

鸡肉中三聚氰胺残留量检测方法研究

张莉¹, 曾明华², 阮祥春² (1. 安徽省兽药饲料监察所, 安徽合肥 23002; 2. 安徽农业大学, 安徽合肥 230001)

摘要 [目的]为检测动物性食品中的三聚氰胺提供参考方法。[方法]以鸡肉匀浆为材料,用高效液相色谱法和气相质谱法检测其中的三聚氰胺含量,并对检测方法的回收率和精密度进行测定。[结果]高效液相色谱法确定的鸡肉中三聚氰胺的最低检测限为1 μg/g,最低定量限为2 μg/g,在0.05~50 μg/g范围内线性关系良好;方法的回收率大于80%,测定结果的日内变异系数小于7%,日间变异系数小于10%。气相质谱法确定的三聚氰胺的最低检测限为30 ng/g,最低定量限为5 030 ng/g,在5~500 ng/g范围内线性关系良好;方法的回收率在80%以上,测定结果的日内变异系数小于8%,日间变异系数小于10%。[结论]该研究为鸡肉中三聚氰胺的检测提供了新方法。

关键词 三聚氰胺; 高效液相色谱; 气相质谱

中图分类号 D657.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)08-03361-03

Study on Detecting Methods on Residual Amount of Melamine in Chicken Meat

ZHANG Li et al (Veterinary Drug and Feed Supervision Institute of Anhui Province, Hefei, Anhui 230022)

Abstract [Objective]The study was to provide a reference method for detecting melamine in animal food. [Method] With the homogenate of chicken meat as the material, the melamine amount in it was detected with high performance liquid chromatography (HPLC) and gas phase mass spectrometry method, and then the recovery rate and the precision of the 2 detection methods were determined. [Result] The minimum detection limit on melamine in chicken meat by high performance liquid chromatography (HPLC) was 1 μg/g, and the limit quantification was 2 μg/g, and in 0.05-50 μg/g, the linear relationship was good. The recovery rate of this method was over 80%, the within-day variation coefficient was less than 7%, and the inter-day variation coefficient was less than 10%. The minimum detection limit on melamine in chicken meat by gas phase mass spectrometry method was 30 ng/g, and the limit quantification was 5 030 ng/g, and in 5-500 ng/g, the linear relationship was good. The recovery rate of this method was over 80%, the within-day variation coefficient was less than 8%, and the inter-day variation coefficient was less than 10%. [Conclusion]The study provided a new method to detect melamine in chicken meat.

Key words Melamine; High performance liquid chromatography (HPLC); Gas phase mass spectrometry

随着生活水平的提高,人们对食品安全的关注程度也越来越高。特别是近一段时间,牛奶中检测出三聚氰胺后,人们对三聚氰胺表现出极大的心理恐慌。事实上,不只是奶粉和牛奶含人为添加的三聚氰胺,动物通过饲料也会把三聚氰胺带人体内循环。因此动物食品中三聚氰胺的残留问题,也愈来愈受到关注。通过有效的技术手段,对动物性食品中的有害物质进行检测,对确保动物性食品的安全性具有十分重要的意义。

目前,三聚氰胺的检测方法有高效液相色谱法、气相-质谱法、液相质谱法、Spectra-Quad 在线分析法、酶联免疫吸附法等,但这些方法在鸡肉和动物组织三聚氰胺检测应用较少。为此,笔者采用高效液相色谱法和质谱法检测鸡肉中的三聚氰胺含量,以期快速、准确检测动物性食品中的三聚氰胺提供参考方法。

1 材料与方法

1.1 材料 自宁国市安徽五星养殖(集团)有限责任公司取鸡胸脯肌肉 1 000 g,用一次性保鲜袋收集,编号,匀浆,-18℃保存备用。

1.2 仪器与试剂 仪器:Agilent5973i 气质联用仪,美国 Agilent 公司;Agilent1100 液相色谱仪,美国 Agilent 公司;AM-6 组织匀浆机,日本精机制作所;CR22G 高速冷冻离心机,日本日立公司;5085 氮吹仪,美国 Organomation 公司;固相萃取装置,美国 Supelco 公司;BS21S 十万分之一天平,德国赛多利斯;MS2 周转速振动仪,德国 IKA 公司。试剂:三聚氰胺对照品(含量>99%),德国;甲醇、吡啶、乙腈(色谱纯),美国 FISHER Chemical 公司;三氯乙酸、正己烷、乙酸铅、庚烷磺酸

钠(分析纯)上海化学试剂有限公司;固相萃取小柱(MCX),规格:3 ml,60 mg 填料,AgelaClearertTMPCX(北京艾杰尔科技有限公司 Agela 公司)和美国 waters 公司;衍生化试剂:N,O-双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)+1% 三甲基氯硅烷(TMCS)。

1.3 方法

1.3.1 试剂的配制。①1%三氯乙酸:称取10 g三氯乙酸溶解于1 000 ml水中,混匀。②5%氨化甲醇:量取5 ml氨水,溶解于100 ml甲醇中。③乙酸铅溶液(22 g/L):取22 g乙酸铅加水溶解后定容至1 L。④甲醇溶液:取甲醇200 ml加水800 ml,混匀。⑤流动相:称取2.02 g庚烷磺酸钠和2.10 g柠檬酸加水溶解后稀释到1 000 ml,取该溶液900 ml加入100 ml乙腈,混匀。

1.3.2 三聚氰胺标准储备液与工作液的配制。①标准储备液(1 mg/ml):精密称取三聚氰胺对照品100 mg(精确到0.1 mg),用甲醇溶解并定容于100 ml容量瓶中,-18℃冰箱保存,有效期90 d。②标准工作液1:量取适量三聚氰胺储备液,用甲醇稀释成0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、50 μg/ml的标准工作液,用作液相色谱分析,4℃冰箱保存,有效期7 d。③标准工作液2:量取适量三聚氰胺储备液,用甲醇稀释成0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 μg/ml的标准工作液。用作气相质谱-质谱分析,4℃冰箱保存,有效期7 d。

1.3.3 样品处理与检测。

1.3.3.1 样品预处理。称取5.0 g(±0.05)匀浆后的样品,置离心管中,依次加入1%的三氯乙酸18 ml和乙酸铅溶液2 ml,10 000 r/min均质1 min,振荡20 min,12 000 r/min离心5 min。取上清液待用。

MCX柱活化:分别用3 ml甲醇,3 ml水活化MCX柱,准确移取5 ml离心后的上清液分次上柱。再用3 ml水和3 ml

作者简介 张莉(1973-),女,安徽界首人,兽医师,在读硕士,从事兽药残留与饲料安全检测管理与分析工作。*通讯作者。

收稿日期 2008-12-08

甲醇洗涤 MCX 柱,抽干后用 5% 氯化甲醇溶液 3 ml 洗脱,收集洗脱液,抽干。洗脱液于氮吹仪上 50 °C 吹干,加甲醇 1 ml,振荡溶解,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,上机测定。

1.3.3.2 检测波长的选择。将三聚氰胺标准工作液在 190 ~ 400 nm 紫外波长下进行扫描,用高效液相色谱仪的 DAD 紫外检测器筛选对三聚氰胺有良好吸收的波长。

1.3.3.3 液相色谱条件。色谱柱: C8 柱, 150 mm × 4.6 mm (i. d), 5 μm; 流速 1 ml/min; 柱温为室温; 流动相为乙腈: 10 mM 庚烷磺酸钠 + 10 mM 柠檬酸缓冲液 (8 + 92); 进样量 20 μl。

1.3.3.4 气相质谱条件。DB-5MS 柱, 长 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm; 载气为氦气 (He); 流速 1.3 ml/min; 不分流进样, 进样体积为 1 μl, 进样口温度 250 °C; 升温程序: 起始温度 75 °C, 保持 1.0 min, 以 30 °C/min 升温至 300 °C, 保持 2.0 min; 传输线温度 280 °C; 扫描模式为离子扫描; 监测离子为 99、171、327、342 m/z; 溶剂延迟 4.2 min; 四极杆温度 150 °C; 离子源温度 230 °C; EI 源轰击能 70 eV。

2 结果与分析

2.1 三聚氰胺高效液相色谱法测定结果

2.1.1 样品的标准曲线。

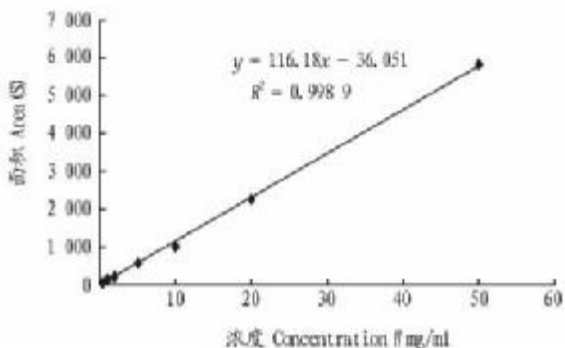


图1 三聚氰胺高效液相色谱的标准曲线

Fig.1 HPLC standard curve of melamine

2.1.2 三聚氰胺的最低检测限与最低定量限。由图 2、图 3 可知, 鸡肉中三聚氰胺的最低检测限为 1 μg/g, 最低定量限为 2 μg/g。

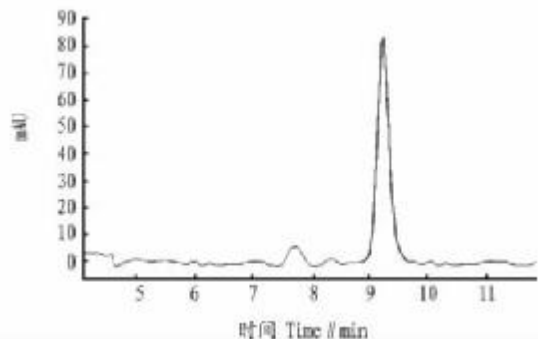


图2 鸡肉样品的高效液相色谱空白图谱

Fig.2 HPLC blank atlas of chicken sample

2.1.3 回收率测定结果。将含三聚氰胺 5、10、20 μg/g 的标准工作液分别添加到空白鸡肉样品中, 按“1.3.3.1”方法处理后测定, 每处理重复 6 次, 根据样品的峰面积计算三聚氰胺的回收率。由表 1 可知, 5、10、20 μg/g 标准工作液中三聚

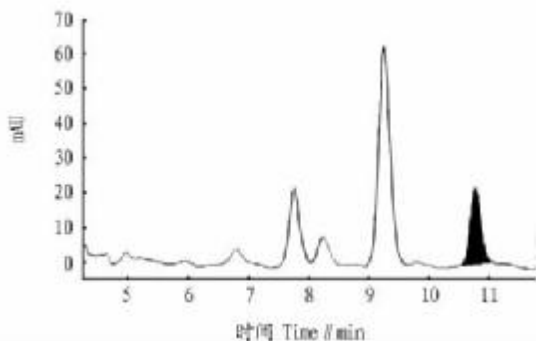


图3 鸡肉中三聚氰胺的高效液相色谱最低检测限

Fig.3 HPLC lowest detection limit of melamine in chicken

氰胺的回收率分别为 (82.5 ± 3.60)%、(184.1 ± 2.96)% 和 (85.1 ± 3.36)%。说明该方法回收率较高。

2.1.4 精密度测定结果。将含三聚氰胺 5、10、20 μg/g 的标准工作液分别添加到空白鸡肉中, 分别在日内和日间按“1.3.3.1”方法处理后测定, 每处理重复 6 次, 根据样品的峰面积计算三聚氢胺在日内和日间的变异系数, 结果如表 1 所示。三聚氰胺检测结果在日内和日间的差异较小, 说明该方法的检测精密度较高。

表1 鸡肉中三聚氰胺高效液相色谱法的回收率与精密度测定结果

Table 1 Detection results of HPLC recovery and precision of melamine in chicken samples

三聚氰胺浓度 mg/g Melamine concentration	回收率//% Recovery	日内变异系数//% Intra-day variation coefficient	日间变异系数//% Inter-day variation coefficient
5	82.5 ± 3.60	3.70	6.90
10	84.1 ± 2.96	4.90	7.20
20	85.1 ± 3.36	5.80	8.30

2.2 三聚氰胺气相质谱法测定结果

2.2.1 样品的标准曲线。

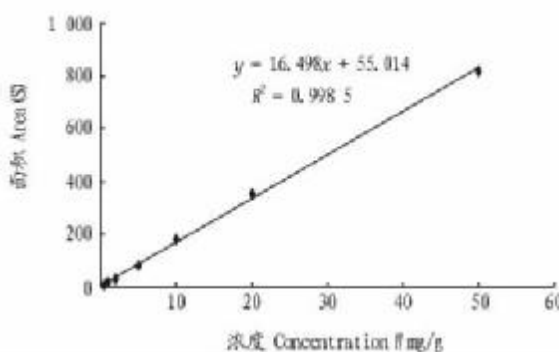


图4 三聚氰胺气相质谱标准曲线

Fig.4 Gas phase mass spectrometry standard curve of melamine

2.2.2 三聚氰胺的最低检测限与最低定量限。测得鸡肉中三聚氰胺的最低检测限为 30 ng/g, 最低定量限为 50 ng/g。

2.2.3 回收率测定结果。将含三聚氰胺 50、100、200 ng/g 的标准工作液分别添加到空白鸡肉中, 按“1.3.3.1”方法处理后测定, 每处理重复 6 次, 根据峰面积计算三聚氰胺回收率, 结果如表 2 所示。

2.2.4 精密度测定结果。将含三聚氰胺 50、100、200 ng/g 的标准工作液分别添加到空白鸡肉中, 分别在日内和日间测

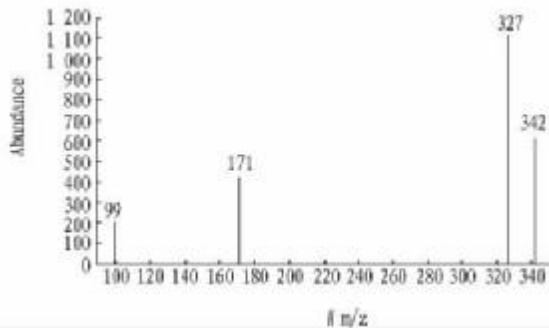


图 5 三聚氰胺气相质谱离子监测图

Fig. 5 Ion detection graph of melamine by gas phase mass spectrometry

定三聚氰胺的变异系数,每处理重复 6 次,根据峰面积计算变异系数,结果如表 2 所示。

表 2 鸡肉中三聚氰胺气相质谱法回收率与精密度测定结果

Table 2 Detection results of gas phase mass spectrometry recovery and precision of melamine in chicken samples

三聚氰胺浓度 ng/g Melamine concentration	回收率//% Recovery	日内变异系数//% Intra-day variation coefficient	日间变异系数//% Inter-day variation coefficient
50	79.30 ± 3.62	6.70	5.90
100	81.40 ± 4.86	5.90	7.00
200	80.20 ± 5.58	7.20	7.40

3 结论与讨论

3.1 检测波长确定 用高效液相色谱仪在 220 ~ 400 nm 对样品扫描时发现,236、240 nm 处都有吸收峰,但 236 nm 处出峰受到干扰,且杂峰较多。而 240 nm 处响应值较高,且杂峰最少,峰型好。

3.2 流动相选择 分别用甲醇-水、水-氨水、乙腈:10 mmol/L 柠檬酸 + 10 mmol/L 己烷磺酸钠 (pH = 3.0) 缓冲液 (8 + 92)、乙酸锌溶液-乙腈 (90 + 10) 作为流动相,对含三聚氰胺 5 μg/ml 的标准工作液进行检测,发现三聚氰胺显弱碱性,没有加入离子对的流动相使三聚氰胺组分峰出现肩峰和分叉峰,而用乙腈:10 mmol/L 柠檬酸 + 10 mmol/L 己烷磺酸钠 (pH = 3.0) 缓冲液 (8 + 92) 作流动相时,三聚氰胺峰型较好,各组分保留时间容易分辨。

3.3 提取方法选择 三聚氰胺为极性化合物,不溶于水,微溶于弱酸或弱碱、甲醇、乙醇等。该试验用甲醇-水 (9 + 1) 溶液、乙腈-水 (1 + 1) 溶液、发现三氯乙酸 + 乙酸铅为提取剂提取鸡肉中的三聚氰胺,三氯乙酸 + 乙酸铅的提取效果较好。鸡肉中含有较多的蛋白质,而三氯乙酸具有较强的沉淀蛋白质的能力,能够除去样品中较多的杂质,故选择三氯乙酸 + 乙酸铅作为提取剂。另外,三聚氰胺溶解性很弱,提取时间对回收率影响很大,因此比较了不同时间的提取效果,最终

确定超声提取 15 min 效果最佳。

3.4 净化方式确定 三聚氰胺呈弱碱性 (弱阳离子化合物),一般用阳离子交换柱对其净化。根据相似相容原理,选用 Waters Oasis MCX 固相萃取柱对其进行净化,使待测物以正离子态被吸附在固相萃取柱上,用甲醇淋洗,再用 5% 氨水甲醇洗脱能有效去除基质干扰,使样品更干净,提高检测的灵敏度,该方法重复性好,回收率高,重现性好。

3.5 质谱条件的优化

3.5.1 质谱条件的选择。 色谱条件的选择,主要是色谱柱、柱温、载气及载气流量的选择与优化。其基本原则是既要保证各组分完全分离,又要保证检测器不受固定相的污染。所以,应尽量选择低配比的耐高温的固定相,减少柱流失,该试验选择 5% 苯基甲基聚硅氧烷柱。选择 He 气作为载气。

3.5.2 升温程序的优化。 色谱柱的温度主要根据样品的复杂程度和汽化温度来确定。组成复杂的样品通常用程序升温法进行分离,柱温较低时,组分容量增大,塔板数增高,分离效果较好,但若温度太低则高沸点组分流出时间太长,造成峰展宽,甚至滞留在色谱柱中造成柱污染;反之,若柱温太高,低沸点组分难以分离。将色谱柱的初始温度定为 75 °C,设计程序升温至 300 °C,完成萃取解吸过程。

3.5.3 载气流速的优化。 由范迪姆特方程可知,载气流速过小,待分离样品中各组分在流动相中的扩散加剧;流速过大,组分在 2 相中的传质阻力增加,两者均导致柱效下降。该试验考察了 3 种不同载气流速对三聚氰胺的分析效果,发现载气流速为 1.3 ml/min 时分离效果最好。

3.6 气相质谱法的优点 气相质谱检测法不使用离子对试剂,既降低了检测成本、延长了色谱柱的使用寿命 (无离子对色谱柱的影响),又提高了三聚氰胺的检测限 (无离子对干扰),可使三聚氰胺得到较好的分离。

参考文献

- [1] 王亚吨,林海丹,邓国东. 反相高效液相色谱法测定饲料中三聚氰胺的含量[J]. 广东饲料,2008,3 (17): 41-43.
- [2] 李德良. 食品及饲料中三聚氰胺残留量液相色谱检测方法的研究[J]. 南昌高专学报,2007 (6): 131-135.
- [3] 辜雪英,吴小花,仇满珍. 饲料中三聚氰胺残留量高效液相色谱测定的研究[J]. 江西化工,2007 (2): 70-73.
- [4] 占春瑞,郭平,温志海. 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.
- [5] FDA/ORA Forensic Chemistry Center. GC/MS screen for the presence of melamine and cyanuric acid [EC/OL]. (2007-04-10) [2008-12-08]. http://www.fda.gov/cvm/Melamine_Presence_Htm.
- [6] CATHY B, KYU-SHIK J, ROBERT P, et al. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007 [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2007, 19 (5): 525-531.
- [7] REN B Z, LI C, YUAN X L, et al. Determination and correlation of melamine solubility [J]. J of Chem Ind Eng, 2003, 54 (7): 1001.
- [8] ANDERSEN W C, TURNIPSEED S B. Determination of melamine residues in catfish tissue by triple quadrupole LC-MS-MS with HILIC chromatography [J]. Laboratory Information Bulletin, 2007, 23: 4396.