

离子交换固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法 快速测定腐竹中的乌洛托品

高洁, 陈达炜, 东思源, 苗虹*, 赵云峰

(国家食品安全风险评估中心, 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

摘要: **目的** 建立腐竹中乌洛托品的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定方法。**方法** 样品经乙腈/水(1:1, v:v)溶液超声提取, 阳离子交换柱净化后, 经 Waters Acquity UPLC BEH HILIC(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)色谱柱分离, 在电喷雾正离子多反应监测模式下进行测定。**结果** 乌洛托品在 0.5~100.0 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数(r)大于 0.999。方法检出限和定量限分别为 6 μg/kg 和 20 μg/kg。在 20、40、100 μg/kg 3 个空白加标水平下, 乌洛托品的加标回收率为 100.1%~103.9%, 相对标准偏差为 4.7%~8.9%。**结论** 该方法快速、简便、准确可靠, 适用于腐竹中非法添加的乌洛托品的含量测定。

关键词: 乌洛托品; 腐竹; 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法; 离子交换固相萃取法

Rapid determination of urotropine in dried beancurd sticks by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with ion exchange solid phase extraction

GAO Jie, CHEN Da-Wei, DONG Si-Yuan, MIAO Hong*, ZHAO Yun-Feng

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of urotropine in dried beancurd sticks by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Samples were ultrasonically extracted by acetonitrile/water (1:1, v:v), and then purified by cation exchange solid phase extraction. The analytes were separated on a Waters Acquity UPLC BEH HILIC column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) and detected by positive electrospray ionization in multiple reactions monitoring (MRM). **Results** The method showed a good linearity over the range of 0.5~100.0 μg/L with relative coefficient not less than 0.999. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 6 μg/kg and 20 μg/kg, respectively. The average recoveries of urotropine at the spiking levels of 20, 40 and 100 μg/kg were in the range of 100.1%~103.9%, with the relative standard deviations in the range of 4.7%~8.9%. **Conclusion** The method is rapid, simple and accurate for the determination of urotropine in dried beancurd sticks.

KEY WORDS: urotropine; dried beancurd sticks; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ion exchange solid phase extraction

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局公益性行业科研专项(2012104003)

Fund: Supported by the Special Public Welfare Industry Research of the State Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (2012104003)

*通讯作者: 苗虹, 研究员, 主要研究方向为食品安全理化检测与膳食暴露评估。E-mail: miaoh@cfssa.net.cn

*Corresponding author: MIAO Hong, Professor, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, No.7 Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. E-mail: miaoh@cfssa.net.cn

1 引言

乌洛托品 (urotropine), 又名六亚甲基四胺 (hexamethylenetetramine), 为白色具有光泽的结晶或结晶性粉末, 是一种重要的化工原料。可用作树脂和塑料固化剂、橡胶硫化促进剂、纺织品防缩剂、氨基塑料的催化剂和发泡剂等^[1]。乌洛托品是甲醛和氨的缩合物, 其在酸性溶液中能分解放出甲醛和氨而起到防腐、杀菌的作用。近年来, 随着国家严厉打击食品中违禁添加吊白块的违法行为, 一些不法企业又开始将乌洛托品掺入腐竹、米线、年糕等食品中, 以替代吊白块, 起到延长保质期和保持色泽的作用。乌洛托品已被证实会在皮肤反复接触后导致皮炎, 而且会在酸性溶液中能分解释放出甲醛, 具有一定的致癌作用^[2]。高剂量的乌洛托品对哺乳动物会产生诱变效应, 有抑制胚胎生长的作用, 并增加胚胎死亡的可能性。其对人体的肾、肝、中枢神经、免疫功能、消化系统等均有损害^[3]。国家卫生和计划生育委员会 (原卫生部) 在 2010 年 4 月公布的《食品中可能违法添加的非食用物质名单 (第四批)》中, 明确禁止将乌洛托品用于腐竹、米线等食品中^[4]。

目前, 关于食品中乌洛托品的检测, 我国仅针对动物源食品基质发布了进出口行业标准 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/质联法》^[5]。而对于腐竹、米线等食品基质还未建立标准化的检测方法。已有文献报道的检测方法包括气相色谱法^[1,6]、高效液相色谱法^[7]、气相色谱-质谱联用法^[8]、液相色谱-质谱联用法^[2,9-11]、激光拉曼光谱法^[12]等。本研究拟采用离子交换固相萃取技术结合超高效液相色谱质谱联用法建立快速测定腐竹中乌洛托品的检测方法, 为打击食品中非法添加乌洛托品的行为提供检测方法, 并完善非食用物质的检测方法体系。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Waters Xevo TQ-S 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪 (美国 Waters 公司); 2510E-DTH 型超声清洗器 (美国 Branson 公司); Vortex-Genie2 涡旋振荡器 (美国 Scientific Industries 公司); 3K15 离心机 (德国 Sigma 公司)。

Oasis MCX 柱 (美国 Waters 公司, 60 mg/3 mL)。

乌洛托品 (纯度 >99%, 加拿大 Dr. Ehrenstorfer 公司); 实验用纯净水 (经 Milli-Q 纯水器纯化); 甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 乙酸胺 (色谱纯, Dikma 公司); 氨水 (分析纯, 西陇化工股份有限公司)。

2.2 标准溶液配制

准确称取乌洛托品标准品 10 mg (精确至 0.1 mg) 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 配制成 1000 mg/L 的标准储备液, 于 -20 °C 贮存。准确移取乌洛托品标准储备液 100 μ L 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈稀释并定容至刻度, 配制成 10 mg/L 标准中间液。准确移取乌洛托品标准储备液 1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈稀释并定容至刻度, 配制成 1 mg/L 标准使用液。

2.3 样品前处理

2.3.1 样品制备

用搅碎机将样品充分混匀后搅碎, 放入分装容器中, 密封, 于 -20 °C 以下冷冻存放。

2.3.2 样品提取

称取 0.5 g (精确至 0.001 g) 样品, 至于 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 乙腈/水 (1:1, v:v) 溶液, 涡旋混匀, 超声提取 10 min, 9500 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 mL 用于固相萃取净化。

2.3.3 净化

用 3 mL 甲醇活化 MCX 固相萃取柱, 用 3 mL 水平衡小柱后, 加入 1 mL 待净化液, 弃去流出液, 依次加入 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗, 弃去流出液, 最后用 3 mL 5% 氨水甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液。洗脱液用 5% 氨水甲醇溶液定容至 4 mL, 待上机测定。

2.4 仪器条件

2.4.1 液相色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH HILIC 柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m); 柱温: 室温; 进样体积: 10 μ L; 流动相 A 为 10 mmol/L 乙酸铵, 流动相 B 为乙腈, 60% B 等度洗脱; 流速: 0.3 mL/min。

2.4.2 质谱条件

采用电喷雾离子 (ESI) 源, 正离子模式进行检测。毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 30 V; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气和锥孔反吹气为 N₂, 脱溶剂气温度: 400 °C, 脱溶剂气流速: 800 L/h, 锥孔反吹气流速:

150 L/h; 碰撞气为 Ar, 流速: 0.2 mL/min; 扫描模式为多反应监测(MRM), 母离子为 m/z 141.1($[M+H]^+$), 定量离子为 m/z 112.1, 碰撞能量为 10 V; 定性离子为 m/z 85.1, 碰撞能量为 20 V。

2.5 基质匹配标准工作曲线制备

空白基质溶液的制备: 称取与试样基质相应的阴性样品 0.5 g, 与试样同时进行提取、净化和定容得到。

准确吸取 1 mg/L 的标准使用液, 用空白基质溶液制成 0.5、1、2.5、5、10、25、50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准系列溶液。

3 结果与讨论

3.1 提取溶剂的选择

乌洛托品可溶于水、乙腈、甲醇、氯仿等溶剂中, 不溶于乙醚、石油醚、正己烷等。考虑到氯仿的毒性, 不选择其作为提取溶剂。另考虑到乌洛托品为叔胺结构的化合物, 加酸可能有利于提取, 因此, 本研究考察了水、甲醇、乙腈、0.1%甲酸乙腈、甲醇/水(1:1, v:v)溶液、乙腈/水(1:1, v:v)溶液等 6 种溶剂体系的提取效率。在已报道的几篇关于乌洛托品检测的文献^[2,9,10]中, 均选用乙腈作为提取溶剂, 但实验尝试用乙腈作提取溶剂时, 加标回收实验的结果并不理想, 回收率仅为 66.6%。用水和甲醇/水(1:1, v:v)溶液作提取溶剂时, 离心后提取液仍然非常浑浊, 在后续的净化步骤中易堵塞小柱, 故不采用。0.1%甲酸/乙腈作提取溶剂, 回收率较乙腈更低, 仅为 55.8%。不同提取溶剂对乌洛托品回收率的影响如表 1 所示。实验结果表明甲醇和乙腈/水(1:1, v:v)溶液作为提取溶剂时能得到较好的回收率, 但甲醇作提取溶剂时, 定量离子的绝对响应较乙腈/水(1:1, v:v)溶液的低, 最终故选择乙腈/水(1:1, v:v)溶液作提取溶剂。

表 1 使用不同提取溶剂的回收情况比较(加标水平 100 $\mu\text{g/kg}$)

Table 1 Recoveries of urotropine extracted by different solvents		
提取溶剂	定量离子峰面积	回收率(%)
水	-	-
甲醇	10199	90.8
乙腈	9539	66.6
0.1%甲酸乙腈	7611	55.8
甲醇/水(1:1, v:v)溶液	-	-
乙腈/水(1:1, v:v)溶液	19327	103.9

-表示无法得到峰面积和无法计算回收率

3.2 液相色谱-质谱条件优化

乌洛托品为小分子量的高极性化合物, 在反相 C_{18} 色谱柱基本没有保留, 无法和干扰物质完全分离, 影响质谱测定。而 HILIC 色谱柱能利用亲水作用, 有效地提高乌洛托品的保留, 故选用 HILIC 色谱柱。最终优化得到的液相色谱-质谱条件见 2.4。乌洛托品母离子为 m/z 141.05($[M+H]^+$), 丰度较大的子离子为 m/z 112.1 和 m/z 85.1, 因 m/z 112.1 响应较大, 且背景较低, 选择 m/z 112.1 为定量离子。空白基质加标的乌洛托品总离子流图及提取离子流图如图 1 所示。

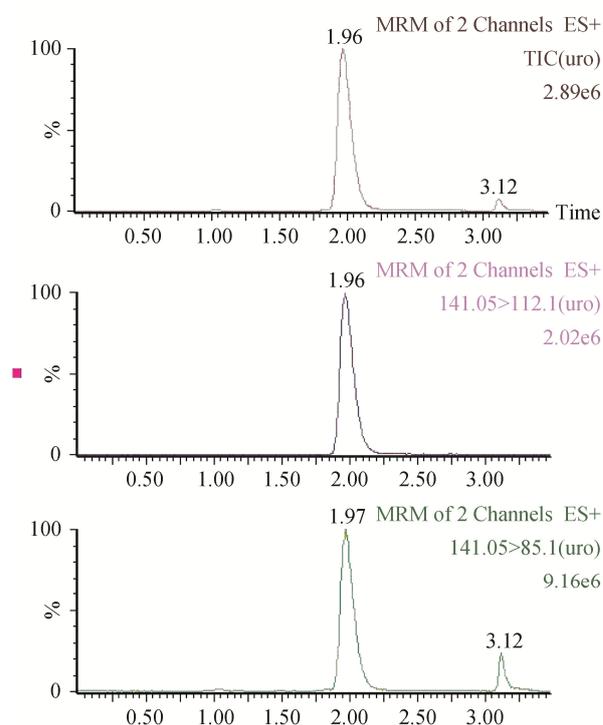


图 1 基质匹配的乌洛托品标准溶液(25 $\mu\text{g/L}$)MRM 色谱图
Fig. 1 MRM chromatograms of urotropine in matrix-matched standard solution (25 $\mu\text{g/L}$)

3.3 基质效应

测定空白基质提取液与纯溶剂中同浓度分析物的离子响应强度, 通过公式: 基质效应(ME) = $B/A \times 100\%$, 计算二者相对比值来评价基质效应。式中, A 和 B 分别表示纯溶剂与基质溶液中分析物的峰面积。通过实验, 计算可得通过如前所述的前处理步骤, 腐竹中的乌洛托品在液质分析中基质效应为 80.3%。为得到理想的回收率, 在未使用同位素内标的情况下, 有必要配制基质匹配的标准曲线, 以校正

基质效应对峰面积响应的影响。

3.4 方法的线性范围、检出限及定量限

用空白腐竹基质溶液配制成 0.5、1、2.5、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的乌洛托品标准溶液系列, 以乌洛托品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 乌洛托品在 0.5~100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 线性方程为 $Y=8928X-431$, 相关系数(r)大于 0.999。对阴性腐竹样品进行低水平(20 $\mu\text{g/kg}$)加标实验, 以 3 倍信噪比对应的浓度为方法的检出限(LOD), 以 10 倍信噪比对应的浓度作为方法的定量限(LOQ), 得到方法检出限为 6 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。对于腐竹中非法添加的乌洛托品, 浓度一般在毫克每千克数量级, 该方法的检出限及定量限能完全能满足实际样品的测定。

3.5 方法的准确度和精密度

取阴性的腐竹样品进行低、中、高 3 个水平(20、40 和 100 $\mu\text{g/kg}$)的加标回收实验, 每个添加水平重复 6 次, 实验结果见表 2。

表 2 乌洛托品在阴性腐竹中的加标回收率和相对标准偏差($n=6$)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations of urotropine in dried beancurd sticks ($n=6$)

加标水平($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率(%)	RSD(%)
20	100.1	7.1
40	102.7	8.9
100	103.9	4.7

由表 2 可见, 样品的平均回收率为 100.1%~103.9%, 相对标准偏差为 4.7%~8.9%。精密度和准确度均满足分析要求。

3.6 实际样品的测定

采用已建立的方法对北京市售的 10 份腐竹样品进行了检测, 均未检出乌洛托品。

4 结 论

本研究采用离子交换固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱技术, 建立了快速测定腐竹中非法添加的乌洛托品方法。本方法用乙腈/水(1:1, $v:v$)溶液代替乙腈作为提取溶剂, 大大提高了腐竹样品中乌洛托品的回收率。该方法前处理步骤简单、用时短、精

密度好, 方法检出限和定量限能满足实际检测的需要, 为非食用物质乌洛托品的监管提供了可靠的技术手段。

参考文献

- [1] 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]. Anal Instrum, 2007, (3): 29-31.
- [2] 张爱芝, 张书芬, 王全林, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4 (2): 472-478.
Zhang AZ, Zhang SF, Wang QL, *et al.* Determination of urotropine in dried beancurd stick, rice flour and rice pastry by ultra pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2013, 4 (2): 472-478.
- [3] 一民. 乌洛托品的毒性与污染防治[J]. 火炸药, 1981(1):63-64.
Yi M. Toxicity and pollution prevention of urotropine[J]. Explosives, 1981(1): 63-64.
- [4] 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)[Z]. 2010, 3.
Ministry of Health, China. Lists of non-edible substance illegally added in food and abusive food additives (IV)[Z]. 2010, 3.
- [5] 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]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
SN/T2226-2008 Determination of urotropine residue in foodstuffs of animal origin for import and export-LC-MS/MS method [S]. Beijing: China Standard Press, 2008.
- [6] 王帅, 王焕锋, 许君亭, 等. 气相色谱法测定乌洛托品含量的研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2014, 32(2): 107-109.
Wang S, Wang HF, Xu JT, *et al.* Study on the determination of methenamine by gas chromatography[J]. J Guizhou Normal Univ: Nat Sci Ed, 2014, 32 (2): 107-109.
- [7] 王庭欣, 王光冲. 腐竹中乌洛托品的高效气相色谱检测技术[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2013, 33 (5): 477-483.
Wang TX, Wang GC. Detection technology on the methenamine in Yuba by gas chromatography[J]. J Hebei Univ: Nat Sci Ed, 2013, 33 (5): 477-483.
- [8] 徐小民, 黄百芬, 任一平. 豆制品和粉干中乌洛托品的气质联用测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4 (3): 873-876.
Xu XM, Huang BF, Ren YP. Determination of urotropine in soybean products and cereal noodles by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2013, 4 (3): 873-876.
- [9] 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(1): 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: Nat Sci Ed*, 2012, 11(1): 78–82.
- [10] 周秀云, 赵勇, 俞婧. SPE-UPLC-MS/MS 快速测定豆制品中的乌洛托品[J]. *河北省科学院学报*, 2013, 30(1): 64–68.
- Zhou XY, Zhao Y, Yu J. A rapid method for the determination of urotropine in soy products by SPE-UPLC-MS/MS[J]. *J Hebei Acad Sci*, 2013, 30(1): 64–68.
- [11] 马雪涛, 牛之瑞, 冯雷, 等. 离子交换固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法测定豆制品中乌洛托品残留量[J]. *食品科学*, 2014, 35(10): 166–169.
- Ma XT, Niu ZR, Feng L, *et al.* Determination of urotropine residue in processed soybean products by ion exchange solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Sci*, 2014, 35(10): 166–169.
- [12] 刘春伟, 仲雪, 马宁. 激光拉曼光谱法快速测定腐竹中的微量

乌洛托品[J]. *食品安全质量检测学报*, 2012, 3(4):306-308.

Liu CW, Zhong X, Ma N. Rapid determination of trace urotropine in yuba by laser Raman spectrometry[J]. *J Food Saf Qual*, 2012, 3(4): 306–308.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



高洁, 硕士, 研究实习员, 主要研究方向为食品安全理化检测与膳食暴露评估。
E-mail: gaojie@cfsa.net.cn



苗虹, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全理化检测与膳食暴露评估。
E-mail: miaoh@cfsa.net.cn