

高效液相色谱法检测食品接触产品中的 三聚氰胺及其衍生物的迁移量

陈旻实*¹ 井伟^{1,2} 吕水源¹ 李小晶¹ 吴洪成¹
林柏玲¹ 郑思远¹ 陈锦权²

¹(福建出入境检验检疫局技术中心, 国家消费品安全检测重点实验室, 福州 350001)

²(福建农林大学食品科学学院, 福州 350002)

摘 要 建立了高效液相色谱同时检测三聚氰胺(MEL)及其衍生物——三聚氰酸二酰胺(ANE)、三聚氰酸一酰胺(ADE)和三聚氰酸(CYA)单体迁移量的方法。样品分别采用水、4%乙酸、10%乙醇作为食品模拟物,在70℃浸泡4 h,浸泡液过0.45 μm微孔薄膜后进入色谱柱。色谱分离采用Luna NH₂柱,柱温:30℃,流动相为V(乙腈):V((5 mmol/L PBS缓冲溶液, pH 6.5))=75:25,流速:1.0 mL/min; DAD检测波长为205和214 nm。在此优化条件下, MEL, ANE, ADE和CYA的浓度在0.5~10 mg/L范围内与其峰面积的线性关系良好,检出限分别为0.06, 0.08, 0.12和0.15 mg/L(S/N=3)。在1.0 mg/L的添加水平下, MEL, ANE, ADE和CYA的平均回收率在96.4%~101.6%之间,相对标准偏差在2.79%~4.39%之间。结果表明,本方法可简便、快速、准确地同时测定食品接触产品中三聚氰胺及其衍生物的迁移量。

关键词 三聚氰胺; 衍生物; 食品接触产品; 高效液相色谱; 迁移

1 引言

三聚氰胺(MEL)及其衍生物三聚氰酸二酰胺(ANE),三聚氰酸一酰胺(ADE)和三聚氰酸(CYA),本身的物质毒性很小,但同时被人体摄入后,三聚氰胺遇强酸或强碱水溶液水解,胺基逐步被羟基取代^[1],通过分子间的氢键结合形成网状三聚氰胺氰尿酸盐(Melamine cyanurate, MCA),该晶体难溶于水,易在肾脏中积聚形成结石,堵塞肾小管,最终导致肾衰竭^[2]。近年美国发生的毒宠物粮事件就在食品中发现了三聚氰胺及其衍生物^[3]。以三聚氰胺甲醛树脂为原料,可重复使用的食品接触产品蜜胺餐具在日常生活中广泛使用。有研究表明,长期使用蜜胺餐具,在高温和酸性条件下,三聚氰胺会迁移至食品中^[4]。同时,这种被大量使用的仿瓷(蜜胺)餐具在长期重复使用过程中,会出现恶化^[5],如灰尘,裂缝,变色。因此,应建立食品接触材料中三聚氰胺及其衍生物的单体残留量和迁移量的检测方法。

目前,有关蜜胺餐具中三聚氰胺^[6,7]检测的分析报道较多,同时检测 MEL, ANE, ADE 和 CYA 的基体多为植物源产品^[8,9]和乳制品^[10],基体为食品接触材料的报道较少^[11,12]。本研究以3种模拟物(水、4%乙酸、10%乙醇)分别浸泡食品接触产品,采用高效液相色谱同时检测 MEL, ANE, ADE 和 CYA 单体迁移量。结果表明,本方法简便、快速、准确可靠。

2 实验部分

2.1 仪器与溶剂

1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Luna NH₂柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国 Phenomenex 公司);ED-115 型恒温干燥箱(德国 Bingder 公司);AB204-L 分析天平(德国赛多利斯仪器公司)。

三聚氰胺(99.0%, MEL),三聚氰酸二酰胺(98.0%, ANE),三聚氰酸一酰胺(99.0%, ADE)和三聚氰酸(98.0%, CYA)标准品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,乙腈(色谱纯,德国默克公司);乙酸、乙醇均为国产分析纯,实验用水为超纯水。磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 6.5)。

2010-12-10 收稿;2011-04-26 接受

本文系福建省科技计划重点项目(No.2009Y0001),国家质量监督检验检疫总局 2011 年度科技计划项目(No.2011HK028),福建出入境检验检疫局科技计划项目(No.FK2010-22)资助

* E-mail: minshi0271@sina.com

MEL 和 CYA 标准储备液用水溶解并定容;ANE 和 ADE 标准储备液以 8.5% 二乙胺溶液溶解并定容;MEL, ANE, ADE 和 CYA 混合标准工作液用模拟物稀释至适宜浓度备用。

2.2 制备方法

依据国标 GB/T 5009.156-2003 食品用包装材料及其制品的浸泡实验方法通则制备样品。样品为蜜胺碗,直接将模拟物注入其中,在 70℃ 恒温箱恒温 4 h,浸泡液过 0.45 μm 微孔薄膜后进入色谱柱。

2.3 色谱条件

2.3.1 检测波长的选择 分别取 10 mg/L 的 MEL, ANE, ADE 和 CYA 标准工作液,于 190~400 nm 波长连续扫描。其中,MEL, ANE 和 ADE 在 205 nm 处均有近最大吸收值,CYA 的最大吸收峰波长为 214 nm。由于 CYA 吸收强度较弱且明显小于 MEL 等,考虑到 CYA 检测灵敏度,故选择 205 和 214 nm 为检测波长。

2.3.2 其它液相色谱条件 Phenomenex Luna NH₂ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);DAD 检测器;柱温为 30℃;进样量 20 μL;流动相为 V(乙腈):V(5 mmol/L PBS 缓冲溶液, pH 6.5)=75:25;等度洗脱,流速为 1.0 mL/min。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的选择与优化

由于 MEL 及其衍生物都含有氨基,具有较强的极性和亲水性,因此在传统的 C₈和 C₁₈反相柱上不易保留,而且很容易受到样品中其它杂峰的干扰。当采用氨基柱作为色谱分离柱时,由于极性较强的氨基柱可以显著增强 MEL 及其衍生物保留时间,从而实现基线分离,且得到的峰形较好。在优化色谱条件下,浓度均为 1.0 mg/L 的 MEL 及其衍生物的混合溶液在不同模拟物中的分离色谱图见图 1。MEL 及其衍生物可实现基线分离,满足同时测定的需求。

3.2 方法的线性范围及检出限

配制 MEL 及其衍生物系列浓度的标准工作溶液,按照所建立的方法进行处理和测定。以目标分析物质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,分别得到 MEL, ANE, ADE 和 CYA 的检出限、线性范围、相关系数和线性方程,列于表 1 中。

表 1 不同模拟物中 MEL 及其衍生物的检出限及线性方程
Table 1 Summary of LOD, linear ranges, and correlation coefficients (r) and linear equations of melamine and derivatives with different simulant solution

模拟物 Simulant solution	分析物 Analyte	检出限 LOD (mg/L)	线性范围 Linear range (mg/L)	相关系数 Correlation coefficient	线性方程 Linear equation
H ₂ O	MEL	0.02	0.2~20	0.9999	Y=371.78X-12.43
	ANE	0.03	0.1~20	1.0000	Y=227.98X-3.29
	ADE	0.06	0.1~10	1.0000	Y=140.99X+2.82
	CYA	0.08	0.2~50	0.9999	Y=57.10X+3.99
4% 乙酸 4% Acetic acid	MEL	0.06	0.5~10	0.9998	Y=195.32X+12.39
	ANE	0.08	0.5~10	0.9999	Y=118.76X-2.23
	ADE	0.12	0.5~10	0.9997	Y=61.46X-1.84
	CYA	0.15	0.5~10	0.9999	Y= 32.46X+4.41
10% 乙醇 10% Ethanol	MEL	0.06	0.5~20	0.9998	Y=383.63X-39.09
	ANE	0.08	0.5~50	0.9995	Y=211.92X+76.49
	ADE	0.12	0.5~10	0.9995	Y=153.10X-13.68
	CYA	0.15	0.5~50	0.9997	Y=55.72X+13.14

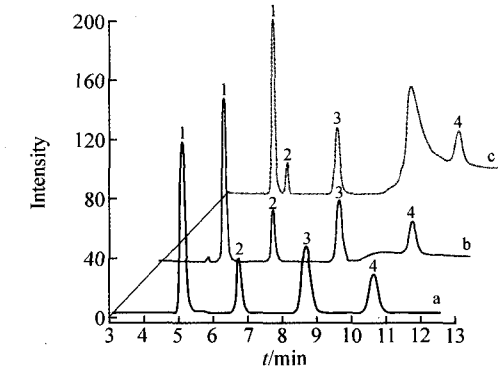


图 1 MEL(1),CYA(2),ANE(3)和 ADE(4)在不同模拟物中的分离色谱图
Fig. 1 HPLC spectra of melamine(MEL) (1), cyanuric acid (CYA) (2), ammeline (ANE) (3) and ammelide (ADE) (4) with different simulant solutions
(a) H₂O, (b) 10% 乙醇(Ethanol), (c) 4% 乙酸(Acetic acid).

结果表明, MEL, ANE, ADE 和 CYA 标准曲线的线性范围宽、检出限低,符合实际样品分析要求。

3.3 方法的回收率与精密度

选取空白蜜胺碗,在水、4% 乙酸和 10% 乙醇浸泡液中分别添加 1.0 mg/L MEL 及其衍生物标准溶液,平行测定 6 次,考察方法的回收率和精密度,结果见表 2。

表 2 不同模拟物中 MEL 及其衍生物单体迁移量的回收率

Table 2 Recoveries of melamine and derivatives in different simulant solutions

分析物 Analyte	模拟物 Simulant solution	回收率 Recovery (%)						平均值 Average recovery (%)	RSD (%, n=6)
		Spl-1	Spl-2	Spl-3	Spl-4	Spl-5	Spl-6		
MEL	H ₂ O	97.3	102.0	99.0	105.3	100.8	98.6	100.5	2.87
	4% 乙酸 4% Acetic acid	95.4	92.7	101.3	104.8	98.8	100.7	99.0	4.39
	10% 乙醇 10% Ethanol	103.8	99.6	105.5	101.4	97.6	96.2	100.7	3.56
ANE	H ₂ O	98.1	96.0	94.7	95.2	93.4	101.3	96.4	2.95
	4% 乙酸 4% Acetic acid	103.4	106.1	100.3	96.5	98.9	104.6	101.6	3.61
	10% 乙醇 10% Ethanol	94.2	99.5	102.8	106.9	101.0	98.7	100.5	4.23
ADE	H ₂ O	99.1	92.4	101.6	98.3	100.5	93.9	97.6	3.77
	4% 乙酸 4% Acetic acid	101.3	102.1	96.9	95.0	100.7	94.7	98.4	3.67
	10% 乙醇 10% Ethanol	96.5	97.7	104.5	102.9	95.8	99.0	99.4	3.56
CYA	H ₂ O	104.8	101.9	97.4	94.3	95.6	102.8	99.5	4.30
	4% 乙酸 4% Acetic acid	95.4	99.7	101.8	100.7	104.2	94.6	99.4	3.75
	10% 乙醇 10% Ethanol	97.1	102.8	94.7	100.1	99.3	98.2	98.7	2.79

MEL, ANE, ADE 和 CYA 的平均回收率分别为 99.0%~100.7%, 96.4%~101.6%, 97.6%~99.4% 和 98.7%~99.5%; 相对标准偏差(RSD)分别为 2.87%~4.39%, 2.95%~4.23%, 3.56%~3.77% 和 2.79%~4.30%, 表明所建立的方法重复性好。对 MEL 及其衍生物的不同检测方法进行了比较(表 3)。

表 3 MEL 及其衍生物不同检测方法之比较

Table 3 Comparison of analytical methods available for detecting and quantifying melamine and derivatives

方法 Method	基质 Matrices	线性范围 Linear range	检出限 LOD	参考文献 Reference
HPLC-DAD	面粉(小麦, 大米, 玉米) Flour (wheat, rice, corn)	MEL/ANE/ADE: 5~500 µg/g CYA: 70~7000 mg/g	4~92 µg/g	[13]
HPLC/MS/MS	肾组织 Porcine muscle tissue	50~1000 µg/L	ANE/ADE/CYA: 0.092~0.14 µg/g	[2]
LC/MS/MS	牛奶, 有机奶 Milk and infant formula	0~5 µg/g	0.25 µg/g (S/N=16)	[14]
HPLC-DAD	大米浓缩蛋白 Rice protein concentrate		55~113 µg/g	[9]
GC-MS	麦麸, 大米蛋白, 玉米面筋, 大豆 Wheat gluten, rice protein, corn gluten and soy protein	0.004~1.6 mg/kg	0.002 mg/kg	[15]
300-MS Triple Quadrupole GC/MS/MS	婴儿奶粉/食物/饲料 Infant milk-based formula and other food and feed products	0.002~20 µg/g	0.002~0.04 µg/g	[16]
MEKC	蜜胺塑料 Melamine articles		MEL: 2.8~5.0 µg/L ANE/ADE/CYA: 2.4~5.0 µg/L	[12]
HILC	奶制品及饲料 Milk-based and feed products		0.25~1.43 µg/L	[11]
HPLC	蜜胺塑料 Melamine articles	0.5~10 mg/L	0.06~0.15 mg/L	This article

由表 2 和表 3 可见, 本方法检测 MEL 及其衍生物, 灵敏度较高, 仪器使用简单, 且无需经过提取分离等前处理过程, 样品浸泡液可直接上机检测, 操作简便, 回收率良好。

3.4 实际应用

购买市售蜜胺餐具 50 个, 以水、4% 乙酸和 10% 乙醇溶液作为浸泡物, 70 °C 浸泡 4 h, 浸泡液过 0.45 μm 微孔滤膜后, 用本方法进行测定。有 4 个样品检出 MEL, 检出浓度范围为 0.04~0.31 mg/dm^2 , CYA, ADE 和 ANE 均未检出。检出量与 WHO 给出的每日允许摄入量(TDI)0.2 mg/kg 体重相比, 风险水平较低。

结果表明, 本方法实现了组分的基线分离, 方法灵敏度好, 检出限低, 前处理简单, 满足我国和欧盟对食品接触材料中污染物残留监控和检测的要求。

References

- 1 WANG Yan-Ji (王延吉). *Organic Chemical Materials* (有机化工原料). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), **2004**: 727~728
- 2 Filigenzi M S, Puschner B, Aston L S, Poppenga R H. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56(17): 7593~7599
- 3 Associated Press. 2007. 104 Deaths Reported in Pet Food Recall. New York Times 28 March [cited 2009 Mar 10]. Available from: http://www.nytimes.com/2007/03/28/science/28brfs-pet.html?_r=1/41&ex=1/41176264000&en=1/418ee0fb91fd221e4b&ei=1/45070&oref=1/4slogin/
- 4 Lu J, Xiao J, Yang D J, Wang Z T, Jiang D G, Fang C R, Yang J. *Biomedical and Environmental Sciences*, **2009**, 22: 104~108
- 5 Wu Y N, Zhao Y F, Li J G and Melamine Analysis Group. *Biomedical and Environmental Sciences*, **2009**, 22: 95~99
- 6 JING Wei, CHEN Min-Shi, LI Xiao-Jing, LÜ Shui-Yuan, CHEN Jing-Dong, WU Hong-Cheng, ZHENG Si-Yuan, CHEN Jin-Quan (井伟, 陈旻实, 李小晶, 吕水源, 陈锦东, 吴洪成, 郑思远, 陈锦权). *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析试验室), **2011**, 30(4): 34~38
- 7 JING Wei, TANG Xi, LÜ Shui-Yuan, LI Xiao-Jing, CHEN Min-Shi, CHEN Jing-Dong, WU Hong-Cheng, ZHENG Si-Yuan, JIANG Xiao-Fen, CHEN Jin-Quan (井伟, 唐熙, 吕水源, 李小晶, 陈旻实, 陈锦东, 吴洪成, 郑思远, 江晓芬, 陈锦权). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), **2011**, 30(3): 269~273
- 8 Campbell J A, Wunschel D S, Petersena C E. *Anal. Lett.*, **2007**, 40: 3107~3118
- 9 QIAN Ming-Rong, ZHANG Hu, HE Hong-Mei, WANG Xiang-Yun, CHEN Zhi-Min, WU Li-Qin (钱鸣蓉, 章虎, 何红梅, 王祥云, 陈志民, 吴俐勤). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(6): 902~906
- 10 Miao H, Fan S, Wu Y N, Zhang L, Zhou P P, Li J G, Chen H J, Zhao Y F. *Biomedical and Environmental Sciences*, **2009**, 22: 87~94
- 11 Xia J G, Zhou N Y, Zhou C, Chen B, Wu Y N, Yao S Z. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33: 2688~2697
- 12 Hsu Y F F, Chen K T, Liu Y W, Hsieh S H H, Huang H Y. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 673(2): 206~211
- 13 Ehling S, Teferaa S, Ho I P. *Food Additives and Contaminants*, **2007**, 24(12): 1319~1325
- 14 Eugene C and R Arora. Varian, Inc. Application Note 01916. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CVM/WhatWeDo/ucm134742.htm>
- 15 Litzau J J, Mercer G E, Mulligan K J. **2008**. Lab Inform Bull. No. 4423. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CVM/WhatWeDo/ucm134742.htm>
- 16 Wang H B, Georg E. *Chemical Analysis, Application Note* # CA-270126

Determination of Melamine and Related Derivatives by High Performance Liquid Chromatography

CHEN Min-Shi^{*1}, JING Wei^{1,2}, LÜ Shui-Yuan¹, LI Xiao-Jing¹, WU Hong-Cheng¹,

LIN Bai-Ling¹, ZHENG Si-Yuan¹, CHEN Jin-Quan²

¹(Fujian Province Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001)

²(Food Science College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350007)

Abstract A novel High-performance liquid chromatographic method of determining monomer migration of melamine (MEL) and its derivatives including ammeline (ANE), ammelide (ADE) and cyanuric acid (CYA) was developed. Samples were immersed in simulants (H₂O, 4% acetic acid, 10% ethanol), and then kept in incubator at 70 °C in a duration of 4 h. The immersed solutions were injected into HPLC column before the penetration through a 0.45-μm microporous membrane. The separation was performed on a Phenomenex Luna NH₂ column at 30 °C and the mobile phase of acetonitrile (5 mmol/L) with PBS (pH=6.5)(75:25, V/V) of isocratic elution was pumped at a flow rate of 1.0 mL/min with DAD detection at 205 and 214 nm. Under the optimum conditions, the calibration curves were linear from 0.5 to 10 mg/L with LODs (S/N=3) of 0.06, 0.08, 0.12 and 0.15 mg/L for MEL, ANE, ADE and CYA, respectively. The method provided recoveries of 96.4%—101.6% in the spiked concentration of 1.0 mg/L, and the RSD of the peak height was between 2.8% and 4.4%. The satisfied experimental results indicated that the proposed method can be directly used for the determination of monomer migration of melamine and its derivatives in food contact material conveniently, rapidly and accurately.

Keywords Melamine; Derivatives; Food contact material; High performance liquid chromatography; Migration test

(Received 10 December 2010; accepted 26 April 2011)

《岩矿测试》2012 年征订启事

国内统一刊号:CN11-2131/TD

国际标准刊号:ISSN 0254-5357

国际 CODEN:YACEEK

国内邮发代号:2-313

国外发行代号:BM4089

京西工商广字第 0227 号

《岩矿测试》1982 年创刊,是中国地质学会岩矿测试技术专业委员会和国家地质实验测试中心共同主办的地质分析测试科学综合性学术期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,地质矿产部优秀科技期刊一等奖,北京市科技期刊四通杯全优期刊奖,中国科协优秀学术期刊三等奖。《岩矿测试》坚持面向地质实验技术创新、面向应用、服务基层的方针和基本定位,是交流地质工作科技成果的百花园地,是联系全国地质分析工作者的纽带,突出服务于地球科学、矿产资源、生态环境地球化学研究,促进地质分析测试技术发展。本刊主要报道国内外地质矿产、环境保护、石油化工、冶金工业、矿产品检验、煤炭等分析测试领域的新理论、新方法、新技术的研究成果、评述及实践经验,适合于地质、冶金、环保、石油、化工、煤炭等行业从事分析测试的科技工作者及大专院校师生阅读。

《岩矿测试》是中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊。被美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、英国《分析文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国科技论文统计与分析》(中国科技核心期刊)、《中国学术期刊文摘》光盘版、中国学术期刊综合评价数据库、中国科学引文数据库、中文科技期刊数据库、中国期刊网等国内外 15 家数据库和文摘收录。《岩矿测试》在 88 种“矿业工程”类期刊中排名第一。

《岩矿测试》为双月刊,大 16 开版本,逢双月 15 日出版,国内外公开发行。2012 年定价 15.0 元/册,全年 90.00 元。漏订的读者可直接与编辑部联系。

《岩矿测试》编辑部地址:北京西城区百万庄大街 26 号

国家地质实验测试中心(邮政编码 100037)

电话:010-68999562;68999563

传真:010-68999563

E-mail:ykcs_zazhi@163.com; ykcs_zazhi@sina.com

《岩矿测试》网站(在线投稿): <http://www.ykcs.ac.cn>