

高效液相色谱法测定鳗鱼中三聚氰胺残留量

魏晶晶*, 陈章捷, 张艳燕, 郝延涛, 陈晓芳

(龙岩出入境检验检疫局, 龙岩 364000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法检测鳗鱼中三聚氰胺残留量的方法。**方法** 鳗鱼试样用1%三氯乙酸超声提取, 以1%三氯乙酸饱和的二氯甲烷液液分配除脂, 用混合型阳离子交换固相萃取小柱富集和净化, 用SHISEIDO CAPCELL PAK CR(1:4)混合液相色谱柱分离, DAD检测器检测。**结果** 三聚氰胺在0~25 μg/mL浓度范围的线性相关系数为0.9999, 加标水平在2.0、4.0、10.0 mg/kg的平均回收率分别为94.0%、95.3%、99.5%, 相对标准偏差RSD($n=6$)分别为2.73%、3.71%、5.79%, 该方法检出限($S/N=10$)为1.55 mg/kg。**结论** 各项指标均符合GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中检测方法确认的技术要求。

关键词: 三聚氰胺; 水产品; 鳗鱼; 高效液相色谱法

Determination of melamine residues in eel by high performance liquid chromatography

WEI Jing-Jing*, CHEN Zhang-Jie, ZHANG Yan-Yan, HAO Yan-Tao, CHEN Xiao-Fang

(Longyan Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Longyan 364000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the detection of melamine residues in eel by high performance liquid chromatography. **Methods** The sample was extracted with 1% trichloroacetic acid by ultrasonic extraction, degreased through liquid-liquid distribution with methylene chloride saturated by 1% trichloroacetic acid, enriched and purified by mixed cation exchange column. SHISEIDO CAPCELL PAK CR (1:4) mixed liquid chromatographic column was used for separation, and DAD detector was used for determination. **Results** The correlation coefficient in the range of 0~25 μg/mL was 0.9999. The recoveries of three different concentration (2.0, 4.0, and 10.0 mg/kg) were 94.0%, 95.3%, and 99.5%, respectively. The relative standard deviations (RSD, $n=6$) were 2.73%, 3.71% and 5.79%. The limit of detection was 1.55 mg/kg. **Conclusion** All the parameters conform to technical specifications of GB/T 27404-2008 "Criterion on quality control of laboratories-chemical testing of food".

KEY WORDS: melamine; aquatic products; eel; high performance liquid chromatography

1 引言

三聚氰胺(melamine, ML)是一种有机含氮杂环化合物,用于有机化工的中间体,其在树脂、涂料、塑料、木材、造纸、纺织、皮革、医药、粘合剂和

阻燃剂等产品生产中广泛使用^[1]。可通过废水排放等途径进入养殖水体并造成污染。研究发现,尽管动物实验表明三聚氰胺在体内代谢很快且不会存留,属低毒和实际无毒级物质,但长期低剂量摄取三聚氰胺能引起动物中毒,因而被列为新型环境污染物^[2]。

*通讯作者: 魏晶晶, 本科, 工程师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: wjj8407@163.com

*Corresponding author: WEI Jing-Jing, Engineer, Longyan Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.26, Longyan Avenue, Xinluo District, Longyan 364000, China. E-mail: wjj8407@163.com

由于三聚氰胺既不是药品也不是食品添加剂, 正常情况下不应该出现在食品或饲料中, 然而在 2007 年美国宠物食品污染事件前国际上没有饲料和食品中三聚氰胺的检测方法和检测标准。随后, 中国爆发了因三聚氰胺引起的“毒奶粉”事件, 使得三聚氰胺成为食品安全中备受关注的焦点。我国的鳊鱼产业在国际鳊鱼市场上具有很强的国际竞争力, 但是近年来受到质量安全问题及主要进口国的贸易保护而影响出口导致我国鳊鱼出口损失惨重。因此随着我国对于食品安全监管力度的加大, 鳊鱼作为出口烤鳊的原材料, 对于其各项化学残留检测, 尤其是三聚氰胺项目检测备加关注。目前, 国内外学者对三聚氰胺的检测开展了大量的研究工作, 我国已经颁布了数项三聚氰胺检测标准^[3-6], 有关三聚氰胺在哺乳动物中的毒性作用也有一些研究^[7-8]。在国内已有食品中三聚氰胺检测技术的相关报道^[9-15], 但这些报道多使用离子对试剂, 易受干扰出现“假阳性”, 会缩短色谱柱的使用寿命, 检测重复性再现性不佳。对于高脂肪含量的水产品, 例如鳊鱼样品, 由于脂肪的大量存在, 严重干扰了检测信号, 因而水产品中三聚氰胺的检测存在较大困难。针对水产品中三聚氰胺检测的难点, 我们采用液相色谱法并结合除油脂的前处理工艺, 开发了一种高效液相色谱法定量检测鳊鱼中三聚氰胺残留量的方法, 该法具有精确可靠、灵敏度高、检出限低等优点。

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

液相色谱仪: Agilent1200 配有 DAD 检测器(安捷伦公司); 高速冷冻离心机: CR21G II (日本日立公司); 电子天平: AL204 IC(梅特勒-托利多集团); 超声波振荡器: KQ 500DE(苏州昆山超声仪器有限公司); 固相萃取装置: SEP-PAK20(美国 Waters 公司); 均质器: JZ II(天津四方电器); 氮气吹干仪: BF-2000M(北京八方世纪科技有限公司); 迷你振荡器: MS1(广州仪科实验室技术有限公司)。

MCX 固相萃取小柱: 60 mg, 3 mL, 使用前以 3 mL 甲醇, 3 mL 水活化; 三氯乙酸溶液(1%): 称取 10 g 三氯乙酸溶解于 1000 mL 水中; 氯化甲醇溶液(5%): 移取 5 mL 氨水于 100 mL 容量瓶, 用甲醇定容至刻度, 混均后备用; 甲醇(HPLC 级, Merck 公司);

乙腈(HPLC 级, Merck 公司); 氨水(含量为 25%~28%, 西陇化工股份有限公司); 二氯甲烷(西陇化工股份有限公司); 滤膜(0.22 μm , 有机相, 天津津腾公司); 三聚氰胺标准品(大于 99.0%, DR 公司)。除非另有说明, 所用试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2.2 标准溶液的配制

标准贮备液(1 mg/mL): 称量 100 mg(精确到 0.1 mg)的标准品, 用甲醇/水(7/3, v/v)溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 该溶液浓度为 1 mg/mL, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内储存, 有效期 3 个月。

标准中间液: 吸取标准贮备液 5 mL 于 50 mL 容量瓶内, 用甲醇/水(7/3, v/v)溶解并定容至 50 mL, 该溶液浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内储存, 有效期 1 个月。

标准工作液: 标准工作液根据需要用流动相逐级稀释配制。

2.3 色谱条件

色谱条件: 色谱柱: CAPCELL PAK CR(1:4)混合柱(3.0 mm \times 150 mm, 5 μm); 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 流动相: (25 mmol/L 乙酸铵:冰乙酸=99:1):乙腈=1:1; 流速: 0.6 mL/min; DAD 检测器检测波长: 240 nm。

2.4 实验方法

选取鳊鱼试样可食部分(除去鱼头、内脏及鱼骨后所剩部分)约 500 g 一并放入组织捣碎机或粉碎机均质, 充分混匀, 装入清洁容器内, 并标记。留样置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 冰柜保存。制样操作过程中必须防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

称取 5 g(精确到 0.01 g)均质样品至 50 mL 塑料离心管, 加入 20 mL 1%三氯乙酸, 超声提取 10 min, 充分震荡 1 min, 以 18000 r/min 离心 10 min, 将上层液移入干净的 50 mL 塑料离心管, 加入 30 mL 1%三氯乙酸饱和的二氯甲烷, 充分震荡后 15000 r/min 离心 5 min, 用滴管吸取上层液体, 待净化。

将上述所得样品提取液以约 2~3 mL/min 的流速缓慢通过净化小柱, 分别以 3 mL 水、3 mL 甲醇洗涤小柱, 抽近干后用 5 mL 5%氨水甲醇溶液洗脱。45 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹至近干后, 以 1 mL 流动相定容, 过 0.22 μm 滤膜, 上机测定。

除不称取鳊鱼试样外, 均按上述测定条件和步

骤进行空白实验。

3 结果与分析

3.1 提取条件的选择

鳗鱼中蛋白质和油脂等杂质是色谱分析的主要干扰物质。采用 1%三氯乙酸提取,沉淀鱼体中的蛋白,并通过离心去除。采用 1%三氯乙酸饱和的二氯甲烷液液萃取分层去除油脂类物质。

3.2 净化条件的选择

三聚氰胺为强极性碱性化合物,在酸性条件下会形成正离子,故采用混合型强阳离子固相萃取柱(MCX小柱)净化样液。用水和甲醇淋洗,可除去样液中水溶性的杂质、无机盐和非离子化的脂溶性杂质,再用 5%氨水甲醇溶液洗脱,能有效地去除基质干扰,图 1 为添加了三聚氰胺标准物质的鳗鱼阴性样品(鳗鱼阴性样品是指在前期三聚氰胺检测过程中无残留的鳗鱼留样),在目标物保留时间附近无干扰信号,实现良好的分离。

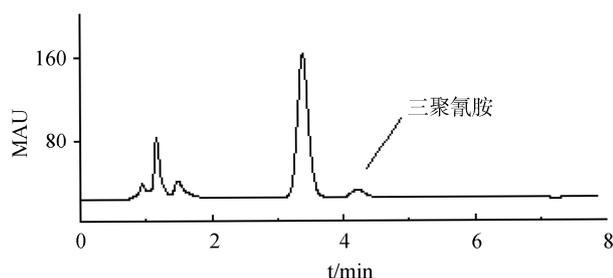


图 1 加标样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of samples with addition of standards

3.3 色谱条件的选择

三聚氰胺极性很强,在反相色谱柱上难以保留。三聚氰胺的色谱分析常使用离子对试剂,使带正电的目标化合物的保留得到增强,以便在反相色谱柱上分离。但离子对试剂方法具有许多局限性:①一些杂质如水溶性维生素 V_B 族、核酸等均可能和三聚氰胺同时出峰,对分析结果产生误判,以至得到“假阳性”的检测结果。②离子对试剂会和固定相结合产生不可逆吸附,进而影响固定相活性位点。这种反应对色谱柱影响很大,而且离子对试剂很难从色谱柱上冲洗干净,会大大缩短色谱柱的使用寿命。③离子对试剂浓度不稳定,离子对试剂的浓度与其样品的保留时

间有直接的影响。④离子对试剂对 pH 值比较敏感,配制流动相时要求精确度较高。否则直接影响实验的重复性和再现性。

本文采用的 SHISEIDO CAPCELL PAK CR(1:4)柱包含 C_{18} 和 SCX 两种填料,具有疏水和离子交换双重机理,可通过调节 pH 值和盐浓度控制各组分的出峰时间,避免离子对法产生的“假阳性”结果,规避了使用离子对试剂的缺点。如图 2 所示,在 4~6 min 三聚氰胺保留时间出峰处有鬼峰的出现,而选择 CAPCELL PAK CR(1:4)混合柱再现了样品分析的真实性,如图 1 所示。从而准确地定性及定量,以最大限度地减少误判。

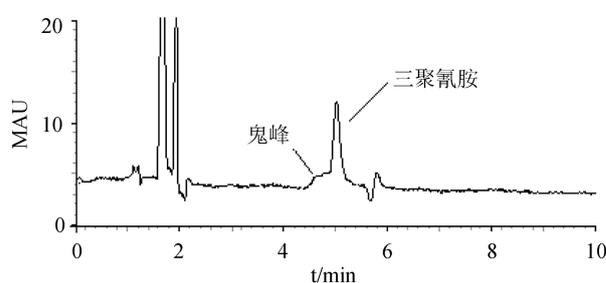


图 2 离子对法三聚氰胺保留时间色谱图

Fig. 2 Retention time chromatograms of melamine with ion pair chromatography

3.4 标准曲线及检出限

用流动相配制三聚氰胺浓度在 0、5、10、15、20、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准工作溶液,以峰面积(A)为纵坐标,待测物的质量浓度(C)为横坐标绘制三聚氰胺标准工作曲线,结果表明浓度在 0~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内具有很好的线性关系,其线性回归方程为: $A = 60.128C - 5.3187$, 相关系数为 $R^2 = 0.9999$, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[16]中相关系数不应低于 0.99 的技术要求。对鳗鱼样品平行测定 6 次,得到方法的检出限($S/N=10$)为 1.55 mg/kg 。

3.5 方法的精密度和回收率

在筛选待测的鳗鱼阴性样品中分别添加 2.0、4.0、10.0 mg/kg 三个不同浓度水平三聚氰胺,分别平行测定 6 次,计算三聚氰胺加标回收率和相对标准偏差,其结果见表 1。实验结果表明该方法加标回收率均在 90%~110%^[16], 相对标准偏差均小于 6%^[16],

表 1 精密度和回收率实验结果($n=6$)
Table 1 Results of test for precision and recovery ($n=6$)

样品	加标量 $w/$ (mg/kg)	回收量 $w/$ (mg/kg)	回收率/%	回收率平均值/%	RSD/%
鳊鱼	2.0	1.911.851.88	95.592.594.0	94.0	2.73
		1.811.961.87	90.598.093.5		
鳊鱼	4.0	3.613.853.82	90.296.295.5	95.3	3.71
		4.043.623.74	10195.593.5		
鳊鱼	10.0	10.210.69.75	10210697.5	99.5	5.79
		9.1810.59.46	91.810594.6		

符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[16]附录 F 检测方法确认的技术要求中回收率和精密度的要求。

4 结 论

本文建立了高效液相色谱法检测鳊鱼中三聚氰胺残留量的方法。检测方法采用 1%三氯乙酸超声提取三聚氰胺后,再用 1%三氯乙酸饱和的二氯甲烷液分配除脂后,通过混合型阳离子交换固相萃取小柱富集和净化,样品处理过程简单,除杂除脂效果好,抗干扰能力强,各项指标均符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[16]中检测方法确认的技术要求,可以为水产食品安全监督检测提供有力的技术依据。此外本方法检测成本低,可以满足基层实验室的检测需求。

参考文献

- [1] 冯建民, 嵇俊红. 中国三聚氰胺生产应用现状及产业技术分析[J]. 化工科技市场, 2006, 29(5): 11-16.
Feng JM, Jie JH. The application status and industrial technical analysis of melamine in China [J]. Chem Technol Market, 2006, 29(5): 11-16.
- [2] Richar DSD. Environmental massspectrometry: emergingcontaminants and current issues [J]. Anal Chem, 2010, 82(12): 4742-4774.
- [3] NY/T1372-2007 饲料中三聚氰胺的测定[S].
NY/T1372-2007 Determination of melamine in feeds [S].
- [4] GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].
GB/T 22388-2008 Determination of melamine in raw milk and dairy products [S].
- [5] GB/T 22400-2008 原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法[S].
GB/T 22400-2008 Rapid determination of melamine in raw milk-High performance liquid chromatography method [S].
- [6] SN/T 3032-2011 出口食品中三聚氰胺和三聚氰酸检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S].
SN/T 3032-2011 Determination of melamine and cyanuric acid in foodstuffs for export. HPLC-MS/MS method [S].
- [7] 刘庆生, 王加启. 三聚氰胺在动物体内的毒性研究进展[J]. 中国畜牧医, 2008, 35(10): 5-7.
Liu QS, Wang JQ. Melamine toxicity in animals [J]. China Anim Hus Vet Med, 2008, 35(10): 5-7.
- [8] 李雅琴, 马晓国, 张燕萍, 等. 三聚氰胺在罗非鱼肝脏内的累积及对 EROD 和 GST 活性的影响[J]. 生态环境学报, 2013, 22(12): 1951-1955.
Li YQ, Ma XG, Zhang YP, et al. Accumulation of melamine in tilapia liver and its effecton EROD and GST acivities [J]. Ecol Environ Sci, 2013, 22(12): 1951-1955.
- [9] 汪辉, 曹小彦, 彭新凯, 等. 高效液相色谱-二级管阵列法测定高蛋白食品中三聚氰胺的测定[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 114-115.
Wang H, Cao XY, Peng XK, et al. Determination of melamine in high protein food by high performance liquid chromatography-photodiode array detector [J]. Food Mach, 2007, 23(5): 114-115.
- [10] 杨云霞, 刘彤, 周桂英, 等. 小麦谷元粉中三聚氰胺的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(3): 322-324.
Yang YX, Liu T, Zhou GY, et al. Determination of melamine in wheat gluten by high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2008, 27(3): 322-324.
- [11] 倪沁颜. 高效液相色谱法(HPLC)测定饲料中三聚氰胺的含量[J]. 福建分析测试, 2008, 17(1): 57-59.
Ni QY. Analytical method for the determination of melamine in feedstuff by HPLC [J]. Fujian Anal Test, 2008, 17(1): 57-59.
- [12] 王登飞, 黄智辉, 邓俊超, 等. 固相萃取-HPLC 法测定水产品中三聚氰胺的测定[J]. 水产科学, 2009, 28(10): 591-593.
Wang DF, Huang ZH, Deng JC, et al. Determination of melamine residues in aquatic products by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Fish Sci, 2009, 28(10): 591-593.
- [13] 刘红河, 毛丽莎, 康莉, 等. 固相萃取-亲水作用液相色谱-串联质谱法同时测定水和尿中三聚氰胺及三聚氰酸[J]. 中华预防药理学杂志, 2013, 47(7): 641-647.

- Liu HH, Mao LS, Kang L, *et al.* Simultaneous determination of melamine and cyanuric acid residues in water and urine by solid phase extraction-hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method [J]. *Chin J Prevent Med*, 2013, 47(7): 641-647.
- [14] 刘慧群, 丁永刚, 董洪海, 等. 液相色谱法测定大豆分离蛋白中的三聚胺[J]. *化学分析计量*, 2013, 22(4): 69-71.
- Liu HQ, Ding YG, Dong HH, *et al.* Determination of melamine residues in soy protein isolate by liquid chromatography [J]. *Chem Anal Meter*, 2013, 22(4): 69-71.
- [15] 计丹婷, 唐涛, 王风云, 等. HPLC—DAD 光谱辅助定性测定乳制品中的三聚氰胺[J]. *中国乳品工业*, 2014, 42(1): 46-48.
- Ji DT, Tang T, Wang FY, *et al.* Application of spectra assisted qualitative determination of melamine in dairy product by HPLC-DAD [J]. *China Dairy Ind*, 2014, 42(1): 46-48.
- [16] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S]. GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-chemical testing of food [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



魏晶晶, 本科, 工程师, 主要研究方向为食品理化检验。
E-mail: wjj8407@163.com