

## 饲料中三聚氰胺的 GC-MS法测定及分析

王彪, 王登临

(甘肃省动物卫生监督所, 兰州 730030)

**摘要:**应用 GC-MS法测定饲料中的三聚氰胺。饲料样品中的三聚氰胺经提取、净化、HPLC检测、衍生化、采用 CGMS方法测定,外标法定量。对 420批饲料进行检测,用试剂盒筛选后,HPLC法检测出疑似阳性 26批,用 CGMS方法定性排除 17批,试验表明,HPLC法三聚氰胺检测阳性率为 6.1%,GCMS法确证后阳性率为 2.1%,此次 GC-MS法回收率为 92%。

**关键词:** GCMS;测定;三聚氰胺

**中图分类号:** S816.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0864(2008)S2-0094-04

## Determination and Analysis of Melamine in Feed Using GC-MS Method

WANG Biao, WANG Deng-lin

(Gansu Animal Sanitation Supervision Institute, Lanzhou 730030, China)

**Abstract:** Melamine in feed was determined by GC-MS method. Melamine in feed was extracted and purified from feed sample. After HPLC determination and derivatization, the melamine in feed was analyzed by CG-MS method and quantified by external standard method. A total of sampling of 420 pet feeds were checked. After test with screening kit, 26 samples were suspected positive by HPLC detection, 17 among them were qualitatively excluded by CGMS method. The experiments showed that positive rate of HPLC was 6.1%, GCMS confirmed positive rate was 2.1% and the recovery rate of GC-MS method was 92%.

**Key words:** GC-MS; determination; melamine

从 2007年 3月起,美国各地不断发生宠物食用宠物粮中毒事件。美国兽医机构接到的报告显示,有数千只宠物生病,其中 15只猫和 1只狗死亡。3月 23日,纽约州立食物实验室发现,总部设在加拿大安大略的“菜单食品”公司生产的宠物食品含有有毒物质。FDA表示,他们对宠物食品中所包含的任何一种成分都进行了调查,结果锁定了麦麸。3月 30日,FDA宣称,他们在来自中国徐州安营生物技术开发公司的麦麸中发现了三聚氰胺。FDA推测中毒事件可能与使用了含有三聚氰胺的原料有关。

据介绍,三聚氰胺是一种化工产品,主要用作涂料、纸张抗皱处理、胶粘剂等等。三聚氰胺简称三胺,学名三氨三嗪,别名蜜胺、氰脲酰胺,英文名为 melamine,分子式为  $C_3N_6H_6$ ,是一种用途广泛的具有均匀结构的有机化工中间产品,最重要的

用途是作为生产三聚氰胺-甲醛树脂的原料,该树脂为热固性树脂,它具有阻燃、耐水、耐热、耐老化、耐电弧、耐化学腐蚀、有良好的绝缘性能、光泽度和机械强度,广泛用于木材、涂料、造纸、纺织、皮革、电器、医药等行业。由于这种化学品含有氮,氮可以提高产品中的蛋白含量,因此不法厂商在植物蛋白粉中添加三聚氰胺,一方面三聚氰胺物理性状为“白色单斜晶体、无味”,与蛋白粉相似;另一方面易于购买,易于生产,成本很低。在蛋白粉中添加三聚氰胺,可增加非蛋白氮的含量,同时提高黏度。三聚氰胺虽然低毒性,但长期或反复接触作用可能对肾发生毒害作用<sup>[1,2]</sup>。

针对去年 3、4月份美国宠物饲料事件,农业部发布了《饲料中三聚氰胺的测定》公告,该标准经专家审定通过,并审查批准,发布为我国农业行业标准,并自发布之日起实施。用于饲料或宠物

收稿日期: 2008-07-10;修回日期: 2008-10-19

作者简介: 王彪, 兽医师, 从事饲料中违禁药物的检测技术研究。Tel: 0931-8462756; Email: wangb160@163.com

罐头中三聚氰胺检测的方法有镜检法、高效液相色谱法、气相/质谱联用法和液相质谱串联法<sup>[3]</sup>。高效液相色谱法准确性好,但灵敏度低,而液相质谱串联法还没有完善的标准,所以目前多用酶联免疫进行筛选,然后用气相-质谱仪(GC-MS)作确证。

本文采用 NY/T1372-2007 标准方法,用三氯乙酸和乙酸铅溶液提取,离心后经固相萃取小柱(MCX小柱)净化,氮气吹干后经双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)+三甲基氯硅烷 1% (TMCS) 衍生,气相色谱-质谱仪(GC-MS)检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验试剂除特别注明者均按 NY/T1372-2007 要求准备,甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水;10 g/L 三氯乙酸溶液;吡啶;衍生剂 N,O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)+1% TMCS(三甲基硅烷);MCX小柱,混合型阳离子交换固相萃取柱,60 mg/3 mL。

三聚氰胺标准品于 2007年 7月 12日购于中国兽药药品监察所。精确称取 1.002 1 mg三聚氰胺标准品,用甲醇配成浓度约为 1 mg/mL 的标准储备液。

将储备液用甲醇稀释成浓度为 5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 和 500 μg/L 的标准溶液,作为工作液,备用。

### 1.2 色谱及质谱条件

高效液相色谱仪采用 Agilent 1100, C8 色谱柱(150 mm ×4.6 mm, 5 μm);柱温为室温,流动相流速 1.0 mL/min,监测波长 240 nm。

气相色谱-质谱联用仪采用 Agilent 6890-5975;色谱柱为 HP-5MS 5% 苯基甲基聚硅氧烷(30 m ×0.25 mm, 0.25 μm);进样口 260;脉冲不分流进样方式;进样体积 1 μL;柱温 75 (保持 1 min),以 30 /min 升温至 300 (保持 2 min);载气为高纯氦气(>99.999%);流速为 1.3 mL/min;GC/MS 传输线温度 280 ;溶剂延迟 5 min;运行 10.5 min;分析器温度 230 ;四极杆温度 150 ;质谱采用选择离子扫描方式,以(m/z)99、171、327 和 342 作为选择离子,327 作为定量

离子。

### 1.3 分析步骤

#### 1.3.1 样品的制备

分别称取饲料样品各 5 g 作为被检样品。取空白样品,作为空白样品。取空白饲料样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加样品。

1.3.2 提取 准确称取饲料样品 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,准确加入 50 mL 三氯乙酸,加入 2 mL 乙酸铅溶液。摇匀,超声提取 20 min。静止 2 min,取上层提取液约 30 mL 转入离心管中,在 10 000 rpm 离心机上离心 5 min,去上清液作为备用液。

1.3.3 净化 依次用甲醇 3 mL,水 3 mL 润洗活化 MCX 小柱后,准确移取 10 mL 离心备用液分次过柱。然后用水 3 mL,甲醇 3 mL 淋洗,真空抽干。用氨水甲醇 3 mL 洗脱 MCX 小柱,收集洗脱液于具塞玻璃试管中,50 下氮气吹干。在样液过柱和洗脱过程中流速控制在 1 mL/min 左右。

1.3.4 液相检测 将洗脱液用 0.45 μm 有机膜过滤后移入样品瓶中用液相检测,计算出样品的含量。根据样品的含量稀释。

1.3.5 衍生 取适量的稀释液于带拧塞的试管中,用氮气吹干在净化、吹干的样品残渣中加入吡啶 200 μL, BSTFA +1% TMCS 衍生试剂 200 μL。涡旋振荡溶解 20 s,密封玻璃塞,70 恒温加热 30 min 衍生化,作为试样溶液上气相质谱联用仪检测。

1.3.6 检测 准确称取饲料,按照样品处理过程,过完小柱并且氮气吹干后备用。取适量试样溶液和相应的标准工作溶液加到上述的备用空白样品中,作单点校准,以 99、171、327、372 作为选择离子,327 作为碎片离子色谱峰(基峰)面积积分值定量。

1.3.7 空白实验 除不加试料外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线

分别准确量取空白样品,按照样品处理过程,过完小柱并且氮气吹干后备用。用移液管分别吸

取标准工作液中浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$  的溶液  $0.5 \text{ mL}$ 、 $1 \text{ mL}$ 、 $2 \text{ mL}$ 、 $5 \text{ mL}$  和  $10 \text{ mL}$  于 5 个  $100 \text{ mL}$  容量瓶内,用甲醇定容,该溶液三聚氰胺浓度为  $0.05 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.2 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$  和  $1.0 \mu\text{g/mL}$ ,再分别准确吸取  $0.50 \text{ mL}$  加到上述的备用空白样品中,涡旋振荡  $20 \text{ s}$ ,在  $50^\circ\text{C}$  下弱氮气流吹干,按上述衍生化步骤进行,供气质联用色谱仪测定后作校正曲线(见图 1)。

## 2.2 样品的定性与定量

2.2.1 定性 标准溶液质谱图见图 2,总离子流图见图 3。本试验所采用的实验仪器和条件的保留时间在  $7.125 \text{ min}$  左右。样品的测定,按照样品与标准品保留时间的相对偏差不大于  $0.5\%$ ,特征离子丰度与标准品相差不大于  $20\%$  的标准进行三聚氰胺的定性分析。

2.2.2 定量 以  $342$ 、 $327$ 、 $171$  和  $99$  峰面积之和进行单点校正定量。

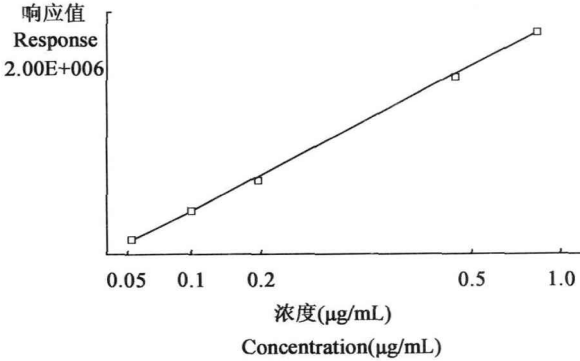


图 1 标准溶液标准曲线图

Fig 1 The standard curve of standard solution

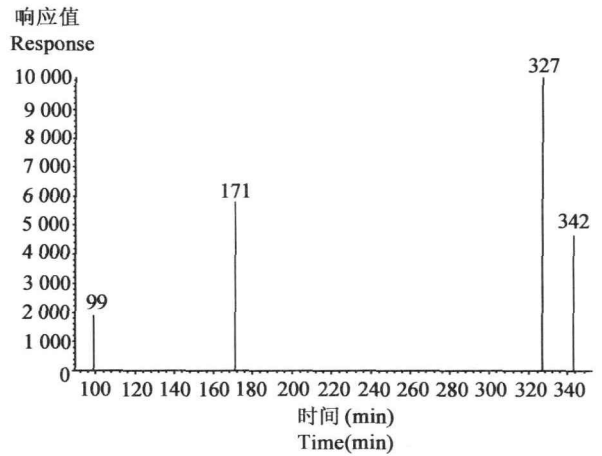


图 2 标准溶液质谱图

Fig 2 The GC-MS profile of standard solution

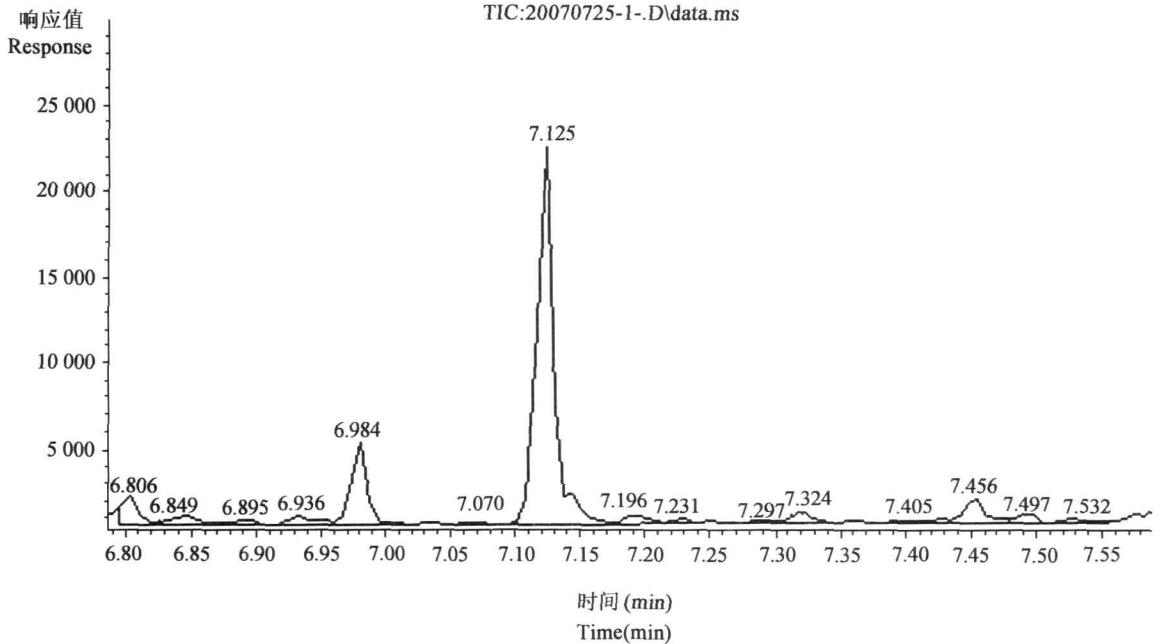


图 3 标准溶液总离子流图

Fig 3 Total ion flow profile of standard solution

2.2.3 样品检测结果 对 420 批饲料样品进行检测,用试剂盒筛选后,HPLC法检测出疑似阳性 26 批,用 GC-MS方法定性排除 17 批,试验表明,HPLC法检测三聚氰胺阳性率为 6.1%,GC-MS法确证后阳性率为 2.1%,此次 GC-MS法回收率为 92%。

### 3 讨论

三聚氰胺属于难挥发性化合物,欲用 GC-MS测定必须将其衍生成易挥发性化合物本方法用衍生试剂 N,O 双三甲基硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA) +1% 三甲基氯硅烷 (TMCS) 衍生后产生容易辨别的离子。本研究选择 (m/z) 342、327、171 和 99 等 4 个离子为特征离子,三聚氰胺的 327 离子为基峰离子,并规定样品与标准品保留时间相差不大于 0.5%。样品溶液的 4 个选择离子丰度若与标准溶液的 4 个选择离子丰度一致或在一定范围之内,可判断为样品中含有三聚氰胺。

饲料中三聚氰胺添加虽然用高效液相色谱法

检测准确性很好,但 GC-MS 能够更准确的定性和定量,所以用 GC-MS 确证是必要的。用 HPLC 进行三聚氰胺检测后再用 GC-MS 确证,回收率在 90% 以上。

此外在选择提取条件时,应注意:试剂和柱子的选择;用乙酸铅去除蛋白,用乙醚去除脂肪;萃取选用 MCX 小柱,速度不能过快。

在选择衍生化条件时,应注意:衍生化试剂选择 BSTFA +1% 三甲基氯硅烷 (TMCS); 反应温度选择在 70 ; 衍生化之前,必须吹干,使样品不带水分。

### 参 考 文 献

- [1] 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰. 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.
- [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] 张美金, 林海丹, 林峰, 等. 高效液相色谱法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, 17 (12): 2205 - 2206, 2246.

### 【新书推介】



## 《饲料添加剂的配制及应用》

邱楚武 编著 金盾出版社

出版日期: 2008. 7

I S B N: 9787508206813

定 价: 10.00 元

开 本: 32 开

页 数: 234 页

本书内容包括:各种常用和新型饲料添加剂的种类、成分、功能用途、产品规格和使用技术,饲料添加剂预混料配方设计的基本原则、设计程序、原料的选择、加工工艺和质量管理,部分常用

配合饲料添加剂配方实例及其分析。全书内容丰富,通俗易懂,实用性强。可供饲料及饲料添加剂预混料生产单位、饲养场的技术及管理人员、养殖专业户、大专院校相关专业的师生阅读。