

三聚氰胺的样品前处理及最新检测方法

张俊燕, 何吕兴

(北京艾杰尔科技有限公司, 北京, 100085)

摘要 三聚氰胺是一种重要的化工材料, 常用于制造三聚氰胺树脂, 是建筑业中常用的防火材料, 本来与食品、饲料行业毫不相干, 但是发生在美国的数起饲料致死宠物的事件使两者联系在一起。经过调查, 发现这些进口饲料中含有一定浓度的三聚氰胺, 对此, 美国食品药品监督管理局(FDA)要求饲料厂商提供三聚氰胺的检测报告, 因此, 三聚氰胺事件也使得分析领域掀起了检测方法的开发热潮, 艾杰尔科技有限公司具有较高的敏感度, 迅速开发了优越的检测方法, 本文将详细论述。

关键词 三聚氰胺, 样品前处理, LC-MS

1 前言

三聚氰胺事件变成社会热点话题是在07年3月份, 美国大量召回被三聚氰胺污染的宠物饲料, 起因于宠物饲料致死猫狗的事件。据不完全统计, 北美地区仅美国因食用有毒饲料而死亡的宠物就有上万只, 相关投诉不计其数, 美国食品药品管理局调查显示, 在回收的宠物食品、死亡动物的尿液结晶和肾脏细胞中都发现有三聚氰胺, 研究人员还发现, 回收宠物食品所用的小麦谷蛋白添加物中有较高浓度的三聚氰胺存在。尽管国内尚无动物中毒死亡或产生不良反应的报道, 对于三聚氰胺的毒性也有些争议, 但三聚氰胺不是饲料原料, 也不是国家允许使用的饲料添加物。某些不法厂商添加三聚氰胺主要是为了增加产品的表观蛋白含量, 三聚氰胺被广泛的添加到淀粉、谷朊粉、蛋白粉中, 致使不仅是饲料生产商, 其它的食品工厂也需要三聚氰胺的检测以保证他们产品的安全。

本文采用固相萃取法对样品进行前处理, 并对比了不同的检测方法, 包括FDA公布的检测方法对三聚氰胺分析的影响^[1]。

三聚氰胺(melamine)简称三胺, 学名三氨三嗪, 别名蜜胺、氰尿酰胺、三聚酰胺, 分子式: C₃N₆H₆、C₃N₃(NH₂)₃。分子量: 126.12, 是一种重要的氮杂环有机化工原料^[2]。三聚氰胺显弱碱性, 能够与各种酸反应生成三聚氰胺盐。在强酸或强碱液中, 三聚氰胺发生水解, 胺基逐步被羟基取代, 生成三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸。三聚氰胺与醛类反应生成加成化合物。三聚氰胺与醛反应制成树脂, 三聚氰胺树脂是一种多种用途的材料, 防火耐热且有很高的稳定性, 用于生产塑料、厨房用具、防火纤维、商业滤膜、胶水和阻燃剂, 部分亚洲国家, 也被用来制造

化肥。

2 材料与试剂

2.1 仪器与条件

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国, Agilent 公司); 二极管阵列检测器(DAD), 检测波长240nm, 柱温: 40℃。

(1) Agela Venusil ASB C18 (4.6 × 250mm); 缓冲液: 10mM 柠檬酸, 10mM 庚烷磺酸钠; 流动相: 缓冲溶液: 乙腈 = 85:15; 流速: 1.0mL/min。

(2) Agela Venusil ASB C8 (4.6 × 250mm); 流动相: 缓冲液: 乙腈 = 85: 15; 缓冲液: 10mM 柠檬酸, 10mM 辛烷磺酸钠, 调pH为3.0; 流速: 1.0mL/min。

混合型阳离子交换固相萃取柱Agela Clearnert PCX (Agela Technologies)

2.2 试剂与样品

宠物饲料样品(农业部饲料供应中心提供); 甲醇、乙腈为北京艾杰尔科技有限公司提供; 氨水、乙酸铅、三氯乙酸、均购于北京化学试剂公司; 三聚氰胺标准品、柠檬酸、辛烷磺酸钠(Sigma公司); 甲醇为色谱纯, 其他均为化学纯。

3 实验方法

3.1 样品前处理方法

(1) 标准样品配制:

取50mg三聚氰胺标准品, 以20%甲醇溶解定容至50mL得到1000ppm的标准溶液, 使用时, 以提取液(0.1%三氯乙酸)稀释至所要的浓度。

(2) 提取:

称取饲料样品5g, 加入50mL 0.1%三氯乙酸提取

液, 充分混匀, 加入2mL 2%乙酸铅溶液, 超声20min。然后取部分溶液转移至10mL离心管中, 8000rpm/min离心10min, 取上清液3mL过混合型阳离子交换小柱(PCX)。

(3) 净化(Clearnert PCX小柱, 60mg/3mL):

- 活化及平衡: 3mL甲醇, 3mL水
- 上样: 加入提取液3mL
- 淋洗: 3mL水; 3mL甲醇; 弃去淋洗液并将小柱抽干。

d) 洗脱: 5mL 5% 氨化甲醇(v/v)洗脱。(5% 氨化甲醇的配制: 5mL氨水+95mL甲醇)。

e) 浓缩: 50℃, 氮气吹干, 20%甲醇/水定容至2mL, HPLC分析或衍生后GC/MS分析。

3.2 HPLC检测方法

3.2.1 三聚氰胺HPLC-UV检测方法

三聚氰胺是强极性化合物, 在传统的反相C18柱上保留很差, 需要用离子对试剂色谱方法才能有良好的保留与分离, 按照美国食品药品监督管理局(FDA)的三聚氰胺检测方法和中国农业部公布的三聚氰胺检测方法, 采用艾杰尔(Agela) ASB系列亲水色谱柱, 可以得到良好的分离效果, 分析色谱图如图2:

表1 PCX柱回收率

添加水平 (mg/L)	回收率
空白	—
0.01	116%
0.1	108%
0.5	92%
2	96%

由表1可以看出: 用PCX柱净化样品, 可以得到满意的回收率, 此方法处理样品, 比FDA公布的前处理方法更加准确、可靠。

3.2.2 三聚氰胺LC-MS检测方法

由于FDA公布的HPLC-UV方法中, 流动相添加了离子对试剂, 因此限制了液质联用方法的使用; 但不用离子对试剂色谱方法, 三聚氰胺在传统的C18柱上保留很差, 不能得到较好的分离定量^[3]。

基于此问题, 艾杰尔科技公司自主开发了新的方法, 采用艾杰尔(Agela) ASB系列亲水色谱柱, 不用离子对试剂也能得到有效的保留与分离。因此方法中流动相不含离子对试剂, 可以用于质谱检测。

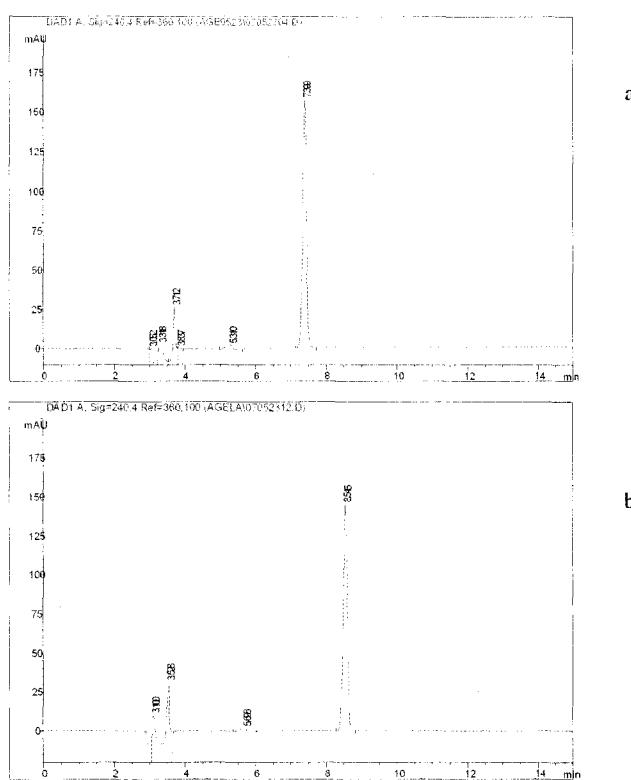


图2 Venusil ASB 色谱柱分离三聚氰胺的谱图

- (a) 色谱柱: Venusil ASB C8 4.6 × 250mm; 标准: FDA方法; 流动相: 缓冲液: 乙腈=85: 15; 缓冲液: 10mM柠檬酸, 10mM辛烷磺酸钠, 调pH为3.0; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 波长: 240nm
 (b) 色谱柱: Venusil ASB C18 4.6 × 250mm; 标准: 中国农业部颁标准方法; 缓冲液: 10mM柠檬酸, 10mM庚烷磺酸钠; 流动相: 缓冲溶液: 乙腈=85:15; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 波长: 240nm

与FDA 2007年4月公布的《Updated FCC Developmental Melamine Quantitation (HPLC-UV)》相比较, 该方法大大降低了最低检测限(MSD: 0.5 ppm; UV: 2 ppm), 提高了检测灵敏度。

以该方法得到的谱图如图3。

4 结果与讨论

4.1 混合型阳离子交换柱(Clearnert PCX)

三聚氰胺呈弱碱性(弱阳离子化合物), 净化过程一般应选择阳离子交换柱。混合型的阳离子交换柱(PCX)通过将磺酸基团(-SO₃H)键合在极性高聚物聚苯乙烯/二乙烯苯(PEP)吸附剂上, 具有阳离子交换和反相吸附两种机理, 并具有以下优点:

- 可通过两种不同溶液的洗涤(水/一定pH值的缓冲溶液和有机溶剂), 使样品更干净, 提高检测

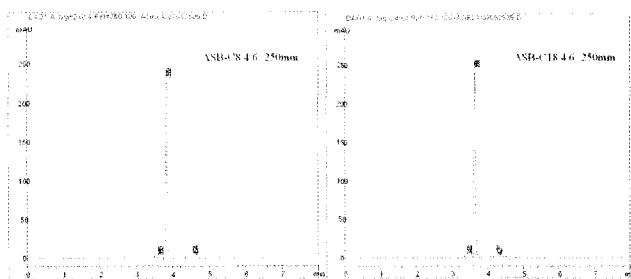


图 3 LC-MS 方法检测三聚氰胺的谱图

缓冲液: 10mM 的 NH₄AC; 流动相: Buffer: ACN=95: 5; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 样品先用 70%ACN 溶解成约 1mg/mL, 用 ACN 稀释成 0.1mg/mL, 进 10μL; 柱温: 40℃; 波长: 240nm

的灵敏度。

b) 批次重复性好。

c) 回收率高, 重现性好, 即使小柱跑干也可以得到较高回收率。

4.2 LC-MS 方法优点:

a) 检测过程简便: 无须添加离子对试剂, 三聚氰胺就可得到良好的保留与分离, 避免了配制离子对流动相的复杂过程。

b) 提高了检测的灵敏度: 无离子对试剂, 可以用于质谱检测器, 大大降低了最低检测限(MSD: 0.5ppm; UV: 2 ppm)。

c) 降低了检测成本: 不用离子对试剂, 就不再需要买价格较贵的离子对试剂了, 从而降低了检测成本。

d) 延长了色谱柱的使用寿命: 避免了使用离子对试剂减少色谱柱寿命的影响。

e) 该方法所使用的色谱柱具有通用性: 无论是用 FDA 方法、中国农业部部颁标准方法和本公司开发的 LC-MS 方法, 使用艾杰尔(Agela) ASB 系列亲水色谱柱均能得到一个很好的检测结果, 从而给客户提供了多种选择空间。

参考文献

- [1] W.C.Andersen, S.B. Turnipseed, Determination of Melamine Residues in Catfish Tissue by Triple Quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography. Laboratory Information Bulletin. vol. 23, No. 4396, 2007,
- [2] D.W. Hamilton, P.A. O' Neal, Analytical methods for the quantification of free melamine and cyanuric acid in Nylon 6/6, 6 copolymer. J. Sep. Sci., vol.26, pp.510—514,2003.
- [3] J.V. Sancho, M. Ibáñez, Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta. vol.530,pp. 237—243, 2005.

新闻动态

台湾“中研院”研发糖芯片 诊断癌症肿瘤快速准确

台“中研院”基因体研究中心研发的“糖芯片”最近有突破性发明, 仅用一小片玻璃材质糖芯片就可在极短的时间内, 方便准确的诊断癌症肿瘤、细胞感染以及病毒感染类的病症, 这个方法可用于临床诊疗, 将大幅改进医疗质量。

据“中央社”报道, “中研院”表示, “糖芯片”即为“多糖体微数组分析法”, 是“中研院长”翁启惠所领导的研发团队研究重点之一。对于在病患血液内只有极少量的抗体时, 当前的诊疗技术仍然无法检验出患者的病症; 但是, 用这个新发明的“糖芯片”却可以验证出来。

根据参与这次研究主要成员之一的梁碧惠博士后研究员表示, “这将是一个精确又自动化的医疗诊断法。只要少量的检体, 许多潜在的癌症病患可能可以诊断出来。这个方法也可能发现新的癌症生物标记, 将改变现有癌症分期的观念。此外, 透过人体细胞和病毒间的作用了解, 极细微的病毒变种也都可以完全现形。”

梁碧惠指出, 糖分子在生物体扮演重要的角色, 像是细菌或病毒的感染、免疫反应、分生或发育、癌细胞扩散等, 都和蛋白质和糖类之间的作用有关。所以, 若能解析糖分子与蛋白质到底是如何的产生作用, 就可以解决许多的生物医学的问题。