

## 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/质谱联用法; 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)<sup>[1]</sup>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<sup>[2]</sup>, 可引起生殖、泌尿系统的损害<sup>[3-4]</sup>, 膀胱、肾部结石<sup>[5-6]</sup>, 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, 氰酸和三聚氰胺反应会产生可能阻碍肾脏功能的结晶<sup>[7]</sup>。它的基本结构见图1。

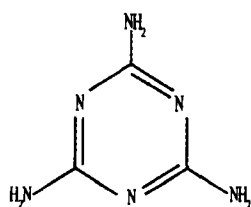


图1 三聚氰胺的结构

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  $\mu$ m 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  $^{\circ}$ C 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  $(1.00 \pm 0.01)$  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  $^{\circ}$ C 氮气吹干, 加入 1 ml 甲醇水溶液, 涡旋振荡 1 min, 过 0.20  $\mu$ m 滤膜, 上机测定。

液相方法: 称取  $(2.00 \pm 0.02)$  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 20 μm 滤膜,上机测定。  
50 ℃ 氮气吹干,准确加入甲醇水溶液,涡旋振荡 1 min,过 0. 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/℃ 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

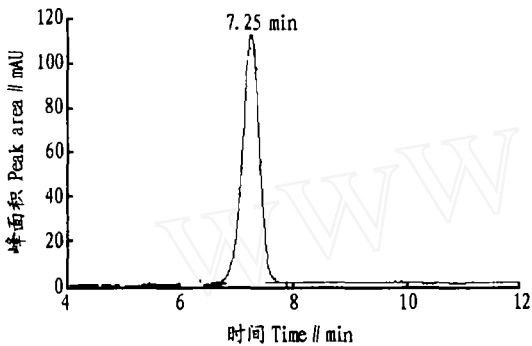
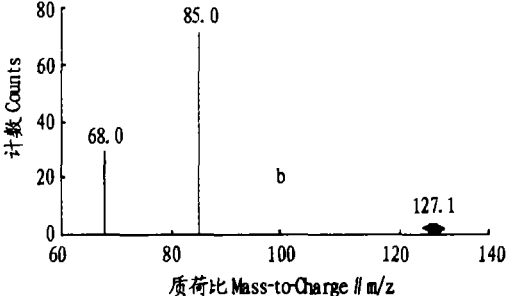
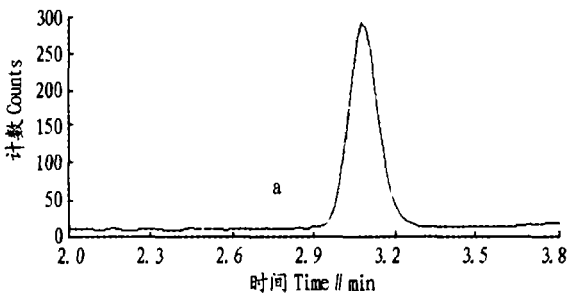


图 2 三聚氰胺的 HPLC 色谱图  
Fig.2 HPLC chromatogram of melamine

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

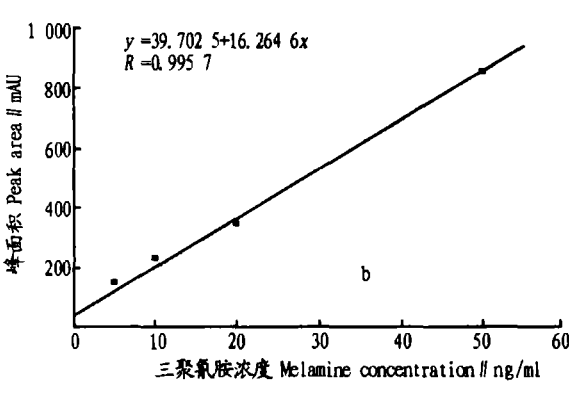
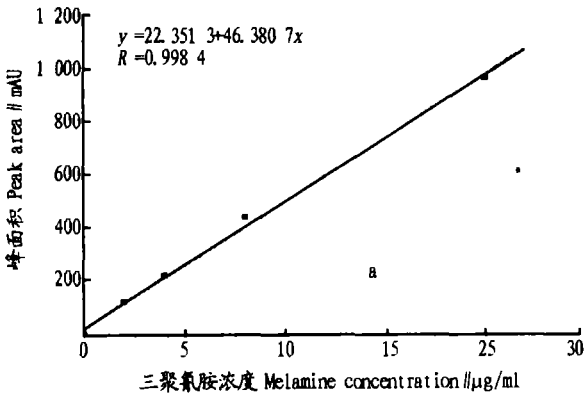


图 4 2 种方法制备三聚氰胺的浓度-峰面积标准曲线  
Fig.4 The standard curve of concentration-peak area for melamine

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] 吴伟茂, 吴周和, 曾莹, 等. 从植物中提取天然防腐剂的初步研究[J]. 食品科学, 2000, 21(9): 24-27.
- [6] 陈朝洋, 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, 陈朝洋, 许旭萍, 等. 天然食品防腐剂——竹叶的研究 I 福桔、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] 刘晓蓉, 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-benzopuinone as antibacterial 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, 张弛, 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 zeamais* Motsch 生物活性的初步研究[J]. 农药学报, 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. 丛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  $O_2^{\cdot -}$  和  $\cdot OH$  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. 毛金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, 徐榕榕, 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, 庞浩. 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.
- [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 preneoplastic 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] BIRGIT 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.

(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.cfsan.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 preneoplastic 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] BIRGIT 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.