

高效液相色谱对液态奶中三聚氰胺的快速测定

乔勇升，李兴根，韩芷玲，黄银波，胡慧

(泰州市产品质量监督检验所，江苏 泰州 225300)

摘要：建立了有机溶剂提取和离子对色谱相结合的三聚氰胺快速检测方法。样品中加入有机溶剂振荡提取，取上清液过滤进行高效液相色谱（HPLC）分析。对丙酮、乙腈、乙醇和异丙醇的提取物分别在甲醇 - 离子对试剂流动相体系和乙腈 - 离子对试剂流动相体系中进行测定和比较。结果显示，选择合适的流动相，使用丙酮、乙醇或异丙醇为提取剂可以获得较好的提取效果。在甲醇 - 离子对试剂流动相体系中，三聚氰胺的质量浓度在 1.0 ~ 100.0 mg/L 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.999\ 98$)，检出限为 0.1 mg/kg，采用丙酮为提取剂，加标回收率为 97% ~ 103%，相对标准偏差 (RSD) 小于 5%。

关键词：三聚氰胺；高效液相色谱（HPLC）；离子对色谱法；液态奶

中图分类号：O657.72; R155.57 **文献标识码：**A **文章编号：**1004 - 4957 (2009) 10 - 1202 - 05

doi: 10.3969/j.issn.1004 - 4957.2009.10.020

Fast Determination of Melamine in Milk by High Performance Liquid Chromatography

QIAO Yong-sheng, LI Xing-gen, HAN Zhi-ling, HUANG Yin-bo, HU Hui

(Taizhou Institute of Supervision & Testing on Product Quality, Taizhou 225300, China)

Abstract: An analytical method for rapid determination of melamine was developed by organic solvent extraction combination with ion-pair chromatography. The milk sample was extracted with organic solvents. The supernatant was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The ion pair chromatographic separation was performed using a Welch Materials XB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with organic solvent added ion-pair reagent as the mobile phase. The extract got by separately using four organic solvents such as acetone, acetonitrile, ethanol and isopropyl alcohol was tested and compared in different mobile phase. The results showed that if appropriate mobile phase was chosen, the adoption of acetone, ethanol and isopropyl alcohol as organic agents for melamine extraction could also get good results. In mobile phase of methanol & ion-pair reagent, a good linear relationship ($r = 0.999\ 98$) between concentration and chromatographic peak area was obtained in the range of 1.0 - 100.0 mg/L. The detection limit ($S/N = 3$) of melamine was 0.1 mg/kg. When acetone was used as extraction agent for melamine, the average recoveries were in the range of 97% - 103% with relative standard deviations (RSD) less than 5%. This method was simple, rapid, accurate, and could meet the testing requirements.

Keywords: melamine; high performance liquid chromatography (HPLC); ion pair chromatography; milk

三聚氰胺 (melamine) 简称三胺，是一种三嗪类含氮杂环有机化工原料，含氮量高达 66.7%^[1]。因其含氮量高而被一些不法商贩添加到植物蛋白中以提高样品的表观蛋白质含量。目前三聚氰胺的检测方法主要包括液相色谱法 (HPLC)^[2-7]、液相色谱 - 质谱法 (LC - MS/MS)^[8-16] 和气相色谱 - 质谱法 (GC - MS)^[17-19]。

2008 年 9 月，在我国某些品牌的乳制品中发现非法添加“伪蛋白”——三聚氰胺，导致部分食用问题奶粉的婴幼儿患肾结石疾病，由此引起了国内外对食品中三聚氰胺的高度关注。国家质检总局于

收稿日期：2009 - 05 - 25；修回日期：2009 - 08 - 02

第一作者：乔勇升 (1980 -)，男，河北徐水人，助理工程师，硕士，Tel: 0523 - 86999912，E-mail: qys - 0708@163.com

2008年10月7日发布国家标准GB/T22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》^[20], 确定了高效液相色谱法、液相色谱-质谱/质谱法和气相色谱-质谱联用法作为三聚氰胺的3种测定方法。其中HPLC法采用1%三氯乙酸溶液和乙腈进行提取, 经阳离子交换固相萃取柱净化后, 在流动相中添加离子对试剂改造成反相离子对色谱后进行测定。该方法使用固相萃取柱对样品进行净化, 除去乳制品中的一些杂质成分, 但操作步骤相对比较繁琐, 前处理时间长。同年10月15日质检总局发布国家标准GB/T22400-2008《原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法》^[21], 该标准只针对原料奶和不含添加物的液态奶, 采用乙腈作为样品的蛋白沉淀剂和三聚氰胺提取剂, 强阳离子交换色谱柱进行液相色谱分离测定。该方法前处理快速简便, 只在1个具塞试管中完成全部前处理程序, 减少了中间环节的损耗, 提高了样品回收率。但采用乙腈作为提取剂, 增加了对检验人员健康危害和环境污染的风险, 而且该方法需要配置强阳离子交换色谱柱。

本文结合以上2个液相色谱检测方法, 用有机溶剂丙酮、乙腈、乙醇或异丙醇等对三聚氰胺进行提取, 在反相离子对色谱上分析。在实验过程中筛选多种有机溶剂作为液态奶中三聚氰胺的提取剂, 减少对乙腈的消耗。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

三聚氰胺对照品(纯度为99%, 德国Alfa Aesar公司); 乙腈(DMA公司)、甲醇(德国Merck公司)、辛烷磺酸钠(色谱纯, 日本TC株式会社); 乙醇、丙酮、异丙醇等均为分析纯; 实验用水为Millipore超纯水。0.22 μm针式微孔滤膜过滤器(天津津腾公司)。

Waters 2695高效液相色谱系统, 配有Waters 2996二极管阵列检测器和Empower色谱工作站(美国Waters公司); Millipore纯水系统, 配有Milli-Q Academic超纯水器和ROs反渗透水纯化系统(美国Millipore公司); Sartorius CP225D型电子分析天平, 感量为0.000 01 g(德国Sartorius公司)。

1.2 标准溶液的配制

准确称取适量三聚氰胺标准品, 用甲醇溶解得到1 000 mg/L的标准储备液。用甲醇稀释标准储备液, 配制成1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 mg/L的标准工作液。

1.3 色谱条件

色谱柱: XB-C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), Welch Materials公司; 甲醇-离子对试剂缓冲液(体积比为40:60)流动相体系, 乙腈-离子对试剂缓冲液(体积比为20:80)流动相体系; 柱温: 40 ℃; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 检测波长: 240 nm。离子对试剂缓冲液由2.10 g柠檬酸和2.16 g辛烷磺酸钠加水溶解, 调节pH至3.0, 定容至1 L。

1.4 样品制备

称取混合均匀的5 g液态样品(准确至0.001 g, 固态样品称取2 g), 置于50 mL具塞刻度试管中, 加入40 mL有机提取剂(丙酮、乙腈、乙醇或异丙醇等), 剧烈振荡6 min, 加水定容至满刻度, 充分混匀后静置20 min, 上清液经0.22 μm有机系滤膜过滤, 供HPLC分析。

2 结果与讨论

2.1 流动相配比的选择

不同配比的甲醇-离子对试剂缓冲液流动相条件下, 20 μL 10.0 mg/L三聚氰胺标准工作液的高效液相色谱见图1。从图1可以看到, 随着流动相中甲醇配比的提高, 三聚氰胺的保留时间逐渐缩短, 峰宽越来越窄, 峰形越来越好。乙腈-离子对试剂缓冲液流动相配比对色谱分离效果的影响规律与之相同。经过优化后,

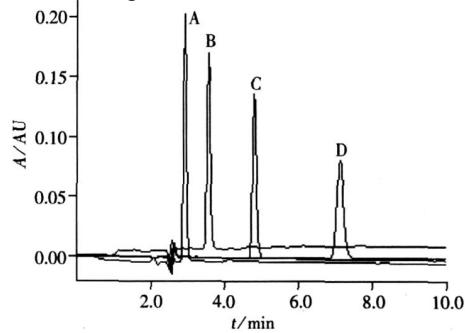


图1 三聚氰胺在不同配比流动相的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of melamine in different ratio of methanol to ion-pair reagent(A - D):
60 40, 50 50, 40 60, 30 70

选择“1.3”所示的流动相配比。

2.2 不同有机提取液的提取效果比较

向原料乳样品中添加 0.5、1、10、50 mg/kg 的三聚氰胺，分别用丙酮、乙腈、乙醇和异丙酮进行提取，结果见表 1。在乙腈 - 离子对试剂流动相体系中，用乙腈为提取剂时的回收率为 84% ~ 108%。而在甲醇 - 离子对试剂流动相体系中，分别以丙酮、乙醇、异丙醇为提取剂时的回收率依次为 97% ~ 103%、92% ~ 101%、86% ~ 100%；结果说明，如果选择合适的流动相体系（如甲醇 - 离子对试剂流动相），使用丙酮、乙醇或异丙醇作为三聚氰胺提取剂也可以获得与乙腈类似甚至更好的提取效果。

在实际操作中，如果使用丙酮或异丙醇作为有机提取剂，可设计为 10 g 样品中加入 40 mL 有机提取剂进行提取。而使用乙醇作为三聚氰胺提取剂时，发现乙醇沉淀蛋白的效果并没有丙酮、乙腈或异丙醇理想，于 10 g 的液态奶样品中加入 40 mL 乙醇不能在短时间内获得较澄清的上清液。考虑到乙醇的沉淀效果，可适当减少样品量的比例，即设计为 5 g 样品加入 40 mL 的有机提取剂，可同样获得较好的沉淀效果。

表 1 不同有机提取剂的提取效果 ($n = 3$)
Table 1 Extraction of different organic solvents ($n = 3$)

Mobile phase	Added $w / (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	Acetone		Acetonitrile		Ethanol		Isopropyl alcohol	
		Recovery R / %	$s_r / \%$						
Methanol - ion- pair reagent	0.5	97	4.3	73	4.7	92	4.2	86	2.6
	1	100	3.5	95	2.5	94	6.1	88	3.5
	10	103	4.8	85	4.1	101	2.4	100	3.1
	50	103	2.1	99	3.8	100	3.4	100	2.8
Acetonitrile - ion- pair reagent	0.5	109	1.6	100	2.8	62	3.8	88	2.0
	1	108	3.4	108	3.9	87	2.4	109	4.7
	10	105	4.8	84	5.8	50	2.2	79	4.5
	50	105	3.7	94	2.6	60	4.2	80	5.8

三聚氰胺微溶于甲醇，而在二甲基亚砜中的溶解度较大^[22]，蔡勤仁等^[14]在提取溶剂中加入 10% 二甲基亚砜来提高提取回收率。由于甲醇和二甲基亚砜均具有沉淀蛋白质的作用，所以本实验有机提取剂的选择中也对甲醇和二甲基亚砜进行了考察，结果发现样品中分别加入 40 mL 以上两种提取液后，不能通过简单的静置或过滤实现提取液与蛋白质的初步分离以能达到快速便捷检测三聚氰胺的目的。

2.3 不同流动相体系对色谱分离的影响

从表 1 可以看出，在甲醇 - 离子对试剂流动相体系中，选择乙醇作为三聚氰胺提取剂，加标 0.5 ~ 50 mg/kg 的回收率均达到 90% 以上，但同样的提取样品在乙腈 - 离子对试剂流动相体系中没有获得理想的测量结果，回收率为 50% ~ 87%，且三聚氰胺标准峰峰形变差，测量值降低，回收率不稳定。表明即便是同种溶剂提取的样品，在不同流动相中的色谱行为也有着较大差别，原因可能是由于三聚氰胺在不同有机溶剂中溶解度的不同，以及有机溶剂极性差异等因素引起的。因此，选择流动相时，其性质应与样品提取剂的性质相同或尽量相近。出于环境保护的考虑，为了减少乙腈的用量，本实验选择甲醇 - 离子对试剂流动相体系为最佳流动相。

2.4 方法的线性范围与检出限

在甲醇 - 离子对试剂体系中，按照“1.3”色谱条件对 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 mg/L 的三聚氰胺标准品溶液进样检测，以标准品质量浓度 (mg/L) 为横坐标，峰面积为纵坐标作图，在 1.0 ~ 100.0 mg/L 范围内，标准品的质量浓度与峰面积值具有良好的线性关系，回归方程为 $Y = 4.00 \times 10^4 X$ ($r = 0.99998$)。将标准品溶液稀释进样，测得三聚氰胺的检出限 ($S/N = 3$) 为 0.1 mg/kg。

2.5 方法的回收率与精密度

在液态奶样品中，用丙酮作为提取剂进行提取，在甲醇 - 离子对试剂流动体系中进行分离，获得

的回收率在 95% 以上, 平行测定 6 次, 得到三聚氰胺峰面积的相对标准偏差 (RSD) 小于 5%, 表明方法的重复性良好。图 2 为空白牛奶样品及加标样品的色谱图。

3 结 论

本文建立了有机溶剂提取与离子对色谱分析相结合的三聚氰胺快速检测方法。通过对实验条件的选择和优化, 确定了色谱条件。方法的灵敏度和精确度满足实际样品检测需要。实验中证实了丙酮等有机溶剂也可以获得与乙腈类似甚至更好的提取效果, 可以在实际工作中进行应用, 食品达到保护环境、保护检验人员健康、降低实验成本的目的。本方法快速、简便, 适用于不含或含少量添加剂的液态奶的快速检验。可以应用于企业自行组织的原材料进厂检验和部分成品出厂检验, 在批批检验的繁重工作中, 提高工作效率。

参考文献:

- [1] 严丽娟, 吴敏, 张志刚, 等. 亲水作用色谱 - 电喷雾串联质谱法检测原料奶及奶制品中的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26(6): 759 - 762.
- [2] L N M, H E L, A W IKA J, et al. Detection of melamine in gluten, chicken feed, and processed foods using surface enhanced Raman spectroscopy and HPLC[J]. J Food Sci, 2008, 73(8): 129 - 134.
- [3] MUÑIZ - VALENCIA R, CEBALLOS - MAGAÑA S G, ROSALES - MARTINEZ D, et al. Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography application to animal feed samples [J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 392(3): 523 - 531.
- [4] 倪沁颜. 高效液相色谱法 (HPLC) 测定饲料中三聚氰胺的含量 [J]. 福建分析测试, 2008, 17(1): 57 - 60.
- [5] 张美金, 林海丹, 林峰, 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.
- [6] 赵永彪, 李自春, 刘婷, 等. 高效液相色谱法测定宠物食品中的三聚氰胺 [J]. 分析试验室, 2008, 27(z): 190.
- [7] 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.
- [8] FLIGENZIM S, PUSCHNER B, ASTON L S, et al. Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. J Agri Food Chem, 2008, 56(17): 7593 - 7599.
- [9] SANCHO J V, BANEZ M, GR MALT S, et al. Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2005, 530(2): 237 - 243.
- [10] FLIGENZIM S, TOR E R, POPPENGA R H, et al. The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography / tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(24): 4027 - 4032.
- [11] ANDERSEN W C, TURNIPSEED S B, KARBINYK CM, et al. Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(12): 4340 - 4347.
- [12] FLIGENZIM S, PUSCHNER B, ASTON L S, et al. Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(17): 7593 - 7599.
- [13] 丁涛, 徐锦忠, 李健忠, 等. 高效液相色谱 - 二极管阵列检测法及高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱法测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26(1): 6 - 9.
- [14] 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 等. 超高效液相色谱 + 串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26(3): 339 - 342.
- [15] 黄芳, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 高效液相色谱 - 质谱法对饲料及食品添加剂中三聚氰胺的测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(3): 313 - 315.
- [16] 李爱军, 张代辉, 马书民, 等. 液相色谱 - 串联质谱法测定饲料中三聚氰胺残留 [J]. 分析化学, 2008, 36(5): 699 - 701.
- [17] 王征. GC - MS 法测定动物食品中的三聚氰胺 [J]. 福建分析测试, 2008, 17(2): 1 - 4.
- [18] 卢业举, 舒勇, 赵成仕, 等. 气相色谱 - 串联质谱法测定食品中的三聚氰胺 [J]. 色谱, 2008, 26(6): 749 - 751.

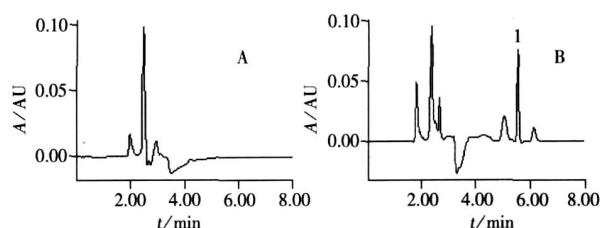


图 2 空白牛奶样品 (A)与添加 10.0 mg/L 三聚氰胺的牛奶样品的色谱图 (B)

Fig. 2 Chromatograms of blank milk sample (A) and blank milk sample spiked with 10.0 mg/L of melamine standard (B)
methanol - ion-pair reagent mobile phase, extract agent acetone; peak 1: melamine

(下转第 1209 页)

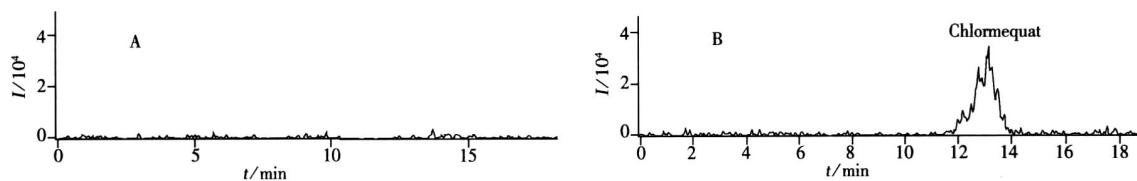


图 2 草莓样品中矮壮素残留的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of chlormequat in strawberry
A. blank strawberry; B. strawberry sample

参考文献:

- [1] 吕印谱, 马奇祥. 新编常用农药使用简明手册 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 321 - 324.
- [2] 彭志源. 中国农药大典 [M]. 广州: 中国科技文化出版社, 2005: 847 - 848.
- [3] 中国国家标准化管理委员会. GB 2763 - 2005 《食品中农药最大残留量》[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005: 11.
- [4] 葛志荣. 日本肯定列表制度 食品中农业化学品残留限量 药品卷 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 271 - 274.
- [5] 葛志荣. 主要贸易国家和地区食品中农兽药残留限量标准 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 424 - 428.
- [6] 李元平. 食品中农用化学品残留检测方法 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 11 - 12.
- [7] VAHL M, GRAVEN A, JUHLER R K. Analysis of chlormequat residues in grain using liquid chromatography - mass spectrometry(LC - MS/MS) [J]. Fresenius J Anal Chem, 1998, 361(8): 817 - 820.
- [8] Community Reference Laboratories for Single Residue Methods. Analysis of chlormequat and mepiquat residues in foods of plant origin [EB/OL]. Germany, 2009, version 2. http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_Chlormequat-Mepiquat_CrlSm.pdf
- [9] ZHAO Y, LAZOU K, SCHELFAUT M, et al. Determination of chlormequat residues in pears and pear concentrates by benchtop LC - ESI- MS[J]. Chromatographia, 2000, 51(9/10): 531 - 535.
- [10] STARTN J R, HARD S J, SYKES M D, et al. Determination of residues of the plant growth regulator chlormequat in pears by ion-exchange high performance liquid chromatography - electrospray mass spectrometry[J]. Analyst, 1999, 124 (7): 1011 - 1015.
- [11] LAUTIÉ J P, STANKOVIC V, SNOQUET G. Determination of chlormequat in pears by high-performance thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography with conductimetric detection [J]. Analisis, 2000, 28: 155 - 158.
- [12] 王金花, 卢晓宇, 黄梅, 等. 超高效液相色谱 - 质谱法快速分析番茄及其制品中矮壮素和缩节胺残留量 [J]. 分析化学, 2007, 35(10): 1509 - 1512.
- [13] 张曦, 金芬, 钱永忠, 等. 食品中矮壮素和缩节胺分析方法的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 127 - 131.

(上接第 1205 页)

- [19] 吴惠勤, 黄芳, 林晓珊, 等. 气相色谱 - 质谱法测定奶粉及奶制品中的三聚氰胺 [J]. 分析测试学报, 2008, 27 (10): 1044 - 1048.
- [20] 中国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 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [21] 中国国家标准化管理委员会. GB/T22400 - 2008 原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [22] 任保增, 李晨, 袁晓亮, 等. 三聚氰胺溶解度的测定与关联 [J]. 化工学报, 2003, 54(7): 1001 - 1003.