

高效液相色谱法快速测定乳制品中三聚氰胺

刘海日,池晓峰,彭茵,燕小梅,李发胜*,刘辉

(大连医科大学 检验医学院,辽宁大连 116044)

[摘要] 目的:建立快速测定乳制品中三聚氰胺的高效液相色谱分析方法(HPLC)。方法:试样用乙腈-水(80+20)溶液提取,采用HPLC测定,色谱柱为Diamonsil(R) C₁₈(200 mm ×4.6 mm, 5 μm),流动相为10 mmol/L磷酸二氢钾,10 mmol/L十二烷基硫酸钠(磷酸调pH至3.5)-乙腈(75+25),流速1.0 ml/min,检测波长236 nm。结果:三聚氰胺在0.5~120 mg/L的范围内呈线性关系,最低检出限为0.6 mg/kg,加标回收率为82.6%~97.5%,相对标准偏差(n=10)小于4.0%。结论:该方法操作简便、快速、准确,检测成本相对较低,能够满足日常大批量快速分析要求。

[关键词] 三聚氰胺;乳制品;高效液相色谱法

[中图分类号] O657.7⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2009)05-0975-02

Rapid determination of melamine in dairy products by high performance liquid chromatography

LIU Hairi, CHIXiaofeng, PENG Yin, YAN Xiaomei, LI Fa-sheng*, LIU Hui

(College of Laboratory Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

[Abstract] **Objective:** An analytical method for rapid determination of melamine in dairy products by high performance liquid chromatography was developed. **Methods:** Samples were extracted with acetonitrile and water(80+20). Chromatographic analysis was performed on a Diamonsil(R) C₁₈ column (200 mm ×4.6 mm, 5 μm) eluted with 10 mmol/L KH₂PO₄, 10 mmol/L SDS (pH=3.5) - acetonitrile (75+25) at a flow rate of 1.0 ml/min and UV detection at 236 nm. **Results:** Linearity was held in the range of 0.5~120.0 mg/L of melamine, the detection limit of the method was found to be 0.6 mg/kg. Values of recovery obtained by standard addition method were in the range of 82.6%~97.5%. Test for precision was performed at 3 different concentration level, giving values of relative standard deviations (n=10) less than 4.0%. **Conclusion:** The method is simple, fast, accurate for daily big-batch quantity analysis.

[Key words] Melamine; Dairy products; HPLC

三聚氰胺(Melamine)(结构式见图1),是三嗪类含氮杂环有机化合物,为一种重要的氮杂环有机化工原料,具有一定肾毒性。其分子式C₃N₆H₆,含氮量为66.7%。因其含氮量高,按照目前国际上测量蛋白质含量的通行方法“凯氏定氮法”检测乳制品中蛋白质含量时,不能够区分这种“伪蛋白氮”。因而一些不法厂家为了降低成本,在乳制品里添加这种化工原料以提高产品中蛋白质含量。为了保证乳制品的质量,维护人们的食品公共安全及身体健康,检测乳制品中的三聚氰胺具有重要的社会意义。目前国内外用于检测三聚氰胺的方法有气相色谱-质谱法^[1]、液相色谱-质谱法^[2]和液相色谱法^[3,4]等。气相色谱-质谱法和液相色谱-质谱法虽然灵敏度高、定量精确,但其设备昂贵,样品前处理时间较长,难以向基层广泛应用。本实验研究了高效液相色谱法(HPLC)快速测定乳制品中三聚氰胺含量的方法,效果令人满意。

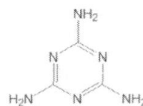


图1 三聚氰胺的结构式

检测器、自动进样器及色谱数据处理工作站;KQ5200E型超声清洗器;TGL-16G型高速离心机。色谱柱为Diamonsil(R) C₁₈(200 mm ×4.6 mm, 5 μm)。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯);三聚氰胺标准品(Dima Technology Inc,纯度99.5%);其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

标准储备溶液及工作液的配制:精密称取三聚氰胺标准品100 mg(精确至0.1 mg),用乙腈-水(80+20)的混合溶液溶解并定容至100 ml,配制成1000 mg/L的标准储备溶液。于4℃条件下保存。使用时用乙腈-水(80+20)的混合溶液稀释成适用浓度的混合标准工作溶液。

1.3 色谱条件

流动相:10 mmol/L磷酸二氢钾,10 mmol/L十二烷基硫酸钠(磷酸调pH至3.5)-乙腈(75+25);流速:1.0 ml/min;色谱柱温度为30℃;检测器:二极管阵列检测器,检测波长为236 nm;进样量为20 μl。

1.4 样品制备

称取混合均匀的试样5.0 g(精确至0.01 g)置于50 ml

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1200型高效液相色谱系统:配四元泵、二极管阵列

[作者简介] 刘海日(1983-),男,硕士研究生,主要从事理化检验及药物分析工作。

* 通讯联系人, E-mail: lfs920@sohu.com

具塞刻度试管中,加入 5 ml 水,涡旋混匀 1 min 后,加入 40 ml 乙腈,超声提取 15 min 后,加水至刻度,漩涡振荡 2 min,以 5000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.45 μm 的滤膜,滤液供液相色谱测定。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

实验考察了用乙腈、水、乙腈-水等提取溶剂。三聚氰胺溶于乙腈,用乙腈提取时,因其溶解的杂质太多,易产生干扰峰;用水提取时,由于三聚氰胺微溶于水,影响了回收率。实验结果表明,当混合溶剂中的乙腈含量为 80% 时,三聚氰胺的回收率可达到 94%,且沉淀蛋白的效果良好。最终确定了用乙腈-水溶剂体系进行提取。

2.2 色谱条件的选择

通过二极管阵列检测器在 200~400 nm 波长扫描,三聚氰胺在波长 208 nm 和 236 nm 处均有强烈吸收,由于流动相在低于 210 nm 的波长下背景吸收较高,在 236 nm 处响应值高,且杂峰最少,故选择 236 nm 作为检测波长。

考察了离子对试剂、pH 值及乙腈比例对色谱分离的影响。因三聚氰胺显弱碱性,具有较强的极性,使其在反相键合相上保留值很低,接近于死时间流出,因此须将离子对试剂加入到流动相中,使其与样品离子结合生成弱极性的离子对,故选用十二烷基硫酸钠为离子对试剂,与磷酸二氢钾、乙腈构成流动相体系。流动相的 pH 越大,三聚氰胺的色谱保留时间越长,峰形变差;流动相的 pH 越小,三聚氰胺的色谱保留时间越小,但相关杂质峰较多,干扰较多。三聚氰胺对流动相中乙腈比例变化不敏感,乙腈比例由 15% 变化至 40%,三聚氰胺保留时间均保持在 4.2 min 左右,但干扰峰对乙腈比例变化较敏感。综合考察各种影响因素后,采用 10 mmol/L 磷酸二氢钾,10 mmol/L 十二烷基硫酸钠(磷酸调 pH 至 3.5)-乙腈(75+25)为流动相。应用上述条件,取 10 mg/ml 的三聚氰胺标准溶液进样,三聚氰胺标准出峰时间为 4.18 min,三聚氰胺分离良好,色谱图如图 2(a) 所示。

2.3 线性范围、检出限、回收率和精密度

配制浓度分别为 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120 mg/L 的三聚氰胺标准溶液,按照 1.3 中色谱条件进行检测。以标准品质量浓度(X)为横坐标,色谱峰面积(Y)为纵坐标,用最小二乘法进行线性回归,得回归方程为 $Y = 0.0113X + 0.3997$,相关系数为 0.9999。质量浓度在 0.5~120 mg/L 的范围内呈线性。将标准品溶液稀释进样,按信噪比为 3(S/N) 计算,三聚氰胺的检出限为 0.1 mg/kg。按 1.4 中样品处理方法,乳制品中三聚氰胺最低检出限为 0.6 mg/kg。

2.4 样品检测

利用本文建立的实验方法对近期(2008年 10月 1日以后)生产的纯牛奶、酸奶、奶酪、奶粉等 4 类共 46 批次的样品进行检测,在所检样品中三聚氰胺的含量均符合国家三聚氰胺临时管理限量值规定。

2.5 方法的准确度及精密度实验

取经检验不含三聚氰胺的空白样品,分别在其中按 2.0, 10.0, 50.0 mg/kg 三个含量水平添加三聚氰胺标准溶液,每一添加浓度重复 10 份样品,按照 1.2 中的色谱条件测定其含量。回收率及相对标准偏差结果如表 1 所示。由表 1 可知,本方法测定的乳制品样品中三聚氰胺的回收率为 82.6%~97.5%,相对标准偏差为 1.9%~4.0%,达到分析的要求。空白样品和添加三聚氰胺标准溶液样品的色谱图分别见图 2(b)、(c)。

表 1 三聚氰胺的回收率和重现性 (n=10)

标准加入量 (mg/kg)	测得总量 (mg/kg)										回收率 %	RSD %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
2	1.86	1.86	1.94	1.95	1.90	1.88	1.95	1.87	1.91	1.94	93.0~97.5	1.9
10	9.16	9.28	9.05	9.53	8.98	8.85	9.34	8.99	9.45	9.52	88.5~95.3	2.4
50	41.3	45.8	44.8	41.5	41.9	45.8	44.6	41.3	42.1	45.7	82.6~91.6	4.0

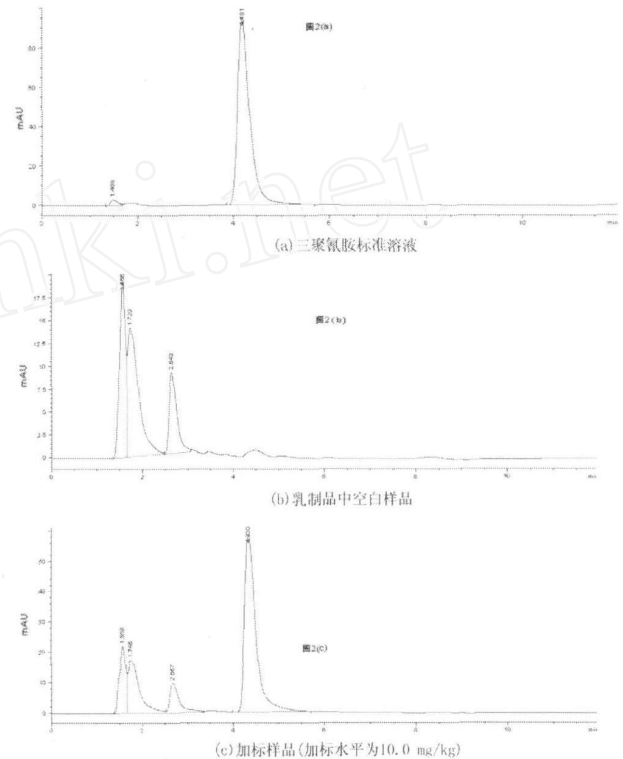


图 2 色谱图

3 小结

本研究探讨了高效液相色谱法检测乳制品中三聚氰胺的样品前处理方法及最佳检测条件,建立的方法具有较高的灵敏度和准确度,三聚氰胺在 0.5~120 mg/L 的范围内呈线性关系,最低检出限为 0.6 mg/kg,加标回收率为 82.6%~97.5%,相对标准偏差 (n=10) 小于 4.0%。该方法样品处理比较简便,检测成本相对较低,检测灵敏度较高,重现性好,易于广泛推广,对乳制品中三聚氰胺的检测具有广泛的适用性。

[参考文献]

- [1] Yokley RA, Mayer LC, Rezaian R. Analytical method for the determination of cyanuric acid and melamine residues in soil using LC-UV and GC-MSD [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 3352-3358.
- [2] Varelis P, Jeskalis R. Preparation of [13C3]-melamine and [13C3]-cyanuric acid and their application to the analysis of melamine and cyanuric acid in meat and pet food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Additives & Contaminants, 2008, 25(10): 1208-1215.
- [3] GB/T22400-2008. 原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法 [S].
- [4] 宫小明,董静,孙军,等. HPLC 法测定植物性原料中三聚氰胺 [J]. 食品科学, 2008, 29(4): 321-323.

(收稿日期: 2009-02-16)