

豆制品和粉干中乌洛托品的气质联用测定

徐小民, 黄百芬, 任一平*

(浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051)

摘要: 目的 建立豆制品和粉干中乌洛托品的气质联用(GC-MS)测定方法。方法 样品中乌洛托品经三氯乙酸水溶液提取、阳离子交换柱净化后 GC-MS 测定。结果 该方法的线性范围为 0.1~5 mg/kg, 相关系数 r 为 0.998; 检出限为 0.05 mg/kg; 回收率为 78.5%~97.0%; 相对标准偏差(RSD)为 5.7%~10.9%。结论 该方法准确、操作简单, 可用于实际样品中乌洛托品的含量测定。

关键词: 乌洛托品; 气质联用(GC-MS); 豆制品; 粉干

Determination of urotropine in soybean products and cereal noodles by gas chromatography-mass spectrometry

XU Xiao-Min, HUANG Bai-Fen, REN Yi-Ping*

(Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

ABSTRACT: Objective To establish a qualitative and quantitative method for the determination of urotropine in soybean products and cereal noodles by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Methods** The sample was extracted by 1.5% trichloroacetic acid aqueous solution. After purified by cation exchange cartridge, the sample solution was detected by GC-MS. **Results** The method showed a good linearity over the range of 0.1~5 mg/kg with relative coefficient $r = 0.998$. The recovery was 78.5%~97.0% with relative standard deviation (RSD) of 5.7%~10.9%. The limit of detection was 0.05 mg/kg. **Conclusion** The method is accurate and easy to operate. It is suitable for the determination of urotropine in real sample.

KEY WORDS: urotropine; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); soybean products; cereal noodles

1 引言

乌洛托品(urotropine), 又名六亚甲基四胺(hexamethylenetetramine), 工业上主要用作树脂和塑料的固化剂、氨基塑料的催化剂和发泡剂、橡胶硫化的促进剂(促进剂 H)、纺织品的防缩剂等。医学上可用作泌尿系统的消毒剂, 其 20% 的溶液可用于治疗腋臭、汗脚、体癣等。一些不法商贩将其违法添

加到腐竹、米线等食品中用作防腐剂, 因此于 2010 年 3 月被全国食品安全整顿工作办公室列入食品中可能违法添加的非食用物质名单(第四批)^[1]。乌洛托品为白色细粒状结晶, 味初甜后苦, 分子式为 $C_6H_{12}N_4$, 氮元素比例占到 40%, 与三聚氰胺的 66.67% 较为接近, 也是一种潜在的蛋白质掺假物质。食品中乌洛托品检测方法的建立成为控制其违法添加的关键。

基金项目: 公益性行业科研专项-“双打”专项(2012104003-6)

Fund: Supported by the Public Welfare Scientific Research Project (2012104003-6)

*通讯作者: 任一平, 教授级高工, 主要研究方向为食品安全检验。E-mail: renyiping@263.net

*Corresponding author: REN Yi-Ping, Professor, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, No. 630, Xincheng Road, Hangzhou 310051, China. E-mail: renyiping@263.net

文献中乌洛托品的检测方法主要在水^[2,3]和药物制剂^[4,5]等两个方面,对于基体相对复杂的食品中的检测方法研究较少。黄国春报道了用三氯甲烷提取、气相色谱氢火焰离子化检测器检测腐竹中乌洛托品^[6],方法检测限为0.7 mg/kg。该法用到了大量的有毒溶剂,对环境和操作者的危害较大。SN/T 2226-2008采用乙腈提取、液质联用(LC-MS/MS)法检测动物源性食品中的乌洛托品^[7]。

乌洛托品属于多环叔胺结构(图1),易与食品基体中的蛋白质、碳水化合物等相互作用,影响其提取效率。乌洛托品的提取溶剂主要是含质子的甲醇、乙醇、氯仿、水等,实验中尝试采用三氯乙酸溶液来提取和沉淀蛋白质;用阳离子交换固相萃取的方法来净化,避免用到大量的有机溶剂。

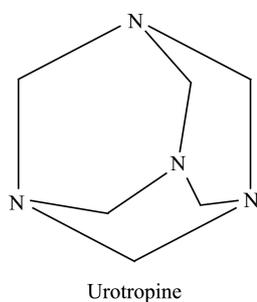


图1 乌洛托品结构式
Fig. 1 Structure of urotropine

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

安捷伦 6890N GC-5973i MSD 气质联用仪(GC-MS)购自美国安捷伦科技公司。

乌洛托品(加拿大 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度大于99%); 甲醇、乙酸乙酯(色谱纯,美国 TEDIA 公司); 超纯水(美国 Millipore system 公司); Cleanert PCX 阳离子交换柱(60 mg/3mL, 天津艾杰尔科技公司); 三氯乙酸、氨水为分析纯。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液

准确称取标准品 10 mg(精确到 0.01mg),用甲醇溶解并定容到 10 mL,得到浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液。取此储备液用甲醇逐级稀释,得到浓度为 1 μg/mL 的标准使用溶液,按一定比例稀释配制标准系列,绘制标准曲线。

2.2.2 样品前处理

本文所涉及的样品包括豆制品(包括豆腐干、豆腐皮、腐竹等)和粉干(米粉、红薯粉、绿豆粉、豌豆粉、荞麦粉、玉米粉、方便面饼等)两大类,均购自当地超市或农贸市场。

用搅碎机将样品充分搅碎均匀,装入洁净容器中,密封,于-18℃以下冷冻存放。

2.2.2.1 提取

腐竹和豆腐皮等高蛋白类样品:准确称取约 1 g 样品(精确到 0.001g),置于 50 mL 具塞比色管中,加入 5 mL 80℃的热水,摇匀后浸泡溶胀 10 min,用 1.5% 三氯乙酸水溶液定容至 25 mL,用组织匀浆机充分匀浆后超声提取 5 min,提取液倒入 50 mL 聚丙烯离心管,10000 r/min 离心 10 min(温度低于 15℃),取上清液 5 mL 用于固相萃取。

粉干等高淀粉类样品:准确称取约 1 g 样品(精确到 0.001 g),置于 50 mL 具塞比色管中,加入 1 g 阴性腐竹,加入 5 mL 80℃的热水,之后的操作同高蛋白类样品。

2.2.2.2 净化

60 mg/3 mL 的阳离子交换柱先依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化,以约每秒 1 滴的速度将 5 mL 上清液过柱,待提取液流完后依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗涤柱子并弃去,最后用 3 mL 5% 氨水/甲醇(v/v)洗脱乌洛托品并收集洗脱液,于 45℃氮气吹干后加入 0.4 mL 甲醇,混匀溶解残渣后加入 0.6 mL 乙酸乙酯,混匀,3000 r/min 离心 5 min,上清液待 GC-MS 测定。

2.2.3 仪器条件

GC-MS: 进样口和传输管温度分别为 230 和 260℃。氦气为载气,流量为 1.0 mL/min; 离子源和四级杆温度分别为 230℃和 150℃; 电子能量为 70 eV; 质量扫描范围在 25~350 amu; 溶剂延迟时间为 4 min; 选择离子模式(SIM)监测,定量离子 m/z 140, 定性离子 m/z 141、112 和 42; 色谱柱采用 30 m 的 DB-5ms 柱(0.25 mm i.d., 0.25 μm df), 程序升温: 50℃, 2 min; 5℃/min; 125℃, 0 min; 40℃/min; 260℃, 0 min; 柱后(post run)280℃, 5 min; 不分流进样 1 μL。

3 结果与分析

3.1 乌洛托品质谱图

乌洛托品的特征离子包括 m/z 140、141、112、85

和42(图2)。采用分子离子 m/z 140 为定量离子, m/z 141、112 和 42 为辅助定性离子。虽然 m/z 85 的丰度比 141 高, 但是其受基体的干扰较大, 实际样品检测中不适合作为定性离子。 m/z 42 虽然基体干扰较大, 但其丰度较高, 与 m/z 140 接近, 仍然选择作为辅助定性离子。

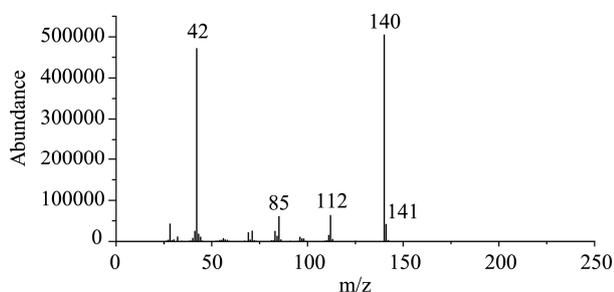


图2 乌洛托品的全扫描质谱图

Fig. 2 Full scan mass spectrum of urotropine

3.2 样品前处理方法

乌洛托品属于极性小分子化合物, 叔胺结构使得只有含质子的溶剂, 如水、甲醇、乙醇、氯仿等, 才能将其从复杂的样品基体中提取出来。考虑到氯仿的毒性, 实验中不考虑作为提取溶剂; 而是选择乙酸乙酯、乙腈、丙酮和甲醇分别提取, 挥干溶剂后过阳离子交换柱净化, 前三种溶剂提取时回收率均低于 50%, 用甲醇时回收率可达 50%~60%, 但基体干扰很大, 且下一步用阳离子交换柱净化时容易堵塞柱子。

SN/T 2226-2008 中的样品基体均为新鲜的动物性食品, 其中含有一定的水分, 且基体易于均质分散, 所以可以采用乙腈来提取, 但实际起作用的还是里面含有的水分。本文所选择的基体均为干物质, 很难用乙腈直接提取。最终采用 1.5%三氯乙酸水溶液提取, 不仅可以沉淀基体中的蛋白质, 还可以将乌洛托品转变成铵盐溶解到水里, 在避免用到有机溶剂的情况下, 腐竹等高蛋白基体中回收率可以达到 70%~120%。但是对于高淀粉类的粉干基体, 该方法的

回收率低于 60%, 参考腐竹等高蛋白基体中能得到较好回收率的现象, 实验中尝试在 1 g 粉干中分别加入 0、0.5、1、1.5 g 阴性腐竹, 进行加标回收实验, 在阴性腐竹的加入量超过 1 g 后, 粉干等的加标回收率可以超过 70%(图 3)。其原因可能是蛋白基质的加入削弱了乌洛托品与高淀粉基质中羟基的相互作用, 从而提高了其在三氯乙酸提取液中的溶解能力。

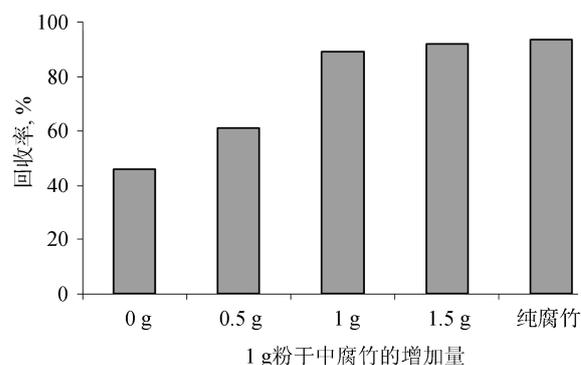


图3 粉干(1 g)中添加不同量的阴性腐竹时乌洛托品的回收率

Fig. 3 Recovery of urotropine in cereal noodle addition of negative yuba

提取液过柱净化前虽然进行了高速离心, 但仍然可能无法得到澄清的溶液, 所以阳离子交换柱尽量选择填充略为松散, 或者粒径较大者, 以不堵塞柱子为准, 尽量不要抽真空。

3.3 方法学验证

由于乌洛托品的两个定性离子 m/z 141 和 112 的丰度只有定量离子 m/z 140 的约 1/10, 为确保方法定性的准确性, 采用 10 倍噪声时定量离子的响应值为检出限, 按样品提取净化方法, 最低检出浓度为 0.05 mg/kg, 线性范围为 0.1~5 mg/kg, 相关系数为 0.998。样品在 0.1、0.5、2 mg/kg 加标浓度下的回收率和相对标准偏差(RSD)见表 1, 回收率为 78.5%~97.0%, RSD 为 5.7%~10.9%。

表1 乌洛托品在阴性腐竹和粉干中的加标回收率和相对标准偏差(RSD)($n=6$)
Table 1 Recovery and RSD of urotropine in negative yuba and cereal noodle ($n=6$)

样品	加标浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
腐竹 Dried bean curd sheet roll	0.10	83.6	8.3
	0.50	92.5	6.2
	2.00	97.0	5.7
粉干 cereal noodle	0.10	78.5	10.9
	0.50	80.6	7.4
	2.00	91.0	7.1

3.4 样品检测结果

实验中分别对豆制品(包括豆腐干、豆腐皮、腐竹等)和粉干(米粉、红薯粉、绿豆粉、豌豆粉、荞麦粉、玉米粉、方便面饼等)可能添加乌洛托品的两大类样品基体进行检测分析,乌洛托品均未检出。在方法检测限内,上述基体均不存在基体干扰(图4),能够满足实际样品的日常检测。

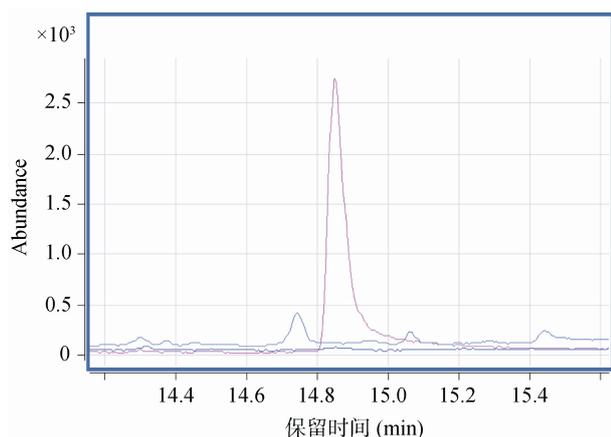


图4 乌洛托品标准品(50 ng/mL, 14.82 min)、粉干和腐竹基体的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of urotropine in standard solution (50 ng/mL), cereal noodles and dried bean curd sheet rolls

4 结论

乌洛托品特殊的分子结构增加了其在高蛋白或高淀粉类食品等复杂基体中的检测难度,本文采用三氯乙酸溶液有效去除了基体中蛋白质的干扰;在高淀粉基体中加入蛋白类基体用于破坏乌洛托品与基体间的较强结合力,有效地提高了此类基体中乌洛托品检测的回收率;在避免用到大量有毒有害有机溶剂的前提下实现了复杂基体中乌洛托品的定性定量检测。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第四批), 2010, 3.
Ministry of Public Health, China. Possible illegal added non-edible substance and abusive food additives (IV), 2010, 3.
- [2] Koga M, Shinohara R, Akiyama T. Gas chromatographic determination of trace amounts of hexamethylenetetramine in water using an iodine charge-transfer complex [J]. *Anal Sci*, 1985, 1: 381-384.
- [3] 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. A new method for the determination of trace amounts of urotropine [J]. *Chin J Guilin Univ Technol*, 2005, 25 (4): 556-558.
- [4] 步雪, 张作华, 周锦勇. 反相 HPLC 法测定乌洛托品合剂的含量[J]. 药学实践杂志, 1996, 14(1): 49-50.
Bu X, Zhang ZH, Zhou JY. Determination of urotropine mixture by reverse HPLC [J]. *Chin J Pharm Pract*, 1996, 14(1): 49-50.
- [5] 李薇, 陈天科, 徐晖, 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]. *Chin J Anal Instrum*, 2007, (3): 29-31.
- [6] 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 urotropine in dried bean curd sheet roll by gas chromatography [J]. *Chin Guangxi J Light Ind*, 2008, (6): 26-27.
- [7] 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/T 2226-2008 Determination of urotropine residue in foodstuffs of animal origin for import and export. LC-MS/MS method [S].

(责任编辑: 赵静)

作者简介



徐小民, 博士, 主要研究方向为卫生理化检验。
E-mail: chemxuxm@163.com



任一平, 教授级高工, 主要研究方向为食品安全检验。
E-mail: renyiping@263.net