



# 高效毛细管电泳法测定牛奶和奶糖中的三聚氰胺

王彩霞, 闫宏涛, 张全彩

(西北大学 化学与材料科学学院, 陕西 西安 710069)

**摘要:**目的 研究建立一种高效毛细管电泳分离测定痕量三聚氰胺的新方法。方法 以高度压差进样,在优化的实验条件下,采用高效毛细管电泳对三聚氰胺进行分离检测。结果 三聚氰胺的峰面积与其质量浓度在  $1 \sim 100 \mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系,相关系数为  $0.999\ 04$ ,检出限为  $0.27 \mu\text{g/mL}$  ( $S/N=3$ )。应用于牛奶和奶糖中三聚氰胺含量的测定,回收率为  $81.36\% \sim 93.52\%$ ,相对标准偏差为  $2.82\% \sim 5.89\%$ 。结论 该法可用于食品及饲料中三聚氰胺含量的测定。

**关键词:**毛细管电泳;分离测定;三聚氰胺;牛奶;奶糖

**中图分类号:** O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 (2009)04-0599-04

三聚氰胺 ( $\text{C}_3\text{N}_6\text{H}_6$ , 又称三氨三嗪, 简称三胺,) 是一种重要的氮杂环有机化工原料, 用于生产塑料、防火纤维、阻燃剂等工业品。亦在部分亚洲国家被用来制造化肥<sup>[1,2]</sup>。由于三聚氰胺分子中含有大量氮元素, 所以不法分子在饲料以及乳制品中添加三聚氰胺以提高蛋白质含量, 而采用通常的“凯氏定氮法”是难以区分样品溶液中这种“伪蛋白”的存在。2007年美国宠物饲料中毒事件的发生, 2008年国内三鹿奶粉事件的曝光, 均是违法添加三聚氰胺所致, 给人民健康和生命造成极大的危害。因之, 研究建立快速测定食品、乳制品中三聚氰胺含量的高灵敏分析方法, 具有十分重要的实际意义和应用价值。

三聚氰胺的分析方法, 已报道有液相色谱-串联质谱法(LCMS/MS)<sup>[3-5]</sup>, 气相色谱-质谱(GC-MS)<sup>[6]</sup>, 液相色谱法<sup>[7,8]</sup>, 气相色谱法<sup>[9]</sup>等。这些方法具有高的分离效率和选择性, 但所使用仪器设备昂贵。高效毛细管电泳技术(High performance capillary electrophoresis, HPCE)是一种高效分离、分析技术。具有分离效率高、分析速度快、样品用量少、抗污染强及易自动化等特点, 应用于三聚氰胺分析测定有其独到之处。高效毛细管电泳分析技术应用于三聚氰胺的测定, 仅在本文研究过程中, 饶钦雄等人<sup>[10]</sup>报道经 SPE柱分离净化牛奶和奶粉样品, 采用

高效毛细管电泳法对其中的三聚氰胺进行分析检测的方法, 表明该方法可用于牛奶和奶粉样品中三聚氰胺的初筛检测。

本文研究建立了一种毛细管电泳直接分离测定三聚氰胺的分析方法, 该方法样品处理过程简单, 不需柱分离及衍生化, 已应用于牛奶、奶糖中三聚氰胺的分析测定, 结果令人满意。该方法准确、灵敏、简单、经济, 满足国家规定的三聚氰胺限量值的测定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器及试剂

CL1030型高效毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司);  $50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$  石英毛细管, 有效长度  $42 \text{ cm}$  (河北永年光纤厂); KQ-250B型超声波(昆山市超声仪器有限公司); PHS-25C酸度计(上海理达仪器有限公司); UV-2550紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。三聚氰胺(北京兴福精心化工研究所); 柠檬酸(广东汕头市西陇化工厂); 乙腈(天津市瑞金特化学品有限公司); 甲醇(西安化学试剂厂)。

实验所用试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

三聚氰胺标准溶液的配制: 准确称取  $0.005\ 0 \text{ g}$  三聚氰胺, 用  $20\%$  甲醇-水溶解配制  $100 \mu\text{g/mL}$  的标准储备液, 置于  $4^\circ\text{C}$  下保存备用。实验中按需要

收稿日期: 2009-02-18

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目(2007B01)

作者简介: 王彩霞, 女, 山西朔州人, 从事食品安全检测的研究。

稀释为所需浓度的标准液。

### 1.2 电泳条件

缓冲液: pH 5.00, 10 mmol/L 柠檬酸 - 柠檬酸钠溶液; 分离电压: 18 kV; 检测波长: 204 nm; 进样方式: 高度进样 (10 cm); 进样时间: 10 s。

每次实验前依次用 0.1 mol/L HCl 二次蒸馏水各冲洗毛细管 5 min, 然后再用缓冲液冲洗 15 min。实验中, 在两次进样间采用缓冲液冲洗 3 min。

### 1.3 样品测定

牛奶的测定: 准确称取市售牛奶 2.00 g 于离心管中, 加入 2 mL 乙腈, 超声提取 10 min 后, 离心取其上清液, 重复前述操作 3 次, 合并上清液。置于水浴中蒸干, 然后再用 2 mL 20% 甲醇 - 水溶解, 经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 在上述电泳条件下, 进行测定。

奶糖的测定: 将市售奶糖研磨至粉状, 准确称取 1.00 g 于离心管中, 加入 2 mL 乙腈 - 水 (2:1, 体积比) 溶解, 超声提取 30 min, 离心取其上清液, 重复前述操作 3 次, 合并上清液。同上实验操作, 水浴蒸干、溶解、过滤后, 在上述电泳条件下, 进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三聚氰胺吸收光谱

实验中进行了三聚氰胺吸收光谱的测定, 结果如图 1 所示。由图 1 可见, 三聚氰胺分子在紫外区 204 nm 处有一最大吸收。这是三聚氰胺分子中的 3 个氨基 ( $-\text{NH}_2$ ) 与三嗪母体共轭, 产生  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁所致<sup>[11]</sup>。实验选择 204 nm 吸收波长作为测定波长。

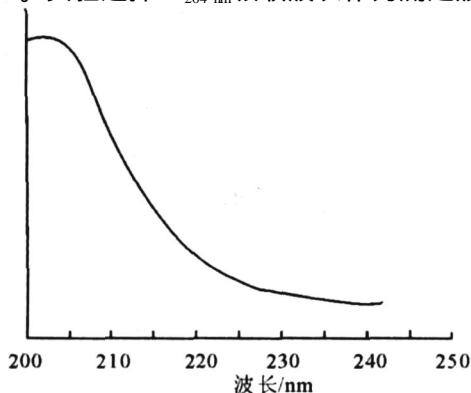


图 1 三聚氰胺吸收光谱图

Fig 1 Absorption spectra of melamine

### 2.2 毛细管电泳仪工作条件的选择

2.2.1 缓冲溶液及其浓度的选择 三聚氰胺为一弱碱性化合物。在酸性条件下, 三聚氰胺分子生成带正电荷的离子, 其电泳流与电渗流的方向相同, 使得分析时间缩短。而且, 在酸性介质中, 石英毛细管

管壁硅羟基质化, 从而降低电渗流, 有利于改善毛细管电泳分离重现性和延长了石英毛细管的使用寿命。实验选用柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液, 并考察了缓冲溶液浓度 (5 ~ 30 mmol/L 柠檬酸 - 柠檬酸钠) 对三聚氰胺分离的影响。结果表明随着缓冲液浓度的增大, 电渗流降低, 致使分离分析时间延长, 信号增强。但是, 随着缓冲溶液浓度的增加, 电流变大, 焦耳热增加, 电泳峰形变宽, 基线噪音增大。综合考虑, 实验选择 10 mmol/L 的柠檬酸 - 柠檬酸钠作为缓冲溶液。

2.2.2 pH 对测定的影响 pH 是影响毛细管电泳分离测定的重要因素之一。实验中考察了 pH 2.4 ~ 6.2 范围内三聚氰胺的分离行为。结果表明, 随着 pH 增加, 信号强度逐渐增强, 保留时间逐渐延长; 但当 pH 5.4 时, 信号强度降低, 毛细管电泳峰形发生畸变。所以, 实验选用 pH 5.00 的柠檬酸 - 柠檬酸钠作为缓冲溶液。

2.2.3 分离电压的选择 实验考察了 15 ~ 22 kV 范围内的电压对三聚氰胺分离的影响。结果表明, 分离电压过高或过低均不利于三聚氰胺的分离。电压较低, 分离分析时间较长; 电压升高, 分析时间缩短, 但基线噪音显著增大, 且峰形拖尾。所以, 实验选择 18 kV 作为毛细管电泳仪的分离电压。

### 2.3 提取溶剂的选择

三聚氰胺属强极性弱碱性化合物, 因此样品中三聚氰胺的提取一般宜选择极性较强的有机溶剂、缓冲溶液或有机溶剂与水的混合溶液作为提取液。实验中分别以甲醇、甲醇 - 水 (2:8, 体积比)、乙腈、和乙腈 - 水 (2:1, 体积比) 作为提取溶液, 比较了这些溶剂对样品中痕量三聚氰胺的提取效果。实验结果表明, 乙腈去除蛋白能力优于甲醇。经乙腈处理的牛奶样品, 上层提取液与蛋白沉淀有明显分层, 容易分离。但是, 对于奶糖而言, 在乙腈中的溶解度较小, 不利于其中三聚氰胺的提取, 回收率低, 故实验以乙腈 - 水 (2:1, 体积比) 为提取溶剂, 对奶糖样品中的三聚氰胺进行提取。

### 2.4 标准曲线、线性范围与检出限

在上述优化的电泳条件下, 进行三聚氰胺的分离、测定。实验中配制系列三聚氰胺标准溶液进行测定, 以峰面积对三聚氰胺浓度绘制标准曲线。结果表明在 1 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内, 三聚氰胺峰面积与浓度呈良好的线性关系, 线性方程为  $y = 10\,549x - 1\,944.1$ , 相关系数为 0.999 04。以  $S/N = 3$  进行计算, 检出限为 0.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 2.5 回收率实验

分别向牛奶和奶糖样品中加入一定体积已知浓度的三聚氰胺标准溶液, 静置约 30 min, 按照上述方

法进行处理, 所得滤液采用毛细管电泳仪进行测定。结果如表 1 所示, 其相关电泳图, 如图 2 所示。

表 1 三聚氰胺的回收率 (N = 5)

Tab 1 The recovery of melamine (N = 5)

样 品	添加量 ( $\mu\text{g/g}$ )	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
纯牛奶 I	2.5	88.16	87.27	2.82
	2.5	89.53		
	2.5	84.11		
纯牛奶 II	2.5	86.67	88.05	4.93
	2.5	93.52		
	2.5	86.95		
奶糖	5.0	81.36	88.15	5.89
	5.0	91.35		
	5.0	91.75		

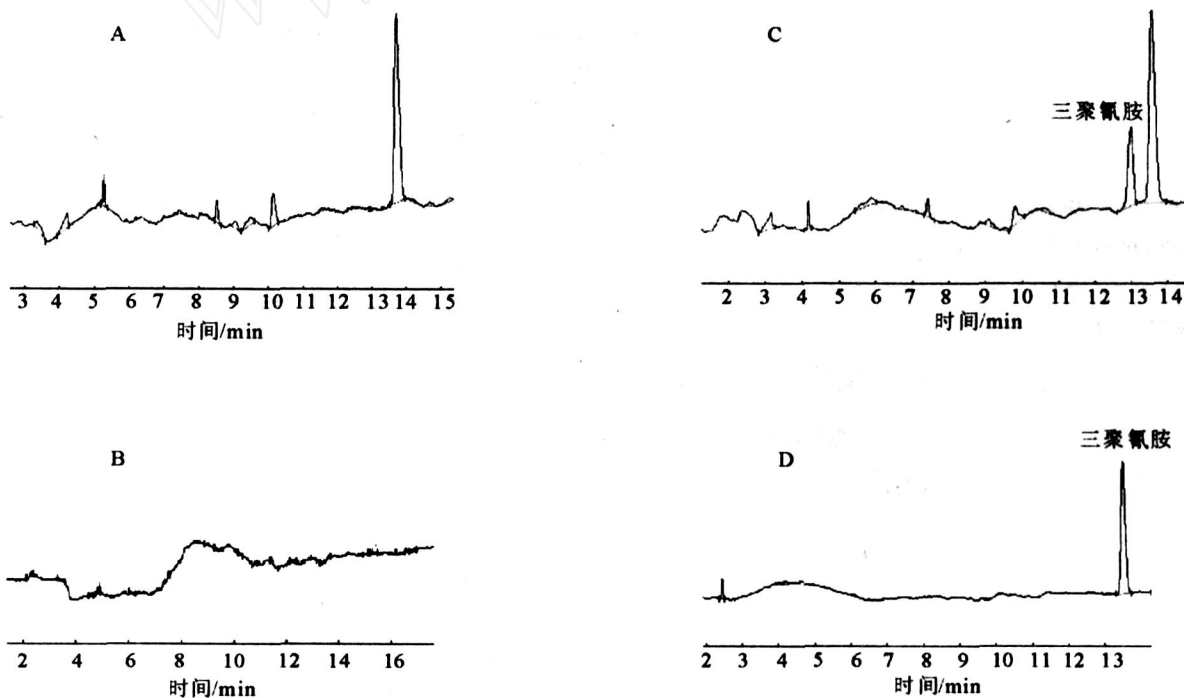


图 2 A, B 分别为牛奶和奶糖的空白电泳图; C, D 分别为牛奶和奶糖添加三聚氰胺后的电泳图

Fig 2 A and B were respectively the CE of milk and toffee. C and D were the CE of milk and toffee spiked with melamine, respectively

本文研究建立了一种毛细管电泳分离、测定三聚氰胺的新方法, 样品不需柱净化或衍生化处理, 简单、快速, 已成功用于奶糖和牛奶中三聚氰胺的测定, 得到满意结果。本方法将为食品及饲料中痕量三聚氰胺的测定提供一种有效方法。

## 参考文献:

- [1] 桑图希 R, 帕梅尼贾 M, 诺伊 S 由尿生产三聚氰胺的方法、特别是在第一分离步骤中得到不含三聚氰胺的尾气的方法: CN, 1659201A [P]. 2005-08-24
- [2] 库法尔 G 制备三聚氰胺的方法: CN, 1367779A [P].

2002-09-04.

- [3] 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.
- [4] 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 等. 超高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26 (3): 339-342
- [5] 黄芳, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 高效液相色谱 - 质谱法对饲料及食品添加剂中三聚氰胺的测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27 (3): 313-315.
- [6] 王征. GC - MS 法测定动物食品中的三聚氰胺 [J]. 福建分析测试, 2008, 17 (2): 1-4.

- [7] 丁涛,徐锦忠,李健忠,等. 高效液相色谱 - 二极管阵列检测法及高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱法测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26 (1): 6-9.
- [8] 何乔桑,刘敏芳,黄丽英,等. 高效液相色谱法测定奶粉和牛奶中的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26 (6): 752-754.
- [9] 张美金,林海丹,林峰,等. 高效液相色谱法测定饲料及宠物食品中三聚氰胺含量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17 (12): 2 205-2 206.
- [10] 饶钦雄,童敬,郭平,等. 高效毛细管电泳法测定牛奶和奶粉中的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26 (6): 755-758.
- [11] 黄量,于德泉. 紫外光谱在有机化学中的应用 [M]. 北京:科学出版社, 2000: 205-206.

(编辑 陈镜文)

## Detem nation of melam ine in milk and toffee by capillary electrophoresis

WANG Cai-xia, YAN Hong-tao, ZHANG Quan-cai

(College of Chemistry and Material, Northwest University, Xi an 710069, China)

**Abstract:** **Aim** To propose a new method for detem nation melam ine by capillary electrophoresis **Methods** The detem nation samples were pressure-injected at the inlet side of the capillary. The melam ine was separated and detected by capillary electrophoresis under the optimized experiment conditions **Results** The linearity between peak area and concentration was established over the range 1 ~ 100  $\mu\text{g/mL}$  with the correlation coefficient 0.999 04. The limit of detection was 0.27  $\mu\text{g/mL}$  ( $S/N = 3$ ). The method has been successfully applied to detem nation of melam ine in milk and toffee. The recoveries were 81.36% ~ 93.52% and the relative standard deviations were 2.82% ~ 5.89%. **Conclusion** The method can be used to detem ine melam ine in food and feed samples

**Key words:** capillary electrophoresis; separation and detem nation; melam ine; milk; toffee

(上接第 598页)

## Preparation of immobilized metal ion affinity adsorbent for recombinant human-like collagen adsorption

WANG Xiao-jun<sup>1,2</sup>, FAN Dai-di<sup>1</sup>, REN Yan-jun<sup>2</sup>

(1. Department of Environmental and Chemical Engineering, Xi an Polytechnic University, Xi an 710048, China; 2. College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi an 710069, China)

**Abstract:** **Aim** To study the preparation conditions of the metal chelate gel with chitosan as support **Methods** Chitosan was crosslinked with glutaraldehyde. Crosslinking support was activated with epichlorohydrin. Then the gel was prepared with iminodiacetic acid (DA) as chelating ligand and  $\text{Cu}^{2+}$  as chelating metal ion **Results** The adsorbents (0.22 mL/g (chitosan) mass fraction of glutaraldehyde) had good stability and mechanical strength. The epoxy density was the most with 1:1 NaOH (0.4 mol/L) and 50% DMSO as activating accelerator for 3 h. The study on the linkaging of DA demonstrates that the adsorbents synthesized with 4.26 g/g (chitosan) DA, at 65 °C for 18 h could chelate copper ion the most **Conclusion** The metal chelate affinity adsorbent prepared with optimized conditions could well chelate  $\text{Cu}^{2+}$  and could be used in immobilized metal ion affinity chromatography as stationary phase.

**Key words:** chitosan; metal chelate affinity adsorbent; crosslinking; chelate