

食品和饲料中三聚氰胺检测方法研究进展

朱瑾娜, 李方实*

(南京工业大学理学院应用化学系, 江苏 南京 210009)

摘要: 三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物。由于其较高的含氮量而被添加于食品和饲料中, 对动物和人体造成了一定的危害。本文综述了近期的食品和饲料中三聚氰胺检测的样品前处理技术和分析方法, 主要包括高效液相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-质谱法和酶联免疫法等。

关键词: 三聚氰胺; 分析方法; 综述

Recent Advance in Determination Methods of Melamine in Foods and Animal Feeds

ZHU Jin-na, LI Fang-shi*

(Department of Applied Chemistry, College of Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: Melamine is a small polar triazine compound. Due to its rich in nitrogen, it has been added to give a false impression of high protein content. Melamine added to food and animal feeds could possibly cause fatal kidney stones. Determination of melamine is therefore of large importance to ensure food safety. This article reviewed the modern methods of sample preparation and determination of melamine in foods and animal feeds including high-performance liquid chromatography, gas chromatography-mass spectrometry, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay.

Key words: melamine; analytical methods; review

中图分类号: R155.5; O657

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0276-04

三聚氰胺(melamine), 简称三胺, 是一种三嗪类含氮杂环有机化合物。

三聚氰胺是一种重要的氮杂环有机化工原料, 能与各种酸反应生成三聚氰胺盐。三聚氰胺在强酸或强碱溶液中水解, 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。三聚氰胺与甲醛反应制成的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、地板砖、厨房用具、防火纤维、商业滤膜、胶水和阻燃剂^[1]。三聚氰胺还是杀虫剂灭蝇胺、杀菌剂井冈霉素等的代谢产物。

食品工业中常需要测定食品的蛋白质含量。由于直接测量蛋白质技术比较复杂, 所以常用凯氏定氮法间接确定食品中蛋白质的含量。由于三聚氰胺(含氮量 66%)与蛋白质(平均含氮量 16%)相比含有更高比例的氮原子, 而目前我国还没有将三聚氰胺纳入食品检测标准, 所以三聚氰胺常被投机者用作食品添加剂, 以提升食品检测中的蛋白质含量指标。

2007年3月中旬以来, 美国发生4000多起猫、狗

等宠物中毒死亡事件。美国食品药品监督管理局从进口的部分小麦蛋白粉和大米蛋白粉中检出三聚氰胺等成分。三聚氰胺是一种禁止用于宠物食品及动物饲料的化学物质, 动物食用后可以使动物发生肾衰竭并导致死亡^[2]。2008年9月, 中国爆发三鹿婴幼儿奶粉受污染事件, 导致食用了受污染奶粉的婴幼儿产生肾结石病症, 其原因也是奶粉中含有三聚氰胺。

食品和饲料中三聚氰胺的检测已成为食品安全研究领域的一个重要内容。由于各类食品的组成成分复杂, 而三聚氰胺的含量较低, 所以急需发展简单、快速、有效的样品处理技术以及具有高灵敏度和选择性的检测方法。本文综述了目前国内外检测食品和饲料中的三聚氰胺的样品前处理技术和分析方法。

1 样品前处理技术

由于食品饲料中三聚氰胺的含量较低, 干扰物质多, 所以样品的前处理是分析工作中至关重要的一环。分析方法的检出限、回收率和准确度都与样品的萃取净化分离效果密切相关。

收稿日期: 2008-10-07

作者简介: 朱瑾娜(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境分析化学。E-mail: zhujinna2001020304@163.com

* 通讯作者: 李方实(1956-), 男, 教授, 博士, 研究方向为环境分析化学。E-mail: fangshi.li@njut.edu.cn

样品前处理包括三聚氰胺的提取、净化和浓缩。提取是用适当的溶剂将三聚氰胺和样品基质从固相样品中转移到易于净化和分析的液态；净化是指将三聚氰胺与提取液中的干扰基质分离。

液-液萃取是最常用的一种分离萃取技术。其样品处理简单，设备要求低。常用的提取剂有50%乙腈水溶液^[3]、甲醇^[4]、磷酸盐缓冲溶液(pH 2)^[5]等。超声波辅助萃取^[2,6]，极大地提高了萃取分离效果。

固相萃取技术是目前常用的净化手段。其原理与液相色谱相似，利用固体吸附剂将液体样品中的目标化合物吸附，与基体及干扰物质分离后，再用洗脱液将其洗脱，达到分离和富集的目的。三聚氰胺化学结构中含有3个伯胺基团，在酸性条件下会形成正离子，因而可采用强阳离子^[7-8]或混合阳离子固相萃取柱对样品进行净化。

因三氯乙酸有沉淀蛋白的作用，并且在酸性条件下有助于三聚氰胺的溶解，刘梅等^[9]采用1%三氯乙酸作为提取剂。经过不同固相萃取柱的试验，发现OASIS MCX的净化作用及回收率最好。

为检测植物性原料中的三聚氰胺，宫小明等^[10]尝试了乙腈、乙腈-水(1:1, V/V)溶液、水作为提取试剂，最终确定用水作为提取溶剂。前两种提取方式提取的杂质较多，不易除去。而用水提取效率高，杂质少，易于净化，同时价格便宜，对人体和环境都无害。净化方式尝试了强阳离子柱富集净化和10%亚铁氰化钾、20%乙酸锌溶液作为沉淀剂净化，后一种方式操作经济、简便、易行，更易于平常检测中。

丁涛等^[11]测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺采用HPLC-DAD和HPLC-MS/MS两种方法。对于HPLC-DAD，比较了甲醇、甲醇-水(1:1, V/V)、乙腈、乙腈-水(1:1, V/V)、水和1%三氯乙酸水溶液超声波提取样品。结果发现，纯有机溶剂的提取回收率低，其余溶剂的提取效率相近。由于三氯乙酸能沉淀蛋白质，而高含量的三氯乙酸会对色谱分析中的峰形产生较大影响，最终采用1%三氯乙酸水溶液作为提取剂。对于HPLC-MS/MS，则先用1%三氯乙酸超声波提取，再用强阳离子交换柱(SCX SPE)净化。通过水和甲醇的淋洗可以除去样品中水溶性的杂质、无机盐和非离子化的脂溶性杂质，且没有污染质谱的喷雾口。

2 分析方法

2.1 高效液相色谱法(HPLC)

HPLC是目前应用比较广泛的测定方法之一。较常用的色谱柱有C₈柱、C₁₈柱，检测器有二级管阵列检测器(DAD)和紫外检测器(UV)。

因三聚氰胺结构中含有胺根，具有较强的极性，使其在传统的反相键合相上保留很差，接近于死时间流出，不能进行分析。为了增加三聚氰胺在传统色谱柱上的保留，必须选用洗脱能力非常弱的流动相，通常选用的流动相有水-乙腈、甲醇-水、醋酸胺缓冲溶液-甲醇、0.1%甲酸溶液-甲醇等。

由于三聚氰胺极易与C₁₈柱上残余的硅醇基形成氢键，使峰型拖尾，因此经常将辛烷磺酸钠^[12]，庚烷磺酸钠^[3]等离子对试剂加入到流动相中，使其与样品离子结合生成弱极性的离子对来改善峰型。美国食品药品监督管理局(FDA)公布的《Updated FCC Developmental Melamine Quantitation (HPLC-UV)》线性范围为1.0~400mg/ml。我国农业行业标准NY/T 1372—2007《饲料中三聚氰胺的测定》也采用了这一办法。文献[10]报道在流动相中加入高氯酸可增加三聚氰胺的保留时间并改善峰型。还有采用依次连接两根C₁₈色谱柱的办法^[4]，大大延长了分析物的保留时间，三聚氰胺的检出限为5 μg/g。Mohammed等^[6]采用亲水作用色谱分离测定了药物中的三聚氰胺。亲水作用色谱柱中硅胶固定相吸附流动相中的水在表面形成一薄层水层，物质的分离即可能基于其在此水层和弱极性的流动相(一般为有机相)间的相互作用。物质极性越强，在亲水作用色谱中的保留时间也越长，由此达到分离的目的。三聚氰胺的检出限为25ng/ml(S/N = 3.8)，最低检出量为75ng/ml(S/N = 11.2)。

2.2 气-质和液-质联用(GC-MS, HPLC-MS)

气质联用法是将气相色谱仪的分离系统与质谱仪的检测系统联接起来，GC-MS系统既发挥了色谱法的高分离能力又发挥了质谱法的高鉴别能力，同时达到定性定量的检测目的。美国食品药品监督管理局颁布了《GC-MS Screen for the Presence of Melamine and Cyanuric Acid》，提供了麦麸和动物食品中的三聚氰胺的分析方法。称取0.5g样品，用甲醇超声萃取后采用三甲基硅烷衍生化法进行气质测定。此法能检出低于0.01%(重量)水平的三聚氰胺。我国农业行业标准NY/T 1372—2007《饲料中三聚氰胺的测定》将GC-MS法作为确证法。该法用三氯乙酸溶液提取试样中的三聚氰胺，经混合型阳离子交换固相萃取柱净化，用N,O-双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)衍生化后用气质联用仪测定。但是由于此法仪器昂贵，还需要衍生化，目前在国内外尚未广泛应用于三聚氰胺的检测工作。

液质联用法^[13-14]不仅可以排除基质干扰，而且还能提供待测物的结构信息，是目前国内外应用最多的检测手段。

与质谱联用时，离子交换色谱因缓冲液具有高离子强度而不适合电喷雾接口。离子对色谱的应用也主要取

决于选用的离子对试剂。只有挥发性的离子对试剂才能适用于电喷雾接口,从而实现液质联用。Petritis 等^[15]研究表明,低浓度的离子对试剂如五氟丙酸、七氟丁酸、全氟庚酸等可用于液质联用的电喷雾接口。

Sancho^[15]研究了一种灵敏度高、选择性好的方法测定甜菜试样中的灭蝇胺及其代谢物三聚氰胺。样品首先用磷酸盐缓冲溶液和甲醇萃取分析物,然后在待测物中加入离子对试剂全氟庚酸,采用液相色谱联合电喷雾接口串联质谱仪分析测定。该法的检出限低于 0.01mg/kg,两种目标物的检出下限均为 0.05mg/kg。

黄芳等^[16]研究表明,在流动相中加入 1% 甲酸作为离子对试剂,不仅改善了三聚氰胺的保留时间,还有利于其分子离子化,提高了灵敏度。线性范围为 0.01~0.5mg/L,检出限 0.01mg/L(S/N = 3),回收率为 80%~99%。

由于在流动相中添加离子对试剂限制了液质联用的使用,因此选择适合的色谱柱在不使用离子对试剂的情况下也可用于质谱检测是很重要的。李爱军等^[2]试验了安捷伦、沃特斯等不同公司、不同型号的色谱柱,最终选择 Agilent XDB C₁₈(150mm × 2.1mm, 3.5 μm)。以 20% 水-80% 乙腈作为流动相,对 46 批饲料样品做三聚氰胺的液相色谱-串联质谱测定,检出限为 0.2mg/kg,完全满足饲料制品安全检测的需要。艾杰尔科技公司^[11]采用 Agela ASB 系列亲水色谱柱对三聚氰胺进行 LC-MS 检测,无须添加离子对试剂也能得到良好的保留与分离,相对于 FDA 公布的 HPLC-UV 方法大大降低了最低检测限(MSD: 0.5×10^{-6} ; UV: 2×10^{-6}),提高了灵敏度。

Andersen 等^[17]在测定鱼虾类体内三聚氰胺残留时也使用亲水作用色谱硅胶柱有效地将三聚氰胺与其同系物和基质分离,连接三重四极杆串联质谱仪,采用电喷雾电离源,正离子模式,选择反应监控扫描进行定性定量分析。在研究的 5 种鱼种中三聚氰胺的平均回收率为 63.8%(n = 121),此法的检测限为 3.2×10^{-9} 。

蔡勤仁等^[18]建立了饲料中三聚氰胺的超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)测定方法。选择对极性化合物有很好保留的 ACQUITY BEH HILIC 色谱柱极性分离,获得了稳定的保留时间,与传统的 HPLC 分离方法相比,UPLC 的分离使得分析时间大大缩短,定量下限达到 10 μg/kg。

2.3 酶联免疫检测法(ELISA)

Kim^[19]分别采用酶联免疫法(EIA)、高效液相色谱法-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)和超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定了动物食品中的三聚氰胺。EIA 和 HPLC-DAD 的检测限分别为 0.02 μg/ml 和 0.1 μg/ml,线性范围分别为 0.02~0.5 和 0.1~500 μg/ml。相比于色谱的方法,酶联免疫法操作较为简单,特异性强,灵

敏度高,适于现场大量样本的筛查,并且不需要昂贵的仪器和复杂的样品制备过程。

目前市场上已有不少检测三聚氰胺的酶联免疫吸附分析试剂盒。国外的有 Rome Labs 公司的 AgraQuant Melamine Test Kit、Beacon Analytical Systems 公司的 Beacon Melamine Plate Kit、Abraxis 公司的 Melamine Plate kit 和 Strategic Diagnostics 公司的 EnviroGard Triazine Plate kit 等。

美国 Abraxis 公司^[20]的三聚氰胺试剂盒的检测限为 9ng/ml,可检测到添加在狗粮中的三聚氰胺,检出限为 1 μg/ml。Strategic Diagnostics 公司的检出限为 1.5mg/ml。

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所的三聚氰胺试剂盒中的特异性抗体是由三聚氰胺与载体蛋白偶联物作为免疫原通过免疫动物制得的兔抗多克隆抗体。酶标三聚氰胺采用琥珀酸酐法将三聚氰胺与辣根过氧化物酶偶联。使用时首先将样品中的三聚氰胺萃取出来,用含有 0.1% 吐温-20 磷酸盐缓冲液稀释。然后将样本或三聚氰胺标准品溶液样品萃取液和标准品以及酶标三聚氰胺一起加入包被有三聚氰胺抗体的酶标板孔中,孵育,待测样品中的三聚氰胺与酶标三聚氰胺竞争固相化的三聚氰胺抗体,通过洗涤剂(含有 0.05%~0.5% 吐温-20 磷酸盐缓冲液)洗涤除去未结合的酶标记物,加入显色剂(过氧化氢或过氧化脲+邻苯二胺或四甲基联苯胺)、终止剂(2mol/L 盐酸溶液)后用酶标仪测定吸光度,该值与样品中三聚氰胺的量呈负相关,与标准曲线比较即可得出三聚氰胺的浓度。主要试剂以工作液形式提供。整个操作过程仅需 1h。饲料样品的回收率为 75%~105%。可在饲料及动物源性产品检测中发挥重要作用。

3 结 语

不同的前处理技术有各自的优缺点,在实际应用时要根据样品基质、检测仪器等选择合适的方法。未来的前处理技术应向尽可能的快速、高度自动化发展,尽可能避免样品的损失。

目前比较常用的分析方法是高效液相色谱法和液质联用。气-质联用仪器昂贵,并且需要复杂的衍生化。相对于高效液相色谱法,液质联用的灵敏度高,定性定量可以同时进行。但是对仪器及实验室的要求较高,样品处理和操作也相对要求较高。更有效的试样前处理、更为合适的色谱柱和流动相的选择将是完善这一方法的主要途径。酶联免疫试剂盒法特异性强,适于大量样品的快速测定,但是抗体的制备比较复杂,且不能定性分析。

建立快速的分离方法和高灵敏度且成本较低检测系统成为三聚氰胺分析的一个重要研究方向。

参考文献:

- [1] 张俊燕, 何吕兴. 三聚氰胺的样品前处理及最新检测方法[J]. 生命科学仪器, 2007(5): 57-59.
- [2] 李爱军, 张代辉, 马书民, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中三聚氰胺残留[J]. 分析化学研究简报, 2008, 36(5): 699-701.
- [3] 杨云霞, 刘彤, 周桂英. 小麦谷元粉中三聚氰胺的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(3): 322-324.
- [4] 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: Part A, 2007, 24(12): 1319-1325.
- [5] 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: 237-243.
- [6] MOHAMMED S A, SYED R, MOHSIN G, et al. Simultaneous determination of metformin hydrochloride, cyanoguanidine and melamine in tablets by mixed-mode HILIC[J]. Chromatographia, 2008, 67: 517-525.
- [7] YOKLEY R A, MAYER L C, REZAAIYAN R, et al. Analytical method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using LC-UV and GC-MSD[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 3352-3358.
- [8] 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.
- [9] 刘梅, 李金强, 田德金, 等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测食品中的三聚氰胺[J]. 化学分析计量, 2008, 27(2): 48-50.
- [10] 宫小明, 董静, 孙军, 等. HPLC法测定植物性原料中三聚氰胺[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 321-323.
- [11] 丁涛, 徐锦忠, 李健忠, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法及高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(1): 6-9.
- [12] 王浩, 刘艳琴, 曹红, 等. 固相萃取与高效液相色谱联用测定宠物食品中三聚氰胺[J]. 分析化学, 2008, 36(2): 273.
- [13] SCHULZ W, SEITZ W, WEBER W H, et al. Detection of melamine in water[J]. Vom Wasser, 2007, 105(4): 18-22.
- [14] YOSHIDA Y, MURAKAMI T, TAKEDA K, et al. Determination of melamine using LC-MS and applications to samples related to waste[J]. Kankyo Kagaku, 2006, 16(4): 635-641.
- [15] PETRITISA K, BRUSSAUX S, GUENU S, et al. Ion-pair reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the analysis of underivatized small peptides[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 957: 173-185.
- [16] 黄芳, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 高效液相色谱-质谱法对饲料及食品添加剂中三聚氰胺的测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(3): 313-315.
- [17] 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: 4340-4347.
- [18] 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(3): 339-342.
- [19] 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): 408-413.
- [20] GARDER A E. Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(3): 590-594.