

原料乳及乳制品中三聚氰胺的快速测定

高平¹, 胡琼予¹, 黄国方¹, 黄春丽², 刘文侠¹, 李志清¹
(1. 广东省湛江市质量计量监督检测所, 广东 湛江 524043;
2. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524025)

[摘要]建立了一种快速测定原料乳及乳制品中三聚氰胺的高效液相色谱方法。样品中的三聚氰胺经三氯乙酸-甲醇-水混合溶液超声提取, 离心过滤后进行 HPLC 测定。三聚氰胺浓度在 0.2~100.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈现良好的线性关系, 相关系数 $R^2=0.9999$ 。三聚氰胺的平均回收率为 96.0%~102.8%, 相对标准偏差为 1.9%~7.3%, 该方法的检出限为 1.0 mg/kg。

[关键词]原料乳; 乳制品; 三聚氰胺; 快速测定
[中图分类号]TQ [文献标识码]A

[文章编号]1007-1865(2011)05-0213-02

A Rapid Method for Determination of Melamine in Raw Milk and Dairy Products

Gao Ping¹, Hu Qiongyu¹, Huang Guofang¹, Huang Chunli², Liu Wenxia¹, Li Zhiqing¹
(1. Zhanjiang Institute of Supervision & Test on Quality & Measure, Zhanjiang 524043;
2. College of Science Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: A method for the rapid determination of melamine in raw milk and dairy products by HPLC was proposed. The samples were ready for determination by HPLC after the extracts were centrifugalized and filtered. The calibration curves showed good linearity in the range of 0.2~100.0 $\mu\text{g/mL}$ for melamine. The correlation coefficient was 0.9999. The average recoveries of the method varied from 96.0% to 102.8%. The relative standard deviations were 3.9%~7.1%. The detection limit of melamine was 1.0 mg/kg.

Keywords: raw milk; dairy products; melamine; rapid determination

三聚氰胺因含氮量高(约 66.7%)且无异味, 价格低廉, 用传统的凯氏定氮法无法区别是对动物机体有益的蛋白氮还是不能被利用的非蛋白氮。2008 年 9 月, 我国乳制品中发现三聚氰胺并导致婴幼儿泌尿系统结石甚至死亡。原料乳及乳制品中添加三聚氰胺冒充增加蛋白质含量的问题已成为社会热点。

目前有关三聚氰胺的检测方法有高效液相色谱法^[1,2,4], 气相色谱质谱法^[2-4]、液相色谱质谱法^[3-4]等。这些报道主要涉及食品、乳制品、饲料中三聚氰胺的分析方法, 大多采用酸溶液或有机溶剂水溶液提取, 过阳离子固相萃取柱净化后上机分析。这些方法操作过程复杂, 耗时长, 成本高。文章研究了 HPLC 法测定原料乳与乳制品中三聚氰胺的快速测定方法。该方法检测快速准确, 成本低, 回收率高且稳定, 重现性好, 非常适合质检部门及企业对大量样品中三聚氰胺的快速筛选与监控。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, 漩涡混合器, 超声波清洗器, 高速冷冻离心机。

三聚氰胺标准品, aldrich 公司产品, 含量 99%; 乙腈 HPLC 级; 庚烷磺酸钠, 国药集团化学试剂有限公司产品; 其他试剂均为国产色谱纯或分析纯。

实验试样: 原料乳、纯牛奶、酸牛奶、奶粉均由广东湛江燕塘乳业有限公司提供, 奶酪、奶油、奶糖、巧克力均购自湛江某大型超市。

1.2 色谱条件

色谱柱为 DIKMA C₁₈(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm); 流动相为乙腈: 离子对试剂溶液(2.02 g 庚烷磺酸钠和 2.10 g 柠檬酸定容至 1000 mL)=8: 92(V: V), 流速为 1.2 L/min, 检测波长为 240 nm, 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20 μL 。

1.3 样品前处理

称取 2.5 g(精确至 0.01 g)试样于 25 mL 比色管内, 加入 7.5 mL 热水(水温约 70~75 $^{\circ}\text{C}$)溶解, 漩涡振荡依次加入 10 g/L 三氯乙酸 2.5 mL、甲醇 10 mL, 超声 20 min, 冷却定容至刻度(奶油等高脂肪含量样品需超声冷却后小心移除最上层脂肪后再定容)。9000 r/min 离心 5 min。上清液过 0.2 μm 有机滤膜供 HPLC 测定。

1.4 样品加标回收率试验

分别选取原料乳、纯牛奶、酸牛奶、奶粉、奶酪、奶油、奶糖、巧克力作为空白样品。样品中分别添加 2.0 mg/kg、10.0

mg/kg、100.0 mg/kg 3 个浓度水平的三聚氰胺标准溶液, 于室温下静置 20 min 后按照 1.3 前处理方法处理样品, 上机测定样品中三聚氰胺的含量并计算加标回收率。每个浓度水平做 5 个平行试验, 计算相对标准偏差(RSD)。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

参考 NY/T 1372-2007 的方法^[2], 选用庚烷磺酸钠作为离子对试剂, 采用乙腈-庚烷磺酸钠溶液作为流动相。当乙腈-庚烷磺酸钠溶液比例为 10: 90(V: V), 可以得到较好的峰形和适当的保留时间, 但在检测某些基质复杂的样品如奶粉、巧克力等时出现过杂质与待测物不能完全分离或假阳性现象。为保证检测结果的准确与快速, 以及色谱图有较好的峰型, 最终确定以乙腈-庚烷磺酸钠溶液=8: 92(V: V)作为流动相, 流速为 1.2 mL/min。经过近 300 份复杂基质样品的检验表明, 该条件下未出现假阳性现象。检出的阳性样品均与 LC-MS/MS 定性确认保持一致。

2.2 提取溶剂的选择

三聚氰胺易溶于甲醇等极性溶剂中, 故可采用甲醇-水溶液、乙腈-水溶液等提取。同时, 三聚氰胺与酸反应生成三聚氰胺盐, 而且酸性条件下有利于蛋白质的变性, 故也可采用酸性溶液提取。试验分别比较了以甲醇-水溶液(1: 1, V: V)、乙腈-水溶液(1: 1, V: V)、冰乙酸溶液(10 g/L)、三氯乙酸溶液(10 g/L)、10 g/L 三氯乙酸-甲醇-水溶液(1: 4: 5, V: V: V)为提取溶剂, 在空白奶粉试样中分别添加 20.0 mg/kg 水平的三聚氰胺, 超声提取后进样分析测定计算回收率并比较不同提取溶剂的提取效果。研究发现, 在漩涡条件下依次加入热水-三氯乙酸-甲醇提取三聚氰胺, 有利于三聚氰胺的提取, 也更有利于干扰杂质的去除, 可能是在该条件下更有利于干扰杂质的沉淀。经过大量的实际样品分析发现, 该提取条件下对三聚氰胺提取效果好, 快速方便, 离心液澄清, 过滤方便, 杂质干扰少。

2.3 方法的线性范围及相关性

在 1.2 色谱条件下, 用提取液配成 0.2、1.0、2.0、10.0、20.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的三聚氰胺标准工作溶液进样分析。以质量浓度(X)为横坐标, 以峰面积(Y)为纵坐标, 建立回归直线方程。结果表明, 三聚氰胺浓度在 0.2~100.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈现良好的线性关系, 线性方程为 $Y=68296X+10651$, 相关系数 $R^2=0.9999$ 。三聚氰胺标准溶液色谱图见图 1。奶粉中三聚氰胺空白色谱图及加标色谱图分别见图 2 和图 3。

[收稿日期] 2011-03-02

[作者简介] 高平(1981-), 男, 湖北人, 硕士, 主要从事食品中有毒有害物质检测分析工作。

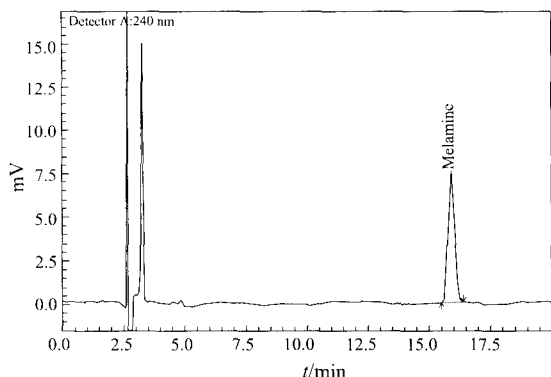


图1 三聚氰胺标准液相色谱图

Fig.1 Chromatogram of the standard substance of Melamine by HPLC

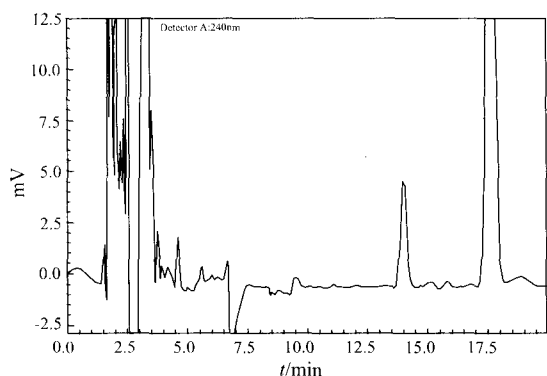


图2 空白奶粉样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of the blank milk powder sample

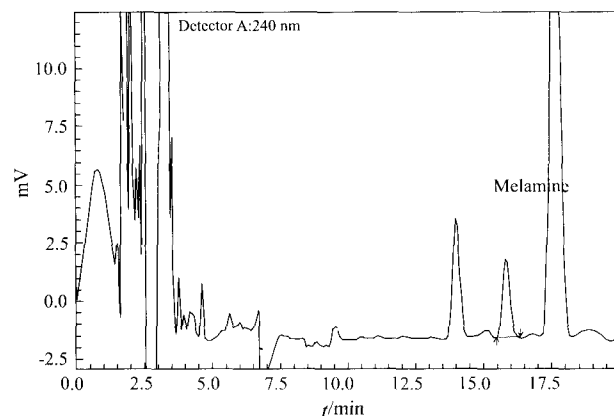


图3 空白奶粉加标色谱图

Fig.3 Chromatogram of the spiked milk powder sample

2.4 加标回收率、精密度及方法检出限

三聚氰胺加标回收率及相对标准偏差(RSD)结果见表1。结果表明,三聚氰胺的加标浓度为2.0、10.0、100.0 mg/kg时,平均回收率为96.0 %~102.8 %,相对标准偏差为1.9 %~7.3 %。以3倍信噪比计算^[1],该方法的检出限为1.0 mg/kg。满足我国卫生部等5部委公布的《乳制品及含乳食品中三聚氰胺临时管理限量值》中的规定。

3 结论

文章建立了反相离子对高效液相色谱法检测原料乳与乳制品中三聚氰胺含量的方法。该方法前处理步骤简单,方法灵敏快速准确可靠,回收率高且重现性好。与国标GB/T22388-2008^[4]相比,大大缩短了分析全过程时间,降低检测成本,提高检测效率与准确性。该方法适合于大量样品中三聚氰胺的快速检测与监控。

表1 样品中三聚氰胺加标回收率与精密度(n=5)
Tab.1 Recovery rates and precisions of the spiked samples (n=5)

试样名称	加标浓度/(mg·kg ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%	试样名称	加标浓度/(mg·kg ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
原料乳	2.0	98.9	4.3	奶酪	2.0	96.0	4.9
	10.0	99.3	2.1		10.0	98.7	5.0
	100.0	100.1	1.9		100.0	100.3	4.1
纯牛奶	2.0	96.5	7.3	奶糖	2.0	97.1	6.9
	10.0	98.9	4.2		10.0	99.8	5.1
	100.0	102.4	4.0		100.0	102.1	2.8
酸牛奶	2.0	99.4	7.2	奶油	2.0	99.7	6.0
	10.0	102.8	4.5		10.0	103.4	4.3
	100.0	97.9	3.9		100.0	100.8	3.7
奶粉	2.0	96.3	6.1	巧克力	2.0	96.7	5.8
	10.0	99.5	4.2		10.0	98.5	4.6
	100.0	98.7	3.8		100.0	99.5	4.1

参考文献

- [1]杨云霞,刘彤,周桂英,等.小麦谷元粉中三聚氰胺的高效液相色谱法测定[J].分析测试学报,2008,27(3):322-324.
- [2]中华人民共和国农业部.NY/T 1372-2007 饲料中三聚氰胺的测定[S].2007.
- [3]刘梅,李金强,田德金,等.固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测食品

中的三聚氰胺[J].化学分析计量,2008,17(2):48-50.

- [4]国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会.GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].2008.

(本文文献格式:高平,胡琼予,黄国方,等.原料乳及乳制品中三聚氰胺的快速测定[J].广东化工,2011,38(5):213-214)

《广东化工》征稿启事

《广东化工》创刊于1974年,是广东省唯一省级化工综合性科技期刊,月刊,每月25日出版,全国发行。刊号为:CN 44-1238/TQ,ISSN 1007-1865。欢迎投稿!

投稿方式:

方式1 在线投稿:登录 www.gdchem.com 《广东化工》杂志网在线投稿;

方式2 邮箱投稿:gdcc200@163.com; 邮件主题:作者名/单位/文章题目。