

超高压液相色谱条件 色谱柱: Waters ACQUITY™ UPLC BEH HILIC 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 柱温: 40℃; 样品温度: 20℃; 进样体积: 10 μL; 流动相 A 为 10 mmol/L 甲酸铵, 流动相 B 为乙腈, 70% B (v/v) 等度洗脱。

质谱条件 离子源: 电喷雾电离(ESI⁺); 毛细管电压: 3.50 kV; 射频透镜 1(RFlens 1)和射频透镜 2(RFlens 2)的电压分别为 13.0 V 和 13.0 V; 离子源度: 120℃; 脱溶剂温度: 350℃; 脱溶剂气流量: 600 L/h。采用 MRM 监测模式, 质谱优化采集参数见表 1。

1.3 试样前处理

称取 5.00 g 粉碎样品, 准确至 0.01 g, 置于 50

表 1 乌洛托品的质谱采集参数
Table 1 MS parameters for urotropine

化合物	保留时间(min)	母离子[M+H] ⁺ (m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(V)
			(碰撞电压)(V)	
乌洛托品	3.08	141.0	111.8(13.00)*; 97.8(12.00)	40.00

注: *下划线离子为定量离子

mL 具塞塑料离心管中。然后加入 10 mL 乙腈溶液, 涡旋混匀 1 min, 超声提取 30 min, 10000 r/min 离心 10 min。取出, 准确移取 5.00 mL 于玻璃离心管中, 待净化。

将 MCX 固相萃取小柱用 5 mL 乙腈活化, 待净化液全部上样, 用 6 mL 5% 氯化甲醇洗脱, 洗脱液在 50 °C 条件下 N₂ 吹干, 最后用 1 mL 乙腈-水(70:20, v/v) 溶解, 漩涡混匀 1 min, 超声 2 min, 漩涡混匀 1 min, 过 0.22 μm 滤膜, 上机分析。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 提取剂的选择

乌洛托品溶于水、乙醇和氯仿等, 不溶于乙醚、正己烷等有机溶剂。文中比较了甲醇、乙腈、水、20 mmol/L 乙酸铵等提取剂对乌洛托品的提取效果。实验发现以水、乙酸铵进行提取提取液非常浑浊, 以甲醇和乙腈为提取剂提取效果较好, 但从结果可以看出以甲醇为提取剂, 提取液颜色较深, 提取出来的杂质较多, 因而本文选用乙腈为提取剂, 实验结果与^[13]结果相符。

2.1.2 净化过程

在提取过程中, 腐竹、米线、年糕等的一些化合物会同目标化合物一同被提取出来, 这些化合物在 UPLC/MS/MS 分析测定离子化的过程中会与目标化合物产生竞争, 影响目标化合物的离子化效率, 从而影响目标化合物的响应灵敏度。因而, 需对提取液进行净化。SN/T 2226-2008^[14]适用于动物源食品中乌洛托品的检测, 采用正己烷及 MCX 固相萃取柱对动物源食品提取液进行净化, 提取液要先经过浓缩、溶解、小柱活化等一系列步骤。实验详细考察了正己烷、MCX 小柱净化的效果, 发现只用正己烷净化存在一定的基质干扰, 而用 MCX 进行净化时不需经过浓缩溶解等一系列步骤, MCX 用乙腈活化后将提取液上固相萃取柱, 后用 5% 氯化甲醇进行洗脱即可获得较好的净化效果。实验前处理优化条件见 1.3 节。

2.2 超高压液相色谱-质谱条件的优化

2.2.1 电离模式的选择

从乌洛托品的分子结构式来看, 乌洛托品结构中含有四个氮, 属于富电子结构, 表明乌洛托品适于

采用正离子电离模式进行分析。在流动相体系下, 采用流动注射泵连续进样, 进行质谱条件的优化, 确定乌洛托品的锥孔电压、碰撞电压、离子源温度、去溶剂气温度及流量、碰撞气流量及定性定量离子等质谱参数, 使样液中乌洛托品的离子化效率达到最佳, 获得的最佳质谱条件如表 1 所示。

2.2.2 流动相的选择

流动相的组成不仅会影响目标化合物的保留时间和峰形, 还会影响目标化合物的离子化效率, 从而最终影响灵敏度。液质联用流动相的基础体系是甲醇-水及乙腈-水体系。为提高离子化效率, 采用负离子电离模式时通常选用乙腈-水体系而采用正离子模式时通常采用甲醇-水体系, 实验考察了两种流动相体系对目标化合物响应灵敏度的影响, 发现在两种流动相体系下目标物的响应强度相差不大, 但以甲醇-水体系为流动相时柱压较高, 同时综合考虑到提取剂是乙腈, 因而实验选用乙腈-水作为流动相体系。无论是以甲醇-水还是乙腈-水作为流动相, 乌洛托品峰宽都较宽。甲酸铵、乙酸铵等缓冲盐在液质联用中常用于改善峰型, 实验详细比较了甲酸铵和乙酸铵的加入对乌洛托品峰型及灵敏度的影响, 结果表明流动相体系中无论是甲酸铵还是乙酸铵的加入都可以显著地改善峰型, 但甲酸铵的加入不仅可以改善峰型, 还可以提高目标化合物的离子化效率。因而, 实验选用在流动相体系中添加甲酸铵。实验同时也优化了甲酸铵的用量, 结果表明甲酸铵的用量为 10 mmol/L 时, 不仅可以得到较好的峰型还可以获得较高的灵敏度。实验最终采用乙腈-10 mmol/L 甲酸铵作为流动相并详细优化了洗脱梯度, 结果表明在 70% 乙腈-10 mmol/L 甲酸铵(v/v) 等度洗脱时, 5 min 内即可完成对乌洛托品的分析测定。图 2 是在选定的实验条件下, 同一标准溶液连续进样 6 次时乌洛托品的总离子流叠加图, 变异系数为 3.3%, 表明在优化条件下, 方法是稳定的。图 3 是乌洛托品标准溶液的 MRM 色谱图。依据选定的实验方法, 我们测试了加标样品(图 4, 加标 10.00 μg/kg)中目标物的 MRM 色谱图。可以看出, 乌洛托品在实际样品测定中不受复杂样品基质的干扰。

2.3 检出限、定量限

向阴性样品中逐级降低加标浓度来确定检出限(LOD)和定量限(LOQ)。以 3 倍信噪比(S/N=3)对应的

目标物浓度作为检出限, 以 10 倍性噪比($S/N=10$)对应的目标物浓度作为定量限, 得到乌洛托品的方法检出限和定量限分别为 $0.30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.4 校准曲线、回收率及精密度

配制乌洛托品质量浓度为 $1.00\sim 100.00 \mu\text{g}/\text{L}$ 的系列混合标准溶液。以目标组分的峰面积 Y 对相应的质

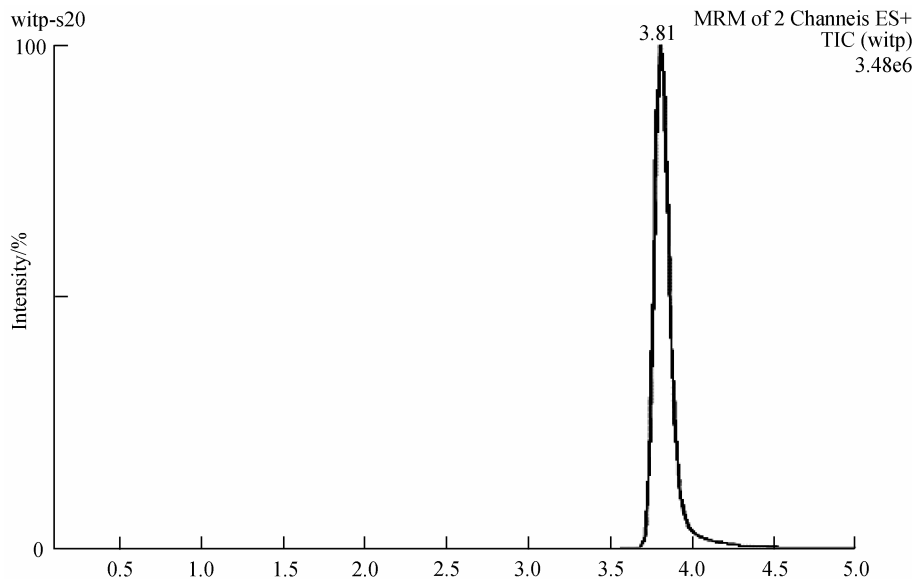


图 2 方法稳定性

Fig. 2 Stability of the method

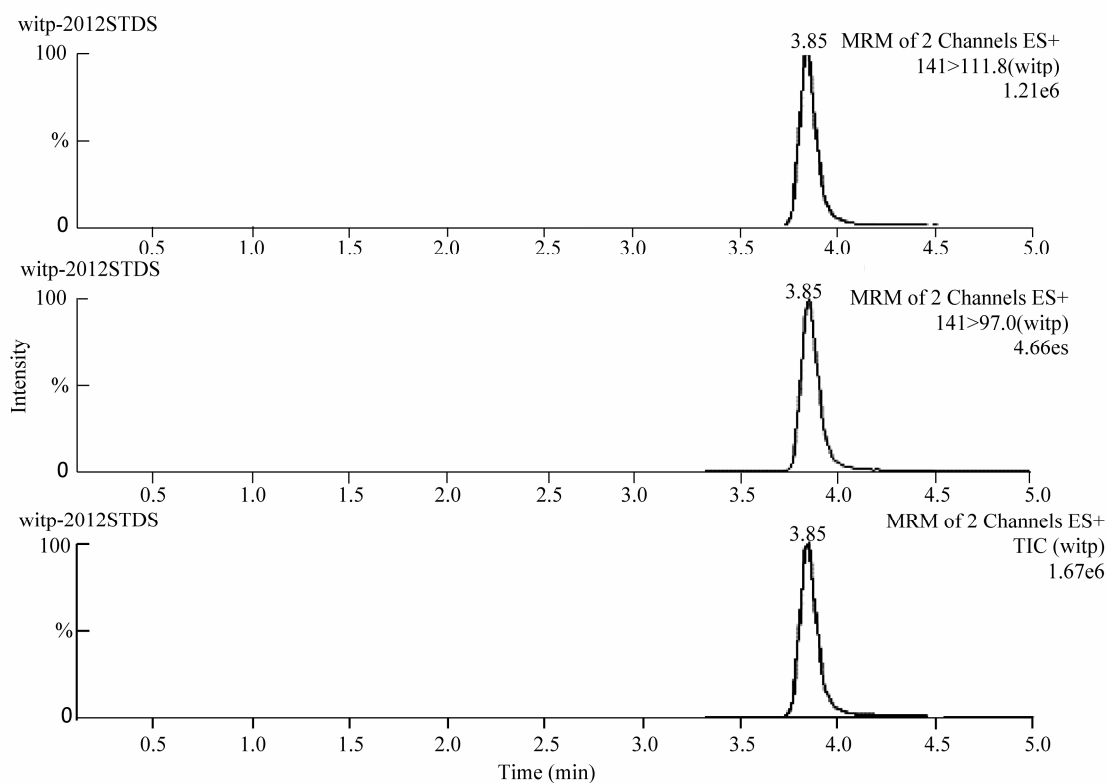


图 3 标准溶液 MRM 色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of standard solution of urotropine

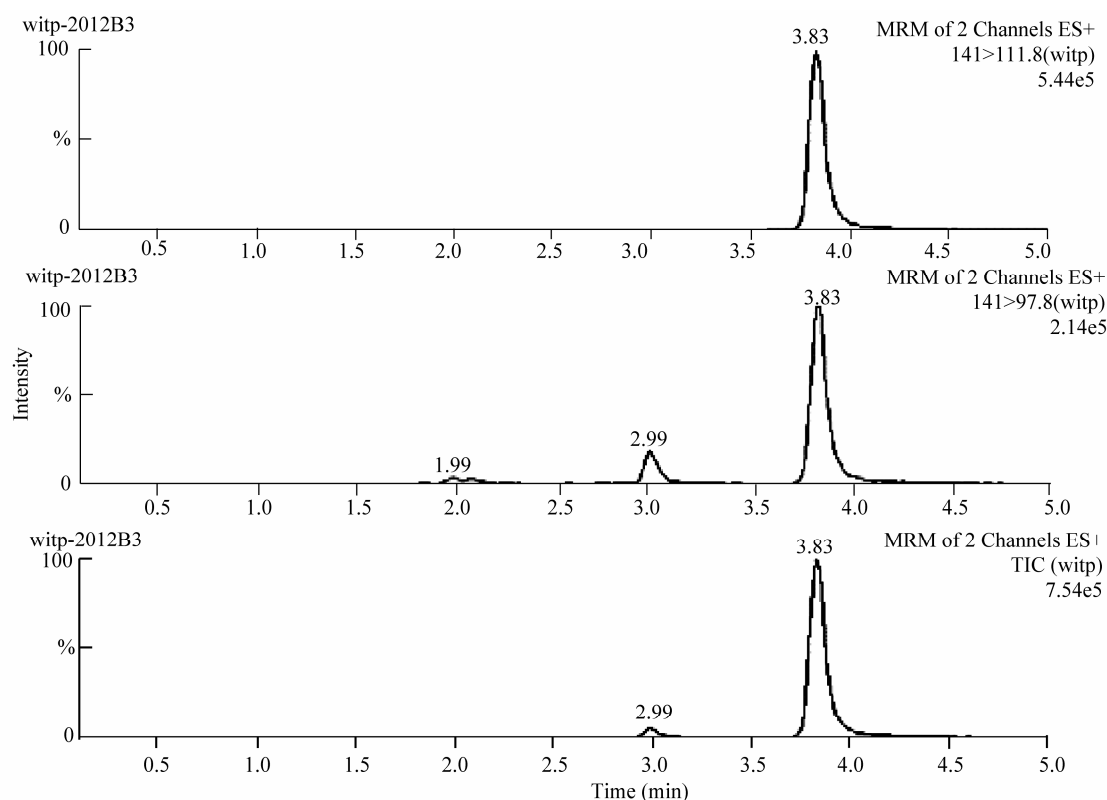


图 4 腐竹加标样品的色谱图(乌洛托品的加标浓度为 10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Fig. 4 Chromatograms of dried beancurd stick spiked sample containing 10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of urotropine

表 2 不同添加水平下乌洛托品的加标回收率、相对标准偏差($n=6$)

Table 2 Average recoveries and relative standard of urotropine in dried beancurd stick, rice noodle and rice pastry at different fortification levels($n=6$)

化合物	添加水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定平均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD(%)	回收率(%)
腐竹	1.00	1.05	12.0	105.0
	10.00	8.20	7.6	82.0
	50.00	44.00	6.3	88.0
米线	1.00	1.07	13.2	107.0
	10.00	8.57	8.9	85.7
	50.00	45.10	7.3	90.2
年糕	1.00	0.98	15.6	98.0
	10.00	9.02	8.7	83.7
	50.00	48.07	6.5	95.1

量浓度 $X(\mu\text{g}/\text{L})$ 做标准曲线, 线性关系为 $Y=2391.11X+253.197$, $R^2=0.9994$, 大于 0.99, 截距斜率之比小于 0.1, 表明乌洛托品在质量浓度 1.00~100.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 内具有较好的线性关系, 且无背景干扰。表 2 是添加水平

为 1.00、10.00、50.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时的回收率及精密度。由数据可以看出, 乌洛托品在三种添加水平下平均回收率为 82.0%~107.0%, 相对标准偏差为 6.3%~15.6%, 能够满足残留检测需要。

3 结 论

本文建立了腐竹、米线、年糕中乌洛托品的UPLC-MS/MS的分析方法。实验系统考察了提取溶剂、提取方法、净化方法对测定结果的影响,最终选用乙腈超声提取、MCX固相萃取小柱净化;详细优化了超高压液相色谱-质谱/质谱(UPLC-MS/MS)法的仪器条件,在正离子采集模式下以多反应检测模式进行分析;在三个添加水平下对腐竹、米线及年糕进行检测,平均回收率为82.0%~107.0%。本方法操作简便、分析时间短、检出限低,有一定的实际应用价值。

参考文献

- [1] 杨彦俊,康旺祥,王晓芸,等. 乌洛托品致职业性皮炎 15 例[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2010, 13(11): 1696-1697.
Yang YJ, Kang WX, Wang XJ, *et al.* 15 cases occupational dermatitis caused by urotropine [J]. *Chin J Coal Ind Med*, 2010, 13(11): 1696-1697.
- [2] 吴艳波. 腐竹的营养功效及鉴别技巧[J]. 现代农业科技, 2011, (8): 337-339.
Wu YB. The nutritional benefits and identification skills of Yuba [J]. *Mod Agr Sci Technol*, 2011, (8): 337-339.
- [3] 刘晓毅,穆同娜,田艳玲,等. 面粉、腐竹中甲醛本底的分析[J]. 粮油加工与食品机械, 2006, (6): 62-63, 69.
Liu XY, Mu TN, Tian YL, *et al.* Analysis the background effect of the formaldehyde in flour and yuba [J]. *Machin Cereals oil Food Proces*, 2006, (6): 62-63, 69.
- [4] 马昌. 非水滴定法测定乌洛托品含量的实验研究[J]. 青海师范大学民族师范学院学报, 2001, (1): 66-67.
Ma C. Determination of content of methenamine by non-aqueous titration method [J]. *J Minorities Teach College Qinghai Teach Univ*, 2001(1): 66-67.
- [5] 黄国春. 气相色谱法测定腐竹中乌洛托品含量的研究[J]. 广西轻工业, 2008, (6): 26-27.
Huang GC. Determination of the urotropine content in dry bean-curd stick by gas chromatography [J]. *Guangxi J Light Ind*, 2008, 6(6): 26-27.
- [6] 李薇,陈天科,徐辉,等. 乌洛托品的气相色谱分析[J]. 分析仪器, 2007, (3): 29-31.
Li W, Chen TK, Xu H, *et al.* Gas chromatographic analysis of Urotropine [J]. *Anal Instrum*, 2007, (3): 29-31.
- [7] GB/T 23296.26-2009 食品接触材料高分子材料 食品模拟物中甲醛和六亚甲基四胺的测定分光光度法[S].
GB/T 23296.26- 2009 Food contact materials-Polymer-Determination of formaldehyde and hexamethylenetetramine in food stimulants- Spectrophotometry [S].
- [8] 朱晓艳,陈少鸿,刘在美,等. 乙酰丙酮分光光度法测定塑料中甲醛和六亚甲基四胺在食品模拟物中的迁移量[J]. 食品科学, 2009, (12): 172-174.
Zhu XY, Chen SH, Liu ZM, *et al.* Acetylacetone spectrophotometric determination of migration of formaldehyde and hexamethylenetetramine from plastics into food stimulants [J]. *Food Science*, 2009, 30(12): 172-174.
- [9] 陈少鸿,刘在美,朱晓艳,等. 变色酸分光光度测定塑料中甲醛和六亚甲基四胺在食品模拟物中的迁移量的改进方法[J]. 食品科技, 2009, (4): 259-261.
Chen SH, Liu ZM, Zhu XY, *et al.* Developed test method of migration of formaldehyde and hexamethylene-tetramine from plastics into food stimulants by spectrophotometry with chromotropic acid [J]. *Food Sci Technol*, 2009, 30(4): 259-261.
- [10] 辛志伟,臧志和,赵小玉,等. 分光光度法测定乌洛托品的含量研究[J]. 数理医学杂志, 2001, 14(6): 569.
Xin ZW, Zang ZH, Zhao XJ, *et al.* Determination of the content of methenamine by spectrophotometric method [J]. *J Math Med*, 2001, 14(6): 569.
- [11] 李莉,张钢平. 高效液相色谱法测定乌洛托品片的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2009, (4): 335-336.
Li L, Zhang GP. Determination of methenamine tablets by High performance liquid chromatography[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2009, (4): 335..
- [12] 陈方平,陈金身,孙保帅,等. 离子电极法测定乌洛托品含量的新方法[J]. 郑州工业高等专科学校学报, 2001, 17(4): 21-22.
Chen FP, Chen JS, Sun BS, *et al.* New method on measuring the content of urotropine by electrolytic electrode method[J]. *J Zhengzhou Polythnic Inst*, 2001, 17(4): 21-22.
- [13] 魏小平. 一种检测微量乌洛托品的新方法[J]. 桂林工学院学报, 2005, 25(4): 556-558.
Wei XP. New method for polarographic determination of micro amount of methenamine based on nitrosation reaction[J]. *J Guilin Inst Technol*, 2005, 25(4): 556-558.
- [14] SN/T 2226-2008 进出口动物源性食品中乌洛托品残留量的检测方法液相色谱-质谱/质谱法 [S]. SN/T2226-2008 Determination of urotropine residue in foodstuffs of animal origin for import and export-LC-MS/MS method [S].

[15] 洗燕萍, 陈立伟, 罗东辉, 等. UPLC-MS/MS 测定腐竹和米粉中的乌洛托品[J]. 江南大学学报(自然科学版), 2012, (11): 78-82.

Xian YP, Chen LW, Luo DH, *et al.* Determination of Urotropine Residue in Dried Beancurd Stick and Rice Flour by Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry [J]. J Jiangnan Univ (Natural Science Edition), 2012, 11(1): 78-82.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



张爱芝, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。

zhangaizhi1981@163.com



王全林, 博士, 教授级高工, 主要研究方向为食品安全检测技术及标准化。

E-mail: quanlinwang@163.com

“应对食品安全突发事件的管理实践”专题约稿

近年来, 食品安全得到了国家越来越多的重视, 《中华人民共和国食品安全法》也于 2009 年颁布。但我国的食品安全问题仍较严重。2011 年出现的“染色”馒头、“瘦肉精”、“金黄色葡萄球菌”, 2012 年出现的立顿茶等多个食品安全事件, 引起了公众对食品安全问题的恐慌。在食品安全事件发生时, 亟需相关部门迅速作出反应, 用正确的知识引导公众, 并及时对违法、违规行为作出相应的处罚。

鉴于此, 本刊特别策划了“应对食品安全突发事件的管理实践”专题, 围绕**食品安全突发事件发生时的应对措施、发生后的控制、相关的经验总结**等问题展开讨论, 计划在 2013 年下半年出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在**2013 年 6 月 30 日**前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部