

## 液相色谱-串联质谱法测定人尿中三聚氰胺

江瑞成<sup>1</sup>, 虞成华<sup>2</sup>, 曲勤凤<sup>2</sup>, 吴岷<sup>1</sup>, 陈婧司<sup>1</sup>, 厉曙光<sup>1</sup>, 陈波<sup>1</sup>

**摘要:** [目的] 建立人尿中的三聚氰胺液相色谱-串联质谱测定法。[方法] 尿样经0.2 mol/L盐酸酸化,乙腈超声提取, MCX固相萃取柱净化及浓缩后, 10 μL进样, 并用液相色谱-串联质谱仪进行检测, 检测的色谱条件为: 色谱柱为CAPCELL PAK CR SCX : C18=1:4, 流动相为10 mmol/L的乙酸铵-乙腈-0.1%甲酸混和溶液(体积分数40:50:10), 柱温为30℃, 流速为0.2 mL/min。[结果] 三聚氰胺的保留时间3.95 min, 三聚氰胺在5~200 μg/L的浓度范围内呈线性关系,  $R^2$ 为0.9998。浓度在10、50、100 μg/L时, 回收率在96.7%~97.2%范围内, 相对标准偏差≤5.16%, 最低检出限为0.6 μg/L, 最定量限为2 μg/L。[结论] 该方法前处理简便, 灵敏度高, 适合用来检测人尿液中三聚氰胺。

**关键词:** 固相萃取; 液相色谱-串联质谱; 尿液; 三聚氰胺; 电喷雾离子源

**Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Determination of Melamine in Urine** JIANG Rui-cheng (CHIANG Jui-chen)<sup>1</sup>, YU Cheng-hua<sup>2</sup>, QU Qin-feng<sup>2</sup>, WU Min<sup>1</sup>, CHEN Jing-si<sup>1</sup>, LI Shu-guang<sup>1</sup>, CHEN Bo<sup>1</sup> (1.Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education/Collaborative Innovation Center of Social Risks Governance in Health/School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2.Institute of Quality Inspection of Food and Cosmetics, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200032, China). Address correspondence to WU Min, E-mail: wumin@shmu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

**Abstract:** [Objective] To establish a method for melamine determination in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). [Methods] Urine samples were acidized with 0.2 mol/L hydrochloric acid, extracted in acetonitrile solution assisted with ultrasound, purified and concentrated using MCX solid phase extraction (SPE) column, and detected by LC-MS/MS in a 10 μL sample injection. The chromatographic conditions were as follows: Chromatographic column was CAPCELL PAK CR (SCX : C18=1:4); Mobile phase was a mixed solution (10 mmol/L) containing ammonium acetate, acetonitrile, and 0.1% formic acid that followed a volume fraction of 40:50:10; Column temperature was 30 °C ; Flow rate was 0.2 mL/min. [Results] The retention time of melamine was 3.95 min. Melamine was linear in a range of 5-200 μg/L with a coefficient square ( $R^2$ ) value of 0.9998. At the concentration of 10, 50, and 100 μg/L, the recoveries ranged from 96.7% to 97.2% with relative standard deviations ≤ 5.16%. The limit of detection and limit of quantification were 0.6 μg/L and 2 μg/L, respectively. [Conclusion] The method is featured by simple pretreatment and high sensitivity, which is suitable for detecting melamine in human urine.

**Key Words:** solid-phase extraction; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; urine; melamine; electric spray ion

三聚氰胺, 俗称密胺, 是一种常见的杂环含氮类有机化合物。三聚氰胺曾被一些不法分子利用, 非法添加于饲料和食品中, 造成了2007年北美宠物粮事件<sup>[1]</sup>和2008年中国婴幼儿奶粉事件<sup>[2]</sup>两起重大食品

安全事件的爆发, 损害了我国居民的身体健康, 挫伤了我国在食品工业领域的国际声誉。

三聚氰胺的过量食用导致泌尿系统结石已在动物实验<sup>[3]</sup>和流行病学研究<sup>[4]</sup>中被证实。三聚氰胺危害控制的关键在于对接触居民做出正确的暴露评估, 并判定在相应暴露水平下居民的健康是否可能受损。除了非法添加外, 三聚氰胺也被广泛应用于木材加工、塑料加工、造纸和涂料等行业, 尤其是密胺碗碟的使用, 使得环境中存在一定水平的三聚氰胺污染。我国三聚氰胺的产量位居世界第一<sup>[5]</sup>, 而三聚氰胺通常在动物体内以原型代谢<sup>[6]</sup>, 我国上述非法添加的历史及在工业生活中的应用, 可能导致环境中三聚氰胺

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.16147

[基金项目]国家自然科学基金项目(编号: 81202208)

[作者简介]江瑞成(1988—), 男, 硕士生; 研究方向: 营养与食品卫生学; E-mail: 13211020081@fudan.edu.cn

[通信作者]吴岷, E-mail: wumin@shmu.edu.cn

[作者单位]1.复旦大学公共卫生学院, 教育部公共卫生安全重点实验室, 健康领域社会风险管理协同创新中心, 上海 200032;  
2.上海市质量监督检验技术研究院食品化妆品质量检验所, 上海 200032

背景值水平的上升,带来健康隐忧。为综合考虑不同的接触途径,采用内剂量指标作为接触生物标志物会是评价三聚氰胺暴露的更好办法,也有助于探索三聚氰胺接触与可能的健康损伤效应之间的关系,为今后的风险评估提供更准确的资料,为制定不同人群的接触限值提供帮助。

目前已证实三聚氰胺主要通过肾脏以原型的形式经由尿液排出,尿中的三聚氰胺可作为人体的良好暴露生物标志物。本研究的目的是建立一种采用液相色谱-串联质谱法来检测人尿中三聚氰胺的方法,并结合文献简要评述我国居民三聚氰胺的暴露水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

TSQ Quantum ULTRA 液相色谱-串联质谱仪( Thermo, 美国 ), 涡旋震荡仪( Talboys, 美国 ), DC12H 水浴式氮吹仪( Rainbow, 美国 ), ANPELCLEAN MCX 固相萃取柱、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$  有机相针筒式滤膜过滤器( 上海安谱, 中国 )。三聚氰胺标准品( 纯度  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, 美国 ), 乙酸铵、乙酸、盐酸、氨水均为分析纯, 乙腈、甲醇均为色谱纯, 水为去离子水。

### 1.2 色谱条件

色谱柱为: CAPCELL PAK CR; SCX : C18=1:4 ( 150 mm  $\times$  2.0 mm, 5  $\mu\text{m}$  )( 资生堂, 日本 ), 流动相为 10 mmol/L 的乙酸铵-乙腈-0.1% 甲酸混和溶液( 体积比为 40:50:10 )。10 mmol/L 乙酸铵溶液的配制: 精确量取 0.772 g 乙酸铵置于 1 L 容量瓶中并加入去离子水溶解定容至刻度, 再使用水相滤膜过滤后, 混匀备用。流动相混和溶液临用时配制, 所有试剂都用 0.22  $\mu\text{m}$  孔径滤膜过滤。柱温: 30°C; 流速: 0.2 mL/min; 进样体积: 10  $\mu\text{L}$ 。

### 1.3 质谱条件

电喷雾电离( ESI 源 ), 采用多反应离子监测( MRM )正离子扫描模式, 并利用保留时间和碎片信号比值来判断定性结果。喷雾电压( IS ): 3 500 V; 离子源温度( TEM ): 400°C; 气帘气压力( CUR ): 40 psi; 辅助气: 20 L/min; 保留时间: 0.1 s; 质荷比 127.0  $\rightarrow$  85.0( 用于定量, 碰撞气能量: 20 eV ), 质荷比 127.0  $\rightarrow$  68.0( 用于定性, 碰撞气能量: 35 eV )。

### 1.4 样品来源

尿液样品为上海市膳食调查人群<sup>[7]</sup>的 50 位正常老年人( 年龄 60~89 岁之间, 平均年龄为 68.89 岁 ) 的

随机尿样, 不考虑疾病种类和性别, 用集尿杯采集后, 将尿样转移至 1.5 mL 的塑料离心管并置于 -80°C 冰箱冷冻状态下保存, 该状态下 5 年内不会因冷冻而造成三聚氰胺的降解。空白尿液: 取自上海普陀某社区的 5 名纯母乳喂养婴儿的随机尿样, 由于人体母乳对饮食中的三聚氰胺具有一定的稀释作用( Cruywagen 等<sup>[8]</sup> 报道母牛经饲料摄入三聚氰胺后在牛奶中的分泌系数约为 2% ), 因此纯母乳喂养婴儿的尿样通常可作为三聚氰胺实验的空白尿; 上述尿样混匀后作为空白尿样用于回收率试验与精密度试验。

### 1.5 样品处理

精准量取 2.5 mL 尿样( 冷冻尿液样品于室温下解冻并摇匀 ), 依序加入 0.2 mol/L 盐酸 300  $\mu\text{L}$  、乙腈 9 mL, 超声 10 min 并涡旋混合 5 min 后以 18 000  $\times$  g 离心 5 min, 收集上清液待处理。先依次用甲醇 3 mL 、水 5 mL 使 MCX 固相萃取柱活化, 且保持萃取柱湿润。再将先前收集的上清液全部上柱, 接着依序用水 3 mL 、甲醇 3 mL 洗涤 MCX 固相萃取柱, 过柱流速在 1 mL/min 以内。在真空泵抽干后, 使用 6 mL 氨甲醇溶液( 体积分数 5% )进行洗脱, 洗脱溶液放置于 40°C 水浴式氮吹仪, 吹干后加入 500  $\mu\text{L}$  乙腈水溶液( 体积分数 70% )定容, 涡旋混合 5 min, 样品由 0.22  $\mu\text{m}$  的有机相滤膜过滤到进样瓶中, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

### 1.6 标准溶液配制

精确称量三聚氰胺标准品 100.0 mg, 用甲醇水混合液( 体积分数 50% )溶解, 稀释并定容于 1 000 mL 的棕色容量瓶中, 配成浓度为 100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液, -20°C 避光保存。

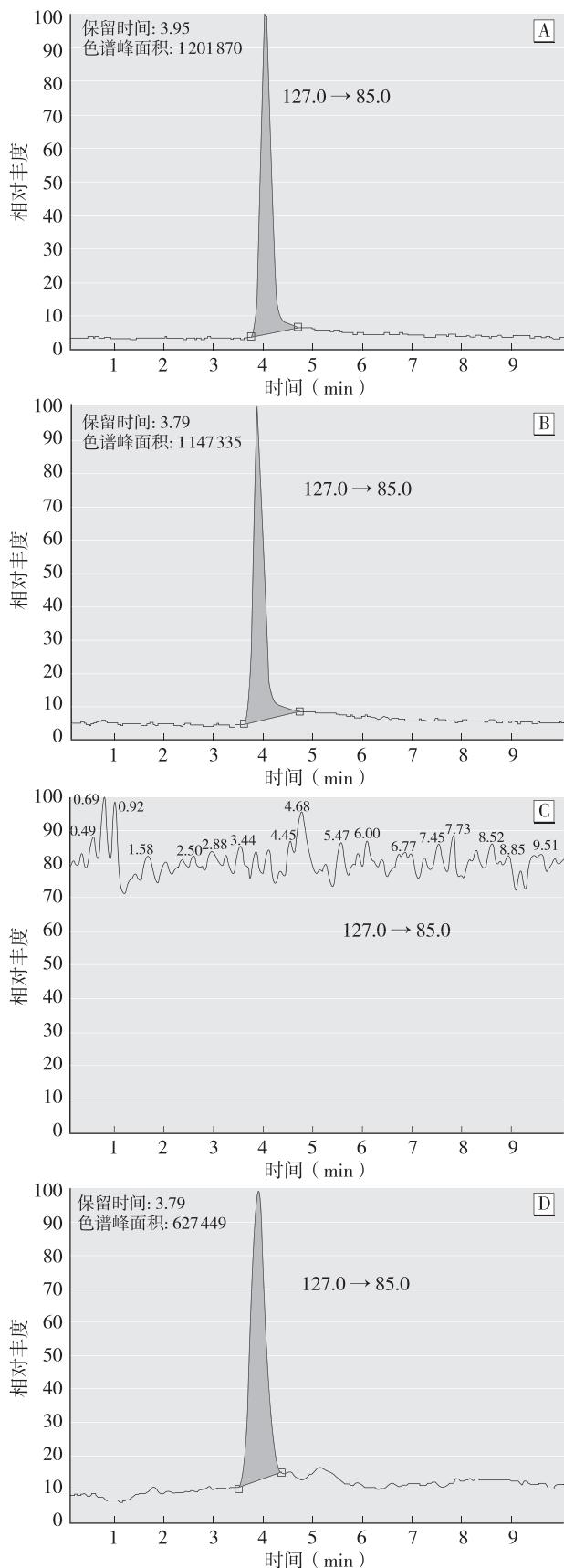
## 2 结果

### 2.1 专属性试验

采用“1.2”所述色谱条件, 结果显示三聚氰胺的保留时间为 3.95 min, 空白尿液样品并不影响三聚氰胺的测定, 专属性好( 图 1 )。

### 2.2 线性范围、检出限与定量限

配制三聚氰胺质量浓度( 下称浓度 )分别为 5、10、25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{L}$  的标准品溶液, 按照“1.2”所述色谱条件进样检测, 并以三聚氰胺标准品浓度(  $x$  )为横坐标, 色谱峰面积(  $y$  )为纵坐标作图, 得到标准曲线回归方程为  $y=24066x+24474$ ,  $R^2=0.9998$ 。结果显示, 三聚氰胺在 5~200  $\mu\text{g}/\text{L}$  的浓度范围内有良好的线性关系。



[注]A: 三聚氰胺标准品(含三聚氰胺50 μg/L); B: 空白尿液样品加标(含三聚氰胺50 μg/L); C: 空白尿液样品; D: 尿液样本(含三聚氰胺27.3 μg/L)。

图1 三聚氰胺色谱图

在“1.2”所述的色谱条件下,进样10 μL,将相当于3倍和10倍信噪比时的三聚氰胺色谱信号所对应的浓度用于推算最低检出限(limit of detection, LOD)和最低定量限(limit of quantification, LOQ),逐次倍数稀释配制5、2.5、1.25、0.625和0.3125 μg/L的标准溶液,可观察到溶液在0.625 μg/L时有明显的三聚氰胺出峰(0.3125 μg/L时没有),在0.625 μg/L附近反复验证(连续3 d,每天试验3次),均可观察到在3倍性噪比时,可检测到0.6 μg/L的三聚氰胺标准溶液,因此将本研究方法的LOD定为0.6 μg/L。同理,配制10、5、2.5和1.25 μg/L的标准溶液,在10倍信噪比时均在2.5 μg/L时有明显的三聚氰胺出峰(1.25 μg/L时没有)。经连续3 d,每天3次验证,在10倍性噪比下均可检测到2 μg/L的三聚氰胺,因此将本次实验的LOQ定为2 μg/L。

### 2.3 方法的精密度、加标回收率试验

取空白尿液2.5 mL,加入浓度分别为10、50、100 μg/L的三聚氰胺标准溶液作为加标试验样品,每个浓度组各6个加标试验样品。按“1.5”样品处理进行操作,并在最佳质谱及色谱条件下进行检测分析。在同一天内,将每个浓度组各6个加标试验样品各进样1次,结果可得出浓度分别为10、50、100 μg/L时的日间精密度(相对标准偏差, relative standard deviation, RSD)在2.45%~5.12%之间;同样,取空白尿液2.5 mL,加入浓度分别为10、50、100 μg/L的三聚氰胺标准溶液为试验样品,每个浓度组各1个加标试验样品。按“1.5”样品处理进行操作,并在最佳质谱及色谱条件下进行检测分析。各浓度组每日将试验样品进样测定1次,共6 d,结果可得出日间精密度的RSD在3.92%~8.65%之间(表1)。

取空白尿液2.5 mL,加入浓度分别为10、50、100 μg/L的三聚氰胺标准溶液作为回收率试验样品,每个浓度组各6个加标试验样品。按“1.5”样品处理进行操作,并在最佳质谱及色谱条件下进行检测分析。得出回收率在96.7%~97.2%范围内,RSD为2.26%~5.16%(表1)。

表1 方法加标回收率及精密度试验结果

加标量 (μg/L)	平均回收率 (%)	回收率RSD (%)	日内RSD (%)	日间RSD (%)
10	97.2	5.16	5.12	8.65
50	96.7	4.34	4.66	6.32
100	96.9	2.26	2.45	3.92

## 2.4 实际尿液样品检测

利用本次所建立的尿样处理方法对50位正常老年人的随机尿样进行了检测,结果显示共有44份尿

样中检验出三聚氰胺,其浓度在0.6~83.93 μg/L之间。本次实际样品中检测的尿中三聚氰胺的浓度水平与国内外文献的比较见表2。

表2 LC-MS/MS所测尿样中三聚氰胺浓度的国内外文献比较

文献	人群	样本量	LOD( μg/L )	浓度范围( μg/L )	检出率( % )	平均水平( μg/L )
本研究	正常老年人	50	0.60	<LOD~83.93	88.0	M: 3.37; GM: 3.62 54%的人≥3.12
简龙海等 <sup>[9]</sup>	婴幼儿	91	20.00	<LOD~978	56.1	—
Panuwet等 <sup>[10]</sup>	正常人	492	0.66	<LOD~161	76.0	GM: 2.37
Liu等 <sup>[11]</sup>	成年结石病人	211	—	<LOD~192.32	62.1	31.8%的人≥3.12
Liu等 <sup>[11]</sup>	正常成年人	211	—	<LOD~55.56	20.4	9.5%的人≥3.12

[注] LOD: 最低检测限; M: 中位数; GM: 几何均数。

## 3 讨论

自三鹿奶粉事件后,随着国家对食品中非法添加的严厉打击,三聚氰胺已逐渐淡出民众视线,不再成为学界的研究热点。但近年来部分研究结果应引起人们的高度重视。Liu等<sup>[12]</sup>发现台湾成年结石患者尿中三聚氰胺浓度明显高于对照组,作者推测即使接触低浓度的三聚氰胺也可能导致成年人罹患结石,而Zheng等<sup>[13]</sup>则证实三聚氰胺在人体内有可能受土氏克雷伯菌的转化作用变为三聚氰酸,由于三聚氰胺和三聚氰酸在形成结石时存在极强的协同作用,因此有理由担心即使在相对低浓度的接触水平下,如果人体携带有土氏克雷伯菌,也存在罹患结石的可能性。

本研究利用建立的检测方法对50位正常老年人的尿样进行检测,三聚氰胺检出率高达88%,浓度中位数为3.37 μg/L,几何均值为3.62 μg/L。我国简龙海等<sup>[9]</sup>曾对上海91份2010年前收集的尿样进行检测,三聚氰胺检出率为56%,浓度范围为22~978 μg/L,虽检测限高达20 μg/L,但检出率仍高于本研究的检测结果。Liu等<sup>[11]</sup>曾对台湾211名成年结石病人和211名成年正常人的尿中三聚氰胺进行检测,检出率分别为62.1%和20.4%,超过3.12 μg/L高浓度的人群分别为31.8%和9.5%。Panuwet等<sup>[10]</sup>则对492例美国人的尿中三聚氰胺浓度进行了监测,检出率为76%,几何均数为2.37 μg/L。显然,本研究和简龙海等<sup>[9]</sup>的检测结果高于Panuwet等<sup>[10]</sup>和Liu等<sup>[11]</sup>的检测结果(表2)。结合上一段讨论对低浓度暴露于三聚氰胺可能导致结石的讨论,本研究认为我国应当高度重视当前国人的三聚氰胺暴露水平,并深入研究在该暴露水平下民众罹患结石的风险是否会增加。本研究正是在上述背景下期望建立人尿中三聚氰胺检测的有效方法,为后续开展三聚氰胺

的暴露评估提供帮助。

在方法的建立过程中,本研究主要参照乳制品中三聚氰胺检测的国家标准<sup>[14]</sup>,以及国内外的相似文献<sup>[9~11]</sup>开展。在样品的前处理过程中,本研究先加入0.2 mol/L的盐酸溶液以酸化尿样,之后再选用乙腈来提取尿液样品中的三聚氰胺,结果显示提取率好,色谱图峰形好,且无杂质峰干扰。另外,酸化后的尿样有利于三聚氰胺与固相萃取柱中的阳离子交换树脂相互作用。由于尿液的基质成份多且复杂,某些基质成份可能会干扰三聚氰胺的检测,因此,本研究比较了四种不同有机提取溶剂,分别为甲醇、乙醇、乙腈和丙酮,提取率分别为85.2%、91.0%、100.2%和81.1%,结果显示乙腈的提取率最高。同时乙腈使尿中蛋白沉淀完全,易于离心分离。在尿液样品纯化环节,本研究比较了MCX和PCX两种阳离子交换柱,结果显示两种阳离子交换固相萃取柱的纯化效率并无差异,在考虑成本后本研究选用了MCX阳离子交换固相萃取柱来纯化尿液样品。

三聚氰胺是一种强极性物质,由于尿液样品杂质峰众多,采用常规的C18色谱柱进行检测时,三聚氰胺与杂质峰无法有效区分。本研究运用三聚氰胺具备阳离子活性的特点,选择对极性物质具有良好保留能力的强阳离子交换与反相C18的混合填料为1:4的色谱柱进行分析,得到了良好且稳定的保留时间。本研究选用乙酸铵-乙腈-0.1%甲酸溶液作为流动相洗脱,对乙酸铵的浓度进行了优化,发现浓度在5~20 mmol/L时,三聚氰胺的保留时间和响应均无明显变化,因此选择乙酸铵浓度为10 mmol/L。此外,流动相中乙腈的比例对保留时间影响较大,本研究分别对不同比例的乙腈(40%、50%、60%)进行了考察,发现含40%乙

腈时,三聚氰胺保留时间偏长;含60%乙腈时,三聚氰胺的峰型较差,保留时间偏短;含50%乙腈时,保留时间适中,峰型好,无干扰,所以流动相中乙腈的比例最终采用50%。同时,甲酸的加入可以调节保留时间,减少干扰,也有利于三聚氰胺分子的离子化,提高了灵敏度。

由于三聚氰胺属于阳离子型化合物,适于正离子分析模式。本研究在ESI正离子模式下采用手动注射的方式,以0.5 mg/L的三聚氰胺标准品溶液来进行母离子全扫描,最终得到三聚氰胺的母离子质荷比为127.0。对其子离子进行全扫描,则得到质荷比分别为109.0、43.4、85.0、68.0等子离子。选用碎片离子峰丰度最强的两种子离子(质荷比分别为85.0和68.0)作为检验三聚氰胺的定量与定性用离子。根据三聚氰胺在色谱柱上的保留性质,将质谱仪设置为正离子扫描模式,应用多反应监测正离子模式来优化电喷雾电压、离子源温度、脱溶剂气温度和碰撞能量等质谱参数,最终检测到了良好的三聚氰胺质谱色谱图。

本研究建立了人尿中三聚氰胺检测的液相色谱-串联质谱法,并采用该方法检测了50例正常老年人的尿中三聚氰胺含量,检测限与同类国外文献相近,最终结果显示高达88%的老年人尿中可检出三聚氰胺,暴露水平高于台湾和国外人群,提示我国应重视民众的三聚氰胺暴露。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

## 参考文献

- [ 1 ] 王娟娟,陈凯,朱小蕾.“宠物毒粮”中的假冒蛋白质—三聚氰胺[J].化学教育,2008(8): 4-5.
- [ 2 ] 迟玉聚,许美艳.三聚氰胺奶粉事件评析[J].食品与药品,2008,10(11): 70-73.
- [ 3 ] 邹移海,张薇,张钟广,等.三聚氰胺诱发SD大鼠尿结石初步观察[J].广州中医药大学学报,2009,26(1): 95-101.
- [ 4 ] 段君凯,吴华平,钟建民,等.江西地区食用含三聚氰胺奶粉所致婴幼儿泌尿系统结石的流行病学调查[J].江西医学院学报,2009,49(7): 107-110.
- [ 5 ] 汪家铭.三聚氰胺生产现状及市场分析[J].化工设计,2008,18(2): 47-51.
- [ 6 ] 兰欣怡,王加启,卜登攀,等.三聚氰胺在动物体内代谢的研究进展[J].中国乳业,2010(1): 66-68.
- [ 7 ] 孟派,贾俐挺,高曦,等.上海社区成年人群超重肥胖与膳食模式的关系探讨[J].卫生研究,2014,43(4): 567-572.
- [ 8 ] Cruywagen C W, Stander M A, Adonis M, et al. Hot topic: pathway confirmed for the transmission of melamine from feed to cow's milk[J]. J Dairy Sci, 2009, 92(5): 2046-2050.
- [ 9 ] 简龙海,闻宏亮,匡新宇,等.LC-APCI-MS/MS法同时测定尿液中的三聚氰胺和三聚氰酸[J].中国卫生检验杂志,2010,20(11): 2701-2703.
- [ 10 ] Panuwet P, Nguyen J V, Wade E L, et al. Quantification of melamine in human urine using cation-exchange based high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 887-888: 48-54.
- [ 11 ] Liu C C, Wu C F, Chen B H, et al. Low exposure to melamine increases the risk of urolithiasis in adults[J]. Kidney Int, 2011, 80(7): 746-752.
- [ 12 ] Wu C F, Liu C C, Chen B H, et al. Urinary melamine and adult urolithiasis in Taiwan[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(3/4): 184-189.
- [ 13 ] Zheng X, Zhao A, Xie G, et al. Melamine-induced renal toxicity is mediated by the gut microbiota[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(172): 172ra22.
- [ 14 ] 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法: GB/T 22388—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.

(收稿日期:2016-01-21)

(英文编辑:汪源;编辑:王晓宇;校对:陶黎纳)