



# 反相液相色谱和HILIC对奶制品中三聚氰胺的检测

徐然<sup>1</sup>, 郝卫强<sup>2</sup>, 毛燕妮<sup>1</sup>, 骆初平<sup>1</sup>, 黄学英<sup>1</sup>

(1.赛分(江苏)有限公司 技术部, 江苏 常州 213164; 2.常州南京大学高新技术研究院, 江苏 常州 213164)

**摘要:**应用Sepax GP-C8和Sepax Bio-C18柱按照国标(GB/T 22388-2008)对市场上购买得到的奶粉,以及应用Polar-Silica柱对鲜牛奶中的三聚氰胺进行了检测。结果表明,C18体现出比C8更高的分离选择性,避免了应用C8可能出现的假阳性检测结果。应用Polar-Silica检测鲜牛奶中的三聚氰胺,流动相为含挥发性醋酸铵盐的乙腈-水体系,可满足LC/MS的要求。Polar-Silica对三聚氰胺保留强度适中,且待测物在出峰处不会受到鲜牛奶中其它组分的干扰,因此可用于液态奶中三聚氰胺的快速检测与分析。

**关键词:**液相色谱;三聚氰胺;C18;C8;HILIC

**中图分类号:**TS252.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-2230(2009)09-0027-03

## Detection of melamine in milk products using HILIC and reversed phase liquid chromatography

XU Ran<sup>1</sup>, HAO Wei-qiang<sup>2</sup>, MAO Yan-ni<sup>1</sup>, LUO Chu-ping<sup>1</sup>, HUANG Xue-ying<sup>1</sup>

(1.Technical Division of Sepax Technologies, Inc, Changzhou 213164,China;

2.High-Tech Research Institute of Nanjing University, Changzhou 213164,China)

**Abstract:**Melamine in milk powder products was detected by using Sepax GP-C8 and Sepax Bio-C18 columns, respectively; in addition, melamine in fresh milk product was separated by using a Polar-Silica column. It was found that C18 phase is able to separate melamine from the other component (s) in the milk powder products more effectively than C8 phase. Thus it can avoid the false results of the existence of melamine. The mobile phase used for the Polar-Silica contained volatile ammonium acetate instead of ion-pair reagents as used for the C8 and C18 phases. This chromatographic system is suited for the LC/MS operations. It was also found that Polar-Silica phase showed good selectivity with moderate retention for separating melamine from other components in the milk product.

**Key words:**liquid chromatography; melamine; C18; C8; HILIC

### 0 引言

三聚氰胺是一种含氮量高的化工原料。一些不法商贩将其加入食品或饲料中,从而造成蛋白含量高的假象。三聚氰胺会诱发肾衰竭,因此对动物和人体的危害极大<sup>[1-4]</sup>。在出现“三鹿奶粉受三聚氰胺污染事件”后,社会对奶制品中三聚氰胺的检测提出了更为严格的要求。

高效液相色谱法在对三聚氰胺的检测中表现出选择性高和专属性好等优点,因此已被国家标准所采用<sup>[5,6]</sup>。国标GB/T 22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》采用C8或C18两种反相液相色谱柱,通过往流动相中添加离子对试剂,从而增强三聚氰胺在柱上的保留<sup>[7]</sup>。在本研究中,应用这两种色谱柱

对实际奶粉样品进行了分析。此外,还基于亲水相互作用分离机理,建立了可用于鲜牛奶中三聚氰胺快速检测的方法。

### 1 实验

#### 1.1 仪器和设备

Waters高效液相色谱仪系统,由Waters 600E输液泵,Waters 600E控制器,Waters 486紫外检测器,以及Millennium32色谱工作站等组成。

固相萃取装置为24孔真空固相萃取装置操作系统(VMF024GL)。其他仪器设备还包括分析天平、离心机、超声波水浴、涡旋混合器、pH计等。

#### 1.2 试剂和材料

色谱柱:Sepax GP-C8、Sepax Bio-C18、Polar-Silica柱;固相萃取柱:STYRE SCREEN<sup>®</sup>DBX,30 mg/6 mL。

三聚氰胺标准品,辛烷磺酸钠(色谱纯),乙腈和甲醇(色谱纯),实验用水为Milli-Q系统制纯水,其他试剂均为分析纯。

收稿日期:2009-01-26

基金项目:常州市社会发展科技计划项目(CS20090001)。

作者简介:徐然(1983-),女,硕士,从事色谱分析及质量检测工作。

通讯作者:郝卫强

1.3 待测样品的制备

1.3.1 奶粉试样的制备

奶粉D和Y购自当地超市。对奶粉中三聚氰胺的提取和净化按照国标GB/T 22388-2008中3.4.1.1和3.4.2项的要求进行操作<sup>[9]</sup>。

1.3.2 鲜牛奶试样的制备

鲜牛奶M购自当地超市。对鲜牛奶中三聚氰胺的提取按照GB/T 22400-2008中6.1项的要求进行操作<sup>[9]</sup>。

1.4 色谱条件

1.4.1 用于奶粉中三聚氰胺分析的色谱条件<sup>[9]</sup>

色谱柱: Sepax GP-C8柱, 250mm×4.6mm(i.d.), 5 μm, 或Sepax Bio-C18柱, 250mm×4.6mm(i.d.), 5 μm。

流动相: Sepax GP-C8柱, 离子对试剂缓冲液(浓度为10mmol/L的柠檬酸和10mmol/L的辛烷磺酸钠, pH=3.0): 乙腈=85:15(体积比)。Sepax Bio-C18柱, 离子对试剂缓冲液(浓度为10mmol/L的柠檬酸和10mmol/L的辛烷磺酸钠, pH=3.0): 乙腈=90:10(体积比)。

柱温为40℃或室温(23℃); 流速为1.0 mL/min; 波长为240 nm; 进样量为20 μL。

1.4.2 三聚氰胺分析的色谱条件

色谱柱: Polar-Silica柱, 250mm×4.6mm(i.d.), 5 μm。

流动相: 10mmol/L醋酸铵溶液(pH=3.0): 乙腈=25:75(体积比)。

柱温为室温(23℃); 流速为1.0 mL/min; 波长为240 nm; 进样量为20 μL。

2 结果与讨论

2.1 对奶粉中三聚氰胺的分离

研究中, 按照国标GB/T 22388-2008规定的色谱条件分别应用GP-C8和Bio-C18柱对三聚氰胺标准品以及奶粉样品进行了分离。在室温条件下, 当用GP-C8柱进行检测时, 空白奶粉D和Y在三聚氰胺的出峰位置处(约13.5 min, 如图1(b)和(c))均有色谱峰出现。当柱温升至国标所规定的40℃时, 实验发现奶粉样品中“三聚氰胺”的色谱峰出现了变形(见图1(d))。这个结果表明奶粉D和Y中的“三聚氰胺”峰有可能是奶粉中的某一组分。在温度升高时, 该组分的保留时间与三聚氰胺的保留时间发生了不同的位移。

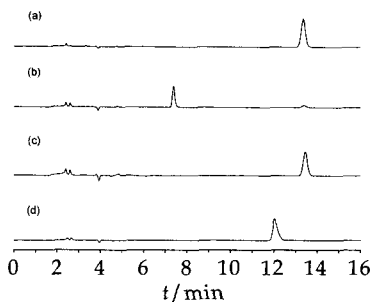


图1 采用柱Sepax GP-C8进行分析结果

若无特别说明, 柱温为室温(23℃)。图1中, (a)为三聚氰胺标准溶液; (b)为奶粉D空白提取液; (c)为奶粉Y空白提取液; (d)为奶粉Y空白提取液, 柱温为40℃。

为了进一步探究图1(d)中色谱峰发生变形的真实原因, 采用Bio-C18柱对相同样品进行了分析, 分离结果如图2所示。由图2(b)和图2(c)可以看出, 在奶粉D样品中, 三聚氰胺出峰位置处(约14min)并没有色谱峰的出现。然而, 在此之前约2min处出现了与图1(b)中三聚氰胺出峰位置处峰面积接近的一个色谱峰。接着, 在对奶粉Y的分析中(图2(d)), 同样出现这个色谱峰, 并且它与三聚氰胺峰面积的加和与图1(d)中的那个发生变形的色谱峰的峰面积非常接近。由此可以判断, 在用GP-C8柱分离得到的图1(b)中, 三聚氰胺出峰位置处出现的那个色谱峰应是奶粉中某个组分; 应用C8柱检测时该组分的存在极有可能会造成样品中含有三聚氰胺的假象。与GP-C8相比, 在用Bio-C18柱对两种奶粉试样分离得到的结果中(图2), 三聚氰胺与奶粉中其它组分有着非常好的分离度。因此, 在GB/T 22388-2008所规定的色谱条件下, C18固定相在对实际奶粉样品的分离中表现出比C8更高的选择性。

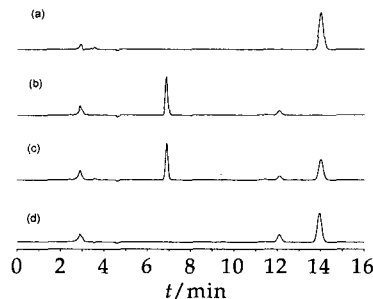


图2 采用Sepax Bio-C18柱进行分析结果

图2中, (a)为三聚氰胺标准溶液; (b)为奶粉D空白提取液; (c)为添加了三聚氰胺的奶粉D提取液; (d)为奶粉Y空白提取液。

此外, 与C8柱相比, 疏水性化合物如离子对等在C18柱上往往会有更强的保留, 从而使分析时间较长。研究中我们曾采用其它品牌的C18柱, 所得到色谱分离情况与图2类似, 但是三聚氰胺的保留时间均在20min以上。因此, 最终采用Sepax Bio-C18柱, 该色谱柱填料孔径为300Å, 具有适中的比表面积(105m<sup>2</sup>/g)和碳载量(7%), 这样可在确保C18固定相高选择性的同时, 有效缩短分析的时间。研究中三聚氰胺在Bio-C18柱上的保留时间与GP-C8柱大体相当。

2.2 对鲜牛奶中三聚氰胺的分离

由于三聚氰胺为强极性物质, 因此在用反相液相色谱对其进行分离时, 需要在流动相中添加离子对试剂以增强其在色谱柱上的保留。而Polar-Silica柱则基于亲水相互作用(Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC)机理, 对极性化合物有着较强的保留, 可在流动相不含离子对试剂的条件下对三聚氰

胺进行分析<sup>[7-10]</sup>。图3为采用Polar-Silica柱(5 μm, 120 Å, 250 mm×4.6 mm i.d.)对三聚氰胺标准品及鲜牛奶试样进行分析结果。由图3可以看出,三聚氰胺在Polar-Silica柱上不受鲜牛奶所含组分的干扰,而且分析时间可控制在8min以内,因此可用于液态奶制品中三聚氰胺的快速检测与分析。此外,该色谱体系的另一个显著优点是流动相体系中不含有不易挥发的盐类物质,且乙腈比例较高,因此也将非常适合于三聚氰胺的LC/MS分析。

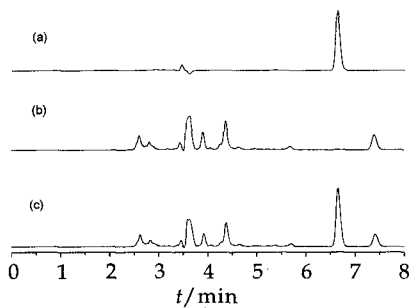


图3 采用Polar-Silica柱进行分析结果

图3中,(a)为三聚氰胺标准溶液;(b)为空白鲜牛奶M;(c)为添加了三聚氰胺的鲜牛奶M。

### 3 结束语

应用Sepax Bio-C18柱按照国标GB/T 22388-2008对奶粉试样中的三聚氰胺进行分析,其具有分离选择性高和保留强度适中的优点,可避免应用C8柱时可能遇到的假阳性的检测结果。应用Polar-Silica对鲜牛奶中的三聚氰胺进行分析,分离选择性好,分析时间可控制在8min以内,而且流动相中无离子对试剂及其它不易挥发的物质,同时乙腈比例较高,因此也将

非常适合于三聚氰胺的LC/MS分析。

### 参考文献:

- [1] 赵永彪,李自春,刘婷,等. 高效液相色谱法测定宠物食品中的三聚氰胺[J]. 分析实验室, 2008, 27 Suppl: 190-192.
- [2] 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]. 化学分析计量, 2008, 17(2): 48-50.
- [3] 王浩,刘艳琴,曹红,等. 固相萃取与高效液相色谱联用测定宠物食品中三聚氰胺[J]. 分析化学, 2008, 36(2): 273.
- [4] 栾伟. 液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)分析宠物食品中三聚氰胺[J]. 分析测试学报, 2007, 26 Suppl: 285-286.
- [5] 国家标准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.
- [6] 国家标准GB/T 22400-2008 原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [7] QIN F, ZHAO YY, SAWYER MB, et al. Column-switching reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of free estrogens and their conjugates in river water[J]. Anal. Chim. Acta, 2008, 627(1): 91-98.
- [8] WANG Y, LEHMANN R, LU X, et al. Novel, fully automatic hydrophilic interaction/reversed-phase column-switching high-performance liquid chromatographic system for the complementary analysis of polar and apolar compounds in complex samples [J]. J. Chromatogr. A, 2008, 1204(1): 28-34.
- [9] LOUW S, PEREIRA AS, LYNEN F, et al. Serial coupling of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography to broaden the elution window for the analysis of pharmaceutical compounds[J]. J. Chromatogr. A, 2008, 1208(1-2): 90-94.
- [10] KUNNEMEYER J, TERBORGH L, NOWAK S, et al. Speciation Analysis of Gadolinium-Based MRI Contrast Agents in Blood Plasma by Hydrophilic Interaction Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry[J]. Anal. Chem., 2008, 80(21): 8163-8170.

(上接第21页)

明小肽产品的添加对乳品质的提高具有一定的促进作用,但是乳蛋白率的改变幅度小于乳脂率的变化幅度,可见通过营养调控途径改变乳蛋白率不如改变乳脂率容易,查阅文献得知乳蛋白率主要受奶牛品种的影响<sup>[6]</sup>。

### 参考文献:

- [1] TAKAHIRO T, KATSUKI K, MASAKAZU T, et al. Taiji Matsukawa Masaaki Yoshikawaa. Soymetide, an Immunostimulating Peptide Derived from Soybean L-conglycinin, is an fMLP Agonist [J]. FEBS Letters, 2003, 540: 206-210.

- [2] KIM S B, KI K S, KHAN M A. Peptic and Tryptic Hydrolysis of Native and Heated Whey Protein to Reduce Its Antigenicity [J]. Dairy Sci, 2007, 90: 4043-4050.
- [3] KORHONEN M, VANHATALO A, HUHTANEN P. Effect of Protein Source on Amino Acid Supply, Milk Production and Metabolism of Plasma Nutrients in Dairy Cows Fed Grass Silage [J]. Dairy Sci, 2002, 85: 3336-3351.
- [4] 曹志军,李胜利,丁志明. 日粮中添加小肽对奶牛产奶性能影响的研究[J]. 饲料工业, 2004(4): 35-37.
- [5] 郭冬生,彭小兰. 小肽制剂和过瘤胃产品对奶牛产奶性能及奶品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2007(6): 202-203.