

食品及食品接触材料中三聚氰胺及其类似物 色谱检测方法研究进展

林 华¹, 陈长虹¹, 李小晶^{1,*}, 吕水源¹, 江晓芬¹, 陈旻实¹, 唐 熙¹, 井 伟¹, 陈锦权²

(1. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建 福州 350001; 2. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002)

摘 要: 本文以食品及食品包装材料中三聚氰胺及其类似物为重点, 对现有检测方法的样品提取、色谱分析、基质效应等进行综述, 为我国开展食品领域三聚氰胺及其类似物的限量制定和研究提供一定的参考。

关键词: 三聚氰胺; 三聚氰胺及其类似物; 食品及食品包装材料; 色谱; 综述;

Chromatographic Methods for the Analysis of Melamine and Analogs in Food and Food Contact Materials

LIN Hua¹, CHEN Chang-hong¹, LI Xiao-jing^{1,*}, LÜ Shui-yuan¹, JIANG Xiao-fen¹, CHEN Min-shi¹,
TANG Xi¹, JING Wei¹, CHEN Jin-quan²

(1. Technical Center of Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China;

2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Residues of melamine and its analogs in food and food contact materials have attracted extensive attentions. In this article, sample extraction, liquid chromatography analysis and matrix effect for the analysis of melamine and its analogs have been reviewed. These investigations will provide the useful references for the research and establishment of the limitation value of melamine and its analogs in the field of food in China.

Key words: melamine; melamine and its analogs; food and food contact material; chromatography; review

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0380-08

1 三聚氰胺及其衍生物概述

1.1 三聚氰胺及其衍生物的性质与应用

三聚氰胺(melamine, MEL, CAS: 108-78-1, $C_3H_6N_6$)是一种常用制备塑料、阻燃剂和其他材料的化工原料, 也是杀虫剂环丙氨嗪在动植物体内代谢产物^[1]。从化学性质上看, 呈弱碱性($pK_b=8$), 与盐酸、硫酸、硝酸、乙酸、草酸等都能形成三聚氰胺盐。由于蛋白质含量常用凯氏方法间接测量含氮量, 它不能区分非蛋白氮和蛋白氮, 因此通过掺含氮的化合物, 如在婴儿配方乳粉及宠物食品中掺杂MEL可以提高其蛋白质含量^[2-3], 添加mg MEL/kg范围时, 蛋白质含量将明显增加1%~2%; 在牛乳中可以提高约3.0%~3.4%。

三聚氰酸(cyanuric acid, CYA, CAS: 108-80-5, $C_3H_3N_3O_3$)也是重要的工业产品原料, 广泛地应用于去污粉、家用漂白剂、工业清洁生产、自动洗碗机清洁剂等^[4], 还可用作游泳池氯稳定剂, 防止蒸发和阳光破坏^[5]。三聚氰酸一酰胺

(ammelide, AMD, CAS: 645-93-2, $C_3H_4N_4O_2$)、三聚氰酸二酰胺(ammelene, AMN, CAS: 645-92-1, $C_3H_5N_5O_1$)和三聚氰酸是三聚氰胺生产过程中的副产物, 也是微生物体内三聚氰胺的代谢产物^[6-7]。三聚氰胺在中性或微碱性情况下, 与甲醛缩合成各种羟甲基三聚氰胺, 但在微酸性(pH5.5~6.5)与羟甲基的衍生物进行缩聚反应生成树脂产物。遇强酸或强碱水溶液水解, 胺基逐步被羟基取代, 先生成AMN, 进一步水解生成AMD, 最后生成CYA, 如图1所示。

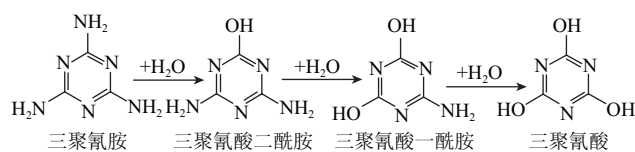


图1 三聚氰胺加碱的水解产物^[8]

Fig.1 Alkaline hydrolysis of melamine^[8]

从工业用途来看, 三聚氰胺是一种重要的氮杂环有

收稿日期: 2011-10-21

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2011Y0001); 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2011IK028);

福建出入境检验检疫局科技计划项目(FK2010-22)

作者简介: 林华(1959—), 女, 工程师, 本科, 研究方向为消费品安全。E-mail: lxjciq@hotmail.com

*通信作者: 李小晶(1976—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为消费品安全。E-mail: 79961078@qq.com

机化工中间体, 广泛用于塑料、涂料、黏合剂、纺织、皮革、阻燃剂^[1]等领域。全世界每年三聚氰胺的用量近200万t。我国是世界上最大的三聚氰胺生产、消费和出口国, 年产量约80万t。三聚氰胺通常作为聚合单体或交联剂用来生产聚合物材料, 如三聚氰胺-甲醛树脂。三聚氰胺聚合物在生产过程中如果生产工艺控制不好会影响单体聚合程度, 从而导致产品中残留三聚氰胺单体及其衍生物。从三聚氰胺应用的领域来看, 其中塑料(蜜胺塑料)、涂料、黏合剂等常用于食品接触材料的生产, 特别是蜜胺塑料生产的餐具(又称蜜胺餐具或仿瓷餐具)在日常生活中广泛使用。如果这些材料中残留的三聚氰胺单体迁移到食品中将会污染食品, 甚至危害人体健康。

有研究表明, 当人体同时摄入三聚氰胺与三聚氰酸时, 由于分子间的络和作用, 将形成更难以代谢与分解的大分子化合物(图2), 该晶体难溶于水, 易在肾脏中积聚形成结石, 堵塞肾小管, 最终导致肾衰竭^[9-10]。而长期低计量地摄入三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸二酰胺也易造成生理病变, 因此对三聚氰胺及其衍生物的研究已引起了相关领域的广泛关注。

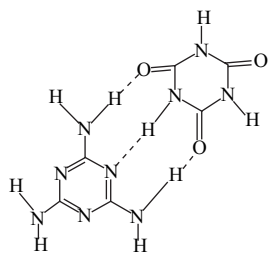


图2 三聚氰胺及三聚氰酸络合物
Fig.2 Melamine-cyanuric acid complex

1.2 三聚氰胺及其衍生物研究概况

自2007年宠物食品事件及2008年三鹿乳粉事件以来, 有关食品安全领域三聚氰胺和三聚氰酸的检测引起了分析界的高度关注。为确保人体健康和食品安全, 我国制定了三聚氰胺在乳与乳制品中的临时管理限量值: 婴幼儿配方乳粉中三聚氰胺的限量值为1mg/kg; 液态乳(包括原料乳)、乳粉、其他配方乳粉中三聚氰胺的限量值为2.5mg/kg; 含乳15%以上的其他食品中三聚氰胺的限量值为2.5mg/kg。

食品中三聚氰胺和三聚氰酸相关检测方法的报道迅速增多。目前三聚氰胺及其类似物检测方法主要有气相色谱质谱法(GC-MS)、气相色谱串联质谱法(GC-MS-MS)、液相色谱法(HPLC)、液相色谱质谱法(LC-MS)、液相色谱串联质谱法(LC-MS-MS)、毛细管电泳质谱联用法(CE-MS)等, 检测基体主要为乳制品^[11-12]、饲料^[13-14]和水产品^[15-16], 表

1列出了食品和动物饲料中现有的同时检测三聚氰胺及其类似物方法。文献[17-21]报道小麦面筋和大米蛋白浓缩物也分别检出MEL和CYA。对三聚氰胺及其类似物在动物组织中动物毒理学和病理学残留检测物的研究也在宠物食品事件后相继展开^[22-23]。

对于食品接触材料特别是蜜胺餐具中三聚氰胺及其衍生物残留量和迁移量的检测方法报道甚少^[24-25]。就检测标准而言, 目前仅有欧盟2005年制定的塑料食品接触材料中三聚氰胺迁移量的检测标准, 但该标准采用液相色谱法, 抗干扰能力和灵敏度较差, 难以准确检测低含量的三聚氰胺。而对于蜜胺餐具中三聚氰胺及其衍生物检测方法的标准研究目前仍是空白。

就研究方法而言, 可查阅最早关于三聚氰胺迁移实验的报道见于1976年Gorbunova等^[26]的研究, 在1982年, van Battum等^[27]实验中参照欧洲经济共同体(EEC)规定报道了塑料包装材料漆器、层板在脂类食品模拟物中迁移实验等。1992年, Ishiwata等^[24]评估了蜜胺餐具在长期重复使用过程中, 在食品卫生方面的恶化, 如是否会释放出三聚氰胺、甲醛或其他有毒物质。Lund等^[25]报道了液相色谱紫外检测(LC-UV)方法测定3%乙酸浸泡液中三聚氰胺, Wang Xiaoyu等^[28]以毛细管电泳串联质谱CE-MS方法测定3%乙酸浸泡液中三聚氰胺及三聚氰酸。有关多种模拟物(包括水、3%乙酸、15%乙醇、正己烷)中三聚氰胺及其衍生物高效灵敏检测方法的报道甚少^[29]。近几年, 同时检测食品接触材料中三聚氰胺及其类似物在多种模拟物的报道中, 方法主要有亲和色谱(HILC)^[30]和毛细管区带电泳(MEKC)^[31]。有关食品接触材料中三聚氰胺及其衍生物的迁移规律、污染风险评估以及相关食品接触材料中三聚氰胺的生产工艺控制研究和经济性分析方面国内外鲜有报道。

在表1所列的方法中, 串联质谱(MS-MS)选择性最好, 单级质谱(MS)次之, 最后是二极管阵列检测器(DAD)和紫外吸收(UV)。HPLC-MS-MS和GC-MS-MS的高选择性是基于从提取物中分离分析物的效果, 以及在色谱检测过程中多反应监测的使用, 这种选择性可能会提高灵敏度。紫外吸收方法选择性不足是由于很多有机化合物在200~270nm波长区间有吸收^[32], 受干扰的可能性比MS-MS要大得多, 且所需样品量更大。即使在某些特定食品基体中, 也可能存在共提取干扰。

本文将重点讨论食品 and 食品接触产品中MEL及其结构类似的化合物三聚氰酸/三聚氰酸二酰胺/三聚氰酸一酰胺的色谱及其与色谱联用的分析方法及可能分析测定方法进行讨论和评述, 为我国开展该领域的相关研究提供一定的参考。

表1 食品和食品接触产品中三聚氰胺及其类似物同时检测方法概览
Table 1 Simultaneous detection of melamine and its analogs in food or food contact materials

方法	基质	流动相	色谱柱	分析物	检测限 (LOD)	定量限(LOQ)	参考文献
GC-MS	麦麸、大米蛋白、玉米面筋、大豆、宠物食物、饲料	DEA-水-乙腈(10: 40: 50, <i>V/V</i>)	30m Agilent DB5-MS毛细管柱	MEL、AMN、AMD、CYA	2.5~1mg/kg	0.1	[33]
	牛乳及牛乳制品	MEL-CYA(1:1, <i>V/V</i>) AMN-AMD(50: 50, <i>V/V</i>) DE-水	VF-5ms石英毛细管柱 (30m×0.25mm, 0.25μm)	MEL、AMN、AMD、CYA	0.002mg/kg	0.005mg/kg	[34]
GC-MS-MS	猪肉、鱼	H2O-DEA(80:20, <i>V/V</i>)	Hewlett Packard柱	MEL、AMN、AMD、CYA	—	0.05mg/kg	[35]
	鸡肉、宠物食品	二乙胺-水-乙腈(10:40:50, <i>V/V</i>)	FactorFour™, VF-5ms™ 毛细管柱(30m×0.25mm, 0.25μm)	MEL、AMN、AMD、CYA	MEL 0.1~1000μg/L AMN 1~1000μg/L AMD 1~1000μg/L CYA 2~2000μg/L	—	[36]
HPLC-DAD	饲料大米浓缩蛋白	50/50乙醇与0.05mol/L氢氧化物	HCN柱(4.6mm×250mm, 5mm)	MEL、AMN、AMD、CYA	55~113mg/kg	65~125mg/kg	[18]
HILC-PDA	蜜胺塑料	乙腈-水-二乙胺(80:18:2, <i>V/V</i>)	C ₁₈ (4.6mm×200mm, 5mm), CN(4.6mm×250mm, 5mm) Venusil HILIC 柱 (4.6mm×250mm, 5mm)	MEL、AMN、AMD、CYA	—	0.025~0.143μg/mL	[30]
	猪肉、鱼、婴儿食品	乙腈-水(50: 50, <i>V/V</i>)	HILIC LC柱	MEL、CYA	—	0.025~0.2mg/kg	[37]
	婴儿配方乳粉	2.5%甲酸	Zwitterionic HILIC 色谱柱	MEL、CYA	—	0.25mg/ kg	[38]
	动物饲料	0.1%甲酸	ZIC-HILIC (2.1mm×150mm, 5mm)	MEL、CYA	—	0.5mg/kg	[19, 39]
HPLC-MS-MS	鲶鱼、猪肉、鸡肉、宠物食品	50%甲醇	BioBasic AX 柱(2.1×150mm, 5mm)	MEL、CYA	0.001~0.003mg/kg	—	[40]
	宠物食品	50/50乙腈	GL Science Inertsil HILIC 5μm(150mm×3mm) 柱	MEL、CYA	0.001mg/kg	—	[41]
	肾组织	50/50乙腈水	Zwitterionic HILIC LC 柱	MEL、AMN、AMD、CYA	0.092~0.14μg/g (MEL除外)	—	[23]
	宠物食品、谷物	2.5%HCl	Atlantis HILIC硅柱 (4.6×50mm, 5um)	MEL、AMN、AMD、CYA	—	—	[20]
Maldi-TofMS	面粉(小麦、大米、玉米)	乙腈	MALDI-TOF, MALDI-TOF-TOF分析LIFT™ TOF-TOF质谱 Bruker, Autoflex	MEL、AMN、AMD、CYA	4~92mg/kg	12~308mg/kg	[42]
MEKC		10mmol/L NaOH (100μL) 和25mmol/L PBS(pH2, 900μL)	Beckman Coulter MDQ 毛细管电致发光系统, 光二极管阵列检测器	MEL、AMN、AMD、CYA	—	MEL: 1.7~2800mg/L; 其他: 0.23~1.2mg/L; 4~5.0μg/L	[31]

注：—, 没有找到相关数据。

2 三聚氰胺及其类似物的提取和净化

三聚氰胺及其类似物的分析流程一般包括：样品采集、样品前处理(萃取分离、富集、净化和浓缩等)、分析与检测、数据处理和数据评价。样品前处理是整个分析过程中的重要环节，直接影响检测的效率和准确度，因此越来越受到重视。采用合适的方法对样品进行前处理，可以减小对方法检测限的影响。由于三聚氰胺及其相关化合物都是极性小分子，因此初步提取通常使用极性溶剂：包括甲酸水溶液^[28,38-39]、醋酸^[43]、盐酸^[44]、pH5的磷酸盐缓冲液^[45]、乙腈^[16]和甲醇^[40]等。这些极性溶剂广泛用于食品基质的提取，包括液态婴儿乳、鱼组织、动物饲料。提取液通常对MEL及其相关化合物并不进行特异性提取，如酸性溶剂萃取分析方法中不仅提取MEL^[39]，还有CYA^[38]。

2007年，Puschner等^[22]第一次报道了二乙胺-乙腈-水能有效溶解MEL和CYA(10mg/10mL)，随后 Filigenzi^[23]、

Litzau^[33]、Xia Jingen^[30]等的报道中均用二乙胺-乙腈-水溶解提取MEL及CYA。由于MEL与CYA是造成动物肾功能衰竭的重要原因，因此当样品为动物内脏时，MEL与CYA通常是同时检测的相关分析物。相对不溶的MEL与CYA的复合物、AMN和AMD溶解度受pH值影响^[46-47]。另据报道，通过调节pH值(pH11~12)可以使样品及标准溶液中AMN和AMD溶解^[21]。然而，其他研究小组^[18]指出，在某些pH值时，MEL、AMD和AMN会发生水解。

为了避免共萃取造成的潜在干扰从而影响方法检测限，有些方法在样品提取后采用非极性溶剂通过液液萃取去除脂肪。离心、过滤、固相萃取(SPE)是最常见提取后进一步清理样品的方法。阳离子交换和反相色谱小柱(Waters oasis MCX 和 Phenomenex strata X)常用于MEL分析^[16]，CYA常使用阴离子交换吸附剂混合模式的小柱((如Waters oasis MAX)^[37]。此外有研究^[43]报道，CYA在石墨的非多孔碳吸附剂保留比混合模式C₁₈-阳离子交换吸附剂强。

3 三聚氰胺及其类似物的检测方法

3.1 气相色谱串联质谱

气质联用技术要求待测组分沸点低、挥发性好。MEL衍生物相对不挥发,因此需衍生后才适于GC检测。仅有为数不多的研究报道了气质联用的方法分析乳品中MEL及其类似物,通常的方法是通过三甲基硅衍生后进行分析^[33,35]。美国食品药品监督管理局(FDA)首先提出了GC-MS同时检测乳品、宠物食品等食品中MEL、AMD、AMN和CYA的方法,样品经乙二胺-水-乙腈(10:40:50, *V/V/V*)提取液提取,三甲基硅衍生后,利用5%苯基95%二甲基聚硅氧烷毛细管柱分离MS检测,15min内可实现4种物质的基线分离^[33]。GC-MS方法也被开发用于MEL及其类似物4种物质的筛选^[35-36]。Miao Hong等^[34]在FDA方法基础上开发了GC-MS-MS检测牛乳及乳制品中MEL、AMD、AMN和CYA 4种目标物的分析方法,提出衍生化过程中溶剂效应的影响显著,体积比为1:1的吡啶-乙腈溶液作为衍生化溶剂时其GC-MS-MS响应值是单独使用吡啶或乙腈的3倍,而只使用吡啶时三聚氰胺衍生物的响应会受抑制。此外程序升温的最终温度从207℃提高至300℃后,运行时间从2min延长至10min,可消除2次进样带来的背景滞留干扰。同时二级质谱MS-MS也带来了优于一级质谱MS的灵敏度,使得检测限提高了一个数量级以上。

3.2 液相色谱法

由于MEL及其类似物的极性小、挥发性差,常使用高效液相色谱法进行分离检测。三聚氰胺及其类似物都含有氨基,具有较强的极性和亲水性,在传统的C₈和C₁₈反相柱上不易保留,分离度差,且易受样品中其他快速共流出杂峰干扰,因此多数研究选择离子色谱柱^[18,30]、氨基柱^[48]、氰基柱^[18]和亲水作用色谱柱^[18,22,36-37,41]等功能性色谱柱分离MEL、AMD、AMN和CYA。其他方法通常采用反相(C₈或C₁₈)HPLC柱^[23]。然而,在反相色谱柱上,由于MEL和共提取基质的极性小,使得在柱上的保留时间较短且分离度小^[21,24,45]。有些小组在反相色谱柱上使用离子对试剂,以方便分离^[24,45]。这可能并不是理想的解决方案,因为有些实验结果表明离子对试剂的使用可能会导致抑制MS电离源^[45](或减少紫外线吸收^[24])。Ehline等^[21]报道了串联多个色谱柱,以改善MEL和类似物的分离。Varelis等^[40]报道了以惰性二氧化硅-聚乙烯亚胺固定相对比二氧化硅C₁₈的亲水作用(HILIC)色谱柱上^[16],在非保留基质中,MEL有更长的保留时间且分离效果更好。

氰基柱具有独特的极性选择性,是最稳定的CN流动相之一。SF柱有一极性嵌入基团和疏水性C₁₈配体,而这双重固定相导致了均衡的选择性。当以100%含水流动相来使用时2种柱子都是非常稳定的,但它们却未曾用于分离MEL及其衍生物。

在高效液相色谱法中,由于MEL及其类似物的极性较小,包含了酸性和碱性化合物,较难用单一的固相萃取小柱净化,且乳粉及其制品样品基质较植物成分复杂,给色谱分离带来困难,易产生假阳性误判。Muñiz-Valencia等^[18]报道了LC-DAD对大米中的假蛋白三聚氰胺及其衍生物进行检测,8min内可实现4种物质的基线分离。

本实验组^[49]建立了一种用液相色谱技术检测分析食品接触材料中三聚氰胺与三聚氰酸单体迁移量的方法。样品采用水、4%乙酸和10%乙醇3种模拟物进行浸泡。色谱分离采用Phenomenex Luna NH₂柱,柱温:30℃。流动相为乙腈5mmol/L, pH6.5 PBS缓冲溶液(75:25, *V/V*),流速1.0mL/min, DAD检测波长为214nm。在优化条件下,三聚氰胺和三聚氰酸分别在0.1~110mg/L和0.3~135mg/L范围内,峰面积和质量浓度线性关系良好。此方法可同时测定食品接触材料中三聚氰胺与三聚氰酸单体迁移量。

离子色谱是基于离子交换原理的高效液相系统,其中最广泛应用的是采用低交换容量的离子交换树脂来分离的离子交换色谱。三聚氰胺及其类似物易水解电离,离子色谱将是用于开发三聚氰胺及其类似物4种物质同时检测的可选方法,目前未见相关方法对食品基体中MEL、AMD、AMN和CYA同时检测的报道。

三聚氰胺及其类似物的检测UV和DAD波长范围为200~270nm^[18,21],通常选择220nm对4种物质进行共同检测,然而CYA发色团比MEL、AMN和AMD更弱,因此其检测限往往最高。对UV和DAD检测中的应用还需要更深入的方法验证,以确保没有任何干扰物在检测所使用的波长处有吸收。总体而言,与高效液相色谱相结合UV或DAD检测器分析MEL及其类似物时选择性较差,检测器的灵敏度与选择性较MS相差甚远,LOD值比MS方法大2~3个数量级。

3.3 液相色谱质谱联用法

在液相色谱质谱联用法中需将样品过固相萃取柱富集净化后,利用电喷雾串联质谱进行检测。高选择性MS-MS法是常用的检测方法。在色谱质谱联用法中,阳离子型三聚氰胺采用了ESI正电电离模式,阴离子型三聚氰酸采用了ESI负电电离模式,两性化合物三聚氰酸一酰胺与三聚氰酸二酰胺在ESI负电电离模式下[M+H]⁺响应强度最高。通常三聚氰胺及其类似物在带有正负离子模式的HPLC-MS-MS上运行^[23,30],或在两个不同的HPLC-MS上运行^[50]。

MSⁿ分析方法要求对每个分析物至少有2个监控离子,从而使这两个转变的反应比率可以作为计算另一种分析物的识别标准。Sancho等^[45]指出,在三聚氰胺检测中存在共洗脱污染,使得该污染物与MEL共有一个转变峰。因此至少需要2个监测离子,才能确保污染物能被正确识别^[44]。MEL的监测母离子对往往是127→85和

127→68, 对应于从 $[M+H]^+$ 失去一个氰胺生成2,4-二氨基-1,3-二氮杂环丁二烯阳离子, 再失去一个氨基形成 M/Z 为68的碎片离子, CYA裂解类似于MEL^[40]。

本研究组^[51]建立了液相色谱串联电喷雾正离子源质谱(LC-ESI MS-MS)检测蜜胺餐具中三聚氰胺迁移量的方法。采用强阳离子交换柱, 流动相为乙腈10mmol/L乙酸铵-乙酸缓冲溶液(pH4.0)(40:60, V/V), 以多反应离子监测对三聚氰胺做定性定量分析。在水、3%乙酸、10%乙醇模拟物中, 三聚氰胺在3.00~130.00 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内, 目标物的峰面积和质量浓度呈良好线性关系, 检出限($R_{\text{SN}}=3$)为1.00 $\mu\text{g/L}$; 而其在橄榄油和异辛烷模拟物中的线性范围为5.00~130.00 $\mu\text{g/L}$, 检出限($R_{\text{SN}}=3$)为3.00 $\mu\text{g/L}$ 。

近年来, 其他质谱分析方法如飞行时间(TOF)质谱对三聚氰胺的分析也有报道, 与三重四级质谱相比, TOF具有更高的选择性, 且对未知物的鉴定更可靠。另外, 质谱仪的串联技术, 如四极杆飞行时间(QTOF)质谱, 可对子离子进行全扫描检测并能够精确测量母离子/子离子的相对分子质量。Teresa等^[52]报道了用即时直接分析飞行时间质谱(AccuTOF™-DART™)对宠物食品中的MEL进行四维确证, 样品经气(D)标记后无需前处理, 可给出精确至小数点后三位的质谱信息(MEL: 127.0728 $\pm$ 3.1)。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOFMS)是将固体基质与待测物混合, 然后在 N_2 激光照射下吸收辐射能量, 产生分子离子和与结构有关的结构碎片, 适合于不宜气化的大分子物质, 可以减少物质分子过分破碎。常用的基质有 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、芥子酸(SA)和2,5-二羟基苯甲酸(DHB)等。MALDI-TOF-MS^[42]也开发于检测面粉(小麦、大米、玉米)中MEL、AMD、AMN及CYA 4种物质, 以芥子酸为辅助介质在正离子MALDI模式下检测MEL、AMD及AMN, 负离子MALDI模式下检测CYA, 方法也适用于其他生物样本的初筛, 其质谱精度达到小数点后一位。

超高效液相色谱(UPLC)是色谱家族中的新成员, 其小颗粒高压技术可极大缩短分离时间并赋予分离系统更强大的性能, 如更高的柱效、更小的死体积、更好的分离度等, 其与质谱联用以开发快速灵敏的分析技术已成为热点, 与传统的LC相比, UPLC通过改善峰形、提高分离度及灵敏度以降低基体干扰。2009年, Benvenuti等^[53]开发用UPLC-MS-MS及UPLC-PDA同时检测宠物食品中三聚氰胺、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸3种物质的方法, 以2%氨水为提取溶剂, 仅用2min就实现了分离。但未对三聚氰酸一酰胺进行同时研究, 这与氨水条件下三聚氰酸一酰胺不稳定有一定关系。若使用UPLC-MS-MS对4种物质同时检测, 提取试剂的选择是需优化的关键步骤。

3.4 毛细管电泳

毛细管电泳兼有电泳和色谱的特点, 即操作简便、分析快速、稳定可靠且经济环保、分析成本低、使用的缓冲溶液全部为水相、不需要特殊的色谱柱使用普通的毛细管、毛细管和缓冲液的价格低、进样量少、消耗的缓冲液少只需1mL, 比HPLC经济、环保、分离效率高, 完成一次操作不超过20min, 但灵敏度比HPLC低。三聚氰胺与其类似物均属于极性物质, 在水中易电离, 适于毛细管电泳等基于电分离原理的分析系统。Wang Xiaoyu等^[28]报道了在线富集场放大堆积技术同时检测食品接触材料中芳香胺类物质。采用 K^+ 为前驱离子, Tris^+ 为终端离子, 检测限低至 $2.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$, 10min完成分离, 适用于奶粉样品及食品接触材料中迁移出的芳香胺物质的检测。Tsai等^[11]发展毛细管电泳在线富集快速检测婴幼儿乳粉的三聚氰胺, 报道对比了堆积和扫集富集技术在三聚氰胺检测方面的效率。场放大样品堆积技术(FASS)和扫集技术在检测三聚氰胺的极限标准分别是0.5、9.2ng/mL。虽然FASS技术比扫集技术体现出更出色的富集效率, 但前者的基体效应却非常大。基体效应是通过对比三聚氰胺的标准品和加入婴儿配方乳萃取后的增强因子(EF)来评估的。在FASS体系中, 增强因子的变化体现在从429.86 $\pm$ 9.81降低到低于133.31水平时有显著的谱峰变形, 但是增强因子在扫集系统中是保持不变的。事实证明扫集胶束电动色谱(sweeping-MEKC)是最适合于实际样品的分析。在Sweeping-MEKC方法的最优化条件下, 婴幼儿乳粉中的三聚氰胺含量可以在6min内被检测出来。固相萃取程序结合Sweeping-MEKC验证了该方法。峰面积的连续运行重现性($n=3$)和日常再现性($n=3$)分别为相对标准偏差(RSD)3.6%和4.8%以内。此相关研究结果显示Sweeping-MEKC方法作为一种快速筛选婴幼儿乳粉中的三聚氰胺的工具有着巨大的潜力。

3.5 其他方法

Shu Yifen等^[31]使用MEKC胶束电动色谱法结合反相电极堆积模式(reversed electrode polarity stacking mode, REPSM)和离子选择注射(cation selective injection, CSI)两种样品在线富集模式对蜜胺餐具及蜜胺粉制品中的三聚氰胺及其类似物的4种物质进行同时检测。其中CSI用于对三聚氰胺的富集, REPSM用于对其他3种类似物(三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸)的富集, 在线耦联MEKC后在优化的缓冲盐条件下三聚氰酸的检测限可低至1.7mg/L, 其他3种类似物的检测限可低至0.23~1.20mg/L, 能满足欧盟等国的限量要求, 并发现蜜胺餐具在80℃的酸性溶液中30min后便持续释放出三聚氰胺。

4 基质效应对三聚氰胺及其类似物在色谱中的影响

基质效应指样品中除了待测物以外的其他基质成分

对待测物测定值的影响,它在色谱分离过程中与被测物共流出的物质对被测物离子化过程产生影响,这些干扰物由样品前处理各步骤引入,文献[12,19-20,30]报道主要包括聚合物残留、酞酸盐、去污剂降解产物、离子对试剂、有机酸等离子交换促进剂、缓冲盐或SPE小柱材料及色谱柱固定相释放的物质等。近几年来,致力于消除和补偿基质效应的研究逐渐增多,除了改善样品制备或对样品进行稀释,主要包括优化质谱条件、优化色谱分离体系、多步净化措施、使用内标物定量、采用基质匹配标准曲线定量、回声峰技术等。

食品及饲料中MEL及其类似物分析中主要问题之一是存在基质效应。LC-MS普遍存在基质效应,特别是高效液相色谱质谱在ESI模式^[54-55]。基质效应常对分析物的分析有显著干扰,并影响分析结果的准确性。基质效应对三聚氰胺及其类似物在高效液相色谱分析过程中的影响已有报道。动物饲料中盐含量增加使MEL出峰变窄,缩短了HPLC-MS-MS保留时间^[19]。峰变窄是由于MEL和HILIC色谱柱的柱填料相互作用,改变了流动相离子强度。基质成分也会影响三聚氰胺及其类似物的衍生效果^[33]。在高糖样品基体中,MEL和2,6-二氨基-4-氯嘧啶(内标物)的回收率正常,但AMN、AMD和CYA回收率很低。衍生剂的加入可以增加所有分析物的回收率,AMN、AMD和CYA的低回收率是由于衍生不完全,这可能是基质成分消耗了一部分衍生剂。

在动物饲料分析中发现基质效应对三聚氰胺及其类似物电离的影响,如面筋和面粉样品中,CYA电离被抑制约70%和50%^[39]。婴儿配方乳粉样品中也观察到基质效应对MEL和CYA的信号的影响,样品提取后,MEL和CYA信号对应标准溶剂变化在±30%以内^[38]。在鱼、猪肉、婴幼儿配方乳粉样品中,MEL和CYA信号分别被抑制约50%和40%^[52]。稳定同位素标记的内标物¹⁵N₃¹³C₃-MEL和¹⁵N₃¹³C₃-CYA或基质匹配标准,用于补偿基质效应。在鲑鱼和对虾样品中,内标物对基质效应没有起到改善作用^[43]。

正确使用同位素内标或基质匹配标准液可以一定程度上减小基质效应带来的影响。目前分析中常用的三聚氰胺内标物有¹⁵N₃¹³C₃-三聚氰胺和¹³C₃-三聚氰胺,三聚氰酸内标物为¹⁵N₃¹³C₃-三聚氰酸和¹³C₃-三聚氰酸以及混合内标物。鲑鱼样品在使用内标物¹³C₃-三聚氰酸配合基质校正曲线法校正后,三聚氰酸加标回收率由原来的56.8%提高到70.6%^[43]。

5 结 语

三聚氰胺及其衍生物在食品及食品接触材料中的检测仍是未来工作的重点,三聚氰胺及其衍生物的基础研

究也是重点,某些化合物方法学方面的矛盾问题有待解决,如:三聚氰胺和三聚氰酸混合物怎样避免产生MEL与CYA复合物的生成;三聚氰胺在怎样的条件下衍生出AMN、AMD和CYA;在前处理过程中是否也发生了这些衍生。这些基础研究有助于今后工作的开展,当有必要检测AMN、AMD和CYA时,在提取三聚氰胺时,避免生成衍生物及与三聚氰酸的混合物。

目前我国出口的蜜胺餐具三聚氰胺迁移量超标情况时有发生,因此有关食品接触材料中三聚氰胺及衍生物的检测、迁移和风险分析系统研究将会成为今后一段时间的研究重点和热点。应尽快建立食品接触材料中三聚氰胺及其衍生物的单体残留量和迁移量的检测方法。开展三聚氰胺迁移规律和污染风险的系统研究,不仅有助于了解相关食品接触材料的使用安全和现有相关食品接触材料对食品的污染风险,而且对提高我国相关食品接触材料的生产水平和产品质量,保障食品安全也有重要的促进作用。此外,还可作为有关部门制定相关食品接触材料安全规范的参考依据。

就食品安全要求的趋势而言,今后的研究将更注重不需要专业检测人员也能快速有效地鉴别食品及食品接触产品是否有三聚氰胺及其衍生物。

参考文献:

- [1] CARBAS P, MELONI M, SPANEEDDA L. High-performane liquid chromatographic separation of cyromazine and its metabolite melamine[J]. *Journal of Chromatography*, 1990, 505(2): 413-416.
- [2] BARBOZA D. China's tainted-food inquiry widens amid worries over animal feed. New York[EB/OL]. (2008-11-01) [2009-03-10]. www.nytimes.com/2008/11/01/world/asia/01china.html?n¼Top/Reference/Times%20Topics/Subjects/C/Consumer%20Product%20Safety&pagewanted¼all/.
- [3] XIN Hao, STONE R. Tainted milk scandal. Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine[J]. *Science*, 2008, 322: 1310-1311.
- [4] KIRK O. *Encyclopedia of chemical technology* (Vol. 7)[M]. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1999: 834-851.
- [5] KOWALSKY L. Certified pool-SPA operator, national swimming pool fundation[J]. *Texas*, 1992: 46.
- [6] JUTZI K, COOK A M, HUETTER R. The degradative pathway of the s-triazine melamine. The steps to ring cleavage[J]. *Biochemistry Journal*, 1982, 208(3): 679-684.
- [7] SHELTON D R, KARNS J S, MCCARTY G W, et al. Metabolism of melamine by *Klebsiella terrigena*[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2832-2835.
- [8] EMSLEY A M, STEVENS G C. Advances in fire retardant materials[M]//The risks and benefits of flame retardants in consumer products. Cambridge: Woodhead, 2008: 36.
- [9] World Health Organization (WHO). Expert meeting to review toxicological aspects of melamine and cyanuric acid[EB/OL]. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Exec_Summary_melamine.pdf.
- [10] DAVIDSON M B, THAKKAR S, HIX J K, et al. Pathophysiology,

- clinical consequences, and treatment of tumor lysissyndrome[J]. *Am J Med*, 2004, 116(8): 546-554.
- [11] TSAI I L, SUN S W, LIAO H W, et al. Rapid analysis of melamine in infant formula by sweeping-micellar electrokinetic chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(47): 8296-8303.
- [12] WANG Jinyan, JIANG Lianmei, CHU Qingcui, et al. Residue analysis of melamine in milk products by micellar electrokinetic capillary chromatography with amperometric detection[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 215-219.
- [13] 赵玉娟, 李如华, 周文芳, 等. UPLC-MRM法测定饲料中的三聚氰胺[J]. *分析实验室*, 2009, 28(8): 119-122.
- [14] TRAN B N, OKONIEWSKI R, STORM R, et al. Use of methanol for the efficient extraction and analysis of melamine and cyanuric acid residues in dairy products and pet foods[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(1): 101-107.
- [15] ANDERSEN W C, TURNIPSEED S B, KARBIWNYK C M, et al. Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(12): 4340-4347.
- [16] 刘永涛, 杨红, 艾晓辉. 高效液相色谱法检测水产品中三聚氰胺的残留量[J]. *分析实验室*, 2009, 28(z1): 138-141.
- [17] 栾伟. 液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)分析宠物食品中三聚氰胺[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(Sup11): 285-286.
- [18] MUÑIZ-VALENCIA R, CEBALLOS M S, ROSALES M D, et al. Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392(3): 523-531.
- [19] HELLER D N, NOCHETTO C B. Simultaneous determination and confirmation of melamine and cyanuric acid in animal feed by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectro*, 2008, 22(22): 3624-3632.
- [20] DOBSON R L, MOTLAGH S, QUIJANO M, et al. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs[J]. *Toxicol Sci*, 2008, 106(1): 251-262.
- [21] EHLING S, TEFERA S, HO I P. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid[J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(12): 1319-1325.
- [22] PUSCHNER B, POPPENG R H, LOWENSTINE L J, et al. Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2007, 19(6): 616-624.
- [23] FILIGENZI M S, PUSCHNER B, ASTON L S, et al. Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17): 7593-7599.
- [24] ISHIWATA H, INOUE T, YAMAZAKI T, et al. Liquid chromatographic determination of melamine in beverages[J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1987, 70(3): 457-460.
- [25] LUND K H, PETERSEN J H. Migration of formaldehyde and melamine monomers from kitchen- and tableware made of melamine plastic[J]. *Food Addit Contam*, 2000, 23(9): 948-955.
- [26] GORBUNOVA V N, YASHINAA V Z, MOISEYEVA V D, et al. Study of the formation of aminoformaldehyde oligomers[J]. *Polymer Science USSR*, 1976, 18(11): 2927-2934.
- [27] van BATTUM D, RIJK M A, VERSPOOR R, et al. Draft eec method for the determination of the global migration of plastics constituents into fatty-food simulants: applicability to lacquers, plastics and laminates[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1982, 20(6): 955-959.
- [28] WANG Xiaoyu, CHEN Yi. Determination of aromatic amines in food products and composite food packaging bags by capillary electrophoresis coupled with transient isotachophoretic stacking[J]. *J Chromatography A*, 2009, 1216(43): 7324-7328.
- [29] LU Jie, XIAO Jing, YANG Dajin, et al. Study on Migration of melamine from food packaging materials on markets[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2009, 22(2): 104-108.
- [30] XIA Jingen, ZHOU Naiyuan, ZHOU Cong, et al. Simultaneous determination of melamine and related compounds by hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(17): 2688-2697.
- [31] SHU Yifen, CHEN Kuanting, LIU Yuwei, et al. Determination of melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid by micellar electrokinetic chromatography[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 673(2): 206-211.
- [32] LAMBERT J B, SHURVEL H F, LIGHTNER D, et al. Introduction to organic spectroscopy[M]//Molecular structure from electronic spectroscopy of chromophores. New York: Macmillan, 1987.
- [33] LITZAU J J, MERCER G E, MULLIGAN K J. GC-MS screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide, and cyanuric acid[OL]. *Lab Inform Bull*, 2008. www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4423.html.
- [34] MIAO Hong, FAN Sai, WU Yongning, et al. Simultaneous determination of melamine, ammelide, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2009, 22(2): 87-94.
- [35] VEYRAND B, ELAUDAIS S, MARCHAND P, et al. Identification et dosage de la melamine et de ses produits de degradation dans les aliments par chromatographie en phase gazeuse couplee a la spectrometrie de mass en tandem[J]. *Laberca*, 2008, 7: 1-15.
- [36] WANG Haibo, ED G. Chemical analysis. Application note # CA-270126 determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant milk-based formula and other food and Feed products using the 300-MS triple quadrupole GC/MS/MS[EB/OL]. <http://www.bdal.com/library/literature-room/detail-view/article/determination-of-melamine-ammeline-ammelide-and-cyanuric-acid-in-infant-milk-based-formula-and-oth/1386.html>.
- [37] SMOKER M S, KRYNITSKY A J. Interim method for the determination of melamine and cyanuric acid residues in foods using LC-MS/MS: version 1.0[R]. Laboratory Information Bulletin 4422. United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, College Park: MD, 2008.
- [38] TURNIPSEED S B, CASEY C, NOCHETTO C, et al. Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS[OL]. *Lab Inform Bull*, 2008, 24: 1-13. www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4421.html.
- [39] NOCHETTO C, HELLER D. Determination and confirmation of melamine and cyanuric acid in animal feed and ingredients by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[S]. United States Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, Laurel: MD. SOP, 2008, 510(106): 1-26.
- [40] VARELIS P, JESKELIS R. Preparation of [(13)C(3)]- melamine and [(13)C(3)]-cyanuric acid and their application to the analysis of melamine and cyanuric acid in meat and pet food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Addit Contam*, 2008, 25(10): 1210-1217.
- [41] TAYLOR A, SAKUMA T, SCHREIBER A. A new, fast and sensitive

- LC-MS-MS method for the accurate quantitation and confirmation of melamine and cyanuric acid in pet food samples[R]. Applied Biosystems, Foster City, 2008. http://www.mz-at.de/pdf/Melamine_AppNote.pdf.
- [42] CAMPBELL J A, WUNSCHER D S, PETERSENA C E. Analysis of melamine, dyanuric acid, Ammelide, and ammeline using matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry (MALDI/TOFMS)[J]. *Analytical Letters*, 2007, 40(16): 3107-3118.
- [43] KARBIWNYK C M, ANDERSEN W C, TURNIPSEED S B, et al. Determination of cyanuric acid residues in catfish, trout, tilapia, salmon and shrimp by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 637(1/2): 101-111.
- [44] TITTEMIER S A, LAU B P Y, MÉNARD C, et al. Melamine in infant formula sold in Canada: occurrence and risk assessment[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(12): 5340-5344.
- [45] SANCHO J V, IBANEZ M, GRIMALT S, et al. Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530(2): 237-243.
- [46] HE Lili, LIU Yang, LIN Mengshi, et al. A new approach to measure melamine, cyanuric acid, and melamine cyanurate using surface enhanced Raman spectroscopy coupled with gold nanosubstrates[J]. *Sens Instr Food Qual*, 2008, 2(1): 66-71.
- [47] REIMSCHUESSEL R, GIESEKER C M, MILLER R A, et al. Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fish and pigs[J]. *Am J Vet Res*, 2008, 69(9): 1217-1228.
- [48] CHOU Shinshou, HWANG Dengfwu, LEE Huifang. High performance liquid chromatographic determination of cyromazine and its derivative melamine in poultry meats and eggs[J]. *J Food Drug Anal*, 2003, 11(4): 290-295.
- [49] 井伟, 陈旻实, 李小晶, 等. HPLC同时检测食品接触材料中三聚氰胺与三聚氰酸单体迁移量[J]. *分析试验室*, 2011, 30(4): 34-38.
- [50] University of Guelph. Determination of residues of melamine and cyanuric acid in animal food by LC-MS-MS[J]. *Toxi*, 2008, 62: 1-31.
- [51] 井伟, 唐熙, 吕水源, 等. LC-ESI MS-MS测定蜜胺餐具中三聚氰胺的迁移量[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(3): 269-273.
- [52] TERESA M V, PATRICK R J. Rapid and unambiguous identification of melamine in contaminated pet food based on mass spectrometry with four degrees of confirmation[J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2007, 31(6): 304-312.
- [53] BENVENUTI M E, O'CONNOR A. Melamine, ammeline and cyanuric acid analysis by UPLC-MS-MS and UPLC-PDA[R]. Milford: Waters Corporation, 2009.
- [54] ANTIGNAC J P, de WASCH K, MONTEAU F, et al. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529(1/2): 129-136.
- [55] SCHUHMACHER J, ZIMMER D, TESCHE F, et al. Matrix effects during analysis of plasma samples by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: practical approaches to their elimination[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(17): 1950-1957.