

水产品中三聚氰胺含量的快速检测方法研究

梁剑,钟茂生,朱品玲,陈舒奕 (中华人民共和国宁德出入境检验检疫局,福建宁德 352100)

摘要 [目的] 参考国家标准建立水产品中三聚氰胺含量的检测方法。[方法] 分别用高效液相色谱法和液相色谱/质谱联用法检测水产品样品液中的三聚氰胺含量。[结果] 高效液相色谱法和液相色谱/质谱联用法都能较好地检测三聚氰胺含量,但其检测限不同。利用高效液相色谱法检测三聚氰胺含量的检测限为 2.0 mg/kg,出峰时间为 7.25 min。利用液相色谱/质谱联用法检测三聚氰胺含量的检测限为 0.01 mg/kg。高效液相色谱法检测三聚氰胺含量的浓度-峰面积曲线为: $y = 22.3513 + 46.3807x, R = 0.9984$ 。液相色谱/质谱联用法检测三聚氰胺含量的浓度-峰面积曲线为: $y = 39.7025 + 16.2646x, R = 0.9957$ 。[结论] 液相色谱/质谱联用法的检测时间更短,灵敏度更高,检测效果更好,但检测成本较高。高效液相色谱法检测效果略差,但更经济实用。

关键词 高效液相色谱;液相色谱/质谱联用仪;三聚氰胺

中图分类号 TS207.5·3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)28-13446-02

Research on the Rapid Detection Methods of Melamine Content in Fishery Products

LIANG Jian et al (Ningde Import and Export Inspection and Quarantine Bureau, Ningde, Fujian 352100)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the detection method of melamine content in fishery products with reference to national standard. [Method] The melamine contents in the sample solutions of fishery products were detected by HPLC and LC/MS combination resp. [Result] Both HPLC and LC/MS combination could detect melamine content better, but their detection limits were different. The detection limit of detecting melamine content by HPLC was 2.0 mg/kg and its peak flowing out was 7.25 min. The detection limit of detecting melamine content by LC/MS combination was 0.01 mg/kg. The concn.-peak area curve of detecting melamine content by HPLC was $y = 22.3513 + 46.3807x (R = 0.9984)$. The concn.-peak area curve of detecting melamine content by LC/MS combination was $y = 39.7025 + 16.2646x (R = 0.9957)$. [Conclusion] The detection by LC/MS combination needed shorter time, had higher sensitivity and better detection effect, but its cost was relatively high. The detection effect of HPLC was a little worse, but it was more economic and practical.

Key words HPLC; LC/MS analyzer; Melamine

三聚氰胺(Melamine)^[1]是一种用途广泛的具有均匀结构的有机化工中间产品,最主要的用途是作为生产三聚氰胺-甲醛树脂(MF)的原料。由于食品和饲料工业蛋白质含量测试方法的缺陷,三聚氰胺也常被不法商人用做食品添加剂,以提升食品检测中的蛋白质含量指标,因此三聚氰胺也被人称为“蛋白精”。2008年8月,自三鹿奶粉添加三聚氰胺事件曝光以来,各类奶粉、饼干、米粉甚至鸡蛋蔬菜中,检出三聚氰胺的报道接二连三。三聚氰胺具有低毒性^[2],可引起生殖、泌尿系统的损害^[3-4],膀胱、肾脏结石^[5-6],并可进一步诱发膀胱癌。加拿大安大略省圭尔夫大学(University of Guelph)的研究发现,氯酸和三聚氰胺反应会产生可能阻碍肾脏功能的结晶^[7]。它的基本结构见图1。

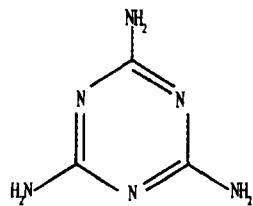


图1 三聚氰胺的结构

Fig. 1 The structure of melamine

该研究的目的是建立灵敏、简单、快速、特异性强的分析方法,以满足对水产品中三聚氰胺的检测和其他食品中的检测需要。在参考国标测定方法的基础上,笔者利用HPLC(高效液相色谱)和LC/MS(液相色谱质谱联用仪),建立了水产品中三聚氰胺含量的2种检测方法,得出了理想的实验结果。

1 材料与方法

1.1 材料 Agilent1200 高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器);Agilent1200-6410QQQ 高效液相色谱质谱联用仪;

作者简介 梁剑(1984-),男,福建莆田人,助理工程师,从事食品检测工作。
收稿日期 2009-05-26

氮吹仪(北京八方);离心机(上海安亭公司);旋涡混合器(上海精科公司);Minishaker(德国 KIA 公司);分析天平(METTLER 公司);天平(SARTORIUS 公司);数字可调移液器(Gilson 公司);超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司);固相萃取装置(北京八方世纪科技有限公司);乙腈;氨水(浓度 25%~28%);甲醇(液相色谱纯);水(超纯水);混合型阳离子交换固相萃取柱(60 mg, 3 ml, waters);滤膜(0.45 μm 有机相);甲醇水溶液(20%);乙酸铵(色谱纯);三氯乙酸(分析纯);乙酸铅(分析纯);三聚氰胺标准品(纯度 99%, Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)。

1.2 方法

1.2.1 试样制备。取 500 g 供试样品,绞碎并使之均匀,然后置于 -18 ℃ 冰箱中储存备用。

1.2.2 分析步骤。

1.2.2.1 前处理步骤。液质方法:称取(1.00 ± 0.01) g 试样置于 50 ml 离心管中,准确加入 10 ml 三氯乙酸溶液和 2 ml 乙酸铅水溶液,minishaker 振摇 1 min,摇匀,超声提取 20 min。静置 2 min 后,过滤上清液于离心管中,4 500 r/min 离心 10 min。分别用 3 ml 甲醇,3 ml 水活化混合型阳离子交换固体萃取柱,把离心液分次上柱,控制过柱速度在 1 ml/min 以内。抽干后用氨水甲醇溶液 3 ml 洗脱。洗脱液 50 ℃ 氮气吹干,加入 1 ml 甲醇水溶液,涡旋振荡 1 min,过 0.20 μm 滤膜,上机测定。

液相方法:称取(2.00 ± 0.02) g 试样置于 50 ml 离心管中,准确加入 20 ml 三氯乙酸溶液和 2 ml 乙酸铅水溶液,minishaker 振摇 1 min,摇匀,超声提取 20 min。静置 2 min 后,移取约 15 ml 上清液于玻璃离心管中,4 500 r/min 离心 10 min。分别用 3 ml 甲醇,3 ml 水活化混合型阳离子交换固体萃取柱,准确移取 5 ml 离心液分次上柱,控制过柱速度在 1

ml/min 以内。抽近干后用氨水甲醇溶液 3 ml 洗脱。洗脱液 50 ℃ 氮气吹干, 准确加入甲醇水溶液, 涡旋振荡 1 min, 过 0.

20 μm 滤膜, 上机测定。

1.2.2.2 分析条件。 HPLC 和 LC/MS 的条件如表 1 所示。

表 1 HPLC 和 LC/MS 的条件

Table 1 The condition of HPLC and LC/MS

仪器 Instruments	色谱柱 Chromatographic column	柱温 / °C Column temperature	流动相 Mobile phase	检测器波长 / nm Detector wavelength	流速 ml/min Flow rate	进样量 μl Injection volume	检测时间 min Detection time
HPLC	资深堂 CR 柱 (1:4), 150.0 mm × 3.0 mm, 粒径 3 μm	30	A: 0.77 g 乙酸铵用水定容至 1 L (90%), B: 乙腈 (10%)	240	0.7	30	13
LC/MS	资深堂 CR 柱 (1:4), 150.0 mm × 3.0 mm, 粒径 3 μm	30	A: 0.77 g 乙酸铵用水定容至 1 L (90%), B: 乙腈 (10%)	-	0.5	30	8

2 结果与分析

2.1 三聚氰胺的 HPLC 色谱图和 LC/MS 色谱图 用 2 种仪器都能够较好地检测三聚氰胺 (图 2、3), 但是检测限有所

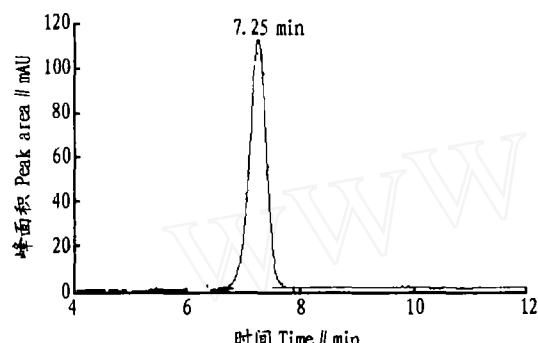
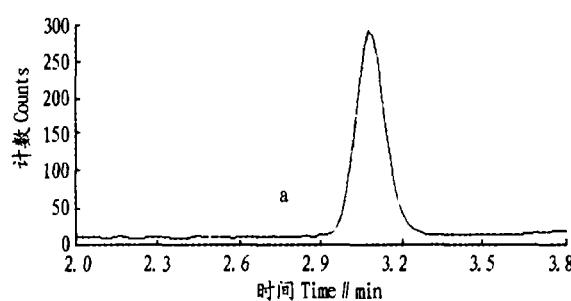


图 2 三聚氰胺的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC chromatogram of melamine

不同。利用 HPLC 检测三聚氰胺的检测限为 2.0 mg/kg, 出峰时间为 7.25 min。利用 LC/MS 检测三聚氰胺的检测限为 0.01 mg/kg。

2.2 加标回收曲线 分别移取 0、0.20、0.40、0.80、2.00 ml 浓度为 10 μg/ml 的三聚氰胺标准工作液于含有 2 g 阴性空白控制样的 50 ml 离心管中, 混匀, 按照“1.2.2.1”的步骤进行提取净化, 样液经高效液相色谱分析, 制备浓度 - 峰面积曲线, 即加标回收曲线, 见图 4a。

分别移取 0、0.50、1.00、2.00、5.00 ml 浓度为 10 ng/ml 的三聚氰胺标准工作液于含有 1 g 阴性空白控制样的 50 ml 离心管中, 混匀, 按照“1.2.2.1”的步骤进行提取净化, 样液经高效液相色谱质谱联用仪分析, 制备浓度 - 峰面积曲线, 即加标回收曲线, 见图 4b。



注: a 为总离子流图; b 为质谱图。
Note: a. Total ion-current; b. Mass spectrogram.

图 3 三聚氰胺的 LC/MS 色谱图
Fig. 3 LC/MS chromatogram of melamine

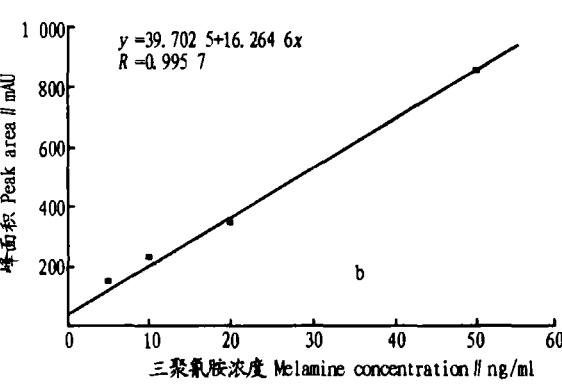


图 4 2 种方法制备三聚氰胺的浓度 - 峰面积标准曲线
Fig. 4 The standard curve of concentration-peak area for melamine

3 讨论

利用 HPLC 和 LC/MS, 建立了 2 种水产品中三聚氰胺的检

测方法。利用 HPLC 检测三聚氰胺的检测限为 2.0 mg/kg。利

(下转第 13472 页)

以后的研究工作中需要加强竹叶提取物有效成分结构与活性关系,活性成分之间协同作用和有害病菌、有害昆虫对活性成分产生抗性的研究。随着人们对竹叶活性成分和营养成分的深入研究,以及提取、分离工艺的不断完善,竹叶提取物在药品、食品、保健品、化妆品、饮料等方面将得到越来越广泛的应用。

参考文献

- [1] 朱石麟.中国竹类植物图志[M].北京:中国林业出版社,1994:1~10.
- [2] 彭彪,宋建英.竹类高效培育[M].福州:福建科学技术出版社,2004.
- [3] 刘云.我国竹类资源开发利用前景与途径[J].自然资源,1988(3):25~30.
- [4] SWAIN T. Secondary compounds as protective agents[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1977, 28:479~501.
- [5] 吴传茂,吴周和,曾莹,等.从植物中提取天然防腐剂的研究[J].食品科学,2000,21(9):24~27.
- [6] 陈朝阳,李惠珍,许旭萍,等.天然食品防腐剂——竹叶的研究Ⅲ 肉、豆腐及肉汁的防腐试验[J].福建师范大学学报:自然科学版,1997,13(2):88~92.
- [7] 李惠珍,陈朝阳,许旭萍,等.天然食品防腐剂——竹叶的研究Ⅰ 林桔、苹果及果蔬汁的防腐试验[J].福建师范大学学报:自然科学版,1995,11(3):89~93.
- [8] 陆志科,谢碧霞.不同种竹叶的化学成分及其提取物抗菌活性的研究[J].西北林学院学报,2005,20(1):49~52.
- [9] 刘晓容,张媛媛.淡竹叶提取物抑菌作用的研究[J].食品科技,2008,33(12):211~213.
- [10] 黄文,王益,胡筱波,等.竹叶提取物抑菌特性的研究[J].林产化学与工业,2002,22(1):68~70.
- [11] 杨卫东,费学谦,王敬文.不同溶剂对竹叶提取物抑菌作用的影响[J].食品工业科技,2006,27(1):77~79.
- [12] 郝培应,肖家军,齐笑笑.紫竹叶提取物的抑菌效果研究[J].安徽农业科学,2008,36(7):2810~2812.
- [13] 吴耀辉,曾超珍,龚燕飞.挂绿竹竹叶提取物的抗菌作用[J].食品科技,2008(1):194~196.
- [14] 张伟,檀建新,贾英民.竹叶对食品致病菌的抑制作用[J].食品科学,1998,19(4):37~39.
- [15] CHUYEN N V, KUTATA T, KATO H. Antimicrobial activity of kumazasa [J]. Agric Biol Chem, 1982, 46(4):971~978.
- [16] NISHINA A, HASEGAWA K. 2,6-Dimethoxy-P-benzopquinone as anti-bacterial substance in the bark of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*, a species of thick-stemmed bamboo[J]. Agric Food Chem, 1991, 39(2):266~272.
- [17] 向天勇,张驰,谢达平.箬竹叶抑菌成分的分离纯化及结构分析[J].湖北民族学院学报:自然科学版,2002,20(3):70~74.
- [18] 操海群,岳永德,彭镇华,等.竹提取物的抗真菌作用[J].植物保护学报,2003,30(1):35~39.
- [19] 操海群,岳永德,彭镇华,等.毛竹提取物的抑菌活性及其有效成分的初步分离[J].植物病理学报,2005,35(5):428~433.
- [20] 黄亚利.毛竹提取物抗菌活性成分研究[D].合肥:安徽农业大学,2008.
- [21] 操海群,岳永德,彭镇华,等.竹提取物对玉米象 *Sitophilus zamiae* Motsch 生物活性的初步研究[J].农药学学报,2002,4(1):80~84.
- [22] 操海群,岳永德,彭镇华,等.竹提取物对蚜虫生物活性的研究[J].植物保护,2003,29(2):33~36.
- [23] 操海群,岳永德,彭镇华,等.竹提取物对棉铃虫幼虫及菜青虫的拒食活性[J].昆虫知识,2005,42(1):171~174.
- [24] 张英,丁霄霖.竹叶有效成分和抗活性氧自由基效能的研究[J].竹子研究汇刊,1996,15(3):17~24.
- [25] 宋仲容,江相兰,李树伟,等.竹叶提取物的抗氧化活性研究[J].化学研究与应用,2006,18(1):67~69.
- [26] 郑德勇,安鑫南.从生竹叶提取物的成分与清除自由基的能力[J].福建林学院学报,2004,24(3):193~196.
- [27] 张英,吴晓琴,傅小伟,等.强化竹叶提取物对麦乳精抗氧化性能的改进[J].食品科学,2001,22(6):76~79.
- [28] 章宇,谢萌,吴晓琴,等.强化竹叶黄酮对酿造酒抗自由基和抗氧化性能的改进[J].中国食品学报,2005,5(4):34~37.
- [29] 许钢,张虹,董建红.竹叶提取物清除 O₂⁻·和·OH 的研究[J].浙江林业科技,2000,20(3):17~21.
- [30] 郭雪峰,岳永德,汤锋,等.用清除有机自由基 DPPH·法评价竹叶提取物抗氧化能力[J].光谱学与光谱分析,2008,28(7):1578~1582.
- [31] 郭雪峰,岳永德,汤锋,等.用清除超氧化阴离子自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J].光谱学与光谱分析,2008,28(8):1823~1826.
- [32] 张英,吴晓琴,俞卓裕.竹叶和银杏叶总黄酮含量及其抗自由基活性的比较研究[J].中国中药杂志,2002,27(4):254~257,320.
- [33] 张英.竹叶提取物类 SOD 活性的邻苯三酚法测定[J].食品科学,1997,18(5):47~49.
- [34] 张英,唐莉莉.毛竹叶提取物抗衰老作用的实验研究[J].竹子研究汇刊,1997,14(4):62~66.
- [35] 唐莉莉,徐榕容,丁霄霖.竹叶多糖对小鼠移植瘤的抑制作用[J].无锡轻工大学学报,1998,17(3):62~65.
- [36] 姚旌旗,李映红,刘红梅,等.竹叶提取液对 H22 肝癌细胞生长的影响[J].咸宁医学院学报,2002,16(4):233~234.
- [37] 姚旌旗,马世玉,李映红,等.竹叶提取液抑制小鼠移植性肺癌生长的实验研究[J].陕西医学杂志,2004,33(10):878~890.
- [38] 许钢,张虹,庞洁.竹叶提取物对亚硝化反应抑制作用的研究[J].郑州工程学院学报,2001,22(1):69~72.
- [39] 沈健,冯磊.竹叶提取液调节血脂作用的研究[J].现代康复,1999,3(5):549~551.
- [40] 付晓春,王敏伟,李少鹏,等.竹叶提取物的抗缺氧作用[J].中药新药与临床药理,2005,16(2):100~102.
- [41] 李少鹏,王成林,潘蔚然,等.竹叶提取物的抗血栓作用研究[J].中国热带医学,2005,5(6):1202~1204.
- [42] 付晓春,王敏伟,李少鹏,等.竹叶提取物对犬实验性心肌梗死的保护作用[J].沈阳药科大学学报,2005,22(2):134~137.
- [43] 付晓春,李少鹏,王敏伟,等.竹叶提取物对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].天然产物研究与开发,2006(18):214~218.
- [44] 付晓春,李少鹏,邱蔚芬,等.竹叶提取物防治脑缺血的药效学研究[J].广州中医药大学学报,2006,23(6):492~495.
- [45] YANG H, TIAN R, CHEN HL. A preliminary study on biological activity of *Wikstroemia chamaedaphne* Meissn [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(1):149~152.
- [46] 何跃君,岳永德.竹叶提取物的有效成分及其应用研究进展[J].生物质化学工程,2008,42(3):31~38.

(上接第 13447 页)

用 LC/MS 检测三聚氰胺的检测限为 0.01 mg/kg。利用 LC/MS 来检测,不仅缩短了检测的时间,还可以得到更低的检测限,达到更好的效果,但是如果考虑到成本等因素,利用 HPLC 来检测更为经济实用。

在提纯操作过程中,振摇要充分,对于较难打散的样品振摇时间应适当延长;移取三氯乙酸溶液 10 ml 的量要精确;在过柱时,速度不宜过快;同时,旋涡混合要充分。

参考文献

- [1] 汪家铭.三聚氰胺生产现状及市场分析[J].四川化工,2008(2):1~51.
- [2] U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Interim melamine and analogues safety/risk assessment [EB/OL]. (2007-10-26). <http://www.fda.gov/~dms/melamra.html>.
- [3] OKUMURA M, HASEGAWA R, SHIRAI T, et al. Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents thymine or melamine [J]. Carcinogenesis, 1992, 13(6):1043~1045.
- [4] CREMONEZZI D C, SILVA R A, DEL PILAR D M, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) differentially modulate melamine-induced pre-neoplastic urothelial proliferation and apoptosis in mice [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2001, 64(3):151~159.
- [5] OGASAWARA H, IMAIDA K, ISHIWATA H, et al. Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation [J]. Carcinogenesis, 1995, 16(11):2773~2777.
- [6] BIRCIT P, ROBERT H P, LINDA J L, et al. Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2007, 19(6):616~624.
- [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.