

# 固相萃取 - HPLC 法测定水产品中三聚氰胺残留量

王登飞, 黄智辉, 郑俊超, 王瑞龙

(漳州出入境检验检疫局, 福建 漳州 363000)

**摘 要:** 建立了水产品中三聚氰胺的固相萃取 - 高效液相色谱法。样品经三氯乙酸、乙腈提取, 离心, 混合相固相萃取小柱净化后, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 用配有二级管阵列检测器 (PAD) 的液相色谱仪检测, 外标法定量。同时, 以三聚氰胺标准品进行添加回收率测定, 结果显示本方法对三聚氰胺的测定下限为 2.0 mg/kg, 回收率为 81.3% ~ 91.7%, 测定的相对标准偏差均不大于 5%。本方法能满足水产品中三聚氰胺残留量常规检测的需要。

**关键词:** 固相萃取; 水产品; 三聚氰胺; 残留量

**中图分类号:** O657.72

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-1111(2009)10-0591-03

三聚氰胺 (Melamine) 简称三胺, 学名三氨基三嗪, 别名蜜胺、氰尿酸胺、三聚酰胺, 是一种重要的氮杂环有机化工原料<sup>[1]</sup>。不得作为食品添加剂使用, 但仍有少数不法商贩为了谋取利益, 将三聚氰胺作为饲料中的“蛋白精”<sup>[2]</sup>。由于之前发生的“三鹿奶粉中三聚氰胺事件”, 导致中国食品安全重新成为国内外的焦点, 许多国家不但加大对中国食品的负面报道, 还加强对中国出口的农产品、食品检测, 尤其是三聚氰胺的检测, 其检测范围从奶制品延伸到其他如水产品、蔬菜等几乎所有的食品范畴, 而三聚氰胺在国内外被检出的报道也时有发生。目前国际上尚无统一的三聚氰胺检测标准, 我国已制定了饲料<sup>[3]</sup>和原料乳与乳制品<sup>[4-5]</sup>的三聚氰胺检测标准, 但水产品方面尚无国家标准。

目前已报道三聚氰胺的检测方法包括高效液相色谱法 (HPLC-UV, PAD)<sup>[3-9]</sup>、气相色谱 - 质谱法 (GC-MS)<sup>[3-4]</sup>、高效液相色谱 - 串联质谱 (HPLC-MS/MS) 检测方法<sup>[1-2, 4, 10-11]</sup>。GC-MS 需要衍生化, 过程比较繁琐; HPLC-MS/MS 由于成本太高, 很多实验室无法采用。HPLC-UV/PAD 由于其无需衍生化且成本较低, 是目前最为常用的检测方法, 该方法操作简便、灵敏、结果准确。笔者在参考已有文献的基础上, 以三氯乙酸、乙腈为提取剂, 用 SPE 固相萃取萃取小柱进行净化, 建立了利用 HPLC-PAD 测定水产品中残留的三聚氰胺方法。大量样品的分析结果表明, 该方法快速、简单, 可作为水产品中三聚氰胺残留的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

美国 Waters2695 高效液相色谱系统配 2996 二极管检测器及 Empower2 数据处理工作站; 美国 Waters 公司固相萃取装置; 瑞士 METTLER AE163 分析天平 (感量 0.1 mg); 德国 SIGMA 2-16 型离心机; 美国 Waters 公司混合相固相萃取小柱: 混合型阳离子交换固相萃取柱 (Oasis MCX 型, 60 mg, 3 ml); 美国 PALL 公司溶剂过滤器; 美国 Millipore 公司 MilliQ 型超纯水器。

三聚氰胺标准品: 含量 99.5%, DIMA TECHNOLOGY 公司生产; 甲醇、乙腈 色谱纯 (1% 三氯乙酸); 水为超纯水, 除注明外其他试剂均为分析纯; 三氯乙酸 (1%): 称取 10 g 三氯乙酸于容量瓶, 加水定容至 1000 ml; 氨水甲醇 (5%): 量取 5 ml 氨水于容量瓶, 加甲醇定容至 100 ml; 离子对试剂缓冲液: 称取 2.10 g 柠檬酸和 2.02 g 庚烷磺酸钠加水定容至 1000 ml。

### 1.2 色谱条件

色谱柱为 Alltima C<sub>8</sub> 柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为离子对试剂缓冲液 + 乙腈 (85 + 15, 体积比), 用前经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤; 流速为 1.0 ml/min; 色谱柱温度 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量为 20  $\mu\text{l}$ ; PAD 选择 236 nm 作为检测波长。当样品谱图和标准品谱图色谱峰保留时间一致时, 采用 PAD 对该色谱峰进行紫外光谱特征扫描, 作为定性确证的依据, 以避免假阳性结果。应用此色谱条件可获得良好的分离, 出峰时间和峰形对称性较理想。三聚氰胺

收稿日期: 2008-11-26; 修回日期: 2009-01-04.

作者简介: 王登飞 (1976-), 男, 工程师, 研究方向: 食品安全检测; E-mail: wdf117@sohu.com.

标准溶液的色谱图见图1。

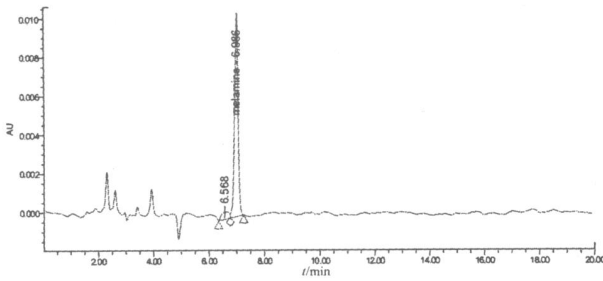


图1 2.0 µg/ml 三聚氰胺标准溶液色谱图

### 1.3 标准溶液的配制及线性范围的确定

三聚氰胺标准品储备液:称取三聚氰胺标准品10.0 mg,用甲醇溶解并定容至100 ml,质量浓度为100 µg/ml(标准储备液于冷冻条件下-4℃储存)。

三聚氰胺标准品中间液:使用时移取10 ml三聚氰胺标准品储备液,用甲醇定容至100 ml,质量浓度为10 µg/ml(标准储备液于冷冻条件下-4℃储存,每周配制)。

三聚氰胺标准品工作液:分别移取上述标准品中间液0、50、100、200、500、1000 µl,氮吹至干,用1 ml流动相定容配制成5种不同质量浓度的标准品工作液(现配)。标准品工作液质量浓度分别为:0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 µg/ml,每一质量浓度进样3次,按上述色谱条件进行分析,得出各种质量浓度所对应的峰面积和峰高,其含量(x)与峰面积或峰高(y)均有良好的线性关系,取峰面积计算。回归方程为: $y = 93142x - 2182.4$ ,  $R^2 = 0.9997$ 。

### 1.4 样品预处理

以罗非鱼(*Tilapia nilotica*)为例,称取2.0 g均质罗非鱼样品,加入15.0 ml三氯乙酸(1%)溶液和5.0 ml乙腈,漩涡混匀1.0 min后超声25 min,7800 r/min离心5 min。取4.0 ml上清液依次用3.0 ml甲醇、5.0 ml纯水活化的固相萃取小柱(Oasis MCX,60 mg,3 ml),然后用3.0 ml水、3.0 ml甲醇进行反淋洗,弃去淋洗液。接着用6.0 ml氨水甲醇进行洗脱,整个固相萃取过程流速不超过1.0 ml/min。收集洗脱液于50 ml氮吹管,氮气吹干。用1.0 ml流动相溶解残余物,经0.45 µm滤膜过滤后,供液相色谱测定用。

试样中三聚氰胺的含量由色谱数据处理软件或按下式计算:

$$X = A \times c \times V \times 1000 \times fA_s \times m \times 1000$$

式中,X:试样中三聚氰胺的含量(mg/kg);A:样液中三聚氰胺的峰面积;c:标准溶液中三聚氰胺的质量浓度(µg/ml);V:样液最终定容体积(ml);A<sub>s</sub>:标准溶液中三聚氰胺的峰面积;m:试样的质量(g);f:稀释倍数。

### 1.5 添加回收率及精密度试验

设计三聚氰胺添加质量浓度水平,包括测定最

低检出限和最高残留限量在内的4个不同水平,每个水平3个平行。在2.0 g罗非鱼样品中添加适宜质量浓度的混合标准溶液,制得所需的阳性添加样品,并按1.4的步骤进行样品的前处理,通过外标法定量,得到相应的平均回收率及批间相对标准偏差,测定结果见表1。样品和添加回收的色谱图见图2、图3。

表1 不同添加水平的回收率与相对标准偏差

| 添加水平/mg·kg <sup>-1</sup> | 回收率/% | 相对标准偏差/% |
|--------------------------|-------|----------|
| 0.5                      | 81.3  | 2.1      |
| 1.0                      | 90.5  | 3.9      |
| 2.0                      | 91.7  | 2.8      |
| 5.0                      | 83.8  | 3.4      |

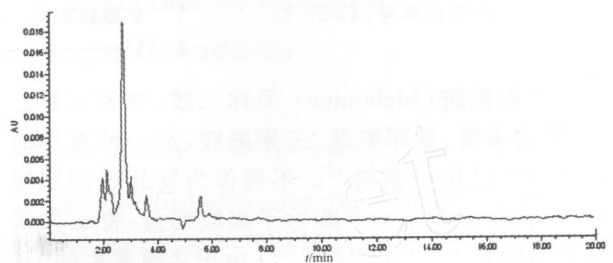


图2 罗非鱼样品色谱图

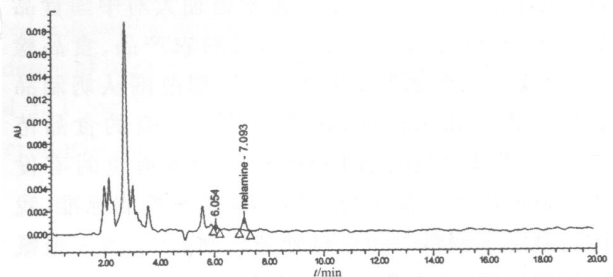


图3 添加2.0 mg/kg三聚氰胺标准品的罗非鱼样品色谱图

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取溶剂的选择和优化

三聚氰胺属于强极性碱性化合物,因此提取溶剂一般都选用极性较强的有机溶剂、缓冲溶液或有机溶剂和水的混合溶液。试验中选择乙腈和1%三氯乙酸体积比分别为1:1、1:2、1:3、1:4作为提取溶剂,于罗非鱼中添加2.0 mg/kg水平的三聚氰胺标准品,用HPLC-PAD测定其回收率,并比较不同提取溶剂的提取效果见表2,结果表明,乙腈:1%三氯乙酸(V:V)为1:3时效果最佳。

表2 三聚氰胺的回收率

| 乙腈 | 1%三氯乙酸 | 回收率/% | 相对标准偏差/% |
|----|--------|-------|----------|
| 1  | 1      | 65.9  | 5.6      |
| 1  | 2      | 78.4  | 4.5      |
| 1  | 3      | 88.5  | 2.8      |
| 1  | 4      | 82.3  | 3.6      |

## 2.2 净化条件的选择

水和甲醇的清洗可以除去样品中水溶性的杂质、无机盐和非离子化的脂溶性杂质。本试验对 PCX、MCX 两种 SPE 小柱进行试验比较,谱图显示 PCX 净化后杂峰比较多,而采用 MCX 净化后杂峰较少。在 2.0 mg/kg 水平下做添加回收试验,MCX 回收率可达 91.7%,高于 85.6% 的 PCX。

## 2.3 流动相的优化

由于三聚氰胺属于强极性化合物,其在 C8 色谱柱上保留效果较差,因此 HPLC - PAD 分析时流动相加入离子对试剂如辛酸磺酸钠、庚烷磺酸钠。采用柠檬酸进行调流动相的 pH 值,试验表明流动相为 0.01 mol/L 庚烷磺酸钠和 0.01 mol/L 柠檬酸可使三聚氰胺产生很好的保留,峰形更尖锐对称<sup>[8]</sup>,且操作方便。

## 2.4 检出限的确定

虽然以罗非鱼为样品做添加回收时,在 0.5、1.0、2.0、5.0 mg/kg 4 个添加水平均有回收率,但考虑到大多数水产品在加工过程均有进行调理,经过调理后的样品由于添加了大量的调味品、添加剂,导致处理后的样品杂质较多、干扰较大,若将检出限定得过低,不利于结果的判定,经过对调理水产品的试验,在 2.0 mg/kg 的添加水平下,定量、定性结果都较为理想,故将检出限定为 2.0 mg/kg。

## 3 结论

试验结果表明,采用三氯乙酸、乙腈超声提取、混合相固相萃取小柱(Mixed-mode SPE)净化的方法,前处理简单,可以排除水产品中大部分干扰物质的影响,加标回收率良好。建立的 HPLC - PAD 方法具有重复性好、定性准确、灵敏度高等特点,与 GC - MS 分离方法比较,无需衍生化,分析时间大

大缩短,定量下限为 2.0 mg/kg。该方法适用于水产品中三聚氰胺的检测。

## 参考文献:

- [1] 蔡勤仁,欧阳颖瑜,钱振杰,等. 高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(3): 339-342.
- [2] 赖碧清,郑晓航,韩银涛. 高效液相色谱 - 四极杆质谱联用测定饲料中三聚氰胺含量[J]. 饲料工业, 2008, 29(4): 47-48.
- [3] 农业部畜牧业司. NY/T 1372-2007, 饲料中三聚氰胺的测定[S].
- [4] 全国食品安全应急标准化工作组,全国质量监管重点产品检验方法标准化技术委员会. GB/T 22388-2008, 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].
- [5] 中国计量科学研究院. GB/T 22400-2008, 原料乳中三聚氰胺快速检测 - 液相色谱法[S].
- [6] 丁涛,徐锦忠,李健忠,等. 高效液相色谱法测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(1): 6-9.
- [7] 王浩,刘艳琴,曹红,等. 固相萃取与高效液相色谱法测定宠物食品中三聚氰胺[J]. 分析化学, 2008, 36(2): 273.
- [8] 占春瑞,郭平,温志海,等. 液相色谱检测饲料中三聚氰胺残留量的方法研究[J]. 饲料研究, 2007(11): 18-22.
- [9] 张美金,林海丹,林峰,等. 液相色谱测定饲料和宠物食品中三聚氰胺含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2007(2): 2205-2206.
- [10] 王征. GC - MS 法测定动物食品中的三聚氰胺[J]. 福建分析测试, 2008, 17(2): 1-4.
- [11] 刘梅,李金强,田德金,等. 固相萃取 - 液相色谱 - 串联质谱法检测食品中的三聚氰胺[J]. 分析化学, 2008, 17(2): 48-50.

## Determination of Melamine Residues in Aquatic Products by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography

WANG Deng-fei, HUANG Zhi-hui, ZHENG Jun-chao, WANG Rui-long  
(Zhangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhangzhou 363000, China)

**Abstract:** A solid phase extraction-high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for analysis of melamine in aquatic products. Samples were extracted and centrifugated with trichloroacetic acid and acetonitrile, and then were cleaned up with mixed-mode SPE. Melamine residues were determined by HPLC with PAD using external standard method. The determination limit was 2.0 mg/kg, and the recovery rate of 81.3% ~ 91.7% for melamine, and the relative standard deviations were all less than 5%. The method can meet analysis requirements of the determination of melamine in aquatic products.

**Key words:** solid phase extraction; aquatic product; melamine; residue

(责任编辑:小舟)