

# 反相高效液相色谱法测定饲料中三聚氰胺的含量

王亚吨, 林海丹, 邓国东, 梁祺琦

(农业部饲料质量监督检验测试中心<广州>, 广东 广州 510230)

[中图分类号]S816.2

[文献标识码]C

[文章编号]1005-8613(2008)03-0041-03

三聚氰胺(Melamine), 别名又称蜜胺、氰尿酸胺、三聚氰酰胺, 一种重要的氮杂环有机化工原料。为纯白色单斜晶体, 分子式为  $C_3N_6H_6$ , 结构式如图 1。比重 1.573(14), 熔点 354, 沸点升华。能溶于甲醛、乙酸、热乙二醇、甘吡啶, 微溶于水及醇, 不溶于醚、苯和四氯化碳, 与盐酸、硫酸、硝酸、乙酸、草酸等都能形成盐。

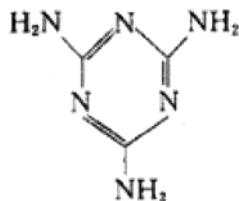


图 1 三聚氰胺分子结构图

目前国际上通常采用凯氏定氮法测定饲料中粗蛋白质的含量, 即以含氮量的多少乘以 6.25 得出蛋白质含量。其主要问题是只要在饲料中添加一些含氮量高的化学物质, 就可在检测中造成蛋白质含量达标的假象。由于三聚氰胺分子中含有大量氮元素, 饲料中非法添加化工原料, 可以提高蛋白质检测数值, 而用全氮测定法测饲料和食品中的蛋白质含时时根本不会区分这种伪蛋白氮。

2007年 3-4 月份, 美国发生多起猫、狗等宠物中毒死亡事件。美国食品药品监督管理局在随后的调查发现, 回收的宠物食品所用的小麦麸蛋白添加物中有较高浓度的三聚氰胺存在。目前三聚氰胺在饲料及食品中的残留检测分析报道较少, 我们对农业行业标准 NY/T1372-2007 进行了优化改进, 建立了饲料中三聚氰胺的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

[收稿日期]2008-02-25

[作者简介]王亚吨(1972-), 女, 药师, 主要从事饲料及饲料中药物残留检测。

美国 Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, 配二极管阵列检测器及化学工作站; 日本 MG-2100 型氮吹仪; 广州仪科实验室技术有限公司 KS501 digital 型振荡器、MS2 旋涡振荡器及 IKA Basic 均质器; 德国 Sartorius BP121S 型电子分析天平, 感量为 0.0001g; 德国 Eppendorf 公司 5804R 冷冻离心机; 津腾 0.45  $\mu\text{m}$  针筒式微孔滤膜过滤器, 天津赛特恩斯超声波清洗器, 美国 Phenomenex 公司 Strata-X-C(混合型阳离子交换柱, 60mg/3mL), 美国 J.T. Baker 固相萃取仪, CyberScan 510 型 pH 计。

### 1.2 试剂

三聚氰胺对照品(由国家饲料质量监督检验中心<北京>提供, 含量为 99.0%), 乙腈、甲醇与庚烷磺酸钠为色谱纯, 其他试剂如氨水、乙酸、乙酸铅等均为分析纯, 实验用水为 Millipore 超纯水。

### 1.3 溶液配制

1.3.1 1% 乙酸溶液: 量取 5mL 冰乙酸于 500mL 容量瓶, 加水稀释并定容至刻度。

1.3.2 5% 氨水甲醇溶液: 量取 5mL 氨水于 100mL 容量瓶, 加甲醇定容至刻度。

1.3.3 乙酸铅溶液 22g/L: 取 11g 乙酸铅用 300mL 水溶解后定容到 500mL。

1.3.4 20% 甲醇溶液: 取 200mL 甲醇, 加入 800mL 水, 混匀。

1.3.5 流动相: 取 2.02g 庚烷磺酸钠于 1L 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 加乙酸调 pH 到 3.3。取该溶液 850mL, 加入 150mL 乙腈, 混匀, 过滤、脱气。

1.3.6 三聚氰胺标准贮备液: 准确称取三聚氰胺对照品 0.0505g 于 50mL 容量瓶中, 用甲醇溶液超声溶解并定容, 即为 1000  $\mu\text{g/mL}$  三聚氰胺标准贮备液。

1.3.7 三聚氰胺标准工作液: 取适量三聚氰胺标准贮备液, 用甲醇溶液稀释使成浓度为 1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、10.0  $\mu\text{g/mL}$ 、25.0  $\mu\text{g/mL}$ 、50.0  $\mu\text{g/mL}$  5 个标准系列。

1. 4 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Luna C8 柱( 4.6mm i.d. ×250mm, 5 μm) ;流速 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 ;检测波长: 240nm.

1. 5 试验方法

1. 5.1 样品处理方法: 饲料样品用匀浆机混碎, 称取 5.0g 试样(精确至 0.01g)于 150mL 具塞锥形瓶中, 准确加入 50mL 1%乙酸溶液, 加入 2.0mL 乙酸铅溶液, 摇匀, 超声提取 20min. 静止 2min, 取上层液约 30mL 于 50mL 具塞离心管中, 10 000r/min 离心 5min. 取上清液 10mL 分次过预先经 3mL 甲醇和 3mL 水活化的 Strata- X- C 柱, 再用 3mL 水和 3mL 甲醇洗涤固相萃取柱, 抽干后用 3 mL 氨水甲醇溶液洗脱, 50 氮气吹干, 准确加入 2.0mL 甲醇溶液, 旋涡振荡 1min, 过 0.45 μm 滤膜后上机测定.

1.5.2 标准曲线: 将三聚氰胺标准工作液(浓度为 1.0 μg/mL, 5.0 μg/mL, 10.0 μg/mL, 25.0 μg/mL, 50.0 μg/mL), 依次从低浓度到高浓度, 按 “1.4 色谱条件” 进行 HPLC 分析, 每一浓度平行测定, 将其所得峰面积的平均值(A) 与所对应的标准溶液浓度(C) 作直线回归, 求得标准曲线方程和相关系数.

1.5.3 空白试验: 称取空白配合饲料 5.00g, 不添加任何三聚氰胺标准溶液, 按 “1.5.1 样品处理方法” 处理后上机测定, 以考察样品中杂质峰对三聚氰胺峰有无影响.

1.5.4 回收率及精密度测定: 称取空白饲料 5.00g, 加入 0.05mL 标准贮备液, 混匀后, 静置 30min, 制成 10mg/kg 添加样品. 按 “1.5.1 样品处理方法” 处理后上机测定. 将所得到的峰面积代入标准曲线求得实测浓度, 将实测浓度与添加浓度进行比较, 得出配合饲料中药物回收率. 连续测 6 次, 求出方法的精密度.

2 结果与讨论

2.1 最佳波长的选择

用含三聚氰胺 5 μg/mL 的标准工作液进样 HPLC 分析, 用二极管阵列检测器在波长 190 ~ 400nm 范围进行扫描(图 2), 结果表明三聚氰胺在 208nm 和 236nm 处吸收值高, 考虑到在 208nm 处饲料中的干扰因素较大, 且各文献均采用 240nm 作为分析波长, 因此本试验选择 240nm 作为检测波长.

2.2 流动相的选择

三聚氰胺显弱碱性, 试验比较了不加离子对试

剂和加离子对试剂流动相体系, 结果表明添加离子对试剂的流动相体系更适合三聚氰胺的检测, 峰型较好. 因而流动相参照 NY/T1372- 2007 并进行了优化, NY/T1372- 2007 标准的流动相由 0.01mol/L 庚烷磺酸钠和 0.01M 柠檬酸水溶液与乙腈组成, 如完全采用则峰形不好, 故流动相采用 0.01mol/L 庚烷磺酸钠(用乙酸调 pH 为 3.3) 与乙腈(85:15) 为流动相, 三聚氰胺组分的分离效果和峰形较好, 且保留时间为 7.10min 左右, 较为适宜. 图 3 为浓度为 5.0 μg/mL 的三聚氰胺标准溶液在此流动相条件下的色谱图.

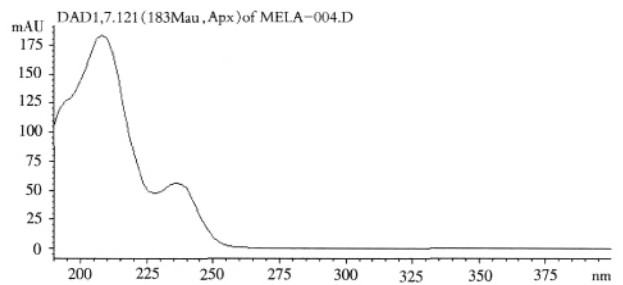


图 2 三聚氰胺标准紫外光谱图

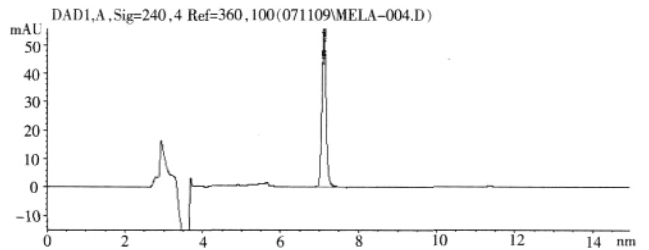


图 3 5.0 μg/mL 的三聚氰胺标准溶液色谱图

2.3 标准曲线的线性关系

三聚氰胺的标准曲线拟合线性方程为  $A = 77.685C + 32.66$  (见图 4), 在浓度为 1.0 ~ 50 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数  $r = 0.9997$ .

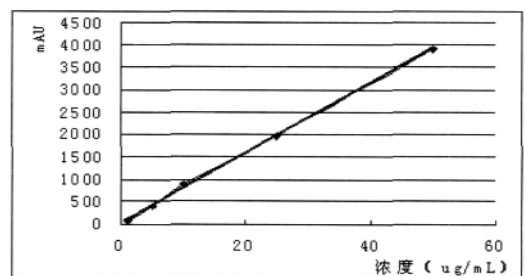


图 4 三聚氰胺标准曲线

2.4 空白试验

不含三聚氰胺的猪配合饲料及添加三聚氰胺的样品处理后的色谱图分别见图 5 和图 6. 从图中可以看出样品中杂质峰对三聚氰胺出峰没有影响,

# 春季池塘工作要点

罗敏辉

(海大集团华中区技术服务部, 广东 广州)

[中图分类号]S916.1

[文献标识码]C

[文章编号]1005-8613(2008)03-0043-03

## 1 鱼塘改造

利用冬闲时节改造鱼池, 挖掉过多的淤泥, 淤泥只需保留 15~20cm 厚, 并整修加固池埂, 堵塞漏洞, 平整塘底, 并抓好清塘除杂的工作。

## 2 清塘消毒, 培肥水质

放养前必须清除野杂鱼, 杀灭病原体, 以提高鱼种成活率和饲料利用率。鱼塘清塘常用的药物有生石灰、茶饼、漂白粉、巴豆等。其中以生石灰清塘效果最好, 不仅能增加池中钙质, 而且能促进池塘淤泥中有机物的矿化, 可以起到提肥的作用。孔雀石绿和五氯酸钠作为国家严令禁止使用的药物, 一定不要使用。有的地方的养殖户使用农药清塘, 只有除杂效果, 对杀灭水中的病原菌刚一点效果也没有。

消毒须选择在晴天进行, 干法消毒每 667m<sup>2</sup> 用生石灰 50~80kg, 塘中须留积水 5~10cm, 每 667m<sup>2</sup>

用生石灰 120~150kg, 要求把石灰撒均匀, 最好在第二天用耙子耙一遍, 以增强消毒效果。带水消毒可以加水到 50~60cm, 每 667m<sup>2</sup> 用生石灰 150~250kg, 化浆全塘泼洒。

鱼塘消毒 5 天后, 加水到 60~100cm。在鱼种投放前最好能先放几条鱼试水, 如果 24 小时后没问题, 就可以大量投放鱼种了。

## 3 鱼种的选择

同龄的鱼种规格求整齐, 发育良好, 色泽光亮, 体质粗壮, 游泳活泼, 溯水力强。在网箱中密集时, 头下尾上, 看上去只见尾巴扇动不见头。离水后尾不弯曲, 口和鳃盖不张开, 跳动激烈。体表和鳃丝不见寄生虫, 鱼体和鳞片完整无创伤。草鱼种的规格最好在 12cm 以上。

不要从有病毒性疾病发病历史的池塘购买鱼种。最好到大规模的鱼种生产基地购买苗种, 这样近亲繁殖的可能性要小很多, 虽然价格高一些, 但苗种的抗病力强, 且生长速度快, 养殖成本低。

[收稿日期]2008-02-29

[作者简介]罗敏辉, 男, 技术服务经理, 主要从事水产饲料技术和销售工作。

可很好分离。

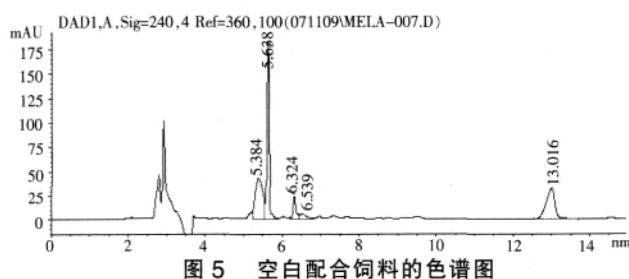


图5 空白配合饲料的色谱图

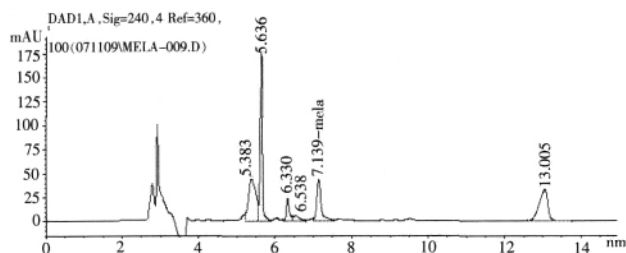


图6 空白组加 10mg/kg 三聚氰胺后的配合饲料

## 2.5 方法的取低检测浓度

以配合饲料中添三聚氰胺标准工作液, 经提取、净化、过滤, 以大于 10 噪声量的信号为准, 取样量为 5.00g 时, 方法定量限分别为 2.0mg/kg。

## 2.6 精密度和准确度试验

按“1.5.1 样品处理方法”的方法对空白配合饲料添加了 10mg/kg 三聚氰胺进行重复试验, 连续测定 6 次, 得出回收率和变异系数, 回收率均大于 80%, 变异系数小于 10%。

## 3 小结

本研究优化了高效液相色谱方法测定饲料中三聚氰胺的色谱分离条件。该方法线性关系良好, 有较高的回收率和较好的精密性, 饲料中杂质峰对三聚氰胺出峰干扰少, 方法简单, 易于操作, 准确度与精密性符合要求, 可用于配合饲料中三聚氰胺的检测。