

高效液相色谱法快速检测酸奶及蛋白饮料中三聚氰胺

肖淑贞 (石家庄君乐宝乳业有限公司)

摘要:三聚氰胺是非常亲水的小分子,在常规的反相色谱中不保留,因此不能与其他物质进行分离。本方法的原理是试样中三聚氰胺经水和乙腈提取后,用高效液相色谱测定,外标峰面积法定量。标准工作曲线相关系数为 $R=0.99998$ 。精密度的 RSD 为 0.3%,样品的加标回收率在 98.37~99.75% 之间。酸奶及蛋白饮料中三聚氰胺快速检测方法灵敏度及准确度符合要求。

关键词:三聚氰胺 高效液相色谱法 快速 酸奶 蛋白饮料

蛋白质主要由氨基酸组成,其含氮量一般不超过 30%,而三聚氰胺的分子式含氮量为 66% 左右。通用的蛋白质测试方法“凯氏定氮法”是通过测出含氮量来估算蛋白质含量,因此,添加三聚氰胺会使得食品的蛋白质测试含量偏高,从而使劣质食品通过食品检验机构的测试,终于爆发了三鹿奶粉事件。

三聚氰胺简称三胺,学名三氨基三嗪,别名蜜胺、氰尿酸、三聚酰胺,分子式 $C_3N_6H_6$ 、其结构式^①分子量 126.12,为纯白色单斜晶体,比重 1.573(14℃),熔点 354℃,300℃ 升华,显弱碱性,能溶于甲醛、乙酸、热乙二醇、甘吡啶,微溶于水(3.1g/L,常温)及醇,不溶于醚、苯和四氯化碳,能够与各种酸反应生成三聚氰胺盐。在强酸或强碱液中,三聚氰胺发生水解,氨基逐步被羟基取代,生成三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸。

三聚氰胺是非常亲水的小分子,在常规的反相色谱中不保留,因此不能与其他物质进行分离。一般情况下,对于亲水性的化合物可以在溶剂中加入离子对试剂,使样品在反相柱上保留,与其他杂质进行分离。在对三聚氰胺的检测中,加入的是辛烷磺酸钠(sodium octane sulfonate)。但是国标方法检测需 4 个小时,这对于企业来说有一定的局限性,尤其是乳品企业。现在介绍一种利用高效液相色谱法检测原料乳中的三聚氰胺的快速方法,本方法的定量限为 2mg/kg。

1 原理

试样中三聚氰胺经水和乙腈提取后,用高效液相色谱测定,外标峰面积法定量。

2 试剂

方法中所用试剂,除另有规定外,均为分析纯试剂,水为超纯水。

①乙腈:色谱纯。②柠檬酸:分析纯。③辛烷磺酸钠:色谱纯。④甲醇水溶液:准确量取 50mL 甲醇和 50mL 水,混匀后备用。⑤三聚氰胺标准品: CAS 108-78-01,纯度大于 99.0%。⑥三聚氰胺标准储备液:精密称取三聚氰胺 0.0100g,用甲醇水溶液(2.4)溶解并定容至 100mL 的容量瓶中,混匀,即得 100ug/mL 三聚氰胺标准储备液。于 4℃ 避光保存。保存期 1 个月。⑦微孔滤膜:0.45 μm,有机相。

3 仪器和设备

①高效液相色谱(HPLC)仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。②分析天平:感量为 0.0001g 和 0.01g。③离心机:转速不低于 4000r/min。④超声波水浴。⑤涡旋混合器。⑥具塞塑料离心管:50mL。

4 分析步骤

4.1 样品处理 准确称取 5.0g(精确至 0.01g)试样于 50mL 容量瓶中,加 10mL 乙腈溶解,用超纯水定容至 50mL,振荡混匀后超声提取 10-20min,离心,3500-4000 转/分钟以上离心 10 分钟,经 0.45μm 滤膜过滤, HPLC 分析。

4.2 测定

4.2.1 HPLC 色谱条件:分析柱: C8 4.6mm×250mm, 5.0μm; 流动相:准确称取 2.10g 柠檬酸和 2.16g 辛烷磺酸钠,加入约 980mL 水溶解,调节 pH 至 3.0 后,定容至 1L 备用;流速:1.0mL/min;进样量:10μL;柱温:40℃;波长:240nm;检测器:紫外检测器,236nm 波长。根据保留时间定性,外标峰面积法。

4.2.2 标准曲线:用不含盐的流动相将三聚氰胺标准储备液逐级稀释得到的浓度为 0, 1.0, 2.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0mg/kg 的标准工作液,浓度由低到高进样检测,以峰面积-浓度作图,得到标准曲线回归方程。基质匹配加标三聚氰胺的样品 HPLC 色谱图参见^②。

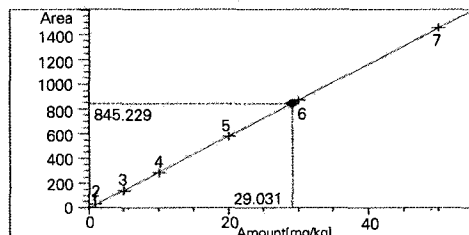
4.2.3 结果计算

试样中三聚氰胺的含量按下式进行计算: $X=C \times V/m/1000 \times 1000$

式中: X——试样中三聚氰胺的含量,单位为 mg/kg; C——经查标准曲线计算所得进样液的浓度,单位为 mg/kg; V——试样总稀释体积,单位为 mL; m——样品量,单位为 mL。计算结果保留三位有效数字。

5 线性实验

实验表明,样品中三聚氰胺的质量浓度在 0-20mg/kg 内标准曲线呈线性范围,曲线的回归方程为: $y=29.17897x-1.87222$, 相关系数为 $R=0.99998$ 。三聚氰胺的标准工作曲线见下图:



6 精密度的实验

重复测定标准溶液 8 次,将得到的浓度进行计算得到相对标准偏差。测定结果见下表所示:

精密密度(n=8)实验								RSD(%)
测定浓度(mg/kg)								
1	2	3	4	5	6	7	8	
9.96	9.95	10.00	9.98	10.02	10.05	10.00	9.97	0.30

7 准确度的实验

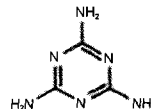
通过在样品中人为添加三聚氰胺标样得到不同浓度的三聚氰胺加标样品,通过样品空白及加标样品的测定结果,得到回收率,结果见下表:

样品中三聚氰胺的回收率				
样品编号	本底中三聚氰胺含量 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)	加标回收率 (%)
1	0	2	1.9949	99.75
2	0	4	3.9365	98.41
3	0	10	9.83745	98.37

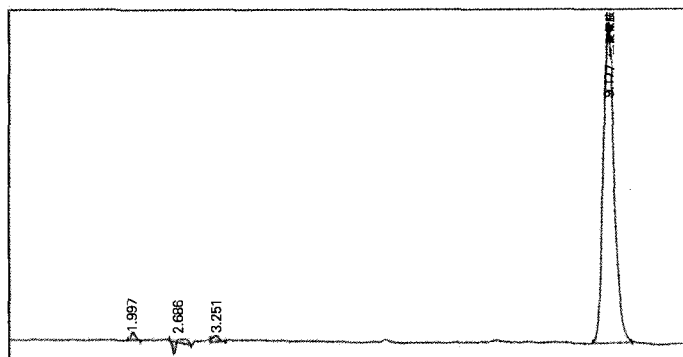
8 结论

利用高效液相色谱仪测定了酸奶中三聚氰胺的含量,其中三聚氰胺的浓度在 0~10mg/kg 范围内线性关系良好,精密度的 RSD 为 0.30%。样品的加标回收率在 98.37~99.75% 之间。

注释:①三聚氰胺分子结构图



②三聚氰胺色谱图



参考文献:

- [1]结构式图片由 yangke19941112 提供。
- [2]性质、用途——化工词典。
- [3]GB/T 22388-2008。