

原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法

Rapid Determination of Melamine in Raw Milk High Performance Liquid Chromatography Method

郑清林 张 瑞

(北京普析通用仪器有限责任公司,
北京 101200)

摘 要: 参照国标GB/T《原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法-草案》用乙腈作为原料乳中的蛋白质沉淀剂和三聚氰胺提取剂, 高效液相色谱-强阳离子交换柱分离, 紫外检测器检测, 外标法定量。标准工作曲线、实际样品加标回收率、重复性和再现性均满足国标草案的要求。

关键词: 三聚氰胺 快速检测 液相色谱

Abstract: According to GB/T《Rapid determination of melamine in raw milk High performance liquid chromatography method-DRAFT》, we deposited protein and distilled melamine in raw milk sample by using acetonitrile, separated melamine by strong cation exchange column, determined by UV-detector, and then we have accurately analyzed melamine in raw milk. The validation data shows that the recovery rate of samples, the repetitiveness and reproducibility are content with the requirement of《GB/T Rapid determination of melamine in raw milk high performance liquid chromatography method-DRAFT》.

Key words: Melamine Rapid determination HPLC

1 引言

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, 简称三胺, 俗称蜜胺、蛋白精。其含氮量高达66.7%。过去, 对奶制品的质控标准中, 仅用了凯氏氮, 有些不法厂家却钻了空子, 人为地添加三聚氰胺, 用以提高氮的含量。1994年国际化学品安全规划署和欧洲联盟委员会合编的《国际化学品安全手册》第三卷和国际化学品安全卡片中就指出: 长期或反复大量摄入三聚氰胺可能对肾与膀胱产生影响, 导致产生结石。三聚氰胺一旦进入人体后, 会发生取代反应(水解), 生成三聚氰酸。三聚氰酸和三聚氰胺形成大的网状结构, 会造成结石, 从而出现了婴儿食用掺有三聚氰胺牛奶的中毒事件。

为此, 我国组织各方力量, 起草了原料乳中三聚氰胺的新标准, 确定了原料乳中三聚氰胺的限量。与此相配合, 由中国计量科学研究院牵头, 起草GB/T《原料乳中三聚氰胺快速检测-液相色谱法》(以下简称国标), 在起草制定过程中, 北京普析通用仪器有限责任公司参与了国标起草的验证试验。采用公司自行研发的L-6型高效液相色谱仪, 圆满地完成了国标起草验证中安排的实验, 测试结果符合要求。

2 实验准备

2.1 仪器及设备

液相色谱: L-6型高效液相色谱, 北京普析通用仪器有限责任公司;

超纯水机: HUMAN纯水机, 北京普析通用仪器有限责任公司;

分析天平: 梅特勒-托利多分析天平;

针式过滤器。

2.2 试剂

去离子水: GB/T 6682规定的一级水;

乙腈(CH_3CN): 色谱纯;

磷酸(H_3PO_4): 分析纯;

磷酸二氢钾(KH_2PO_4): 分析纯;

三聚氰胺标准物质($\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$): 纯度大于或等于99%, 由中国计量科学研究院提供。

2.3 色谱条件

色谱柱: Thermo-SCX, 250 mm×4.6 mm, 5 μm ;

流动相: 磷酸盐缓冲溶液(0.05mol/L pH=3.0): 乙腈=70:30;

流速: 1.0mL/min;

柱温: 室温;

检测器: 紫外检测器;

检测波长: 240 nm;

进样量: 20 μL ;

进样方式: 手动。

3 实验方法

3.1 试样的制备

称取混合均匀的15g原料乳样品(准确至0.01g), 置于50.0 mL容量瓶或具塞刻度试管中, 加入30 mL乙腈, 剧烈振荡6min, 加水定容至满刻度, 充分混匀后静置3min, 用一次性注射器吸取上清液用针式过滤器过滤后, 作为高效液相色谱分析用试样。

3.2 标准溶液的配制

3.2.1 三聚氰胺标准储备溶液的配制

称取100.45mg三聚氰胺标准物质, 用水完全溶解后, 100mL容量瓶中定容至刻度, 混匀, 4℃条件下避光保存, 作为1004.5mg/L的三聚氰胺标准储备溶液。

3.2.2 标准工作曲线溶液的配制

依照国标, 按分析需求分别配制0.10045mg/L、0.20090mg/L、0.50225mg/L、2.009mg/L、10.045mg/L、50.2259mg/L的系列标准工作曲线溶液。

3.3 加标样品的制备

分别精密称取混合均匀的原料乳样品M克:

$M=1000-x$

式中:

x为需要加入的三聚氰胺标准储备液体积, 单位为mL。

分别精确加入三聚氰胺标准储备液50 mL、20mL、2mL、1mL、0.5mL、0.3mL, 作为加标样品G-1、G-2、G-3、G-4、G-5、G-6, 摇匀备用。

4 实验结果

4.1 标准工作曲线

以浓度为0.10045mg/L、0.20090mg/L、0.50225mg/L、2.009mg/L、10.045mg/L、50.2259mg/L的系列标准工作溶液分别进样, 得到系列响应值, 绘制标准工作曲线。标准工作曲线浓度—响应值表如表1所示, 工作曲线如图1所示, 标准工作曲线溶液图谱如图2所示。

表1 标准工作曲线溶液的浓度—响应值表

浓度 (mg/L)	0.10045	0.2009	0.50255	2.009	10.045	50.225
响应值	6537.6	12922.7	33816.4	136869.9	581868.0	2992660.0

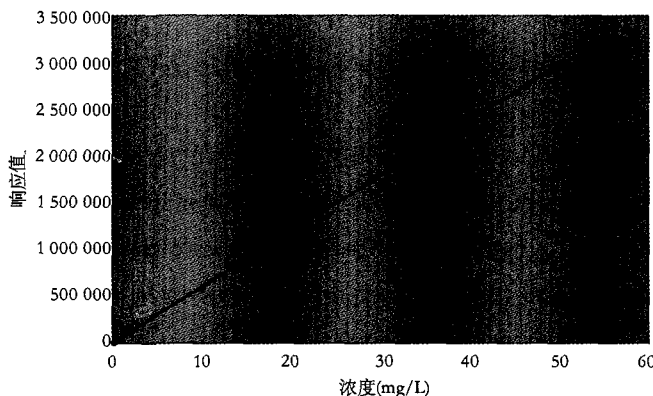


图1 三聚氰胺标准工作曲线

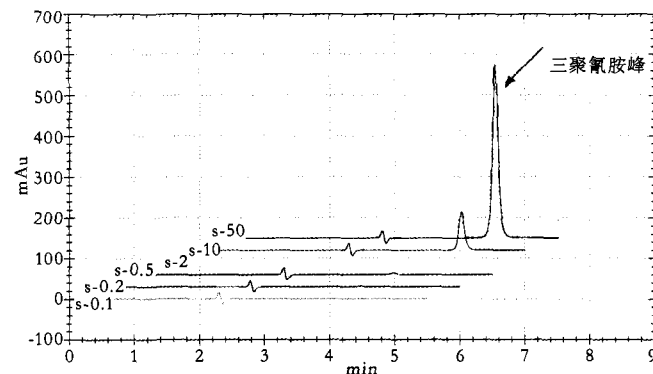


图2 标准工作曲线溶液图谱

标准工作曲线方程: $y=59487.08x+2009.49$; 线性相关系数: $R=0.99992$ 。

由以上数据得出, 标准工作曲线线性相关系数在0.999以上, 满足国标要求。

4.2 加标样品的回收率

分别对加标0.3mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、20mg/kg、50mg/kg的样品进行分析, 依照标准工作曲线得出测得值, 计算回收率如表2所示。

表2 样品加标回收率

样品	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	G-6	质控1	质控2
理论加标量 (mg/kg)	50.225	20.09	2.009	1.0045	0.50225	0.30135	65.6	1.00
实际测得值 (mg/L)	49.7	19.90	2.00	0.999	0.497	0.300	65.5	0.997
回收率(%)	98.9	99.0	99.6	99.4	99.2	99.6	—*	—*

*注: 表中质控样品为经过多家单位的HPLC、LC-MS、GC-MS分析, 已知准确浓度的含三聚氰胺牛奶样品, 由中国计量院提供。

由以上数据可知, 实际样品加标回收率在98.9%~99.6%之间, 满足国标要求。

4.3 重复性与精密度

取加标0.3mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、10mg/kg、50mg/kg的样品各3份, 按3.1步骤进行试样的制备并进样分析, 得出重复性与精密度数据, 如表3所示, 实际加标样品测试图谱如图3所示。

表3 加标样品的重复性及精密度数据

mg/kg	样品	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	G-6	质控1	质控2
平行-1		49.8	19.99	2.02	0.993	0.496	0.302	65.6	1.01
平行-2		49.8	19.88	1.99	0.995	0.499	0.296	66.0	0.994
平行-3		49.5	19.83	1.98	1.01	0.496	0.302	65.9	0.997
平均值		49.7	19.90	2.00	0.999	0.497	0.300	65.8	1.00
相对标准偏差(%)		0.35	0.41	1.04	0.93	0.35	1.15	0.32	0.85
重复性限及再现性限*		符合	符合	符合	符合	符合	符合	符合	符合

*注: 表中的重复性限(r)和再现性限(R)检查参照GB/T22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法-液相色谱法》。

由实验数据可知, 整个分析过程的各样品3次平行测定的相对标准偏差均小于1.2%, 满足国标测试要求。

5 结束语

采用本方法能够快速测定原料乳中三聚氰胺含

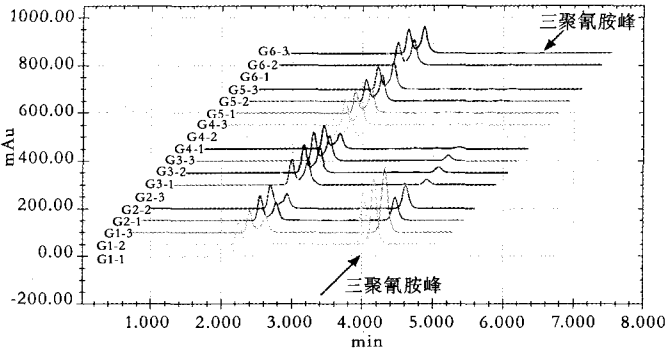


图3 实际加标样品测试图谱

量, 其中单个样品分析时间仅为15min, 分析过程快速, 在重复性、再现性、加标回收率等指标上均能符合国标草案的要求。结果准确可靠, 可及时地为检测检验部门提供数据, 保障人民的食品安全。

(1) 在实际分析中, 采用50.0mL容量瓶比50mL刻度试管具有更好的测试结果精密度, 震荡时可以采用超声震荡混匀。

(2) 使用不同厂家或型号的强阳离子交换色谱柱, 其三聚氰胺保留时间有较大差异, 应对色谱条件进行优化。

(3) 污染和残留对低浓度样品的测试影响较大, 采用手动进样分析未知浓度样品时, 一定注意严格防止交叉污染。并在出现高浓度样品后及时清洗处理进样针和色谱系统内的残留。

参考文献

1 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB/T22388-2008原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法-液相色谱法. 2008,10,07.

2 中国科学计量研究院. GB/T原料乳中三聚氰胺快速检测-液相色谱法草案稿、送审稿.

3 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会.GB/T16631-2008高效液相色谱法通则. 2008, 06,18.

作者简介: 郑清林, 北京普析通用仪器有限责任公司分析中心主任, 主要从事分析仪器应用技术研究及分析方法开发, 曾成功主持申报铜、锌、钙、镁、铁溶液成分分析用国家标准物质。