

高效液相色谱法同时测定青菜中环丙氨嗪和三聚氰胺残留

刘德金¹, 葛峰², 吴若函¹, 高士祥^{1①} (1. 南京大学环境学院/ 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏南京 210046; 2. 环境保护部南京环境科学研究所, 江苏南京 210042)

摘要: 研究并建立了同时测定青菜中环丙氨嗪和三聚氰胺残留量的高效液相色谱紫外检测分析方法。冷冻干燥并均质后的青菜样品经 $V(\text{氨水}) : V(\text{甲醇}) = 5 : 95$ 的混合溶液超声辅助浸提、离心、旋转蒸发、固相萃取等浓缩净化处理后, 用高效液相色谱定量。分离色谱柱为 Agilent NH_2 柱, 流动相为 $V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 90 : 10$ 的混合溶液, 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 214 nm。环丙氨嗪和三聚氰胺的标准曲线在 $0.05 \sim 10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与其峰面积线性良好, 相关系数不低于 0.999 5, 在 $0.2 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 添加范围内, 环丙氨嗪和三聚氰胺的平均回收率分别为 81.26% ~ 87.69% 和 78.24% ~ 82.33%, 相对标准偏差分别为 2.75% ~ 6.18% 和 3.99% ~ 6.67%, 方法的最低检测浓度分别为 11.30 和 $20.38 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。该方法操作简单且灵敏度高, 适用于青菜样品中环丙氨嗪和三聚氰胺残留检测。

关键词: 环丙氨嗪; 三聚氰胺; 青菜; 固相萃取; 高效液相色谱

中图分类号: X132 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673 - 4831(2012)05 - 0595 - 04

Simultaneous Determination of Cyromazine and Melamine in Green Vegetables With HPLC. LIU De-jin¹, GE Feng², WU Ruo-han¹, GAO Shi-xiang¹ (1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse/ School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210046, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China)

Abstract: An analytical method has been developed for simultaneous determination of cyromazine and metabolite melamine in green vegetables using a high performance liquid chromatograph (HPLC) coupled with an ultraviolet detector. Fresh green vegetable samples were freeze-dried, homogenized and subjected to extraction in solution containing 95% methanol and 5% aqueous ammonia assisted with ultrasonics. The extracts were concentrated and purified through centrifugalization, rotary evaporation and solid phase extraction, and quantified using a high performance liquid chromatography-ultraviolet detector. It used an Agilent NH_2 column as chromatographic column for separation, solution consisting of 90% acetonitrile and 10% water as carrier with a flow rate of $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and worked with a wavelength of 214 nm. It was found that the standard curves of cyromazine and melamine in the range of $0.05 \sim 10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ showed a good linear relationship with their peak areas with correlation coefficients not less than 0.999 5, and the recovery rate of cyromazine and melamine at fortified levels of $0.2 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ varied in the range of 81.26% - 87.69% and 78.24% - 82.33% with relative standard deviation being 2.75% - 6.18% and 3.99% - 6.67%, respectively. The limit of quantification (LOQs) was $11.30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for cyromazine and $20.38 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for melamine. This method is simple, sensitive and suitable for determination of cyromazine and melamine in green vegetables.

Key words: cyromazine; melamine; green vegetable; solid phase extraction; HPLC

环丙氨嗪 (CYR) 是一种高效昆虫生长抑制剂类杀虫剂^[1], 其分子式为 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_6$, 化学名为 2-环丙氨基-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪。在中国, 环丙氨嗪被广泛添加入动物饲料中, 以控制动物厩舍内蝇蛆的生长发育, 添加量一般为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 经动物食用后绝大部分以原药 (w 为 75% ~ 86%) 或代谢物三聚氰胺 (w 为 2% ~ 14%) 的形式随动物粪便排出体外^[2]。含有大量环丙氨嗪的动物粪便作为农家肥施用会造成大面积的农业土壤污染^[3-4]。环丙氨嗪在土壤环境中易发生光降解, 其主要降解产物

三聚氰胺在环境中非常稳定, 能够长期存在于土壤环境中^[5]。

目前, 关于环丙氨嗪和三聚氰胺的检测方法主要集中在饲料^[6]、土壤^[7]和动物性食品^[8]中, 而其在蔬菜等植物性食品中的残留检测方法还鲜见报道, 仅见 SANCHO 等^[9]采用离子对液相串联质谱检

收稿日期: 2012 - 03 - 01

基金项目: 环保公益性行业科研专项(200809094, 201109038)

① 通信作者 E-mail: ecssxg@nju.edu.cn

测甜菜组织中环丙氨嗪和三聚氰胺残留的报道,然而其样品处理过程中需加入高危险性的四氢呋喃离子对试剂,且单个样品需要超过 80 mL 有机试剂。笔者研究并建立了同时测定青菜中环丙氨嗪和三聚氰胺残留的高效液相色谱方法,其灵敏度高,抗干扰能力强,可以作为绿叶蔬菜中环丙氨嗪和三聚氰胺的常规残留检测方法。

1 试验设计

1.1 仪器与材料

仪器:安捷伦 1200 高效液相色谱仪,配 VWD 检测器;冷冻干燥仪(Advantage Freeze Dryer,美国);Biofuge stratos 高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司);RE252A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);十二管防交叉污染固相萃取装置(美国 Supelco 公司);氮吹仪,CNWBOND Poly-Sery MCX 固相萃取柱(填料 500 mg,柱管体积 6 mL,上海安普公司);KQ5200DE 超声清洗机,Milli-Q 超纯水仪(美国 Milipore 公司)。

材料:环丙氨嗪($w > 99\%$,美国 Sigma 公司);三聚氰胺标样($w > 99\%$,美国 Sigma 公司);甲醇,乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);氨水,浓硫酸(分析纯,南京化学试剂有限公司);Milli-Q 超纯水。

1.2 溶液配制

分别称取 10 mg 环丙氨嗪和三聚氰胺,用乙腈溶解并定容至 100 mL,配成 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 环丙氨嗪和三聚氰胺标准储备液,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下冷藏。分别吸取 5 mL 环丙氨嗪和三聚氰胺标准储备液,用乙腈定容到 50 mL,配成 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 环丙氨嗪和三聚氰胺混合标样标准工作溶液,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下冷藏。标准储备液 2 个月更换 1 次,标准工作液 2 周更换 1 次。

1.3 青菜加标样品制备

试验青菜来自于室内盆栽种植,青菜种子为购自江苏省农业科学院的“上海青”品种(*Brassica chinensis*)。室内培养条件为:盛有 5 kg 黄壤土的 7.8 L 瓷盆,每盆种植青菜 4 颗,温度控制在 $(15 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$,自然光照,隔天浇稀释 1 倍的 Hoagland 溶液 200 mL,隔 2 周松土 1 次,种植周期为 2010 年 11 月—2012 年 1 月。于青菜成熟后采集整棵青菜(带根),用蒸馏水洗净,放入 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷藏。青菜冷藏 1 周后,冷冻干燥,磨碎过 1.7 mm 孔径尼龙筛,密封,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下冷藏。

称取 0.5 g 空白青菜样品,置于 40 mL 聚丙烯离心管内,分别加入 0.2、0.5、1.0、2.0 和 4.0 mg ·

L^{-1} 的环丙氨嗪和三聚氰胺混合标样 0.5 mL,摇匀,配成 0.2、0.5、1.0、2.0 和 4.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的青菜加标样品,放入通风橱隔夜平衡,待溶剂挥发完全后,进行加标回收试验。

1.4 样品前处理

1.4.1 提取

称取 $(0.5 \pm 0.0005) \text{ g}$ 蔬菜样品,置于 40 mL 具塞聚丙烯离心管中,加入 10 mL $V(\text{氨水}):V(\text{甲醇}) = 5:95$ 的提取剂,涡旋 30 s, $(35 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下超声提取 20 min,以相对离心力 2 000 离心 10 min,吸取上清液于另一支离心管中,残渣再接着超声提取 2 次,每次加提取剂 10 mL,超声处理 10 min,合并 3 次提取液,以相对离心力 16 000 离心 20 min,将上清液转移到梨形旋蒸瓶中, $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 旋转蒸发至 1~2 mL,加入 20 mL $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$,摇匀,得到待净化溶液。

1.4.2 净化

将 CNWBOND Poly-Sery 混合强离子交换固相萃取柱依次用 6 mL 甲醇活化,6 mL 超纯水平衡,上样,再用 $V(10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4):V(\text{乙腈}) = 5:95$ 的混合溶液淋洗,待萃取柱自然干燥后,用 6 mL $V(\text{氨水}):V(\text{甲醇}) = 5:95$ 的混合溶液洗脱,收集洗脱液于 10 mL 比色管中, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮吹浓缩至近干,用 1 mL 流动相溶解残渣,过 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 孔径有机滤膜,供高效液相色谱测定。

1.5 液相色谱条件

色谱柱:Agilent NH_2 色谱柱($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm} \times 5 \text{ } \mu\text{m}$);流动相: $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 90:10$ 的混合溶液,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$;VWD 检测器,检测波长 214 nm。进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$,每个样品运行 10 min。环丙氨嗪保留时间为 5.9 min,三聚氰胺保留时间为 8.9 min。

2 结果与讨论

2.1 线性关系和检测限

配制质量浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 环丙氨嗪和三聚氰胺混合标准溶液,按 1.5 节所述液相色谱条件进行检测分析,以峰面积定量,对所测数据用 SPSS 17.0 软件进行线性回归,结果表明环丙氨嗪和三聚氰胺在 0~10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内,峰面积(Y)与进样质量(X)线性关系良好,相关系数 > 0.999 。以环丙氨嗪和三聚氰胺标样的 3 倍仪器信噪比所对应的标样浓度求得仪器检测限分别为 1.70 和 3.06 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;以 10 倍信噪比所对应的取样质量和定容

体积求得方法定量限分别为 11.30 和 20.38 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 可以满足定量分析要求。

2.2 提取方法的优化

前处理方法优化过程中选用添加 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 环丙氨嗪和三聚氰胺混合标样的匀浆青菜样品作为提取样品, 每处理设 4 个平行。超声辅助浸提常用于固体基质中目标物质的提取, 甲醇是最常用的萃取溶剂。考虑到环丙氨嗪和三聚氰胺属于弱碱性化合物, 在提取剂甲醇中添加一定量氨水可以增强其提取效果。为选择合适的氨水浓度, 进行不同氨水浓度的提取回收率比较试验(图 1)。

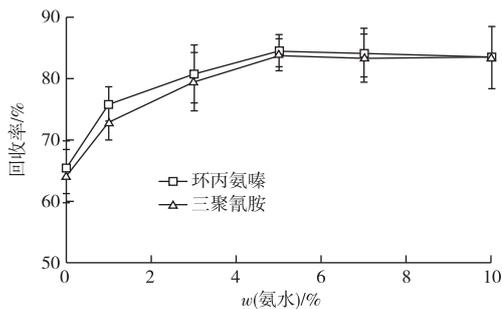


图 1 氨水含量对环丙氨嗪和三聚氰胺回收率的影响

Fig.1 Effect of content of ammonia water on recovery rate of cyromazine and melamine

由图 1 可知, 随着氨水浓度增加, 环丙氨嗪和三聚氰胺回收率明显增加, 与未添加氨水的甲醇处理相比, 添加量 w 为 5% 的氨水处理环丙氨嗪和三聚氰胺的回收率增加约 20 百分点, 再继续增加氨水浓度, 回收率呈略微减小趋势, 因此后续试验选用

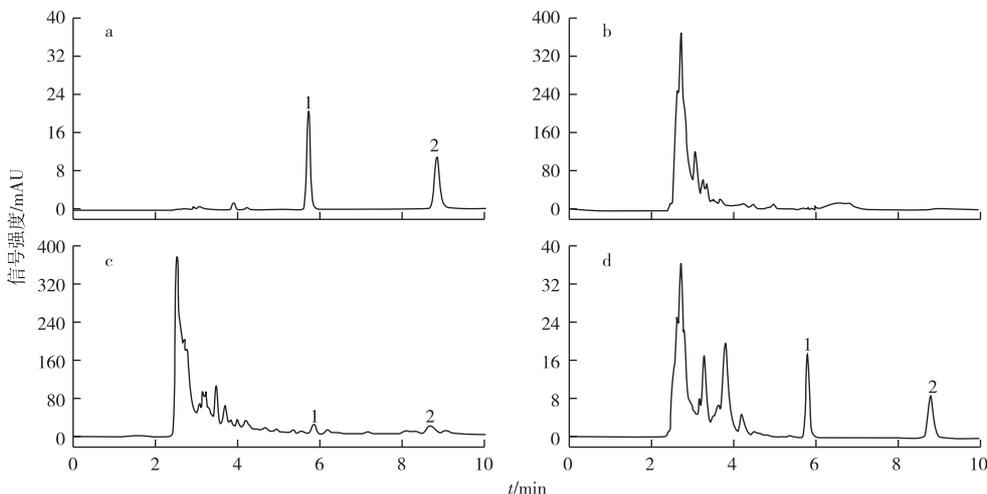
$V(\text{氨水}) : V(\text{甲醇}) = 5 : 95$ 的混合溶液作为提取剂。

2.3 固相萃取的优化

离心后的澄清溶液中主要含有酚类色素和有机酸类杂质, 其在液相色谱分析中会干扰目标峰的分析, 降低方法灵敏度。固相萃取(SPE)能有效地将目标物和杂质分离, 提高分析方法的选择性和灵敏度, 并且操作简单, 能减少样品前处理过程。

选用 CNWBOND Poly-Sery MCX 混合强阳离子交换 SPE 小柱进行净化。为了使目标化合物在离子交换机制的吸附剂上有效保留, 待净化溶液的有机相比例不能超过 10%, 且溶剂的 pH 值需使吸附剂和目标化合物均带上电荷。根据环丙氨嗪和三聚氰胺的酸度系数(pK_a)以及待净化溶液的特点, 提取后溶液先通过旋转蒸发浓缩至约 1~2 mL, 然后加入 20 mL 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液, 将溶液中环丙氨嗪和三聚氰胺转化为正离子形态, 作为固相萃取的待净化液。

固相萃取过程中, 部分干扰物和目标化合物被同时保留在吸附剂上, 通过摸索发现 $V(10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{乙腈}) = 5 : 95$ 的混合溶能有效去除干扰物而不影响目标物的回收。比较图 2 可以发现, 图 2(b)和图 2(c)的纵坐标刻度是图 2(a)和图 2(d)的 10 倍, 经过 SPE 净化后, 杂质峰响应降低到未净化前的 1/10 左右, 而目标峰响应没有显著变化, 这表明 MCX 固相萃取柱能去除 90% 以上的杂质, 并能较好地保留目标物, 固相萃取的回收率在 95% 以上。



1—环丙氨嗪; 2—三聚氰胺。a—0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 环丙氨嗪和三聚氰胺混合标样; b—青菜空白样品; c—添加 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 环丙氨嗪和三聚氰胺的青菜样品(未经固相萃取净化); d—添加 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 环丙氨嗪和三聚氰胺的青菜样品(经过固相萃取净化)。

图 2 环丙氨嗪、三聚氰胺标准品和样品的色谱图

Fig.2 Chromatograms of the standard samples of cyromazine and melamine and their samples

2.4 方法回收率与精密度

在青菜中分别混合添加0、0.2、0.5、1.0、2.0和4.0 mg·kg⁻¹环丙氨嗪和三聚氰胺,每个浓度设4个平行。按1.4节所述前处理方法制备样品,按1.5节所述液相方法进行分析。用SPSS 17.0软件对添加浓度与检测浓度进行线性回归分析,结果表明其相关系数>0.999,分析方法在不同加标浓度下的回收率具有很好的稳定性。

为进一步考察方法的稳定性,于同一天不同时间3次进行0.5、1.0和2.0 mg·kg⁻¹环丙氨嗪和三聚氰胺的混合添加回收。由表1可见,环丙氨嗪回收率为83.62%~85.71%,相对标准偏差为5.12%~6.18%;而三聚氰胺回收率为80.15%~84.58%,相对标准偏差为4.21%~7.41%。于1周内不同日期5次进行1.0 mg·kg⁻¹环丙氨嗪和三聚氰胺的混合添加回收试验,得到环丙氨嗪回收率为84.56%±6.53%,三聚氰胺回收率为84.04%±4.57%。

表1 环丙氨嗪和三聚氰胺混合添加的回收率、日内偏差和日间偏差

Table 1 Recovery rate and RSD of interday and intraday assays of the mixture of cyromazine and melamine

物质	偏差类型	添加质量浓度/ (mg·kg ⁻¹)	回收率/ %	相对标准偏差/ %	
环丙氨嗪	日内偏差	0.5	84.33±5.21	6.18	
		1.0	83.62±4.68	5.60	
		2.0	85.71±4.39	5.12	
	日间偏差	1.0	84.56±6.53	7.48	
	三聚氰胺	日内偏差	0.5	80.15±5.94	7.41
			1.0	84.58±3.56	4.21
2.0			83.97±5.08	6.05	
日间偏差	1.0	84.04±4.57	5.44		

日内偏差, n=3; 日间偏差, n=5。

2.5 实际样品测定

在实验室进行盆栽模拟环丙氨嗪在土壤-青菜系统中的生物累积和转化试验。按照优化后的方法测定青菜样品中的环丙氨嗪和三聚氰胺含量,每个样品设3个平行。在添加(989.0±97.6) μg·kg⁻¹环丙氨嗪的黄棕壤中生长60 d后,青菜根、茎和叶中环丙氨嗪含量分别为(1 665.3±153.8)、(1 925.8±262.1)和(4 201.2±776.6) μg·kg⁻¹,而三聚氰胺在青菜根、茎和叶中的含量都低于检测限;生长80 d后,青菜根、茎和叶中环丙氨嗪含量分别为(1 967.4±132.9)、(2 377.6±358.7)和(4 859.2±390.0) μg·kg⁻¹,而三聚氰胺仅在叶片

检出,含量为(34.1±6.0) μg·kg⁻¹。

3 结论

采用V(氨水):V(甲醇)=5:95的混合溶液超声辅助提取目标物,MCX固相萃取柱去除杂质,可基本排除绿叶蔬菜组织中酚类色素和有机酸对分析检测的影响,样品液相分析基线平稳,目标峰和杂质峰分离效果好。与已有方法相比,该方法具有样品处理过程简单、有机溶剂消耗少、抗干扰能力强等优点。该方法灵敏度高,重现性好,适用于菠菜、青菜和韭菜等绿叶蔬菜中环丙氨嗪和三聚氰胺的残留检测。

参考文献:

- [1] XIA K, ATKINS J, FOSTER C, *et al.* Analysis of Cyromazine in Poultry Feed Using the QuEChERS Method Coupled With LC-MS/MS[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(10):5945-5949.
- [2] USEPA. Cyromazine; Pesticide Tolerance. (1999-09-15)[2012-04-09]. <http://www.epa.gov/EPA-PEST/1999/September/Day-15/p24047.htm>.
- [3] WEI R, GE F, HUANG S, *et al.* Occurrence of Veterinary Antibiotics in Animal Wastewater and Surface Water Around Farms in Jiangsu Province, China [J]. *Chemosphere*, 2011, 82(10):1408-1414.
- [4] 张慧敏, 章明奎, 顾国平. 浙北地区畜禽粪便和农田土壤中四环素类抗生素残留[J]. *生态与农村环境学报*, 2008, 24(3):69-73.
- [5] ROOT D S, HONGTRAKUL T, DAUTERMAN W. Studies on the Absorption, Residues and Metabolism of Cyromazine in Tomatoes [J]. *Pesticide Science*, 1996, 48(1):25-30.
- [6] 李爱军, 张代辉, 马书民, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中三聚氰胺残留[J]. *分析化学*, 2008, 36(5):699-701.
- [7] 唐玲丽, 王辉, 董元华, 等. 高效液相色谱法同时测定土壤中环丙氨嗪和三聚氰胺[J]. *土壤*, 2009, 41(5):826-832.
- [8] WU Y T, HUANG C M, LIN C C, *et al.* Determination of Melamine in Rat Plasma, Liver, Kidney, Spleen, Bladder and Brain by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(44):7595-7601.
- [9] SANCHO J V, IBANEZ M, GRIMALT S, *et al.* Residue Determination of Cyromazine and Its Metabolite Melamine in Chard Samples by Ion-Pair Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530(2):237-243.

作者简介: 刘德金(1986—),男,四川内江人,硕士生,主要从事农药和抗生素在土壤中的环境行为研究。E-mail: ldjcs@163.com