

Isotachophoretic Determination of Melamine (Izotachoforetické stanovení melaminu)

Martin Bartoš, Magda Janoušková, Michaela Kovářová

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of
Pardubice, Studentská 573, CZ-532 10 Pardubice, Czech Republic,

E-mail: martin.bartos@seznam.cz

Abstract

In this article, melamine is the analyte of interest determined in milk with the aid of capillary isotachopheresis. After method development, the optimal electrolyte system comprised 0.01 mol.L⁻¹ KOH + 0.04 mol.L⁻¹ acetic acid (pH 4.15) as the leading electrolyte and 0.01 mol.L⁻¹ acetic acid as the terminating electrolyte. In this system, the presence of milk practically does not affect the signal melamine. The calibration / detection characteristics are as follows: linearity over the concentration range of 0–300 mg.L⁻¹ melamine, limit of detection *ca.* 1 mg.L⁻¹, limit of quantification of *ca.* 3 mg.L⁻¹ melamine. Furthermore, simple procedure and sufficient sensitivity are also typical attributes of the method that can be recommended for analysis of melamine in milk and related samples.

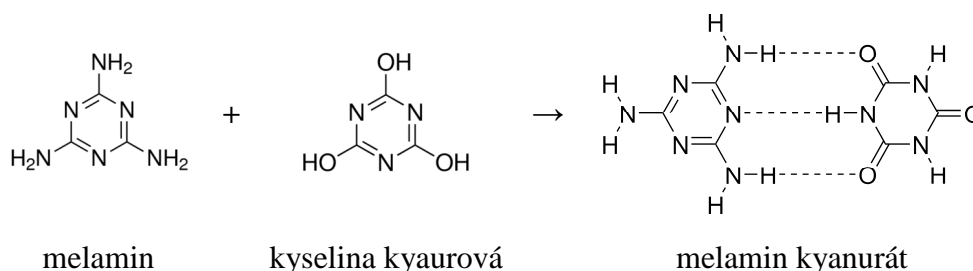
Key Words: Capillary isotachopheresis, Melamine, Determination, Milk

Úvod

V roce 2008 vzbudila celosvětovou pozornost hromadná otrava téměř 300 tisíc lidí v Číně, především kojenců, z nichž 50 tisíc muselo být hospitalizováno a nejméně šest kojenců zemřelo. Otrava, projevující se poškozením až selháním ledvin, byla způsobena dětskou výživou úmyslně kontaminovanou melaminem. Melamin měl zvýšit obsah dusíku v potravinech a tím vytvořit zdání vyššího obsahu bílkovin, než kolik jich v ní bylo obsaženo. Obdobné otravy psů a koček v roce 2004 v Asii a v roce 2007 v USA byly způsobeny krmivem čínského původu, které rovněž obsahovalo melamin.^{1,2}

Melamin (2,4,6-triamino-1,3,5-triazin) je průmyslově vyráběná látka používaná především k výrobě plastických hmot a jako zpomalovač hoření. Obvykle se vyskytuje v podobě jemného bílého prášku, který je jen málo rozpustný ve studené vodě. Obsahuje téměř 67% dusíku. Od roku 1958 byl melamin přidáván do krmiva skotu jako neproteinový zdroj dusíku. Časem se ukázalo, že jej přežvýkavci vstřebávají a využijí jen v malé míře a od roku 1978 se již do krmiv nepřidává. Přidávání melaminu do žrádla pro kočky a psy vyústilo v již zmíněné otravy.

Akutní toxicita melaminu je nízká. V těle je ale částečně hydrolyzován až na kyselinu kyanurovou, jejíž akutní toxicita je sice také nízká, ale spolu s melaminem tvoří nerozpustný komplex, jehož usazování v ledvinách může vyústit až v jejich selhání.



Obsah melaminu v potravinách a krmivech nebyl až do roku 2007 sledován. Od té doby byly zavedeny (a několikrát změněny) jak maximální limity jeho obsahu v potravinách, tak stanoven tolerovatelný denní příjem (ADI).

Jedním z důsledků masových otrav melaminem byl i značný rozvoj metod stanovení jeho obsahu v různých matricích. Vypracovány byly jak laboratorní postupy vyžadující nákladnou techniku, schopné přesně určit obsah melaminu v různých matricích na stopové úrovni, tak jednoduché testy určené k orientačním semikvantitativním stanovením resp. k důkazu přítomnosti melaminu v nadlimitním množství v konkrétní matrici. Velká pozornost byla věnována i elektroforetickému stanovení.^{3,4,5,6,7,8}

Melamin je dusíkatou bází schopnou protonizace, jeho pK_A je přibližně 5. Protonizovaný melamin nese kladný náboj a mělo by být možné jej izotachoforeticky stanovit. V této práci je popsáno stanovení melaminu po jeho převedení na protonizovanou formu.

Experimentální část

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a., pocházely od firmy Sigma-Aldrich a byly použity bez dalšího čištění. Pouze kyselina chlorovodíková pocházela od firmy Lachema Brno. K přípravě všech roztoků byla použita demineralizovaná voda.

Modelové vzorky melaminu, použité k optimalizaci parametrů analýzy, měření kalibračních řad a dalších parametrů analýzy, byly připravovány ředěním zásobního roztoku obsahujícího melamin o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ a kyselinu chlorovodíkovou o koncentraci $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$. Přídavek kyseliny je potřebný pro rozpuštění melaminu, jeho rozpustnost ve studené vodě je poměrně malá, přibližně $3,2 \text{ g.l}^{-1}$ při 20°C .⁹

Ke zkoumání vlivu matrice na analytický signál bylo použito Čerstvé mléko polotučné (1,5% tuku) výrobce Olma Olomouc, které samozřejmě žádný melamin neobsahovalo. Ten byl do něj přidáván uměle v podobě výše zmíněného $0,01 \text{ molárního}$ zásobního roztoku až před analýzou. Vzhledem k vysokému obsahu kationtů bylo nutné vzorek mléka před analýzou aspoň 10x naředit.

Izotachoforetická analýza

K měření byl použit CS Isotachophoretic Analyser ZKI 01 (URVJT, Spišská Nová Ves) doplněný dvouliniovým zapisovačem TZ 4200 (Laboratorní přístroje Praha) a jeho modernizovaná počítačová verze Electrophoretic Analyser EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves). Oba přístroje jsou dvoukolonové izotachoforetické analyzátoři. Použita byla předseparační kolona o vnitřním průměru 0,8 mm a délce 160 mm a analytická kolona o vnitřním průměru 0,3 mm a délce 160 mm, obě z fluorovaného polymeru. Vzorek je vnášen dávkovacím kohoutem o objemu 30 μl . Zaznamenáván byl signál vodivostních detektorů a jeho derivace.

Parametry analýzy

Melamin byl stanovován za následujících podmínek: vedoucí elektrolyt obsahoval $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ hydroxid draselný a $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ kyselinu octovou, jeho pH bylo 4,15 (vedoucím iontem byl K^+); koncovým elektrolytem byla kyselina octová o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ (koncovým iontem byl H^+). Do vedoucího elektrolytu nebyla přidávána hydroxyethylcelulóza ani jiné podobné látky obvykle přidávané s cílem zvýšit viskozitu roztoku a snížit elektroosmotický tok, protože dostupné preparáty těchto látek obsahovaly vysoké koncentrace sodného iontu tvořícího vlastní zónu před zónou melaminu.

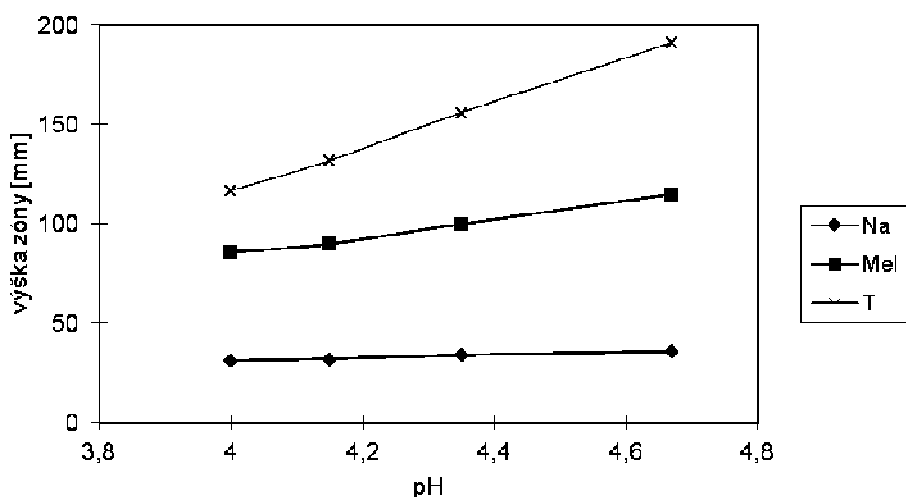
Výsledky a diskuse

Titrací navážky melaminu odměrným roztokem HCl bylo ověřeno, že jeho pK_A je přibližně 5 a že při pH vyšším než 2 je protonizován maximálně do prvního stupně.

Volba vedoucího a koncového elektrolytu

Vedoucí elektrolyt musí být dostatečně kyselý, aby zajistil protonizaci melaminu. I tak lze předpokládat, že mobilita melaminového iontu bude poměrně nízká. Zkoušeny byly dva systémy elektrolytů. U prvního systému byla jako vedoucí elektrolyt použita 7,5 mM kyselina sírová (vedoucí iont H^+) a koncovým elektrolytem byl 10 mM arginin v 6 mM kyselině sírové (koncovým iontem je protonizovaný arginin). Tento systém se příliš neosvědčil, poskytoval špatně reprodukovatelné výsledky, což bylo pravděpodobně způsobeno pomalým rozkladem argininu na amonný iont na kladně polarizované elektrodě ponořené do koncového elektrolytu. Tento amonný iont pak procházel zónou melaminu a měnil její parametry. Systém byl také citlivý na pH roztoku vzorku. Při analýze vzorku mléka ošetřeného kyselinou (používá se k srážení bílkovin a dalších složek mléka) docházelo k významnému prodloužení zóny vedoucího elektrolytu a tím i doby analýzy. Mléko bylo nutno přibližně 100x ředit.

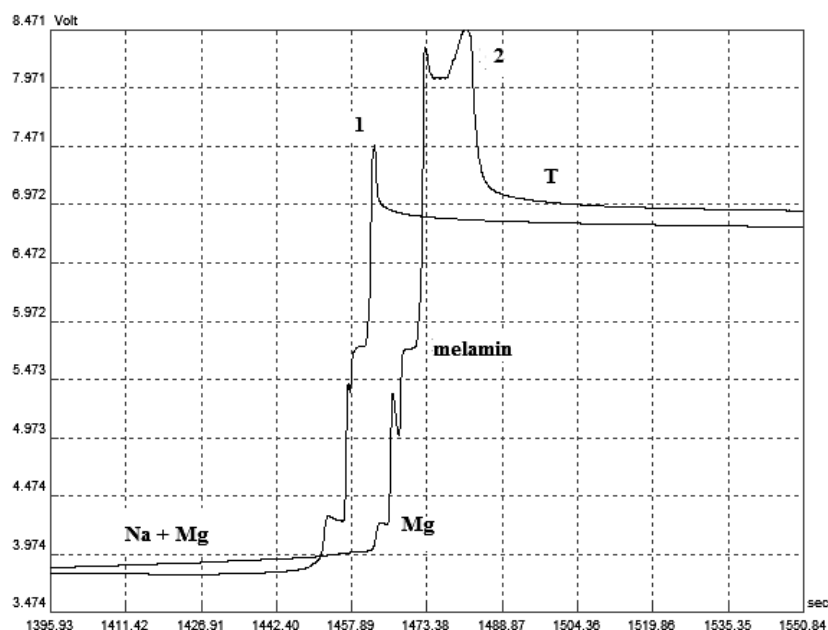
Lepší výsledky byly dosaženy s druhým systémem, u kterého byl jako vedoucí elektrolyt použit 10 mM hydroxid draselný, jehož pH bylo upraveno přidávkou kyseliny octové (vedoucí iont K^+) a koncovým elektrolytem byla 10 mM kyselina octová (koncovým iontem byl H^+). Vliv pH resp. koncentrace kyseliny octové na separaci iontů Na^+ , melaminu a H^+ je na obrázku 1. S rostoucím pH dochází ke snižování mobility melaminu i koncového iontu H^+ , zatímco mobilita „permanentních“ iontů (draselného, vápenatého, sodného a hořečnatého) se příliš nemění. Jako optimální byla vybrána koncentrace kyseliny octové 40 mmol/l, při které dochází k dostatečnému rozlišení zón iontů alkalických kovů a kovů alkalických zemin přítomných v mléce, melaminu a koncového iontu, přičemž mobilita všech je dostatečně vysoká, takže lze použít vyšších separačních proudů a doba analýzy není příliš dlouhá.



Obr. 1. Závislost výšky zóny Na^+ , melaminu a H^+ (T) na pH vedoucího elektrolytu. Vedoucí elektrolyt: 0,01 M KOH + kyselina octová o koncentraci 0,05 mol/l, 0,04 mol/l, 0,03 mol/l a 0,02 mol/l. Koncový elektrolyt: 0,01 M kyselina octová.

Závislost velikosti signálu melaminu na koncentraci byla lineární v celém zkoušeném rozsahu od $0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$ až do $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, tj. přibližně od 6 mg.l^{-1} do 300 mg.l^{-1} . Obdobné parametry mělo i měření kalibračních závislostí v 10x zředěném mléku, což znamená, že signál melaminu není ovlivněn přítomností látek v mléku obsažených. Zvyšující se podíl

mléka ale výrazně prodlužuje délky zón draslíku, vápníku, sodíku a hořčíku a tím i dobu analýzy, proto je vhodné vzorek před analýzou aspoň 10x naředit.



Obr. 2. Záznam izotachoforetické analýzy $2.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ melaminu (1) a $2.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ melaminu v 50x zředěném mléce (2). Analyzátor EA 102, analytická kolona.

Reprodukovatelnost měření, která byla v roztocích neobsahujících mléko velmi dobrá (relativní odchylka 5x opakovaného měření roztoku o koncentraci 1 mmol.l^{-1} melaminu byla v obou kolonách nižší než 1 %) poněkud poklesla v roztocích s mlékem. Tento pokles byl patrně způsoben usazováním některých složek mléka a spolu s nimi i melaminu na stěně dávkovacího zařízení. Detekční limit, tj. koncentrace, která poskytne zónu o délce 1 mm, byl pro analytickou kolonu $6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (tj. $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$) při separačním proudu $40 \mu\text{A}$, mez stanovení byla $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Dosaženou mez stanovení lze dále několikanásobně snížit např. snížením velikosti separačního proudu, zředěním elektrolytů nebo menším ředěním mléka, i když za cenu prodloužení doby analýzy. Dalšího snížení meze stanovitelnosti by bylo možné dosáhnout předběžnými separacemi, tím by ale stanovení „ztratilo eleganci“.

Závěr

Uvedený postup umožňuje stanovit koncentraci melaminu v mléce bez jakýchkoliv úprav, stačí pouze jeho naředění.

Literatura

1. Sharma K., Paradakar M.: Food Secur. 2, 97 (2010).
2. Wei Y., Liu D.: Toxicol. Ind. Health 28, 579 (2012).
3. Tittlemier S. A.: Food Addit. Contam. Part A 27, 129 (2010).
4. Chu P. W. S., Chan K. M., Cheung S. T. C., et al.: TRAC-Trend Anal. Chem. 29, 1014 (2010).
5. Nascimento C. F., Santos P. M., Pereira-Filho E. R., et al.: Food Chem. 221, 1232 (2017).
6. Rovina K., Siddiquee S.: J. Food Compos. Anal. 43, 25 (2015).
7. Li Y., Xu J., Sun C.: RSC Advances 5, 1125 (2015).
8. Sun F., Ma W., Xu L., et al.: TRAC-Trend Anal. Chem. 29, 1239 (2010).
9. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/108-78-1>, Downloaded March 3rd, 2017.

Navrátil Tomáš, Fojta Miroslav a Schwarzová Karolina (editoři): Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXVII. Moderní Elektrochemické Metody, Jetřichovice 15. - 19. května 2017. ISBN 978-80-905221-5-2

Best servis Ústí nad Labem

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., Praha

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno

UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Navrátil Tomáš, Fojta Miroslav a Schwarzová Karolina (editors): Proceedings of the International Conference Modern Electrochemical Methods XXXVII, Jetřichovice, Czech Republic, May 15rd - 19th, 2017. ISBN 978-80-905221-5-2

Best servis Ústí nad Labem

J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v. v. i., Prague

Institute of Biophysic of the AS CR, v. v. i., Brno

UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague