

胶束毛细管电动色谱法在线富集联用技术灵敏检测 乳制品和饲料样品中的三聚氰胺

陈新¹ 袁红萍² 曹玉华^{* 1} 陈秋云¹

¹(江南大学 化学与材料工程学院 无锡 214122) ²(常州纺织服装职业技术学院纺织化学工程系 常州 213164)

摘 要 建立了胶束毛细管电泳(MEKC)在线富集技术灵敏检测三聚氰胺的方法,采用场放大进样(FASS)联用胶束扫集(Sweep)测定多种样品中的三聚氰胺。试样用乙腈反复提取 3 次,在优化实验条件下,三聚氰胺的检测灵敏度提高了约 1000 倍,检出限由原来的 2 mg/L 降到 1.8 $\mu\text{g/L}$ ($S/N = 3$)。本方法用于配方奶粉和动物饲料中三聚氰胺残留的检测,回收率在 97.2% ~ 105.0% 之间;相对标准偏差均小于 4.5% ($n = 4$)。本方法具有检测灵敏、方便易行、预处理简单、干扰少、经济环保和适用范围广等优点。

关键词 胶束毛细管电动色谱;场放大进样;扫集;三聚氰胺

1 引 言

三聚氰胺(Melamine)是一种重要的氮杂环有机化工原料,由于三聚氰胺分子中含有大量氮元素,少数不法分子为虚假提高饲料以及乳制品中蛋白质含量而非法添加三聚氰胺,导致牛奶、蛋类等生活必需品中的三聚氰胺含量超过限量值(鸡蛋: 2.5 mg/kg, 婴幼儿配方奶粉: 1.0 mg/kg, 奶类制品: 2.5 mg/kg)。2008 年发生三聚氰胺乳品事件引起公众强烈关注。研究建立快速测定食品、乳制品中三聚氰胺含量的高灵敏分析方法具有十分重要的实际意义和应用价值。目前,测定三聚氰胺的方法有 GC-MS 法^[1]、HPLC 法^[2~5]、LC-MS 法^[6~9],毛细管电动色谱法^[10~17]、增强拉曼光谱法^[18]和荧光光度法^[19]等。李爱军等^[8]运用 LC-MS 检测饲料中的三聚氰胺残留,检出限为 0.2 mg/kg;饶钦雄等^[10]运用毛细管区带电泳联用二极管阵列检测器测定鸡蛋中的三聚氰胺,定量限为 0.25 mg/kg;Tsai 等^[11]运用胶束扫集毛细管电泳法测定配方奶粉中的三聚氰胺,检出限为 10.9 $\mu\text{g/L}$ 。黄晖等^[19]运用 CTMAB 增敏荧光光度法测定牛奶中的三聚氰胺,检出限为 19 $\mu\text{g/L}$ 。

毛细管电泳是近十几年发展起来的分离技术,具有仪器简单、高效快速、自动化高、经济环保等优点,已成为生物化学和分析化学领域中发展最快的一种分离分析技术。本研究将堆积技术和扫集技术联用测定三聚氰胺,采用场放大进样联用扫集毛细管电泳模式(FASS-sweep MEKC)检测三聚氰胺,并将此方法用于实际多种类型样品的检测中。样品不需要常规的复杂预处理过程。实验结果显示,本方法对三聚氰胺有非常好的富集检测效果,灵敏度提高了约 3 个数量级,检出限为 1.8 $\mu\text{g/L}$,在不同样品中的检测都具有很低的检出限及很高的稳定性和回收率,效果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CAPEL105 高效毛细管电泳系统(Lumex 俄罗斯);TH-3000 高效毛细管电泳仪(天惠分离科学研究所);未涂层石英毛细管(65 cm $\times$ 75 μm i. d. ,有效长度 50 cm);三聚氰胺标准品(上海安谱科学仪器有限公司);婴幼儿配方奶粉、牛奶及动物饲料购于本地超市;其余试剂均为分析纯;水为超纯水(华晶微电子有限公司)。

标准溶液的配制:准确称取三聚氰胺标准品,用 20% 甲醇溶液配制成 2.000 g/L 储备液。避光 4 $^{\circ}\text{C}$

2010-12-16 收稿;2011-06-10 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20775028)和江南大学青年基金(No. 20070337)资助项目

* E-mail: cxgxp@hotmail.com

保存。使用时根据需要稀释成不同浓度的标准液。

样品溶液的制备: 称取 2.000 g 不同品牌的配方奶粉, 加入 3 mL 乙腈, 超声 10 min, 以 7000 r/min 离心 6 min, 吸出上清液, 在下层沉渣中再加 3 mL 乙腈, 操作方法同上, 反复提取 3 次, 合并上清液, 并将其放入冰箱内冷冻 5 min, 取出后用滤纸过滤, 然后用 0.45 μm 过滤膜过滤得样品溶液。所有溶液进入毛细管前均经过 0.45 μm 过滤膜过滤, 经超声脱气后使用。

动物蛋白饲料和牛奶的样品处理方法同上。

2.2 毛细管预处理

毛细管在使用时, 分别用 0.1 mol/L HCl、超纯水、0.1 mol/L NaOH、超纯水、电泳缓冲液冲洗 10 min。两次样品分析运行期间, 分别用 0.1 mol/L NaOH、超纯水、电泳缓冲液冲洗 5 min, 以获得良好的分离检测重现性。

2.3 区带毛细管电泳(CZE)体系

考察了经典 CZE 体系对三聚氰胺的检测效果。CZE 电泳条件: 压力进样 3 kPa, 进样时间 15 s, 运行缓冲液: 20 mmol/L 10% (V/V) H_3PO_4 -甲醇 (pH 2.2), 三聚氰胺溶液 (8 mg/L) 配制在运行缓冲液中。

2.4 场放大进样-胶束扫集体系

2.4.1 MEKC 条件 低 pH 条件可有效抑制电渗流, 建立低电渗流体系。MEKC 运行缓冲液的组成为 90 mmol/L SDS 溶液、20 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 2.2)、10% (V/V) 甲醇。在分析中采用的运行条件: 运行电压 -20 kV (检测端位于正电压一端), 运行温度 20 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 230 nm。

2.4.2 FASS-sweep MEKC 运行模式 样品基质为: 0.10 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲溶液 (pH 2.2)、20% 乙腈、三聚氰胺溶液 (1.0 mg/L) 溶在样品基质中。FASS-sweep MEKC 方法: 毛细管内充满运行缓冲液, 再加压注入一段水柱 (60 s, 3 kPa), 采用电动进样 (60 s, 20 kV), 水柱提供的高电场使样品快速向出口端迁移, 样品离子迁移到水和背景缓冲液的界面, 背景电解质提供低电场使样品离子的迁移速度降低, 从而在界面处形成一段样品区带。进样完毕, 进出口端均换上低 pH 胶束背景电解质, 在负压 (-20 kV) 下, 运用胶束扫集样品区带, 使样品区带更窄。

3 结果与讨论

3.1 FASS-sweep MEKC 条件优化

3.1.1 电泳缓冲液的优化 为抑制电渗流, 本实验选用低 pH 值磷酸盐缓冲体系。考察了 SDS 浓度、pH 值、有机改性剂和分离电压对分离效果的影响。实验表明, 随着 SDS 浓度增加, 峰增高, 出峰时间缩短。这是由于 SDS 增大了样品的容量因子, 样品与胶束的作用增强, 浓缩程度增加。SDS 浓度大于 90 mmol/L 时, 出现了峰形展宽、峰高降低的现象。最终选定 90 mmol/L SDS 溶液、20 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 2.2)、10% (V/V) 甲醇为有机改性剂, 分离电压为 -20 kV, 此时分析物峰形良好、出峰时间短且富集效果最佳。

3.1.2 样品基质的优化 考察了样品基体溶液浓度从 (0.1 ~ 10 mmol/L) 对富集效果的影响。将样品分别溶解在 0.1 ~ 10 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 2.2) -20% 乙腈缓冲溶液中, 在相同的实验条件下利用场放大进样-胶束扫集对样品进行检测。结果表明, 样品浓度较低 (0.1 或 0.5 mmol/L) 时, 检测灵敏度明显增强, 富集因子较高浓度样品基质下提高约 15%。这是因为在固定的进样时间内, 低浓度基体溶液在样品进口端形成的低电场能推动更多的样品离子进入毛细管, 从而提高富集灵敏度。当基体溶液浓度低于 0.10 mmol/L 时, 对灵敏度影响不大。选择 0.10 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 2.2) 缓冲液作为样品的基体溶液。结果表明, 样品在该浓度的基质溶液中检测的灵敏度明显增高。

3.1.3 进水进样条件的优化 考察了压力为 3 kPa 时, 水塞进入时间 (10 ~ 80 s) 对富集效果的影响。实验表明, 随着水塞进入时间的延长, 样品峰峰宽逐渐变窄, 峰高明显增加, 富集效果增加; 当水塞进入时间为 60 s 时, 峰形良好, 样品的富集效果很好; 继续增加水塞进入时间发现, 峰形未变, 且富集效果并没有明显增加。本实验水塞进入时间选择 60 s。

其它条件不变, 进样压力为 20 kV, 考察了进样时间对富集倍数的影响。实验表明: 富集倍数随进

样时间的延长而增加,当进样时间超过 60 s 后,富集倍数较高,但峰形展宽,在顶端有平台出现。本实验采用 60 s 作为最佳进样时间。

3.2 线性范围、检出限、回收率和相对标准偏差

分别采用 CZE 和 FASS-sweep MEKC 方法对 6 个空白的奶粉、牛奶和饲料样品进行测定,测得基线噪声平均值。配制 1.0 ~ 8000 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液,在最佳条件下测定,以 3 倍信噪比($S/N=3$) 计算得三聚氰胺的 CZE 法和 FASS-sweep MEKC 法的检出限(LOD) 分别为 2 mg/L 和 1.8 $\mu\text{g/L}$ 。以峰面积 y 对样品浓度 x 进行回归分析,FASS-sweep MEKC 法中三聚氰胺的峰面积与其浓度在 5.0 ~ 1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈线性关系: $y=1.81x+0.743$, $R=0.9991$ 。在此实验条件下,三聚氰胺的富集倍数比普通区带毛细管电泳法提高了约 1000 倍(图 1 和图 2)。迁移时间和峰面积的相对标准偏差(RSD) 分别小于 5.2% 和 3.7%。按照实验方法进行回收率实验,结果见表 1,三聚氰胺的回收率在 97.2% ~ 105.0% 之间;其 RSD 均小于 4.5%。

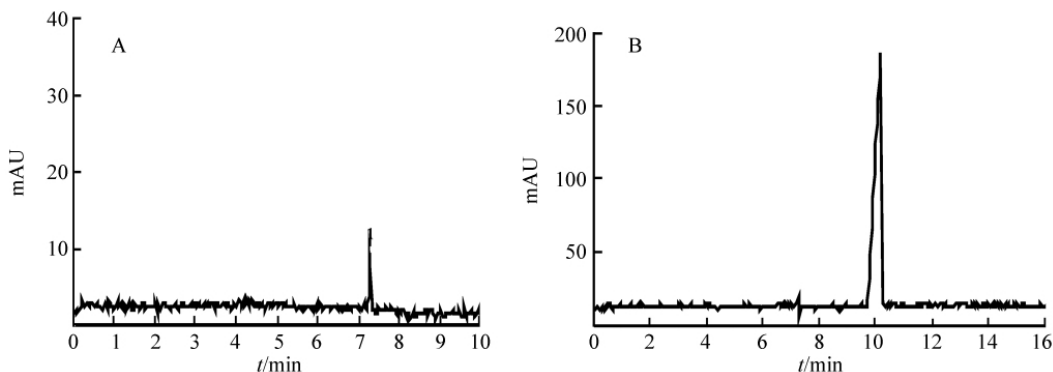


图 1 (A) 标准品的 CZE 图和(B) 标准品的 FASS-sweep MEKC 图

Fig. 1 (A) Conventional capillary zone electrophoresis (CZE) and (B) field amplified sample stacking (FASS)-sweep micellar electrokinetic chromatography (MEKC) of melamine

Micellar buffer solutions were composed of 90 mmol/L SDS, 10% (V/V) methanol and 20 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 2.2).

A: Pressure injection of sample (3 kPa, 15 s), sample concentration: 8 mg/L. B: Electokinetic injection of sample (20 kV, 60 s), pressure injection of water (3 kPa, 30 s), sample concentration: 1.0 mg/L.

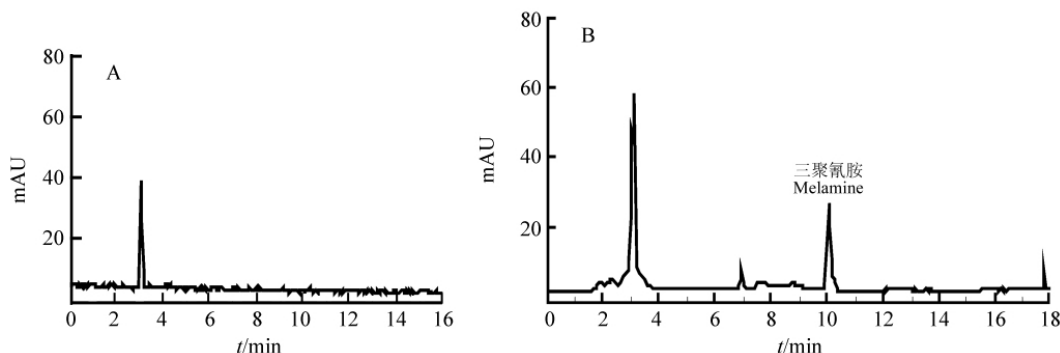


图 2 配方奶粉(A) 及其添加 30 $\mu\text{g/L}$ 三聚氰胺后(B) 的 FASS-sweep MEKC 图谱

Fig. 2 FASS-sweep MEKC of blank infant formula (A) and spiked sample at 30 $\mu\text{g/L}$ (B)

表 1 样品加标回收率

Table 1 Recoveries for melamine in samples

配方奶粉 Infant formula				动物饲料 Animal feed			
加入量 Added ($\mu\text{g/L}$)	测量值 Found ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recovery [*] (% , $n=4$)	RSD (% , $n=4$)	加入量 Added ($\mu\text{g/L}$)	测量值 Found ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recovery [*] (% , $n=4$)	RSD (% , $n=4$)
10	10.3	103	3.9	10	10.5	105	2.7
30	29.2	97.2	4.5	30	30.6	102	3.6
300	295	98.2	2.7	300	292	97.4	2.2

* Recovery = (Found - Background) / Added $\times 100\%$.

3.3 讨论

毛细管电泳法具有分离效率高、时间短、重现性好、分离模式多种多样等优点。相比于三聚氰胺的液相色谱测定方法,毛细管电泳的分析成本较低,检测一个样品消耗的缓冲溶液不足 1 mL,经济环保;另外,也不需要特殊的色谱柱,仅使用普通的空心毛细管柱,价格比一般的色谱柱低很多,使用方便。本实验优势在于使用了在线富集技术,使灵敏度提高了约 3 个数量级,弥补了毛细管电泳的在测量灵敏度上的缺陷。目前采用的方法如 LC-MS 法毛细管电动色谱法、胶束扫集毛细管电泳法和 CTMAB 增敏荧光光度法等,检出限较高,本方法的检出限为 $1.8 \mu\text{g/L}$ 。其次,本方法运用了电动进样,这种进样方法对进入毛细管中的成分是有选择性的。在正向电压下,不同极性的化合物在电泳和电渗的共同作用下先后进入毛细管中,阳离子化合物在正向电压下首先被引入,从而克服了测量样品中存在的一些中性基质分子或阴离子化合物的干扰。由于本方法的灵敏度高,富集倍数达到数千倍,在测量样品时,可以将样品溶液稀释数倍后再电动进样,进一步减少了样品中非阳离子化合物基质的干扰。所以本方法中不需要采用常规的较为繁琐的预处理方法也可以达到灵敏的检测效果。

References

- 1 LI Feng-Ge, YAO Wei-Qin, TIAN Yan-He, DOU Hui(李锋格,姚伟琴,田延河,窦辉). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2010**, 28(3): 319 ~ 322
- 2 Lin M, He L, Awika J, Yang L, Ledoux D R, Li H, Mustapha A. *Journal of Food Science*, **2008**, 73(8): T129 ~ T134
- 3 WANG Hao, LIU Yan-Qin, CAO Hong, YANG Hong-Mei, LIU Xiao-Li, YAN Long-Bao(王浩,刘艳琴,曹红,杨红梅,刘小力,闫龙宝). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2008**, 36(2): 273
- 4 Venkatasami G, Sowa J R. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 665(2): 227 ~ 230
- 5 Wang G Y, Chen J, Shi Y P. *Acta Chromatographica*, **2010**, 22(2): 307 ~ 321
- 6 Deng X J, Guo D H, Zhao S Z, Han L, Sheng Y G, Yi X H, Zhou Y, Peng T. *J. Chromatogr. B*, **2010**, 878(28): 2839 ~ 2844
- 7 Yu H, Tao Y F, Chen D M, Wang Y L, Liu Z Y, Pan Y H, Huang L G. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 682(1-2): 48 ~ 58
- 8 LI Ai-Jun, ZHANG Dai-Hui, MA Shu-Min(李爱军,张代辉,马书民). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2008**, 36(5): 699 ~ 701
- 9 CAI Qin-Ren, OUYANG Ying-Yu, QIAN Zhen-Jie(蔡勤仁,欧阳颖瑜,钱振杰). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2008**, 26(3): 339 ~ 342
- 10 RAO Qin-Xiong, TONG Jing, GUO Ping(饶钦雄,童敬,郭平). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(9): 1341 ~ 1344
- 11 Tsai I L, Sun S W, Liao H W, Lin S C, Kuo C H. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(47): 8296 ~ 8303
- 12 Zana C, Ina R, Audrius P. *Chemica*, **2009**, 20(4): 231 ~ 235
- 13 Sun H W, Liu N, Wang L X, He P. *J. Chromatogr. Sci.*, **2010**, 48(10): 848 ~ 853
- 14 Jin Y, Meng L C, Li M X, Zhu Z W. *Electrophoresis*, **2010**, 31(23-24): 3913 ~ 3920
- 15 Li X G, Hu J W, Han H Y. *Journal of Separation Science*, **2011**, 34(3): 323 ~ 330
- 16 LI Li-Jun, HAO Xue-Chao, CHENG Hao, WU Qi-Tao(李利军,郝学超,程昊,吴启涛). *Chinese Journal of Analysis Laboratory*(分析试验室), **2010**, 29(1): 76 ~ 79
- 17 Wu W C, Tsai I L, Sun S W, Kuo C H. *Food Chemistry*, **2011**, 128(3): 783 ~ 789
- 18 LI Jun-Mei, XU Xiao-Xuan, WANG Yu-Fang, WANG Bin, SUN Jia-Ming, ZHANG Chun-Zhou(李俊梅,徐晓轩,王玉芳,王斌,孙甲明,张有洲). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), **2010**, 30(10): 2663 ~ 2666
- 19 HUANG Hui, LI Li, MA Qiao, FENG Yu-Chou, HE Zhi-Ke(黄晖,李丽,马乔,冯钰铸,何治柯). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2010**, 38(2): 249 ~ 252

On-line Preconcentration and Sensitive Determination of Melamine in Milk Powder and Animal Feeds Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography

CHEN Xin¹, YUAN Hong-Ping², CAO Yu-Hua^{*1}, CHEN Qiu-Yun¹

¹(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122)

²(Department of Textile and Chemical Engineering, Changzhou Textile and Garment Institute, Changzhou, 213164)

Abstract A sensitive analytical method using micellar electrokinetic chromatography with on-line preconcentration technique was developed for rapid determination of melamine in various samples. Two online preconcentration techniques including field-amplified sample stacking and sweeping micellar electrokinetic chromatographic technique (FASS-sweep MEKC) were used. The samples were extracted by acetonitrile for three times. Under the optimum conditions, the sensitivity was improved about 1000 times. The LODs was decreased from 2.0 mg/L to 1.8 μ g/L. The RSD were less than 4.5%. The recoveries were range in 97.2% – 105%. This method is sensitive, reliable, economic and pretreatment-free for complex samples and can be easily used for product quality control of milk powder and animal feeds.

Keywords Micellar electrokinetic chromatography; Field-amplified sample stacking; Sweeping; Melamine

(Received 16 December 2010; accepted 10 June 2011)

沃特世公司参加 2011 第 31 届中国质谱学会年会

2011 年 8 月 6 日至 8 日,由中国物理学会质谱分会主办,西北核技术研究所承办的“2011 年第 31 届中国质谱学会年会”在古都西安盛大开幕,共有来自全国各地的 300 多位质谱专家、学者参与此次盛会。

本届年会的主题是:前沿质谱新方法、新技术及其应用的最新进展。大会为期两天半,主办方为与会者准备了精彩的大会报告、4 场分会报告及 3 场青年论坛,涉及有机质谱、无机质谱、同位素质谱及生物质谱等类别。

沃特世公司(Waters®)作为全球最大的液相色谱、质谱及相关产品专业生产厂家之一,全程参与了此次大会。

大会期间,沃特世公司市场发展部经理蔡麒先生在有机质谱专业组分会场,做了题为“ASAP 质谱离子源技术简化您的研究流程”的报告。ASAP(Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe)大气压固体分析探头,是一种无需样品前处理或 LC 色谱分离便能够在 1 分钟内快速获得固体或液体样品的质谱数据技术。ASAP 离子化技术具备快速、简单、低成本、灵敏、无需样品前处理、无需色谱分离、在 API 质谱上可替代 EI/CI 直接分析等优点。同时还能被广泛应用于制药学、精细化工、公安、环境、石化、食品安全、聚合物以及聚合物添加剂等领域(www.waters.com)。