

doi:10.3969/j.issn.2095-1035.2020.04.004

三聚氰胺在双色谱柱串联模式下的色谱保留研究

刘育坚¹ 余诗雨¹ 杨怡¹ 吉洋¹ 刘智敏¹
许志刚^{1*} 刘宏程² 司晓喜^{3*}

(1. 昆明理工大学理学院 化学分离与富集重点实验室, 昆明 650500;

2. 云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 昆明 650223;

3. 云南中烟工业有限责任公司 技术中心, 昆明 650231)

摘 要 研究了亲水相互作用色谱柱串联 C₁₈ 柱上三聚氰胺的色谱保留, 并应用牛奶基质中三聚氰胺的高效分离。将 HILIC 柱与 C₁₈ 柱串联, 研究不同色谱柱串联顺序及色谱分离条件下三聚氰胺的保留情况, 结果表明: 当流动相为乙腈-乙酸铵(10 mmol/L)=85:15(v/v)、柱温 30 °C、流速 0.75 mL/min、检测波长 220 nm、HILIC 柱在前 C₁₈ 柱在后串联时, 三聚氰胺分离效果最佳。在最佳的色谱条件下, 对市售牛奶进行测定, 未检测出三聚氰胺, 加标回收率在 81.1%~119%, 三聚氰胺在双柱模式下分析效果良好。

关键词 柱串联; HILIC 柱; C₁₈ 柱; 三聚氰胺

中图分类号: O657.7; TH833

文献标志码: A

文章编号: 2095-1035(2020)04-0018-04

The Chromatographic Retention of Melamine on Dual Chromatographic Columns Tandem

LIU Yujian¹, YU Shiyu¹, YANG Yi¹, JI Yang¹, LIU Zhimin¹, XU Zhigang^{1*},
LIU Hongcheng², SI Xiaoxi^{3*}

(1. Faculty of Science, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China;

2. Institute of Quality Standard and Testing Technology, Yunnan Academy of Agriculture Science, Kunming, Yunnan 650223, China;

3. R & D Center of China Tobacco Yunnan Industrial Co. Ltd., Kunming, Yunnan 650231, China)

Abstract The chromatography retention of melamine was studied by a hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column tandem C₁₈ column, which also applied on the efficient separation of melamine in milk matrix. The chromatographic conditions were optimized. The best separation results could be obtained under the conditions of acetonitrile—10 mmol/L ammonium acetate solution(85:15, v/v) mobile phase, 30 °C column temperature, 0.75 mL/min flow rate and the column order of HILIC column tandem C₁₈ column. This method was applied to detect melamine in some of the milk samples. The recovery was 81.1%—119%. The melamine was analyzed effectively under dual chromatographic columns tandem mode.

Keywords column tandem; hydrophilic interaction chromatography column; C₁₈ column; melamine

收稿日期: 2020-01-20 修回日期: 2020-02-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(21565018); 云南省重点研发计划项目(2018BC005-04); 云南中烟工业有限责任公司重点项目(2018JC05); 昆明理工大学大学生课外学术科技创新基金(2018BA387); 昆明理工大学分析测试基金项目(2017M20162111056, 2017M20152111050)

作者简介: 刘育坚, 男, 硕士研究生, 主要从事色谱分析研究。

* **通信作者:** 许志刚, 男, 教授。E-mail: chemxuzg@kust.edu.cn

司晓喜, 男, 教授。E-mail: sixiaoxi2006@126.com

本文引用格式: 刘育坚, 余诗雨, 杨怡, 等. 三聚氰胺在双色谱柱串联模式下的色谱保留研究[J]. 中国无机分析化学, 2020, 10(4): 18-21.

LIU Yujian, YU Shiyu, YANG Yi, et al. The Chromatographic Retention of Melamine on Dual Chromatographic Columns Tandem[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2020, 10(4): 18-21.

前言

与常见的反相液相色谱(RP-LC)不同,亲水相互作用色谱(HILIC)是一种适用于保留和分离极性分析物的方法^[1]。然而,C₁₈柱对复杂样品中的杂质成分依旧具有良好的分离能力,将两种方法进行一个简单的组合,即将HILIC色谱柱串联C₁₈色谱柱,不仅能有效分析目标物,还能一定程度分离杂质组分。双柱串联技术已在糖精钠^[2]、氨基酸^[3]和胺类化合物^[4]的高效分析检测中得到了应用。

三聚氰胺,又名1,3,5-三嗪-2,4,6-三胺,主要用于生产黏合剂、塑料、层压板和胶水等^[5]。但是,由于其价格低廉、氮含量高,三聚氰胺曾被非法添加到食品(例如奶制品、婴儿配方奶粉)和动物饲料中以增加表观蛋白质含量。尽管,三聚氰胺的毒性较低,但是长期食用含三聚氰胺的食品会导致肾结石,最终导致肾衰竭^[6-7]。早在2007年,宠物食品被掺入三聚氰胺,引起许多宠物的肾衰竭,甚至死亡^[8]。一年之后,一家中国乳制品公司生产的婴幼儿奶粉中发现三聚氰胺,导致许多婴幼儿出现泌尿问题,并有六名死亡案例,事件引起了广泛的社会关注^[9-10]。2011年,我国将婴儿配方奶粉的三聚氰胺标准限值设定为1 mg/kg,其他食品设定为2.5 mg/kg。由于三聚氰胺是一种弱碱、亲水性的有机物,已报道的方法常采用常规的反相液相色谱分析,为了适用在复杂的样品中分析,本文研究了三聚氰胺在双柱串联模式下的色谱保留,并进一步应用于实际牛奶样品中三聚氰胺的高效分离。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪(配备自动进样器、DAD检测器),HILIC色谱柱(150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm,天津博纳艾杰尔科技有限公司),Innoval ASB C₁₈色谱柱(50 mm×4.6 mm I.D., 5 μm,天津博纳艾杰尔科技有限公司),SC-04 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),PS-20 洁康超声波清洗机(东莞洁康超声波设备有限公司)。

甲醇和乙腈(色谱纯,北京百灵威科技有限公司),三聚氰胺(99%,上海麦克林生化科技有限公司),氯化钠(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司),醋酸铵(98%,西陇化工股份有限公司),纯净水为娃哈哈纯净水,所用的牛奶均购于本地超市。

1.2 实验方法

采用逐级稀释法,以乙腈:水(50:50, v/v)为

溶剂,准确称取一定量的三聚氰胺,配制成浓度为0.1、0.5、1、2、5和10 mg/L的溶液。流动相乙腈-乙酸铵(10 mmol/L),检测波长220 nm,进样量20 μL。对不同类型的色谱柱、流动相组分、柱温和流速等分离条件进行优化,其中 k 为容量因子。

2 结果讨论

2.1 色谱柱的优化

研究不同类型的色谱柱对三聚氰胺分离效果的影响,流动相为乙腈-乙酸铵(10 mmol/L)=90:10(v/v),柱温30℃,流速0.8 mL/min,检测波长220 nm,将三聚氰胺在四种色谱柱模式下进行分离,包括柱串联模式和单柱模式。结果如图1所示,高有机相条件下,三聚氰胺在C₁₈柱上很难被保留,色谱峰在溶剂峰之前。而三聚氰胺则能被HILIC柱保留。将两根机理不同的色谱柱进行串联,三聚氰胺在这两种模式下都能得到保留,且保留时间相比单根HILIC柱要长。并且,在HILIC柱在前C₁₈柱在后的串联模式(图1b)下,三聚氰胺的保留效果要优于C₁₈柱在前的HILIC柱在后的串联模式(图1a)。因此,选择HILIC柱在前C₁₈柱在后的串联模式进行分离。

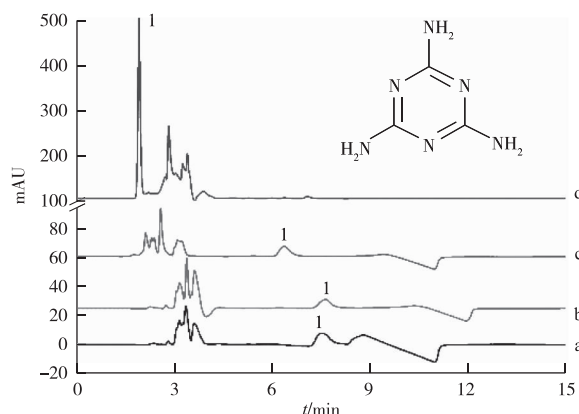


图1 不同类型的色谱柱分离三聚氰胺的色谱图
a—C₁₈柱在前 HILIC 柱在后;b—HILIC 柱在前 C₁₈柱在后;
c—HILIC 柱分析;d—C₁₈分析;1—三聚氰胺
Figure 1 Separation of melamine under different column modes.
a—Separation by C₁₈ tandem HILIC column;b—Separation by HILIC tandem C₁₈ column;c—Separation by HILIC;
d—Separation by C₁₈;1—Melamine

2.2 流动相比比例的优化

在HILIC柱在前C₁₈柱在后的串联模式下,对流动相的比例进行优化,色谱条件为乙腈-乙酸铵(10 mmol/L),柱温30℃,流速0.8 mL/min,检测波长220 nm。结果如图2所示,当有机相的比例越大,HILIC柱相较于C₁₈柱的保留能力强,三聚氰胺

的保留时间越长,此时 HILIC 柱的保留能力起主要的作用。兼顾分离效果和分析效率,以乙腈-乙酸铵(10 mmol/L)=85:15(*v/v*)为最佳的流动相比例。

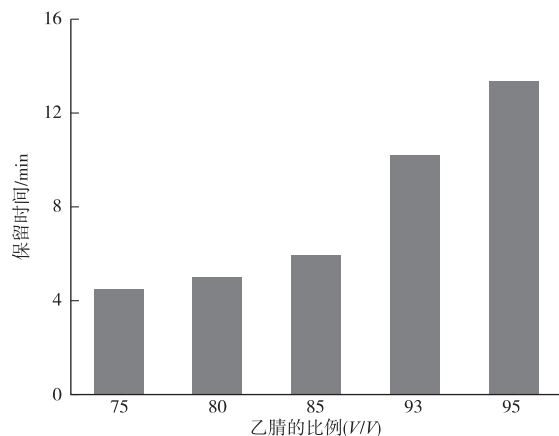


图2 流动相对三聚氰胺保留时间的影响

Figure 2 Effects of the proportion of mobile phase to the retention time of melamine.

2.3 柱温的优化

在乙腈-乙酸铵(10 mmol/L)=85:15(*v/v*),流速 0.8 mL/min,检测波长 220 nm 的条件下,进行柱温优化。结果如图 3 所示,三聚氰胺在 15~35 °C 的柱温范围下,保留时间在 5~6 min,保留时间变化不明显。然而柱温在 30 °C 时,色谱峰形较好,并且此时的色谱柱压力较低,目标峰与溶剂峰有明显的距离,便于观察。因此,选择最佳的柱温为 30 °C。

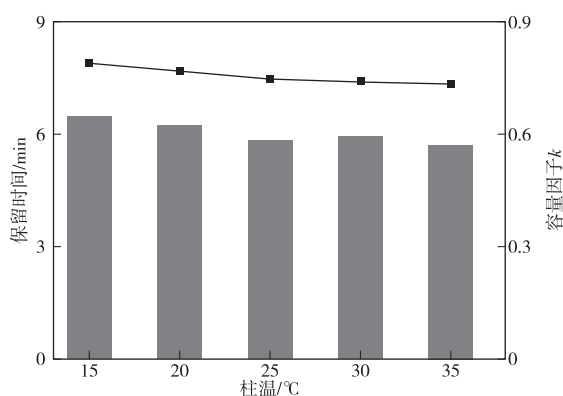


图3 柱温对三聚氰胺分离的影响

Figure 3 Effects of the column temperature to the retention time of melamine.

2.4 流速的优化

流速是影响柱分离的重要条件之一。在乙腈-乙酸铵(10 mmol/L)=85:15(*v/v*),柱温 30 °C,检测波长 220 nm 的色谱条件下,考察不同的流速(0.70~0.90 mL/min)下对三聚氰胺色谱分离的影响。结果如图 4 所示,随着流速增大,保留时间减少,比照不同流速的效果,兼顾分离分析效率,当流

速为 0.75 mL/min 时,峰形较好,出峰时间适当。因此,0.75 mL/min 为最佳的流速。

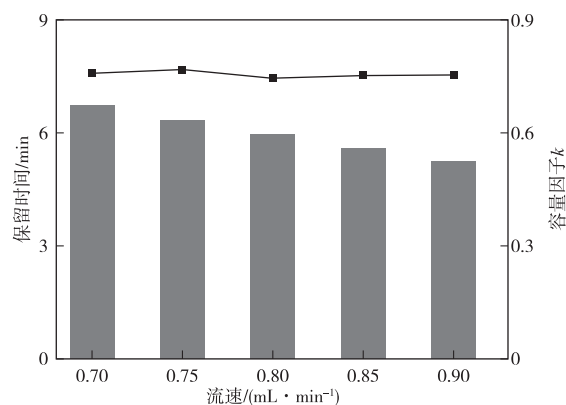


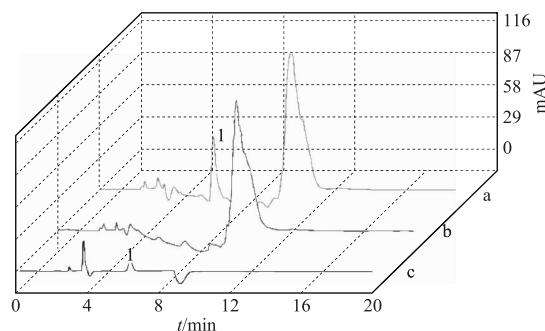
图4 流速对三聚氰胺分离的影响

Figure 4 Effects of the flow rate to the retention time of melamine.

2.5 实际样品测定

通过系列不同浓度的三聚氰胺标准溶液绘制曲线,线性方程为 $Y=2.5071X-0.0960$, $R=0.9999$ 。结果表明,三聚氰胺在 0.01~10.0 mg/L 范围内线性关系良好。三聚氰胺检出限($S/N=3$)为 0.01 mg/L。所建立的方法进一步用于实际样品中三聚氰胺含量的测定,以市售四种牛奶作为实际样品。移取 1.0 mL 液体,加入 0.5 g 氯化钠,振荡混合均匀后,加入 3.0 mL 乙腈,振荡混合均匀,超声 5 min。然后加入 3.0 mL 水,在 4 000 r/min 的转速下离心 10 min。色谱分析前用 0.45 μm 滤膜过滤后,按最优的色谱条件进行测定,每份样品测定 3 个平行样。

为进一步验证所建立方法的可靠性,分别对样品进行加标回收实验,加标浓度分别为 0.2、1.0 和 5.0 mg/L,在最佳的条件下进行测定,测定其加标回收率和相对标准偏差。分析结果如表 1 所示,色谱图如图 5 所示。从图 5 中可以看出,三聚氰胺



a—牛奶样品加标 5.0 mg/L; b—牛奶实际样品;
c—1.0 mg/L 三聚氰胺标准溶液; 1—三聚氰胺

图5 牛奶样品色谱图

Figure 5 Chromatograms of milk sample.

表 1 实际样品中三聚氰胺的测定
Table 1 The detection of melamine in real samples

牛奶样品	本底值测定/ (mg · L ⁻¹)	加标检测(n=3)		
		加标量/(mg · L ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
样品-1	-	0.2	96.2	8.3
		1.0	109	3.0
		5.0	102	2.7
样品-2	-	0.2	81.1	6.7
		1.0	108	9.5
		5.0	116	4.1
样品-3	-	0.2	84.4	6.1
		1.0	98.7	5.3
		5.0	83.7	2.3
样品-4	-	0.2	90.5	2.4
		1.0	98.5	5.1
		5.0	119	8.6

目标峰与溶剂峰、基体中的干扰峰均有较好的分离,分析时间短、效率高。三聚氰胺的回收率在 81.1%~119%,满足实际样品的分析需要。

3 结论

三聚氰胺是广受关注的食品基质中的分析对象,由于极性较强,在常规色谱柱上的保留差。本文研究了三聚氰胺在 HILIC 柱串联 C₁₈ 柱上的保留,三聚氰胺在双柱模式下与溶剂峰及牛奶基质中的干扰峰得到有效分离,且能够高效分离和测定牛奶样品中的三聚氰胺,并取得了满意的回收率。本文的色谱柱串联分析方法也为色谱工作者分析复杂样品中痕量组分提供了一种新的思路。

参考文献

[1] 刘育坚,王丹,许志刚. HILIC 色谱柱拆分抗坏血酸对映体及其在药物分析中的应用[J]. 化学研究, 2017, 28(6):726-729.
LIU Yujian, WANG Dan, XU Zhigang. Enantiomeric separation of ascorbic acid by HILIC column and its application in drug analysis[J]. Chemical Research, 2017, 28(6):726-729.

[2] 刘育坚,董琪,刘智敏,等. 亲和柱串联 C₁₈ 柱高效液相色谱法分离糖精钠[J]. 分析试验室, 2019, 28(9): 1048-1050.
LIU Yujian, DONG Qi, LIU Zhimin, et al. Separation of saccharin sodium by high performance liquid chromatography of hydrophilic interaction column tandem C₁₈ column[J]. Chinese Journal of Analysis

Laboratory, 2019, 28(9):1048-1050.

[3] 许志刚,王丽,刘育坚,等. 液相色谱柱串联技术高效分离酒样中的手性芳香氨基酸[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2019, 44(3):102-107.
XU Zhigang, WANG Li, LIU Yujian, et al. Effective separation of aromatic amino acids in alcohol samples by C₁₈ column tandem crown ether chiral column[J]. Journal of Kunming University of Science and Technology (Natural Science), 2019, 44(3):102-107.

[4] 朱丽波,徐能斌,冯加永,等. 双柱串联-超高效液相色谱-质谱法检测水中的 4 种胺类物质[J]. 分析化学, 2013, 41(4):594-597.
ZHU Libo, XU Nengbin, FENG Jiayong, et al. Simultaneous determination of acrylamide, caprolactam, benzidine and aniline by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with two coupled columns[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(4):594-597.

[5] 唐宁莉,李欣,蒙华毅,等. 能量转移荧光法测定牛奶中的三聚氰胺[J]. 化学世界, 2013, 54(4):204-206.
TANG Ningli, LI Xin, MENG Huayi, et al. Determination of melamine in milk by fluorescence energy transfer method[J]. Chemical World, 2013, 54(4):204-206.

[6] WANG T T, MA J F, CHEN Y H, et al. Analysis of melamine and analogs in complex matrices; Advances and trends[J]. J. Sep. Sci., 2017, 40(1):170-182.

[7] HAN M M, GONG L, WANG J Y, et al. An octuplex lateral flow immunoassay for rapid detection of antibiotic residues, aflatoxin M1 and melamine in milk[J]. Sens. Actuators B, 2019, 292:94-104.

[8] 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]. Toxicol. Sci., 2008, 106(1):251-262.

[9] XU X M, REN Y P, ZHU Y, et al. Direct determination of melamine in dairy products by gas chromatography/mass spectrometry with coupled column separation[J]. Anal. Chim. Acta, 2009, 650(1): 39-43.

[10] SUH J H, JUNG J, KIM B, et al. Development of aqueous mobile phase using chaotrope for the chromatographic determination of melamine in infant formula[J]. J. Chromatogr. A, 2017, 195:174-179.