

原料奶的高效液相色谱指纹图谱的建立

王颜红^{1*}, 张 红¹, 林桂凤¹, 曾庆方^{1,2}, 王世成¹, 赵春杰²

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要 :采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)技术,在负离子扫描模式下建立了原料奶的乙腈提取成分的指纹图谱。采用乙腈和0.1%的乙酸水溶液为流动相进行二元梯度洗脱,柱温30℃,分析时间为85 min。确定了11个共有峰,以其中的7号峰为参照物,通过相对峰面积和相对保留时间进行了方法学考察。结果表明,本方法具有良好的重现性,各指纹峰相对保留时间的相对标准偏差(RSD)小于0.79%,相对峰面积的RSD小于2.84%。在原料奶指纹图谱基础上,选取有代表性的危害物如防腐剂苯甲酸等进行了添加,建立了危害物添加图谱,对沈阳地区超市的50个纯牛奶样品进行了筛查,取得初步的应用结果。

关键词 :高效液相色谱-质谱联用;指纹图谱;原料奶

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)10-0935-05

Establishment of high performance liquid chromatographic fingerprint of raw milk

WANG Yanhong^{1*}, ZHANG Hong¹, LIN Guifeng¹, ZENG Qingfang^{1,2},
WANG Shicheng¹, ZHAO Chunjie²

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;
2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : The fingerprint of raw milk based on high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) in negative ion mode was established to evaluate the quality of raw milk. The raw milk was extracted by acetonitrile and the obtained constituents were eluted by acetonitrile and 0.1% acetic acid solution with a gradient program at a column temperature of 30 °C within 85 min. A total of 11 common peaks had been identified. The methodology was investigated by the relative peak area and relative retention time with No. 7 peak as the reference. The results showed that the fingerprint established by this method has reasonable reproducibility with the relative standard deviations (RSDs) less than 0.79% for the relative retention time and less than 2.84% for the relative peak area. Based on the fingerprint, a labelling HPLC-MS spectrogram was obtained for the screening of hazards by adding several representative hazards, such as benzoic acid etc. An amount of 50 pure milk samples in Shenyang supermarkets were inspected, and preliminary results had been achieved.

Key words : high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS); fingerprint; raw milk

指纹图谱技术是一种综合的、宏观的质量控制手段,明显区别于现行的显微鉴别、理化检验和含量测定等方法,具有整体性、相对稳定性和模糊性等特点^[1],特别适用于成分复杂和有效成分不明确物质的伪劣鉴别和质量控制,是世界卫生组织(WHO)和

美国食品和药物管理局(FDA)^[2,3]等组织和机构普遍接受和认可的一种质量评价模式。目前指纹图谱技术主要被应用于中药和天然药物的真伪鉴别和质量控制^[4-6],其中色谱及质谱技术是指纹图谱的主要研究手段^[7-9]。

* 通讯联系人:王颜红,研究员,主要研究方向为食品安全检测技术及风险评估。Tel:(024)83970388,E-mail:wangyh@iae.ac.cn。
基金项目:中国科学院重要方向项目(No. KSCX2-YW-N-035)和沈阳市重大科技支撑计划项目(No. 1071110-9-01)。
收稿日期:2010-07-12

原料奶是奶制品的源头,优质的原料奶供应是奶制品质量安全的根本保证。牛奶成分复杂,单纯检测个别营养指标和可能引入的不安全指标来控制其质量,存在明显的不确定性。同一产品往往需多个指标分项检测,耗时长,费用高,而且检测指标较为单一,难以体现产品整体质量特征。近年来指纹图谱技术被逐渐引入食品分析领域,Selli等^[10]采用气相色谱-质谱(GC-MS)技术对白葡萄酒中72种香气成分进行了定性和定量分析;Yu等^[11]建立了中国熏肉的40种风味物质的指纹图谱。针对奶制品,李武等^[12]构建了酸奶的PCR(聚合酶链反应)指纹图谱,对其菌种组成及稳定性进行评价,Eknæs等^[13]对山羊奶中脂肪酸进行了轮廓分析,并探讨了不同脂肪来源的浓缩饲料对其的影响。本研究利用液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术建立了原料奶乙腈提取成分的指纹图谱,在一定程度上客观反映了原料奶的整体质量特征,并在此基础上建立了危害物的标准添加图谱,为原料奶的质量控制和奶制品中有害物质筛查体系的研究提供了方法学参考。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters 2695 HPLC 仪, Waters ZQ4000 质谱仪(美国 Waters 公司); KQ-250B 型超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); EYELA N-1000 旋转蒸发器(日本 Eyela 公司); 低温离心机(日本 Hitachi 公司); 超低温冰箱(日本 Sanyo 公司)。

冰乙酸(分析纯,天津市博迪化工有限公司); 乙腈(分析纯,天津市康科德科技有限公司); 正己烷(色谱纯,美国 Fisher 公司); 乙腈(色谱纯,德国 Merck 有限公司)。

1.2 原料奶采集和贮存

以标准化养殖的奶牛所产原料奶作为原料奶的基础样本,以散户养殖和奶站混合罐装原料奶为校对样本,从而保证所建立的指纹图谱具有代表性。基础样本采自沈阳辉山牧场10头健康奶牛,每头牛采集约500 mL 奶样;校对样本采自沈阳苏家屯八一镇奶牛场5头健康奶牛样本和沈阳伊利奶站5个混合牛奶样本。上述样本采用-70℃超低温冰箱保存,用前取出,室温解冻,混匀,备用。

1.3 供试样品溶液制备

取原料奶约50 g于离心管中,加入80 mL乙腈,超声提取20 min,10℃下以15 000 r/min离心20 min,上清液转移至具塞量筒中。向具塞量筒中

加入氯化钠10~12 g,充分振摇,静置分层,乙腈层转移至鸡心瓶中,35℃下旋蒸至近干。用1 mL色谱纯乙腈洗涤鸡心瓶内的提取物,洗脱液转移至5 mL离心管中,加入3 mL正己烷,涡旋,弃去正己烷层,重复3次,乙腈层过0.45 μm滤膜,备用。

1.4 实验条件

HPLC 条件 色谱柱:XTerra MS C₁₈柱(150 mm×2.1 mm,5 μm),柱温:30℃。进样量:20 μL。流动相:0.1%乙酸水溶液(A)和乙腈(B)。线性梯度洗脱程序:0~17 min,10% B~40% B;17~30 min,40% B~50% B;30~60 min,50% B~60% B;60~70 min,60% B~80% B;70~80 min,80% B~95% B;80~85 min,95% B。流速:0.25 mL/min。

MS 条件 电喷雾离子源(ESI),负离子模式,毛细管电压2.0 kV,锥孔电压40 V,萃取电压4 V,射频透镜电压0.5 V,离子源温度120℃,脱溶剂气温度300℃,脱溶剂气流速250 L/h,锥孔反吹气流速100 L/h,扫描范围 m/z 100~600。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件选择与优化

2.1.1 提取溶剂确定

乙腈作为提取溶剂,同时能沉淀蛋白。本文考察了40、80、120 mL 3个水平的乙腈用量。乙腈取40 mL时,提取液微浑浊,浓缩复溶时残留物较多;乙腈取80和120 mL时,提取液澄清,浓缩复溶时无残留物。最终确定提取剂乙腈用量为80 mL。

2.1.2 脱水方式考察

牛奶含水量大于80%,提取液浓缩较困难,一般多用适量无水硫酸钠去除提取液中的水^[14,15]。由于取样量较大,无水硫酸钠的用量也较大(通常为样品量的2.5~3倍),若用量不足易结块并包被目标物而造成损失,故不宜采用无水硫酸钠进行脱水。本文采用加入适量氯化钠进行脱水的方法,饱和氯化钠水溶液与乙腈分层良好,可有效去除提取液中的水。本文考察了氯化钠用量,结果表明50 g牛奶中加10~12 g氯化钠,脱水效果较好。

2.2 检测条件优化

2.2.1 流动相的选择

通过对分离选择性的比较,乙腈-水体系明显优于甲醇-水体系。本文分别对乙腈-水、乙腈-0.1%乙酸、乙腈-0.1%氨水的流动相体系进行比较,发现流动相中的少量乙酸能明显改善峰形。本文考察了不同梯度洗脱程序对色谱峰分离度的影响,结果表明

在 1.4 节所述洗脱程序下色谱峰分离度较好。

2.2.2 柱温的选择

对于复杂成分、特别是未知成分的分离,柱温影响较大。本文考察了 30 ℃ 和 40 ℃ 柱温下的色谱分离情况。与 40 ℃ 时的分离情况相比,30 ℃ 柱温下各色谱峰峰宽更窄,峰形更尖锐,分离度更好。因此最终确定柱温为 30 ℃。

2.2.3 质谱离子源的选择

由于本文所关注的主要是原料奶的乙腈提取成分中的危害物成分,其大多为极性化合物,因此选择 ESI 离子源。实验发现原料奶中各类成分在 ESI 正负离子检测模式下都有响应。但在正离子模式下质谱峰较少,响应值偏低且背景干扰严重;而负离子模式下质谱峰较多,信息丰富,干扰相对较小,故最终选择 ESI⁻ 模式。

2.3 指纹图谱及技术参数

参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[16],对 10 个基础样本原料奶供试样品溶液的图谱进行统计分析,并采用 10 个校对样本原料奶供试样品溶液的图谱进行修正,确定了原料奶的总离子流(TIC)指纹图谱(见图 1)。

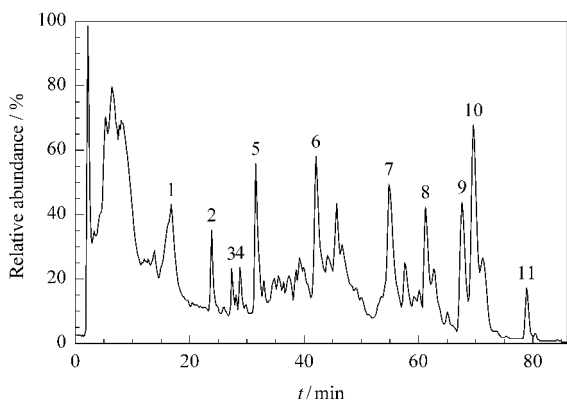


图 1 原料奶的总离子流指纹图谱(扣除试剂空白后)
Fig. 1 TIC fingerprint chromatogram of raw milk sample (having deducted reagent blank)

2.3.1 共有峰的确 定

图 1 中 11 个峰为 20 个供试样品溶液所共有,确定其为共有指纹峰。其中 1、6、7、9、10 号峰的峰面积接近或大于共有峰总峰面积的 10%,因此确定它们为主要共有峰。11 个共有峰的保留时间和特征碎片离子见表 1。

2.3.2 内标的选择

原料奶成分复杂,影响分析结果的因素较多,本文采用自身内标法以减小不确定因素对实验的影响。由于图 1 中 7 号峰相对较稳定,峰面积较大,与其邻近峰分离较好,保留时间较居中,符合参照物要

求,因此选其为内标。设定 7 号内标峰保留时间和峰面积为 1,计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。对 20 批原料奶样品的指纹图谱中非共有峰峰面积进行统计,各图谱中非共有峰总面积均小于总峰面积的 10%。

表 1 11 个共有峰的保留时间和质谱信息

Table 1 The relative retention times and characteristic product ions of 11 common peaks

Peak No.	t/min	Characteristic fragment ion (m/z)
1	17.2	121, 168, 112, 211, 512
2	23.8	361, 552, 467, 197, 302, 409, 575, 102, 374, 249
3	27.4	456, 104, 595, 252, 324, 519
4	28.8	412, 171, 526, 584
5	31.5	258, 417, 480, 169, 253, 256, 229
6	42.0	179, 396, 257, 177, 113, 328
7	54.8	224, 149, 480, 485
8	61.2	583, 337, 584
9	67.3	313, 224, 239
10	69.4	559, 496, 588
11	78.6	592, 368

2.4 方法学考察

2.4.1 重现性

按 1.3 节方法平行制备 5 份供试样品溶液,在 1.4 节条件下进样分析。各共有峰相对保留时间的相对标准偏差(RSD)均小于 0.79%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.84%,表明本方法重现性良好。

2.4.2 精密度

取同一供试样品溶液,连续进样 5 次获得分离谱图。其中各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.24%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.70%,表明仪器的精密度良好。

2.4.3 稳定性

取供试样品溶液,分别在 0、2、6、12、18、24 h 进样获得谱图。各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.24%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.88%,表明在 24 h 内供试样品溶液的稳定性良好。

上述方法学考察结果(见表 2 和表 3)均符合文献^[16]的相关规定要求(RSD 小于 3%)。

2.5 指纹图谱的初步应用

实验中选取了具有代表性的有害物质进行了添加试验,如防腐剂苯甲酸、药物残留氯霉素、合成性激素己烯雌酚、药物残留布洛芬。在原料奶指纹图谱基础上的添加图谱见图 2。其中各种有害物质的添加浓度均为 100 μg/L。

实验中采用逐步稀释法,最终确定 4 种目标物的最低检出限(信噪比为 3)是:苯甲酸 10 μg/L,氯霉素 10 μg/L,己烯雌酚 8 μg/L,布洛芬 15 μg/L。

表 2 方法学考察结果(以相对保留时间为指标)

Table 2 Results of method validation experiments (evaluation of relative retention time)

Peak No.	Reproducibility (n = 5)		Precision (n = 5)		Stability (n = 5)	
	Average	RSD/%	Average	RSD/%	Average	RSD/%
1	0.3135	0.79	0.3076	0.24	0.3078	0.24
2	0.4346	0.19	0.4334	0.14	0.4332	0.15
3	0.4994	0.13	0.4977	0.11	0.4977	0.11
4	0.5256	0.36	0.5243	0.13	0.5241	0.14
5	0.5753	0.16	0.5745	0.15	0.5745	0.15
6	0.7664	0.15	0.7679	0.14	0.7682	0.15
7	1	0	1	0	1	0
8	1.116	0.11	1.115	0.10	1.115	0.10
9	1.228	0.16	1.229	0.10	1.229	0.12
10	1.266	0.24	1.266	0.23	1.266	0.24
11	1.435	0.24	1.436	0.23	1.436	0.23

表 3 方法学考察结果(以相对峰面积为指标)

Table 3 Results of method validation experiments (evaluation of relative peak area)

Peak No.	Reproducibility (n = 5)		Precision (n = 5)		Stability (n = 5)	
	Average	RSD/%	Average	RSD/%	Average	RSD/%
1	0.7788	2.07	1.345	1.32	1.341	1.54
2	0.2718	1.28	0.2997	0.76	0.3042	1.30
3	0.1624	0.66	0.0847	0.46	0.0853	0.44
4	0.0528	0.22	0.0928	0.20	0.5241	0.14
5	0.7428	2.16	0.6317	2.70	0.6355	2.59
6	0.7161	1.28	1.033	1.55	0.7682	0.15
7	1	0	1	0	1	0
8	0.8634	1.59	0.6392	1.54	0.6400	1.39
9	0.9436	0.36	0.9156	2.67	0.9193	2.56
10	1.411	2.84	1.746	2.04	1.742	2.06
11	0.3582	2.65	0.3165	1.55	0.3268	2.88

采用所建立的指纹图谱和添加图谱,对沈阳地区超市的 50 个纯牛奶样品进行分析后发现,原料奶质谱图中普遍有苯甲酸的特征离子(m/z 121),但丰度较低。分析原因可能是原料奶中马尿酸在某些条件下脱甘氨酸生成苯甲酸,从而使牛奶中天然苯甲酸含量增加^[17]。鉴于此,实际样品筛查时,若筛出异常物为苯甲酸,则苯甲酸含量低于国家规定的限定值(食品中最大添加量为 2 mg/kg)时属于合

格牛奶,否则可视为人为过量添加的防腐剂。筛查过程中未发现氯霉素、己烯雌酚和布洛芬残留。

在奶制品的筛查中还发现了异常化合物峰,其保留时间点特征峰 m/z 271(保留时间为 2 427 s),此外还有 m/z 253、183、169、107 等碎片峰(见图 3)。经文献查阅及碎片裂解规律分析,推断该异常物是促进动物生长、乳腺发育并能提高产奶量的性激素雌二醇残留。

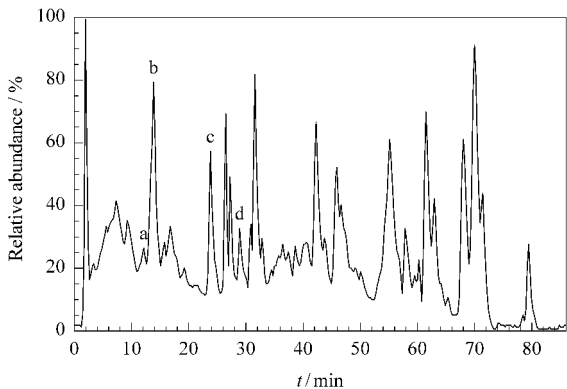


图 2 标准添加样品的总离子流色谱图

Fig. 2 TIC chromatogram of spiked milk sample

Peaks : a. benzoic acid ; b. chloramphenicol ; c. stilbestrol ; d. brufen.

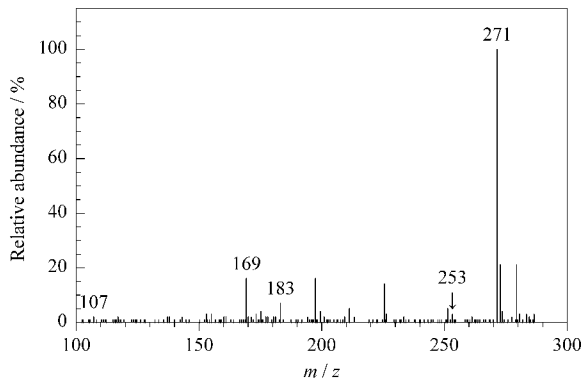


图 3 纯牛奶样品中异常色谱峰的质谱图

Fig. 3 MS spectrum of the abnormal chromatographic peak in pure milk sample

3 结论

本文基于指纹图谱技术,针对原料奶经乙腈提取的成分,采用 HPLC-MS 在负离子扫描模式下建立了原料奶指纹图谱分析方法。本方法的重现性、精密度和稳定性均符合指纹图谱的技术要求。将获取的指纹图谱在市售纯牛奶样品的筛查和检测中初步应用,检测结果可为奶制品质量控制和有害物筛查技术研究提供方法学参考,所获得的指纹信息能在一定程度上反映原料奶的质量。为使原料奶质量的评价方法和评价体系更为完善,还需在不同提取方法、扫描模式等条件下进行试验研究,建立对应的指纹图谱,从而获得原料奶更全面的质量信息。

参考文献:

- [1] Sun G X, Hu Y S, Zhi X Z. Central South Pharmacy (孙国祥, 胡玥珊, 智雪枝. 中南药学), 2008, 6(5): 600
- [2] World Health Organization (WHO). Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. Geneva : WHO , 1991
- [3] Yang L W, Wu D H, Tang X, et al. J Chromatogr A, 2005, 1070(1/2): 35
- [4] Zeng Z, Tan L X, Meng S J, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (曾志, 谭丽贤, 蒙绍金, 等. 分析化学), 2006, 34(9): 1249
- [5] Wu K X, Gu X, Yan C. Chinese Journal of Analytical Chemistry (吴孔弦, 谷雪, 阎超. 分析化学), 2009, 37(4): 581
- [6] Zhu M, Cao Y, Fan G R, J Liq Chrom Relat Tech, 2007, 30 : 123
- [7] Fu S P, Yang B, Chen T, et al. Chinese Journal of Chromatography (付绍平, 杨博, 陈彤, 等. 色谱), 2008, 26(2): 64
- [8] Han Y H, Huo F F, Yang Y Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (韩晔华, 霍飞凤, 杨悠悠, 等. 色谱), 2008, 26(2): 142
- [9] Sun Y Q, Sun G X, Jin Y. Chinese Journal of Chromatography (孙毓庆, 孙国祥, 金郁. 色谱), 2008, 26(2): 160
- [10] Selli S, Canbas A, Cabaroglu T, et al. Food Chem, 2006, 94(3): 319
- [11] Yu A N, Sun B G. Food Chem, 2005, 89(2): 227
- [12] Li W, Zhao Y, Wang L H, et al. China Dairy (李武, 赵勇, 王凌华, 等. 中国乳业), 2006, 4 : 47
- [13] Eknæs M, Havrevoll Ø, Volden H, et al. Anim Feed Sci Tech, 2009, 152 : 112
- [14] Xie L Q, Yue Z F, Tang S B, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (谢丽琪, 岳振峰, 唐少冰, 等. 分析实验室), 2008, 27(3): 5
- [15] Li S Y, Li Q H, Mao H M. Feed Research (李石友, 李琦华, 毛华明. 饲料研究), 2006, 4 : 28
- [16] State Food and Drug Administration. Requirements for Studying Fingerprint of Traditional Chinese Medicine Injections (Draft) (中国国家食品药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)). (2000-08-15). <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0237/15768.html>
- [17] Xie G X, Wu L L, Song R S, et al. Food Science (谢国祥, 吴丽莉, 宋如森, 等. 食品科学), 2005, 26(9): 426