

【化学测定方法】

固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中的三聚氰胺

肖珺, 肖志雯, 丁宇, 劳宝法

(上海市卢湾区疾病预防控制中心, 上海 200023)

[摘要] 目的:建立用固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中三聚氰胺的高效液相色谱法。方法:水产品中的三聚氰胺经阳离子交换固相萃取柱净化后,采用 Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm)分离,以庚烷磺酸钠-柠檬酸缓冲液:乙腈(85:15)为流动相,由高效液相色谱-紫外检测器分析测定。结果:该方法在 10~100 μg/ml的范围内具有良好的线性关系($r=0.9993$);加标回收率为 80.1%~88.9%;RSD 为 2.1%~5.0%;方法检出限为 1.6 mg/kg。结论:该方法操作简便快捷、净化富集效果好、重现性较高,能满足实际样品的日常检测需求。

[关键词] 三聚氰胺; 水产品; 高效液相色谱法; 阳离子交换固相萃取

[中图分类号] O657.7⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2009)12-2793-02

Determination of melamine in aquatic products by SPE - HPLC

XIAO Jun, XIAO Zhiwen, DING Yu, LAO Bao-fa

(Luwan Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a SPE - HPLC method for the determination of melamine in aquatic products. **Methods:** Melamine in aquatic products was cleaned - up by SPE column, then separated by Kromasil C₁₈ column (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) with ultraviolet detection. The mobile phase consisted of sodium heptanesulfonate - citric acid buffer solution: acetonitrile (85:15). **Results:** The linear ranges were 10~100 μg/ml ($r=0.9993$), the recoveries were in the range of 80.1%~88.9%, the relative standard deviations were 2.1%~6.1%, and the determination limit was 1.6 mg/kg. **Conclusion:** This method is of good reproducibility and simple operation and it could be applied to the determination of the aquatic products.

[Key words] Melamine; Aquatic products; SPE - HPLC

三聚氰胺是一种重要的氮杂环有机化工原料,禁止使用于食品和动物饲料中。由于其分子结构中含有大量的氮元素,普通全氮测定法在检测蛋白质含量时不能排除这类伪蛋白氮的干扰,从而使得一些不法厂商为降低成本而违禁添加这种化工原料,以提高产品中粗蛋白的含量来获取利润,损害了消费者的健康和利益。2008年9月,“三鹿婴幼儿奶粉事件”的爆发一度引起了人们对三聚氰胺的高度关注。

美国食品药品管理局经调查研究发现,受三聚氰胺污染的饲料已经被用于喂养人所食用的动物^[1,2],且尚不明确是否用于喂养鱼、虾等水产品。目前,国家已迅速出台了乳制品中三聚氰胺的标准检测方法^[3],但对于动物组织中三聚氰胺的测定还没有建立相应的标准。本文拟采用阳离子固相萃取和高效液相色谱-紫外检测器法来测定水产品中三聚氰胺的含量,以期通过系列实验探讨、总结,从而建立一种适合于水产品中三聚氰胺含量的分析方法。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

1.1.1 仪器 HP1100高效液相色谱仪-紫外检测器;电子分析天平;高速离心机;超声波水浴;固相萃取装置;氮气吹干

[作者简介] 肖珺(1976-),女,主管技师,主要从事食品理化分析工作。

仪;涡旋混合器。

1.1.2 试剂 离子对试剂缓冲液:准确称取 2.10 g 柠檬酸和 2.16 g 庚烷磺酸钠,加入约 980 ml 水溶解,调节 pH 至 3.0 后,定容至 1 L 备用。色谱纯试剂:甲醇、乙腈;分析纯试剂:柠檬酸、三氯乙酸、乙酸锌、氨水;三聚氰胺标准品: CFAA - A11295 - 5G, 纯度大于 99.0%。实验用超纯水。

1.1.3 材料 混合型阳离子交换固相萃取柱 AnpelcleanTM MCX (60 mg, 3 ml); 定性滤纸; 微孔滤膜: 0.2 μm, 有机相; 氮气: 纯度大于等于 99.999%。

1.2 标准溶液配制

1.2.1 标准储备液 准确称取 100 mg (精确到 0.1 mg) 三聚氰胺标准品于 100 ml 容量瓶中,用甲醇水 (50%) 溶液溶解并定容至刻度,配制成浓度为 1 mg/ml 的标准储备液,于 4 避光保存。

1.3 样品前处理

1.3.1 取水产品可食部分用搅碎机搅成匀浆,称取 2 g 左右试样加入到 50 ml 钻塞塑料离心管中,加入 2% 的三氯乙酸溶液 10 ml、乙腈 5 ml, 振荡混匀后超声提取 30 min, 放入离心机中以 5000 r/min 离心 12 min。上清液经三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤后,用三氯乙酸溶液定容至 25 ml, 移取 5 ml 滤液, 加 5 ml 水混匀后以待净化。

1.3.2 先用 3 ml 甲醇、5 ml 水依次活化固相萃取小柱,然后将 10 ml 样液分次转移上柱,待上样液全部完成后,再依次用

3 mL水和3 mL甲醇淋洗近干。最后用6 mL氯化甲醇溶液(5:95)洗脱,收集洗脱液于40 mL氮气吹干,用2.0 mL流动相溶解后过0.2 μm滤膜,滤液用于高效液相色谱仪测定。

1.4 色谱分析条件

色谱柱为Kromasil C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:庚烷磺酸钠-柠檬酸(10 mmol/L)缓冲液:乙腈混合溶液(85:15,体积比);检测波长为240 nm;柱温40 °C;流速1.0 mL/min,进样量20 μL,以保留时间定性,色谱峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 样品提取液的优化选择

三聚氰胺分子结构中带有氨基,呈弱碱性,在酸溶液中有较好的溶解性,但在强酸中却有不同程度的水解^[4]。针对其特点,本次试验分别选用了1%三氯乙酸-乙腈、1%三氯乙酸-10%乙酸锌和2%三氯乙酸-乙腈这三种混合溶液作为提取液,在几种不同水产品中添加40 μg/mL的三聚氰胺标准品,通过测定回收率来比较不同提取液的提取效率(结果见表1)。从表1的结果可以看到用2%三氯乙酸-乙腈提取时能更好的促进蛋白变性、沉淀,提取效率略高于前两种,且适合于不同基质的多种组分。因此,实验最终采用2%三氯乙酸-乙腈溶液作为提取溶剂。

表1 不同提取液的提取效果

提取液	提取效率(%)			
	鱼	虾仁	大闸蟹	黄鳝
1%三氯乙酸-乙腈	63.2	85.2	61.7	71.5
1%三氯乙酸-乙酸锌	79.6	86.1	76.7	81.6
2%三氯乙酸-乙腈	86.5	86.3	81.3	84.7

2.2 固相萃取过程的控制

固相萃取的目的是为了净化、富集目标化合物,所以整个上样-吸附-洗脱过程中的流速及洗脱液的总量控制对于结果的准确性和重现性至关重要。实验就不同的萃取流速和洗脱液体积做了多次试验,发现当流速控制在60 d/min内、洗脱液用量大于6 mL时,即可得到较好的回收率和重现性。

2.3 色谱条件的优化选择

三聚氰胺的极性很强,在C₁₈柱上用常规的洗脱体系不易保留,本文采用乙腈:(10 mmol/L庚烷磺酸钠-柠檬酸缓冲液)15:85作为流动相,获得了较好的分离效果和峰形,且延长了出峰时间,结果见图1。

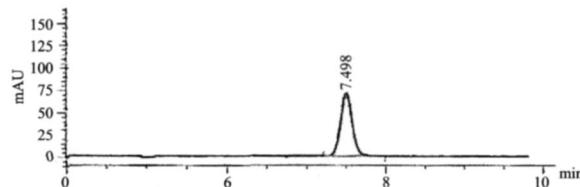


图1 三聚氰胺标准色谱图

2.4 工作曲线和最低检出限

将1 mg/mL的三聚氰胺标准储备液用流动相分别稀释成10、20、40、80、100 μg/mL的标准工作溶液,按浓度由低到高进样测定,求得标准曲线回归方程Y = 66.67073x + 49.63997,相关系数 $r^2 = 0.9993$ 。结果表明三聚氰胺在10~100 μg/mL的浓度范围内其峰面积(Y)与三聚氰胺浓度(X)呈良好的线性关系。按3倍的信噪比得出方法检出限为1.6 mg/kg。

2.5 回收率与精密度实验

选择鱼、虾、蟹等不同种类水产品为基体,分别添加20、40、80 μg/mL浓度的三聚氰胺标准,每个浓度水平重复测定6次,求得加标回收率及精密度,结果见表2。

表2 添加回收率和相对标准偏差(RSD)(n=6)

样品	试样中三聚氰胺的含量	添加浓度(20 μg/mL)		添加浓度(40 μg/mL)		添加浓度(80 μg/mL)	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
银鱼	未检出	82.3	3.2	85.2	4.1	86.4	2.9
青鱼	未检出	81.1	5.0	82.3	3.8	82.1	3.9
昂刺鱼	未检出	83.6	2.7	84.3	4.5	84.8	4.9
鲫鱼	未检出	84.5	4.3	86.5	3.2	87.2	1.9
金枪鱼	未检出	82.4	2.1	85.5	3.2	87.3	2.7
黄鳝	未检出	84.3	3.1	84.7	3.9	86.6	2.9
大闸蟹	未检出	80.1	4.7	80.3	4.7	80.7	3.6
青虾仁	未检出	84.5	3.5	86.3	3.2	88.9	2.6

3 结论

通过多次试验验证,根据三聚氰胺的化学特性选择相应的提取液及阳离子(MCX)固相萃取柱用于净化富集目标化合物,再用高效液相色谱仪分离、紫外检测器检测,从而建立了固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中三聚氰胺含量的分析方法。经实验验证,该方法具有操作简便、快速,稳定性较好的特性,基本能满足多种水产品的检测需求。

[参考文献]

- [1] Fish on U. S. fish farms fed melamine-contaminated feed; FDA discovers contaminated food products from China mislabeled. American Veterinary Medical Association Available at www.avma.org/press/releases/070508_petfoodrecall.asp Accessed 10 December 2007.
- [2] Melamine contaminant found in chicken feed. Available at www.sciencedaily.com/releases/2007/05/070502072434.htm. Accessed 10 December 2007.
- [3] GB/T22388-2008. 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].
- [4] 张美金,林海丹,等. 高效液相色谱法测定饲料和宠物食品中三聚氰胺含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2205-2206, 2246.

(收稿日期:2009-08-13)