

Determination of melamine in feed by HPLC

Deng Qinqin

Nanchang University, Nanchang

Abstract: A high performance liquid chromatographic method was established for the determination of melamine in feed. The samples were extracted with trichloroacetic acid solution. After centrifuged, the supernatants were cleaned by mixed cation exchange SPE column. The eluant were dried, then redissolved by initial mobile phase. Separation was performed by using Elite MSP column (ID 4.6 mm×150 mm, 5 m), the retention time of melamine was 14 min. The limit of detection (LOD) of the method was 0.046 mg/kg and the limit of quantification (LOQ) was 0.153 mg/kg. The method was sensitive and reliable and more propitious to be used for the determination of melamine in feed.

Key words: Melamine; High performance liquid chromatography; Feed

Received: 2020-01-07; Accepted: 2020-01-22; Published: 2020-01-24

高效液相色谱测定饲料中三聚氰胺含量的方法

邓勤勤

南昌大学，南昌

邮箱: qqdengqq@hotmail.com

摘 要: 建立了高效液相色谱 (HPLC) 测定饲料中三聚氰胺含量的方法。样品中三聚氰胺用三氯乙酸溶液提取，提取离心后经混合型阳离子交换固相萃取柱净化，洗脱物吹干后用流动相溶解，用高效液相色谱仪进行测定。使用 Elite MSP 5 m (ID 4.6 mm × 150 mm) 色谱柱，三聚氰胺保留时间为 14 min，方法验证结果表明该方法具有良好的稳定性和重现性，该方法的三聚氰胺方法检出限为 0.046 mg/kg，方法定量限为 0.153 mg/kg，远低于农业部标准 NY/T 1372-2007 的检出限 2.0 mg/kg，为饲料样品的安全性评价提供了稳定、高灵敏分析方法。

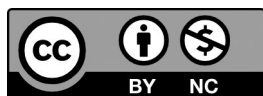
关键词: 三聚氰胺；高效液相色谱；饲料

收稿日期：2020-01-07；录用日期：2020-01-22；发表日期：2020-01-24

Copyright © 2019 by author(s) and SciScan Publishing Limited

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



1 前言

三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物，重要的氮杂环有机化工原料。简称三胺。三聚氰胺是一种低毒的化工原料。由于食品和饲料工业蛋白质含量测试方法的缺陷，三聚氰胺也常被不法商人用作食品添加剂，以提升食品检测中的蛋白质含量指标，因此三聚氰胺也被人称为“蛋白精”。目前最为常用的三聚氰胺检测手段主要有液相色谱法、气相色谱—质谱法、液相色谱—质谱法、酶联免疫法等。其中，液相色谱法具有灵敏度高、准确、可靠、仪器成本低等优势，因而是检测三聚氰胺的理想方法。

2008年9月三鹿毒奶粉事件发生后，发现饲料已成为三聚氰胺的主要污染对象之一，饲料的污染会引起相应农产品如肉类、禽蛋类食品的污染，危害性极大。因此，国家加大了对饲料中三聚氰胺的监测力度。目前饲料中三聚氰胺分析的标准只有农业部的标准 NY/T 1372-2007《饲料中三聚氰胺的测定》。但在进行实际饲料样品分析中发现，农业部标准中使用的蛋白沉淀剂对某些饲料样品不能有效进行蛋白沉淀，离心后饲料样品浑浊，不能应用 HPLC 直接测试，同时其色谱条件对一些饲料样品不能实现三聚氰胺与杂质峰的有效分离。因此，建立快速有效的饲料样品中三聚氰胺的 HPLC 分析方法十分必要。本文通过对农业部标准进行优化改进，建立了饲料中三聚氰胺的解决方案。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV1201 紫外—可见检测器，P1201 高压恒流泵，固相萃取仪，混合型阳离子固相萃取柱（大连依利特分析仪器有限公司），涡旋混合器，氮吹仪等。

三聚氰胺标准品（>99%）；氢氧化钠、柠檬酸（分析纯）、辛烷磺酸钠（色

谱纯)、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、乙酸锌(分析纯)、亚铁氰化钾(分析纯)、三氯乙酸(分析纯)、氨水(25%)、超纯水(二次过滤),饲料样品。

2.2 实验条件

2.2.1 样品前处理方法

称取饲料样品 0.40 g (精确到 0.01 g), 置于 10 ml 具塞刻度试管中, 加入 7 ml 1% 三氯乙酸, 涡旋混匀, 超声提取 10 min; 再加入 0.5 ml 10% 乙酸锌溶液和 0.5 ml 10% 亚铁氰化钾溶液, 涡旋混匀, 用 1% 三氯乙酸定容至满刻度线; 样品经 10 000 rpm, 离心 5 min; 取 5 ml 上清液作为待净化液。

依次用 3 ml 甲醇和 5 ml 水活化 SPE 柱; 将待净化液用水稀释至 10 ml, 转移至固相萃取柱, 依次用 3ml 水和 3 ml 甲醇洗涤, 抽至近干后, 用 6 ml 5% 氨化甲醇溶液洗脱。整个过程控制流速不超过 1 ml/min。洗脱液 50℃ 下用氮气吹干, 残留物用 1 ml 流动相溶解, 涡旋混合, 过 0.45 μm 油系滤膜, 供 HPLC 分析。

2.2.2 色谱条件

色谱柱为 Elite MSP 5 μm (ID4.6 mm × 150 mm) (大连依利特分析仪器有限公司); 流动相采用乙腈/缓冲盐 = 10/90 (缓冲盐为含 10 mmol/L 柠檬酸和 10 mmol/L 辛烷磺酸钠, 调节 pH 至 3.0); 流速为 1.5 ml/min; 检测波长为 240 nm; 柱温为室温; 进样量为 20 μl。

3 结果与讨论

3.1 线性相关性

配制浓度分别为 1 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml 的三聚氰胺标准品, 按 2.2.2 色谱条件进样分析。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作标准曲线, 相关系数为 0.9999, 说明在测定的浓度范围内, 三聚氰胺标准品具有良好的线性相关性。

3.2 方法准确性

在 4 个不同的加标水平下, 该方法三聚氰胺的加标回收率在 87.5%~104.0%

之间,说明方法准确性良好。如表 1 所示。

表 1 饲料样品加标回收率结果

加标量 (mg/kg)	平行实验一 (mg/kg)	平行实验二 (mg/kg)	平均值 (mg/kg)	回收率 (%)
1.0	1.05	1.03	1.04	104.0%
5.0	4.36	4.51	4.44	88.8%
10.0	9.63	9.25	9.44	94.4%
25.0	21.97	21.77	21.87	87.5%

3.3 方法重复性

同一饲料加标样品,一分为三,采用所述方法连续处理 3 次,并测试谱图计算结果。

表 2 结果说明,建立方法具有良好的方法重现性。

表 2 平行样品测试结果

平行实验一 (mg/kg)	平行实验二 (mg/kg)	平行实验三 (mg/kg)	平均值 (mg/kg)	RSD%
4.36	4.51	4.42	4.43	1.47

3.4 系统检出限和定量限

以 3 倍信噪比对应的浓度换算为方法检出限,以 10 倍信噪比对应的浓度换算为方法定量限。

表 3 数据表明,该方法具有较高的灵敏度,远低于农业部标准 NY/T 1372-2007 的检出限 2.0 mg/kg。

表 3 饲料中三聚氰胺方法检出限及定量限

计算方法	方法检出限 (mg/kg)	方法定量限 (mg/kg)
校正曲线方法	0.046	0.153

3.5 实际样品分析

按文中所建立的方法,对 10 种饲料样品进行了三聚氰胺分析实验,实验结果比较理想。

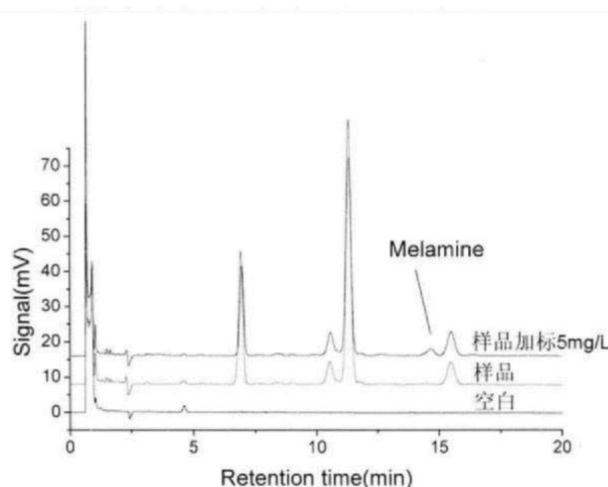


图 1 饲料样品、空白及样品加标叠加谱图

4 结论

建立了饲料中三聚氰胺测定的解决方案：采用三氯乙酸、乙酸锌、亚铁氰化钾作为蛋白沉淀剂，能够有效沉淀蛋白，离心后杂质沉淀良好；采用的色谱条件能够实现三聚氰胺与杂质峰的有效分离。为适应饲料样品的复杂性和多样性，在方法建立过程中选择成分比较复杂的饲料样品，并对该方法进行了系统的表征和实际样品测定，结果表明该方法稳定性好、灵敏度高，可以满足大多数饲料样品的分析。

参考文献

- [1] 陈君义, 孙慧宇, 苏燕等, . 食品和饲料中三聚氰胺检测技术研究进展 [J]. 粮油食品科技, 2010, 18: 38-43.
- [2] 王华东, 冯晓春. 乳品及饲料中三聚氰胺 / 三聚氰酸的检测方法研究进展 [J]. 粮油食品科技, 2012, 4: 78-80.
- [3] 王莉丽, 刘连利, 张杰, 等. 饲料中三聚氰胺的 HPLC 检测方法研究 [J]. 当代化工, 2012, 41: 547-549.
- [4] 王扬, 叶磊海, 张海琪, 等. 液相色谱法测定渔用饲料中的三聚氰胺 [J].

- 饲料检测, 2010, 18 (5): 49-51.
- [5] 黄春丽, 黄和, 高平, 等. 固相萃取—高效液相色谱法对饲料中三聚氰胺的检测 [J]. 检测分析, 2010, 19 (7): 32-34.
- [6] 倪沁颜. 高效液相色谱法 (HPLC) 测定饲料中三聚氰胺的含量 [J]. 福建分析测试, 2008, 17 (1): 57-59.
- [7] 蒋晨阳, 范倩, 林德清, 等. 气质联用法测定饲料中的三聚氰胺 [J]. 饲料工业, 2008, 29 (8): 48-50.
- [8] 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.
- [9] 黄芳, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 高效液相色谱—质谱法对饲料及食品添加剂中三聚氰胺的测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27 (3): 313-315.
- [10] 杨玉秀, 黄和, 谢丽玲, 等. 高效液相色谱质谱联用法测定饲料中的三聚氰胺 [J]. 饲料广角, 2011, (22): 38-40.
- [11] 陈俊峰, 贾敬亮, 张红艳, 等. 酶联免疫法检测饲料中的三聚氰胺 [J]. 安全检测, 2012, (4): 86-88.