

原料乳与乳制品中三聚氰胺的检测方法

刘海侠, 赵倩

(浙江福立分析仪器股份有限公司, 浙江 温岭 317500)

摘要: 试样用三氯乙酸溶液-乙腈提取, 经阳离子交换固相萃取柱净化后, 用高效液相色谱测定, 外标法定量。

关键词: 原料乳; 乳制品; 三聚氰胺

1 参考标准

依据国家标准《GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》

2 试剂和材料

2.1 试剂

2.1.1 乙腈: 色谱纯。

2.1.2 甲醇: 色谱纯。

2.1.3 氨水: 分析纯, 含量为 25%-28%。

2.1.4 三氯乙酸: 分析纯。

2.1.5 柠檬酸: 分析纯。

2.1.6 辛烷磺酸钠: 色谱纯。

2.1.7 甲醇水溶液: 准确量取 50mL 甲醇和 50mL 水, 混匀后备用。

2.1.8 三氯乙酸溶液 (1%): 准确称取 5g 三氯乙酸于 500mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 混匀后备用。

2.1.9 氨化甲醇溶液 (5%): 准确量取 5mL 氨水和 95mL 甲醇, 混匀后备用。

2.1.10 离子对试剂缓冲液: 准确称取 2.10g 柠檬酸和 2.16 辛烷磺酸钠, 加入约 980mL 水溶解, 定容至 1L 备用。

2.1.12 三聚氰胺标准品: CAS 108-78-01, 纯度 99.44%, 有证书。

2.1.13 阳离子交换固相萃取柱: CNW Poly-Sery MCX SPE 混合型阳离子交换固相萃取柱, 基质为苯磺酸化的聚苯乙烯-二乙烯苯基高聚物, 60mg, 3mL。

2.1.14 微孔滤膜: 0.45 μ m, 有机相。

2.1.15 氮气：纯度 99.999%

2.2 仪器设备

2.2.1 高效液相色谱仪：福立 LC5090 高效液相色谱仪，配备 LC5090 在线脱气机、LC5090 二元高压输液泵、LC5090 自动进样器、LC5090 柱温箱、LC5090 紫外检测器。

2.2.2 色谱柱：Sunniest C18 柱，4.60 mm * 250 mm，粒径为 5.0 μm 。

2.2.3 分析天平：精度 0.0001g。

2.2.4 50mL 具塞离心管。

2.2.5 10mL 塑料离心管。

2.2.6 高速离心机。

2.2.7 涡旋混合器。

2.2.8 流动相抽滤装置。

2.2.9 MultiVap-10 定量平行浓缩仪。

2.2.10 固相萃取装置。

3 溶液配制

3.1 标准溶液配制

3.1.1 三聚氰胺标准储备溶液：准确称取 13.3mg 三聚氰胺标准品于 10mL 容量瓶中，用甲醇水溶液（2.1.7）溶解并定容至刻度，配制成浓度为 1.33mg/mL 的标准储备液，于 4°C 避光保存。

3.1.2 三聚氰胺标准使用溶液：吸取 1.00mL 三聚氰胺标准储备液（1.33mg/mL），用甲醇水溶液（2.1.7）稀释定容至 10 mL，配制成浓度为 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准使用液，于 4°C 避光保存。

3.1.3 标准曲线绘制：吸取不同体积的三聚氰胺标准使用溶液（133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），用流动相稀释，配成浓度为 0.4，0.8，2.0，20，40，80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三聚氰胺标准系列溶液。

3.2 样品溶液配制

3.2.1 样品提取

称取 2g（精确到 0.01g）试样于 50mL 具塞离心管中，加入 15mL 三氯乙酸溶液（2.1.8）和 5mL 乙腈，涡旋混合 2min，超声提取 10min，在 10000r/min 转速下离心 10min，将上清液转移至 25mL 容量瓶中，用三氯乙酸溶液（2.1.8）定容至 25mL，移取 5mL 滤液，加入 5mL 水混匀后做待净化液。

3.2.2 样品净化

将阳离子交换固相萃取柱（2.1.13）依次用 3mL 甲醇、5mL 水活化，再加入待净化液（3.2.1），依次用 3mL 水和 3mL 甲醇洗涤，抽至近干后，用 6mL 氨化甲醇溶液（2.1.9）洗脱。整个固相萃取过程流速不超过 1mL/min。洗脱液于 50°C 下用氮气吹干，残留物（相当于 0.4g 样品）用 1mL 流动相定容，涡旋混合 1min，过滤 0.45 微米滤膜后供液相色谱测定。

4 色谱条件

- a) 色谱柱: Sunniest C18, 柱长 250mm, 内径 4.6mm, 粒径 5 μ m
- b) 流速: 1.0 mL/min
- c) 检测波长: 240nm
- d) 柱温: 40°C
- e) 进样量: 20 μ L
- f) 流动相: 离子对试剂缓冲液（3.1.10）: 乙腈=85: 15

5 分析结果

5.1 试剂空白谱图

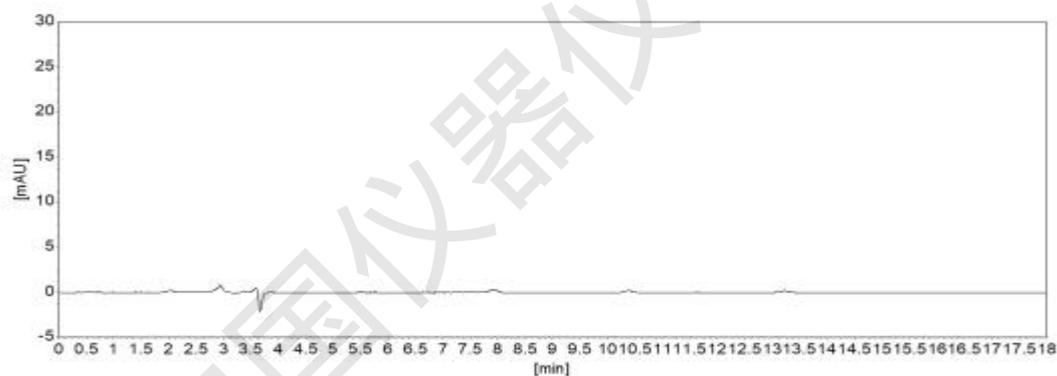


图 1 试剂空白谱图

5.2 三聚氰胺标准溶液典型谱图及结果

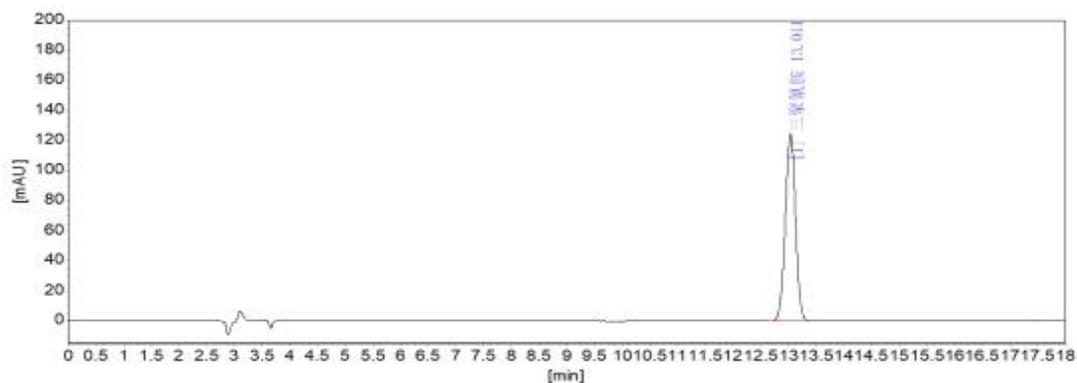


图 2 三聚氰胺标准溶液谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]
1	三聚氰胺	13.041	123421.8	1583924.1
			123421.8	1583924.1

系统评价表

柱长: 250mm

死时间:

峰序	组分名	保留时间 [min]	半高峰宽 [min]	容量 因子	理论 塔板	分离度	拖尾 因子
1	三聚氰胺	13.041	0.19985	0.0000	23589	0.000	0.975

5.3 重复性实验

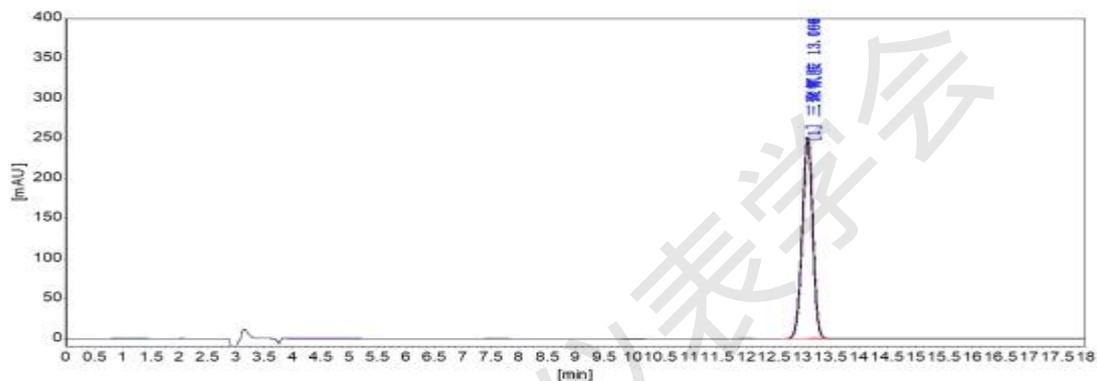


图3 三聚氰胺标准溶液八针重复性谱图

峰序	组分名	保留时间 平均值 [min]	保留时间 RSD [%]	面积 平均值 [uAU*s]	面积 RSD [%]	峰高 平均值 [uAU]	峰高 RSD [%]
1	三聚氰胺	13.097	0.066	3218568.4	0.149	247949.5	0.149

5.4 标准曲线

分别将一系列不同浓度的三聚氰胺标准溶液(4.1.3)各 20 μ L, 进行 HPLC 分析。然后以峰面积为纵坐标, 以含量为横坐标, 绘制标准曲线。

5.4.1 三聚氰胺标准溶液 (0.4 μ g/mL) 谱图及结果

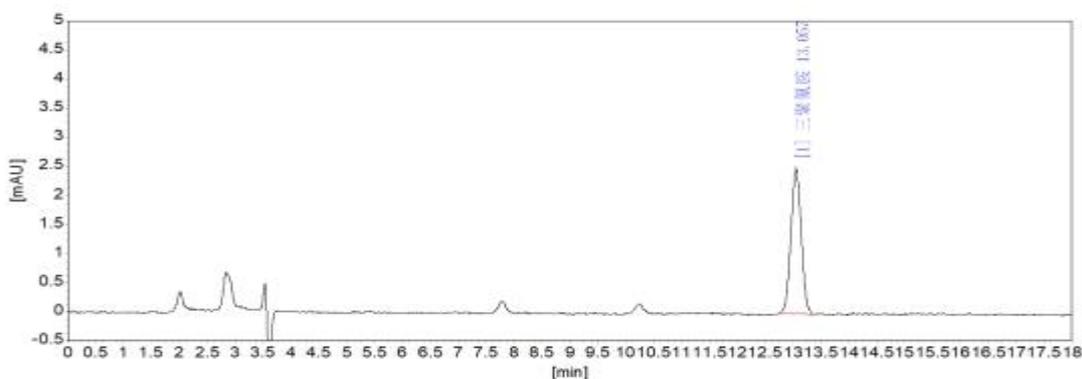


图4 三聚氰胺标准溶液 (0.4 μ g/mL) 谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]
1	三聚氰胺	13.057	2496.5	32122.4
			2496.5	32122.4

系统评价表

柱长: 250mm

死时间:

峰序	组分名	保留时间 [min]	半高峰宽 [min]	容量 因子	理论 塔板	分离度	拖尾 因子
1	三聚氰胺	13.057	0.20061	0.0000	23470	0.000	1.005

5.4.2 三聚氰胺标准溶液 (0.8 μ g/mL) 谱图及结果

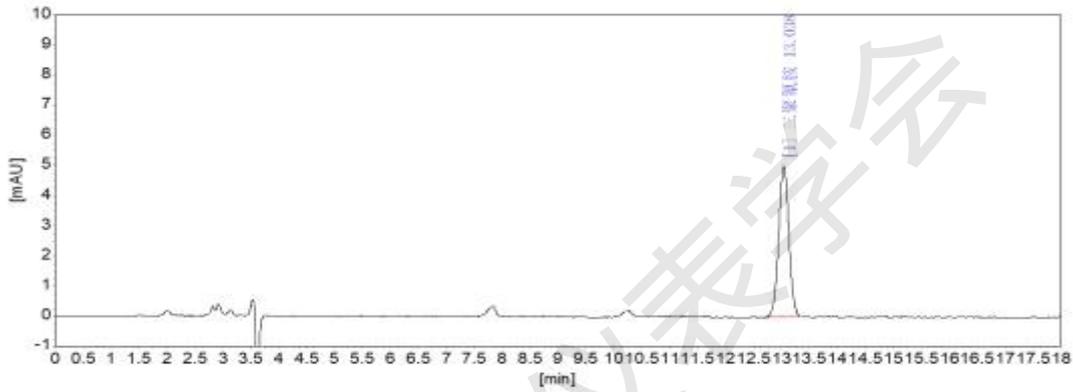


图 5 三聚氰胺标准溶液 (0.8 μ g/mL) 谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]
1	三聚氰胺	13.038	4962.1	63301.5
			4962.1	63301.5

系统评价表

柱长: 250mm

死时间:

峰序	组分名	保留时间 [min]	半高峰宽 [min]	容量 因子	理论 塔板	分离度	拖尾 因子
1	三聚氰胺	13.038	0.19846	0.0000	23911	0.000	1.004

5.4.3 三聚氰胺标准溶液 (2.0 μ g/mL) 谱图及结果

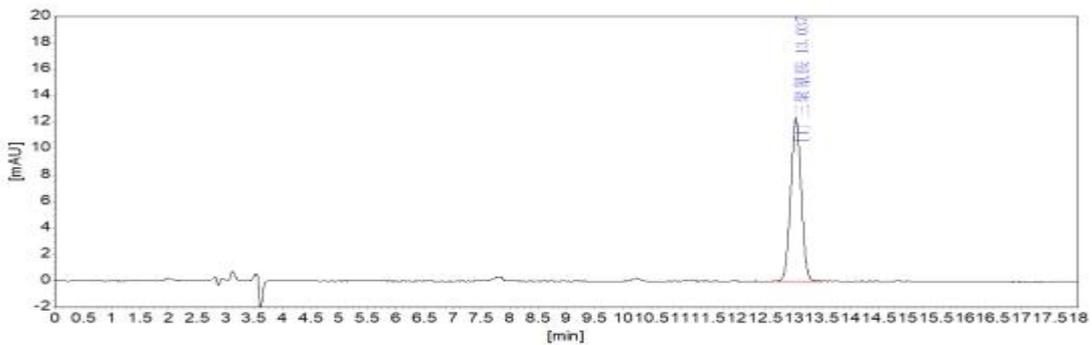


图 6 三聚氰胺标准溶液 (2.0 μ g/mL) 谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]
1	三聚氰胺	13.037	12273.0	157642.5
			12273.0	157642.5

系统评价表

柱长: 250mm

死时间:

峰序	组分名	保留时间 [min]	半高峰宽 [min]	容量 因子	理论 塔板	分离度	拖尾 因子
1	三聚氰胺	13.037	0.19928	0.0000	23712	0.000	1.014

5.4.4 三聚氰胺标准溶液 (20 μ g/mL) 谱图及结果

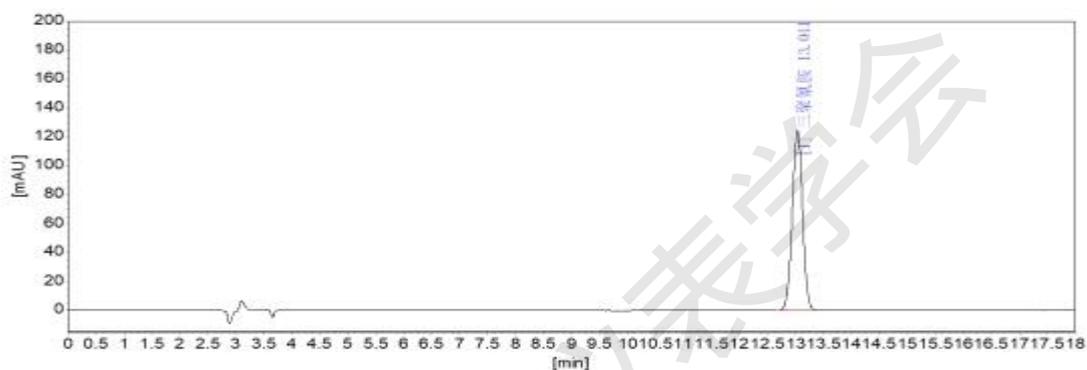


图 7 三聚氰胺标准溶液 (20 μ g/mL) 谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]
1	三聚氰胺	13.041	123421.8	1583924.1
			123421.8	1583924.1

系统评价表

柱长: 250mm

死时间:

峰序	组分名	保留时间 [min]	半高峰宽 [min]	容量 因子	理论 塔板	分离度	拖尾 因子
1	三聚氰胺	13.041	0.19985	0.0000	23589	0.000	0.975

5.4.5 三聚氰胺标准溶液 (40 μ g/mL) 谱图及结果

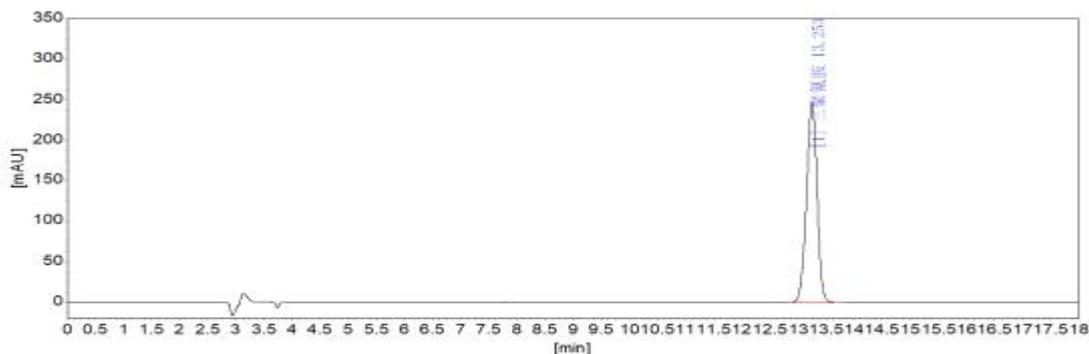


图 8 三聚氰胺标准溶液 (40 μ g/mL) 谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]
1	三聚氰胺	13.253	244929.7	3226132.7
			244929.7	3226132.7

系统评价表

柱长: 250mm

死时间:

峰序	组分名	保留时间 [min]	半高峰宽 [min]	容量 因子	理论 塔板	分离度	拖尾 因子
1	三聚氰胺	13.253	0.20436	0.0000	23297	0.000	0.951

5.4.6 三聚氰胺标准溶液 (80µg/mL) 谱图及结果

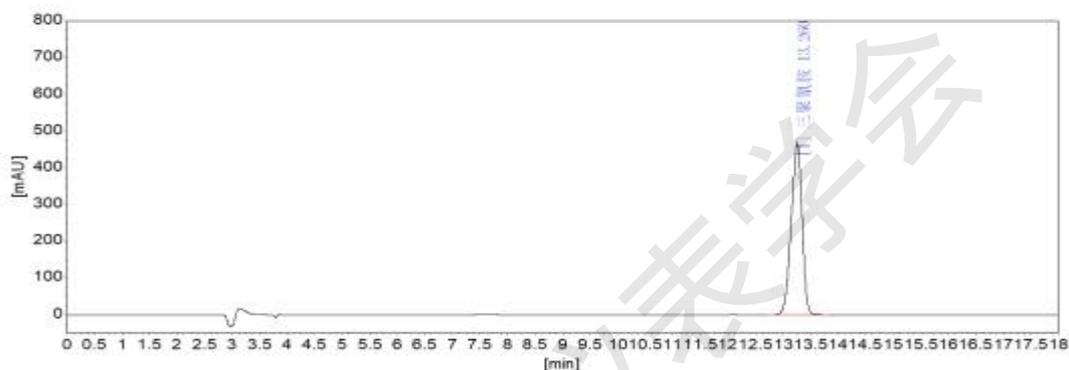


图9 三聚氰胺标准溶液 (80µg/mL) 谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]
1	三聚氰胺	13.260	465209.4	6400829.8
			465209.4	6400829.8

系统评价表

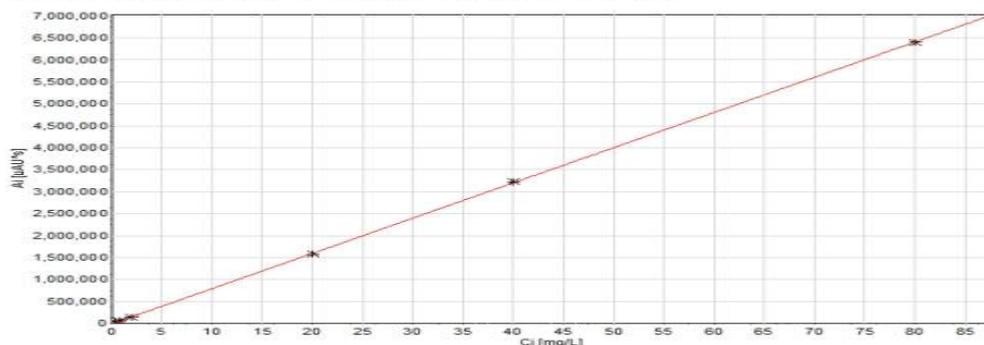
柱长: 250mm

死时间:

峰序	组分名	保留时间 [min]	半高峰宽 [min]	容量 因子	理论 塔板	分离度	拖尾 因子
1	三聚氰胺	13.260	0.21400	0.0000	21271	0.000	0.900

5.4.7 三聚氰胺标准曲线方程及相关系数

组分[三聚氰胺]: 曲线方程: $C_i = 0.0751865 + 1.24739E-005 \cdot A_i$
 校正因子: $f_0=0.0751865, f_1=1.24739E-005$ 相关系数: $r^2 = 0.99997$



5.5 检出限

5.5.1 三聚氰胺标准溶液（0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）七针重复性谱图

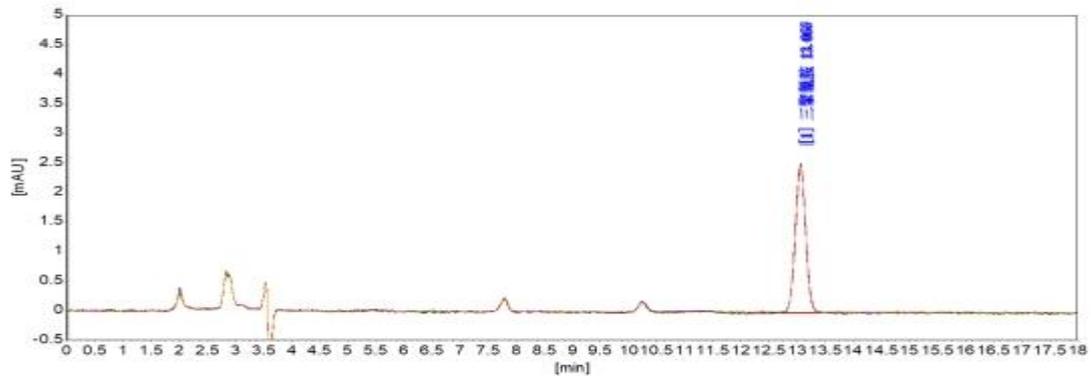


图 10 三聚氰胺标准溶液（0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）七针重复性谱图

峰序	组分名	平均时间	时间RSD%	平均面积	面积RSD%	平均峰高	峰高RSD%	平均含量	含量RSD%	含量最小值	含量最大值	谱图数
1	三聚氰胺	13.063	0.033	32071.0	0.760	2473.7	0.822	0.1359	170.723	0.0000	0.4759	7

5.5.2 三聚氰胺检出限结果

以取样 2.0g 计，本方法的检出限、定量限如下表所示：

组分名	含量 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	检出限 [mg/kg]	定量限 [mg/kg]						
三聚氰胺	0.4692	0.4753	0.4753	0.4762	0.4794	0.4752	0.4759	0.025	0.25

5.6 奶粉样品中三聚氰胺谱图及回收率结果

5.6.1 奶粉试样空白

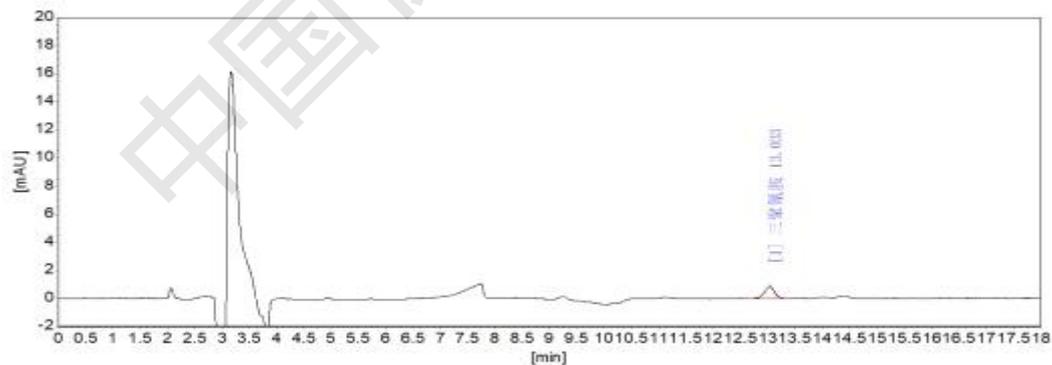


图 11 奶粉试样空白谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.033	840.6	11197.8	0.5372
总计:			840.6	11197.8	0.5372

5.6.2 奶粉样品谱图及结果

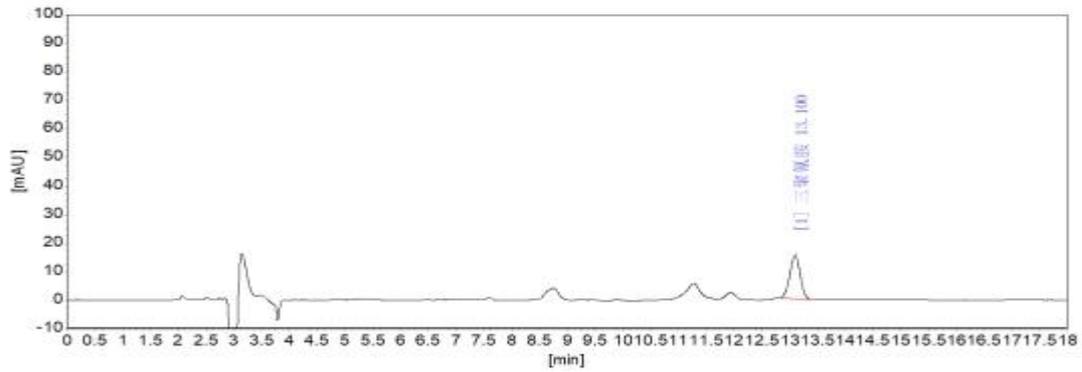


图 12 奶粉样品谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.100	15070.5	196533.0	6.3168
总计:			15070.5	196533.0	6.3168

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.102	15114.6	197412.9	6.3442
总计:			15114.6	197412.9	6.3442

注：在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值为 0.0274，为算术平均值 6.3455 的 0.43%，符合不得超过算术平均值 10% 的要求。

5.6.3 奶粉样品加标三聚氰胺（10mg/kg）谱图及回收率结果

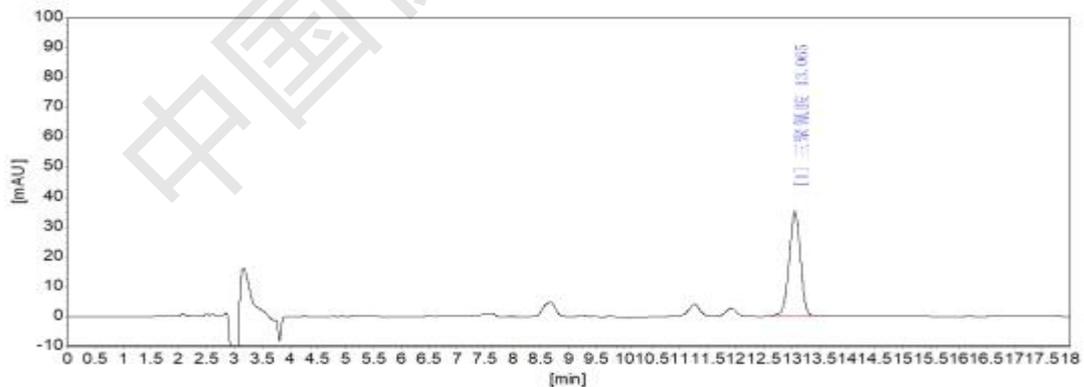


图 13 奶粉样品中加标三聚氰胺（10mg/kg）谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.065	34589.5	488813.1	15.4315
总计:			34589.5	488813.1	15.4315

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.060	34486.8	487441.9	15.3887
总计:			34486.8	487441.9	15.3887

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.064	34584.1	488908.6	15.4345
总计:			34584.1	488908.6	15.4345

奶粉中三聚氰胺 (mg/kg)	试样空白 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	加标回收率/%	相对标准偏差%	加标回收率范围/%
			15.43	90.8		
5.81	0.54	10	15.39	90.4	0.25	90.4~90.8
			15.43	90.8		

注：添加浓度为 10mg/kg，回收率在 90.4~90.8%之间，相对标准偏差为 0.25%，符合回收率在 80%-110%之间，相对标准偏差小于 10%的要求。

5.7 液体奶样品中三聚氰胺谱图及回收率结果

5.7.1 液体奶试样空白

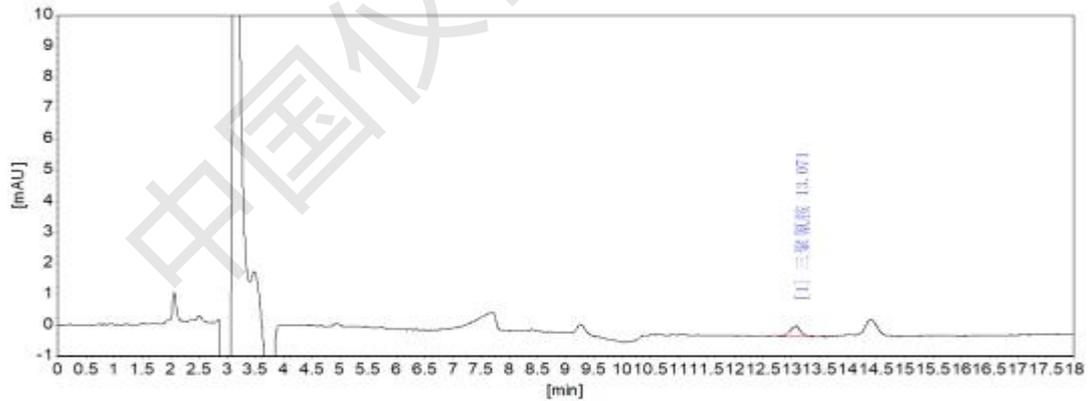


图 14 液体奶试样空白谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.071	313.4	4344.3	0.3234
总计:			313.4	4344.3	0.3234

6.7.2 液体奶样品谱图及结果

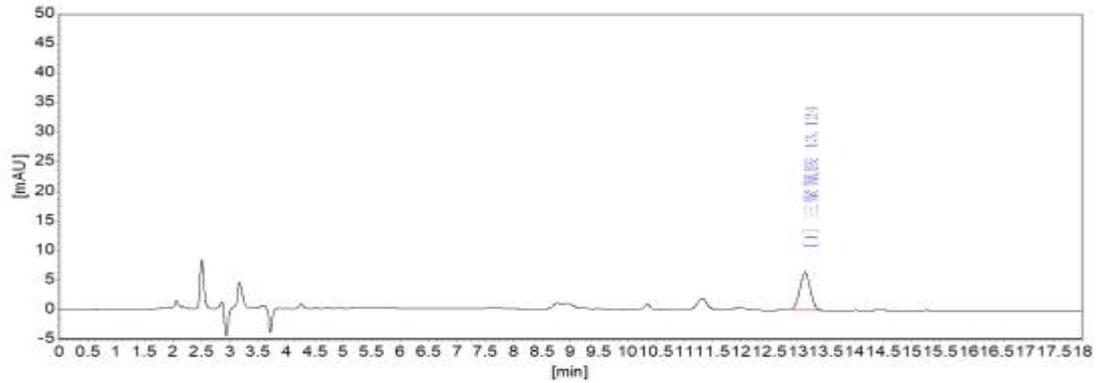


图 15 液体奶样品谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.124	6295.6	80575.5	2.7007
总计:			6295.6	80575.5	2.7007

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.125	6286.4	80169.3	2.6880
总计:			6286.4	80169.3	2.6880

注：在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值为 0.0064，为算术平均值 2.6912 的 0.24%，符合不得超过算术平均值 10% 的要求。

5.7.3 液体奶样品加标三聚氰胺 (10mg/kg) 谱图及回收率结果

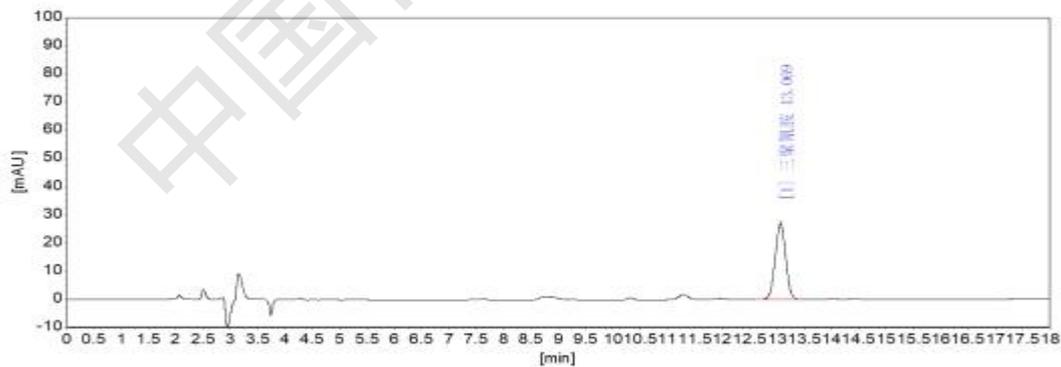


图 16 液体奶样品中加标三聚氰胺 (10mg/kg) 谱图

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.069	26961.1	359549.7	11.4004
总计:			26961.1	359549.7	11.4004

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.064	26953.1	359063.4	11.3853
总计:			26953.1	359063.4	11.3853

分析结果表

峰序	组分名	保留时间 [min]	峰高 [uAU]	峰面积 [uAU*s]	含量 [ug/g]
1	三聚氰胺	13.063	26998.6	359987.5	11.4141
总计:			26998.6	359987.5	11.4141

液态奶中 三聚氰胺 (mg/kg)	试样空白 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	加标回收 率/%	相对标 准偏差%	加标回收率范围 /%
			11.40	87.1		
2.37	0.32	10	11.39	87.0	0.11	87.0~87.2
			11.41	87.2		

注：添加浓度为 10mg/kg，回收率在 87.0~87.2%之间，相对标准偏差为 0.11%，符合回收率在 80%-110%之间，相对标准偏差小于 10%的要求。

6 实验结果

方法验证汇总表

化合物	检出限 [mg/kg]	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)	标准曲线相 关系数	样品中含量 [mg/kg]	加标回收率 (%)	定量限 [mg/kg]
三聚氰胺	0.025	0.066	0.149	0.99997	5.81 (奶粉) 2.37 (液体奶)	90.4-90.8 (奶粉) 87.0-87.2 (液体奶)	0.25

由以上实验结果可知，本方法符合 GB/T 22388-2008 《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》的要求。