

不同基质食品中乌洛托品残留量的检测方法研究

敦 萌¹, 魏玉龙^{1*}, 陈 雷²

(1. 青岛海润农大检测有限公司, 青岛 266109; 2. 青岛科创质量检测有限公司, 青岛 266109)

摘 要: **目的** 建立适用于猪肉、豆干、豆腐、腐竹基质中乌洛托品的分析检测方法。**方法** 比较提取方式、浓缩温度、固相萃取柱、微孔滤膜等关键因素测定样品中乌洛托品, 样品用乙腈超声提取, 35 °C旋蒸浓缩, 经 cleanert PCX 固相萃取柱及 0.22 μm 亲水 PTFE 微孔滤膜净化, 高效液相色谱串联质谱仪进行检测。**结果** 乌洛托品在 5~500 μg/L 质量浓度范围内线性相关系数为 0.9997; 添加水平为 1~50 μg/kg 时, 平均回收率为 75.7%~91.9%, 相对标准偏差为 1.10%~9.88%。**结论** 该方法快速、准确度和精密性均能满足日常检测的需求。**关键词:** 乌洛托品; 提取方式; 浓缩温度; 固相萃取柱

Study on the determination method of urotropine residue in different food matrix

DUN Meng¹, WEI Yu-Long^{1*}, CHEN Lei²

(1. Qingdao Harrens-QAU Inspection Testing Co., Ltd., Qingdao 266109, China; 2. Qingdao Sci-tech Innovation Co., Ltd., Qingdao 266109, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the determination of urotropine in pork, bean curd, tofu and dried bean curd stick. **Methods** Key factors such as extraction method, concentration temperature, solid phase extraction column and microporous filtration membrane were compared and studied to determine the urotropine content in the sample. The samples were extracted by ultrasonic extraction with acetonitrile and concentrated by rotary evaporation at 35 °C, purified by cleanert PCX SPE column and 0.22 μm hydrophilic PTFE microporous filtration membrane, and analyzed by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometer. **Results** The correlation coefficient was 0.9997 at the concentration range 5–500 μg/L, and the average recoveries were 75.7%–91.9% and the relative standard deviations (RSDs) were 1.10%–9.88% when the supplemental levels were 1–50 μg/kg. **Conclusion** This method is rapid, accuracy and precision, and can meet the request of daily testing.

KEY WORDS: urotropine; extract method; concentrate temperature; solid phase extraction column

0 引 言

乌洛托品, 分子式为(CH₂)₆N₄, 学名六亚甲基四胺, 其物理化学性质相对稳定, 属低毒类, 可作为药物服用。但其在酸性条件下会分解产生甲醛^[1-4], 甲醛易与体内多

种化学结构的受体发生反应, 如与氨基化合物缩合, 与巯基化合物加成, 使蛋白质变性。甲醛在体内还可还原为醇, 表现出甲醇的毒理作用, 对人体的肾、肝、中枢神经、免疫功能、消化系统等均有损害^[5-6], 因此国家已明令禁止乌洛托品在食品生产和加工过程中使用^[7]。

*通信作者: 魏玉龙, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全管理。E-mail: LoganWei@harrens.com

*Corresponding author: WEI Yu-Long, Engineer, Qingdao Harrens-QAU Inspection Testing Co., Ltd, No.700, Changcheng Road, Chengyang District, Qingdao 266109, China. E-mail: LoganWei@harrens.com

目前,食品中乌洛托品的检测标准只有行标 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》^[8],其适用基质包括鸡肉、鸡肝脏、鸡肾脏和猪肉,比较单一。本研究采用高效液相色谱串联质谱法,从前处理提取及净化方面,研究适合多种不同基质食品中乌洛托品的检测方法^[9-14],以期为快速、准确的检测食品中乌洛托品提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);正己烷(色谱纯,韩国 SK chemicals 公司);甲醇(色谱纯,德国 Merk 公司);无水硫酸钠(分析纯,天津恒兴化学试剂制造有限公司);乙酸铵(色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司);氨水(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乌洛托品标准物质(纯度大于 99%,德国 DR 公司);Agela cleanert PCX 固相萃取柱(60 mg/3CC,天津博纳艾杰尔科技);微孔滤膜(0.22 μm 亲水 PTFE 滤膜,上海安谱实验科技股份有限公司);水均为一级水。

1.2 仪器与设备

1290-6460 Infinity 高效液相色谱串联质谱仪,配电喷雾离子源(ESI)(美国 Agilent Technologies 公司);NV212B 电子天平:感量 0.01 g(奥豪斯仪器有限公司);SQP 电子天平(感量 0.01 mg,赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-600 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);L550 台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);ASE-12 固相萃取仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);N-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);N-EVAP 112 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司);XW-80A 涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

1.3 色谱条件

色谱柱:亲水作用色谱(1.8 mm×50 mm, 1.7 μm);流动相:甲醇,5 mmol/L 乙酸铵,流速 0.3 mL/min,流动相梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Mobile phase composition for gradient elution

时间/min	A 相(甲醇)/%	B 相(5 mmol/L 乙酸铵)/%
0	10	90
1.00	10	90
4.00	80	20
5.00	80	20
5.01	10	90
6.50	10	90

1.4 质谱条件

离子源:ESI;扫描模式:正离子扫描;监测方式:多反应监测(multiple- reaction monitoring, MRM);干燥气温度:350 ℃;干燥气流量:10 L/min,雾化器压力:45 psi,鞘气温度:350 ℃;鞘气流量:10 L/min;毛细管电压:3500 V,监测离子对及碰撞能条件见表 2。

表 2 乌洛托品监测离子对及碰撞能
Table 2 Monitor ions and collision energy for urotropine

目标物	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能/eV
乌洛托品	141	112.0*	10
		98	10
		85.1	12

注:*代表定量离子。

1.5 样品前处理

本研究选择猪肉、豆干、豆腐、腐竹 4 种基质,粉碎混匀,称取 5.00 g(精确至 0.01 g)

样品于 50 mL 具塞离心管中。加入 4 g 无水硫酸钠,10 mL 乙腈,涡旋 1 min 混匀后,超声提取 10 min,4000 r/min 离心 5 min,转移上清液至另一 50 mL 具塞离心管中,样品残渣加入 10 mL 乙腈重复提取 1 次,合并上清液,加入乙腈饱和正己烷 10 mL,涡旋混匀 1 min,4000 r/min 离心 5 min,取下层乙腈层于茄形瓶中,于 35 ℃旋蒸浓缩至干。加入 2 mL 20 mmol/L 乙酸铵溶液溶解残渣,待净化。

Agela cleanert PCX (60 mg/3 CC)固相萃取柱使用前分别用 3 mL 水,3 mL 甲醇和 3 mL 20 mmol/L 乙酸铵溶液预处理;将上述样液过柱,依次用 1 mL 水和 1 mL 甲醇淋洗固相萃取柱,弃去流出液,抽干;用 3 mL 氨水甲醇(5:95, V:V)洗脱,洗脱液于 45 ℃氮吹浓缩至干,用 1 mL 甲醇水(9:1, V:V)溶解,经 0.22 μm 亲水 PTFE 滤膜过滤,上机待测。

2 结果与分析

2.1 提取方式的确定

振荡与超声是样品前处理提取最常用的 2 种方式,但是近年来超声波提取已经显示出越来越多的优势,利用其机械性能、热学性能和强大的空化效应,可以加速细胞内物质的释放、扩散及溶解,提高提取效率^[15]。本研究比较了振荡与超声的提取效果,提取完成后离心,取上层乙腈溶液上机检测。结果表明 2 种提取方式均能较好地提取 4 种基质中的乌洛托品,在保证目标物不被破坏的前提下,超声提取耗时短,操作简单易行,对乌洛托品的提取更加充分。其回收率精密度见表 3。

表 3 振荡和超声提取的回收率精密度实验(n=3)
Table 3 Effects of vibrating and ultrasonic extraction on the recovery and precision (n=3)

提取方式	添加浓度 /(μg/kg)	平均测定值 /(μg/kg)	平均回 收率/%	相对标准 偏差/%
振荡提取	10	8.20	82.0	1.23
超声提取	10	9.98	99.8	3.64

2.2 浓缩温度的确定

旋转蒸发仪浓缩的水浴温度对浓缩的回收率有影响^[16],当温度过低时,浓缩时间长;而温度过高时,有机试剂容易爆沸反冲,造成污染。因此选择合适的浓缩温度,既能缩短旋蒸时间,又能防止污染。本研究样品提取液分别于 30、35、40 ℃进行旋蒸浓缩。浓缩近干后复溶,复溶液上机检测,通过测定结果比对(表 4),以及结合乙腈、乌洛托品的物理性质,确定浓缩温度为 35 ℃,此时回收率最高。

表 4 不同浓缩温度的回收率精密度实验(n=3)
Table 4 Effects of different concentrate temperatures on the recovery and precision (n=3)

浓缩温度 /℃	添加浓度 /(μg/kg)	平均测定值 /(μg/kg)	平均回 收率/%	相对标准 偏差/%
30	10	9.33	93.3	2.66
35	10	10.13	101.3	4.01
40	10	9.04	90.4	2.43

2.3 固相萃取柱的选择

乌洛托品分子结构中带有氨基,呈弱碱性,由于其在酸性条件下带正电,具有阳离子交换特性,因此优先选择阳离子交换柱进行净化^[2]。本研究比较了 3 种不同厂家的阳离子交换柱,将每种基质的浓缩复溶液分别过活化后的 Agela cleanert PCX (60 mg/3 CC)、Agilent Bond ElutPlexa PCX (60 mg/3 CC)、Oasis MCX (60 mg/3 CC)净化柱,收集洗脱液上机检测。通过比对测定结果,各厂家生产的阳离子交换柱对不同基质中乌洛托品的净化效果相似(图 1),但有研究表明^[2],Agela cleanert PCX 更加适用于豆制品中乌洛托品残留的检测,因此本研究选择 Agelacleanert PCX(60 mg/3 CC)固相萃取柱进行净化。

2.4 微孔滤膜的选择

吸取适量的乌洛托品标准工作溶液,配制成质量浓度为 50 μg/L 的标准稀释液,分别过 0.22 μm 水相滤膜(聚醚砜)、有机相滤膜(尼龙)及亲水 PTFE 滤膜(聚四氟乙烯)净化,每种微孔滤膜同时设置空白对照样液,上机测定。有研究采用 0.22 μm 水相滤膜进行净化^[17],但由本研究的测定结果可知,水相滤膜对乌洛托品的影响较大,吸附 1 μg/L;有机相滤膜次之,吸附 0.5 μg/L;而亲水 PTFE 滤膜无影响;因此本研究选择亲水 PTFE 滤膜进行过滤净化。其回收率精密度见表 5。

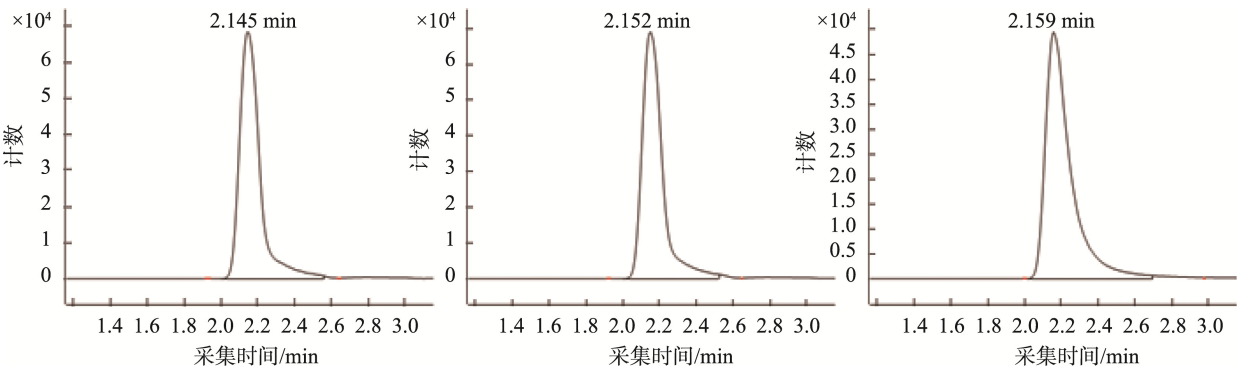


图 1 不同厂家阳离子交换柱对乌洛托品的净化效果(50 μg/L)
Fig.1 Effects of solid-phase extraction cartridges on the purification of urotropine (50 μg/L)

表 5 不同微孔滤膜的回收率精密度实验(n=3)
Table 5 Effects of different millipore filters on the recovery and precision (n=3)

微孔滤膜类型	标准溶液浓度/(μg/L)	平均浓度/(μg/L)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
水相	50	48.5	97.0	2.49
有机相	50	49.2	98.4	0.26
亲水 PTFE	50	50.1	100.2	0.39

2.5 样品检测实际应用

采用本研究方法,对 4 种基质进行高、中、低浓度的添加回收检测,加标后的样品含量分别为 1、10、50 μg/kg,上机浓度分别为 5、50、250 μg/L。配制乌洛托品质量浓度分别为 5、25、50、250、500 μg/L 的标准曲线,以乌洛托品的峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X)为横坐标,得到线性方程 $Y=1373.25X+999.157$, $r^2=0.9997$,线性相关性良好。乌洛托品的 50μg/L 标准溶液及加标样品的色谱图见图 2。

不同水平的添加回收率结果见表 6。由表 6 可知,不同基质样品的平均回收率为 75.7%~91.9%,相对标准偏差

为 1.10%~9.88%,本方法有较高的准确度和精密度,满足检测需求。

3 结 论

本文研究了适用于不同基质中乌洛托品的前处理检测方法,通过比对提取方式、浓缩温度、固相萃取柱以及微孔滤膜 4 个方面对乌洛托品检测结果的影响,确定了样品检测过程的 4 个关键因素,建立了满足检测需求的前处理方法,为食品中乌洛托品的检测提供数据参考及技术支撑。

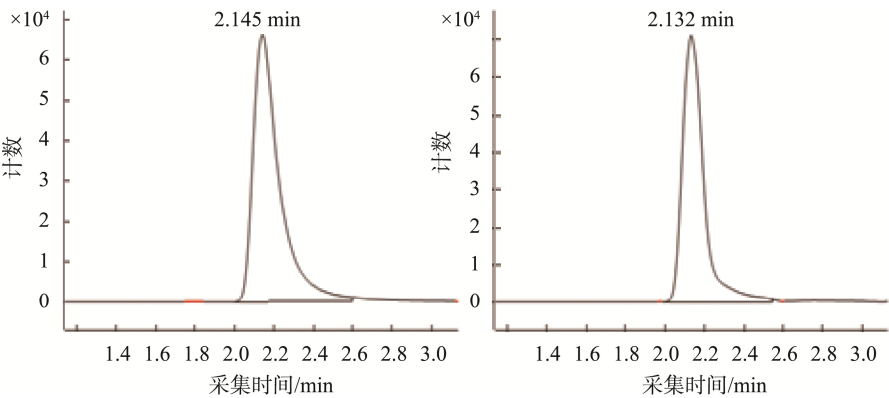


图 2 乌洛托品标准溶液及加标样品色谱图(50 μg/L)
Fig.2 Chromatograms of urotropine standard solution and spiked sample (50 μg/L)

表 6 乌洛托品在不同基质中的平均回收率及相对标准偏差(n=6)
Table 6 Recoveries and RSDs of urotropine indifferent food matrix (n=6)

样品基质	添加浓度/(μg/kg)	平均测定值/(μg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
猪肉	1	0.88	88.0	4.75
	10	8.82	88.2	3.08
	50	42.8	85.6	5.18
豆干	1	0.86	85.5	8.20
	10	8.31	83.1	8.18
	50	41.2	82.4	3.47
豆腐	1	0.76	75.7	4.77
	10	8.42	84.2	7.23
	50	40.1	80.3	6.59
腐竹	1	0.78	78.3	1.10
	10	9.19	91.9	6.05
	50	44.6	89.2	9.88

参考文献

- [1] 徐幸. 食品中乌洛托品高效萃取与准确检测技术的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
XU X. Study for efficient extraction and accurate detection of methenamine in food [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [2] 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.
- [3] 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]. Jiangnan Univ (Nat Sci Ed), 2012, 11(1): 78-82.
- [4] PAVITRAPOK C, WILLIAMS DA. Determination of methenamine, methenamine mandelate and methenamine hippurate in pharmaceutical preparations using ion-exchange HPLC [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(5): 1243-1248.
- [5] 高洁, 陈达伟, 东思源, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(10): 3210-3214.
GAO J, CHEN DW, DONG SY, *et al.* Rapid determination of urotropine in dried beancurd sticks by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with ion exchange solid phase extraction [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(10): 3210-3214.
- [6] 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.
- [7] 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].
Ministry of Health of the People's Republic of China. Lists of non-edible substance illegally added in food and abusive food additives (IV) [Z].
- [8] 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].
- [9] XU X, ZHAN XM, DUHORANIMANA E. Determination of methenamine residues in edible animal tissues by HPLC-MS/MS using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in actual samples [J]. Food Control, 2016, 61: 99-104.
- [10] 李新丽, 张厚森, 贾涛, 等. 液相色谱-串联质谱法测定豆制品中的乌洛托品[J]. 山东化工, 2016, 45(14): 63-66.
LI XL, ZHANG HS, JIA T, *et al.* Determination of urotropine content in bean products by HPLC-MS/MS [J]. Shandong Chem Ind, 2016, 45(14): 63-66.
- [11] 汪辉, 夏立新, 彭新凯, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定食品中的乌洛托品[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 72-78.
WANG H, XIA LX, PENG XK, *et al.* Rapid determination of methenamine in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Mach, 2013, 29(3): 72-78.
- [12] 徐幸, 张晓鸣, 舒平, 等. 超高效液相色谱-稳定性同位素稀释质谱法测定米线中乌洛托品的不确定度评估[J]. 食品科学, 2015, (16): 246-250.
XU X, ZHANG XM, SHU P, *et al.* Evaluation of uncertainty in determination of urotropine in rice noodles by ultra performance liquid chromatography-stable isotope dilution mass spectrometry [J]. Food Sci, 2015, (16): 246-250.
- [13] 杨芳, 董刘敏, 苏晶, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的乌洛托品[J]. 食品工业, 2014, 35(9): 278-281.
YANG F, DONG LM, SU J, *et al.* Determination of methenamine in foods by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Ind, 2014, 35(9): 278-281.
- [14] 陆春良, 刘娟, 刘向农. 亲水作用液相色谱电喷雾串联质谱法测定米线中乌洛托品残留[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2013, 34(2): 82-86.
LU CL, LIU J, LIU XN. Determination of urotropine residue in rice noodle by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Yangzhou Univ (Agric Life Sci Ed), 2013, 34(2): 82-86.
- [15] 陈嘉聪. 食品中微量乌洛托品的检测方法研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
CHEN JC. Study on detection methods of trace urotropine in food [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.
- [16] 李恩鹏. 淡水鱼类中磺胺类和三甲苯类兽药残留检测能力验证[D]. 上海: 东华大学, 2018.
LI EP. Verification of detection capability on residues of sulfonamides and trimethylbenzene veterinary drugs in freshwater fish [D]. Shanghai: Donghua University, 2018.
- [17] 彭名军, 宋安华, 黄儒强, 等. 亲水性色谱柱高效液相色谱法测定米面及制品中的乌洛托品[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3733-3739.
PENG MJ, SONG AH, HUANG RQ, *et al.* Determination of methenamine in rice, flour and their products by hydrophilic chromatographic column high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3733-3739.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



敦 萌, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全分析与检测。
E-mail: 531200823@qq.com



魏玉龙, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全管理。
E-mail: LoganWei@harrens.com