

禽蛋中三聚氰胺残留高效液相色谱快速检测法

沈祥广, 丁焕中, 贺利民, 余静贤, 曾振灵

(华南农业大学 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:建立了禽蛋中三聚氰胺残留的高效液相色谱快速检测方法. 以 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乳酸溶液-乙腈(体积比为 35:65) 提取样品, 提取液高速离心、滤膜过滤后直接进样. 色谱柱为 LC-SCX 柱, 流动相为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲盐溶液-乙腈(体积比为 60:40), 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 240 nm. 禽蛋中三聚氰胺质量分数为 $0.25 \sim 10.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 三聚氰胺的质量分数与其峰面积之间存在良好的线性关系 ($R \geq 0.999$), 在鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋中按 $0.25, 2.50, 10.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个添加水平做三聚氰胺的回收率试验, 其回收率 $> 93\%$, 变异系数 $< 8\%$. 该方法重现性好, 灵敏度高, 简便, 可用于禽蛋中三聚氰胺残留的快速检测.

关键词:三聚氰胺; 残留; HPLC; 禽蛋

中图分类号: S859.84

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)04-0086-04

Rapid Determination of Melamine Residue in Poultry Eggs Using High Performance Liquid Chromatography Detection Method

SHEN Xiang-guang, DING Huan-zhong, HE Li-min, YU Jing-xian, ZENG Zhen-ling
(Guangdong Provincial Key Laboratory for Pharmaceutics Development and Safety Evaluation,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography method for the determination of melamine in poultry eggs was developed. The sample treatment consisted of extraction with $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lactic acid solution-acetonitrile (volume ratio 35:65), high speed centrifugation and filtration. The resulting supernatant was detected by HPLC with ultraviolet detector at 240 nm. The mobile phase consisted of $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer-acetonitrile (volume ratio 60:40) and the flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Within the range of 0.25 to $10.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ melamine in eggs, good linearity was obtained ($R \geq 0.999$). The recoveries from fortified samples at three levels ($0.25, 2.50, 10.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) were higher than 93% , with good RSD ($< 8\%$). The method is of good reproducibility, high sensitivity, and expedience and can be applied for the rapid determination of melamine residue in poultry eggs.

Key words: melamine; residue; HPLC; poultry eggs

三聚氰胺(melamine)是一种用途广泛的有机化工中间产品,其主要的用途是作为生产三聚氰胺甲醛树脂(MF)的原料.三聚氰胺分子中含氮量高,约占分子质量的66.7%,由于目前蛋白质的含量测定主要是采用定氮法,本品的存在能导致蛋白质的含量测定值比真实值高.目前测定三聚氰胺的方法研究主要集中在乳及乳制品和饲料,常采用 ELISA

法^[1]、HPLC法^[2-4]、毛细管电泳法^[5-6]、GC-MS法^[7]、LC-MS或LC-MS-MS法^[8-13]进行检测,针对禽蛋中三聚氰胺的残留测定报道较少.由于市场上禽蛋品种繁多,日常消费量大,监测工作的准确度和效率也就显得格外重要,因此开发一种准确可靠的禽蛋中三聚氰胺残留快速检测方法也就显得很有必要.本文建立了禽蛋中三聚氰胺高效液相色谱法快速检测方

收稿日期:2009-05-12

作者简介:沈祥广(1970—),男,兽医师,硕士;通讯作者:曾振灵(1963—),男,教授,博士, zlzeng@scau.edu.cn

基金项目:农业部2008年无公害农产品质量安全监测项目(农财发[2008]89号)

法,应用二极管阵列检测器对检出物质进行定性,方法操作简便、快速,可有效去除干扰物对检测结果的影响.本方法对于有效监控禽蛋中的三聚氰胺残留,保证人民身体健康具有实际应用价值.

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

三聚氰胺对照品(美国 ChemService 公司,批号:410-86A,含量:99.5%);甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司);磷酸、乳酸、磷酸二氢钾等为国产分析纯.

1.2 仪器

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,配置紫外检测器、二极管阵列检测器,型号:2695-2487-2996),冷冻高速离心机(德国 BAECKMAN 公司,J-25 型),LC-SCX 色谱分析柱(SUPELCO,250 mm × 4.6 mm,5 μm).

1.3 试液配制

三聚氰胺标准贮备液:精密称取三聚氰胺对照品 100 mg,置 100 mL 量瓶中,加体积分数为 50% 甲醇溶液溶解并定容至刻度,制得 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的三聚氰胺标准贮备液,置 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用.

三聚氰胺标准工作液:取适量三聚氰胺标准贮备液,用水稀释成适宜浓度的标准工作液.

体积分数为 50% 甲醇溶液:取甲醇适量,加入同等体积的水混匀即得.

$0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乳酸溶液:称取分析纯乳酸 28 g,置 500 mL 量瓶,加水溶解并定容至刻度.

样品提取液:取 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乳酸溶液 350 mL,加入乙腈 650 mL 混匀即得.

$0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲盐溶液:称取 6.8 g 磷酸二氢钾,加水 800 mL 溶解后,用磷酸调节 pH 至

3.0,用水稀释并定容至 1 L, $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后备用.

1.4 色谱条件

色谱柱:LC-SCX 柱,250 mm × 4.6 mm,5 μm;流动相: $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲盐溶液-乙腈(体积比为 60:40);流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温: $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$;检测波长:240 nm;进样量:50 μL.

1.5 样品的处理

打开蛋壳,将蛋黄和蛋清一起置组织匀浆机打成均匀蛋液,制成待测样品,移取 5 mL 待测样品置 50 mL 具盖聚乙烯塑料离心管,精密称定,准确加入样品提取液 20 mL,盖紧盖子后涡旋震荡使均匀分散,置于摇床震荡提取 20 min,静置 10 min,取适量混合液置高速离心机 $18000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10 min,上清液过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜后制得试样溶液,进高效液相色谱仪按“1.4”的色谱条件测定,以峰面积外标法定量.

1.6 应用试验检测

对采自于农贸市场和超市的 200 余份禽蛋样品,采用上述方法进行检测,阳性样品采用 GC-MS 方法进行复检.

2 结果与分析

2.1 标准品的色谱法检测

取适量三聚氰胺标准贮备液,用流动相稀释成 $0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列质量浓度的标准液,在“1.4”所述色谱条件下,三聚氰胺保留时间在 9 min 左右.以药物的浓度与峰面积进行线性回归,计算标准曲线方程.标准曲线的相关系数大于 0.999;每一质量浓度标准溶液测定 4 次,三聚氰胺峰面积的相对标准偏差小于 2%.三聚氰胺标准液、空白禽蛋样品和空白禽蛋样品中加入三聚氰胺标准品的色谱分析结果见图 1.

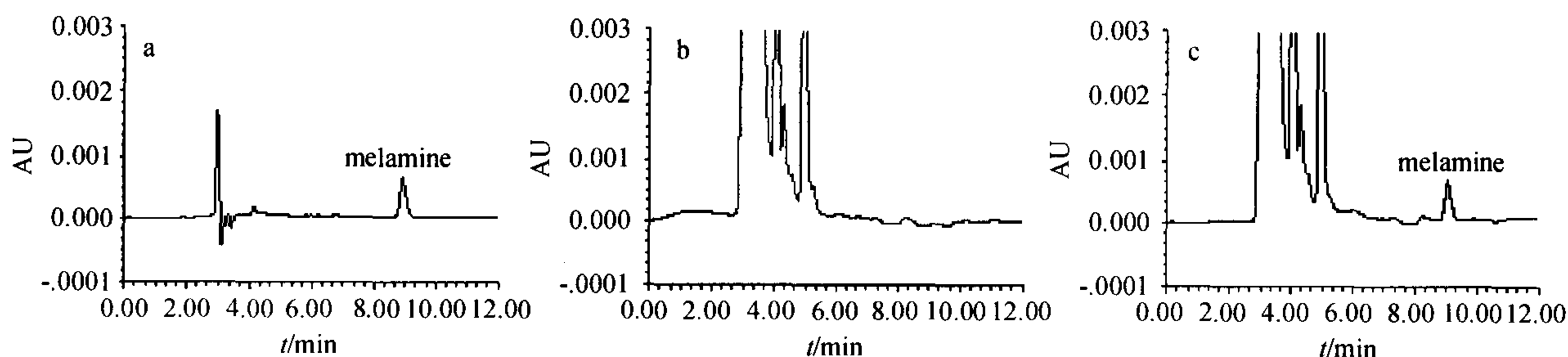


图1 三聚氰胺标准品($0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)(a)、空白鸡蛋(b)及加入三聚氰胺标准品的鸡蛋($0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)(c)的色谱图
Fig.1 Chromatogram of melamine standard($0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)(a),Chromatograms of blank eggs(b) and the egg sample spiked with melamine($0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)(c)

2.2 禽蛋中三聚氰胺的线性范围与最低测定浓度

移取 5 mL 空白待测禽蛋样品,样品质量以 5 g 计,依次加入 50 μL 不同质量浓度(25、50、100、250、

500、1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)标准工作液,旋涡混匀,使得样品中三聚氰胺的质量分数分别为 0.25、0.50、1.00、2.50、5.00、10.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.以加入 50 μL 双蒸水的

样品作对照.按前述方法进行处理和测定.将三聚氰胺的色谱峰面积 S 与相对应的药物质量分数 $[w/(mg \cdot kg^{-1})]$ 作线性回归,求得标准曲线方程和相关系数,结果见表1.按 $S/N \geq 10$ 计,禽蛋样品中的定量限为 $0.25 mg \cdot kg^{-1}$.

2.3 回收率及变异系数

将不同质量浓度 ($25, 250, 1\ 000 mg \cdot L^{-1}$) 标准工作液 $50 \mu L$ 加入至 $5 mL$ 空白禽蛋待测样品中,涡旋混匀,制得 $0.25, 2.50, 10.00 mg \cdot kg^{-1}$ 3个添

表1 方法的线性范围及标准曲线回归方程

Tab.1 Linear range and linear equation of the method

样品	测定范围/($mg \cdot kg^{-1}$)	回归方程	R
鸡蛋	0.25 ~ 10.00	$w = 2.505 \times 10^{-5}S + 0.024\ 40$	0.999 7
鸭蛋	0.25 ~ 10.00	$w = 2.517 \times 10^{-5}S + 0.023\ 83$	0.999 8
鹅蛋	0.25 ~ 10.00	$w = 2.502 \times 10^{-5}S + 0.086\ 20$	0.999 4

加水平的样品,然后按样品前处理方法处理,并进行色谱分析.每一批样品均测定4次,共测定3批,三聚氰胺的回收率及变异系数见表2.

表2 样品中三聚氰胺不同质量浓度的回收率和变异系数

Tab.2 Recoveries and RSD of melamine in samples at different concentrations

$n = 4$

样本	添加量/ ($mg \cdot kg^{-1}$)	平均回收率/%			变异系数(RSD)/%			
		批1	批2	批3	批内			批间
鸡蛋	0.25	95.34	98.13	93.16	5.3	4.1	3.6	5.5
	2.50	98.21	95.22	101.80	3.1	4.3	2.7	6.4
	10.00	102.30	102.10	98.12	2.1	2.6	3.8	4.9
鸭蛋	0.25	101.60	105.40	102.10	4.8	5.4	5.8	6.1
	2.50	98.46	96.14	103.90	2.9	3.8	2.9	6.5
	10.00	102.60	103.80	100.20	2.5	3.2	2.7	4.3
鹅蛋	0.25	101.60	96.72	103.50	5.2	5.6	5.3	7.1
	2.50	102.50	101.40	97.36	3.1	4.2	3.5	5.6
	10.00	100.20	98.13	96.15	2.9	3.4	3.3	3.9

2.4 应用试验检测

采用本文建立的方法检测来自农贸市场和超市的200余份禽蛋样品,检出的2份阳性样品采用GC-MS方法进行复检,与本方法检测结果较为一致;其中含三聚氰胺质量分数较高的样品为 $7.3 mg \cdot kg^{-1}$,将该样品剩下的部分未打壳鸡蛋样品的蛋黄和蛋清各自按上述方法进行处理和测定,其中蛋黄含三聚氰胺的质量分数为 $3.2 mg \cdot kg^{-1}$,蛋清含三聚氰胺的质量分数为 $8.9 mg \cdot kg^{-1}$.

3 讨论与结论

3.1 色谱条件的优化

三聚氰胺的分子式中含有三个酰胺键,为一强极性化合物,液相色谱分析中,在 C_8 或 C_{18} 柱的保留很弱,几乎与溶剂响应峰同时出峰.在文献报道中,大多数的研究者都是在流动相中加入辛烷磺酸钠离子对试剂^[3,14],以延长三聚氰胺的保留时间,便于检测物与检测样品中的其他成分分离.在本试验中曾就上述条件进行探索,结果发现该条件勉强能使检测物与其他成分分离,但色谱条件下基线的信号噪音较大.国家质监总局2008年10月发布的《原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法》^[15]中,以LC-SCX

色谱柱为固定相,以磷酸盐缓冲液-乙腈(体积比为60:30)为流动相,经进一步优化条件,以LC-SCX 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm 的色谱柱为固定相,采用磷酸盐缓冲液-乙腈(体积比为60:40)为流动相,用于测定禽蛋中的三聚氰胺,目标物的响应峰与禽蛋样品中的杂质峰能更好分离,基线平稳,基线信号噪音较小.

按本研究的色谱条件,从二极管阵列检测器得到三聚氰胺色谱峰的紫外线吸收光谱图,对光谱图的分析发现,在236 nm波长处有一吸收峰,在228 nm处有一吸收谷,继续往低波长方向,吸收度呈快速上升,至210 nm达最大.在检测波长的选择上,如果选择较低波长,药物峰的响应值明显变大,但基线的噪音信号增加更为显著,选择240 nm作为检测波长虽不在药物吸收峰顶的位置,但基线噪音较小,相比之下三聚氰胺色谱峰的信噪比更为理想.

3.2 样品的制备和处理

禽蛋的可食部分主要是蛋清和蛋黄,经对阳性样品的蛋清和蛋黄中三聚氰胺的残留情况进行分析,发现残留主要在蛋清,蛋黄中也有少量残留,大约为蛋清中的1/3,考虑到人们吃蛋的时候通常是蛋黄、蛋清一起吃,因此在样品的制备上采用蛋黄和蛋

清加在一起均质制成待测样品. 由于待测禽蛋样品有一定粘稠性, 经反复试验, 在室温下 5 mL 样品的称样质量约为 5 g $[(5 \pm 0.1) \text{g}, n = 10]$, 检测含量以天平所称质量的结果进行计算. 样品处理主要的目标是提取三聚氰胺, 沉淀蛋白质和卵磷脂, 通常可以用甲醇、乙腈、三氯甲烷等有机溶剂或加入高氯酸、三氯乙酸、三氟乙酸等含卤素的溶液来处理样品. 在试验中发现, 禽蛋均质液具有乳化作用, 仅加入高氯酸、三氯乙酸、三氟乙酸等含卤素的溶液来处理样品难以获得澄清的样品提取液, 需要加入适量乙腈、甲醇等有机溶剂进一步破乳和沉淀蛋白质. 研究同时发现, 三聚氰胺在水、高氯酸、三氯乙酸、三氟乙酸等的稀溶液中的溶解较差, 而在稀乳酸溶液的溶解较为理想, 乙腈沉淀蛋白的效果较好, 最后选择了 0.5 mol \cdot L⁻¹ 乳酸溶液—乙腈(体积比为 35:65)的混合溶液来提取样品, 采用高速离心的方法获得澄清的样品溶液用于液相分析, 能得到良好的回收率.

3.3 方法的适用范围

本法利用二极管阵列检测器得到三聚氰胺的色谱峰特征紫外光谱图, 当禽蛋样品中三聚氰胺的质量分数 $\geq 0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 二极管阵列检测器即能获得特征明显的三聚氰胺紫外光谱图, 通过色谱峰的保留时间和色谱峰的在线紫外光谱图能很好地对检出的物质进行定性. 我国现阶段禽蛋中三聚氰胺的暂定残留限量为 2.5 mg \cdot kg⁻¹, 使用本法进行检测具有快捷准确的特点.

利用本方法同时还可以检测蛋中三聚氰胺衍生物环丙氨嗪的残留, 监测灵敏度及回收率与三聚氰胺相近. 环丙氨嗪色谱峰的保留时间约比三聚氰胺推后 2 min, 与三聚氰胺的色谱峰能完全分离.

在检测中, 如果需要更低的检测限, 可在本法的样品处理过程中, 移取 5~10 mL 样品混合溶液离心后的上清液, 置氮吹仪 50 $^{\circ}\text{C}$ 挥发至原体积的 1/2 后过混合型阳离子交换柱(SCX, 60 mg, 3 mL)进行净化和浓缩, 过柱方法按常规操作(3 mL 甲醇和 3 mL 水平衡柱子, 上样, 用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗柱子, 6 mL 体积分数为 5% 氨化甲醇洗脱并收集, 置氮吹仪 50 $^{\circ}\text{C}$ 挥发至干, 用 1 mL 流动相溶解后过 0.22 μm 滤膜得待测样品液)^[14]. 此法能使检测灵敏度提高 5~10 倍, 但在过柱操作上花费了大量的时间.

参考文献:

[1] KIM B, PERKINS L B, BUSHWAY R J, et al. Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tan-

dem mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2008, 91(2):408-413.

- [2] 魏瑞成, 王冉, 刘伟荣. 高效液相色谱法测定鸡蛋、牛奶和猪肉中环丙氨嗪及三聚氰胺的实验研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12):605-609.
- [3] 何乔桑, 刘敏芳, 黄丽英, 等. 高效液相色谱法测定奶粉和液态奶中的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(6):752-754.
- [4] 魏瑞成, 黄思瑜, 侯翔, 等. 鸡蛋中三聚氰胺残留的检测[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(6):936-939.
- [5] 饶钦雄, 童敬, 郭平, 等. 高效毛细管电泳法测定牛奶和奶粉中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(6):755-758.
- [6] YAN Na, ZHOU Lei, ZHU Zai-fang, et al. Determination of melamine in dairy products, fish feed, and fish by capillary zone electrophoresis with diode array detection[J]. Journal of agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(3):807-811.
- [7] 吴惠勤, 黄芳, 林晓珊, 等. 气相色谱-质谱法测定奶粉及奶制品中的三聚氰胺[J]. 分析测试学报, 2008, 27(10):1044-1048.
- [8] FILIGENZI M S, POPPENGA R H, ASTON L A, et al. The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007, 21(24):4027-4033.
- [9] 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 等. 超高效液相色谱-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.
- [10] 冯家望, 蔡勤仁, 柳训才, 等. 高效液相色谱-电喷雾串联技术测定奶及奶制品中三聚氰胺和环丙氨嗪[J]. 现代食品科技, 2008, 24(10):1058-1060.
- [11] 吴庆庆, 范可心, 沙伟, 等. 基于反相液相色谱-质谱联用的高灵敏度三聚氰胺检测新方法[J]. 科学通报, 2009, 54(2):171-176.
- [12] 祝伟霞, 袁萍, 杨冀州, 等. 亲水色谱-串联质谱法对牛奶与奶粉中三聚氰胺及其衍生物含量的测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(12):1288-1292.
- [13] 严丽娟, 吴敏, 张志刚, 等. 亲水作用色谱-电喷雾串联质谱法检测原料奶及奶制品中的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(6):759-762.
- [14] 宋书锋, 鲁杰, 安娟, 等. GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [15] 李红梅, 张庆合, 汤桦, 等. GB/T 22400-2008 原料乳中三聚氰胺快速液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.