

应用 STATISTICA 建立尿素、三聚氰胺及其衍生物的液相色谱分离方法

郝卫强^{1*}, 郝卫娟², 陈强¹

(1. 常州南京大学高新技术研究院, 江苏, 常州, 213164;
2. 江南大学信息工程学院微电子教研室, 江苏, 无锡, 214122)

摘要: 基于亲水相互作用机理, 以 Polar-Silica 色谱柱为固定相, 乙腈-磷酸盐缓冲液为流动相, 分离尿素、三聚氰胺、三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸二酰胺。应用 STATISTICA 软件设计实验, 考察不同实验条件, 如流动相中乙腈的含量, 缓冲盐的浓度, pH 以及流速等对分离的影响。结果, 三聚氰酸一酰胺和尿素、三聚氰胺和三聚氰酸二酰胺的色谱峰易重叠。前者的分离度会随乙腈含量和缓冲盐浓度的降低而改善, 而后者则恰好相反。因此, 首次建立了可使尿素等 5 种化合物实现基线分离的液相色谱条件。

关键词: 三聚氰胺; 三聚氰酸; 三聚氰酸一酰胺; 三聚氰酸二酰胺

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1001-4160(2011)02-222-225

1 引言

“三鹿奶粉事件”使三聚氰胺问题引起人们的广泛关注。查三聚氰胺还会进一步降解生成三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺以及三聚氰酸等物质^[1-2]。另有报道, 一些个体养牛户在鲜奶中添加尿素以提高蛋白质的含量, 也会导致中毒或潜在危害^[3-5]。因此, 为了能够对上述物质全面监控, 同时建立测定它们的分析方法, 就非常必要。

液相色谱法有灵敏高和分离选择性好等优点, 在检测三聚氰胺中应用广泛^[6-11]。由于三聚氰胺及其类似物都属于强极性化合物, 常用的 C18 色谱柱对它们的保留会非常弱。因此, 实践时在流动相中需添加离子对试剂, 但多少会增加分离条件选择的复杂性。近年来, 出现了 1 种新的液相色谱模式, 即亲水相互作用色谱 (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC), 不添加离子对试剂也可对极性化合物有强的保留作用^[12-15]。HILIC 技术已应用于测定奶制品和饲料中的三聚氰胺及其衍生物^[16-17]和化妆品中的尿素等^[18-19]。但是目前还未见同时分离尿素、三聚氰胺及其衍生物的报道。本研究选择基于 HILIC 设计的 Polar-Silica 柱, 通过 STATISTICA 软件中的 Experimental Design(DOE) 模块设计实验, 考察不同实验条件, 如流动相中乙腈的含量, 缓冲盐的浓度, pH 以及流速等对分离的影响。然后, 首次建立了可使尿素、三聚氰胺及其衍生物等分离的液相色谱方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

日本岛津 (Shimadzu) 液相色谱系统, 包括 LC-20AT 输液泵, CBM-20A 控制器, SPD-20A 紫外检测器, 以及 LcSolution 色谱工作站等。Polar-Silica 色谱柱购自天津标臣科技发展有限公司。PHS-3E 型 pH 计购自上海精密科学仪器有限公司。

三聚氰胺 (纯度 98%)、三聚氰酸 (纯度 98%)、三聚氰酸一酰胺 (纯度 98%) 和三聚氰酸二酰胺 (纯度 95%) 购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司。尿素 (纯度 99%) 购自上海凌峰化学试剂有限公司。实验用水为超纯水。乙腈为色谱纯。磷酸二氢铵、磷酸、氨水等试剂均为分析纯。

2.2 样品溶液的制备

据文献报道, 三聚氰胺会与三聚氰酸结合生成难溶于水的复合物^[17]。实验中也发现, 由尿素、三聚氰胺、三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺制备的混合溶液不稳定, 易生成白色絮状沉淀。因此, 研究选择制备 2 种相对稳定的混合溶液。首先, 取三聚氰胺、三聚氰酸二酰胺和尿素适量, 用乙腈-水 (体积比 1:1) 配成浓度各为 (20、40、1000) $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液 I。另外, 取三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺和尿素适量, 用乙腈-水 (体积比 1:1) 配成浓度各为 (100、40、1000) $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液 II。

2.3 实验方案设计

在 HILIC 中, 流动相组成比例, 缓冲盐的浓度, pH

收稿日期: 2010-05-27; 修回日期: 2010-08-09

基金项目: 常州市社会发展科技计划 (CS20090001)。

联系人: 郝卫强 (1976—), 男, 湖北人, 博士, 副研究员, E-mail: hao_w_q@163.com。

以及流速等因素均会对溶质的保留产生较大影响。本研究通过 STATISTICA (StatSoft, Inc.) 中的 Experimental Design(DOE)模块, 通过两水平析因标准设计, 考察上述因素对分离的影响^[20]。实验顺序由软件随机产生, 具体方案见表 1。

表 1 实验方案设计
Table 1 Experimental design.

编号 No.	pH	流速 flow rate (mL·min)	缓冲液含量 buffer content/%	缓冲液浓度 buffer conc/ (mmol/L)
2	6.9	0.8	15	2.0
11	4.5	1.0	15	5.0
3	4.5	1.0	15	2.0
8	6.9	1.0	20	2.0
12	6.9	1.0	15	5.0
16	6.9	1.0	20	5.0
10	6.9	0.8	15	5.0
13	4.5	0.8	20	5.0
1	4.5	0.8	15	2.0
4	6.9	1.0	15	2.0
9	4.5	0.8	15	5.0
7	4.5	1.0	20	2.0
14	6.9	0.8	20	5.0
15	4.5	1.0	20	5.0
5	4.5	0.8	20	2.0
6	6.9	0.8	20	2.0

2.4 色谱条件

固定相为 Polar-Silica 色谱柱 (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm)。流动相为乙腈-磷酸二氢铵缓冲液体系。缓冲液的浓度, pH, 流动相组成以及流速见表 1。检测波长 200 nm。进样体积 1 μL。

3 结果与讨论

研究选取 5 种可能在食品中出现的含氮化合物, 尿素、三聚氰胺、三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺以及三聚氰酸二酰胺作为分离的对象。原来, 在所采用的 HILIC 体系中, 三聚氰酸一酰胺和尿素, 以及三聚氰胺和三聚氰酸二酰胺是较难分离的物质对。例如, 在表 1 编号为 8 实验得到的色谱图中 (见图 1), 三聚氰酸一酰胺 (b) 和尿素 (c) 为基线分离, 但是三聚氰胺 (d) 和三聚氰酸二酰胺 (e) 的色谱峰重叠。而在表 1 编号为 10 的实验中, 得到的色谱图则正好相反, 三聚氰胺和三聚氰酸二酰胺可以实现基线分离, 但是三聚氰酸一酰胺和尿素没有分开。

为了进一步探讨影响上述 2 组化合物分离的主要因素, 研究通过 STATISTICA 软件设计实验 (见表 1), 系统考察了不同实验因素, 如 pH (因素 1)、流速 (因素 2)、缓冲液在流动相中的含量 (因素 3) 以及缓冲液浓度 (因素 4) 等对分离度的影响。图 2 和图 3 是通过 STATISTICA 分析实验数据, 得出 Pareto 图和边际均数图。

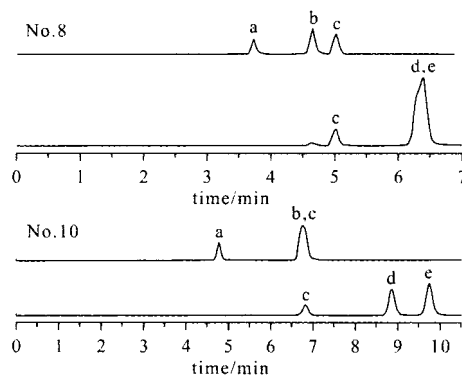


Fig.1 Chromatograms obtained in the experiments of No. 8 and 10 in Table 1: (a) cyanuric acid, (b) ammelide, (c) urea, (d) melamine, (e) ammeline.

图 1 表 1 中编号为 8 和 10 实验得到的色谱图: (a) 三聚氰酸; (b) 三聚氰酸一酰胺; (c) 尿素; (d) 三聚氰胺; (e) 三聚氰酸二酰胺

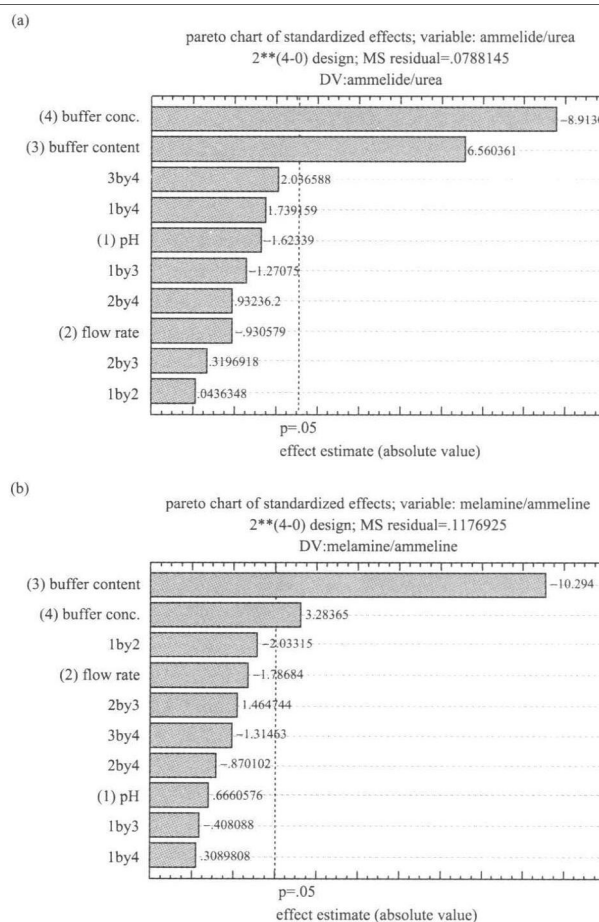


Fig.2 Pareto charts accounting for the influence of experimental factors on the separation of ammelide/urea (a) and that of melamine/ammeline (b), respectively.

图 2 各因素对三聚氰酸一酰胺/尿素 (a) 和三聚氰胺/三聚氰酸二酰胺 (b) 分离度影响的 Pareto 图

Pareto 图中, 对于三聚氰酸一酰胺/尿素, 缓冲液的浓度及在流动相中的含量是影响分离度的主要因素, 前者的影响最显著。其它因素如 pH 和流速、不同因素之间的交互作用 (by) 的统计意义不大 ($p>0.05$)。而对于三聚氰胺/三聚氰酸二酰胺, 缓冲液的浓度和含量也是影响

分离的主要因素。不过与三聚氰酸一酰胺/尿素不同,对分离度的影响,缓冲液的含量要大于缓冲液的浓度。

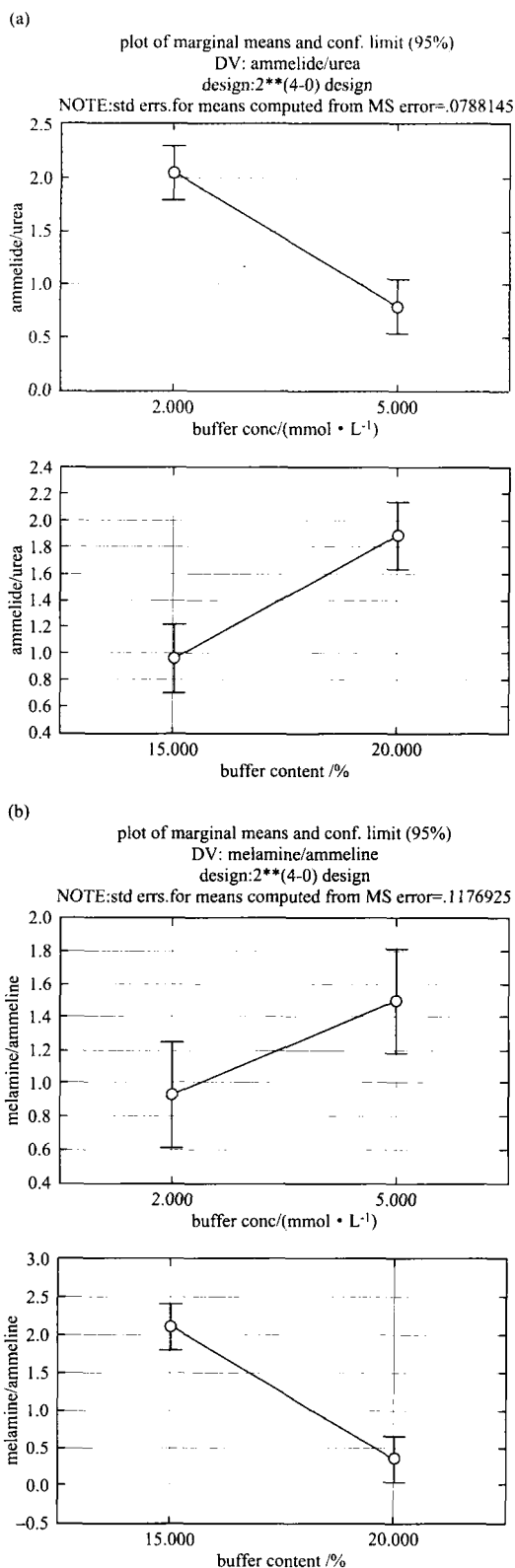


Fig.3 Plots of marginal means accounting for the influence of buffer concentration and its content on the separation of ammeline/urea (a) and that of melamine/ammeline (b), respectively.

图3 缓冲液浓度及其含量对三聚氰酸一酰胺/尿素(a)和三聚氰胺/三聚氰酸二酰胺(b)分离度影响的边际均数图

看边际均线图,降低缓冲液的浓度及增加在流动相中的含量,虽有助于三聚氰酸一酰胺与尿素的分离,但不利于三聚氰胺与三聚氰酸二酰胺的分离。该观点与图1所示的实验结果相吻合。再结合分析 Pareto 图的结论,适当降低缓冲液的浓度以增加三聚氰酸一酰胺/尿素的分离度,同时减少缓冲液在流动相中的含量以增加三聚氰胺/三聚氰酸二酰胺的分离度,则可能同一色谱条件下分离5种化合物。图4是缓冲液浓度为2 mmol/L,缓冲液含量为17%得到的色谱图。该条件可基线分离5种化合物。

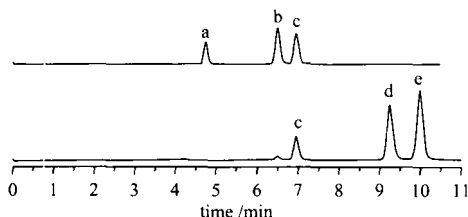


Fig.4 Separation of the five compounds in this study: (a) cyanuric acid, (b) ammelide, (c) urea, (d) melamine, (e) ammeline. The flow rate was set at 0.8 mL/min and the mobile phase was acetonitrile: 2 mmol/L phosphate buffer (pH 6.9)=83: 17(v/v). Other conditions can be found in section 2.4.

图4 5种化合物分离色谱图:(a)三聚氰酸;(b)三聚氰酸一酰胺;(c)尿素;(d)三聚氰胺;(e)三聚氰酸二酰胺

4 结论

借助 STATISTICA 软件,考察各种实验因素对尿素、三聚氰胺及其衍生物分离的影响。从 Pareto 图和边际均数图可以看到,缓冲液的浓度及在流动相中的含量是影响分离的主要因素;前者影响三聚氰酸一酰胺和尿素,而后者影响三聚氰胺和三聚氰酸二酰胺。据此,可找到实现基线分离的色谱条件,为下一步建立含量测定方法打下基础。

References:

- Muniz-Valencia R, Ceballos-Magana S G, Rosales-Martinez D, Gonzalo-Lumbreras R, Santos-Montes A, Cubedo-Fernandez-Trapiella A and Izquierdo-Hornillos R C. Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392(3): 523-531.
- Zhu Weixia, Yuan Ping, Yang Jizhou, Liu Yafeng, Guo Junfeng, Wei Wei and Zhang Shusheng. Determination of melamine and its derivatives in milk and milk powder by hydrophilic liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Instrumental Analysis*, 2008, 27(12):1288-1292.
- Wei Feng, Ma Zhenshan and Jia Zhonghui. Two rapid detection methods for carbamide in milk. *Food Engineering*, 2006, 1:58-60.
- Zhang Weiguo, Zhou Jikun and Tian Jinzhong. Rapid assay methods of urea in foods and feeds. *China Public Health*, 2000, 16(12):1102.
- Ling Hong. Influencing factors on the rapid assay of urea adulterated in milk. *China Dairy Cattle*, 2000, 6:45-47.

- 6 Ono S, Funato T, Inoue Y, Munechika T, Yoshimura T, Morita H, Rengakuji S and Shimasaki C. Determination of melamine derivatives, melame, meleme, ammeline and ammelide by high-performance cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, 815(2):197-204.
- 7 Cai Qinren, OuYang Yingyu, Qian Zhenjie and Peng Yufen. Determination of melamine residue in feeds by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 2008, 26(3): 339-342.
- 8 Hamilton D W and O'Neal P A. Analytical methods for the quantification of free melamine and cyanuric acid in Nylon 6/6,6 copolymer. *Journal of Separation Science*, 2003, 26(6):510-514.
- 9 NY/T 1372-2007 Determination of melamine in feeds, 2008.
- 10 GB/T 22388-2008 Determination of melamine in raw milk and dairy products, 2008.
- 11 GB/T 22400-2008 Rapid determination of melamine in raw milk high performance liquid chromatography method, 2008.
- 12 Qin F, Zhao Y Y, Sawyer M B and Li X F. Column-switching reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of free estrogens and their conjugates in river water. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 627(1):91-98.
- 13 Wang Y, Lehmann R, Lu X, Zhao X J and Xu G W. Novel, fully automatic hydrophilic interaction/reversed-phase column-switching high-performance liquid chromatographic system for the complementary analysis of polar and apolar compounds in complex samples. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1204(1):28-34.
- 14 Louw S, Pereira A S, Lynen F, Hanna-Brown M and Sandra P. Serial coupling of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography to broaden the elution window for the analysis of pharmaceutical compounds. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1208(1-2):90-94.
- 15 Kunemeyer J, Terborg L, Nowak S, Scheffer A, Telgmann L, Tokmak F, Gonsel A, Wiesmuller G, Reichelt S and Karst U. Speciation analysis of Gadolinium-Based MRI contrast agents in blood plasma by hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(21):8163-8170.
- 16 Turnipseed S, Casey C, Nochetto C and Heller D N. Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS. *Laboratory Information Bulletin No.* 4421, U.S. Food and Drug Administration, 2008.
- 17 Dobson R L M, Motlagh S, Quijano M, Cambron R T, Baker T R, Pullen A M, Regg B T, Bigalow A S, Vennard T, Fix A, Reimschuessel R, Overmann G, Shan Y and Daston G P. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicological Sciences*, 2008, 106(1):251-262.
- 18 Dallet P, Labat L, Kummer E and Dubost J P. Determination of urea, allantoin and lysine pyrrolidate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2000, 742(2):447-452.
- 19 Doi T, Kajimura K, Takatori S, Fukui N, Taguchi S and Iwagami S. Simultaneous measurement of diazolidinyl urea, urea, and allantoin in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877(10): 1005-1010.
- 20 Ma Zhengfei and Yin Xiang. *Application of Mathematical methods and Software in Engineering*. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.

中文参考文献

- 2 祝伟霞, 袁萍, 等. 亲水色谱-串联质谱法对牛奶与奶粉中三聚氰胺及其衍生物含量的测定[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(12): 1288-1292.
- 3 魏峰, 马振山, 等. 牛奶中掺入尿素的两种快速检测方法[J]. *食品工程*, 2006, 1: 58-60.
- 4 张维国, 周吉坤, 等. 食品及饲料中尿素快速检测法[J]. *中国公共卫生*, 2000, 16(12):1102.
- 5 凌虹. 牛奶中掺尿素的快速检测和影响因素[J]. *中国奶牛*, 2000, 6:45-47.
- 7 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 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.
- 9 农业行业标准 NY/T 1372-2007 饲料中三聚氰胺的测定[S], 2007.
- 10 国家标准 GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S], 2008.
- 11 国家标准 GB/T 22400-2008 原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法[S], 2008.
- 20 马正飞, 殷翔. *数学计算方法与软件的工程应用*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.

Application of STATISTICA to separate urea, melamine and its derivatives by high performance liquid chromatography

Hao Weiqiang^{1*}, Hao Weijuan² and Chen Qiang¹

(1. High-Tech Research Institute of Nanjing University, Changzhou, 213164, Jiangsu, China)

(2. School of Information Technology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Five compounds, urea, melamine, cyanuric acid, ammelide and ammeline, were separated based on HILIC separation mechanism using a Polar-Silica column as stationary phase and a mixture of acetonitrile and phosphate buffer as mobile phase. STATISTICA was used for the design of experiments to investigate the effects of the factors such as the content of acetonitrile in mobile phase, buffer concentration, pH and flow rate. It was found that the peaks of ammelide and urea as well as those of melamine and ammeline would easily overlap each other. With decrease of acetonitrile content and buffer concentration, the resolution between ammelide and urea became better while that between melamine and ammeline worse. Based on these results, chromatographic conditions for baseline separation of these compounds were first proposed.

Keywords: melamine, cyanuric acid, ammelide, ammeline, urea

(Received: 2010-05-27; Revised: 2010-08-09)