

## HPLC-UV、Acclaim 混合基质柱 WCX-1 快速检测液体奶和奶粉中的三聚氰胺

### 引言

三聚氰胺是一种用于塑料和化学肥料生产的化学原料。最近出现了一些中国婴儿健康甚至死亡问题，调查的结果是一些婴儿食品（奶粉）被三聚氰胺污染所致。不法分子通过掺加三聚氰胺来增加奶粉中蛋白质含量，三聚氰胺也被掺到动物饲料中以增加蛋白质含量。最新报道一些超市的鸡蛋中也检测出了三聚氰胺。

三聚氰胺的定量检测方法有酶免疫测定法（EIA），GC-MS, LC-MS, HPLC-UV。中国政府颁布的检测原奶和奶制品中三聚氰胺检测方法包括了HPLC-UV, LC-MS, 和GC-MS，但是GC/LC-MS的正常运行需要很高的成本，并且GC-MS样品衍生化需要较高的劳动强度，这样就限制了该标准在奶制品企业中的推广应用，因此HPLC-UV方法仍是目前在奶制品企业中普及的检测方法。针对大批量需要检测的原奶，另一种HPLC-UV方法被推荐来快速检测原奶，但是该方法在奶制品的检测中有局限性。

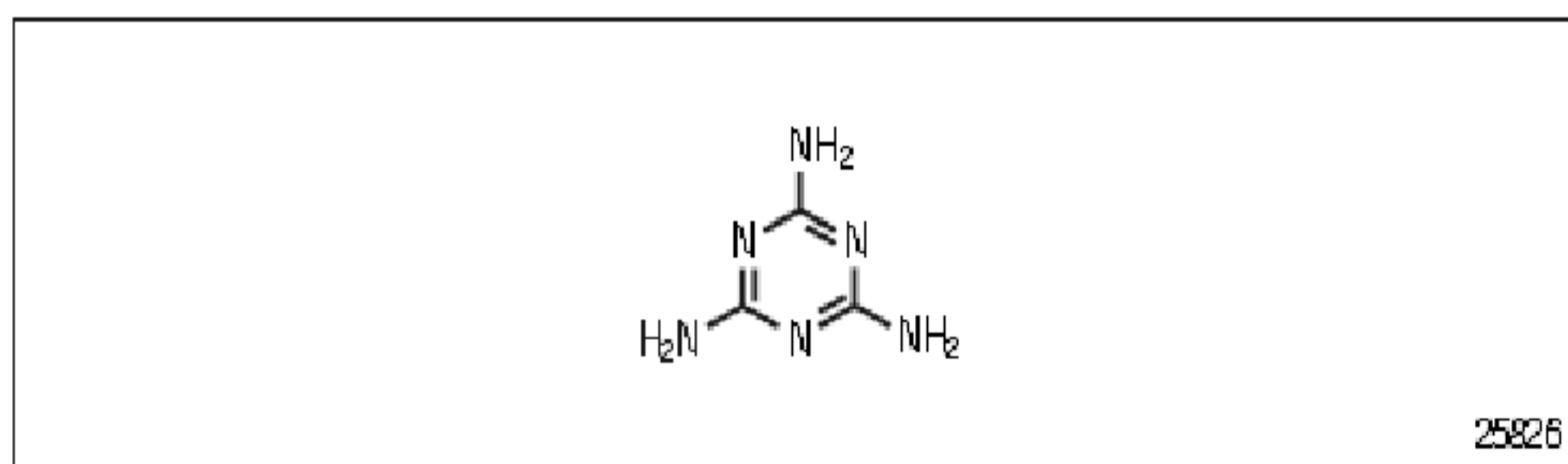


Figure 1. 三聚氰胺结构式

这里我们介绍一种简单的HPLC方法，同时快速检测液体奶和奶粉中三聚氰胺。该方法使用Acclaim混合基质WCX-1色谱柱，Ultimate® 3000 HPLC-UV高效液相，醋酸盐缓冲液和乙腈为流动相。单个样品10min内完成分析。Acclaim混合基质WCX-1色谱柱使用硅胶基质，其分离原理含有疏水和弱离子交换特点，对离子化和中性的化合物表现出了很好的分离特性。使用Ultimate® 3000 HPLC-UV高效液相和Acclaim混合基质WCX-1色谱柱能同时快速分析液体奶和奶粉中的三聚氰胺。

## 仪器

Dionex UltiMate 3000 HPLC系统, 包括有

HPG 3400A 泵

WPS 3000TSL 自动进样器

TCC-3000 柱温箱

VWD-3400RS UV-vis 检测器

Dionex Summit UVD-340U PDA

Chromeleon® 6.80 SP5 工作站

Kudos® SK3200LH 超声波发生器KudosUltrasonic Instrumental Co., Shanghai, China

梅特勒 Toledo AL-204 电子天平 (梅特勒 (上海) 公司, 上海)

Anke® TGL-16B 离心机 (Anting 科学仪器公司, 上海)

IKA® MSI 微型振荡器 (广州)

## 试剂与标准品

水, Milli-Q® Gradient A 10

甲醇(CH<sub>3</sub>OH), HPLC 级, Fisher

乙腈(CH<sub>3</sub>CN), HPLC 级, Fisher

醋酸铵(NH<sub>4</sub>Ac), analytical 级, SCRC, China

醋酸(HAc), analytical grade, SCRC, China

辛烷磺酸钠 (98%), Baker Analyzed @HPLC Reagent, USA

三聚氰胺(99.0%), HPLC 级, Fluka

## 色谱条件

保护柱: Acclaim 混合基质WCX 1, 5 μm, 4.3 × 10 mm, P/N 068354, 预柱, P/N 59526

分析柱: Acclaim 混合基质 WCX-1, 5 μm, 4.6 × 250 mm, P/N 068352

柱温.: 30 °C

流动相: 醋酸盐缓冲系统 (mixture of 700 mL of 10 mM HAc and 300 mL of 10 mM NH<sub>4</sub>Ac, ~ pH 4.3) -CH<sub>3</sub>CN (8 : 2, v/v)

流速: 1.0 mL/min

进样体积: 20 μL

紫外检测器: 吸收波长 240 nm

## 标准品溶液的制备

### 标准品储备液

精密称定 100mg 左右的三聚氰胺,用 50%甲醇水溶液定容在 100mL 容量瓶中,得到三聚氰胺浓度为 1000 $\mu$ g/mL

### 标准溶液

制备 7 份标样用来校准,每个标样加入一定量的标准品储备液,醋酸水溶液流动相稀释,三聚氰胺的浓度分别是 0.05, 0.1, 0.2, 1.0, 5.0, 20, 和 40  $\mu$ g/mL

### 供试品制备

#### 奶粉样品

加入 1g 左右精确称重的干燥奶粉样品至 15mL 离心管,添加 10mL 水,涡流振荡 1min 后,超声波超声 30min。取出,滴加 1mL 乙酸溶液 (3%, v/v), 4 $^{\circ}$ C 下放置至少 30min 后,离心 15min (10000 rpm), 移取上清液至 10mL 容量瓶中,水定容至刻度,进样前,0.2 $\mu$ m 微孔滤膜滤过。

#### 液体奶样品

精确量取 10mL 液体奶样品至 15mL 体积离心管后,直接加入 1mL 的乙酸 (3%, v/v) 洗脱液,4  $^{\circ}$ C 下静置 30min。余下操作步骤同奶粉样品处理。

### 奶粉和液体奶加标回收

加入 40 $\mu$ L 三聚氰胺标准品储备液至 15mL 离心管中,分别加入已精确称定 1g 左右的干燥奶粉和精确量取 10mL 左右的液体奶,余下步骤同奶粉和液体奶的操作。

## 结果与讨论

### 优化牛奶和奶粉样品的制备过程

一般处理牛奶和奶粉样品的分两个步骤,样品提取和 SPE 小柱净化,50  $^{\circ}$ C N<sub>2</sub> 吹干。离子交换分析法 (IEX) 的处理方法比这简便,但是只适用于液体奶检测。因此开发一种高效而更简便的方法来同时可以处理牛奶和奶粉就显得十分必要。

这里我们开发的方法是方便有效的,该方法不需要过 SPE 小柱和样品干燥,只需加入乙酸洗脱液,离心,过滤,该方法同时适用于液体奶和奶粉检测,也适用反相离子对色谱方法 (RP-PIC) 分析。图 2 表明该样品制备方法无论使用 Acclaim 混合基质 WCX-1 色谱柱或者 RP-PIC 方法的 Acclaim 120 C18 色谱柱后,都能得到很好的三聚氰胺图谱,目标峰无杂质峰干扰。

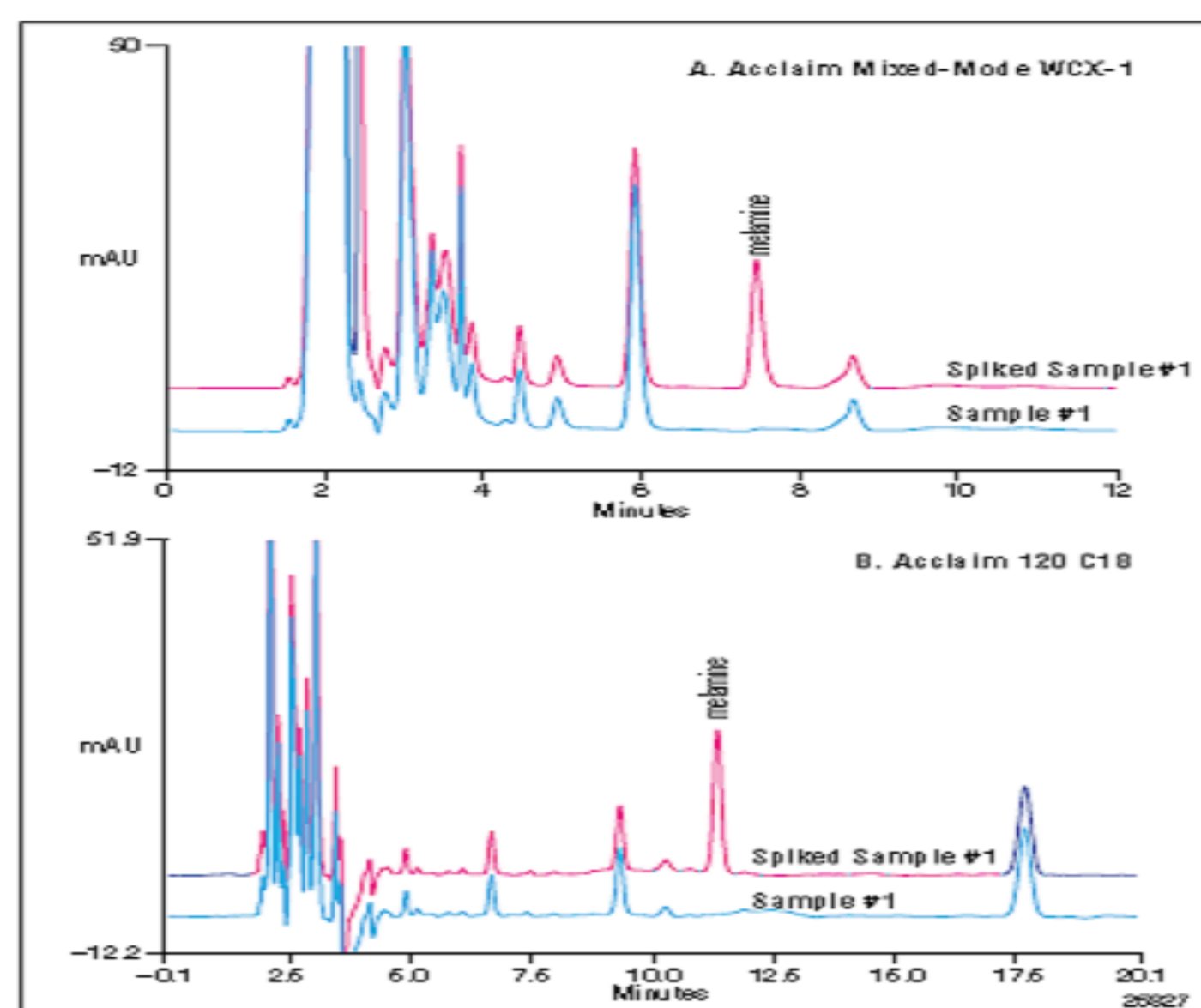


Figure 2. 牛奶样品和牛奶样品加标图谱 (A) Acclaim混合基质WCX-1色谱图  
(B) Acclaim 120 C18 色谱图.

色谱图: 1, 样品 #1; 2, 样品 #1 加标  $4\ \mu\text{g/mL}$  三聚氰胺.  
三聚氰胺检测波长 $240\ \text{nm}$ .

### 优化色谱条件

三聚氰胺是亲水性成分，在经典 RP 反相色谱柱（例如 C18 或 C8）中保留较弱，大多数反相柱使用离子对试剂，流动相中添加离子对试剂，例如辛烷磺酸盐，三聚氰胺就能很好地保留。然而，离子对试剂可能会污染固定相，会改变反相柱的保留性能，如果这根色谱柱换成其它分离方法时，可能原色谱峰就得不到。RP-PIC 方法通常不适宜与 MS 检测器连接，因此我们尝试在 Acclaim 混合基质 WCX-1 色谱柱上分离离子化的三聚氰胺，醋酸缓冲盐洗脱。

Acclaim 混合基质 WCX-1 色谱柱特性是混合硅胶基质填料，同时具有疏水性和弱离子交换特性，流动相 PH 值能影响到固定相的电荷数和疏水性，当流动相 PH 值低于固定相羧酸根的 PKa 值时，离子交换作用失活，因此疏水作用成为保留机制的主要作用。当流动相 PH 高于固定相 PKa 值时，离子交换作用激活，因此两种分离机制都对被分析物的保留有影响，保留时间取决于分析物特性，我们的大量实验结果发现流动相缓冲盐 PH 值低于 3.5 或大于 5.0 时，三聚氰胺都没有被很好的保留。离子交换作用是能改变带电荷化合物在色谱柱中保留的关键因素，在碱性环境中流动相离子浓度的增加后，三聚氰胺保留时间降低；疏水性保留特性明显受有机相比比例影响，增加有机相比比例后，其它的条件（例如离子作用力，PH，温度，等）保持不变，所有种类的分子（酸，碱，和中性化合物）保留时间都会提前。

针对液体奶和奶粉样品，流动相为  $10\ \text{mM}$  醋酸铵， $\text{PH}=4.3$ ， $20\%\ \text{MeCN}$ 。对于更复杂的样品，应当使用更强缓冲能力的缓冲盐溶液，同时三聚氰胺的保留时

间提前，而减少流动相中乙腈的比例不大可能恢复原来的保留时间位置。

### 色谱性能

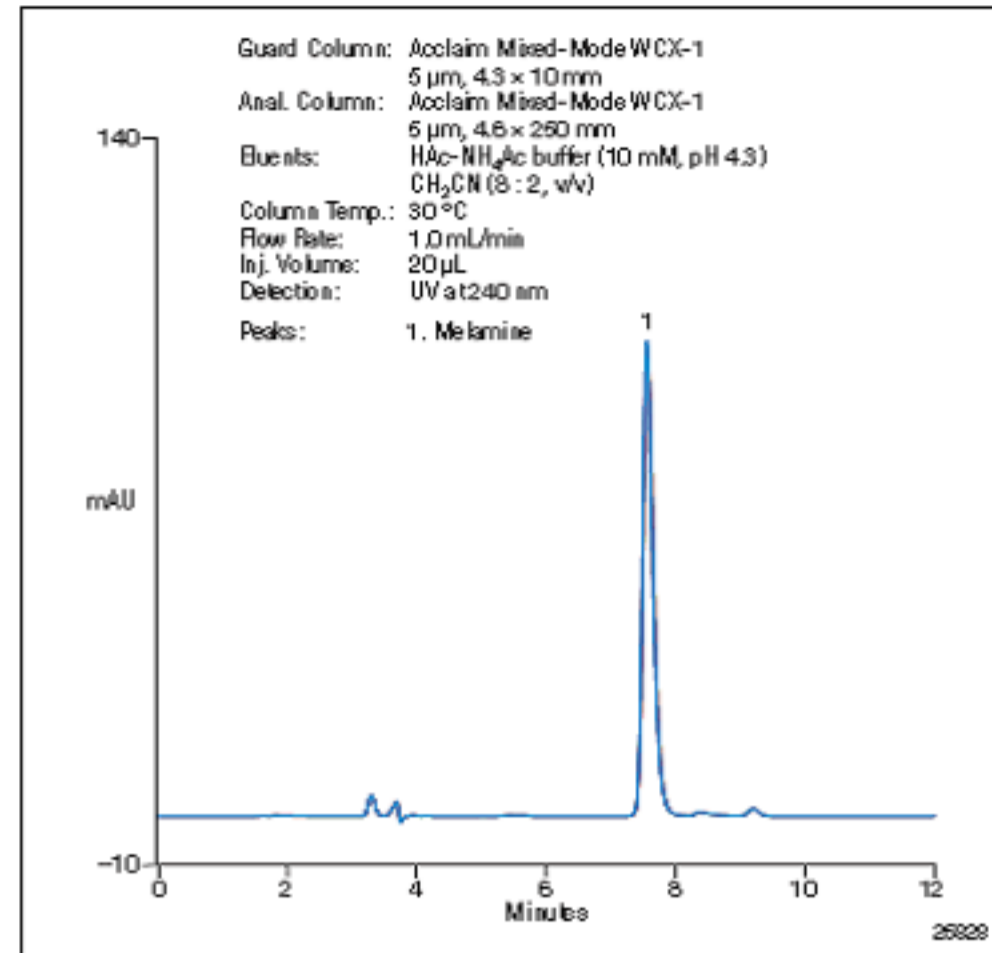


Figure 3. 5次 20 μg/mL 三聚氰胺标准溶液连续进样重叠图

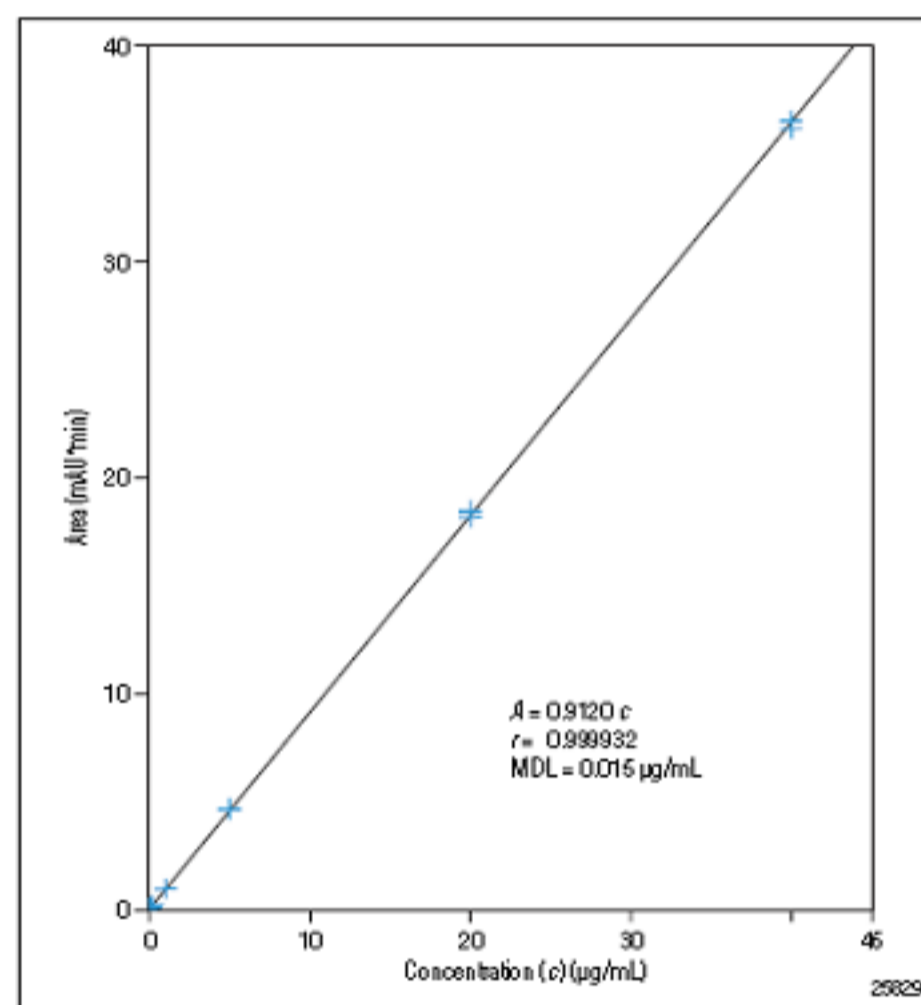


Figure 4. 三聚氰胺标准曲线

图 3 为三聚氰胺标准品溶液 5 次连续进样色谱图，每次进样 20 μg/mL，保留时间和峰面积重复性良好。三聚氰胺标准曲线由 7 个不同浓度的标准品溶液制得，每个标准液重复进样 5 次。标准曲线和样品定量使用外标法，如图 4，线性范围 0.05~40 μg/mL 良好，线性方程如下，曲线通过原点。

$$A = 0.9120 c$$

这里，A 表示峰面积，C 表示三聚氰胺的浓度 (μg/mL)，相关系数 0.9999。重复性方法学考察通过 10 次连续进样 1 μg/mL 标准品溶液。保留时间 RSD 为 0.037，峰面积的 RSD 为 0.472。

三聚氰胺检测限 MDL 计算公式：

$$\text{检测限} = St(n-1, 1 - \alpha = 0.99)$$

S = 重复分析标准差

n = 重复次数

$t(n-1, 1 - \alpha = 0.99) = \text{Student's value}$  置信度99%，自由度  $n-1$   
 10次1  $\mu\text{g/mL}$ 标准品溶液重复进样计算的检测限MDL为0.015  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 样品分析

取 5 份样品，包括 3 份奶粉(#1 - #3)和 2 份液体奶(#4 和#5)，用新前处理方法和法 WCX 色谱法，样品#1 中没有检测到三聚氰胺，而其它 5 份样品都检测到了三聚氰胺，图 1 和图 5 显示了所有色谱图，我们在样品#1 和#4 处理前加标样三聚氰胺，结果两个图谱出现了明显的三聚氰胺色谱峰。

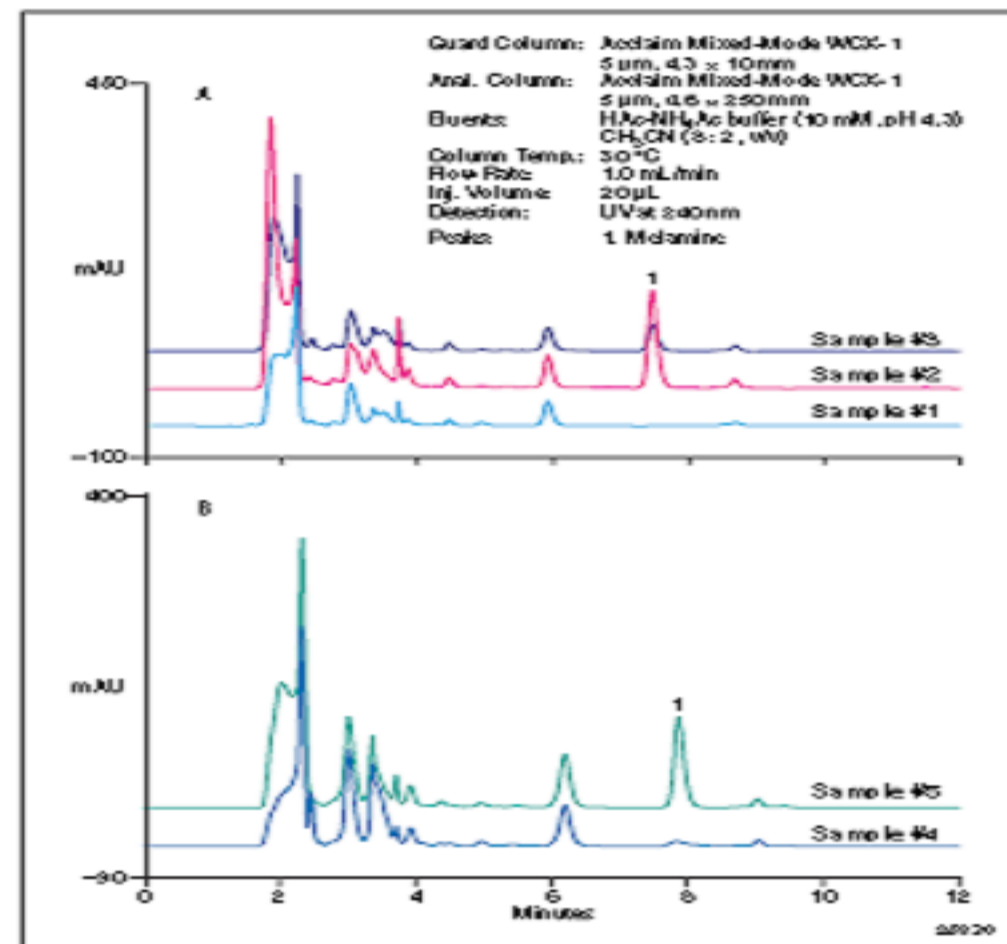


Figure 5. 谱图 (A) 奶粉 #1-#3, (B) 液体奶 #4 和 #5.

### 样品制备和分析方法的对比

取 3 份奶粉样品，#1-#3，和另外 3 份奶粉样品#6-#8,分别使用我们的新方法和活化 SPE 小柱的奶粉检测方法（GB/T 22388 2008），制备后的样品分别用 Acclaim 120 C18 色谱柱、GB/T 22388 2008 色谱条件和 Acclaim 混合基质 WCX-1 色谱柱、以上本文中的色谱条件分析，表 2 显示全部样品结果，包括两种样品制备过程和两种色谱方法的分析，数据对比表明，全部 6 份样品使用这两种样品制备方法或色谱分离方法后，结果一致性良好。

Table 1. Sample Analysis Results											
	Milk Powder						Liquid Milk				
	#1				#2	#3	#4				#5 (mg/L)
	Detected (mg/Kg)	Added (mg/Kg)	Found (mg/Kg)	Recovery (%)	Detected (mg/Kg)	Detected (mg/Kg)	Detected (mg/L)	Added (mg/L)	Found (mg/L)	Recovery (%)	
Melamine	n.a.	40	35	88	262	67	1.8	40	3.6	90	22

Note: \* Injections were made for each sample

\*\* Found = Measured value of spiked sample - Measured value of sample

对于复杂基质的奶制品可能有三聚氰胺假阳性，与三聚氰胺标准品溶液对比

紫外光谱图是有效的办法。我们分析样品#8时，分别使用 GB/T 22388 2008 中的样品制备方法和混合基质 WCX-1 色谱柱方法，发现一个和三聚氰胺保留时间接近的小峰，将此峰标记为三聚氰胺时浓度为 3.3 mg/Kg。使用其它样品处理方法和色谱方法没有在该样品中检测到三聚氰胺。于是我们在 VWD 紫外检测器后连接一个 PDA 阵列检测器，对比紫外光谱图，如图 6 中所示该色谱峰，结果显示该色谱峰不是三聚氰胺，使用 PDA 阵列检测器分析有助于减少三聚氰胺假阳性误判。

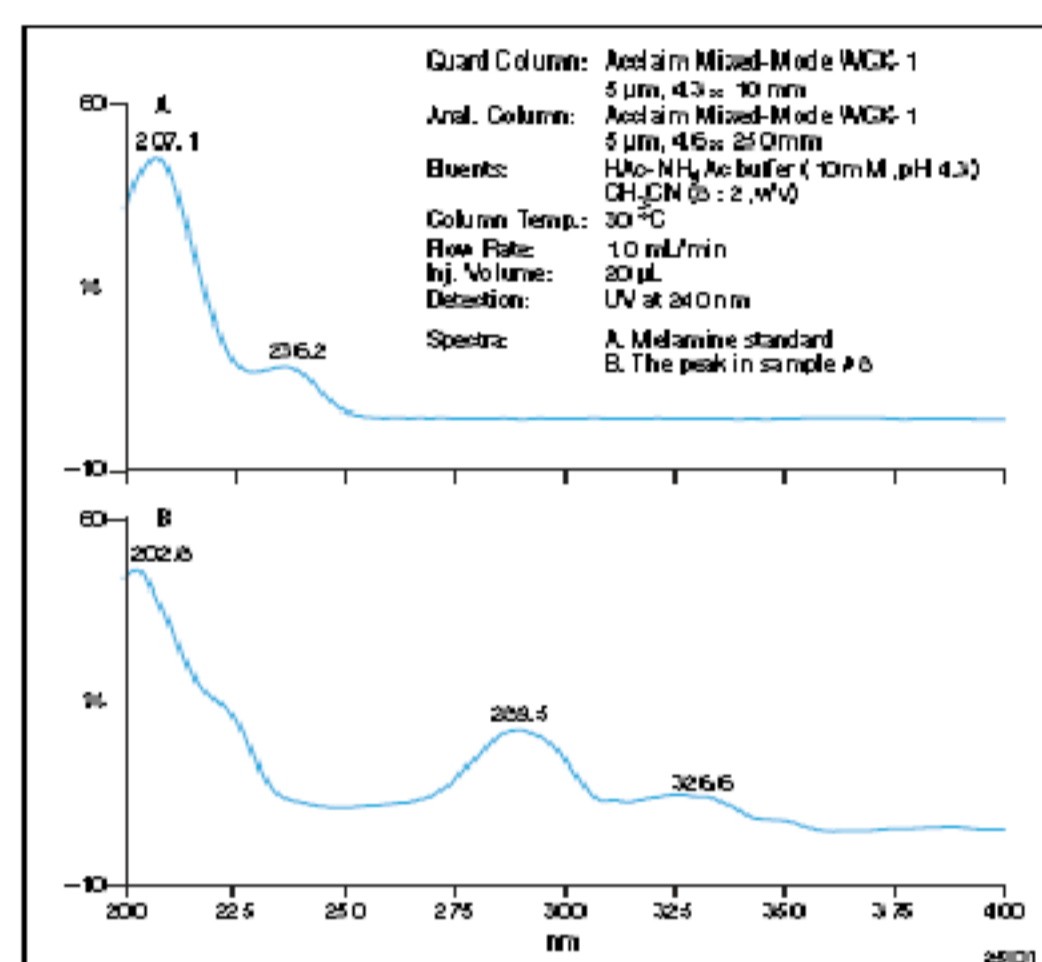


Figure 6. UV 光谱图 (A) 三聚氰胺标准溶液(B) 假定的三聚氰胺色谱峰 #8.

## 总结

本文开发了一个处理液体奶和奶粉样品高效简便方法，该HPLC方法能快速检测三聚氰胺。方法使用Acclaim混合基质WCX-1色谱柱和醋酸铵缓冲盐和乙腈作为流动相，三聚氰胺得到很好的保留，同时兼容MS检测器。

Sample #	Melamine Concentration using the RP-PLC method (mg/Kg) <sup>1</sup>		Melamine Concentration using the Acclaim Mixed-Mode WCX-1 Column (mg/Kg) <sup>2</sup>	
	Prepared following the description in this AN	Prepared following the description in Ref. 5	Prepared following the description in this AN	Prepared following the description in Ref. 5
#1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
#2	274	229	262	229
#3	67	68	67	68
#6	2.2	2.3	2.4	2.8
#7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
#8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Note: 1. Using the chromatographic conditions described in Ref. 5

2. Using the chromatographic conditions described in this AN

## 参考文献

1. Filigenzi M.S., Tor E.R, Poppenga R.H., Aston L.A and Puschner B., The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**,21(24), 4027-4032.
2. Ding T., Xu J., Li J., Shen C., Wu B., Chen H. and Li S., Determination of melamine residue in

plant origin protein powders using high performance liquid chromatography-diode array detection and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Se Pu*. **2008**, *26(1)*, 6-9.

3. Kim B, Perkins LB, Bushway RJ, Nesbit S, Fan T, Sheridan R, Greene V., Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *JAOAC Int*. **2008**, *91(2)*, 408-413.

4. Leo Wang, Stacy M. Henday, Xiaodong Liu, Mark Tracy and William C. Schnute, Simultaneous Determination of Melamine and Cyanuric Acid Using LC-MS with the Acclaim Mixed-Mode WAX-1 Column and Mass Spectrometric Detection. Dionex Corporation LPN 1991-01 10/07.

5. Determination of melamine in raw milk and dairy products, GB/T 22388 2008.

6. Rapid determination of melamine in raw milk (High performance liquid chromatography method), GB/T22400 2008.

7. Dionex Corporation. *Product Manual for the Acclaim Mixed-Mode WCX-1 Column*.