

ICS 67.100
X 16

DB13

河北省地方标准

DB13/T 1000—2008

乳及乳制品中三聚氰胺的测定

Determination of melamine in milk and dairy produce

2008-09-21 发布

2008-09-21 实施

河北省质量技术监督局 发布

前 言

本标准中附录A、附录B、附录C、附录D和附录E为规范性附录。

本标准由河北省质量技术监督局提出。

本标准第一法由河北省疾病预防控制中心负责起草。

本标准第二法由河北省食品安全实验室、国家环保产品质量监督检验中心负责起草。

本标准第三法由国家果类及农副加工产品质量监督检验中心（河北）负责起草。

本标准第一法主要起草人：常凤启、秦振顺、董彬、杨娜静、路杨。

本标准第二法主要起草人：乔炜、张岩、李挥、李玉国、范斌、张敬轩、陈瑞超、李兴、谢乐、赵一军、王丽霞、康素芬。

本标准第三法主要起草人：谭立、张会军、王红、匡林鹤、李强、徐晓荣、夏静、何淑娟、张京、吴春敏、王军磊。

乳及乳制品中三聚氰胺的测定

1 范围

本标准规定了乳及乳制品中三聚氰胺的测定方法。

本标准适用于乳及乳制品中三聚氰胺的测定。

本标准中高效液相色谱法定量检出限为 2.0 mg/kg；高效液相色谱-串联质谱法定量检出限为 0.01 mg/kg；气相色谱-质谱法定量检出限为 0.05 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

乳制品

是指以生鲜牛（羊）乳及其制品为主要原料，经加工而制成的各种食品。本标准所指的乳制品包括液体乳类（杀菌乳、灭菌乳、酸牛乳、配方乳）、乳粉类（全脂乳粉、脱脂乳粉、全脂加糖乳粉和调味乳粉、婴幼儿乳粉、其他配方乳粉）、含乳饮料类、炼乳类（全脂无糖炼乳、全脂加糖炼乳、调味炼乳、配方炼乳）、乳脂肪类（稀奶油、奶油、无水奶油）、干酪类（原干酪；再制干酪）、乳冰淇淋类（乳冰淇淋、乳冰）和其他乳制品类（干酪素、乳糖、乳清粉、浓缩乳清蛋白）等。

第一法 高效液相色谱法

4 原理

试样经溶解、超声提取、沉淀蛋白、过滤得到测试液，经高效液相色谱测定，根据保留时间和紫外吸收光谱定性，根据峰面积进行定量。

5 试剂

方法中所用试剂，除另有规定外，均为分析纯试剂，水为GB/T 6682—2008中一级用水，溶液为水溶液。

5.1 磺基水杨酸。

5.2 柠檬酸。

5.3 辛烷磺酸钠：高效液相色谱离子对试剂。

5.4 乙腈：色谱纯。

5.5 盐酸。

5.6 60 g/L 磺基水杨酸：称取 60 g 磺基水杨酸用水定容至 1 L。

- 5.7 0.1 mol/L 盐酸：量取 8.3 mL 盐酸用水稀释至 1 L。
- 5.8 缓冲液：柠檬酸和辛烷磺酸钠浓度均为 10 mmol/L。
- 5.9 三聚氰胺标准品：已知含量大于 99%。
- 5.10 标准储备液：称取三聚氰胺标准品 0.01g（准确至 0.0001g），用甲醇配制成浓度为 1 mg/mL 标准储备液。
- 5.11 标准系列：将标准储备液用 0.1 mol/L 盐酸逐级稀释至 0.25 μ g/mL，0.50 μ g/mL，1.00 μ g/mL，2.00 μ g/mL，4.00 μ g/mL，5.00 μ g/mL，10.0 μ g/mL 的系列标准溶液。

6 仪器

- 6.1 高效液相色谱，附二极管阵列检测器或紫外检测器。
- 6.2 天平：感量 0.01 g。
- 6.3 分析天平：感量 0.0001 g。
- 6.4 高速离心机：转速 >4 000 r/min。
- 6.5 超声波清洗器。
- 6.6 旋涡混匀器。

7 样品处理

7.1 固态乳制品

称取 1.0 g 左右试样（准确至 0.0001 g），加入 0.1 mol/L 盐酸约 15 mL，涡旋混匀，超声提取 30 min 后加入 60 g/L 磺基水杨酸 6 mL~8 mL，用 0.1 mol/L 盐酸定容至 25 mL，混匀后离心，上清液经 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤后进样。

7.2 液态乳制品（包含酸奶）

称取 15 g 左右试样（准确至 0.0001 g），加入 60 g/L 磺基水杨酸 3 mL~4 mL，用 0.1 mol/L 盐酸定容至 25 mL，混匀后离心，上清液经 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤后进样。

8 测定步骤

8.1 色谱条件

- 8.1.1 色谱柱：ODS C₈，250 mm×4.6 mm，5 μ m。
- 8.1.2 流动相：缓冲液：乙腈=85：15。
- 8.1.3 流速：1.0 mL/min。
- 8.1.4 柱温：40 $^{\circ}$ C。
- 8.1.5 波长：240 nm。

上述色谱条件是典型的，可根据实际情况做具体调整。

8.2 测定

8.2.1 标准曲线制备

将标准系列 0.25 μ g/mL，0.50 μ g/mL，1.00 μ g/mL，2.00 μ g/mL，4.00 μ g/mL，5.00 μ g/mL，10.0 μ g/mL 分别进样 20 μ L，以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标作图，制作标准曲线。

8.2.2 样品测定

取制备好的试样溶液进样 20 μ L，进行液相色谱分析。根据保留时间和紫外吸收光谱定性，根据峰面积进行定量。三聚氰胺的标准色谱图和光谱图见图 1 和图 2。

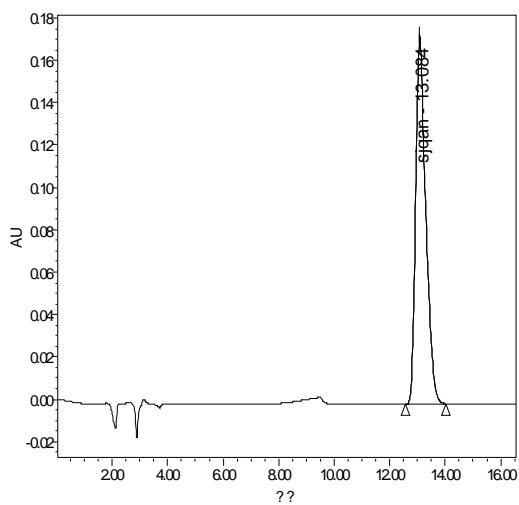


图1 标准色谱图

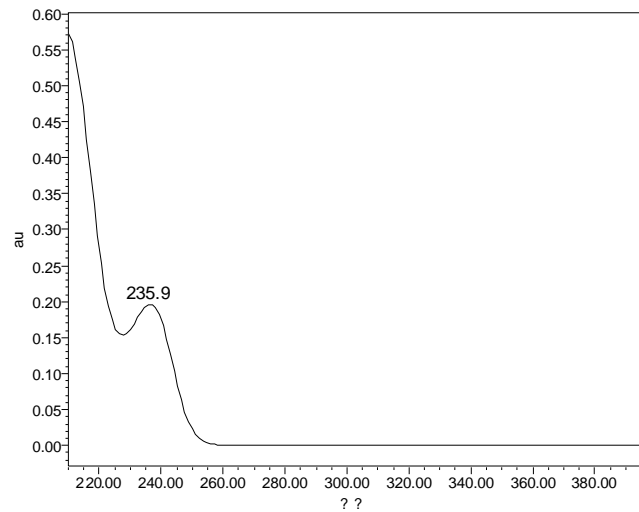


图2 三聚氰胺光谱图

9 结果计算

9.1 计算

试样中三聚氰胺的含量 (mg/kg) 按式 (1) 计算:

$$X = \frac{C \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中: X—样品中三聚氰胺含量, mg/kg;
 C—从标准曲线上查出的含量, $\mu\text{g/mL}$;
 V—定容体积, mL;
 m—称样量, g。

平行测定结果用算术平均值表示, 结果保留三位有效数字。

9.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

第二法 高效液相色谱-串联质谱法

10 原理

试样中三聚氰胺经乙腈水溶液超声提取、MCX固相萃取柱净化, 高效液相色谱仪 (配硅胶色谱柱分离)、串联质谱定性定量分析。

11 试剂

方法中所用试剂, 除另有规定外, 均为分析纯试剂, 水为GB/T 6682-2008中一级用水, 溶液为水溶液。

11.1 甲醇。

- 11.2 乙腈：色谱纯。
- 11.3 盐酸：优级纯。
- 11.4 甲酸铵：优级纯。
- 11.5 1 mol/L盐酸水溶液：量取90 mL盐酸，加水至1 000 mL。
- 11.6 0.02 mol/L甲酸铵水溶液：pH=5.0。
- 11.7 氨水甲醇溶液：量取5 mL氨水溶解至100 mL甲醇中。
- 11.8 三聚氰胺标准品：已知含量 $\geq 99\%$ 。
- 11.9 三聚氰胺标准贮备液：准确称量100 mg(精确至0.1 mg)的三聚氰胺标准品，用乙腈水溶液(7 : 3)溶解定容于100 mL容量瓶，该溶液浓度为1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 11.10 三聚氰胺标准工作液：分别准确量取三聚氰胺标准贮备液(11.9) 1.0 mL和10.0 mL于100 mL容量瓶中，用乙腈水溶液(2 : 8)定溶至刻度，该标准工作液浓度分别为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，现用现配。

12 仪器

- 12.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源(ESI)。
- 12.2 天平：感量0.01 g。
- 12.3 分析天平：感量0.00 001 g。
- 12.4 高速低温离心机(15 000 r/min)。
- 12.5 超声波振荡仪。
- 12.6 旋涡混匀器。
- 12.7 氮吹仪。
- 12.8 固相萃取装置。
- 12.9 Oasis MCX固相萃取柱：150 mg/6 mL，或相当者。

13 样品处理

13.1 提取步骤

13.1.1 固态乳制品

准确称取样品2 g(精确至0.01 g)于50 mL具塞刻度离心管中，分别加入25 mL乙腈：水(60 : 40)混合提取液和1 mL盐酸溶液(11.5)，提取液定容至刻度，超声提取20 min，10 000 r/min低温离心5 min，上清液待净化。

13.1.2 液态乳制品

准确称取样品10 g(精确至0.01 g)于50 mL具塞刻度离心管中，分别加入25 mL乙腈提取液和1 mL盐酸溶液(11.5)，提取液定容至刻度，超声提取20 min，10 000 r/min低温离心5 min，上清液待净化。

13.1.3 酸奶

准确称取样品10 g(精确至0.01 g)于50 mL具塞刻度离心管中，分别加入25 mL乙腈：水(80 : 20)混合提取液和1 mL盐酸溶液(11.5)，提取液定容至刻度，超声提取20 min，10 000 r/min低温离心5 min，上清液待净化。

13.2 净化

依次加入3 mL甲醇、3 mL水活化固相萃取柱，准确移取10.0 mL上清液(13.1)过固相萃取柱，控制过柱速度在1 mL/min以内。再依次加入3 mL水和3 mL甲醇淋洗固相萃取柱，抽近干，用8 mL氨水甲醇溶液(11.7)洗脱，收集洗脱液于50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干，用20%乙腈水溶液1.0 mL溶解残渣，漩涡混匀1 min，10 000r/min低温离心5 min，上清液过0.22 μm 滤膜，供高效液相色谱-串联质谱法测定。

13.3 空白添加标准曲线的制备

13.3.1 固态乳制品

分别准确量取10.0 μg/mL三聚氰胺标准工作液(11.10)适量,添加到2.0 g(精确至0.01 g)空白试样中,制得浓度为0.50 mg/kg、2.00 mg/kg、5.00 mg/kg、8.00 mg/kg、10.00 mg/kg的各系列空白添加试样,按13.1~13.2步骤操作,供高效液相色谱-串联质谱测定,制作标准曲线。

13.3.2 液态乳制品和酸奶

分别准确量取100.0 μg/mL三聚氰胺标准工作液(11.10)适量,添加到10 g(精确至0.01 g)空白试样中,制得浓度为0.50 mg/kg、2.00 mg/kg、5.00 mg/kg、8.00 mg/kg、10.00 mg/kg的各系列空白添加试样,按13.1~13.2步骤操作,供高效液相色谱-串联质谱测定,制作标准曲线。

14 测定步骤

14.1 色谱条件

14.1.1 色谱柱: Hypersil SiO₂ 硅胶色谱柱, 250 mm×4.6 mm, 5 μm, 或相当者。

14.1.2 流动相: A相:乙腈, B相:甲酸铵水溶液(5.6)。梯度洗脱条件见附录A。

14.1.3 流速: 0.8 mL/min。

14.1.4 柱温: 40℃。

14.1.5 进样量: 10 μL。

14.2 质谱条件

14.2.1 定量离子对为 127 /85, 碰撞池电压为 20 V。

14.2.2 定性离子对为 127 /68, 碰撞池电压为35 V。

14.2.3 其他条件见附录B。

14.3 测定

14.3.1 测定法

取试样溶液和相应的空白添加标准溶液,单点校准,外标法计算,即得。以峰面积积分值定量,空白添加标准溶液及试样溶液中三聚氰胺的响应值均应在仪器检测的线性范围之内,在上述色谱条件下,空白添加标准溶液和试样溶液中的特征离子的质量色谱图见附录C。

14.3.2 定性与定量

14.3.2.1 定性

通过样品色谱图的保留时间与标准品的保留时间、各色谱峰的特征离子与相应浓度标准品各色谱峰的特征离子相对照定性。样品与标准品的保留时间的相对偏差不大于5%;样品特征离子的相对丰度与浓度相当混合标准溶液的相对丰度一致,定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差不超过±10%,同时满足以上两个条件则可判断样品中存在相应的被测物。

14.3.2.2 定量

将供试试样和标准溶液的定量离子面积之比作单点校正。

15 结果计算

15.1 计算

试样中三聚氰胺的含量(mg/kg)按式(2)计算:

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X—试样中三聚氰胺的含量, mg/kg;

A—试样溶液中三聚氰胺的峰面积;

A_S —标准工作液中三聚氰胺的峰面积；

C_S —标准工作液中三聚氰胺的浓度，mg/L；

V —试样定容体积，mL；

m —样品质量，g。

平行测定结果用算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

15.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

第三法 气相色谱-质谱法

16 原理

试样经三氯乙酸超声提取、SPE小柱净化后，进行硅烷化衍生，衍生产物采用选择离子监测（SIM）的质谱扫描模式进行定性定量分析。

17 试剂

方法中所用试剂，除另外说明外，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682-2008规定的一级水。

17.1 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）。

17.2 吡啶：优级纯。

17.3 甲醇：色谱纯。

17.4 甲醇溶液（1：4）：200 mL 甲醇（17.3）加入 800 mL 一级水，混匀。

17.5 氨水

17.6 三氯乙酸溶液：质量分数为1%的水溶液（现用现配）。

17.7 甲醇氨水溶液：100 mL 甲醇中加入 5 mL 氨水。

17.8 三聚氰胺标准品：已知含量 $\geq 99\%$ 。

17.9 三聚氰胺标准储备液：准确称取三聚氰胺标准品 0.1000 g 于 100 mL 的容量瓶中，用甲醇（17.4）溶解并定容至刻度。此溶液浓度为 1 mg/mL，于 4℃ 冰箱内储存，有效期 3 个月。

17.10 三聚氰胺标准中间液：吸取标准储备液（17.9）5.0 mL 于 50 mL 容量瓶中，用甲醇（17.4）定容至刻度，此溶液浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，于 4℃ 冰箱内储存，有效期 1 个月。

17.11 三聚氰胺标准工作液：移取标准中间液（17.10）1 mL、5 mL、10 mL、25 mL、50 mL 于 5 个 100 mL 容量瓶内，用甲醇溶液（17.4）定容至刻度，此溶液浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ ，于 4℃ 冰箱内储存，有效期 1 周。

18 仪器

18.1 气相色谱质谱联用仪：配有正离子源（EI）。

18.2 漩涡振荡器。

18.3 超声振荡器。

18.4 滤膜：孔径 0.45 μm 。

18.5 离心机：15 000 r/min。

18.6 氮吹仪：可控温度至 60℃。

18.7 固相萃取装置：固相萃取柱 Oasis MCX 柱：150 mg/6 mL，或相当者。

19 样品处理

19.1 提取步骤

19.1.1 固态乳制品

试样充分混匀，称取2 g（精确至0.01 g）样品于50 mL具塞比色管，加入25 mL1%三氯乙酸溶液，漩涡振荡30 s，超声提取30 min，10 000 r/min离心5 min，用1%三氯乙酸定容至刻度。充分混匀后，静置，过滤，滤液待净化。

19.1.2 液态乳制品及酸奶

称取10 g（精确至0.01 g）样品于50 mL具塞比色管，加入25 mL1%三氯乙酸溶液，漩涡振荡30 s，超声提取30 min，10 000 r/min离心5 min，用1%三氯乙酸定容至刻度。充分混匀后，静置，过滤，滤液待净化。

19.2 净化

依次加入3 mL甲醇、3 mL水活化固相萃取柱，准确移取适当体积数的待净化滤液上固相萃取柱，控制过柱速度在1 mL/min以内，再依次加入3 mL水和3 mL甲醇淋洗固相萃取柱，抽近干，用3 mL甲醇氨水溶液洗脱，收集洗脱液于50℃氮气吹干，根据洗脱液中三聚氰胺的浓度用甲醇溶液（17.4）进行适当稀释。同时三聚氰胺标准系列同步净化。

19.3 衍生化

准确移取一定量洗脱液，用氮气吹干，加入400 μL的吡啶和200 μL衍生化试剂，混匀，70℃反应30 min。同时三聚氰胺标准系列同步衍生。

20 测定步骤

20.1 质谱条件

20.1.1 传输线温度：280℃。

20.1.2 扫描范围：60 m/z~400 m/z。

20.1.3 扫描模式：选择离子扫描。监测离子 m/z：99、171、327、342。

20.1.4 离子源温度：230℃。

20.1.5 EI 源轰击能：70 eV。

20.1.6 色谱条件见附录 D。

20.2 测定

20.2.1 工作曲线的绘制

吸取系列标准工作液各 1 μL 注入气相色谱质谱联用仪中，单点校准，按外标法，以峰面积积分值定量，绘制工作曲线。

20.2.2 定性与定量

20.2.2.1 定性

通过样品色谱图的保留时间与标准品的保留时间、各色谱峰的特征离子与相应浓度标准品色谱峰的特征离子相对照定性。试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 5%，特征离子的相对丰度与标准溶液的相对丰度一致，相对离子丰度的最大允许偏差不超过 20%。三聚氰胺标准图谱见附录 E。

20.2.2.2 定量

采用外标法以定量离子（m/z327）峰面积进行定量。

21 结果计算

21.1 计算

试样中三聚氰胺含量（mg/kg）按式（3）计算

$$X = \frac{C \times V \times F}{m} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X—试样中三聚氰胺的含量，mg/kg。

C—标准曲线中查得的试样液中三聚氰胺的浓度， $\mu\text{g/mL}$ 。

V—用于衍生的试样体积，mL。

m—试样质量，g。

F—稀释倍数。

平行测定结果用算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

21.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

附 录 A
(规范性附录)
液相色谱梯度洗脱条件

A.1 液相色谱梯度洗脱条件见表A.1。

表A.1 三聚氰胺液相色谱条件

时间, min	A相, %	B相, %
0	80	20
5	100	0
6	100	0
6.1	80	20
13	80	20

附 录 B
(规范性附录)
质谱条件

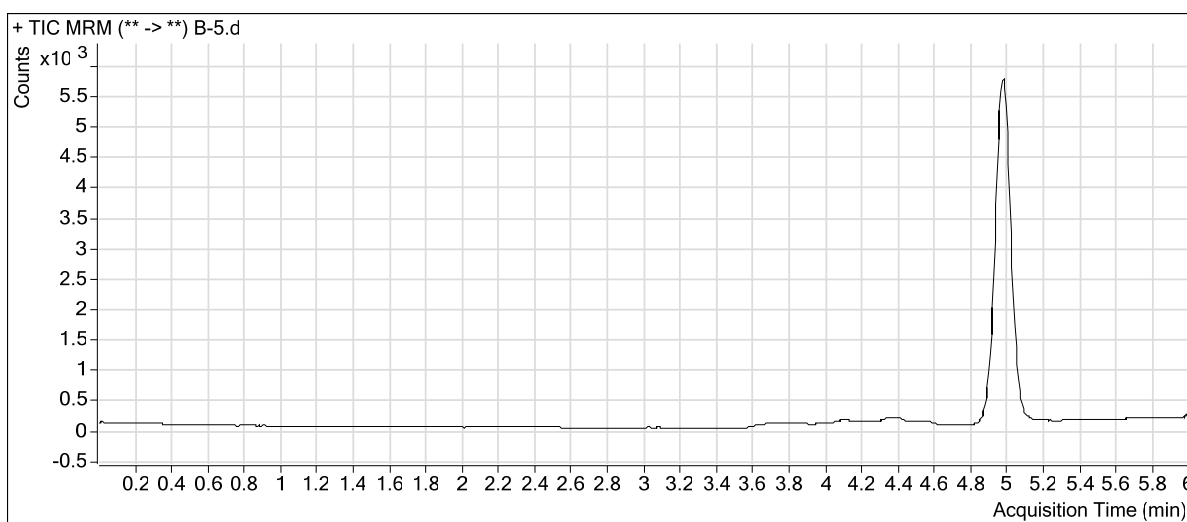
B.1 三聚氰胺质谱条件见表B.1。

表B.1 三聚氰胺质谱条件

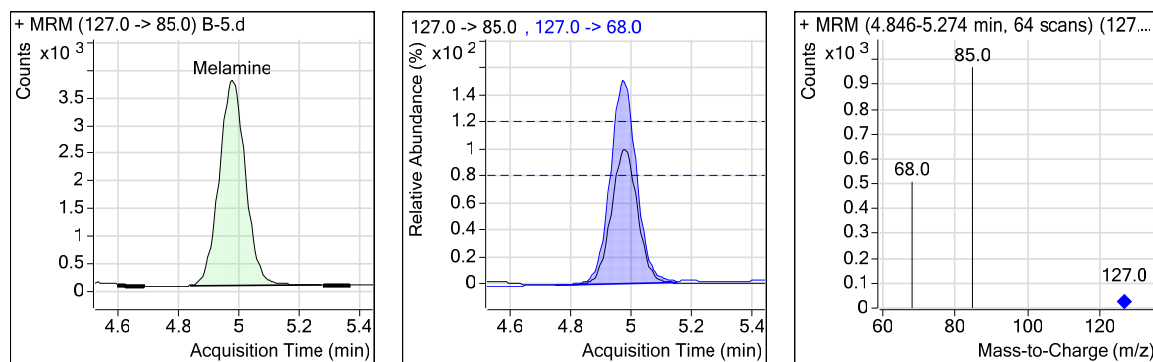
离子源	电喷雾离子源
扫描方式	正离子扫描
检测方式	选择反应监测 (MRM)
喷雾电压	4 000 V
干燥气温度	350℃
干燥气流速	12 L/min
雾化气压力	45 psi
源内裂解电压	120 V
注: 对于不同质谱仪器, 仪器参数可能存在差异, 测定前应将质谱参数优化到最佳。	

附录 C
(规范性附录)
标准物质的MRM谱图

C.1 标准物质的MRM谱图见图C.1和图C.2。



图C.1 0.1 ug/ml三聚氰胺标准品总离子流图



图C.2 三聚氰胺碎片离子比例图

附录 D
(规范性附录)
色谱参考条件

- D.1 色谱柱: DB-5MS, 30 m×0.25 mm×0.25 μm, 或相当者。
- D.2 载气: 氮气, 流速 1.3 mL/min
- D.3 进样量: 1.0 μL
- D.4 进样口温度: 250℃
- D.5 升温程序: 起始温度 75℃, 持续 1.0 min, 以 30℃/min 升温至 300℃, 保持 2 min。

附录 E
(规范性附录)
三聚氰胺标准图谱

E.1 三聚氰胺标准图谱见图 E.1 和图 E.2。

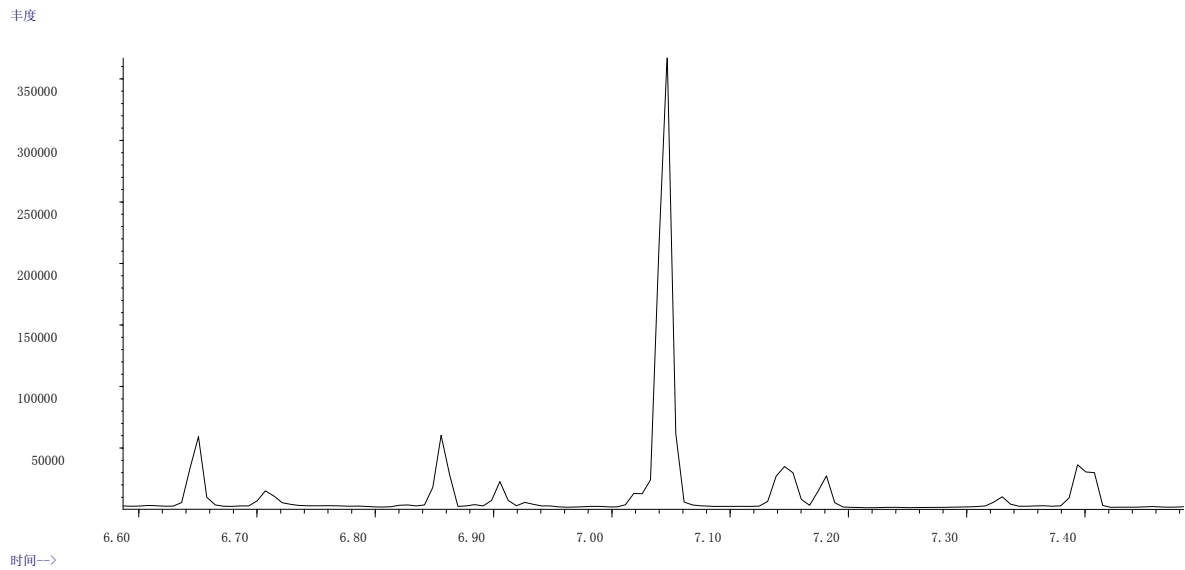


图 E.1 三聚氰胺基质加标衍生物选择离子检测 GC-MS 图

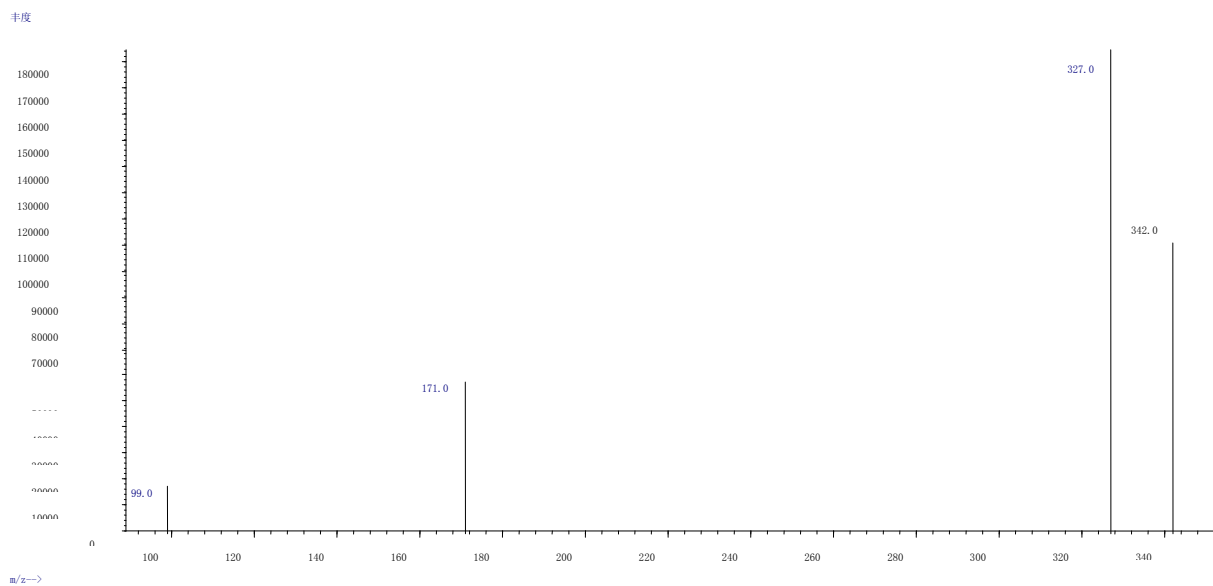


图 E.2 三聚氰胺衍生物选择离子碎片 GC-MS 图