中国科学 B辑:化学 2009 年 第 39 卷 第 8 期: 845 ~ 849
www.scichina.com chem.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

反相高效液相色谱法同时分析三聚氰酸和三聚氰胺

侯升杰, 王辉, 丁明玉*

清华大学化学系, 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084

* 通讯作者, E-mail: dingmy@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2009-05-28; 接受日期: 2009-06-16

摘要 建立了同时分析三聚氰酸和三聚氰胺的反相高效液相色谱法. 发现三聚氰酸和三聚氰胺在C_8柱上的保留比在C_{18}柱上明显要强, 这一结果表明三聚氰酸和三聚氰胺在反相固定相中的保留并非以通常的疏水分配作用为主导. 方法的紫外检测下限为 0.034~0.31 mg/L, 标准曲线线性范围为 0.5~100 mg/L. 方法不经特殊的样品前处理即可用于奶粉和游泳池水等样品中三聚氰酸和三聚氰胺的同时分析.

关键词
高效液相色谱法
三聚氰酸
三聚氰胺
奶粉

1 引言

三聚氰酸和三聚氰胺均属三嗪类含氮杂环有机化合物, 都是常用化工原料, 三聚氰胺生产过程中会产生副产物三聚氰酸. 三聚氰胺在强酸或强碱溶液中水解最终也生成三聚氰酸. 三聚氰胺和三聚氰酸可以通过分子间氢键形成难溶于水的网状结构晶体[1]. 三聚氰胺在人体内还能与三聚氰酸结合生成难溶的氰尿酸三聚氰胺复合物, 从而造成结石损伤肾脏. 尽管三聚氰胺和三聚氰酸本身的急性毒性作用并不高, 在体内大部分以原型从尿液排出, 但大剂量或长期摄入将对肾脏产生毒性, 同时还可能对心脏等其他人体器官产生毒性作用[2]. 它们的毒性对婴幼儿的影响较成年人更严重.

最近两年, 国外不法厂商将三聚氰胺添加到宠物食品中造成宠物死亡的事件引起国际关注, 去年在我国出现了将三聚氰胺添加到牛奶中造成大量婴幼儿肾结石病例甚至死亡的重大食品安全事故. 三聚氰酸还常与氯类消毒剂共用于游泳池消毒, 以减缓起消毒作用的氯气被阳光分解的速度[2]. 因此, 三聚氰酸和三聚氰胺的检测有很多实际需求. 三聚氰酸和三聚氰胺的同时分析方法对于研究三聚氰胺在环境和动物体内的转变和代谢也有重要意义.

目前, 有关三聚氰胺的分析报道比较多, 主要有高效液相色谱法[3,4]、液相色谱-质谱联用法[5]. 三聚氰酸的分析方法国内几乎没有见到, 国外报道的主要有滴定法[6]、比色法、脉冲极谱法[7]和高效液相色谱法[8]等. 关于三聚氰酸和三聚氰胺的同时分析方法则鲜有报道[9]. 本文旨在建立一个能够同时分析三聚氰胺和三聚氰酸的高效液相色谱法, 并尝试其在奶制品等样品中的实际应用.

2 实验部分

2.1 仪器与色谱条件

安捷伦 1100 高效液相色谱仪; 色谱柱为Shim-pack CLC-C_8 柱 (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm)和Agilent extend-C_{18} 柱 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm); 流动相为 10 mmol/L磷酸盐缓冲液(往 10 mmol/L磷酸氢二钠溶液中加入 10 mmol/L磷酸二氢钠至pH

7.5); 流速：1 mL/min; 进样量 20 μL; 紫外检测波长 200 nm.

2.2 试剂

三聚氰胺和三聚氰酸分别购于北京化工厂和国药集团化学试剂有限公司. 磷酸氢二钠和磷酸二氢钠购于北京益利精细化学品有限公司. 实验试剂均为分析纯, 水为去离子水. 奶粉样品于 2006 年 12 月购于北京某超市, 游泳池水取自清华大学游泳馆.

2.3 样品前处理

称取 1 g 奶粉, 加入 10 mL 甲醇超声 10 min 后, 离心 15 min, 取上层清液减压蒸干, 最后用 10 mL 去离子水溶解. 进样前用 0.45 μm 滤膜过滤. 游泳池水则只需在进样前用 0.45 μm 滤膜过滤.

3 结果与讨论

3.1 三聚氰酸和三聚氰胺在反相柱上的保留与分离特点

三聚氰酸和三聚氰胺都具有较强的极性和亲水性, 在反相柱上的保留都比较弱, 特别是三聚氰酸的保留很小, 往往受死体积处的系统峰(样品中不保留物质产生)的干扰. 为了使三聚氰酸具有尽可能大的保留, 只能最大限度减少流动相中有机溶剂的比例. 本研究选择常用的C_8和C_{18}反相柱进行实验, 发现只有流动相中不含有机溶剂, 即使用 10 mmol/L磷酸盐缓冲液时, 三聚氰酸在反相柱上才有明显的保留.

往 10 mmol/L磷酸氢二钠溶液中加入 10 mmol/L磷酸二氢钠调节流动相pH分别为 5.5, 6.5, 7.5 和 8.5, 研究流动相pH对溶质保留的影响. 结果发现流动相pH值对三聚氰酸和三聚氰胺在C_8和C_{18}柱上的保留有明显影响. 图 1 是流动相pH对三聚氰酸和三聚氰胺在C_8柱上保留的影响. 从图 1 中可以看出, 三聚氰酸的保留时间随着pH增加而减小, 这是因为随着pH的增加, 三聚氰酸分子中羟基氢的解离增强, 分子极性增强. 而三聚氰胺总体而言则随pH增加保留时间逐渐增加. 这是因为三聚氰胺分子中氨基的质子化随pH增大(氢离子浓度减小)而减弱, 即极性减弱. 在pH 7.5 之后, 三聚氰胺的荷电性质基本不变(极性也基本不变), 但流动相的黏度、极性等性质随流动相pH的变化导致pH 7.5 之后三聚氰胺的保留时间有所降低. 另外, 当流动相pH为 5.5 时, 三聚氰酸的色谱峰发生分叉, 这可能是三聚氰酸存在烯醇式和酮式互变异构体所致. 烯醇式异构体在中性和碱性介质中比较稳定, 而酮式异构体在酸性介质中比较稳定. 分叉峰是两种互变异构体共存的体现, 因为极性相对较弱的酮式异构体在反相柱上的保留比烯醇式异构体更强一些, 因此两者在保留时间上出现较小的差异. 流动相pH对三聚氰酸和三聚氰胺在C_{18}柱上保留的影响与在C_8柱上的趋势是一致的(图略), 但由于三聚氰酸在C_{18}柱上的保留时间太小, 已经看不出保留时间随pH增大而降低. 实验还发现, 随着pH增加, 三聚氰酸和三聚氰胺的响应值都呈增加趋势. 综合考虑检测灵敏度和分离度, 本研究选择pH 7.5 的 10 mmol/L磷酸盐缓冲液作流动相.

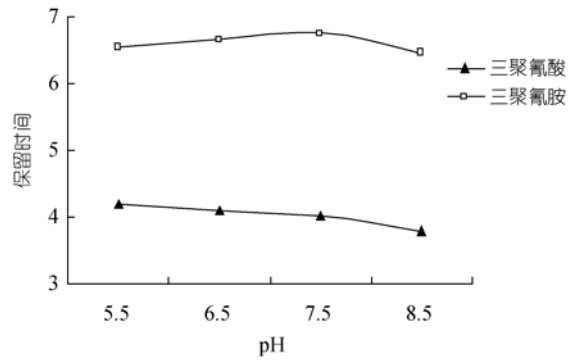

图 1 流动相pH对三聚氰胺和三聚氰酸在C_8柱上保留的影响

用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.5)作流动相, 三聚氰酸在C_8和C_{18}柱上的容量因子(k')分别为 0.392 和 0.232; 三聚氰胺在C_8和C_{18}柱上的k'分别为 1.34 和 0.554. 三聚氰酸和三聚氰胺在C_8柱和C_{18}柱上的分离度(R)分别为 6.99 和 6.08. 尽管在两根柱上的分离度没有明显差别, 但三聚氰酸在C_{18}柱上的保留太小, 容易受死体积处的系统峰影响. 因此, 一般而言, 使用C_8柱更合适. 理论上而言, C_{18}柱的疏水性较C_8柱大, 物质基于疏水分配作用应该在C_{18}柱上保留更强. 但是, 在本研究中三聚氰酸和三聚氰胺在柱长较短(150 mm)的C_8柱上的保留反而明显大于柱长更长(250 mm)的C_{18}柱. 这一结果预示着三聚氰酸和三聚氰胺在反

相固定相中的保留机理并非以疏水分配主导, 可能还有其他相互作用力, 例如三聚氰酸和三聚氰胺分子与固定相上残余硅羟基之间的氢键相互作用. 固定相表面残余硅羟基的多少又与固定相封尾技术有关, 采用不同封尾技术制备的固定相, 残余硅羟基的比例会有明显差异. 另外, C_8固定相表面键合的碳链较短, 对硅羟基的屏蔽作用也不如C_{18}固定相表面的长碳链大.

3.2　方法评价

三聚氰酸和三聚氰胺的标准曲线是以被测物浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标得到. 每个浓度平行测定三次. 在 0.5~100 mg/L 浓度范围内研究了标准曲线的线性. 检测限是噪声大小的 3 倍峰高所对应的被测物浓度. 线性回归方程、相关系数和检出限等参数列于表 1. 结果表明：三聚氰酸和三聚氰胺标准曲线线性范围宽、检测灵敏度能满足普通样品分析要求.

表 1　三聚氰酸和三聚氰胺的线性方程和检测限

固定相	分析物	线性方程	线性范围 (mg/L)	相关系数	检测限 (mg/L)
C_8	三聚氰酸	Y=198.47X–58.19	0.5~100	0.9999	0.17
	三聚氰胺	Y=495.83X+96.90	0.5~100	0.9998	0.31
C_{18}	三聚氰酸	Y=177.15X+90.89	0.5~100	0.9999	0.052
	三聚氰胺	Y=435.34X+135.40	0.5~100	0.9999	0.034

在优化的色谱条件下, 连续 5 次重复测定 1 mg/L 三聚氰酸和 1 mg/L三聚氰胺标准溶液, 得到三聚氰酸和三聚氰胺的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD). 使用C_8柱时, 三聚氰酸和三聚氰胺保留时间的RSD分别是 0.45%和 0.79%, 峰面积的RSD分别是 2.36%和 1.32%; 使用C_{18}柱时, 三聚氰酸和三聚氰胺保留时间的RSD分别是 0.24%和 0.61%, 峰面积的RSD分别是 4.17%和 3.31%. 结果表明方法具有很好的精密度.

3.3　样品定量分析

为了检验所建立的三聚氰酸和三聚氰胺同时分析方法的实用性, 选择了奶粉和游泳池水这两种有应用需求的样品. 图 2(a) 是含三聚氰酸和三聚氰胺各 1 mg/L的标准溶液和加入三聚氰酸和三聚氰胺标准溶液各 1 mg/L的游泳池水(图 2(b))在C_{18}柱上分离的色谱图. 从图 2 可以看出, 保留很弱的三聚氰酸也能与其前面的系统峰完全分开. 这说明即使保留很弱的C_{18}柱也可以用于游泳池水等简单基体样品中的三聚氰酸和三聚氰胺的同时分析. 所取游泳池水样品中未检出三聚氰酸, 说明此游泳池水未采用含三聚氰酸的消毒剂. 因为牛奶样品基体复杂, 在C_{18}柱上三聚氰酸保留太小, 不足以与邻近的系统峰或共存物质峰分开. 图 3(a)是含三聚氰酸和三聚氰胺各 1 mg/L 的标准溶液和未经特殊样品前处理的奶粉样

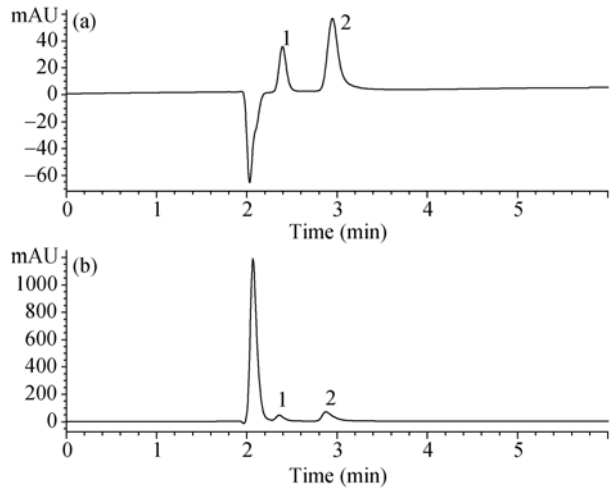

图 2　三聚氰酸和三聚氰胺在C_{18}柱上的分离色谱图

(a) 为标准溶液; (b) 为游泳池水中加入三聚氰酸和三聚氰胺各 1 mg/L. 色谱峰: 1. 三聚氰酸, 2. 三聚氰胺

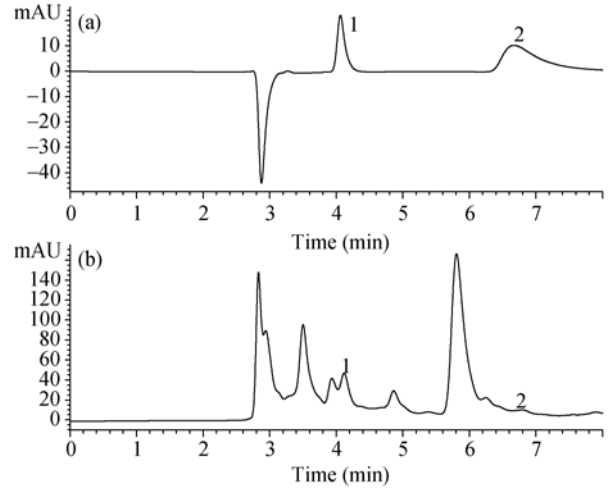

图 3　三聚氰酸和三聚氰胺在C_8柱上的分离色谱图

(a) 为标准溶液; (b) 为奶粉样品. 色谱峰: 1. 三聚氰酸, 2. 三聚氰胺

品(图 3(b))在C_8柱上的分离色谱图, 从图 3 可以看出, 即使是保留较大的C_8柱, 奶粉样品中的三聚氰酸峰也未能与邻近杂质峰达到基线分离. 实验表明常用的C_{18}固相萃取柱不能有效除去干扰物质, 如果要获得更好的分离效果, 则需对样品的前处理方法进行更深入系统的研究. 不过, 三聚氰胺峰则不受邻近杂质峰的干扰. 经过三次平行测定, 得到奶粉中三聚氰酸和三聚氰胺的含量分别为 18.6 和 0.6 mg/kg.

奶粉加标回收实验是在样品提取之前分别加 20 和 5 μg 三聚氰酸和三聚氰胺于 1 g 奶粉样品中, 然后按照 2.3 节的前处理方法进行提取和液相色谱分析. 每个加标水平进行三次平行测定, 得到三聚氰酸在两个加标水平的回收率分别为 97.3% 和 105.1%, 三聚氰胺在两个加标水平的回收率分别为 95.1%和 92.9%.

4 结论

三聚氰酸常与三聚氰胺共存, 相比于三聚氰胺, 三聚氰酸在食品安全领域尚未引起人们对其危害的关注. 而且有关三聚氰胺在体内的代谢动力学也缺少研究. 游泳池水中三聚氰酸的检测也将随着其使用的增加而引起人们的关注. 因此, 建立一个简便快速的同时测定三聚氰酸和三聚氰胺的方法是十分紧迫和必要的. 本文建立的基于紫外检测的反相高效液相色谱法简便快速, 在不进行特别的样品前处理的情况下, 也能基本满足奶粉和游泳池水中三聚氰酸和三聚氰胺的同时分析. 然而, 对于像奶粉这样基体复杂的样品, 还需要开发有效的样品前处理方法, 以避免基体物质峰对三聚氰酸测定的干扰.

参考文献

1 Thoma S R, Kulkarni I G U. A hydrogen-bonded channel structure formed by a complex of uracil and melamine. Beilstein J Org Chem, 2007, 3: 17[DOI]

2 胡虎, 盛宏强, 马晓琼, 来茂德. 三聚氰胺及其同系物三聚氰酸的生物学效应和毒理学研究进展. 浙江大学学报(医学版), 2008, 37(6): 544—550

3 占春瑞, 郭平, 温志海, 左海根, 罗晓洪. 液相色谱检测饲料中三聚氰胺残留量的方法研究. 饲料检测与品质控制, 2007, (11): 18—23

4 侯冬岩, 刘晓媛, 刁全平, 回瑞华. 酸奶饮料中三聚氰胺的高效液相色谱法分析. 鞍山师范学院学报, 2008, 10 (6): 27—29

5 王静, 刘铮铮. 使用超高效液相色谱/串联质谱分析水样中的三聚氰胺. 环境化学, 2009, 28(2): 313—314

6 Morales R. Potentiometric titrations of cyanuric acid and melamine in dimethyl sulfoxide. Anal Chem, 1968, 40(7): 1148—1149[DOI]

7 Struys J, Wolfs P M. Determination of cyanuric acid in swimming pool water by differential pulse polarography. Anal Chim Acta, 1987, 199: 173—176[DOI]

8 Cantú R, Evans O, Kawahara F K, Wymer L J, Dufour A P. HPLC determination of cyanuric acid in swimming pool waters using phenyl and confirmatory porous graphitic carbon columns. Anal Chem, 2001, 73: 3358—3364[DOI]

9 栾伟. 宠物食品中三聚氰胺及三聚氰酸的液相色谱串联质谱法分析. 分析测试学报, 2008, 27(7): 203—206

Simultaneous determination of cyanuric acid and melamine by reversed phase high performance liquid chromatography

HOU ShengJie, WANG Hui & DING MingYu *

The Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology, Ministry of Education; Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: A reversed phase high performance liquid chromatographic method is developed for the simultaneous determination of cyanuric acid and melamine. The retention and separation characteristics of cyanuric acid and melamine on C_8 and C_{18} columns are compared, and the result shows that both of cyanuric acid and melamine are of stronger retention on C_8 column than C_{18} column. This result indicates that the retention mechanism of cyanuric acid and melamine on the reversed phase columns is not controlled by hydrophobic distribution. The detection limits of the cyanuric acid and melamine are 0.034~0.31 mg/L by UV detector, and the linear range of the calibration curves for cyanuric acid and melamine are 0.5~100 mg/L. The proposed method is applied to the simultaneous determination of cyanuric acid and melamine in milk power and swimming pool water without special sample pretreatment.

Keywords: high performance liquid chromatography, cyanuric acid, melamine, milk power