

高效液相色谱法快速测定奶粉中三聚氰胺的含量

尹利辉¹, 王军², 王瑾¹, 陈金泉², 刘晋仙², 金少鸿¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 东营市药品检验所, 东营 257091)

摘要 目的: 建立快速样品预处理和高效液相色谱法测定奶粉中三聚氰胺含量的方法。方法: 样品预处理采用 1% 甲酸水溶液为脱脂剂, 乙腈为沉淀剂, 快速处理样品; 含量分析采用高效液相色谱法, 色谱柱为 C_{18} 预柱 + CAPCELL PAK CR (1:4) 柱 (3.0 mm × 150 mm 5 μ m), 流动相: 含 1% 醋酸的 0.025 mol · L⁻¹ 醋酸铵溶液 - 乙腈 (50:50), 流速: 0.5 mL · min⁻¹, 检测波长: 240 nm, 柱温: 40 °C。结果: 样品预处理简便快捷; 三聚氰胺的线性范围为 0.20 ~ 50.00 mg · L⁻¹ ($r=0.9999$), 3 个水平回收率均在 97% ~ 103% 之间, 方法检测限为 0.2 mg · kg⁻¹, 定量限为 0.6 mg · kg⁻¹。结论: 该方法快速、灵敏、准确、重复性好, 可用于奶粉中三聚氰胺的分析测定。

关键词: 高效液相色谱; 奶粉; 三聚氰胺

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)10-1938-03

HPLC rapid determination of melamine in milk power

YIN Li-hui¹, WANG Jun², WANG Jin¹, CHEN Jin-quan², LIU Jin-xian², JIN Shao-hong¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Dongying Institute for Drug Control, Dongying 257091, China)

Abstract Objective: To develop a method for the extraction and determination of melamine in milk power by HPLC. **Method:** The chromatographic separation was achieved on C_{18} pre-column and CAPCELL PAK CR (1:4) column (3.0 mm × 150 mm 5 μ m) with 0.025 mol · L⁻¹ ammonium acetate containing 1% acetic acid - acetonitrile (50:50) as the mobile phase at a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹. The column was maintained at 40 °C and the detective wavelength was 240 nm. **Results:** The calibration curve was linear in the range of 0.20 - 50.00 mg · L⁻¹ for melamine ($r=0.9999$) and the average recoveries ($n=3$) are 97% - 103%. The limits of detection (LOD) and the limits of quantitation (LOQ) were 0.2 mg · kg⁻¹ and 0.6 mg · kg⁻¹, respectively. **Conclusion:** The method is rapid, sensitive, accurate, reproducible and can be used in the rapid determination of melamine in milk power.

Key words: HPLC; milk power; melamine

三聚氰胺 (melamine) 简称三胺, 化学名三氨基三嗪, 其含氮量为 66.6%, 对采用氮含量表征代表含量的宠物饲料和牛奶等, 加入三聚氰胺可以大幅提高蛋白质测定表观含量, 但使用后可诱发肾衰竭并导致死亡, 因此一直禁止在饲料和食品中使用。2008 年三鹿奶粉事件使三聚氰胺成为国人关注的焦点, 国家相关部门相继出台了一系列检验标准^[1-2]。目前三聚氰胺的检测方法的检测方法中有: 高效液相色谱法^[1-4]、高效液相色谱 - 质谱连用法 (LC-MS)^[1-5]、气相色谱 - 质谱连用法 (GC-MS)^[1]、毛细管电泳^[6]以及近红外检测法^[7]等。然而, 烦琐的样品处理过程, 高昂的仪器维护成本, 使

得这些方法并不适合于大批量样品的检测。本实验采用的三聚氰胺提取纯化过程, 新颖、简单快速; 采用反相高效液相色谱法测定奶粉中三聚氰胺含量, 重复性好, 灵敏度高。

1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪 (日本岛津), SPD-M20A 二极管阵列检测器, Solution 工作站处理系统。

三聚氰胺 (分析纯, 北京化学试剂有限公司, 含量 ≥ 99.5%)、醋酸铵 (分析纯, 北京化学试剂有限公司)、冰醋酸 (分析纯, 北京化工厂)、甲酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA company)、水为重蒸水。

2 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: [C₁₈ 预柱 + CAPCELL PAK CR(1:4) 柱 (3.0 mm × 150 mm 5 μm)]; 流动相: 含 1% 醋酸的 0.025 mol · L⁻¹ 醋酸铵溶液 - 乙腈 (50:50); 检测波长: 240 nm; 流速: 0.5 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL; 理论板数: 三聚氰胺不低于 2000, 样品中三聚氰胺与相邻杂质峰分离度均大于 1.5, DAD 检测波长 220 ~ 800 nm, 对三聚氰胺峰进行峰纯度和相似度检测: 三聚氰胺峰纯度为 0.9999, 三聚氰胺样品峰与三聚氰胺对照峰相似度为 0.9999, 表明系统适用性良好。

3 样品前处理

称取样品约 2 g 置 50 mL 量瓶中, 加入 1% 甲酸溶液 25 mL, 涡旋 1 min, 缓慢加入乙腈, 边加边振摇, 至刻度。超声 (功率? 频率?) 10 min, 15000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 0.2 μm 滤膜过滤作为待测液。

4 溶液的配制

4.1 三聚氰胺对照品储备液 称取三聚氰胺对照品 100 mg (准确至 0.1 mg), 用水完全溶解后, 100 mL 量瓶中定容至刻度 (1.00 × 10³ mg · L⁻¹) 混匀, 4 °C 条件下避光保存, 有效期为 1 个月。

4.2 对照品溶液 (使用时配制)

4.2.1 对照品溶液 A 准确移取“4.1”项下三聚氰胺对照品储备液 20.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀, 即得 (2.00 × 10² mg · L⁻¹)。

4.2.2 对照品溶液 B 准确移取“4.2.1”项下对照品溶液 A 0.25 mL 置于 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀, 即得 (0.50 mg · L⁻¹)。

4.2.3 系列对照品溶液 按表 1 分别移取不同体积的对照品溶液 A 于量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀。按表 2 分别移取不同体积的对照品溶液 B 于量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀, 即得。

表 1 对照品系列溶液的配制 (高浓度)

Tab 1 Preparation of standard working solution (high concentration)

标准溶液 A 体积 (standare solution A volume) / mL	定容体积 (constant volume) / mL	标准工作溶液浓度 (standare working solution concentration) / mg · L ⁻¹
0.10	100	0.20
0.25	100	0.50
1.00	100	2.00
1.25	50.0	5.00
5.00	50.0	20.00
12.5	50.0	50.0

表 2 对照品系列溶液配制 (低浓度)

Tab 2 Preparation of standard working solution (low concentration)

标准溶液 A 体积 (standare solution A volume) / mL	定容体积 (constant volume) / mL	标准工作溶液浓度 (standare working solution concentration) / mg · L ⁻¹
1.00	100	0.005
2.00	100	0.01
4.00	100	0.02
20.0	100	0.10
40.0	100	0.20

5 保留时间与峰形

本方法检测三聚氰胺的典型色谱图见图 1 (浓度为 2.0 mg · L⁻¹), 由图 1 可见本方法所测三聚氰胺保留时间为 4.676 min, 峰形尖锐对称性好。

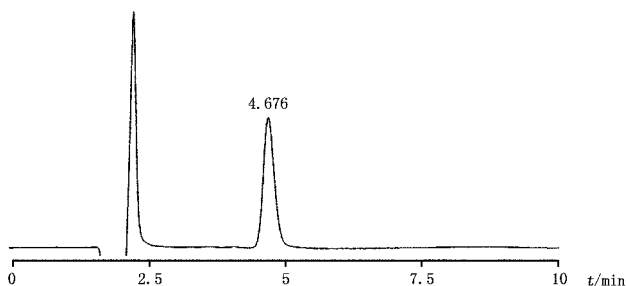


图 1 三聚氰胺典型色谱图

Fig 1 Typical chromatogram for determination of melamine

6 精密度试验

取浓度为 5.00 mg · L⁻¹ 对照品溶液, 连续进样 6 针, 保留时间与峰面积的 RSD 分别为 0.06% 和 0.33%。

可见本方法测定三聚氰胺具有很好的精密度。

7 稳定性试验

取供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 进行测定, 记录色谱峰面积。三聚氰胺色谱峰面积的 RSD 为 0.42%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定。

8 标准曲线

取表 1 中标准工作溶液 (高浓度), 分别进样, 以峰面积积分值为横坐标, 以三聚氰胺对照溶液浓度为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为:

$$Y = 1.238 \times 10^{-5} X - 5.202 \times 10^{-2} \quad r = 0.9999$$

结果表明三聚氰胺浓度在 0.20 ~ 50.00 mg · L⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

9 加样回收率

取奶粉空白样品, 分别加入不同浓度的三聚氰胺对照品溶液, 使其三聚氰胺含量分别为: 10 mg ·

L^{-1} 、 $20\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 、 $30\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 按本法测定,低、中、高 3 个浓度的平均回收率($n=3$) 分别为 100.9%, 100.0%, 100.2%。

10 检测限

利用系列对照品溶液(低浓度),找到三聚氰胺峰高为噪声的 3 倍的浓度值即为方法的检测限。该浓度值为 $0.0075\text{ mg} \cdot L^{-1}$,该方法的检测限为: $0.02\text{ mg} \cdot kg^{-1}$ (该方法定量限约为 $0.06\text{ mg} \cdot kg^{-1}$)

11 样品分析

利用本方法对含三聚氰胺的 5 批样品进行测试,并将测定结果与采用 LC-MS 测定实验结果做比较,结果表明 2 种方法含量测定结果基本一致,见表 3。

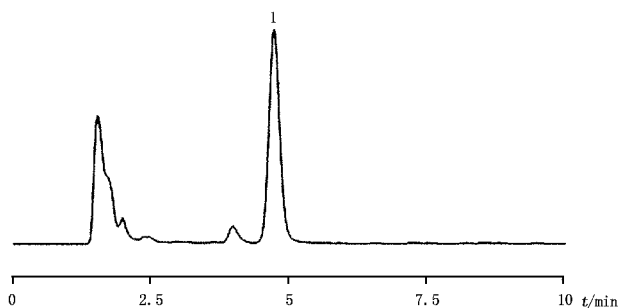


图 3 样品色谱图

Fig 3 Chromatogram of samples

1. 三聚氰胺(melamine)

表 3 样品测定结果($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Tab 3 Result of five bathes sample

编号 (No.)	批号 (Lot No)	生产日期 (production date)	MS	LC
A	SLV0301V	2007-11-9	281.7	224.696
B	SLI0202I	2008-3-2	519.1	541.040
D	SLI0201I	2008-7-15	893.2	935.078
C	SLV0402V	2008-3-6	117.8	144.237
E	B0201K	2008-3-16	401.5	409.064

12 结果与讨论

12.1 样品处理 本实验考察了水、乙腈、乙腈-水、1% 甲酸-乙腈等不同的提取溶剂;还考察了常温静置、低温静置、超声等沉淀蛋白方式。结果表明采用 1% 甲酸-乙腈(50:50, v/v) 为提取溶剂,并超声沉淀蛋白法可以得到满意的三聚氰胺回收率。

12.2 色谱条件的选择 三聚氰胺为亲水性物质,在典型反相色谱柱(如 C_{18} 和 C_8) 上有很弱的保留性质。国家标准中采用离子色谱对三聚氰胺进行分

析,在流动相中加入离子对试剂,得到很好的保留。但是离子对试剂可能影响色谱柱的保留性质,影响其他分析,并且离子对色谱不能和质谱检测器连用。本实验采用了 C_{18} 预柱($4.0\text{ mm} \times 10\text{ mm}$) + CAP-CELL PAK CR (1:4) ($3.0\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) 色谱柱,含 1% 醋酸的 $0.025\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 醋酸铵溶液-乙腈(50:50) 流动相,对奶粉中三聚氰胺进行分析。

12.3 流动相的选择 三聚氰胺为弱碱性物质,选用含有 1% (v/v) 醋酸的醋酸铵溶液有利于改善峰形。

12.4 小结 本方法检测限为: $0.2\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而定量限一般为检测限的 3 倍,即 $0.6\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 明显低于国家标准 $2\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的定量限。因此本方法适合于奶粉中三聚氰胺的含量测定,特别是大批量样品的低成本检测。

参考文献

- GB/T22388-2008, Determination of melamine in raw milk and dairy products(原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法). National Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国国家标准).
- GB/T22400-2008, Rapid determination of melamine in raw milk High performance liquid chromatography method(原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法). National Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国国家标准).
- GONG Xiao-ming(宫小明), DONG Jing(董静), SUN Jun(孙军) *et al.* Determination of melamine in vegetable materials by high performance liquid chromatography(HPLC 法测定植物性原料中三聚氰胺). *Food Sci* (食品科学) 2008, 9(4): 321
- Muniz-Valencia R, Ceballos-Magana SG, Rosales-Martinez D *et al.* Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrate by liquid chromatography application to animal feed samples. *Anal Bioanal Chem* 2008, 392(3): 523
- LI Ai-jun(李爱军), ZHANG Dai-hui(张代辉), MA Shu-min(马书民) *et al.* Determination of melamine residues in feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry(液相色谱-串联质谱法测定饲料中三聚氰胺残留). *Chin J Anal Chem* (分析化学) 2008, 36(5): 699
- RAO Qin-xiong(饶钦雄), TONG Jing(童敬), GUO Ping(郭平) *et al.* Determination of melamine in milk and milk powder by high performance capillary electrophoresis(毛细管电泳法测定牛奶和奶粉中残留的三聚氰胺). *Chin J Chromatogr* (色谱) 2008, 26(6): 755
- XU Yun(徐云), WANG Yi-ming(王一鸣), WU Jing-zhu(吴静珠) *et al.* Detecting the melamine of pure milk by near infrared spectra(用近红外光谱检测牛奶中的三聚氰胺). *J Infrared Millimeter Waves* (红外与毫米波学报) 2010, 29(1): 53

(本文于 2011 年 8 月 15 日修改回)