

# DB34

安 徽 省 地 方 标 准

DB34/T 863—2008

---

## 生鲜牛乳中三聚氰胺的测定

Determination of Melamine in Raw Milk

2008-12-01 发布

2008-12-01 实施

---

安徽省质量技术监督局 发布



## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 高效液相色谱法 .....	1
4 气相色谱质谱法（仲裁法） .....	3
附录A 液相色谱图及光谱图 .....	5
A.1 三聚氰胺标准溶液色谱图 .....	5
A.2 样品中添加三聚氰胺色谱图 .....	5
A.3 三聚氰胺紫外光谱图 .....	5
附录B 气相色谱图及离子质谱图 .....	6
B.1 三聚氰胺标准溶液衍生物选择离子色谱图 .....	6
B.2 三聚氰胺标准溶液衍生物选择离子质谱图 .....	6

## 前 言

本标准由安徽省畜牧兽医局提出。

本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：安徽省兽药饲料监察所（安徽省畜产品质量安全检测中心）。

本标准起草人：许世富、汤春莲、丁在亮、刘红云、明文庆、刘发全、张莉、蔡东东。

本标准于2008年12月1日首次发布。

# 生鲜牛乳中三聚氰胺的测定

## 1 范围

本标准规定了生鲜牛乳中三聚氰胺的制样和检测方法，包括高效液相色谱法（HPLC）和气相色谱质谱法（GC-MS），其中气相色谱质谱法为仲裁法。

本标准适用于生鲜牛乳中三聚氰胺的测定。

本标准中高效液相色谱法检出限为0.1 mg/kg，气相色谱质谱法检出限为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 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 高效液相色谱法

### 3.1 方法提要

试样中的三聚氰胺用1%三氯乙酸提取，离心后取部分提取液，用阳离子交换柱净化，氨化甲醇洗脱，洗脱液经氮气吹干用甲醇溶液溶解，用配备紫外检测器或二极管阵列检测器的高效液相色谱仪进行定量测定。

### 3.2 试剂与材料

除非另有说明，本法所用试剂均为分析纯，水为去离子水，符合 GB/T 6682 二级水的规定。

3.2.1 乙腈：色谱纯。

3.2.2 庚烷磺酸钠。

3.2.3 柠檬酸。

3.2.4 乙酸铅。

3.2.5 甲醇：色谱纯。

3.2.6 氨水：浓度 25%—28%。

3.2.7 SPE 柱：阳离子交换柱，60 mg / 3 mL。

3.2.8 1%三氯乙酸：称取 10g 三氯乙酸溶解于 1000 mL 水中，混匀。

3.2.9 5%氨化甲醇：量取 5mL 氨水（3.2.6），溶解于 100 mL 甲醇（3.2.5）中，混匀。

3.2.10 乙酸铅溶液（22 g/L）：称取 22 g 乙酸铅（3.2.4），加水适量溶解后定容至 1000 mL。

3.2.11 甲醇溶液：取甲醇（3.2.5）200 mL 加水 800 mL，混匀。

3.2.12 滤膜：0.45 μm。

3.2.13 流动相：称取 2.02 g 庚烷磺酸钠（3.2.2）和 2.10 g 柠檬酸（3.2.3）加水溶解后稀释至 1000 mL，取该溶液 900 mL 加入 100 mL 乙腈，混匀。

3.2.14 三聚氰胺对照品（≥99.0%）。

3.2.15 三聚氰胺标准贮备液（1 mg/mL）：称取 100 mg（精确到 0.1 mg）三聚氰胺对照品，用甲醇溶液（3.2.11）溶解并稀释至 100 mL 量瓶中，贮存于 0℃~8℃冰箱中，有效期 1 个月。

3.2.15.1 三聚氰胺标准工作液：取三聚氰胺标准贮备液（3.2.15）适量，分别用甲醇溶液（3.2.11）稀释为0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、50 μg/mL的标准工作液，贮存于0℃~8℃冰箱中，有效期7天。

### 3.3 仪器与设备

3.3.1 高效液相色谱仪，配备紫外检测器或二极管阵列检测器。

3.3.2 高速冷冻离心机。

3.3.3 涡旋混合器。

3.3.4 氮吹仪。

3.3.5 固相萃取装置。

3.3.6 振荡摇床。

### 3.4 测定步骤

#### 3.4.1 提取

称取5.0 g样品，准确加入19 mL 1%的三氯乙酸（3.2.8）溶液，加入1 mL乙酸铅溶液（3.2.10）。振荡提取20 min，在10000 r/min离心机上离心5 min。

#### 3.4.2 净化

分别用3 mL甲醇，3 mL水活化SPE柱，准确移取10 mL离心上清液分次上柱，再用3 mL水和3 mL甲醇洗涤SPE柱，抽干，用3 mL 5%氨化甲醇溶液（3.2.9）洗脱，收集洗脱液，抽干，洗脱液于氮吹仪上50℃氮吹至干，加1 mL甲醇溶液（3.2.11），振荡溶解，摇匀，过0.45 μm滤膜，上机测定。

#### 3.4.3 测定

##### 3.4.3.1 液相色谱条件

色谱柱：C<sub>8</sub>柱，150×4.6 mm(i.d)，5 μm，或性能相当者；

流速：1 mL/min；

柱温：室温；

检测波长：235 nm；

进样量：20 μL。

##### 3.4.3.2 定量测定方法

样品溶液与标准溶液保留时间的相对偏差应不大于2%，外标法定量，待测样液中三聚氰胺的响应值应在工作曲线范围内。

### 3.5 结果计算和表述

按照下式计算试样中三聚氰胺的含量：

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \times n \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X—试样中三聚氰胺的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A—试样溶液对应的色谱峰面积响应值；

A<sub>s</sub>—标准溶液对应的色谱峰面积响应值；

V—净化后加入的甲醇溶液体积，单位为毫升（mL）；

C<sub>s</sub>—三聚氰胺标准溶液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m—试样质量，单位为克（g）；

n—提取稀释倍数。

平行测定结果用算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

### 3.6 检测方法灵敏度、准确度、精密度

#### 3.6.1 灵敏度

本方法生鲜牛乳中三聚氰胺的检出限为0.1 mg/kg。

### 3.6.2 准确度

本方法在0.1 mg/kg~25.0 mg/kg添加浓度的回收率为80%~120%。

### 3.6.3 精密度

本方法的批内变异系数 $CV \leq 10\%$ ，批间变异系数 $CV \leq 15\%$ 。

## 4 气相色谱质谱法（仲裁法）

### 4.1 方法提要

试样中的三聚氰胺用1%三氯乙酸提取，经阳离子交换柱净化，用BSTFA+1%TMCS衍生化，用气相色谱质谱仪进行定性和定量分析。

### 4.2 试剂与材料

4.2.1 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）；

4.2.2 吡啶：色谱纯；

4.2.3 其他试剂和材料同 3.2.5—3.2.12；

4.2.4 三聚氰胺标准工作液：取三聚氰胺标准工作液（3.2.16），用甲醇溶液（3.2.11）稀释为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ 、0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、2.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作液。

### 4.3 仪器与设备

4.3.1 气相色谱质谱仪；

4.3.2 恒温干燥箱；

4.3.3 其它仪器同 3.3.2—3.3.6。

### 4.4 测定步骤

按3.4.1和3.4.2进行提取与净化。

#### 4.4.1 衍生化

取3.4.2的净化液，用甲醇溶液（3.2.11）稀释到标准工作液线性范围内的浓度，取400  $\mu\text{L}$ 置于带盖玻璃试管中，氮气吹干，加入200  $\mu\text{L}$ 的吡啶（4.2.2）和200  $\mu\text{L}$ 的BSTFA+1%TMCS（4.2.1），混匀，在70℃衍生30 min，放冷后上机测定。同时分别取三聚氰胺标准工作液（4.2.4）400  $\mu\text{L}$ ，氮气吹干，做同步衍生。

#### 4.4.2 测定

##### 4.4.2.1 气相色谱质谱条件

色谱柱：

HP-5MS，5%苯基甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱（30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ），或性能相当者；

载气：氦气（He），纯度 $\geq 99.999\%$ ；

流速：1.3 mL/min；

进样：不分流进样，进样体积为1  $\mu\text{L}$ ，进样口温度：250℃；

升温程序：起始温度为75℃，持续1.0 min，以30℃/min升温至300℃，保持2.0 min；

传输线温度：280℃；

扫描模式：选择离子扫描；

监测离子：99、171、327、342 m/z；

溶剂延迟：4 min；

四极杆温度：150℃；

离子源温度：230℃；

EI源轰击能：70 eV。

##### 4.4.2.2 定性定量方法

定性方法：样品与标准衍生溶液保留时间的相对标准偏差不大于0.5%，特征离子基峰丰度与标准衍生溶液相差不大于20%。

定量方法：以342，327，171，和99峰面积之和进行校正定量。

#### 4.5 结果计算和表述

按照下式计算试样中三聚氰胺的含量：

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \times n_1 \times n_2 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X—试样中三聚氰胺的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A—试样溶液对应的色谱峰面积响应值；

A<sub>s</sub>—标准溶液对应的色谱峰面积响应值；

V—净化后加入的甲醇溶液体积，单位为毫升（mL）；

C<sub>s</sub>—三聚氰胺标准溶液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m —试样质量，单位为克（g）；

n<sub>1</sub> — 提取稀释倍数；

n<sub>2</sub> — 衍生前稀释倍数。

平行测定结果用算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

#### 4.6 检测方法灵敏度、准确度、精密度

##### 4.6.1 灵敏度

本方法生鲜牛乳中三聚氰胺的检出限为0.05 mg/kg。

##### 4.6.2 准确度

本方法在0.05 mg/kg~2.0 mg/kg添加浓度的回收率为80%~120%。

##### 4.6.3 精密度

本方法的批内变异系数CV≤10%，批间变异系数CV≤15%。



## 附录 A 液相色谱图及光谱图

## A.1 三聚氰胺标准溶液色谱图

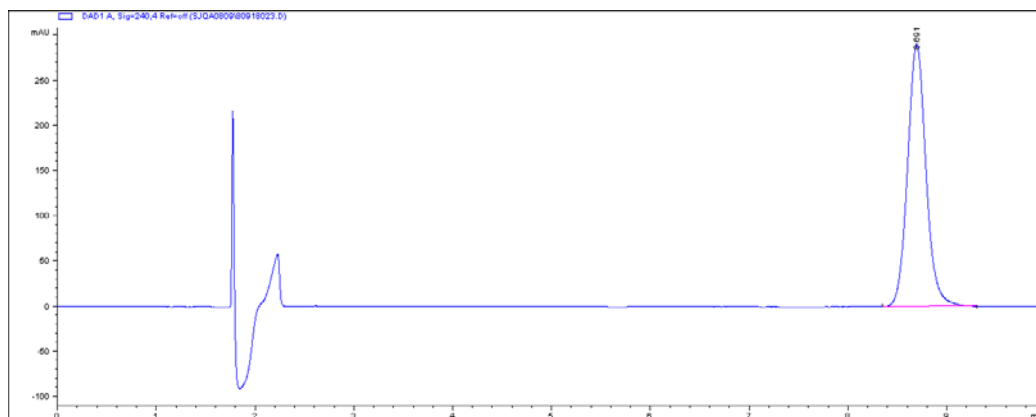


图 A.1: 三聚氰胺标准溶液色谱图

## A.2 样品中添加三聚氰胺色谱图

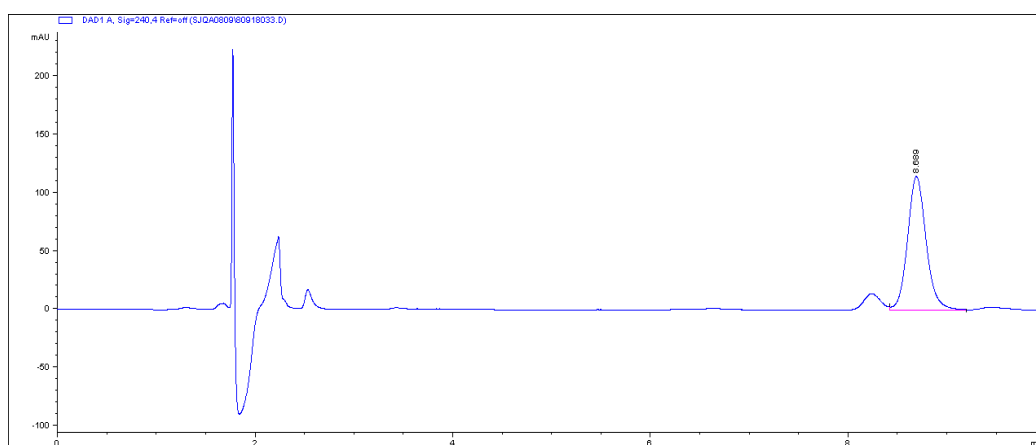


图 A.2: 样品中添加三聚氰胺色谱图

## A.3 三聚氰胺紫外光谱图

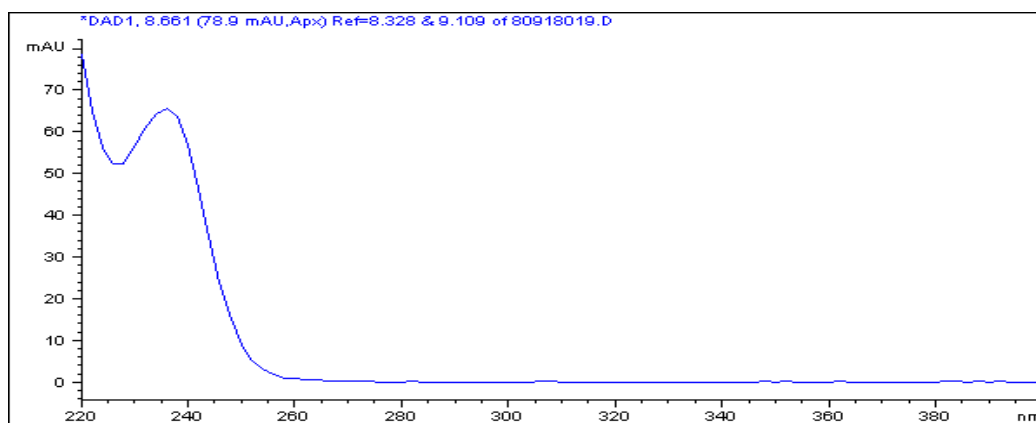


图 A.3: 三聚氰胺紫外光谱

附录 B 气相色谱图及离子质谱图

B.1 三聚氰胺标准溶液衍生生物选择离子色谱图

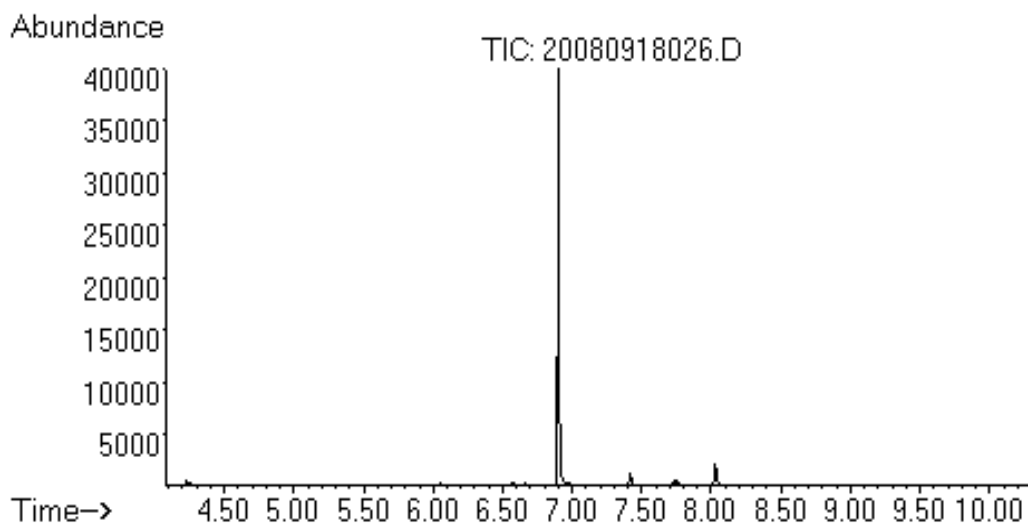


图 B.1 三聚氰胺标准溶液衍生生物选择离子色谱图

B.2 三聚氰胺标准溶液衍生生物选择离子质谱图

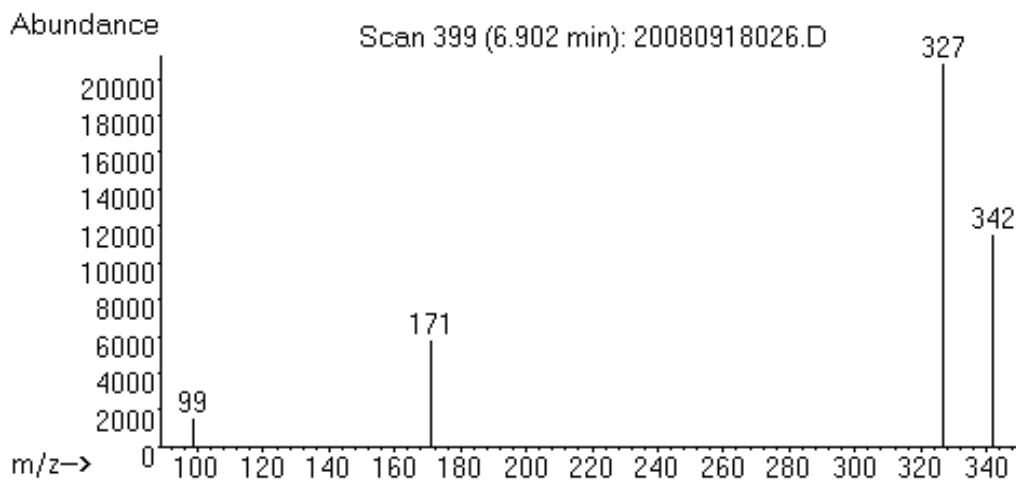


图 B.2 三聚氰胺标准溶液衍生生物选择离子质谱图