

乳及乳制品中三聚氰胺检测方法的研究进展

谈甜甜, 朱双良, 田憬若, 孙惜时, 任 娇
(扬州大学旅游烹饪学院, 江苏 扬州 225127)

摘 要: 本文综述乳及乳制品中三聚氰胺的分析检测方法, 对其优缺点进行分析比较, 并对前处理过程中出现的问题进行讨论。

关键词: 三聚氰胺; 检测方法; 展望

Research Progress on Analytical Methods for Melamine Determination in Milk and Dairy Products

TAN Tian-tian, ZHU Shuang-liang, TIAN Jing-ruo, SUN Xi-shi, REN Jiao
(College of Tourism and Culinary Science, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: We present a review and comparison of the current methods for melamine determination in milk and dairy products. Moreover, sample pretreatment problems are discussed.

Key words: melamine; detection method; prospect

中图分类号: TS252.7

文献标识码: A

文章编号: 1671-5187(2012)05-0027-04

1 三聚氰胺的性质

三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化工原料, 主要用于生产三聚氰胺-甲醛树脂, 在食品生产加工过程中不得添加。食品中偶尔也会有微量三聚氰胺的存在, 这主要是由于三聚氰胺树脂被广泛用于食品包装材料和日用品, 食品在接触这些材料后会被污染^[1]。然而, 近年来发现, 三聚氰胺被非法添加到动物饲料和婴幼儿配方乳粉中以提高氮的含量, 从而获得高的蛋白质测定值^[2]。WHO和一些国家规定婴幼儿乳粉中三聚氰胺最大残留量为1mg/kg, 其他乳及乳制品最大残留量为2.5mg/kg。对于三聚氰胺毒性的研究已有很长时间, 结果均表明动物和人类长期超剂量摄入三聚氰胺会引起肾结石。此外, 三聚氰胺还存在许多结构类似物, 如三聚氰酸(CYA)、三聚氰酸二酰胺(AML)、黑尿酸(AMD)和灭蚊胺(CYRO), 这些物质如果在乳及乳制品中达到一定剂量同样会对食用者的健康造成影响。

2 三聚氰胺检测方法

目前用于检测乳及乳制品中三聚氰胺的分析方法有很多, 包括液相色谱法、气相色谱法、液质联用法、气质联用法、酶联免疫法等, 这些方法通常具有较高的灵敏性和广泛的适用性的特点; 根据分析时间的长短又可

分为快速检测方法和常规检测方法。

2.1 色谱检测方法

表1中列举了乳及乳制品中三聚氰胺残留量的色谱检测方法, 这些方法都是具有高的选择性和灵敏度的仪器分析方法, 如高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱法(GC)。从检测器的灵敏度上分, 最高的是串联质谱检测器(MS-MS), 其次是单质谱(MS)和二极阵列(DAD), 最差的则是紫外-可见分光光度计(UV)。

2.1.1 样品预处理

选择性的样品预处理方法对样品的分析起着至关重要的影响。液液萃取为最传统的样品预处理方法, 有时与固相萃取法结合起来使用。高灵敏度的样品预处理方法必须能够避免样品预处理过程带来的影响而获得较低的检测限。一般而言, 液液萃取的样品预处理方法能适用于不同的检测方法。

三聚氰胺是极性小分子, 通常用极性溶剂进行萃取。这些溶剂包括甲酸、乙酸、盐酸、pH5的硫酸缓冲溶液、丙烯腈或甲醇^[10-14]。提取溶剂具有通用性, 并不需要根据分析方法而特意选择。酸性提取剂不仅适用于三聚氰胺的分析方法, 同时也适合三聚氰酸的分析。研究发现^[15], 二乙胺和丙烯腈对三聚氰胺的溶解性能够达到10mg/10mL; 也有研究表明^[16], 碱性环境不但能够阻止三聚氰胺转化为三聚氰酸, 而且可以用来提取三聚氰胺和配制标准溶液, 其他研究则发现碱性环境会使三聚氰

收稿日期: 2012-06-27

作者简介: 谈甜甜(1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品成分分析研究。E-mail: tan8850@sina.cn

表1 高选择性和灵敏度的检测方法在检测乳及乳制品中三聚氰胺的应用

Table 1 Applications of selective and sensitive analytical methods for melamine determination in milk and dairy products

分析方法	样品种类	检测限(LOD)	定量限(LOQ)	参考文献
HPLC-MS/MS	牛乳	18μg/kg	60μg/kg	[3]
HPLC-MS	牛乳和乳粉		0.06mg/kg	[4]
HPLC-DAD	牛乳、酸乳和乳粉		0.2mg/kg	[5]
HPLC-UV	牛乳和乳粉	0.028μg/mL		[6]
HPLC-UV	乳粉	0.15mg/kg		[7]
HPLC-UV	乳及乳粉	0.003mg/L		[8]
高效毛细管电泳法(MEKC)	乳粉	5ng/L		[9]

表2 快速筛选和定性分析乳及乳制品中的三聚氰胺

Table 2 Fast screening and qualitative analysis of melamine in milk and dairy products

分析方法	样品种类	检测极限(DL)/%	参考文献
傅里叶变换红外光谱法(FTIR)	液体乳和乳粉	0.05	[25]
近红外光谱结合偏最小二乘算法(NIRS-PLS)	乳粉	0.01~0.1	[26]
傅里叶变换红外光谱结合偏最小二乘算法(FTIR-PLS)	乳制品	0.1	[27]
近红外光谱法(NIRS)	婴幼儿配方乳粉	0.025	[28]
近红外光谱法(NIRS)	牛乳	—	[29]
拉曼光谱结合偏最小二乘算法(LRS-PLS)	乳粉	0.13	[30]
表面增强拉曼散射(SERS)	牛乳	0.02	[31]
太赫兹时域光谱(THz-TDS)	乳粉	—	[32]
荧光光谱法(photoluminescence-spectrum)	牛乳	0.1	[33]

注：—, 没有找到相关数据。

胺、三聚氰酸二酰胺和黑尿酸水解成三聚氰酸。

除了离心和过滤处理, 固相萃取(SPE)还常用来对萃取后的样品做进一步净化。在过去的几年里, 混合离子交换逐渐代替原有的纯离子交换。近来, 反相阳离子交换小柱也被应用于三聚氰胺的分析中(如美国Waters公司生产的Oasis MCX型号和美国Phenomenex公司生产的Strata X-C型号)。

2.1.2 色谱分析

由于三聚氰胺及其类似物的极性, 以往大多数采用高效液相色谱法, 近来则越来越多地采用亲水液相色谱法(HILIC)^[17]。这些色谱法一般使用反相柱、氰基柱或氨基柱^[18-20]。其他通常使用反相(C₁₈或C₈)高效液相色谱法。但是, 三聚氰胺及其类似物在反相色谱柱上的保留量很小, 分离效果较差。为了解决这一问题, 在流动相中加入少量离子对试剂以改善在反相色谱柱上的分离效果, 但是却给MS分析带来干扰^[12,21-22]。为此, Ehling等^[16]使用串联色谱柱来提高分离效果。

Epstein等^[23]采用气相色谱法进行分析检测。然而, 气相色谱法只适合分析易挥发和极性较大的有机物, 对于三聚氰胺及其类似物, 必须经过衍生化后才能分析。目前用于衍生化的试剂主要有三甲基硅(TMS)和N,O-双三甲基硅基三氟乙酰胺/三甲基氯硅烷(99:1)^[24]。

高选择性的MS-MS常用作检测器来分析三聚氰胺及其类似物。大多数MS-MS采用选择离子监测质谱扫描模式(SIM)或多级监测扫描模式(MRM), 用化合物的保留时间和质谱碎片的丰度比定性, 用外标法定量^[24]。HPLC-

MS-MS法中, 三聚氰胺选择正喷雾电离模式(ESI⁺), 而三聚氰酸则选用负喷雾电离模式(ESI⁻)。

单级GC-MS法使用EI多级离子检测模式对三聚氰胺衍生物进行定量。这些方法与MS-MS相比, 灵敏度低, 选择性差。

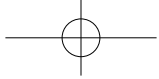
高效液相色谱法为分析三聚氰胺较常用的方法, 一般与UV和DAD检测器联用。其缺点是灵敏度和选择性不如MS。不管是UV还是DAD都是靠紫外吸收强度来定量, 吸收波长定性, 抗干扰性差, 需要更灵敏的方法进行验证以确保在同一吸收波长处不存在干扰。UV和DAD检测法的吸收波长范围为200~270nm, 通常选用214nm。然而, 三聚氰酸的发色基团不如三聚氰胺, 因此具有更高的检测限。

2.2 光谱法

色谱法测定乳及乳制品中的三聚氰胺具有高选择性和高灵敏度等优点, 被越来越广泛的应用。然而, 色谱法也存在自身的缺点, 如分析时间长、需要消耗有机溶剂、样品要进行一定的预处理, 只适合对三聚氰胺进行定性和精密定量分析。光谱法测定三聚氰胺则渐渐为人们所关注, 不但分析速度快, 而且环保。但是光谱法介于其特殊的分析原理, 只能对三聚氰胺进行定性和半定量分析, 仅仅适合现场快速筛选和检测样品(表2)。

2.2.1 光谱分析

光谱法测定乳及乳制品中三聚氰胺的含量, 主要是基于三聚氰胺中的特征基团对光谱的吸收。利用吸收波长进行定性分析, 吸收强度进行定量分析。光谱法最重



要的程序就是收集大量的数据进行建模,同时结合最小二乘法实现对乳粉中三聚氰胺的定性定量分析。

近红外光谱分析技术是近年来迅速发展起来的、根据分析物的成分和结构进行分析的快速分析方法。三聚氰胺的指纹区有多个典型吸收峰,主要有814、1031、1199、1442 cm^{-1} ,近红外区特征则在6800 cm^{-1} 左右^[27]。三聚氰胺阴性和阳性乳粉样品在红外光谱一阶导数光谱图中波长为1100~1200nm及1380~1480nm区域内存在明显差异,可以分别建立阴性和阳性两个模型进行分析^[28]。由于乳粉成分比较复杂,原始的近红外光谱的噪声和基线会发生漂移,严重影响一阶光谱图的分析,需要利用Savitsky-Golay方法进行平滑处理,二阶导数光谱建模^[26]。有研究发现^[25],用红外光谱法测定三聚氰胺时,三聚氰胺的浓度越大检测结果越准确,这正好和液相色谱法相反。

拉曼光谱作为快速无损检测技术也被用于三聚氰胺的检测中,且获得较准确的测定结果^[30]。拉曼光谱法与近红外光谱法的区别在于,拉曼光谱不需要大量的样品数据建模,只要配制一定梯度的标准曲线,分别以吸收波长和吸收强度进行定性定量分析。三聚氰胺的拉曼吸收波长一般认为在708~714 cm^{-1} 之间^[31],也有研究发现^[30]在673、982 cm^{-1} 各有一个较强的吸收峰。

太赫兹时域光谱(THz-TDS)技术是基于超快激光技术的远红外波段光谱测量新技术,它利用物质对THz辐射的特征吸收来分析物质成分、结构及其相互作用。作为又一新兴的无损检测技术,在食品安全检测领域也渐渐发挥其作用。李建蕊等^[32]尝试用THz-TDS技术分析乳粉中的三聚氰胺,并取得了一定的进展。Mu Kaijun等^[34]发现当样品中的三聚氰胺含量大于5%时,其吸收曲线与空白乳粉存在明显差异。然而,当三聚氰胺含量小于5%时,其吸收很微弱,无法进行定量分析。由此可见,要真正地将THz-TDS技术用于分析食品中的微量成分尚待进一步研究。

2.3 其他技术

除了色谱和光谱法,还有其他用于快速检测乳粉中三聚氰胺的方法,如酶联免疫法(ELISAs)、分子印迹电化学传感器法、纳米金探针法等。

2.3.1 ELISAs

现在市面上有很多用于检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒。但是能够同时检测三聚氰胺及其类似物的试剂盒却尚未问世。三聚氰胺及其类似物是否有协同效应,目前也没有相关研究。

陈俊峰等^[35]应用酶联免疫法检测生鲜乳中的三聚氰胺,发现温度对实验的结果影响相当大,而且整个孵育过程需避光处理。汤慕瑾等^[36]采用酶联免疫吸附法快速测定乳粉和液态乳中的三聚氰胺,结果表明液态乳的检

出限和相对标准差都低于乳粉样品。出现这种现象的主要原因是乳粉样品需先溶解,然后进行离心。溶解的程度会直接影响三聚氰胺的提出率,这也就很好地解释了为什么乳粉样品的检出限会高于液态乳。

2.3.2 分子印迹电化学传感器法(MIECS)

分子印迹电化学传感器融合了电化学传感器与分子印迹技术的特点,具有高的灵敏度、操作简单、费用低的特点,因此越来越受到关注。Li Jianping等^[37]采用MIECS测定牛乳中的三聚氰胺,在0.005~1 $\mu\text{mol/L}$ 范围内具有良好的线性关系,检测限为0.7nmol/L,整个实验方法重复性好,且稳定性强。

2.3.3 纳米金探针法

近年来,纳米金显色技术以其显色性能、生物相容性、稳定性和高消光系数等特性而越来越受到重视^[38]。Zhou Qingqing等^[39]以纳米金显色技术为基础,研制出了一种快速检测乳粉中的三聚氰胺的试剂盒,但该试剂盒检测牛乳基质中的三聚氰胺效果不及以水为基质的样品。这可能是因为简单的预处理无法完全去除牛乳中的蛋白质和脂肪,从而降低了试剂盒的LOD,该项技术在牛乳中的LOD为1mg/kg,小于国家标准规定(2mg/kg),能够满足日常三聚氰胺的检测。

3 结 语

现有的乳及乳制品中三聚氰胺检测方法只能检测三聚氰胺,无法同时检测其类似物或衍生物,往往造成检测结果偏低,同时还存在两方面问题:1)是否要对样品提取物进行分离,以阻止形成MEL-CYA结合物;2)提取物是否会在碱性条件下发生MEL→AML、AMD→CYA。鉴于此,以后需对现有的检测方法进行技术革新以避免这些问题的出现。

从广义上讲,将来的工作将主要为开发一种机动性、快捷和简单的样品监控方法,无实验室和专业技术的要求。这种方法能够快速鉴别乳及乳制品在生产和销售各个环节是否受到的三聚氰胺的污染,为实验室检测阶段节约时间和成本。

参考文献:

- [1] ISHIWAYA H, INOUE T, TANIMURA A. Migration of melamine and formaldehyde from tableware made of melamine resin[J]. Food Additives and Contaminants, 1986, 3(1): 63-69.
- [2] BROWN C A, JEONG K S, POPPENG R H, et al. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2007, 19(5): 525-531.
- [3] SUN Hanwen, WANG Lixin, AI Lianfeng, et al. A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high-performance liquid chromatography with solid-

- phase extraction[J]. Food Control, 2010, 21(5): 686-691.
- [4] YANG Huanghao, ZHOU Wenhui, GUO Xiuchun, et al. Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products[J]. Talanta, 2008, 80(2): 821-825.
- [5] 王新娣, 李莉, 田兰, 等. 乳制品中三聚氰胺检测方法的改进[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(3): 248-252.
- [6] LI Lang, LUO Ji, XU Qun, et al. 高效液相色谱-紫外检测法快速检测液态牛奶和奶粉中的三聚氰胺[J]. 生命科学仪器, 2010, 8(4): 27-31.
- [7] 李燕, 柴勇, 龚久平, 等. 液相色谱法测定奶粉中三聚氰胺的方法优化[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 227-229.
- [8] ZHENG Xiaolin, YU Bingsheng, LI Kexian, et al. Determination of melamine in dairy products by HILIC-UV with NH_2 column[J]. Food Control, 2012, 23(1): 245-250.
- [9] WU Wenchu, TSAI I, SUN Shaowen, et al. Using sweeping-micellar electrokinetic chromatography to determine melamine in food[J]. Food Chemistry, 2011, 128(3): 783-789.
- [10] DOBSON R L M, 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]. Toxicological Sciences, 2008, 106(1): 251-262.
- [11] 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]. Analytica Chimica Acta, 2009, 637(1/2): 101-111.
- [12] SANCHEZ 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.
- [13] 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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(12): 4340-4347.
- [14] VARELIS P, JESKELIS R. Preparation of [C-13(3)]-melamine and [C-13(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 Additives and Contaminants, 2008, 25(10): 1208-1215.
- [15] 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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(17): 7593-7599.
- [16] 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 Additives and Contaminants, 2008, 24(12): 1319-1325.
- [17] 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[EB/OL]. Foster City: Applied Biosystems. [2012-06-27]. <http://www.barascientific.com/article/Melamine/PDF/Melamine.pdf>.
- [18] FILIGENZI M S, TOR E R, POPPENG R H, et al. The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007, 21(24): 4027-4032.
- [19] MUNIZ-VALENCIA R, CEBALLOS-MAGANA S G, ROSALES-MARTINEZ D, et al. Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 392(3): 523-531.
- [20] CHOU S S, HWANG D F, LEE H F. High performance liquid chromatographic determination of cyromazine and its derivative melamine in poultry metas and eggs[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2003, 11(4): 290-295.
- [21] KIM B, PERKINS L B, BUSHWAY R J, et al. Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2008, 91(2): 408-414.
- [22] LIN M, HE L, AWIKA J, et al. Detection of melamine in gluten, chicken feed, and processed foods using surface enhanced Raman spectroscopy and HPLC[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(8): T129-T134.
- [23] EPSTEIN R L, RANDECKER V, CORRAO P, et al. Influence of heat and cure preservatives on residues of sulfamethazine, chloramphenicol, and cyromazine in muscle tissue[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 36: 1009-1012.
- [24] 中华人民共和国卫生部. GB/T 22388—2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [25] 田高友, 鲁长波, 袁洪福. 液体奶和奶粉中三聚氰胺含量红外光谱分析方法研究[J]. 现代科学仪器, 2009, 10(5): 86-89.
- [26] 丁丽, 相玉红, 张卓勇. 近红外光谱定量预测奶粉中三聚氰胺的含量[J]. 首都师范大学学报, 2010, 31(1): 26-28.
- [27] 刘景旺, 张博洋, 李树峰, 等. 近红外吸收光谱技术快速检测奶制品中添加三聚氰胺[J]. 光散射学报, 2010, 22(3): 291-297.
- [28] 钱枫, 肖海龙, 付永强, 等. 近红外光谱快速筛查奶粉中三聚氰胺定性模型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1132-1135.
- [29] 徐云, 王一鸣, 吴静珠, 等. 用近红外光谱检测牛奶中的三聚氰胺[J]. 红外与毫米波学报, 2010, 29(1): 53-56.
- [30] CHENG Yang, DONG Yiyang, WU Jinghang, et al. Screening melamine adulterant in milk powder with laser Raman spectrometry[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2010, 23(2): 199-202.
- [31] 赵宇翔, 彭少杰, 赵建丰, 等. 表面增强拉曼光谱法快速检测牛奶中的三聚氰胺[J]. 乳业科学与技术, 2011, 34(1): 27-29.
- [32] 李建蕊, 李九生, 赵晓丽. 太赫兹时域谱技术快速定性检测奶粉中的三聚氰胺[J]. 中国计量学院学报, 2009, 20(2): 131-134.
- [33] SERDIUK T, SKRYSHEVSKY V A, PHANER-GOUTORBE M, et al. Monitoring of melamine contamination in fat watery milk by the photoluminescence analysis[J]. Talanta, 2010, 82: 1543-1547.
- [34] MU Kaijun, ZHANG Cunlin. Application of terahertz spectroscopy and imaging[J]. Vestnik Novosibirsk State University, 2010, 5(4): 123-129.
- [35] 陈俊峰, 贾敬亮, 张红艳. 酶联免疫法检测生鲜乳中三聚氰胺的研究[J]. 乳业科学与技术, 2011, 34(1): 30-32.
- [36] 汤慕瑾, 张恒, 郑晓燕, 等. 酶联免疫吸附法快速测定不同样品基质中三聚氰胺[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(4): 340-343.
- [37] LI Jianping, CHEN Zhiqiang, LI Yuping. A strategy for constructing sensitive and renewable molecularly imprinted electrochemical sensors for melamine detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 706(2): 255-260.
- [38] WU Zhijiao, ZHAO Hong, XUE Ying, et al. Colorimetric detection of melamine during the formation of gold nanoparticles[J]. Biosens & Bioelectron, 2010, 26(5): 2574-2578.
- [39] ZHOU Qingqing, LIU Nan, QIE Zhiwei. Development of gold nanoparticle-based rapid detection kit for melamine in milk products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(22): 12006-12011.