

# 分子印迹固相萃取气相色谱-质谱法 测定鸡蛋中三聚氰胺

贺利民<sup>1</sup>, 刘开永<sup>2</sup>, 武力<sup>1</sup>, 郑亚秋<sup>1</sup>, 郭宏斌<sup>1</sup>, 张青杰<sup>1</sup>, 曾振灵<sup>1</sup>

(1 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2 河南科学技术大学食品与生物工程学院, 河南洛阳)

[收稿日期] 2010-11-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2011)01-0002-05 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 以环丙氨嗪为虚拟模板分子, 甲基丙烯酸为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 采用本体聚合法合成了对三聚氰胺具有良好交叉识别能力的分子印迹聚合物(MIP)。将其制备成固相萃取小柱, 可有效分离、净化和富集鸡蛋中的三聚氰胺。提取的三聚氰胺进一步经 Sy lon BFT<sup>TM</sup> 衍生后, 采用气相色谱-质谱选择离子监测模式(SM)测定。建立了基于分子印迹固相萃取气相色谱-质谱测定鸡蛋中三聚氰胺的确证方法, 在 25.0~500 ng/mL 浓度范围内, 线性良好 ( $r > 0.99$ ); 在 50.500 和 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加水平, 鸡蛋中三聚氰胺的平均回收率分别为 82.5%、84.5% 及 81.4%, 相对标准偏差小于 10%; 以 3 倍信噪(S/N)比计算, 方法检出限(LOD)达 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

**[关键词]** 三聚氰胺; 分子印迹聚合物; 固相萃取; 鸡蛋; 气相色谱-质谱法

## Molecularly Imprinted Polymer Solid Phase Extraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Determination of Melamine in Eggs

HE Li-min<sup>1</sup>, LU Kai-yong<sup>2</sup>, WU Li<sup>1</sup>, ZHENG Ya-qiu<sup>1</sup>, GUO Hong-bin<sup>1</sup>,  
ZHANG Qing-jie<sup>1</sup>, ZENG Zhen-ling<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642;

2. College of Food and Biotechnology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

**Abstract** A molecularly imprinted polymer (MIP) using cyrimazine as a mimic template, methacrylic acid as the functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linker was synthesized with bulk polymerization and showed high cross-recognition to melamine. It was used to separate, enrich and cleanup melamine from eggs via a molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) protocol. For gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis, extracted melamine was derived with Sy lon BFT<sup>TM</sup> prior to selected ion monitoring detection in electron impact mode. The established method based on MISPE-GC/MS showed a good linear in the range from 25.0 to 500 ng/mL ( $r > 0.99$ ), and the average recoveries of melamine from egg samples fortified at 50.500 and 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  were 82.5%, 84.5% and 81.4%, respectively, with coefficients of variation lower than 10%. The limit of detection obtained by MISPE-GC/MS was 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  if calculated with a S/N ratio of 3.

**Key words** melamine; molecularly-imprinted polymers; solid-phase extract; egg; gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

项目来源: 农业行业制标项目 2007-069

作者简介: 贺利民(1967年-), 男, 博士, 副研究员。从事食品质量安全检测研究。E-mail: hlm1922@sohu.com

通讯作者: 曾振灵(1963年-), 男, 博士, 教授。从事兽医药理与毒理学研究。E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

三聚氰胺 (Melamine), 化学名称 2,4,6-三氨基-1,3,5-三嗪, 是一种重要的氮杂环有机化工原料, 广泛用于塑料、涂料、粘合剂、食品包装材料和化肥等的生产, 禁止用于饲料和食品中<sup>[1]</sup>。但因其含氮量 (66.7%) 很高, 被一些不法分子人为添加到动物饲料、甚至奶制品等食品中, 以提高表观蛋白质含量。近年连续爆发的“宠物事件”、“三聚氰胺奶粉事件”和“三聚氰胺鸡蛋事件”等促使化学分析工作者对饲料<sup>[2]</sup>、牛奶<sup>[3]</sup>、鸡蛋<sup>[4]</sup>等食物中三聚氰胺的提取、分离和检测方法开展深入研究。

目前用于三聚氰胺检测的方法主要有高效液相色谱法<sup>[5]</sup>、气相色谱-质谱联用法<sup>[6]</sup>和液相色谱-串联质谱法<sup>[7]</sup>等。这些方法尽管定性、定量能力不同, 但在前处理方面一般都使用混合型离子交换固相萃取小柱对试样进行分离、净化, 虽然回收率较高, 但该类小柱没有特异性, 选择性不强, 试样净化不尽理想。分子印迹技术是在分子识别理论基础上发展起来的一项新技术, 利用这项技术制备的分子印迹聚合物 (MIP) 具有高度的特异性识别能力, 能够高选择性识别复杂样品中的目标分子<sup>[8]</sup>。将 MIP 用作固相萃取填料具有特异的选择性和高效的富集效果, 已被广泛用于各种复杂试样基质中如恩诺沙星<sup>[9]</sup>、甲氧苄啶<sup>[10]</sup>、盐酸克伦特罗<sup>[11]</sup>等痕量物质的分析测定。本研究以与三聚氰胺结构相似的环丙氨嗪为虚拟模板分子 (图 1), 有效合成了对三聚氰胺显示良好交叉识别能力和高选择性的分子印迹聚合物, 应用于鸡蛋中三聚氰胺的净化、富集, 从而建立了基于分子印迹固相萃取气相色谱-质谱法灵敏、准确测定鸡蛋中三聚氰胺的定性定量方法。

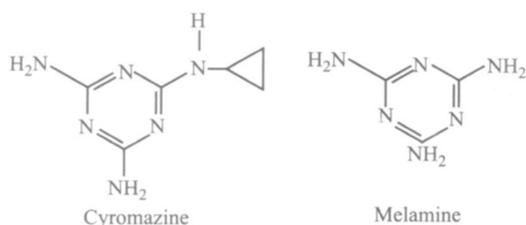


图 1 环丙氨嗪和三聚氰胺的化学结构

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 环丙氨嗪 (CYR, 化学纯, 常州智能动物药业公司); 三聚氰胺对照品 (MEL, 纯度 99.5%, Chem Service 公司); 甲基丙烯酸 (MAA, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心)

和乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA, 分析纯, Sigma-Aldrich 公司), 使用前用活性炭脱除阻聚剂; 偶氮二异丁腈 (AIBN, 化学纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心), 使用前重结晶; 乙腈、丙酮、甲醇、吡啶、甲苯和氨水等均为分析纯 (广州化学试剂厂); 衍生剂, Sybn BFT<sup>TM</sup> (Supelco 公司) 为 N, O-双三甲基硅基三氟乙酰胺 + 三甲基氯硅烷 (99+1); 实验用水为去离子水。

AUTOSYSTEM GC XL-TURBOMASS 型气相色谱-质谱联用仪 (美国 Perkin Elmer 公司); FEI XL 30 E SEM 扫描电子显微镜 (荷兰 Philips 公司); UNIVERSAL 32R 离心机 (德国 Hettich 公司); HH-1 数显恒温水浴锅 (金坛市富华仪器有限公司)。

1.2 三聚氰胺分子印迹聚合物的合成 称取 0.17 g 环丙氨嗪于试管中, 加 5 mL 甲醇/水 (10:1, V/V) 溶解, 加入 MAA 0.7 mL, 超声 5 min, 再加入 EDMA 5.0 mL 和 AIBN 30 mg 超声 5 min, 通氮气 5 min, 密封。在 60 °C 水浴中聚合 24 h 得到块状聚合物。将该聚合物粉碎、研磨、过筛, 收集粒度为 38~75 μm 的颗粒, 用丙酮反复沉降以除去细小颗粒, 装入 15 mm × 200 mm 玻璃层析柱中, 先用 10% 乙酸甲醇溶液 200 mL 洗涤除去模板, 再用甲醇 100 mL 洗涤除去乙酸, 真空干燥 24 h 称取收集的颗粒 200 mg 装入空的固相萃取小柱。非印迹聚合物 (NIP) 的制备除不加模板分子外, 均按上述方法制备、处理和装柱。

1.3 样品制备 准确称取鸡全蛋匀质样品 1 g 于 50 mL 聚丙烯塑料离心管中, 加入 10 mL 提取液 (三乙胺:水:甲醇; 10:30:60), 振荡 20 min 后, 于 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min 取出 5 mL 上清液, 加无水乙醇 5 mL 混合, 旋转蒸干, 加水 5 mL 超声溶解残渣, 作为上样溶液。依次用甲醇、水各 3 mL 活化自制的 MIP 固相萃取 (MISPE) 小柱, 上样, 分别用水、甲醇各 3 mL 淋洗, 挤干, 用 5% 氨化甲醇溶液 5 mL 洗脱。50 °C 下用氮气小心吹干洗脱液, 加入 200 μL 吡啶溶解残渣, 加入 200 μL 衍生剂, 密封后于 70 °C 衍生反应 30 min, 冷却后, 加 600 μL 甲苯混匀, 测定。

1.4 仪器条件 色谱柱: J&W DB-1MS 石英毛细柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 升温程序: 100 °C 保持 1 min, 以 30 °C/min 升至 200 °C, 再以 5 °C/min 升至 205 °C 保持 1 min, 然后以 30 °C/min 升至 280 °C 保持 3 min, 进样口温度 220 °C; 载气

(He)流速 0.8 mL/min, 进样量 1.0 μL。电子轰击 (EI)离子源; 电子能量 70 eV; 传输线温度 280 °C; 离子源温度 230 °C; 选择监测离子  $m/z$  99, 171, 327 和 342, 定量离子 327。

## 2 结果与讨论

**2.1 聚合配方的选择** 由于三聚氰胺难溶于氯仿、丙酮等低极性溶剂, 本研究分别选择了甲醇、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、水及不同含量的水甲醇溶液为致孔剂, MAA 为单体, MEL 及其结构相似物 CYR (在甲醇中的溶解度增加) 为模板, EGDMA 为交联剂进行不同配方的热聚合试验。实验结果表明, 只有以甲醇-水 (10:1, V/V) 为致孔剂, CYR 为虚拟模板时, 热聚合制备的聚合物对 MEL 显示高度交叉识别反应, 表现良好的选择特异性; 以 MEL 本身为模板, 需增加致孔剂中水的含量才能保证模板充分溶解, 合成的聚合物脆而粉细, 对三聚氰胺没有特异性。图 2 是合成 CYR-MIP 的电子扫描显微镜图片, 表面存在大量孔隙, 显示可能的吸附特性。

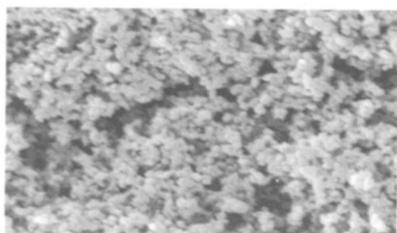
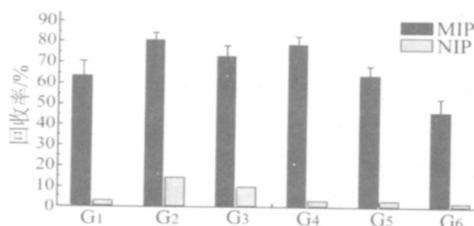


图 2 合成 CYR-MIP 电子显微镜图片 (× 8000)

### 2.2 固相萃取条件的优化

**2.2.1 上样溶液的优化** 空白鸡蛋提取液旋转蒸干后, 添加适量三聚氰胺, 分别用不同 pH ( $\mu\text{H}$  为 5, 7 和 9) 的水溶液和不同含量的甲醇水溶液 (浓度为 5%, 10% 和 20%) 溶解上样。回收率实验结果见图 3。



G<sub>1</sub> ~ G<sub>3</sub> 分别代表 pH 值 5, 7 和 9;  
G<sub>4</sub> ~ G<sub>6</sub> 分别代表 5%, 10% 和 20% 甲醇水溶液

图 3 三聚氰胺在不同上样溶液体系中的回收率 (上样量 2 μg)

由图 3 可见, 用纯水 ( $\mu\text{H}$  7) 或甲醇含量低于 5% 水溶液上样, 三聚氰胺在 MIP 柱上回收率都大于 80%, 在非印迹聚合物固相萃取 (NIP) 柱上回收率小于 20%。在弱酸性和弱碱性条件下, 三聚氰胺回收率都有所降低, 这可能是 pH 值一方面影响三聚氰胺的质子化; 另一方面, pH 会改变聚合物链中羧基功能团的电离状态而影响其与三聚氰胺的结合。上样液中甲醇含量增加, MIP 柱的回收率明显下降, 这可能是因为在水溶液中, 聚合物与目标分子间识别的静电作用力主要是离子键和疏水作用, 甲醇比例的增加削弱了这些作用力。通过对不同溶液体系为上样液比较, 选择纯水溶解提取的鸡蛋基质, 三聚氰胺在制备的 MIP 柱上可以较好地保留。

**2.2.2 洗涤和洗脱液的优化** 根据上述溶解鸡蛋基质中三聚氰胺上样溶液实验结果, 参考饲料和牛奶基质中三聚氰胺 MIP 净化方法<sup>[12]</sup>, 本研究选择水、纯甲醇作为洗涤液。实验表明, 甲醇能将 NIP 柱上非特异性吸附的三聚氰胺去除达 70% 以上, 而 MIP 萃取柱上特异性吸附的三聚氰胺损失小于 10%。水可以去除大量水溶性杂质, 但不能有效消除 NIP 柱对三聚氰胺的非特异性吸附, 甲醇可以消除经非特异性吸附保留在 NIP 柱上的三聚氰胺, 而通过水、甲醇洗涤过程, 不仅可以洗去 MIP 柱上的水溶性杂质和各种有机干扰物, 且可实现经非特异性吸附保留在 MIP 柱上的三聚氰胺转化为特异性识别作用保留下来<sup>[13]</sup>。为了充分洗脱保留在 MIP 柱上的三聚氰胺, 考察了不同含量的氯化甲醇溶液 (浓度为 2%, 3%, 4%, 5% 和 8%) 的洗脱效果, 回收率实验结果见表 1。实验结果表

表 1 洗脱步骤优化 (n = 5)

洗脱溶液	洗脱体积 /mL	回收率 RSD /%	
		MIP 柱	NIP 柱
2% 氯化甲醇	5	57.5 (9.4)	10.5 (18)
3% 氯化甲醇	5	69.8 (6.0)	9.8 (16)
4% 氯化甲醇	5	74.5 (4.1)	17.2 (22)
5% 氯化甲醇	第 1 毫升	8.0 (16)	-
	第 2 毫升	49.5 (9.2)	-
	第 3 毫升	17.6 (18)	-
	第 4 毫升	6.5 (19)	-
	第 5 毫升	3.0 (24)	-
	合计	85.8 (5.9)	16.0 (20)
8% 氯化甲醇	5	86.7 (6.8)	10.0 (18)

明, 3% 以下的氯化甲醇溶液 5 mL 不能完全洗脱三聚氰胺, 5% 和 8% 氯化甲醇溶液的洗脱效果差异不

明显,为减少洗脱液吹干所需时间(降低洗脱液中水的含量),实验选择 5% 的氯化甲醇溶液作为洗脱液。

### 2.3 方法效能指标

**2.3.1 方法的标准曲线、线性和检测限** 分取适量三聚氰胺标准溶液,加 5% 氯化甲醇溶液 5 mL,吹干,按方法衍生后得系列三聚氰胺标准溶液,在 25.0~500 ng/mL 范围内线性良好,相关系数大于 0.99,标准曲线方程为  $Y = 1.74 \times 10^4 X - 1.40 \times 10^5$  ( $n = 5$ )。按 3 倍信噪比 ( $S/N$ ) 计算,本方法检测限可达  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

**2.3.2 方法的回收率和精密度** 鸡蛋中三聚氰胺添加回收率试验结果见表 2。50、500 及 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三个水平添加平均回收率,每水平 5 个重复,MCX 混合型阳离子交换柱回收率大于 90%,MIP 柱大于 80%,NIP 柱小于 20%,MCX 与 MIP 柱相应的相对标准偏差均小于 6%,而 NIP 偏差较大,在 10%~14% 之间。从表 2 还可看出, MIP 小柱整体回收率较 MCX 小柱稍低,是否因基质增强效应产生,值得进一步研究。典型离子流色谱图如图 4 从图 4 可以看出, MCX 柱净化的色谱图相对有杂峰,体现了 MIP 的特异性吸附,净化效果更理想。

表 2 鸡蛋添加回收率试验结果 ( $n = 5$ )

固相萃取小柱	添加水平 $I$ ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )		
	50.0	500	1000
回收率 ( $RSD$ ) %			
MCX	96.2 (4.9)	94.3 (5.4)	91.6 (2.2)
MIP	82.8 (4.5)	84.5 (5.1)	81.4 (4.6)
NIP	15.7 (14)	9.4 (12)	8.8 (10)

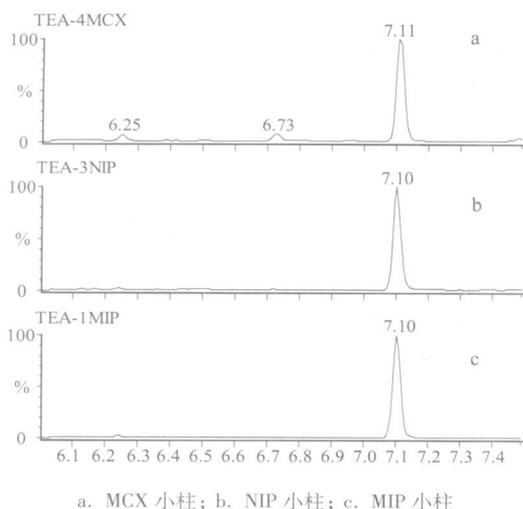


图 4 鸡蛋试样添加三聚氰胺典型离子流色谱图 ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ )

**2.4 样品分析** 从当地批发、农贸市场及超市抽取 100 批鲜鸡蛋样品,按 1.2 实验方法处理、检测,并与 Anpelclean MCX 柱 (60 mg 3 mL) 净化结果比较。有 6 批鸡蛋样品两种小柱处理结果三聚氰胺均超过  $0.05 \text{ mg}/\text{kg}$  其中 1 批鸡蛋三聚氰胺含量达  $1.22 \text{ mg}/\text{kg}$  MCX 柱的回收率稍高些,结果为  $1.34 \text{ mg}/\text{kg}$ 。

### 3 结论

本文研究了在甲醇-水体系,以环丙氨嗪为虚拟模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂合成了对三聚氰胺具有良好交叉识别能力的分子印迹聚合物。用其制备的分子印迹小柱较好地净化和富集了鸡蛋中的三聚氰胺,同时防止了因“模板泄露”对三聚氰胺残留的准确测定。建立的基于分子印迹固相萃取气相色谱-质谱法测定鸡蛋中三聚氰胺的定性定量方法,可有效用于鸡蛋中三聚氰胺的残留监测。

### 参考文献:

- [1] 李永庆,王军. 三聚氰胺的生产与应用 [J]. 化工科技市场, 2004, 27(5): 8-10
- [2] Lin M, He L, Awaka J *et al*. Detection of Melamine in Gluten, Chicken Feed, and Processed Foods Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy and HPLC [J]. J Food Sci. 2008, 73: 129-134
- [3] 王征. GC-MS 法测定动物食品中的三聚氰胺 [J]. 福建分析测试, 2008, 17(2): 1-4
- [4] Xia X, Ding S, Li X, *et al*. Validation of a Confirmatory Method for the Determination of Melamine in Egg by Gas Chromatography-mass Spectrometry and Ultra-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry [J]. Anal Chim Acta. 2009, 651(2): 196-200.
- [5] Byunghu K, Lewis B P, Rodney J B, *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]. J Assoc Off Anal Chem, 2008, 91: 408-413
- [6] US Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammelide, and Cyanuric Acid (Version 2.1). <http://www.fda.gov/cvm/GCMSmelamine.htm> (2007-05-22).
- [7] Heller D N, Nочetto C B. Simultaneous Determination and Confirmation of Melamine and Cyanuric Acid in Animal Feed by Zwitterionic Hydrophilic Interaction Chromatography and Tandem Mass Spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22: 3624-3632

(下转第 13 页)

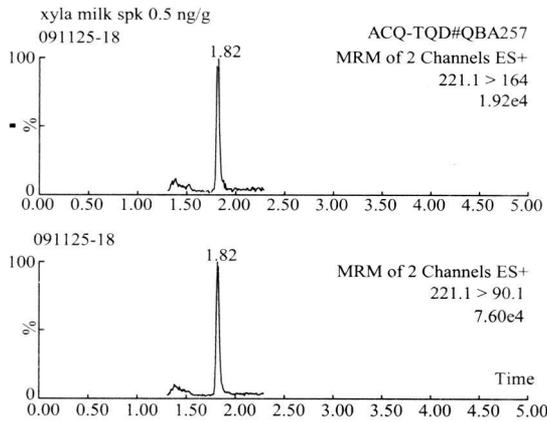


图 4 空白牛奶中添加赛拉嗪 (0.5 ng/g) 的特征离子质量色谱图

表 4 牛奶中赛拉嗪的添加回收率实验结果

添加浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	次数	回收率 / %	批内变异 系数 / %	批间变异 系数 / %
0.5	1	81.4	13.8	
	2	87.5	5.8	3.5
	3	75.3	8.5	
10	1	72.3	10.9	
	2	76.6	11.6	4.9
	3	81.5	8.2	
50	1	94.2	7.0	
	2	97.2	7.5	3.4
	3	100.9	14.6	

### 3 结论

本方法采用乙腈沉淀牛奶中的蛋白质, HLB固相萃取小柱净化, UPLC快速分离, 串联质谱检测, 成功建立了牛奶中赛拉嗪的残留检测方法。赛拉嗪的检测限为  $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 最低定量限为  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。整个实验过程简便快速、稳定性好, 非常适合大量牛奶样品中赛拉嗪残留的检测。

### 参考文献:

- [1] 沈建忠, 谢联金. 兽医药理学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000
- [2] 董义春. 食品安全与兽药残留监控 [J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(10): 24-28
- [3] 张传津. 盐酸赛拉嗪对反刍兽临床麻醉效果观察 [J]. 畜牧兽医杂志, 2007, 26(2), 89-91.
- [4] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量. 农业部 235号公告 [S]. 2002
- [5] Spyridaki M, Lyris E, Georgoulakis ID, *et al*. Determination of Xylazine and Its Metabolites by GC-MS in Equine Urine for Doping Analysis [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 35: 107-116
- [6] Niedorf E, Böhr H-H, Kietzm ann M. Simultaneous Determination of Ketamine and Xylazine in Canine Plasma by Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection [J]. Journal of Chromatography B, 2003, 791: 421-426
- [7] 孙雷, 刘琪, 王树槐. 液相色谱-串联质谱技术进展及在兽药行业上的应用 [J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(9): 34-37.
- [8] Masque N, Marce R M, Borrull F. Molecularly Imprinted Polymers: New Tailor-made Materials for Selective Solid-phase Extraction [J]. Trends in Anal Chem, 2001, 20(9): 477-486.
- [9] Yan H Y, Tian M L, Row K H. Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Milk Using Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction [J]. J Sep Sci, 2008, 31, 3015-3020
- [10] Hu S G, Li L, He X W. Comparison of Trimethoprim Molecularly Imprinted Polymers in Bulk and in Sphere as the Sorbent for Solid-phase Extraction and Extraction of Trimethoprim from Human urine and Pharmaceutical Tablet and Their Determination by High-performance Liquid Chromatography [J]. Anal Chim Acta, 2005, 537(1/2): 215-222
- [11] 王培龙, 范理, 宋荣, 等. 动物尿液中盐酸克伦特罗的分子印迹固相萃取气相色谱质谱法研究 [J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1319-1322
- [12] He L M, Su Y J, Zheng Y Q, *et al*. Novel Cyanazine Imprinted Polymer Applied to the Solid-phase Extraction of Melamine from Feed and Milk Samples [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(34): 6196-6203.
- [13] Blomgren A, Berggren C, Holmberg A, *et al*. Extraction of Clenbuterol from Calf Urine Using a Molecularly Imprinted Polymer Followed by Quantitation by High-performance Liquid Chromatography with UV Detection [J]. J Chromatogr A, 2002, 975: 157-164.

(上接第 5 页)