

# 牛羊肉中三聚氰胺的 HPLC 快速检测

李巧玲<sup>1</sup>, 安源<sup>2</sup>, 张艳川<sup>1</sup>, 杨金<sup>1</sup>

(1.河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 2.长春大学生物科学技术学院, 吉林 长春 130012)

**摘要:** 建立高效液相色谱(HPLC)检测牛、羊肉中三聚氰胺的检测方法。样品经 1% 三氯乙酸-乙腈(3:1, V/V)提取, 利用阳离子交换固相萃取柱净化后, 洗脱液于 50℃ 条件下用氮气吹干, 残渣用离子对试剂缓冲液-乙腈(90:10, V/V)溶解, 用高效液相色谱法由紫外检测器检测、外标法定量。结果表明, 三聚氰胺在 0.2~80 μg/mL 质量浓度范围内具有良好的线性关系, 线性相关系数( $R^2$ )为 0.9999, 其检出限为 0.05mg/kg。在牛肉样品中, 三聚氰胺的平均回收率为 81.73%~83.35%, 相对标准偏差为 0.97%~1.95%; 在羊肉样品中, 三聚氰胺的平均回收率为 80.95%~82.95%, 相对标准偏差为 0.70%~2.32%。本方法具有操作快捷、灵敏度高、重现性好等优点。

**关键词:** 三聚氰胺; 牛肉; 羊肉; 高效液相色谱

## Rapid HPLC Determination of Melamine in Beef and Mutton

LI Qiao-ling<sup>1</sup>, AN Yuan<sup>2</sup>, ZHANG Yan-chuan<sup>1</sup>, YANG Jin<sup>1</sup>

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China;  
2. Biological Scientific and Technical College, Changchun University, Changchun 130012, China)

**Abstract:** A rapid HPLC method was developed for the determination of melamine in beef and mutton. Samples were extracted with a mixture of trichloroacetic acid and acetonitrile mixture (3:1, V/V) and cleaned up on a cation exchange solid-phase extraction (SPE) column. The eluate was blown to dryness under nitrogen at 50 °C and then dissolved in a mixture of ion-pair buffer and acetonitrile (90:10, V/V). The analysis was carried out using HPLC with UV detector. A good linear relationship was observed for melamine within the range of 0.2–80 μg/mL and the linear correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.9999. The limit of detection was 0.05 mg/kg. For beef, average spike recoveries (6 replicates) at 3 levels ranged from 81.73% to 83.35%, with a relative standard deviation (RSD) from 0.97% to 1.95%. For mutton, average spike recoveries (6 replicates) at 3 levels ranged from 80.95% to 82.95%, with a RSD from 0.70% to 2.32%. The method proved to be rapid, accurate and reliable.

**Key words:** melamine; beef; mutton; high performance liquid chromatography

中图分类号: TS251.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)10-0196-04

从“宠物饲料事件”到“三鹿问题奶粉事件”, 再到“鸡蛋中检出三聚氰胺”, 三聚氰胺已经成为食品公共安全的焦点<sup>[1-3]</sup>。三聚氰胺(melamine)是一种三嗪类含氮杂环有机化合物, 重要的氮杂环有机化工原料。由于其含氮量高达 66%, 换算成粗蛋白含量为 416.27%<sup>[4]</sup>, 在“凯氏定氮法”中可以表现出“高蛋白质含量”的假象, 所以成了“三鹿奶粉”事件中的主角。

关于三聚氰胺对人的毒性报道较少, 大部分是动物研究的结果。三聚氰胺的毒作用靶器官为膀胱和肾脏, 实验显示<sup>14</sup>C 标记的三聚氰胺进入 Fischer344 大鼠体内后主要分布于血液、肝脏、肾和膀胱等器官<sup>[5-7]</sup>。三聚氰胺既然能进入血液, 推测其也能通过代谢在肉组织中有

残留。既然有残留, 残留量能否对摄入该肉的人体产生危害, 就成为一个很值得关注的问题。既然鸡蛋中能检出残留的三聚氰胺<sup>[3]</sup>, 推测食饲料的动物的肉中也有可能检出三聚氰胺。

2008 年 10 月 7 日国家质量监督检验检疫总局、国家标准化委员会批准发布了《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》国家标准(GB/T 22388—2008), 标准规定了高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱/质谱法 3 种方法为三聚氰胺的检测方法, 检测定量限分别为 2、0.05、0.01 mg/kg<sup>[8]</sup>。目前, 对于鲜肉中三聚氰胺残留的检测研究报告还较少<sup>[9]</sup>, 因此本研究在 GB/T 22388—2008 的基础上, 通过对样品前处

收稿日期: 2009-08-07

基金项目: 教育部“留学回国人员科研启动基金”资助项目(教外司留[2009]1001 号)

作者简介: 李巧玲(1973—), 女, 副教授, 博士后, 研究方向为食品安全与检测。E-mail: lq198119@126.com

理方法进行改进, 研究牛、羊肉中三聚氰胺的检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

牛、羊肉购买于超市。

三聚氰胺标准品(纯度大于 99.0%) 河北省食品质量监督检验研究院; 甲醇、乙腈、辛烷磺酸钠(均为色谱纯); 柠檬酸、三氯乙酸(均为分析纯); 实验用水均为超纯水; 氮气(纯度大于 99.999%); 0.2  $\mu\text{m}$  有机相微孔滤膜 天津市沃尔孚科技发展有限公司。

LC-20A 高效液相色谱仪(配有 SPD-20A 检测器和 LC solution 工作站) 日本 Shimadzu 公司; AL204 分析天平 梅特勒-托利多有限公司; XYJ-3 台式自动平衡离心机 春兰实验仪器厂; SK5200LHC 超声波清洗器 上海科导超声仪器有限公司; 氮气吹干仪 上海济成分析仪器有限公司; ProElut 阳离子交换固相萃取柱 Dikma 科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 溶液的配制

甲醇水溶液、三氯乙酸溶液(1%)、氨化甲醇溶液(5%)、离子对试剂缓冲液以及三聚氰胺标准储备液的配制见参考文献[8]。

#### 1.2.2 标准曲线的绘制

用流动相将三聚氰胺标准储备液逐级稀释得到的质量浓度为 0.2、0.8、2、20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液, 各取 20  $\mu\text{L}$  上色谱仪进样分析。以标准样品的质量浓度为横坐标、相应的峰面积为纵坐标, 获得三聚氰胺的标准曲线及相关系数。

#### 1.2.3 样品的处理

选取新鲜牛肉、羊肉样品约 500g, 分别切碎后, 装入洁净盛样袋内, 密闭并标识, 冷冻于冰箱中。

取适量上述样品于干净的研钵中, 研磨成浆状后称取 2g(精确至 0.01g)试样于 50mL 具塞塑料离心管中, 加入 12mL 1% 三氯乙酸溶液和 4mL 乙腈, 超声提取 8min 后, 以不低于 4000r/min 离心 10min。上清液经 1% 三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤后, 残渣再经上述过程提取一次, 然后合并滤液, 用 1% 三氯乙酸溶液定容至 35mL, 移取 7mL 滤液, 加入 7mL 水混匀后转移至固相萃取柱中。依次用 3mL 水、3mL 甲醇和 6mL 氨化甲醇溶液洗脱。洗脱液于 50 $^{\circ}\text{C}$  条件下用氮气吹干, 得 0.4g 残留物, 用 1mL 流动相定容, 涡旋混合 1min, 过微孔滤膜后, 供 HPLC 测定。

#### 1.2.4 液相色谱条件

色谱柱为 Shim-pack VP-ODS  $\text{C}_{18}$  柱(150mm $\times$ 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ), 流动相为离子对试剂缓冲液-乙腈(90:10, V/V),

检测波长 240nm, 流速 1.0mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.2.5 三聚氰胺含量的计算

试样中三聚氰胺含量的计算参见参考文献[8]中的计算公式。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取剂的选择

根据 GB/T 22388—2008 相关资料, 选取 1% 三氯乙酸-乙腈溶液(3:1, V/V)为提取剂。精确称取 2g 供试样品并添加三聚氰胺标准溶液(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )250  $\mu\text{L}$  于干净的研钵中, 研磨成浆状后放入 50mL 塑料离心管中, 加入 16mL 提取剂高速均质 2min, 后面的操作步骤和 1.2.3 节相同, 高效液相色谱的测定结果见表 1。

表 1 以三氯乙酸-乙腈为提取剂三聚氰胺的回收率

Table 1 Recovery of melamine in mutton and beef extracted with a mixture of trichloroacetic acid and acetonitrile mixture (3:1, V/V)

样品	羊肉	牛肉
平均回收率/%	82.35	82.55

从表 1 可以看出, 1% 三氯乙酸-乙腈溶液对于两种样品中三聚氰胺的提取效果比较好, 所以确定本实验的提取剂为 1% 三氯乙酸-乙腈溶液。

### 2.2 提取液净化条件的选择

在三聚氰胺的检测分析实验中, 固相萃取法是最为常用的净化方法。萃取柱常使用以高聚物为基质的亲水-亲脂混合型阳离子交换柱, 苯磺酸基属于强阳离子交换功能团, 在任何 pH 值条件下都为带负电荷的阴离子<sup>[10]</sup>。因此, 只要控制样品溶液的 pH 值使三聚氰胺呈阳离子状态, 就能够被苯磺酸基通过离子交换方式吸附。在样品溶液中, 三聚氰胺已经是在酸性条件, 故本实验采用 ProElut 阳离子交换固相萃取柱(基质为苯磺酸化的聚苯乙烯-二乙烯基苯高聚物)净化提取液, 结果表明, 其净化结果较为理想。

### 2.3 分析的线性范围和检出限

40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三聚氰胺标准溶液的 HPLC 图见图 1, 三聚氰胺的标准曲线见图 2。

由图 2 可看出, 三聚氰胺在 0.2~80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的质量浓度范围内呈良好线性关系, 线性相关系数  $R^2$  为 0.9999。

依据本实验的色谱条件, 将标准溶液进行连续稀释, 同供试样品进行研磨、提取、净化后进样分析, 根据 3 倍噪音的峰面积响应值和方法回收率, 可以得到最低检出限<sup>[11]</sup>。测定表明, 三聚氰胺的检出限为 0.05mg/kg。此数值小于国标《原料乳与乳制品中三聚

氰胺检测方法》中高效液相色谱法的检测定量限2mg/kg,完全可以满足对肉中三聚氰胺残留的分析。

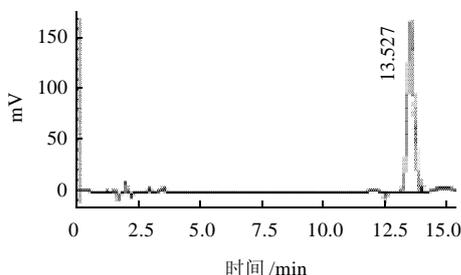


图1 40μg/mL 三聚氰胺标准溶液的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of melamine standard solution at 40 μg/mL

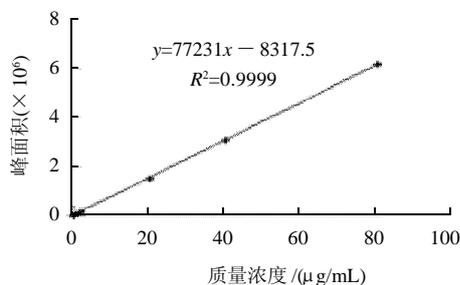


图2 三聚氰胺的标准曲线

Fig.2 Standard curve of melamine

## 2.4 回收率的测定

本实验分别取2g牛肉、羊肉样品各3份,在2、4、8 μg/g三个添加水平,按前述提取方法及检测条件分别测定,同时做空白样品两份,每份样品监测6次,确定添加回收率。测得的回收率和相对标准偏差如表2、3所示。结果表明,牛肉样品在3个添加水平下,样品中三聚氰胺的平均回收率为81.73%~83.35%,相对标准偏差为0.97%~1.95%;羊肉样品在3个添加水平下,三聚氰胺的平均回收率为80.95%~82.95%,相对标准偏差为0.70%~2.32%,这说明该方法的准确度和精密度良好。

表2 牛肉测定的回收率(n=6)

Table 2 Average spike recoveries (6 replicates) for melamine in beef at 3 levels

测定次数	测定值/(μg/g)		
	添加水平 2 μg/g	添加水平 4 μg/g	添加水平 8 μg/g
1	1.692	3.325	6.581
2	1.638	3.287	6.490
3	1.665	3.406	6.476
4	1.654	3.261	6.565
5	1.595	3.329	6.632
6	1.653	3.397	6.487
平均回收率/%	82.48	83.35	81.73
相对标准偏差/%	1.95	1.74	0.97

表3 羊肉测定的回收率(n=6)

Table 3 Average spike recoveries (6 replicates) for melamine in mutton at 3 levels

测定次数	测定值/(μg/g)		
	添加水平 2 μg/g	添加水平 4 μg/g	添加水平 8 μg/g
1	1.632	3.310	6.433
2	1.654	3.287	6.536
3	1.700	3.356	6.485
4	1.598	3.378	6.416
5	1.621	3.184	6.508
6	1.645	3.393	6.477
平均回收率/%	82.08	82.95	80.95
相对标准偏差/%	2.11	2.32	0.70

## 2.5 牛、羊肉中三聚氰胺含量的测定

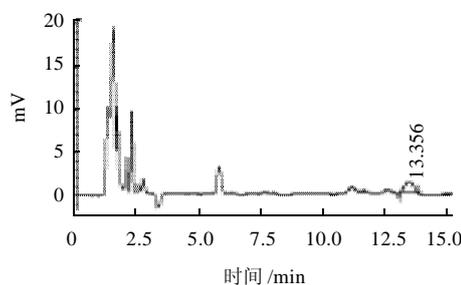


图3 牛肉样品的高效液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of a beef sample

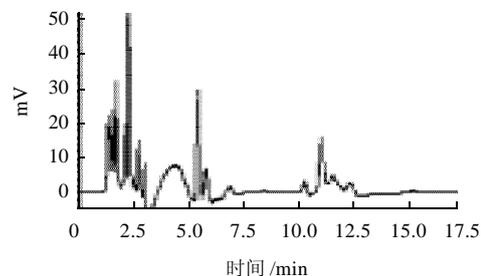


图4 羊肉样品的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of a mutton sample

由图1可知,三聚氰胺的保留时间在13.5min左右。图3、4同图1对比可知,牛肉样品中含有三聚氰胺,羊肉样品中不含有三聚氰胺。根据参考文献[8]的计算公式,计算得出牛肉样品中三聚氰胺的含量为1.064mg/kg,并且在待测物出峰的区域,未见干扰峰出现。根据国家含乳15%以上食品中三聚氰胺的限量值(2.5mg/kg)的规定,牛肉样品中虽然检出了三聚氰胺,但含量符合国家规定限量值。

牛肉样品中检出了三聚氰胺,而羊肉样品中未检出,分析原因可能为:牛和羊所食饲料有差异,羊吃的饲料中三聚氰胺的含量很少,或者饲料中不含有三聚氰胺,经机体代谢后,残留在肌肉组织中的三聚氰胺

的量低于仪器的检出限。

### 3 结论

实验证明三聚氰胺能够通过饲料进入动物体内,并在肌肉组织中有残留,但其残留量较少,符合国家规定限量值,食用这种肉不会对健康带来危害。同时该研究也表明,用高效液相色谱检测牛羊肉中的三聚氰胺的含量是可行的。该方法精密度好,准确度高,检出限低,该研究为鲜肉中三聚氰胺残留的检测提供了切实可行的技术手段,推广性较强。

### 参考文献:

- [1] 宫靖, 吴燕. 宠物饲料加三聚氰胺成毒粮引发中美贸易风波[J/OL]. 财经, 2007, 186(11) (2007-05-28)[2008-09-12]. [http://finance.qq.com/a/20080912/002595\\_1.htm](http://finance.qq.com/a/20080912/002595_1.htm).
- [2] 慧聪食品工业网. 三鹿奶粉事件引发全行业信任危机[EB/OL]. (2008-09-23)[2008-09-23]. <http://info.food.hc360.com/zt/slnf/index.shtml>.
- [3] 陈颖镭. 鲜鸡蛋在港检出三聚氰胺[EB/OL]. (2008-10-26)[2008-10-26]. [http://news.ifeng.com/hongkong/200810/1026\\_19\\_846858.shtml](http://news.ifeng.com/hongkong/200810/1026_19_846858.shtml).
- [4] 谢志辉, 陈茜, 陈智, 等. 三聚氰胺毒性研究进展[J]. 湖南饲料, 2009 (2): 14-16.
- [5] MAST R W, JEFFCOAT A R, SADLER B M, et al. Metabolism, disposition and excretion of [<sup>14</sup>C] melamine in male Fischer344 rats[J]. Food Chem Toxicol, 1983, 21: 807-810.
- [6] MELNICK R L, BOORMAN G A, HASEMAN J K, et al. Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1984, 72(2): 292-303.
- [7] OKUMURA M, HASEGAWA R, SHIRAI T, et al. Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents thymine or melamine[J]. Carcinogenesis, 1992, 13(6): 1043-1045.
- [8] GB/T 22388 — 2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].
- [9] 李海燕, 占春瑞, 郭平. 动物性食品中三聚氰胺研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(2): 90-92.
- [10] 张俊燕, 何吕兴. 三聚氰胺的样品前处理及最新检测方法[J]. 生命科学仪器, 2007, 5(10): 57-59.
- [11] 朱明华. 仪器分析[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 44.