

文章编号:1673-0062(2009)02-0083-04

三聚氰胺的 HPLC - DAD 检测新方法研究

肖锡林¹, 廖力夫¹, 肖静水¹, 匡汀¹, 刘传湘¹, 吴抗抗², 赵俊¹, 李刚¹

(1. 南华大学 化学化工学院, 湖南 衡阳, 421001; 2. 湖南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410082)

摘要:待测样品以适量 1% 三氯乙酸溶液提取, 2% 乙酸铅溶液沉淀蛋白, 离心后上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后直接进行 HPLC 分析. 据此建立了蛋白类保健食品中非法添加三聚氰胺的高效液相色谱-二级管阵列检测新方法. 方法的线性范围为 0.02 ~ 2.0 mg/L, $r = 0.999\ 5$, 检出限为 0.14 ng. 该方法简便、快速, 灵敏度高, 可准确排除阴性干扰, 易推广应用.

关键词:三聚氰胺; 测定; HPLC - DAD

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

Study of New Determination Method of Melamine by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detectors

XIAO Xi-lin¹, LIAO Li-fu¹, XIAO Jing-shui¹, KUANG Ting¹,
LIU Chuan-Xiang¹, WU Kang-kang², ZHAO Jun¹, LI Gang¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China)

Abstract: The sample was extracted by 1% TCA solution, and 2% lead acetate solution for protein precipitation. As centrifuged, supernatant layer was filtrated with 0.45 μm membrane for HPLC analysis. The linear range for the method was 0.02 ~ 2.0 mg/L, $r = 0.999\ 5$, and detection limit for the method was 0.14 ng. The method is applicable for the determination of melamine in nitrogenous health food products. Spectrum of diode array detector is easy to exclude negative interference. Results show that the method is simple, rapid, sensitive and easy to be applied.

Key words: melamine; determination; high performance liquid chromatography - diode array detector (HPLC - DAD)

收稿日期: 2009-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20877038); 湖南省卫生厅科研基金资助项目(B2006-103)

作者简介: 肖锡林(1978-), 男, 湖南岳阳人, 南华大学化学化工学院讲师. 主要研究方向: 食品、生物样品等的分离分析.

三聚氰胺(Melamine)是氮杂环有机化工原料,结构式如图1所示.因其低毒低代谢^[1]、原料氮含量可高达66%,不法分子漠视大量摄入三聚氰胺的危害,在含蛋白类食品生产过程中加入三聚氰胺,拉高样品含氮量,使蛋白含量虚假增高,以达到产品蛋白质含量达标的目的.07年3月,美国发生了多起因饲料中含大量三聚氰胺而致猫、狗死亡事件^[2].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.因此在蛋白类食品中进行三聚氰胺含量的快速测定是一项重要的安全措施^[3].

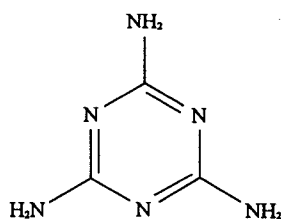


图1 三聚氰胺的结构式

Fig.1 Structural formula of melamine

我国是保健食品消费大国,其中含蛋白类保健食品占有较大比例.目前,我国暂未有含蛋白类保健食品非法添加三聚氰胺的检验标准,也未有相关研究报道.针对现行监管技术上的盲区,建立了HPLC-DAD快速筛查方法.用该法对含蛋白类保健食品的检测,结果经与国家公布的阳性样品与阴性样品比对,未出现假阴性结果.上述方法简单快速,单次检验时间不超过30 min,可用于实际监测工作.

1 材料与方法

1.1 仪器和主要试剂

美国 Waters 2690/2996 液相色谱仪(二极管阵列检测器,四元泵,柱温箱);德国 Eppendorf 离心机(4 400 r/min);国产 HY-2 型调速多用振荡器;Phenomenes STRATA-X-C 柱;德国 SARTORIUS 电子天平(BP211D、AC120S).三聚氰胺(Fluka 公司;纯度>99.0%);三氯乙酸、盐酸(分析纯);甲醇、乙腈(色谱纯);水为超纯水.

1.2 标准系列溶液配制

精密称取三聚氰胺试剂10 mg置10 mL容量瓶中,加20%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成标准贮备溶液,质量浓度为1.0 mg/mL(-18℃下避光贮存).临用时取此液以1%三氯乙酸溶液为稀释液配制成浓度为4、8、20、40、60、80、100、140

μg/mL的标准系列溶液.

1.3 样品处理

取混匀固体样品1.0 g(液体样品10 mL),加1%三氯乙酸溶液5 mL,充分振荡2 min,加入0.5 mL 10%乙酸铅溶液,加入2 mL 三氯甲烷,充分振荡2 min,4 000 转/min离心,上清液转至20 mL容量瓶.残渣再加入三氯乙酸溶液5 mL,重复前述操作.合并两次上清液,加1%三氯乙酸溶液稀释至刻度,0.45 μm滤膜滤过即得.

1.4 液相色谱条件

样品进样10 μL,以1%三氯乙酸:乙腈(90:10)为流动相,1.0 mL/min洗脱,25℃柱温下经Agilent C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)分离后二极管阵列检测器检测(波长范围:200~400 nm;提取波长:235 nm).

1.5 快速筛查定性方法

通过将样品在标准品主峰保留时间相同处色谱峰的光谱图相似度判断样品是否含有三聚氰胺(允许误差±2 nm)^[4].实验记录的部分色谱图和光谱图分别如图2~图6所示.

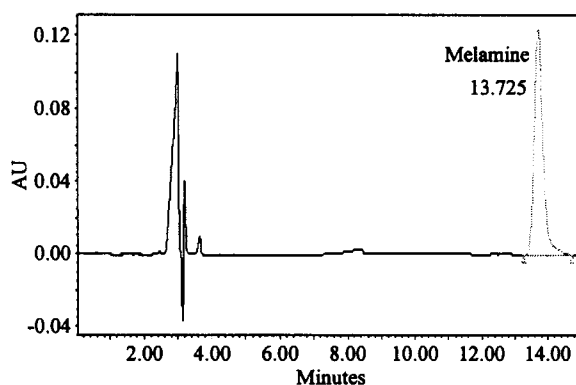


图2 三聚氰胺标准品色谱图

Fig.2 Chromatogram map of melamine

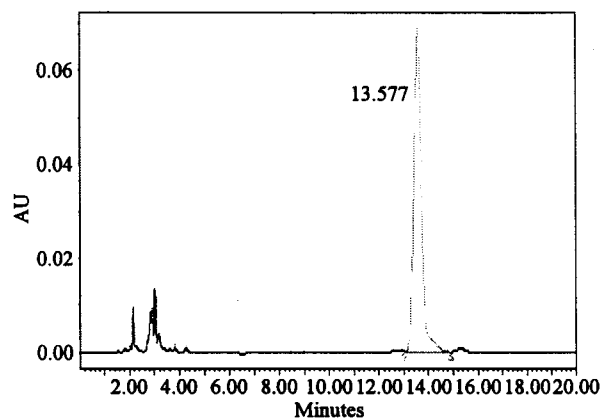


图3 三聚氰胺阳性样品色谱图

Fig. Chromatogram map of melamine positive sample

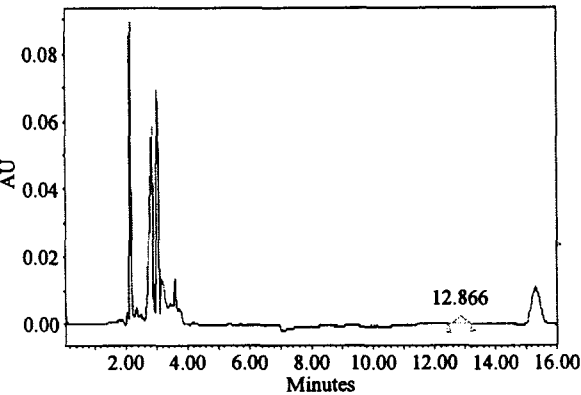


图 4 三聚氰胺阴性样品色谱图
Fig.4 Chromatogram map of melamine negative sample

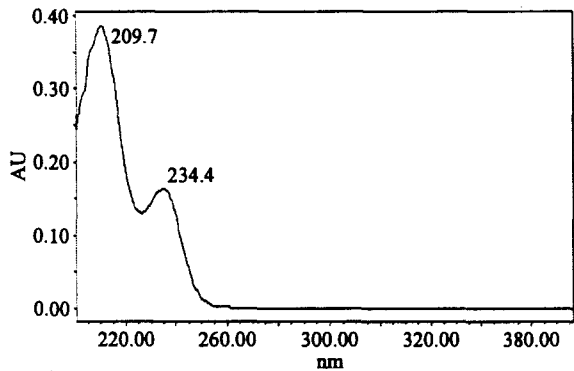


图 5 三聚氰胺标准品 DAD 光谱图
Fig.5 DAD spectral of melamine

2 结果与讨论

2.1 提取液的选择

三聚氰胺呈弱碱性,在酸溶液中有较好的溶解性,但在强酸有不同程度的水解^[2]. 针对三聚氰胺可稳定存在的酸度范围,选择乙酸、三氯乙酸和盐酸为酸度调节液,设置不同浓度组考察各酸溶液提取三聚氰胺的效率(见表 1). 结果表明,1% 三氯乙酸溶液、0.1 mol/L 盐酸溶液提取效果都比较理想,乙酸溶液的提取效果不如前二者. 考虑到研究样品中含有较多的蛋白基质,而 1% 三氯乙酸溶液较 0.1 mol/L 盐酸溶液有更好的促蛋白变性作用,因此,选择 1% 三氯乙酸溶液为样品提取液.

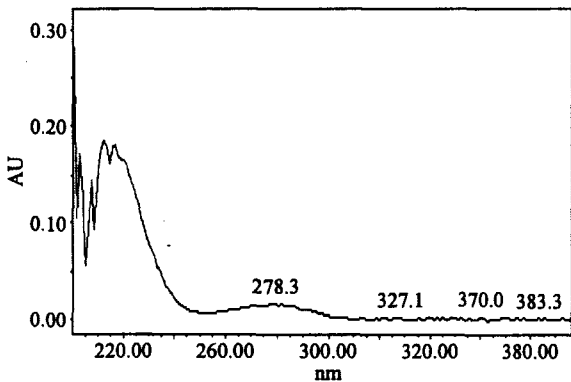


图 6 三聚氰胺阴性样品 DAD 光谱图
Fig.6 DAD spectral of melamine negative sample

表 1 不同酸对三聚氰胺的提取率
Table 1 Extraction rate of different acid medium

提取液	盐酸/(mol · L ⁻¹)			三氯乙酸/%			乙酸/%		
	0.05	0.10	0.20	1.0	2.0	3.0	1.0	3.0	5.0
提取率/%	77.0	90.0	82.0	95.0	81.0	75.0	69.0	77.0	71.0

2.2 色谱条件优化

三聚氰胺在水相中表现出较强的极性,在常规的反相洗脱系统保留时间很短,共流出现象严重,增加洗脱体系的酸度可改善其色谱保留行为^[4]. 经实验考察,选定 1% 三氯乙酸:乙腈(90:10)为流动相,获得三聚氰胺色谱保留时间见图 2、图 3,结果表明此色谱条件能满足分析需要.

2.3 线性范围

在最佳实验条件下按实验方法操作,以峰面积作定量指标,提取波长为 235 nm,方法在选定的浓度范围内有良好的线性关系($Y = 38357.01931X - 40850.40182, r^2 = 0.999$). 提示在 DAD 光谱确认无阴性干扰前提下,该法可直接用于样

品三聚氰胺杂质的定量测定.

2.4 检出限和精密度

取 1.2 项下标准溶液不断稀释后,按 1.4 条件操作,以 10 倍信噪比确定二极管阵列检测器检测低限为 0.5 mg/kg,可变波长紫外检测器检测限为 0.14 mg/kg.

取阳性样品按 1.3 项操作方法处理后平行测定 11 次,得到相对标准偏差(RSD)为 0.51%,表明该方法的精密度比较好.

检出限和精密度结果说明本次研究满足蛋白类保健食品中非法添加的三聚氰胺的快速筛查.

2.5 样品测定

按 1.3、1.4 实验方法操作,对 5 种含蛋白类

保健食品、三个控制样品测定,结果见表 2. 检测结果与现行监测方法测定报告结果相吻合.

表 2 样品测定结果
Table 2 Determination results of samples

检品名称	称量样/g	定容体积/mL	检验结论
美澳健牌胶原蛋白片	1.001	20	未检出
纽崔莱高蛋白饮品 371	1.097	20	未检出
健之嘉牌大豆蛋白粉冲剂	1.067	20	未检出
健之嘉牌螺旋藻片	1.166	20	未检出
嵩珍牌蛋白质粉	1.015	20	未检出
阳性控制样 1(三鹿奶粉)	1.001	20	检出
阳性控制样 2(伊利奶粉)	1.002	20	检出
阴性控制样(风行学生纯牛奶)	10ml	20	未检出

3 结论

本次研究建立了含蛋白类保健食品中三聚氰胺残留量的高效液相色谱-二极管阵列检测器法快速定性筛查方法. 实践表明该方法用于实际样品具有定性快速准确,操作简便的优点,特别适用于大批量样品的筛查工作.

参考文献:

[1] 林祥海,王建峰,贾广乐,等. 三聚氰胺的毒性研究

[J]. 毒理学杂志,2008,22(3):216-218.

[2] 张美金,林海丹,林峰,等. 高效液相色谱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.
[3] 胡阶明. Spectra-Quad 实现三聚氰胺含量在线检测[J]. 食品安全导刊,2008,2(2):56-57.
[4] 丁涛,徐锦忠,李健忠,等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器法及高效液相色谱-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.

(上接第 73 页)

使人们可以更加简单方便地复用成功的设计和体系结构,将已证实的技术表述成设计模式,使新系统开发者更加容易理解其设计思路,一个熟悉这些模式的设计者不需要再去发现,而能够立即将其应用于设计问题中,实现了更高的灵活性和复用性.

参考文献:

[1] 李天科. 以人为本的人机界面设计思想[J]. 计算机

工程与设计,2005,6(5):1228-1229.

[2] 杨莉萍. 面向对象的方法和设计模式[J]. 计算机应用与研究,2006,23(3):36-38.
[3] 张友生,徐锋. 系统分析师技术指南[M]. 北京:清华大学出版社,2007.
[4] 曹恒,凌正阳,蒋知峰,等. 软件设计模式在数控系统人机界面开发中的应用[J]. 华东理工大学学报(自然科学版),2007,33(6):878-880.
[5] 宋艳钊. 设计模式在 MVC 框架的 Web 开发中的应用[J]. 微计算机信息,2008,24(3):215-217.