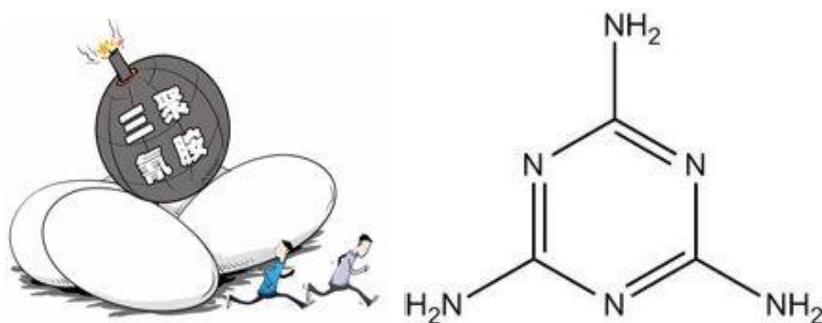


背景:

三聚氰胺（化学式： $C_3H_6N_6$ ），俗称密胺、蛋白精，是一种三嗪类含氮杂环有机化合物，白色晶体，无明显异味，常被用作塑料、涂料及粘合剂的化工原料。



通常牛奶等乳制品中蛋白质含量测定是通过检测其中氮元素含量来计算的，而三聚氰胺中氮元素含量高达 66%，且价格便宜，因此常被不法分子非法添加到牛奶或乳制品中。长期摄入过量三聚氰胺会引发人体膀胱炎症、上皮增生、结石等，甚至会导致膀胱癌，严重危害人体健康。



2011年4月6日发布的《关于三聚氰胺在食品中的限量值的公告》中明确规定：三聚氰胺不是食品原料，也不是食品添加剂，禁止人为添加到食品中。婴儿配方食品中三聚氰胺的限量值为 1mg/kg，其他食品中三聚氰胺的限量值为 2.5mg/kg，高于上述限量的食品一律不得销售。

实验部分:

牛奶中三聚氰胺的含量测定 高效液相色谱法

仪器与试剂:

仪器与设备：悟空 K2025 高效液相色谱仪；分析天平（精确到 0.0001g）；涡旋振荡器；pH 计；离心机；固相萃取装置；氮气吹干仪；超声波清洗机；容量瓶（10mL、1000mL，棕色带刻度）等。

试剂与材料：符合 GB/T6682 的一级水；甲醇、乙腈、辛烷磺酸钠 [色谱纯]；乙酸锌、冰乙酸、三氯乙酸、柠檬酸、氨水（含量为 25%~28%）[分析纯]；三聚氰胺标准品（纯度大于 99.0%）；混合型阳离子

交换固相萃取柱（基质为苯磺酸化的聚苯乙烯-二乙烯基苯高聚物）；0.22 μ m 微孔滤膜（有机相）。

实验方法:

样品提取: 称取2g（精确至0.01g）牛奶于50mL离心管中，依次加入3mL乙酸锌溶液乙酸锌溶液（质量浓度为20g/L），15mL三氯乙酸溶液（质量分数为2%）和5mL乙腈，超声提取10min，再振荡提取10min后，定容至25mL，于4000r/min条件下离心10min，取上清液过滤；准确移取5mL续滤液于10mL离心管中，加入5mL水混匀，即为待净化液。

活化: 依次使用3mL甲醇、5mL水对固相萃取柱进行活化，流速为1滴/s。

净化: 将待净化液转移至固相萃取柱中，依次用3mL水和3mL甲醇洗涤，抽至近干后，用6mL的5%氨化甲醇溶液洗脱，流速为1滴/s；将洗脱液收集后，于50 $^{\circ}$ C下用氮气吹干；残留物用1mL流动相定容，涡旋混匀1min，用0.22 μ m微孔滤膜过滤后，供HPLC测定。

色谱条件:

a) 色谱柱: C₁₈ 4.6 \times 250mm, 5 μ m 或者相当的色谱柱;

b) 流动相: 流动相 A: 流动相 B = 85: 15; [流动相 A: 准确称取 2.10g 柠檬酸和 2.16g 辛烷磺酸钠, 加入约 980mL 水溶解, 调节 pH 至 3.0 后, 定容至 1L 备用; 流动相 B: 乙腈]

c) 柱温: 40 $^{\circ}$ C;

d) 进样量: 10 μ L;

e) 流速: 1.0mL/min;

f) 波长: 240nm;

结果与讨论:

【结果与讨论】:

1. 三聚氰胺标准溶液色谱图如图 1 所示

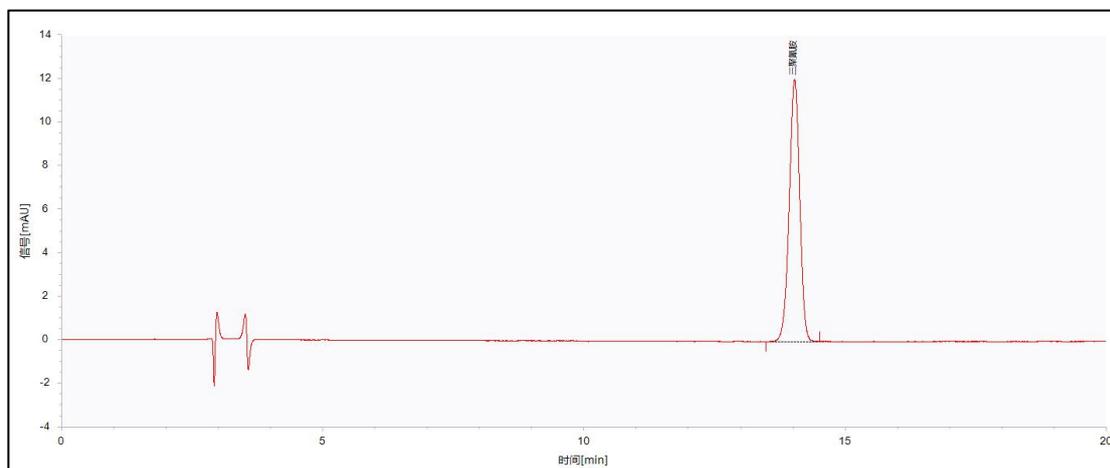


图1 三聚氰胺标准溶液 (5 $\mu\text{g/mL}$) 色谱图

1. 将三聚氰胺标准溶液逐级稀释至信噪比 S/N 为 3 左右, 计算仪器的检出限, 数据结果见表 1。经计算仪器针对三聚氰胺的检出限为 0.064 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.212 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 灵敏度测试数据

目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
三聚氰胺	0.867	2.535	0.062	40.9	0.064	0.212

2. 将系列三聚氰胺标准溶液在 HPLC 上进行测定, 绘制校准曲线, 线性方程及相关系数见图 2, 曲线的相关系数 R^2 为 0.9998, 线性关系良好。

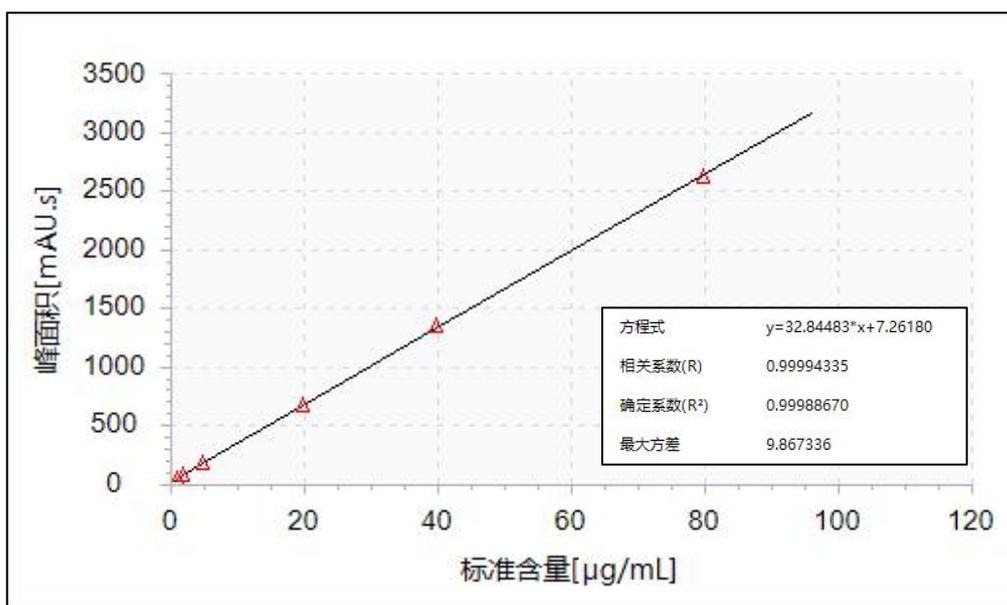


图 2 三聚氰胺标准溶液校准曲线

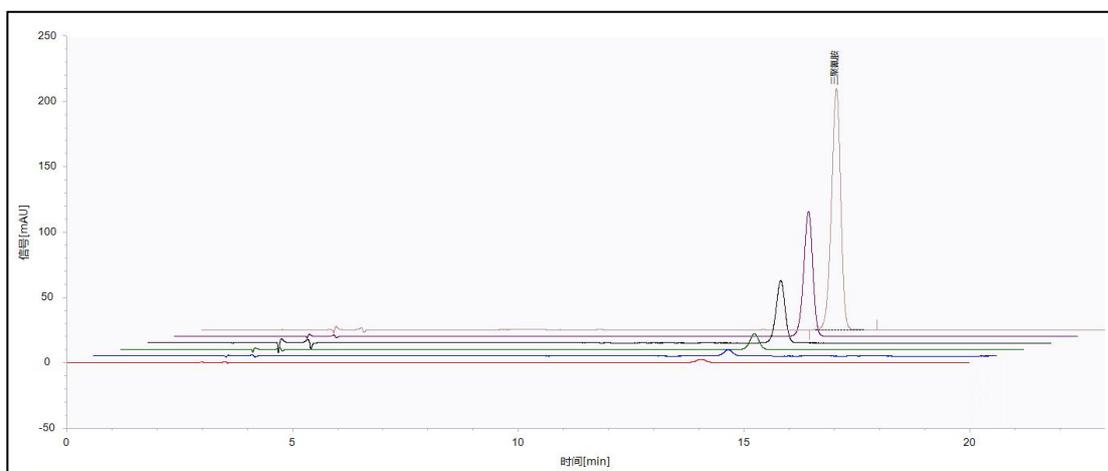


图 3 三聚氰胺标准溶液系列浓度叠加色谱图

3. 购买市售纯牛奶样品进行处理, 并进行加标回收实验, 样品加标回收色谱图如图 4, 三聚氰胺加标

回收率为 96.3%。

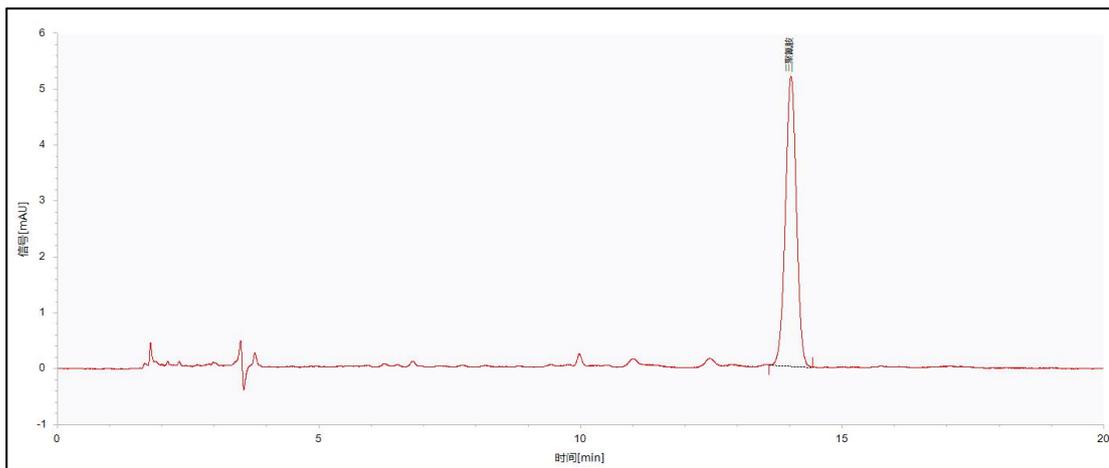


图 4 市售纯牛奶样品加标回收色谱图

经计算，此市售纯牛奶样品中三聚氰胺的含量为 0.4mg/kg，由于《GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》中高效液相色谱法的检出限为 2mg/kg，符合限量标准要求。

【结论】

通过对三聚氰胺的峰型、重复性、灵敏度、线性测试以及对纯牛奶样品测试，使用 K2025 高效液相色谱仪测定牛奶样品中三聚氰胺具有良好的线性关系，确定系数 R2 为 0.9998；连续进样 7 针，三聚氰胺保留时间的 RSD 为 0.101%，峰面积的 RSD 值为 0.125%，定性定量均有良好的重复性；三聚氰胺的仪器检出限为 0.064 μ g/mL，定量限为 0.212 μ g/mL，加标回收率为 96.3%。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪完全可以满足《GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》中使用高效液相色谱法测定三聚氰胺含量的需求。