

原料乳中三聚氰胺的高效液相色谱法测定

肖 洋, 粟周伟, 冯永渝, 寻思颖

(国家酒类及饮料质量监督检验中心, 贵州省产品质量检验检测院, 贵州 贵阳 550003)

摘要:原料乳中三聚氰胺经乙腈萃取后, 采用 Biobasic SCX 色谱柱(250 mm×150 mm, 5 μ m)分离, 二极管阵列紫外检测器检测。流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液(体积比=30:70), 检测波长 240 nm。在添加浓度为 5~20 mg/kg 范围内, 回收率为 92%~96%, 相对标准偏差小于 10%, 方法检测限为 0.25 mg/kg。

关键词:原料乳; 三聚氰胺; 高效液相色谱法

中图分类号:TS252.7

文献标识码:A

文章顺序编号:1672-5190(2009)01-0045-02

Determination of Melamine in Raw Milk by HPLC

XIAO Yang, et al

(Guizhou Inspection and Detection Institute of Product Quality, National Supervision and Inspection Centre of Alcohol and Drink Quality, Guiyang 550003, China)

Abstract: The melamine in raw milk was extracted with acetonitrile, isolated by Biobasic SCX chromatographic column (250 mm×150 mm, 5 μ m) and detected by diode array UV-detector. The mobile phase was acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer solution (with volume ratio of 30:70) and the detection wavelength was 240 nm. In the addition concn. range of 5~20 mg/kg, the recovery of this method was 92%~96%, its RSD was smaller than 10% and its detection limit was 0.25 mg/kg.

Key words: raw milk; melamine; HPLC

近来, 在国内发生了婴幼儿奶粉被化工原料三聚氰胺污染的严重事件, 引起广泛关注。三聚氰胺(melamine)俗称蜜胺、氰尿酸胺、三聚酰胺, 为白色晶体, 熔点 354 $^{\circ}$ C, 难溶于水、乙二醇、甘油和吡啶, 略溶于乙醇, 不溶于乙醚、苯和四氯化碳; 其分子结构中含氮量达 66.7%^[1](化学结构见图 1)。凯氏定氮法是测定食品中蛋白质含量的经典方法, 其结果表征的是总氮含量, 在检样掺入含氮化合物时, 检测数据并不能反映氮元素是否来源于蛋白质分子还是化工原料(如三聚氰胺的杂氮环), 因此造成了非法添加三聚氰胺的原料乳蛋白质检测仍然达标的假象, 从而使其冒充合格原料, 加入生产与流通环节, 危害人体健康。鉴于原料乳贮存时间短、易变质的特性, 无论乳制品生产企业还是食品监管机构都需要快速准确地完成对原料乳的验收, 方能实现合格产品生产, 确保乳制品行业健康发展。笔者采用强阳离子交换色谱柱进行原料乳中三聚氰胺的测定, 10 min 内即可完成样品检测, 该方法简便快速, 结果较为满意。

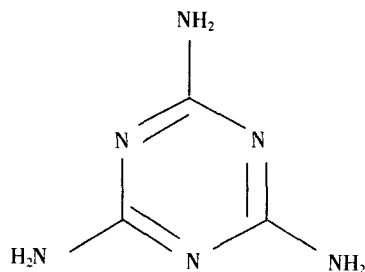


图 1 三聚氰胺的结构式

1 试验材料与方法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪: Agilent-1100 型, 配四元梯度泵, 二极管阵列检测器, 在线真空脱气机; 电子分析天平: 瑞士梅特勒公司; 超纯水机: 成都康宁实验专用纯水设

备厂; 超声波清洗器: 天津东科仪器设备有限公司; Biobasic SCX 色谱柱: Thermo, USA; 三聚氰胺标准品(纯度: 99.5%); Chemistry Sevice, USA; 磷酸二氢钾、磷酸(分析纯); 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(色谱纯): 天津科密欧化学试剂有限公司。

1.2 色谱条件 流动相: 乙腈: 磷酸盐缓冲液(称取 6.8 g 磷酸二氢钾, 加水约 800 mL 溶解, 以磷酸调至 pH=3.0, 加水定容至 1 000 mL, 过 0.45 μ m 水系滤膜即得)=30:70; 色谱柱为强阳离子交换柱, 250 mm×150 mm, 粒径 5 μ m; 流速: 1.5 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 240 nm; 进样量: 20 μ L, 保留时间定性, 峰面积定量。

1.3 标准溶液配制 精密称取 100 mg 三聚氰胺标准物质(准确至 0.1 mg)于 100 mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得 1.0 mg/mL 的标准储备液, 使用时以水稀释至所需浓度。

1.4 原料乳前处理 称取混合均匀的原料乳 10 g(准确至 0.01 g)于 50 mL 具塞刻度试管中, 加 30 mL 乙腈剧烈振荡 6 min, 加水至刻度, 充分混匀后静置 3 min, 上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤后得待测液。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择 通过二极管阵列检测器波长扫描, 三聚氰胺在 215, 240 nm 处均有较大吸收, 但在 240 nm 处, 响应值高, 且杂峰最少, 结合其他文献资料进行综合比较, 该试验选择检测波长为 240 nm^[2-3]。扫描图谱见图 2。

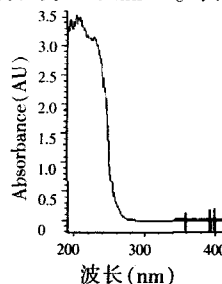


图 2 三聚氰胺紫外扫描图谱

收稿日期: 2008-12-21

作者简介: 肖洋(1976—), 男, 工程师, 硕士, 主要从事食品质量安全检验工作。

2.2 选用强阳离子交换色谱柱的依据 三聚氰胺化学结构中含胺根, 极性较强, 导致该化合物在普通反相 C18 柱上, 保留值很低, 接近死时间流出, 不利于分析。该试验固定相采用强阳离子交换色谱柱, 柱中含强阳离子填料, 可在线去除杂质干扰, 净化样品, 避免了使用固相萃取小柱净化样品时, 须经上样、洗脱、氮吹等步骤, 可以有效节约时间, 提高检测效率; 配合 pH=3.0 的磷酸二氢钾缓冲溶液, 三聚氰胺出峰时间理想, 峰型对称尖锐(见图 3)。

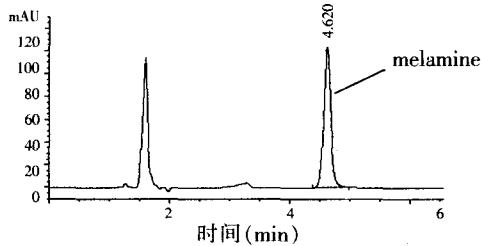


图 3 10 µg/mL 三聚氰胺标准品 HPLC 色谱图

2.3 工作曲线与检测限 在试验条件下, 配制三聚氰胺标准系列 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 µg/mL, 以三聚氰胺浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制曲线, 得回归方程为 $Y=52.6X+5.02$, 相关系数 $R=0.9998$, 说明在 0.25~2.00 µg/mL 范围内线性关系良好。综合称样量、样品定容体积求出方法检测限为 0.25 mg/kg。

2.4 精密度与回收率 采用标准添加法, 取空白原料乳样品 18 份, 分别加入三聚氰胺标准物质 0.05, 0.10, 0.20 mg, 进行 3 个浓度水平的加标回收试验, 各浓度做 6 次平行, 计算回收率和相对标准偏差, 结果见表 1。原料乳及原料乳中添加三聚氰胺色谱信息见图 4 和图 5。

按试验方法重复测定浓度为 1 µg/mL 的三聚氰胺标准样品 6 次, 测定方法精密度, 结果见表 2。

3 结论

该试验以高效液相色谱仪为平台, 选用合适强阳离子

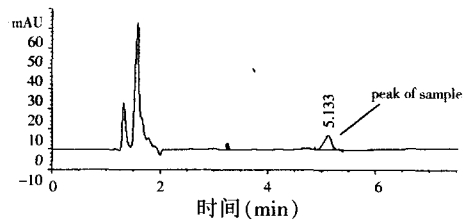


图 4 原料乳色谱图

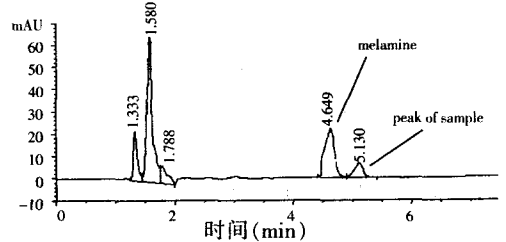


图 5 原料乳中添加三聚氰胺色谱图

表 1 回收率试验 (n=6)

添加量 (mg)	回收率 (%)						平均回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD)
	1	2	3	4	5	6		
0.05	95.1	93.3	94.3	96.3	95.2	96.8	95.2	1.34
0.10	96.2	92.8	95.5	94.2	96.4	92.1	94.5	1.90
0.20	94.2	95.1	92.7	92.3	95.1	93.7	93.9	1.25

表 2 精密度试验结果

分析物	测定值 (µg/mL)	平均值 (µg/mL)	相对标准偏差 (%) (RSD)
三聚氰胺	1.02, 1.05, 1.02, 0.99, 1.02, 0.99	1.02	2.0

交换色谱柱测定原料乳中三聚氰胺。方法简便快捷, 精密度高, 重现性好, 适用于原料乳质量控制。

参考文献:

- [1] 王箴. 化工辞典 [M]. 4 版. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] 王浩, 刘艳琴, 曹红, 等. 固相萃取与高效液相色谱联用测定宠物食品中三聚氰胺 [J]. 分析化学, 2008, 36(2): 273.
- [3] 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.
- [4] 王箴. 化工辞典 [M]. 4 版. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [5] 王浩, 刘艳琴, 曹红, 等. 固相萃取与高效液相色谱联用测定宠物食品中三聚氰胺 [J]. 分析化学, 2008, 36(2): 273.
- [6] 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.
- [7] 王箴. 化工辞典 [M]. 4 版. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [8] 王浩, 刘艳琴, 曹红, 等. 固相萃取与高效液相色谱联用测定宠物食品中三聚氰胺 [J]. 分析化学, 2008, 36(2): 273.
- [9] 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.
- [10] 王箴. 化工辞典 [M]. 4 版. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [11] 黄东东, 王庆华, 吕振岳, 等. 转基因食品的定量 PCR 检测方法 [J]. 食品科技, 2001(5): 62-64.
- [12] 魏振林, 田志环, 焦传珍, 等. 转基因番茄植株 Mi1.2 表达水平的 Real Time PCR 检测体系的建立 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7589-7590.
- [13] 于国龙. 实时荧光定量 PCR 在医学遗传学方面的应用 [J]. 国外医学遗传学分册, 2003, 26(3): 125-130.
- [14] 马荣群, 陈红运, 黄文胜, 等. 实时定量 PCR 方法检测转基因产品 [J]. 植物检疫, 2002(1): 61-65.
- [15] 陈苏红, 张敏丽, 牟航, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测炭疽杆菌 [J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(3): 268-270.
- [16] 王德朋, 李红阁, 郭松长, 等. 青海家牦牛 HIF-1α 基因组织特异性表达 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(29): 9173-9175.
- [17] 黄士兴, 沈富林, 李洁, 等. 荧光定量 PCR 法检测饲料中的牛、羊成分 [J]. 饲料研究, 2002(11): 18-20.
- [18] 李启琳, 李燕鹏, 王士长. 分子生物学技术在瘤胃纤毛虫研究中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 908-910.
- [19] 易道生, 娄高明, 韩先干, 等. 猪圆环病毒多重 PCR 检测与分型 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(32): 10239-10241.
- [20] 陈玉栋, 张楚喻, 邹俊煊, 等. 建立快速定量检测猪瘟兔化弱毒苗的荧光定量 PCR 技术 [J]. 中国病毒学, 2003, 18(2): 124-128.

(上接第 44 页)器和试剂成本、样品处理及多基因同时分析等, 推动该技术在生命科学领域的应用和普及^[7]。

参考文献:

- [1] 王小红. 荧光定量 PCR 技术研究进展 [J]. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23(1): 42-45.
- [2] 韩俊英, 曾瑞萍. 荧光定量 PCR 技术研究及其在应用 [J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(3): 117-120.
- [3] 何蕴韶. 荧光探针定量 PCR 技术 [J]. 中国医药导刊, 2001, 3(4): 307-309.
- [4] 杨新. 实时荧光定量 RT-PCR 定量分析 mRNA 表达水平原理及应用 [J]. 中国检验医学与临床, 2003, 4(2): 78-80.
- [5] 邓少丽, 罗阳. 荧光定量 PCR 技术及其在临床上的应用 [J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2002, 23(5): 301-303.
- [6] 蒋奎荣. 荧光定量 PCR 技术及其在肿瘤研究中的现状 [J]. 医学综述, 2003, 9(5): 288-289.
- [7] 陈苏红, 王小红, 张敏丽, 等. 复合荧光探针定量 PCR 方法的建立 [J]. 生物技术通讯, 2003, 14(2): 127-130.
- [8] 朱文斯, 黄茜华, 黄艳兰, 等. 含内标的荧光 PCR-荧光定量 PCR [J]. 中国医药导刊, 2001, 3(4): 309-311.
- [9] 杨建荣, 陈晓东. 应用实时 RT-PCR 技术的 mRNA 定量分析 [J]. 中国实验诊断学, 2002, 6(3): 192-195.
- [10] 翟新验. 实时 Taqman PCR 技术在兽医学中的应用 [J]. 实