

高效液相色谱法测定密胺容器中三聚氰胺迁移量的研究

熊丽蓓, 姜觅, 戴承兵

摘要: [目的] 采用 4 种溶剂浸泡提取, 建立一个快速、简便的三聚氰胺-甲醛食品容器中三聚氰胺迁移量的高效液相色谱(HPLC)测定方法。[方法] 三聚氰胺-甲醛(密胺)食品容器采用水、4% 乙酸、15% 乙醇和正己烷 4 种溶剂浸泡提取, 其浸泡液过滤至高效液相色谱仪, 经反相色谱分离后, 由紫外检测器检测分离、测定, 外标法定量。[结果] 从色谱条件和样品浸泡液的选择等各方面研究了三聚氰胺-甲醛食品容器中三聚氰胺迁移量的分析方法, 该方法的定量限 $10 \mu\text{g}/\text{dm}^2$, 方法的线性范围为 $0.050 \sim 2.000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。样品加标回收范围为 $85.7\% \sim 105.7\%$, 样品 4 种浸泡液测定结果的相对标准偏差为 $0.43\% \sim 4.80\%$ 。[结论] 本方法是一个测定三聚氰胺-甲醛食品容器中三聚氰胺迁移量快速、有效、稳定性好、灵敏度高的测定方法。

关键词: 三聚氰胺迁移量; 液相色谱法; 三聚氰胺-甲醛; 浸泡液

Study on the Method for Determining Migration of Melamine from Melamine-Formaldehyde Containers by HPLC XIONG Li-bei, JIANG Mi, DAI Cheng-bing (Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: [Objective] To develop a rapid and simple high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the migration of melamine extracted by four solvents from melamine-formaldehyde products used as food containers. [Methods] Melamine were soaked out by four solvents which were water, 4% acetic acid, 15% ethanol and n-hexane. The four soaks were separated by reversed phase chromatographic column and detected by UV-detector. [Results] The analysis method of determining the migration of melamine from melamine-formaldehyde food containers was studied from the aspects of chromatogram and soaking solutions. The detection limit was $10 \mu\text{g}/\text{dm}^2$. The linear range was between $0.050 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $2.000 \mu\text{g}/\text{mL}$. The recovery was controlled between 85.7% and 105.7% . The relative standard deviation was between 0.43% and 4.80% . [Conclusion] This method was rapid, effective, stabilize and sensitive for detecting the migration of melamine from melamine-formaldehyde products used as food containers.

Key Words: migration of melamine; HPLC; melamine-formaldehyde; soak

三聚氰胺, 分子式为 $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$, 又称 2, 4, 6-三氨基-1, 3, 5-三嗪, 白色单斜棱晶。工业上三聚氰胺由双氰(酰)胺与氨在高温下反应或由尿素直接在高温高压下制得。三聚氰胺是一种用途广泛的基本有机化工中间产品, 最主要的用途是作为生产三聚氰胺-甲醛树脂(MF)的原料。三聚氰胺是一种禁止用于食品(包括宠物食品)及动物饲料的化学物质。2007 年的“宠物毒粮”事件, 2008 年的“三鹿奶粉”事件, 为我国食品安全敲响了警钟。为了尽可能保护消费者健康, 使三聚氰胺-甲醛(密胺)食品容器不再发生类似事件, 研究三聚氰胺迁移量的测定具有重要意义。目前三聚氰胺的高效液相色谱(HPLC)测定方法可用于检测食品、饲料中的三聚氰胺含量^[1-7]。本实验拟通过对色谱条件和样品浸泡液的选择等各方面的研究, 确定食品容器中三聚氰胺迁移量的高效液相色谱方法。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

[作者简介] 熊丽蓓(1964—), 女, 学士, 副主任技师; 研究方向: 食品包装材料中特定迁移量的分析; E-mail: lbxiong@scdc.sh.cn

[作者单位] 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国, 配紫外检测器。色谱柱: 钻石 C_{18} [$5 \mu\text{m}$, $150 \text{ mm}(\text{L}) \times 4.6 \text{ mm}(\text{ID})$]。

三聚氰胺(纯度 99.9%)购自 Fluke 公司; 乙酸、乙醇、正己烷、己烷磺酸钠、磷酸、三氟乙酸为分析纯; 甲醇为色谱纯; 水为去离子高纯水。

1.2 仪器分析条件

流动相: 己烷磺酸钠(5 mmol/L)-磷酸(0.1%)溶液+甲醇($V+V$)($90 \text{ mL}+10 \text{ mL}$); 流速 $1.0 \text{ mL}/\text{min}$; 柱温: 35°C ; 紫外检测器波长: 235 nm ; 进样体积: $10 \mu\text{L}$ 。

1.3 实验过程

1.3.1 样品的预处理 (1)取扁平食品容器清洗后, 按每平方厘米容器面积分别添加水、4% 乙酸、15% 乙醇、正己烷各 2 mL 浸泡容器; (2)取非扁平食品容器清洗后, 加浸泡液至容器体积 $4/5$ 处, 浸泡容器。水、4% 乙酸、15% 乙醇浸泡液浸泡温度为 60°C , 正己烷浸泡温度为室温。浸泡时间均为 2 h 。

1.3.2 样品的测定 分别取水、4% 乙酸、15% 乙醇浸泡液经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤至 HPLC 样品瓶中进行分析。1 mL 正己烷浸泡液在氮吹仪上吹干, 加入水溶解定容至 1 mL , 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过至样品瓶中进行分析。

1.3.3 标准曲线 称取三聚氰胺对照品约 10.0 mg, 用水稀释成 100 µg/mL 的标准贮备液, 再配制浓度为 0.050、0.100、0.500、1.000、2.000 µg/mL 的标准系列。经 0.45 µm 微孔滤膜过滤至 HPLC 样品瓶中, 进行分析。

1.4 计算公式

$X=(c \times V)/(S \times 1000)$ 。式中: X 为试样中三聚氰胺单体的迁移量, 单位为 mg/dm²; c 为测定液中三聚氰胺的含量, 单位为 µg/mL; V 为试样浸泡液总体积, 单位为 mL; S 为与浸泡液接触的试样面积, 单位为 dm²。

2 结果

2.1 色谱条件的研究

根据三聚氰胺在 pH 值为 2~3 的强酸性条件下较稳定, 且三聚氰胺的强极性特性, 故选择极性较强的色谱柱及流动相。本实验首先选用 5 种不同的色谱柱, 并以 0.1% 三氟乙酸为流动相的条件下, 得到的保留时间(见表 1)均太早, 因此 0.1% 三氟乙酸不是理想的流动相。又选用了离子对试剂己烷磺酸钠, 浓度 5 mmol/L, 并用实验室常用 Diamonsil® C₁₈ 柱(5 µm, 150 mm × 4.6 mm), 得到三聚氰胺的保留时间为 7 min 左右(见图 1), 达到实验要求。

表 1 色谱柱及流动相的选择

色谱柱 Chromatographic column	流动相 Mobile phase	保留时间(min) Retention time
Shield™ RP ₁₈ 5 µm, 150 mm × 2.1 mm	0.1% 三氟乙酸 0.1% trifluoroacetic acid	1.683
dC ₁₈ 5 µm, 150 mm × 2.1 mm	0.1% 三氟乙酸 0.1% trifluoroacetic acid	1.887
pak C ₁₈ MG 5 µm, 150 mm × 2.0 mm	0.1% 三氟乙酸 0.1% trifluoroacetic acid	2.265
pursuit polar C ₁₈ 5 µm, 150 mm × 4.6 mm	0.1% 三氟乙酸 0.1% trifluoroacetic acid	3.780
diamonsil® C ₁₈ 5 µm, 150 mm × 4.6 mm	己烷磺酸钠(Sodium hexanesulfonate)(5 mmol/L、 pH 3.0)+甲醇(Methanol) (90 mL+10 mL)	1.860 7.024

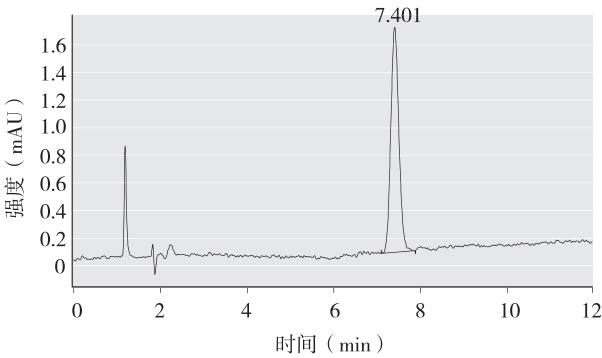


图 1 三聚氰胺标准溶液的色谱图

Figure 1 Chromatogram of melamine standard solution

2.2 线性范围及相关性

用三聚氰胺对照品制作标准曲线, 实验表明标准曲线的线性范围 0.050~2.000 µg/mL, 线性方程 $\hat{Y}=42.114x+0.5292$, 相关系数 $r=0.9999$ 。

2.3 HPLC 方法的定量限

HPLC 方法的定量限按标准曲线最低点计算, 得 10 µg/dm²。

2.4 HPLC 方法的精密度实验

取 3 种不同形状的容器, 分别进行水、4% 乙酸、15% 乙醇各 6 次浸泡以及正己烷溶液各 3 次浸泡实验, 并对各浸泡液进行三聚氰胺精密度实验, 测定结果见表 2。实验表明 3 个样品的 4 种浸泡液测定结果的相对标准偏差为 0.44%~4.87%, 均 <5%, 方法的重现性良好。

2.5 HPLC 方法的准确度回收率实验

取 3 种不同形状的容器, 对其 4 种浸泡液(水、4% 乙酸、15% 乙醇、正己烷)分别进行 0.1 µg/mL 和 1.0 µg/mL 2 个浓度加标回收实验, 即每个样品加入 1 mL 10 µg/mL 或 1 mL 100 µg/mL 的三聚氰胺标准溶液, 在样品浸泡液中浓度为 0.1 µg/mL 或 1.0 µg/mL。其结果见表 3。实验表明其加标回收范围为 85.7%~105.7%, 相对标准偏差为 0.15%~6.41%。方法的回收率良好。

表 2 三聚氰胺样品精密度实验结果

Table 2 Results of precision test for melamine-formaldehyde products

浸泡容器 Soak vessel	浸泡液 Soak solution	各次浸泡的测定结果(mg/m ²) Determination results in every time of soak						测定平均值(mg/m ²) Average value	相对标准偏差(%) Relative standard deviation, RSD
		1	2	3	4	5	6		
1	水(Water)	2.25	2.23	2.19	2.16	2.27	2.21	2.22	1.81
	4% 乙酸(4% acetic acid)	3.83	3.92	3.90	3.91	3.93	3.92	3.90	0.94
	15% 乙醇(15% ethanol)	2.47	2.47	2.32	2.50	2.45	2.45	2.44	2.58
	正己烷(n-hexane)	0.79	0.73	0.78	—	—	—	0.77	4.19
2	水(Water)	1.88	1.87	1.73	1.75	1.68	1.70	1.77	4.87
	4% 乙酸(4% acetic acid)	2.85	2.74	2.76	2.85	2.76	2.78	2.79	1.73
	15% 乙醇(15% ethanol)	1.71	1.67	1.70	1.73	1.70	1.70	1.70	1.14
	正己烷(n-hexane)	0.71	0.70	0.71	—	—	—	0.71	0.82
3	水(Water)	4.78	4.78	4.81	4.83	4.90	4.83	4.82	0.92
	4% 乙酸(4% acetic acid)	6.28	6.20	6.21	6.18	6.19	6.09	6.19	0.99
	15% 乙醇(15% ethanol)	4.37	4.39	4.42	4.37	4.40	4.40	4.39	0.44
	正己烷(n-hexane)	0.71	0.74	0.75	—	—	—	0.73	2.84

表 3 三聚氰胺样品准确度实验结果
Table 3 Results of accuracy test for melamine-formaldehyde products

浸泡容器 Soak vessel	浸泡液 Soak solution	样品序号 Sample No.	样品本底含量 (mg/L) Background content of sample	样品加标量 (mg/L) Labeling value of sample	测出值 (mg/L) Measured value	回收率 (%) Recovery	平均回收率 (%) Average recovery	相对标准偏差 (%) Relative standard deviation, RSD
1	水 (Water)	1	0.299	0.100	0.397	97.7	97.8	2.71
		2	0.296	0.100	0.391	95.2		
		3	0.291	0.100	0.392	100.5		
		1	0.299	1.000	1.302	100.4	99.7	0.67
		2	0.296	1.000	1.291	99.5		
		3	0.291	1.000	1.283	99.1		
	4% 乙酸 (4% acetic acid)	1	0.510	0.100	0.604	94.1	97.7	6.41
		2	0.521	0.100	0.626	104.9		
		3	0.519	0.100	0.613	94.0		
	15% 乙醇 (15% ethanol)	1	0.329	0.100	0.416	86.9	90.5	5.43
		2	0.328	0.100	0.417	88.5		
		3	0.309	0.100	0.405	96.1		
		1	0.329	1.000	1.302	97.3	97.5	0.99
		2	0.328	1.000	1.294	96.6		
		3	0.309	1.000	1.294	98.5		
	正己烷 (n-hexane)	1	0	0.100	0.106	105.7	102.2	4.00
		2	0	0.100	0.098	97.7		
		3	0	0.100	0.103	103.2		
2	水 (Water)	1	0	1.000	0.901	90.1	89.9	1.68
		2	0	1.000	0.883	88.3		
		3	0	1.000	0.912	91.3		
	4% 乙酸 (4% acetic acid)	1	0.250	0.100	0.335	85.7	87.1	1.87
		2	0.248	0.100	0.337	88.9		
		3	0.230	0.100	0.317	86.8		
	15% 乙醇 (15% ethanol)	1	0.245	0.100	1.242	99.3	99.4	0.81
		2	0.248	0.100	1.234	98.6		
		3	0.230	0.100	1.232	100.2		
	正己烷 (n-hexane)	1	0.380	0.100	0.478	98.5	97.6	1.11
		2	0.365	0.100	0.461	96.4		
		3	0.367	0.100	0.465	97.9		
	4% 乙酸 (4% acetic acid)	1	0.380	1.000	1.377	99.8	100.4	0.65
		2	0.365	1.000	1.375	101.1		
		3	0.367	1.000	1.372	100.5		
	15% 乙醇 (15% ethanol)	1	0.227	0.100	0.319	91.7	93.6	2.34
		2	0.223	0.100	0.319	96.0		
		3	0.226	0.100	0.319	93.1		
	正己烷 (n-hexane)	1	0.227	1.000	1.212	98.5	98.6	0.15
		2	0.223	1.000	1.210	98.8		
		3	0.226	1.000	1.212	98.6		
	4% 乙酸 (4% acetic acid)	1	0	0.100	0.095	94.6	93.7	1.07
		2	0	0.100	0.093	92.6		
		3	0	0.100	0.094	93.8		
		1	0	1.000	0.978	97.8	97.0	0.88
		2	0	1.000	0.961	96.1		
		3	0	1.000	0.971	97.1		

续表 3

浸泡容器 Soak vessel	浸泡液 Soak solution	样品序号 Sample No.	样品本底含量 (mg/L) Background content of sample	样品加标量 (mg/L) Labeling value of sample	测出值 (mg/L) Measured value	回收率 (%) Recovery	平均回收率 (%) Average recovery	相对标准偏差 (%) Relative standard deviation, RSD
3	水 (Water)	1	0.631	0.100	0.726	95.3	96.5	1.08
		2	0.632	0.100	0.728	96.8		
		3	0.636	0.100	0.733	97.3		
		1	0.631	1.000	1.623	99.2		
		2	0.632	1.000	1.631	100.0		
		3	0.636	1.000	1.629	99.3		
	4% 乙酸 (4% acetic acid)	1	0.829	0.100	0.926	96.9	96.8	2.02
		2	0.819	0.100	0.917	98.7		
		3	0.820	0.100	0.914	94.8		
		1	0.829	1.000	1.816	98.7	98.6	0.72
		2	0.819	1.000	1.796	97.8		
		3	0.820	1.000	1.812	99.2		
	15% 乙醇 (15% ethanol)	1	0.581	0.100	0.686	104.8	102.9	2.14
		2	0.583	0.100	0.687	103.5		
		3	0.588	0.100	0.688	100.5		
		1	0.581	1.000	1.573	99.2	99.7	0.45
		2	0.583	1.000	1.580	99.6		
		3	0.588	1.000	1.589	100.1		
	正己烷 (n-hexane)	1	0	0.100	0.093	93.3	96.6	3.15
		2	0	0.100	0.097	97.2		
		3	0	0.100	0.099	99.3		
		1	0	1.000	0.982	98.3	98.7	1.38
		2	0	1.000	0.976	97.7		
		3	0	1.000	1.003	100.3		
		1	0	1.000	0.982	98.3	98.7	1.38
		2	0	1.000	0.976	97.7		
		3	0	1.000	1.003	100.3		

3 讨论

乳制品中三聚氰胺测定方法已有报道,但以三聚氰胺-甲醛树脂酯为原料加工制成的食品容器中三聚氰胺迁移量的测定方法目前较少。本方法选择水、4% 乙酸、15% 乙醇、正己烷四种溶剂浸泡食品容器,对三聚氰胺-甲醛食品容器进行溶出实验,所采用的溶剂从模拟食品的特性考虑,选择正己烷模拟脂肪、油脂类食品,选择乙醇溶剂模拟酒类食品,选择乙酸及水溶剂模拟酸性食品及其他食品。在一定模拟条件下,经浸泡提取处理后,通过优化色谱条件,选用极性较强的色谱柱及流动相,选择离子对试剂己烷磺酸钠,并在 pH 值为 2~3 的强酸性条件下,然后采用 C₁₈ 液相色谱柱,高效液相色谱仪紫外检测器进行三聚氰胺食品容器中三聚氰胺迁移量的测定。本方法不但能满足分析方法中精密度、准确度的要求,而且实验操作简单、快速,从而能为日常监督监测提供技术保障。

参考文献:

[1] 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 Addit

Contam, 2007, 24(12): 1319-1325.

[2] MUÑIZ-VALENCIA R, CEBALLOS-MAGAÑA SG, ROSALES-MARTINEZ D, et al. Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 392(3): 523-531.

[3] 张美金,林海丹,林峰,等. 高效液相色谱法测定饲料和宠物食品中三聚氰胺含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2205-2206.

[4] 杨云霞,刘彤,周桂英,等. 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.

[5] 宋书峰,鲁杰,方从容,等. 高效液相色谱法测定乳与乳制品中的三聚氰胺[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(1): 27-31.

[6] 赵永彪,李自春,刘婷,等. 高效液相色谱法测定宠物食品中的三聚氰胺[J]. 分析试验室, 2008, 27(5): 190-192.

[7] 刘红菊,闫冲,李国樵,等. 高效液相色谱法测定饲料及食品中三聚氰胺的研究[J]. 中国医药导报, 2010, 7(18): 12-14.

(收稿日期: 2011-06-16)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 张晶; 校对: 徐新春)