

高效液相色谱法快速测定乳粉中的三聚氰胺与双氰胺

杨 嘉¹, 丁娟芳², 周元元¹, 徐 秋¹, 朱 姜¹, 王 帅¹

(1.扬州市产品质量监督检验所, 江苏 扬州 225111; 2.扬州职业大学生物与化工工程学院, 江苏 扬州 225009)

摘 要: 建立高效液相色谱-二极管阵列检测器同时检测乳粉中三聚氰胺和双氰胺的分析方法。采用1%三氯乙酸溶液提取样品中的三聚氰胺和双氰胺, 氨基柱为分析柱, 流动相为乙腈-水(75:25, V/V), 流速1.0 mL/min, 检测波长233 nm。2种物质在0.005~60 mg/L范围内与其峰面积线性关系良好, 不同添加水平的回收率在83.2%~102.6%, 三聚氰胺和双氰胺的方法定量限分别为0.17、0.15 mg/kg, 方法变异系数为2.3%~7.2% ($n=6$)。此方法操作简便、快速、成本低, 适用于乳粉中三聚氰胺和双氰胺的同时检测。

关键词: 高效液相色谱; 二极管阵列检测器; 乳粉; 三聚氰胺; 双氰胺

Rapid Determination of Melamine and Dicyandiamide in Milk Powder by High Performance Liquid Chromatography

YANG Jia¹, DING Juan-fang², ZHOU Yuan-yuan¹, XU Qiu¹, ZHU Jiang¹, WANG Shuai¹

(1. Yangzhou Products Quality Supervision and Inspection Institute, Yangzhou 225111, China;

2. College of Biological and Chemical Engineering, Yangzhou Polytechnic College, Yangzhou 225009, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-diode array detector (DAD) method was developed for rapid and simultaneous determination of melamine and dicyandiamide in milk powder. Melamine and dicyandiamide were extracted with 1% trichloroacetic acid solution. The chromatographic separation was performed on an amino column using acetonitrile-water (75:25, V/V) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, and the analytes were detected with a DAD detector at 233 nm. The two compounds were well separated with a good linear relationship in the wide range of 0.005–60 mg/L. The average recoveries in milk powder were in the range of 83.2%–102.6% at several spiked levels. The lowest limits of quantification for melamine and dicyandiamide were 0.17 and 0.15 mg/kg, respectively, and the precision of the method expressed as coefficient of variance (CV) was in the range of 2.3%–7.2% ($n=6$). This method is simple, rapid, low-cost and suitable for the simultaneous determination of melamine and dicyandiamide in milk powder.

Key words: high performance liquid chromatography; diode array detector; milk powder; melamine; dicyandiamide

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)06-0172-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201406037

近年来, 国内外乳品质量安全事件频发, 2008年三鹿奶粉三聚氰胺事件和2013年1月新西兰乳品的双氰胺事件由于关系到未成年人这个特殊的消费群体, 引起了社会各界的广泛关注。

三聚氰胺, 化学式 $C_3H_6N_6$, 又称蜜胺或氰尿酸, 是一种重要的氮杂环有机化工原料。部分不法分子通过向乳品中添加三聚氰胺来提高产品的含氮量, 谋取不法利润; 一些食品包装材料中也含有三聚氰胺, 与食品接触时会发生微量迁移^[1]。双氰胺, 化学式 $C_2H_4N_4$, 化肥工业中常用作硝化抑制剂以提高氮肥利用率和减少氮肥对环境的污染^[2-3], 奶牛摄食喷洒了双氰胺的牧草后, 分泌的乳汁中会有少量残留; 与三聚氰胺一样, 双氰胺也是

成本低廉且性状稳定的非蛋白类高氮物质, 极有可能以较高的质量浓度被非法添加到食品中。资料显示, 2种物质都会对人体健康构成已知或潜在的威胁^[4-6], 不同来源的添加或带入使得产品中目标物的质量浓度值可能会横跨多个数量级, 所以研究建立快速、低成本、线性范围宽的检测方法很有意义。

目前, 三聚氰胺的检测方法比较成熟, 除常用的色谱检测法(液相色谱法^[7-8]、液相色谱-质谱法^[9]、气相色谱-质谱法^[10]等)外, 还有光谱检测法^[11-12]、免疫学检测法^[13]等多种方法。食品中双氰胺的检测方法也有报道^[14-17], 利用液相色谱-质谱法进行检测, 虽然在分辨率和灵敏度方面有一定优势, 但硬件配置门槛较高, 推广应用受到一

收稿日期: 2013-07-03

作者简介: 杨嘉(1982—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品检验技术。E-mail: jiajia82112001@163.com

定限制。目前,食品中三聚氰胺和双氰胺的同时检测方法未见报道,本实验旨在建立一种快速、有效的检测方法,为这2种物质的同时测定提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳粉 外来送检样品。

三聚氰胺、双氰胺标准品(纯度99%) 美国Sigma-Aldrich公司;甲醇、乙醇、乙腈(均为色谱纯) 美国Tedia公司;氨水、丙酮、乙酸锌、亚铁氰化钾、乙酸铅、三氯乙酸(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;实验用水符合GB/T 6682—2008《国家实验室用水规格和试验方法》分析实验室一级水要求。

1.2 仪器与设备

1200高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器) 美国Agilent公司;Milli-Q Academic超纯水仪 美国Millipore公司;CP225D型电子天平 德国Sartorius公司;Vortex-Genie 2涡旋振荡器 美国Scientific Industries公司;0.22 μm 针式微孔滤膜过滤器 上海安谱公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Asahipak NH2P-50 4E氨基柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);柱温40 $^{\circ}\text{C}$;进样量10 μL ;流动相乙腈-水(75:25, V/V),其中每100 mL水中添加25%氨水0.2 mL;流速1.0 mL/min;检测波长233 nm。

1.3.2 标准溶液的配制

准确称取三聚氰胺、双氰胺标准品,用甲醇溶解得到质量浓度均为1 000 mg/L的标准储备液,用甲醇稀释标准储备液,配制成不同质量浓度的标准使用液(表1),绘制标准曲线,确定线性范围。

表1 标准溶液质量浓度

Table 1 Serial dilution concentrations of standard solutions of melamine and dicyandiamide

标准物质	mg/L									
	低质量浓度标准使用液					高质量浓度标准使用液				
三聚氰胺	0.005	0.01	0.02	0.1	0.2	0.5	0.5	2.0	5.0	20
双氰胺	0.005	0.01	0.02	0.1	0.2	0.5	0.5	2.0	5.0	20

1.3.3 样品处理

称取2 g均匀样品(准确至0.000 1 g),置于50 mL具塞刻度试管中,加水10 mL,充分溶解后加入1%三氯乙酸溶液定容至满刻度,剧烈振荡5 min后静置20 min,上清液经0.22 μm 水系滤膜过滤,供仪器分析使用。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 色谱柱

三聚氰胺和双氰胺都含有胺基,具有较强的极性,因此在传统的 C_8 和 C_{18} 反相柱上不易保留,需要使用离子对试剂,后者也是药物分析中检测双氰胺的常用方法^[18]。利用 C_{18} 柱配合离子对试剂对目标成分进行色谱条件的优化,但由于食品基体成分的复杂性,目标物的同时分离效果不佳。氨基柱能用于分离极性较大的物质,根据待测物质的性质和文献[19-20]报道,本实验最终选择氨基柱作为分析色谱柱。

2.1.2 检测波长

取质量浓度为2.0 mg/L的混合标准使用液及待检样品处理液,在190~400 nm波长处进行扫描,发现2种物质在213 nm和233 nm波长处有较大的共同吸收峰(图1)。由于甲醇和乙腈在213 nm波长附近有紫外吸收,故选择谱图干扰较少的233 nm作为检测波长。

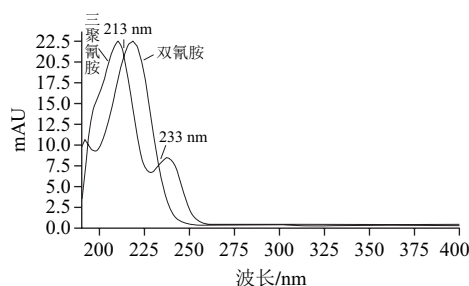


图1 三聚氰胺和双氰胺的吸收光谱图

Fig.1 Absorption spectra of melamine and dicyandiamide

2.1.3 流动相

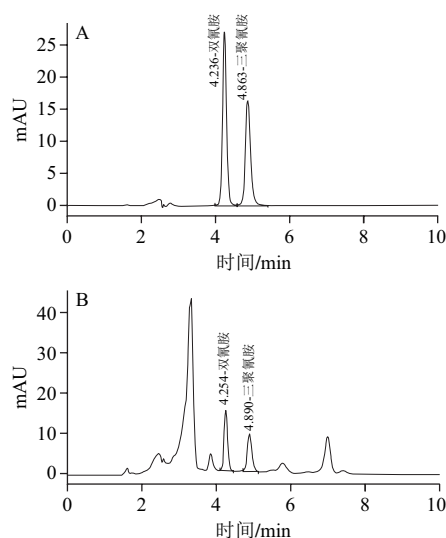


图2 混合标样(2.0 mg/L) (A)、添加混合标样的阴性样品(1.0 mg/kg) (B) 色谱图

Fig.2 Chromatograms of mixed standards (2.0 mg/L) (A) and blank sample spiked with mixed standards (1.0 mg/kg) (B)

比较了乙腈和水的不同配比,结合标样色谱图峰形和样品处理液的分离效果(图2),确定了最佳的流动相条件为乙腈-水(75:25, *V/V*)。由于提取试剂三氯乙酸溶液显酸性,所以在流动相中加入了少量氨水以防止氨基柱键合官能团的水解,延长色谱柱的使用寿命。

2.2 提取方法的优化

根据2种物质的溶解性并参考相关文献[21-22],选择了甲醇、乙醇、乙腈、丙酮和1%三氯乙酸作为提取试剂进行定容,配合2种沉淀方法(1.加水溶解样品后加入1.5 mL 10%亚铁氰化钾和1.5 mL 20%乙酸锌;2.加水溶解样品后加入2 mL 20 g/L乙酸铅)进行提取条件的筛选和优化。实验中样品加标质量浓度为2.0 mg/kg,每组条件平行测定3次。从表2可以看出,不使用沉淀剂,直接用甲醇或1%三氯乙酸定容、振荡提取,三聚氰胺和双氰胺的平均回收率均能达到90%以上。用相同的实验条件重复测定6次,进行统计分析,结果显示,甲醇和三氯乙酸对双氰胺的回收率平均值相近,且差异不显著;而三氯乙酸对三聚氰胺的提取效果略优于甲醇(表3)。

三氯乙酸是国际上常用的检测蛋白含量的预处理方法,可实现样品中蛋白态氮与非蛋白态氮的分离^[23],本实验也采用该方法对样品进行前处理。

表2 不同提取方法的回收率 (*n*=3)

Table 2 The recoveries of melamine and dicyandiamide by different extraction methods (*n* = 3)

化合物	提取溶剂	回收率/%		
		沉淀方法1	沉淀方法2	直接提取
三聚氰胺	甲醇	78.40±2.92	76.03±1.93	93.64±1.76
	乙醇	76.13±3.06	77.66±2.05	83.61±3.75
	乙腈	86.30±1.56	79.28±2.39	93.17±2.10
	丙酮	74.66±2.21	74.91±3.00	76.33±2.75
	1%三氯乙酸	89.34±3.60	91.95±2.76	96.23±1.50
双氰胺	甲醇	92.60±1.22	91.57±3.52	95.27±1.64
	乙醇	92.28±2.40	90.36±2.57	92.40±3.12
	乙腈	76.72±4.34	83.30±2.90	88.52±3.77
	丙酮	90.53±2.92	92.76±2.39	91.38±3.29
	1%三氯乙酸	89.33±3.47	85.10±3.10	95.77±1.20

表3 甲醇和1%三氯乙酸提取方法回收率 (*n*=6)

Table 3 The recoveries of melamine and dicyandiamide using methanol or 1% trichloroacetic acid solution as the extraction solvent (*n* = 6)

化合物	甲醇提取		1%三氯乙酸提取	
	回收率	RSD	回收率	RSD
三聚氰胺	93.77 ^a	1.86	96.07 ^b	1.58
双氰胺	95.56 ^a	2.04	95.85 ^a	1.80

注:同行肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 方法线性范围、回收率、精密度、检出限和定量限

按1.3.2节配制混合标准使用液、按1.3.1节色谱条件进行测定,以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制曲线,在不同质量浓度范围内,标准品的质量浓度与峰面积值具有良好的线性关系;以基线噪声3倍峰面积对应

的样品检出浓度作为检出限,以10倍峰面积对应的样品检出浓度作为定量限。准确称取阴性样品,进行3个水平的加标测试,每个水平测定6次,计算回收率和精密度,结果见表4。结果显示,不同添加水平下,回收率和变异系数均满足实验室分析要求。

表4 方法线性范围、回收率、精密度、检出限和定量限 (*n*=6)

Table 4 Linear range, recovery, repeatability, LOD and LOQ of the method (*n* = 6)

化合物	线性范围/(mg/L)	相关系数 (R^2)	添加水平/(mg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
三聚氰胺 (低质量浓度)	0.005~0.5	0.999 8	0.01、0.1、0.4	86.8~95.9	5.9~6.4	0.05	0.17
三聚氰胺 (高质量浓度)	0.5~60	0.999 9	0.5、5、50	90.3~102.6	2.3~3.2		
双氰胺 (低质量浓度)	0.005~0.5	0.999 9	0.01、0.1、0.4	83.2~91.3	4.3~7.2	0.04	0.15
双氰胺 (高质量浓度)	0.5~60	0.999 9	0.5、5、50	89.7~97.9	2.7~4.6		

我国规定了三聚氰胺在婴儿配方食品中的限量值为1 mg/kg,其他食品中三聚氰胺的限量值为2.5 mg/kg^[24]。双氰胺污染目前尚不具有显著的公共卫生意义,国家也未制定限量标准,有资料显示其毒性低于三聚氰胺^[4]。综合上述情况,本检测方法的定量限完全能够满足日常食品检验的要求。

2.4 实际样品的测定

使用本方法对外来送检的34个乳粉样品进行了检测,其中有16个样品标称为进口奶源。结果在其中一个进口原料乳粉中检出双氰胺残留,其含量为0.72 mg/kg,而三聚氰胺未检出。双氰胺阳性样品色谱图见图3。

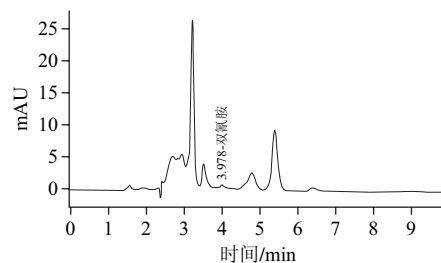


图3 阳性样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of positive sample

3 结论

本实验建立了高效液相色谱法同时测定乳粉中三聚氰胺和双氰胺质量浓度的检测方法,通过1%三氯乙酸溶液的提取及氨基色谱柱的分离,取得了较理想的实验效果,方法精密度和回收率能满足实际检测的要求。本方法前处理简单、操作性强,利用二极管阵列检测器进行定性,成本低于质谱检测法,降低了实验室检测的门槛,易于推广,适用于日常检测中的分析定量。

参考文献:

- [1] ISHIWAYA H, INOUE T, TANIMURA A. Migration of melamine and formaldehyde from tableware made of melamine resin[J]. Food Additives and Contaminants, 1986, 3(1): 63-69.
- [2] MONAGHAN R M, SMITH L C, de KLEIN C A M. The effectiveness of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) in reducing nitrate leaching and nitrous oxide emissions from a grazed winter forage crop in southern New Zealand[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2013, 175: 29-38.
- [3] 李香兰, 徐华, 蔡祖聪. 氢醌、双氰胺组合影响稻田甲烷和氧化亚氮排放研究进展[J]. 土壤学报, 2009, 46(5): 917-924.
- [4] 贾广乐, 王建峰, 林祥梅, 等. 三聚氰胺等4种物质的毒性比较研究[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(12): 162-163.
- [5] IPCS INCHEM, Canadian Centre for Occupational Health and Safety. Organization for economic cooperation and development. screening information data set for melamine, CAS#108-78-1[EB/OL]. (1999-02-26) [2013-03-14]. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/108781.pdf>.
- [6] OKUMURA M, HASEGAWA R, SHIRAI T, et al. Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the nongenotoxic agents thymine or melamine[J]. Carcinogenesis, 1992, 13(6): 1043-1045.
- [7] 刘立萍. 高效液相色谱法测定奶制品中的三聚氰胺[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 385-388.
- [8] 国家标准化管理委员会. GB/T 22388—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.
- [9] 吕水源, 井伟, 李小品, 等. 亲水作用色谱串联质谱同时检测食品接触产品中三聚氰胺和三聚氰酸单体迁移量[J]. 食品科学, 2012, 33(16): 159-162.
- [10] 李东刚, 李春娟, 鞠福龙, 等. 非衍生-气相色谱串联质谱法测定饲料中三聚氰胺[J]. 中国测试, 2009, 35(4): 65-67; 71.
- [11] KIM B, PERKINS L B, BUSHWAY R J, et al. Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2008, 91(2): 408-413.
- [12] LACHENMEIER D W, HUMPFER E, FANG F, et al. NMR spectroscopy for non targeted screening and simultaneous quantification of health-relevant compounds in foods: the example of melamine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16): 7194-7199.
- [13] 汤慕瑾, 张恒, 郑晓燕, 等. 酶联免疫吸附法快速测定不同样品基质中三聚氰胺[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(4): 340-343.
- [14] MACMAHON S, BEGLEY T H, DIACHENKO G W, et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1220: 101-107.
- [15] 王祖翔, 蒋俊, 孙莉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的尿素、缩二脲与双氰胺[J]. 分析测试学报, 2012, 31(5): 593-599.
- [16] 许娇娇, 张京顺, 黄百芬, 等. 液相色谱-串联质谱同位素稀释法测定奶粉中双氰胺的残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 415-420.
- [17] 黄芳, 马叶芬, 吴惠勤, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定奶粉中的双氰胺[J]. 分析测试学报, 2013, 32(3): 271-274.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 625-626.
- [19] 肖道清, 曹国洲, 朱晓艳, 等. 高效液相色谱法测定蜜胺-甲醛制品中三聚氰胺的特定迁移量[J]. 分析试验室, 2010, 29(5): 76-78.
- [20] CHOU S S, HWANG D F, LEE H F. High performance liquid chromatographic determination of cyromazine and its derivative melamine in poultry meats and eggs[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2003, 11(4): 290-295.
- [21] 乔勇升, 李兴根, 韩芷玲, 等. 高效液相色谱对液态奶中三聚氰胺的快速测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(10): 1202-1205.
- [22] 徐晨, 许婷婷, 白素琴, 等. 原料奶中三聚氰胺检测的三种前处理方法比较[J]. 中国食品添加剂, 2012, 23(6): 242-245.
- [23] BARBANO D M, LYNCH J M, FLEMING J R. Direct and indirect determination of true protein content of milk by kjeldahl analysis collaborative study[J]. Journal of AOAC International, 1990, 73(1): 281-288.
- [24] 卫生部, 工业和信息化部, 农业部, 国家工商行政管理总局. 联合公告2011年第10号: 关于三聚氰胺在食品中的限量值的公告[EB/OL]. (2011-04-06) [2014-03-14]. <http://www.moh.gov.cn/sps/s7891/201104/9f1311e1e97649f3a26a6b7f7b3d7ae3.shtml>.