

液相色谱法测定奶粉中三聚氰胺的方法优化

李燕, 柴勇, 龚久平, 刘吉振*, 易志坚, 洪云菊, 高静

(农业部农产品质量安全监督检验测试中心(重庆), 重庆市农业科学院农业质量标准检测技术研究所, 重庆 400055)

摘要: 优化了反相高效液相色谱测定奶粉中三聚氰胺的方法。样品制备: 采用乙酸铅对奶粉中的蛋白质进行沉淀, 用1%的三氯乙酸代替水对阳离子交换固相萃取柱进行活化和洗涤; 色谱条件: 提高缓冲离子对试剂pH值为3.0, 增加流动相中乙腈比例。结果: 用外标法定量分析, 标准曲线的相关系数为0.9997, 平均回收率为95.8%~101.5%。证明优化后的方法具有较好的回收率和重现性, 可以准确地测定奶粉中的三聚氰胺。

关键词: 三聚氰胺; 液相色谱; 奶粉; 优化

Optimization of RP-HPLC Determination of Melamine in Milk Powder

LI Yan, CHAI Yong, GONG Jiu-ping, LIU Ji-zhen*, YI Zhi-jian, HONG Yun-ju, GAO Jing

(Chongqing Supervision and Testing Center for Agricultural Products Quality and Security, Ministry of Agriculture, Institution of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400055, China)

Abstract: The RP-HPLC method for determining melamine in milk powder has been developed. However, the differences in chromatography instrument and column performance and status may lead to the occurrence of disagreement among determination results from different labs. To enhance the accuracy, reproducibility and efficiency of melamine detection by HPLC, sample preparation and chromatographic conditions were optimized in the present study. Milk powder samples were extracted using 1% trichloroacetic acid and 2% lead acetate solution in an ultrasonic field and cleaned up on an SCX solid phase extraction column which was activated and leached using 1% trichloroacetic acid instead of water. The optimization of chromatographic conditions was achieved by increasing the ion-pairing buffer containing 10 mmol citric acid and 10 mmol heptane-1-sulfonic acid sodium salt to pH 3 and adjusting the proportion of acetonitrile in the mobile phase consisting of it and the ion-pairing buffer to 28% (V/V). The external standard method was adopted for the quantitative analysis of melamine. The correlation coefficient of linear equation was 0.9997 and the limit of detection of melamine was 0.15 mg/kg by this method. The recoveries for melamine in blank milk powder spiked at five levels were within 95.8% - 101.5%. The optimized method has high reproducibility and allows accurate detection and high recovery for melamine in milk powder.

Key words: melamine; HPLC; milk powder; optimization

中图分类号: TS207.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0227-03

三聚氰胺简称三胺, 学名三氨基三嗪, 别名蜜胺、氰尿酸胺、三聚酰胺, 分子式 $C_3N_6H_6$, 分子量126.12, 白色单斜棱晶, 毒性轻微。三聚氰胺显弱碱性, 略溶于水及乙醇, 不溶于醚、苯和四氯化碳, 与各种酸反应生成三聚氰胺盐, 在强酸或强碱液中发生水解^[1]。三聚氰胺本来是一种重要的有机化工中间产品, 主要用来制作三聚氰胺树脂, 具有优良的耐水性、耐热性、耐电弧性、优良阻燃性, 与食品、饲料行业毫不相干,

但有时被不法商人用作食品添加剂, 以提升食品中蛋白质含量指标, 而一般的“凯氏定氮法”只能测出食品的含氮量, 不能检测出由三聚氰胺带来的“假蛋白质”, 从而使含有三聚氰胺的劣质食品通过食品检验机构的测试。

大量摄入三聚氰胺后, 会损害人体和动物的生殖、泌尿系统, 产生肾、膀胱结石^[1]。2007年美国的数起饲料致死宠物的事件, 使得美国法律禁止在食品中添加

收稿日期: 2008-11-24

作者简介: 李燕(1979-), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为农产品质量检测技术标准研究与制定。

E-mail: liyan3403@163.com

* 通讯作者: 刘吉振(1979-), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为农产品质量检测技术标准研究与制定。

E-mail: nfnyljz@163.com

三聚氰胺,且美国食品应急反应中心出台《猪肉和家禽产品中三聚氰胺 LC/MS/MS 快速筛选方法》。同年6月,中国农业部颁布了《饲料中三聚氰胺的测定》(NY/T1372—2007)标准,随后也宣布禁止在食品中添加三聚氰胺。除此以外,相关文献有 GC-MS 法,LC-UV 法^[2-3],高效液相色谱法只是测定单氰胺中三聚氰胺含量^[4],相关检测机构建立的方法也很少^[5]。直到2008年9月,三鹿婴幼儿奶粉受到三聚氰胺的污染,导致婴幼儿致病,因此三聚氰胺再次成为国人的焦点。10月,国家就发布了《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》(GB/T 22388—2008)和《原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法》(GB/T22400—2008),同时各个仪器厂商和检测研究机构在网上提供了多种检测方法。本实验拟在这些标准和参考文献的基础上,利用实验室现有的条件,对奶粉中三聚氰胺的测定方法进行了优化组合。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

庚烷磺酸钠(98%) 美国 Tedia 公司;三聚氰胺标准品 Alfa Aesar 公司;阳离子交换固相萃取柱(SCX) 美国 Waters 公司;甲醇(色谱纯和分析纯)、乙腈(色谱纯和分析纯) 天津市四友精细化学品有限公司;实验用水均为超纯化水机制备;柠檬酸、乙酸铅、三氯乙酸等均为分析纯。

WARIAN 液相色谱仪[(配 Prostar 310 可变波长紫外检测器、Prostar 420 高压泵、Prostar 410 自动进样器、依利特 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6mm × 250mm)]; Heraeus 冷冻高速离心机;Branson SB3200 超声仪;DZG-303A 艾科浦实验室台式超纯化水机;Sartorius TE612-L 电子天平;雷磁 PHS-3C 精密 pH 计;KL512 型氮吹仪。

1.2 色谱条件

色谱柱:C₁₈ 柱;缓冲离子对试剂:10mmol 柠檬酸和 10 mmol 庚烷磺酸钠,用 1mmol 的氢氧化钠溶液将 pH 调到 3;流动相:乙腈-缓冲离子对试剂(28:72, V/V),检测器:UV 检测器:检测波长:240nm,流速:1.0ml/min;进样量:10 μl,柱温:40 °。

1.3 标准溶液的配制

1.3.1 三聚氰胺标准储备液

标准储备溶液:准确称取 100mg 三聚氰胺标准品于 100ml 容量瓶中,用甲醇水溶液(甲醇:水=1:1, V/V)溶解并定容至刻度,配置成浓度为 1mg/ml 的标准储备液,于 4 ° 避光保存。

1.3.2 三聚氰胺标准曲线的绘制

用流动相将三聚氰胺标准储备液逐级稀释到浓度为 0.8、2、20、40、80 μg/ml 的标准工作液,经 0.45 μm 的

水系滤膜过滤,进行 HPLC 分析,浓度由低到高进样检测,以峰面积-浓度作图,得到标准曲线的回归方程见图 1。

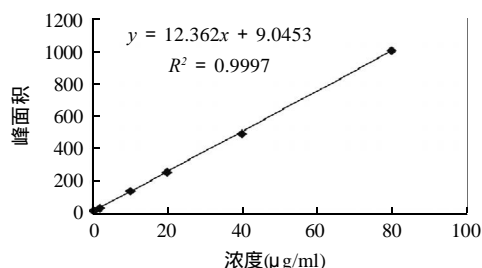


图1 标准曲线

Fig.1 Standard curve for determining melamine by the RP-HPLC method developed

1.4 奶粉样品的测定

称取样品 2.0g(准确至 0.01g)于 100ml 的具塞离心管中,准确加入 50ml 1% 三氯乙酸提取液,充分混匀,加入 2ml 2% 乙酸铅溶液,超声提取 20min 后静置 2min,然后取上层液约 30ml 部分溶液转移至 10ml 离心管中,10000r/min 离心 5min,取上清液进行抽滤。取滤液 6ml 分次过预先经 3ml 甲醇和 3ml 1% 三氯乙酸活化过的 SCX 小柱,再用 3ml 甲醇和 3ml 1% 三氯乙酸洗涤固相萃取柱,抽干后用 6ml 氨化甲醇洗脱,洗脱液于 50 ° 氮气吹干。准确加入 1ml 流动相溶液,漩涡振荡 1min,过 0.45 μm 水系滤膜上机测定。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 缓冲离子对试剂的 pH 值优化

由 10mmol 柠檬酸与 10mmol 庚烷磺酸钠直接配制出的缓冲离子对试剂, pH 值一般小于 3,如果按照国标饲料方法做,即流动相为乙腈-缓冲离子对试剂=(10:90, V/V),在 80min 内没有出峰。根据国标 GB/T 22388—2008,将缓冲离子对试剂的 pH 值用 1mmol 的氢氧化钠溶液调节至 3.0,保留时间为 48.152min。说明提高缓冲离子对试剂的 pH 值,有利于保留时间的提前。

2.1.2 流动相比比例优化

虽然缓冲离子对试剂在 pH 值为 3.0 时,50min 内能出峰,但时间还是太长,逐步提高乙腈比例,到乙腈-缓冲离子对试剂(32:68, V/V)时,保留时间提前到 4.776min。但加标样品的目标峰与后面的小杂峰不能完全分开,于是又逐渐减少乙腈比例,到乙腈-缓冲离子对试剂(28:72, V/V)时,目标峰和杂质峰刚好分开,此时 2 μg/ml 标准液的保留时间为 8.285min。

2.2 样品前处理的优化

2.2.1 提取

根据 GB/T 22388—2008 和 NY/T 1372—2007 标准, 比较用乙酸铅和乙腈沉淀蛋白质的效果。结果表明: 用乙酸铅比用乙腈提取的回收率平均高 3.25%; 如果将离心后的溶液直接拿来过 SCX 小柱, 过柱速度越来越慢, 无法达到均速的 1ml/min, 但若将离心后的上清液先进行真空抽滤后(0.45 μ m 水系膜)再过 SCX 小柱, 此时过柱速度比较均匀, 基本上能保持 1ml/min。

2.2.2 净化

活化小柱时, 用 3ml 1% 三氯乙酸比用 3ml 水的效果要好, 因为用 1% 三氯乙酸能保证小柱处于 pH 4 的环境下。待净化液刚过完 SCX 小柱后, 立即用 3ml 1% 三氯乙酸和 3ml 甲醇洗涤 SCX 小柱, 因为经过一定 pH 值的缓冲溶液和有机溶剂两种不同溶液的洗涤后, 样品更干净, 减少了杂质干扰, 提高了检测的灵敏度。洗涤过的 SCX 小柱一定要充分抽干, 否则残留的水在氮吹时不易完全吹干。将 6ml 的氮化甲醇分次加入充分抽干的 SCX 小柱, 如 3ml \times 2 或 2ml \times 3 次; 收集的洗脱液必须充分氮吹干, 否则, 残留的溶液易导致 HPLC 测定时三聚氰胺出现双头峰。注意过膜时不得使用醋酸纤维素膜。

2.3 线性范围和检出限

将配制的系列标准溶液, 按照给定色谱条件实验, 以峰面积(Y)对各组分浓度(X)求回归方程, 方程见图 1, 相关系数为 0.9997。以 3 倍信噪比计算最低检测浓度, 根据进样量 10 μ l, 根据仪器的信噪比的 3 倍可求得最低检测限为 0.15mg/kg。

2.4 加标回收率和精密度

表 1 加标回收率及精密度实验结果

Table 1 Recoveries for melamine in blank milk powder spiked at five levels

编号	本底值 (μ g/ml)	加入量 (μ g/ml)	测得量 (μ g/ml)	回收率 (%)	标准偏差 (%)
1	未检出	2.00	1.92	95.8	3.6
2	未检出	4.00	3.85	96.4	2.3
3	未检出	6.00	5.90	98.3	2.7
4	未检出	8.00	8.12	101.5	2.2
5	未检出	10.0	9.92	99.2	1.5

准确称取阴性对照奶粉 2.0g, 添加三聚氰胺标准贮备液制成 5 个不同浓度的样品, 每个浓度做 3 个平行, 进行测定。回收率精密度结果见表 1。

2.5 样品测定结果

样品奶粉色谱图如图 2 所示, 所测得的奶粉中三聚氰胺的浓度含量为 9.87 μ g/ml。

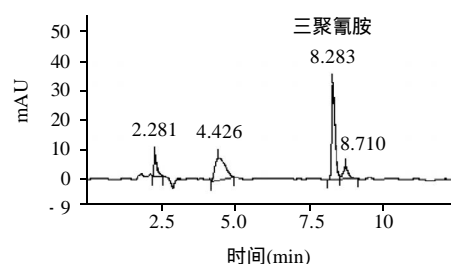


图 2 样品色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of milk powder sample

3 结 论

目前, 测定乳制品和饲料中三聚氰胺的方法很多, 但由于不同检测机构的液相色谱仪、色谱柱性能和状态的差异, 标准和资料所提供方法并不一定是每个检测机构最理想的方法。本实验在参考标准和资料基础上, 根据实验室现有条件, 对色谱条件和样品制备进行适当的优化, 提高了本实验室测定奶粉中三聚氰胺的准确性、重现性和高效性。

参考文献:

- [1] 北京化学试剂公司. 化学试剂·精细化学品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 712.
- [2] TOTH J P, BARDALAYE P C. The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography[J]. Chromatogr, 1987, 408: 335-340.
- [3] YOKLEY R A, MAYER L C, REZAAIYAN R. Analytical method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using LC-UV and GC-MSD[J]. Agric Food Chem, 2000, 48: 3353-3358.
- [4] 吴明礼, 陈彩虹. 高效液相色谱法测定单氰胺中三聚氰胺的含量[J]. 宁夏石油化工, 2005, 24(2): 24-26.
- [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.