

新型的分子印迹固相萃取小柱分离富集饲料中的三聚氰胺

黄华斌¹, 赵丽¹, 吕靖¹, 庄峙厦^{2*}, 王小如¹ (1. 厦门华夏职业学院检验科学与技术系, 福建厦门 361024; 2. 厦门大学化学化工学院, 福建厦门 361005)

摘要 [目的] 研制一种新型的分子印迹固相萃取小柱, 用于分离富集饲料中的三聚氰胺。[方法] 采用本体聚合法制备了三聚氰胺分子印迹聚合物, 以该聚合物为填料制作三聚氰胺分子印迹固相萃取 (MIP-SPE) 小柱, 优化了固相萃取条件, 应用高效液相色谱 (HPLC) 法测定浓缩液中的三聚氰胺含量。[结果] 自制的 MIP-SPE 小柱可以从饲料中选择性地分离、富集三聚氰胺, 有效地去除饲料中的复杂基质, 加标回收率约为 95%。MIP-SPE 小柱与空白印迹固相萃取小柱 (NMIP-SPE) 的对比试验表明, 前者的萃取效率明显高于后者。[结论] 自制的新型三聚氰胺 MIP-SPE 小柱可用于饲料提取液中的三聚氰胺高选择性分离富集, 使用简便, 具有广阔的应用前景。

关键词 分子印迹; 固相萃取; 饲料; 三聚氰胺

中图分类号 S816.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)16-07174-03

Separation and Enrichment of Melamine in Feed by a New Molecular Imprinting Solid-phase Extraction Column

HUANG Hua-bin et al (Department of Test Science and Technology, Xiamen Huaxia Vocational College, Xiamen, Fujian 361024)

Abstract [Objective] The research aimed to develop a new molecular imprinting solid-phase extraction column for the separation and enrichment of melamine in feed. [Method] The molecular imprinting polymer of melamine was prepared by noumenon polymeric method. This polymer was used as filler to prepare molecular imprinting polymer solid-phase extraction (MIP-SPE) column of melamine. The solid-phase extraction conditions were optimized and melamine content in concentrated solution was determined by using HPLC. [Result] Melamine could be separated selectively from feed and enriched by home-made MIP-SPE column. It could wipe off complex matrix from feed and the addition recovery rate was 95%. The contrast experiment between MIP-SPE column and NMIP-SPE (non-imprinted polymer-solid phase extraction) column showed that the extraction efficiency of the former was obviously higher than the latter. [Conclusion] The home-made MIP-SPE column could be used to separate and enrich melamine in feed efficiently, with a broad application prospect.

Key words Molecular imprinting; Solid-phase extraction; Feed; Melamine

分子印迹聚合物 (Molecularly imprinted polymers, MIPs) 作为固相萃取 (Solid-phase extraction, SPE) 填料用来分离富集复杂样品中的目标分子, 具有选择性好、稳定、可重复使用等特点而被广泛应用于环境、医药、食品等试样中分析物的分离富集^[1]。

三聚氰胺是 1 种三嗪类含氮杂环的有机化工原料, 不得用于食品或饲料中, 在饲料中添加三聚氰胺将导致动物制品 (肉、奶、蛋等) 中的三聚氰胺超标。近年来, 不法分子的违法添加和生产过程中器具溶出的影响使三聚氰胺备受关注^[2-3]。目前, 国内外检测食品及饲料内三聚氰胺的残留通常采用液相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-串联质谱法、毛细管电泳-质谱法等^[4-7]。由于质谱联用仪器成本较高, 检测方法较难普及; 而食品或饲料样品基质较为复杂, 给色谱分离带来困难, 而三聚氰胺在样品中的含量低, 导致液相色谱法的检测能力较低, 因此富集、净化等样品前处理在色谱检测中显得尤其重要。笔者采用本体聚合法合成了对三聚氰胺具有特异性识别能力的分子印迹聚合物, 制作了一种结构新颖的三聚氰胺 MIP-SPE 小柱, 用于固相萃取饲料提取液中的三聚氰胺, 从饲料的复杂基质中有效分离并富集了三聚氰胺, 结合 HPLC 法对饲料中三聚氰胺含量进行检测。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 LC-20A 高效液相色谱仪 (岛津仪器有限公司)

基金项目 厦门市科技计划项目 (3502Z20110018)。

作者简介 黄华斌 (1983-), 男, 福建漳州人, 讲师, 硕士, 从事食品分析检验技术的开发与研究, E-mail: skier128@163.com。* 通讯作者, 高级工程师, 硕士生导师, 从事仪器分析工作, E-mail: zzx@xmu.edu.cn。

收稿日期 2013-05-02

司); C18 柱 (Inertsil ODS-SP, 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) UV2200 型紫外可见分光光度计 (岛津仪器有限公司); CT15RT 型离心机 (Techcomp); 旋涡混合器 (IKA MS 3basic); 精密鼓风干燥箱 (施都凯仪器设备有限公司); 氮气吹扫仪 (杭州奥盛仪器有限公司)。

1.1.2 试剂 三聚氰胺, 购自天津市光复精细化工研究所; 甲基丙烯酸 (MAA), 购自国药集团; 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA), 购自 Alfa 公司; 偶氮二异丁腈 (AIBN), 购自上海试四赫维化工有限公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, 试验用水为超纯水, 其他试剂为分析纯, 饲料样品为某品牌鸡饲料。

1.2 色谱条件 ① 色谱柱: Inertsil ODS-SP C18 柱, 5 μm , 250 mm \times 4.6 mm; ② 流动相: 10 mmol/L 辛酸磺酸钠 + 10 mmol/L 柠檬酸 (调节 pH 至 3.0) - 乙腈 = 90:10 (V/V); ③ 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 20 μl ; 检测波长: 240 nm。

1.3 试验方法

1.3.1 分子印迹聚合物的制备 分子印迹聚合物 (MIPs) 的合成采用本体聚合法, 以三聚氰胺为模板分子, MAA 为功能单体, EGDMA 为交联剂, AIBN 为引发剂进行自由基引发聚合。参照相关文献^[6-7] 中的方法制得三聚氰胺分子印迹聚合物颗粒。用 15% 乙酸-甲醇溶液和甲醇为溶剂, 采用索氏提取法洗脱未反应的模板分子、功能单体和交联剂, 使用紫外跟踪检查甲醇提取回流液, 直至模板分子被洗脱干净。然后, 用乙腈洗去残留的乙酸和甲醇, 聚合物颗粒经丙酮反复沉降, 除去细颗粒后, 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重, 即为三聚氰胺的分子印迹聚合物。

空白印迹聚合物 (NMIPs) 的制备方法除不添加三聚氰胺外, 其他步骤同上。

1.3.2 饲料中三聚氰胺的固相萃取与检测。①新型 MIP-SPE 小柱的制作。自制的新型固相萃取柱的结构如图 1 所示。最大柱容量可达 20 ml,直径 8 mm。称取三聚氰胺分子印迹聚合物和空白印迹聚合物各 0.2 g,分别装入自制固相萃取小柱中,以乙腈为匀浆液,进行湿法装柱,氮气吹干柱子,制得三聚氰胺 MIP-SPE 小柱和 NMIP-SPE 小柱。该柱依次用 3 ml 甲醇、3 ml 水活化备用。②样品处理与回收率测定。参照国家标准 GB/T22388-2008 中的 HPLC 方法^[8]制备饲料样品,上清液作为饲料提取液,向提取液添加三聚氰胺,得到 0.2 mg/L 样品加标液。

取浓度为 0.2 mg/L 的样品加标液各 10 ml 分别加至 MIP-SPE 小柱和 NMIP-SPE 小柱,以 0.5 ml/min 流速过柱,依次用 5 ml 水和 5 ml 甲醇-水(1:1)淋洗固相萃取小柱,流速为 0.5 ml/min,最后用 8 ml 含 5% (体积分数)浓氨水的甲醇自然洗脱,收集洗脱液,氮吹至干,用甲醇定容至 1 ml,得到浓缩液。采用 HPLC 方法分别测定样品加标液、样品加标浓缩液和样品浓缩液中的三聚氰胺含量。

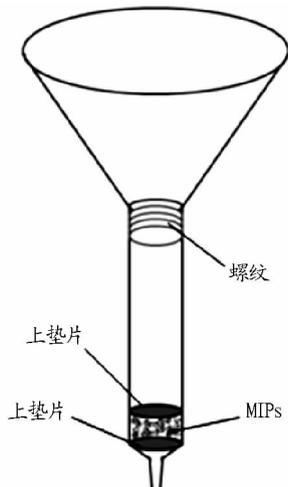


图 1 自制的新型 MIP-SPE 柱结构

2 结果与分析

2.1 三聚氰胺分子印迹聚合物模板分子洗脱 索氏提取法洗脱模板分子和未反应的化合物时,如果根据文献方法仅用乙酸-甲醇溶液提取,随着未反应的交联剂的洗脱导致溶液浑浊粘稠,难以用紫外分光光度法跟踪模板分子是否洗脱干净,因此在用乙酸-甲醇溶液提取 48 h 后,以甲醇作为提取溶剂再进行索氏提取,并跟踪回流液的情况,确保更为彻底地去除模板分子。

2.2 固相萃取条件优化

2.2.1 漏斗形固相萃取小柱制作。痕量分析往往要求较高的浓缩倍数,需要较大体积的提取液过柱,传统的固相萃取小柱柱体积较小(一般小于 5 ml)的现状给试验操作带来不便。笔者制作了 1 个漏斗形固相萃取小柱,柱体积扩大至 20 ml,萃取时,溶液可一次性添加,简化实验操作;对于部分可直接过滤的浑浊样品,可直接在漏斗上加装滤纸,防止杂质堵塞筛板,确保萃取小柱的萃取效率。

2.2.2 上样液流速对测定结果的影响。溶液在 MIP-SPE

小柱中的流速决定了目标分子与 MIPs 的接触时间,直接影响固相萃取效率。以 0.2 mg/L 的三聚氰胺标准溶液(溶剂为甲醇-水,比例为 1:1)10 ml 为上样溶液,控制溶液流速分别为 0.2、0.4、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0 ml/min,考察流速对回收率的影响。从图 2 可以看出,三聚氰胺的回收率随着流速的增大而下降,主要是因为流速增大使溶液在固相萃取柱上的停留时间缩短,降低了目标分子与聚合物的结合率,当流速小于 0.5 ml/min 时,回收率达到较大值,考虑到试验时间,确定 0.5 ml/min 为上样液流速。

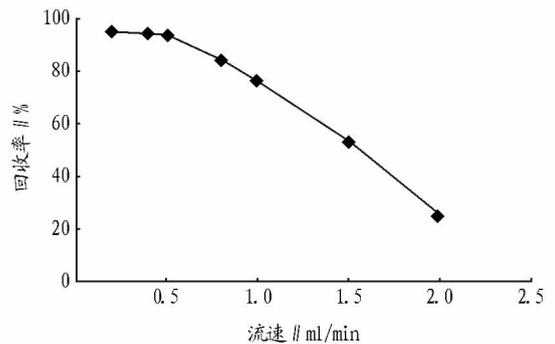


图 2 上样液流速与回收率的关系

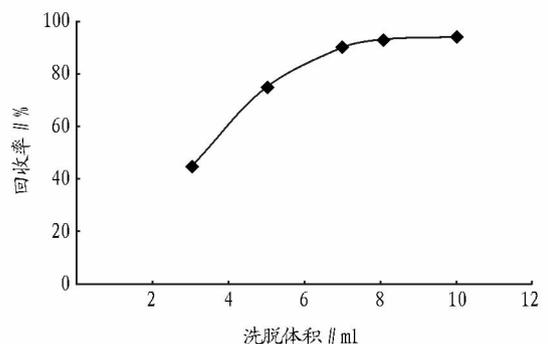


图 3 洗脱液体积与回收率的关系

2.2.3 洗脱液体积对测定结果的影响。以 0.2 mg/L 的三聚氰胺标准溶液 10 ml 过柱,流速为 0.5 ml/min,分别用 3、5、7、8、10 ml 氨化甲醇(体积分数 5%)溶液进行洗脱,考察洗脱液体积对回收率的影响。从图 3 可以看出,三聚氰胺的回收率随着洗脱液体积的增加而增大,当洗脱体积为 8 ml 时,回收率达到最大值,考虑到洗脱效果与时间,选择 8 ml 作为洗脱体积。

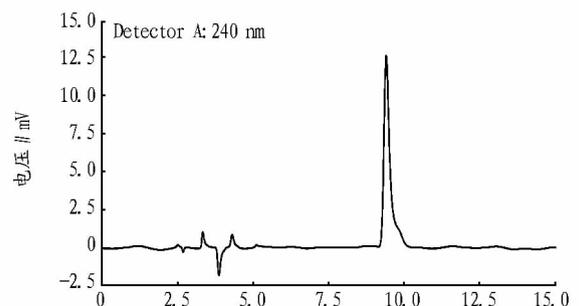


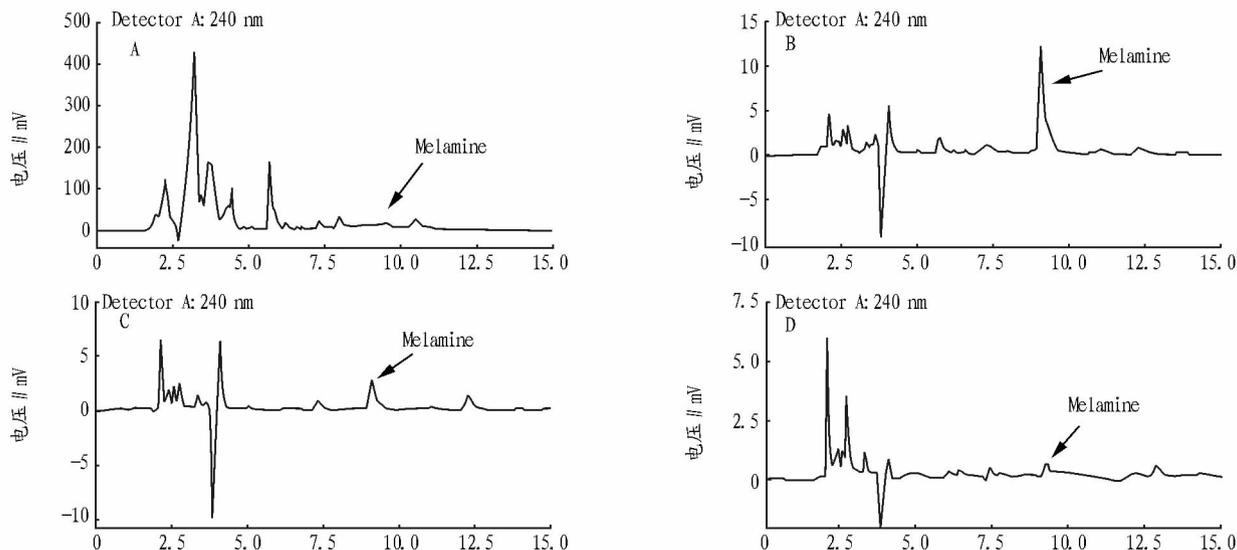
图 4 2 mg/L 三聚氰胺标准溶液的 HPLC 图谱

2.3 三聚氰胺的色谱方法检测 三聚氰胺属于强极性化合物,在反相 C_{18} 柱上几乎不保留,试验通过在流动相中添加离

子对试剂,采用柠檬酸调节流动相的 pH,使三聚氰胺产生很好的保留峰,且峰形尖锐;试验选择 240 nm 作为检测波长。2 mg/L 三聚氰胺标准溶液的 HPLC 图谱如图 4 所示。三聚氰胺色谱峰的保留时间为 9.403 min。

2.4 饲料样品的测定 从图 5 可以看出,饲料提取液的基质非常复杂,杂质含量非常高,目标峰被基线淹没,未能检测到目标峰。0.2 mg/L 三聚氰胺加标提取液经自制的 MIP-SPE 柱萃取后浓缩液进行 HPLC 色谱,结果表明饲料提取液中的复杂基质基本上被去除,三聚氰胺被 MIP-SPE 柱选择

性地分离并富集,利用该方法检测添加 0.2 mg/L 三聚氰胺的饲料提取液,3 组平行试验回收率分别为 95%、93% 和 96%,相对标准偏差($n=3$)为 2%。0.2 mg/L 三聚氰胺加标提取液经 NMIP-SPE 柱萃取后洗脱液进行 HPLC 色谱,复杂基质亦被去除,但三聚氰胺的回收率低;MIP-SPE 柱的萃取效率优于 NMIP-SPE 柱。饲料提取液经 MIP-SPE 柱萃取后浓缩液进行 HPLC,检测到的三聚氰胺色谱峰低,说明选取的饲料样品中三聚氰胺含量低,也表明自制的分子印迹聚合物填料中的模板分子在索氏提取时基本被去除。



注:A. 添加 0.2 mg/L 三聚氰胺的饲料提取液;B. 加标提取液经 MIP-SPE 萃取后浓缩液;C. 加标提取液经 NMIP-SPE 萃取后浓缩液;D. 提取液经 MIP-SPE 萃取后浓缩液。

图 5 饲料样品的 HPLC 图谱

3 小结

笔者自制的新型三聚氰胺 MIP-SPE 小柱对鸡饲料提取液中的三聚氰胺具有高度的选择性,复杂基质基本上被去除,三聚氰胺的加标回收率高,应用 HPLC 成功实现饲料样品中三聚氰胺的检测;该小柱使用简便,在三聚氰胺检测领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 胡树国,李礼,何锡文.一种高选择性固相萃取吸附剂——分子印迹聚合物[J].化学进展,2005,17(3):531-543.
- [2] 林建云,王海燕,林涛,等.水产饲料造粒过程中三聚氰胺形成机理的研究[J].饲料工业,2012(2):11-17.
- [3] 饶钦雄,童敬,王金芳,等.饲料和食品中三聚氰胺的毒性及残留检测方法的研究进展[J].饲料工业,2009(11):34-36.

- [4] YAN H Y, CHENG X L, SUN N, et al. Rapid and selective screening of melamine in bovine milk using molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with liquid chromatography-ultraviolet detection [J]. Journal of Chromatography B, 2012, 908(1): 137-142.
- [5] WANG X H, FANG Q X, LIU S P. The application of pseudo template-molecularly imprinted polymer to the solid-phase extraction of cyromazine and its metabolic melamine from egg and milk [J]. Journal of Separation Science, 2012, 35(12): 1432-1438.
- [6] 周文辉,林黎明,郭秀春,等.三聚氰胺分子印迹聚合物的制备及奶制品中三聚氰胺的分离[J].分析测试学报,2009,128(16):687-691.
- [7] YANG H H, ZHOU W H, GUO X C, et al. Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products [J]. Talanta, 2009, 80(2): 821-825.
- [8] 宋书锋,彭涛,巢强国,等. GB/T 22388-2008, 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].北京:中国标准出版社,2008.

(上接第 7129 页)

- [3] 景丽洁,马甲.火焰原子吸收分光光度法测定污染土壤中 5 种重金属[J].中国土壤与肥料,2009(1):74-77.
- [4] 卑占宇,罗晓冰,李银保,等.微波消解样品-火焰法测定白花蛇舌草中微量元素[J].理化检验-化学分册,2009,45(2):141-143.
- [5] 王俊伟,钱蜀,李海霞,等.微波消解-ICP-MS 测定土壤和水系沉积

物中的重金属[J].四川环境,2010,29(6):40-43.

- [6] 张素荣,曹星星.对比不同消解方法测定土壤中重金属[J].环境科学与技术,2004,27(1):49-51.
- [7] 王建龙,易红星,李书军.微波消解平台石墨炉原子吸收法测定活性污泥中重金属[J].中国环境监测,2004,20(5):27-28.