

# 高效液相色谱 - 二极管阵列法测定 高蛋白食品中的三聚氰胺

Determination of melamine in high protein food by high performance liquid chromatography- photodiode array detector

汪 辉 曹小彦 彭新凯 陈利国 黄 辉 谭 舸

WANG Hui CAO Xiao-yan PENG Xin-kai CHEN Li-guo HUANG Hui TAN Ge  
(长沙市食品质量安全监督检测中心, 湖南 长沙 410013)

(Changsha Center of Supervision & Inspection on Food Quality Safety, Changsha, Hunan 410012, China)

**摘要:**建立用高效液相色谱 - 二极管阵列法测定高蛋白食品中的三聚氰胺的检测方法。对不同样品采用不同的前处理方法,然后用 Agilent TC-C18 4.6 × 250 mm 色谱柱,柱温为 40℃,流动相为 0.02 mol/L 硫酸铵 - 甲醇 = 94:6 (V/V),流速 0.8 mL/min,二极管阵列检测器于 235 nm 波长下进行检测,并以保留时间和三维光谱图相似性系数进行定性,外标法定量。不同样品的加标回收率为 98.8% ~ 101.5%,RSD 小于 1.2%。方法线性范围为 0.1 ~ 150 μg/mL,检测限为 0.01 μg/mL,相关系数  $R = 0.9999$ 。

**关键词:**高效液相色谱;二极管阵列检测器;三聚氰胺;高蛋白食品

**Abstract:** A high performance liquid chromatography- photodiode array detector for determining the content of melamine in high protein food was studied. In this paper, different pre-treatments were used in different samples. A Agilent TC-C18 column was used with methanol and 0.02 mol/L ammonium sulfate (94:6, V/V) as mobile phase. The flow rate was 0.8 mL/min. A diode array detector was used and the detection wavelength was 235 nm. Qualitative analysis was performed with retention time and DAD spectrum similarity index value and quantitative analysis was performed with external standard method. The calibration curve was linear over a range from 0.1 μg/mL to 150.0 μg/mL. The lowest detected limit was 0.01 mg/kg. The recoveries of different samples were from 98.8% to 101.5% and relative standard deviations were less than 1.0% (n = 10). The linearity was 0.1 to 150 μg/mL, detection limit of melamine was 0.01 μg/mL and related coefficient was 0.9999.

**Keywords:** High performance liquid chromatography; Photodiode array detector; Melamine; High protein food

最近美国发生了许多猫狗宠物非正常死亡事件。美国 FDA 经过调查确认是宠物食品的原料受非法添加的三聚氰胺污染。含三聚氰胺的食物被动物食用后,可以使动物发生肾衰竭并导致死亡。三聚氰胺 (Melamine) 即蜜胺,又称氰尿酸胺,是一种白色晶体,熔点 354℃,难溶于水、乙二醇、甘油和吡啶,略溶于乙醇,不溶于乙醚、苯和四氯化碳<sup>[1]</sup>。按常规三聚氰胺不可能通过环境污染的方式进入食品原料中。通常三聚氰胺只作为生产塑料树脂的原料,其分子中含有大量氮元素 (见图 1),不法分子在植物蛋白添加三聚氰胺,是因为其分子中含氮量高达 66.7%。非法添加化工原料三聚氰胺可以提高含氮量,冒充成高蛋白食品,从而大幅度降低成本。用“凯氏定氮法”测饲料和食品中的粗蛋白质的含量<sup>[2]</sup>,其实只是测氮的含量,再根据蛋白质的含氮量 (15% ~ 17%) 折算成蛋白质。因此,通常情况下根本不能区分这种“伪蛋白氮”。三聚氰胺在高温下可能分解产生氰化物 (有较大毒性),故应避免高温。

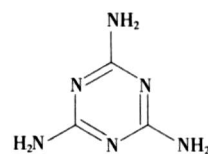


图 1 三聚氰胺的结构式

目前国内外测定食品中三聚氰胺含量的方法很少,一般采用气相 - 质谱法<sup>[3]</sup>、液相 - 质谱法、液相色谱法<sup>[4,5]</sup>等。本试验避开毒性大的乙腈,以甲醇和 0.02 mol/L 硫酸铵作为流动相,甲醇提取样品,吹干后 20% 的甲醇水溶解并定容,进样,用二极管阵列检测器检测,结果令人满意。

**作者简介:**汪辉 (1983 - ),男,长沙市食品质量安全监督检测中心助理工程师。E-mail: wanghui158@163.com

**通讯作者:**曹小彦

**收稿日期:**2007 - 06 - 18

## 1 试验材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Waters1525高液相色谱仪;配2996二极管阵列检测器、717Plus自动进样器、Epower工作站;

超纯水处理器:北京东西电子有限公司;

超声清洗器:天津奥特赛恩斯仪器有限公司;

氮吹仪:天津市恒皇科技发展有限公司;

三聚氰胺(99+ %):SNGMA-ALDRICH NC;

硫酸铵(分析纯):上海试剂四厂;

甲醇(色谱纯):国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 色谱条件

色谱柱为Agilent TC-C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm i d);柱温为40 °C;流速为0.8 mL/min;流动相为硫酸铵(0.02 mol/L) 甲醇 = 94 : 6(V/V);检测波长为235 nm;进样量10 mL<sup>[6]</sup>。

### 1.3 标准溶液的制备

精密称取三聚氰胺对照品25.0 mg于100 mL容量瓶中,加20%的甲醇水溶解并稀释至刻度,摇匀,使成为250 μg/mL的标准储备液。精密吸取三聚氰胺标准储备溶液0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL,分别置于25 mL容量瓶中,加20%的甲醇水稀释至刻度,摇匀,使成为浓度为5, 10, 20, 50, 100 μg/mL标准使用液,经0.45 μm的滤膜过滤,按色谱条件进行分析测试(见图2)。以组峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

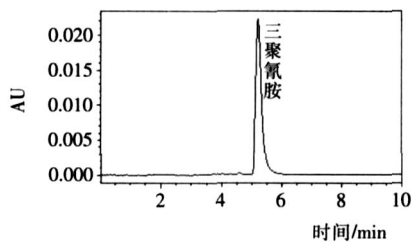


图2 标准溶液的色谱图

### 1.4 样品处理

1.4.1 固体样品 准确称取2.0~5.0 g固体样品于50 mL的比色管,超声波提取30 min,放置冷却后,用甲醇稀释至刻度,摇匀。静置30 min后取上清液10 mL氮吹至近干,用20%甲醇水定容至10 mL,经0.45 μm的滤膜过滤,待测。

1.4.2 液体样品 准确吸取5~10 mL液体样品置于50 mL比色管中,加入20%甲醇水40 mL,加入5%三氯乙酸5 mL,用20%甲醇水稀释至刻度,摇匀,4 000~8 000 r/min离心5 min,取上清液,经0.45 μm的滤膜过滤,待测(见图3)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测波长的选择与定性

取浓度为50 μg/mL的三聚氰胺标准使用液及某待检样

品,在200~400 nm波长处扫描,发现三聚氰胺在200~220 nm处有强烈的吸收,在234.1 nm处有吸收峰(见图4),在235.0 nm处的吸收峰峰型对称,存在的干扰少,且流动相在低于210 nm的波长下背景吸收较高,故选用235.0 nm为检测波长。样品中成分复杂,可采用二极管阵列检测器对其进行光谱扫描,并以保留时间和三维光谱图相似性系数进行定性。

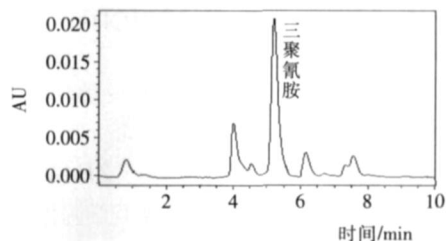


图3 样品的色谱图

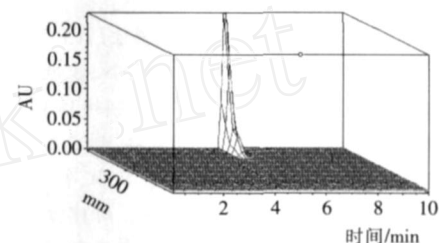


图4 标准溶液的3D图

### 2.2 流动相的优化

对不同流动相以及不同比例进行了多次试验。结果发现用乙腈为流动相时,乙腈正好在三聚氰胺出峰处有背景吸收,很难分离,且乙腈毒性大。采用硫酸铵(0.02 mol/L) 甲醇 = 94 : 6(V/V),三聚氰胺与流动相甲醇的背景吸收完全分开,且峰型对称,出峰时间比较理想。

### 2.3 沉淀剂的选择

因为三聚氰胺有三个胺基,易与金属离子络合,采用106 g/L亚铁氰化钾2 mL和219 g/L醋酸锌沉淀蛋白质2 mL时,三聚氰胺会有损失,回收率仅为55%。三聚氰胺是酰胺类物质,是可溶于三氯乙酸溶液的小分子。采用5%三氯乙酸沉淀蛋白质5 mL,效果非常理想,但时间不宜过长,避免三聚氰胺包含于沉淀中,降低提取率。

### 2.4 线性范围与检出限

在试验条件下,用峰面积比对浓度绘制曲线,三聚氰胺在0.1~150 μg/mL之间均具有良好的线性关系,以基线噪声三倍峰面积对应的三聚氰胺最低检测限为0.01 μg/mL,回归方程式为:

$$y = 2.99 \times 10^4 x - 4.00 \times 10^3$$

$$\text{相关系数 } R = 0.9999$$

(下转第124页)

### 3 结论

本试验方法利用次氯酸钠将食品中的甜蜜素转化为 N,N-二氯环己胺,以正己烷萃取后用高效液相色谱法测定<sup>[10]</sup>,待测组分能有效分离,样品测定的精密度、准确度较好,适用范围大,适用性强,便于在日常大批量检测中测定食品中甜蜜素的含量。在本试验方法的基础上,只需调整甲醇和乙酸铵的比例,就可以做苯甲酸、山梨酸、糖精钠试验,适合于检测同时添加了苯甲酸、山梨酸、糖精钠、甜蜜素等添加剂的含乳饮料、果汁饮料等产品。不需要使用气相色谱和液相色谱 2 种仪器,只需用液相色谱就可以了,避免了资源和能源的浪费。

#### 参考文献

- 1 闫福安. 国内外合成甜味剂的发展现状及趋势 [J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(1): 46~47.
- 2 赵耀. 人工合成甜味剂的特点及其发展趋势 [J]. 食品工业, 2004(8): 30~31.
- 3 GB2760—1996 食品添加剂使用卫生标准 [S]. 中国标准出版社, 1996, 17.
- 4 GB/T5009.97—2003 食品中环己基氨基磺酸钠的测定 [S]. 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会, 2004.
- 5 王凯云. 食品中甜蜜素的高效液相色谱法 [J]. 福建分析测试, 2004, 13(3): 2 041~2 043.
- 6 尹艳春, 李智红. 反相高效液相色谱法同时测定食品中甜蜜素、糖精钠和苯甲酸钠 [J]. 理化检验 - 化学分册, 2003, 39(8): 469~470.
- 7 万春花, 龙洲雄, 朱筱玲. 反相液相色谱法测定 胡萝卜素 [J]. 食品与机械, 2003(2): 37.
- 8 刘波. 甜蜜素检测方法研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2007(2): 218~222.
- 9 刘鹏春, 祁广建. 高效液相色谱法测定冷饮中甜蜜素含量 [J]. 中国公共卫生, 1997, 13(6): 345~345.
- 10 郑玲, 李丽华, 郭蔚, 等. 高效液相色谱法测定食品中的甜蜜素 [J]. 化学分析计量, 2005, 14(3): 50~51.
- 11 张秀尧. 反相高效液相色谱法测定食品中甜蜜素 [J]. 理化检验 - 化学分册, 2000, 36(10): 451~454.
- 12 温志海, 占春瑞, 鄢爱平. 液相色谱法测定酱油及其制品中甜蜜素的研究 [J]. 检验检疫科学, 2004, 14(2): 25~26.
- 13 郭伟, 张春晖, 周明超. 液相色谱 - 电喷雾质谱测定肉类中的磺胺类药物 [J]. 食品与机械, 2004, 22(6): 84~87.

(上接第 115 页)

#### 2.5 精密度试验

取三聚氰胺样品加标溶液做精密度试验,按上述色谱条件及试验方法分别对 50 μg/mL 和 100 μg/mL 两个不同浓度的样品加标溶液进行测定,重复进样 10 次, RSD 小于 1.2%, 说明该方法具有较高的精密度。

#### 2.6 回收率试验

采用加标测定回收率。取 3 种样品各 3 份,分别加入一定量的混合标准使用液。测定结果(见表 1,已去本底值)表明:平均回收率基本在 98.8%~101.5% 之间,完全可以满足日常分析的要求。

### 3 结论

此方法样品处理简便易行、快速。同时利用二极管阵列检测器定性,成本低于质谱,所测结果准确度高,易于推广,适于测定高蛋白食品中的三聚氰胺。

#### 参考文献

- 1 王箴. 化工辞典(第四版) [M]. 北京:化学工业出版社, 2003, 3.
- 2 张亚飞, 乐国伟, 施用晖, 等. 小麦蛋白 Alcalase 水解物免疫活性肽的研究 [J]. 食品与机械, 2006, 22(3): 44~46.
- 3 GC-MS Scem for the Presence of Melamine and Cyanuric Acid [S]. FDA/ORA Forensic Chemistry Center SOP T015, 2007.
- 4 Update FCC Developmental Melamine Quantitation (HPLC-UV) [S]. FDA/ORA Forensic Chemistry Center SOP, 2007.
- 5 吴明礼, 陈彩虹. 高效液相色谱法 (HPLC) 测定单氰胺中三聚氰胺的含量 [J]. 宁夏石油化工, 2005(2): 24~26.
- 6 施奈德 L R, 格莱吉克 J L, 柯克兰 J J. 实用高效液相色谱法的建立(第一版) [M]. 北京:科学出版社, 2000, 5.

表 1 三聚氰胺的回收率

样品	添加量	实测值	回收率	平均回收率
	/mg	/mg	/%	/%
肉脯	1.000	0.989	98.9	
	2.000	1.978	98.9	98.8
	3.000	2.958	98.6	
植物蛋白饮料	1.000	1.012	101.2	
	2.000	2.032	101.6	101.5
	3.000	3.055	101.8	
豆粉	1.000	0.986	98.6	
	2.000	1.976	98.8	98.8
	3.000	2.967	98.9	