



中华人民共和国国家标准

GB/T 22388—2008

原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法

Determination of melamine in raw milk and dairy products

2008-10-07 发布

2008-10-07 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准包括三个方法：第一法 高效液相色谱法，第二法 液相色谱-质谱/质谱法，第三法 气相色谱-质谱联用法。检测时，应根据检测对象及其限量的规定，选用与其相适应的检测方法。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国食品安全应急标准化工作组、全国质量监管重点产品检验方法标准化技术委员会提出并归口。

本标准第一法起草单位：中国检验检疫科学研究院、中国疾病预防控制中心、国家食品质量安全监督检验中心、北京市疾病预防控制中心、国家乳制品质量监督检验中心、浙江省质量技术监督检测研究院、国家加工食品质量监督检验中心(广州)。

本标准第一法主要起草人：宋书锋、鲁杰、安娟、杨大进、李淑娟、张晶、刘艳琴、杨红梅、杨金宝、鄂来明、廖上富、陈小珍、蔡依军、郭新东、吴玉奎。

本标准第二法起草单位：中国检验检疫科学研究院、北京市疾病预防控制中心、国家食品质量安全监督检验中心、中国疾病预防控制中心、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准第二法主要起草人：彭涛、吴永宁、邵兵、王浩、李晓娟、郭启雷、苗虹、赵云峰、丁涛、李立、蒋原。

本标准第三法起草单位：上海市质量监督检验技术研究院、国家食品质量安全监督检验中心、中国检验检疫科学研究院。

本标准第三法主要起草人：巢强国、常宇文、雷涛、陈冬东、赵玉琪、周耀斌、穆同娜、葛宇、曹程明、张辉、麦成华、曹红。

原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法

1 范围

本标准规定了原料乳、乳制品以及含乳制品中三聚氰胺的三种测定方法,即高效液相色谱法(HPLC法)、液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS法)和气相色谱-质谱联用法[包括气相色谱-质谱法(GC-MS法),气相色谱-质谱/质谱法(GC-MS/MS法)]。

本标准适用于原料乳、乳制品以及含乳制品中三聚氰胺的定量测定;液相色谱-质谱/质谱法、气相色谱-质谱联用法(包括气相色谱-质谱/质谱法)同时适用于原料乳、乳制品以及含乳制品中三聚氰胺的定性确证。

本标准高效液相色谱法的定量限为 2 mg/kg,液相色谱-质谱/质谱法的定量限为 0.01 mg/kg,气相色谱-质谱法的定量限为 0.05 mg/kg(其中气相色谱-质谱/质谱法的定量限为 0.005 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

3.2.13 阳离子交换固相萃取柱: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,填料质量为 60 mg,体积为 3 mL,或相当者。使用前依次用 3 mL 甲醇、5 mL 水活化。

3.2.14 定性滤纸。

3.2.15 海砂:化学纯,粒度 0.65 mm~0.85 mm,二氧化硅(SiO₂)含量为 99%。

3.2.16 微孔滤膜:0.2 μm,有机相。

3.2.17 氮气:纯度大于等于 99.999%。

3.3 仪器和设备

3.3.1 高效液相色谱(HPLC)仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

3.3.2 分析天平:感量为 0.000 1 g 和 0.01 g。

3.3.3 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

3.3.4 超声波水浴。

3.3.5 固相萃取装置。

3.3.6 氮气吹干仪。

3.3.7 涡旋混合器。

3.3.8 具塞塑料离心管:50 mL。

3.3.9 研钵。

3.4 样品处理

3.4.1 提取

3.4.1.1 液态奶、奶粉、酸奶、冰淇淋和奶糖等

称取 2 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 具塞塑料离心管中,加入 15 mL 三氯乙酸溶液(3.2.8)和 5 mL 乙腈,超声提取 10 min,再振荡提取 10 min 后,以不低于 4 000 r/min 离心 10 min。上清液经三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤后,用三氯乙酸溶液定容至 25 mL,移取 5 mL 滤液,加入 5 mL 水混匀后做待净化液。

3.4.1.2 奶酪、奶油和巧克力等

称取 2 g(精确至 0.01 g)试样于研钵中,加入适量海砂(试样质量的 4 倍~6 倍)研磨成干粉状,转移至 50 mL 具塞塑料离心管中,用 15 mL 三氯乙酸溶液(3.2.8)分数次清洗研钵,清洗液转入离心管中,再往离心管中加入 5 mL 乙腈,余下操作同 3.4.1.1 中“超声提取 10 min,……加入 5 mL 水混匀后做待净化液”。

注:若样品中脂肪含量较高,可以用三氯乙酸溶液饱和的正己烷液-液分配除脂后再用 SPE 柱净化。

3.4.2 净化

将 3.4.1 中的待净化液转移至固相萃取柱(3.2.13)中。依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗涤,抽至近

f) 进样量:20 μL 。

3.5.2 标准曲线的绘制

用流动相将三聚氰胺标准储备液逐级稀释得到的浓度为 0.8、2、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液,浓度由低到高进样检测,以峰面积-浓度作图,得到标准曲线回归方程。基质匹配加标三聚氰胺的样品 HPLC 色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

3.5.3 定量测定

待测样液中三聚氰胺的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分析。

3.5.4 结果计算

试样中三聚氰胺的含量由色谱数据处理软件或按式(1)计算获得:

$$X = \frac{A \times c \times V \times 1\,000}{A_s \times m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中三聚氰胺的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

A ——样液中三聚氰胺的峰面积;

c ——标准溶液中三聚氰胺的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

A_s ——标准溶液中三聚氰胺的峰面积;

m ——试样的质量,单位为克(g);

f ——稀释倍数。

3.6 空白实验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

3.7 方法定量限

本方法的定量限为 2 mg/kg 。

3.8 回收率

在添加浓度 2 mg/kg ~10 mg/kg 浓度范围内,回收率在 80%~110%之间,相对标准偏差小于 10%。

3.9 允许差

4 第二法 液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS法)

4.1 原理

4.4 样品处理

4.4.1 提取

4.4.1.1 液态奶、奶粉、酸奶、冰淇淋和奶糖等

称取 1 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 具塞塑料离心管中,加入 8 mL 三氯乙酸溶液(3.2.8)和 2 mL 乙腈,超声提取 10 min,再振荡提取 10 min 后,以不低于 4 000 r/min 离心 10 min。上清液经三氯

4.4.1.2 奶酪、奶油和巧克力等

称取 1 g(精确至 0.01 g)试样于研钵中,加入适量海砂(试样质量的 4 倍~6 倍)研磨成干粉状,转移至 50 mL 具塞塑料离心管中,加入 8 mL 三氯乙酸溶液(3.2.8)分数次清洗研钵,清洗液转入离心管中,再加入 2 mL 乙腈,余下操作同 4.4.1.1 中“超声提取 10 min,……做待净化液”。

注:若样品中脂肪含量较高,可以用三氯乙酸溶液饱和的正己烷液-液分配除脂后再用 SPE 柱净化。

4.4.2 净化

将 4.4.1 中的待净化液转移至固相萃取柱(3.2.13)中。依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗涤,抽至近干后,用 6 mL 氯化甲醇溶液(3.2.9)洗脱。整个固相萃取过程流速不超过 1 mL/min。洗脱液于 50 °C 下用氮气吹干,残留物(相当于 1 g 试样)用 1 mL 流动相定容,涡旋混合 1 min,过微孔滤膜(3.2.16)后,供 LC-MS/MS 测定。

4.5 液相色谱-质谱/质谱测定

4.5.1 LC 参考条件

- 色谱柱:强阳离子交换与反相 C₁₈ 混合填料,混合比例(1:4),150 mm×2.0mm[内径(i. d.)], 5 μm,或相当者。
- 流动相:等体积的乙酸铵溶液(4.2.3)和乙腈充分混合,用乙酸调节至 pH=3.0 后备用。
- 进样量:10 μL。
- 柱温:40 °C。
- 流速:0.2 mL/min。

4.5.2 MS/MS 参考条件

- 电离方式:电喷雾电离,正离子。

- 雾化气:氮气,2.815 kg/cm²(40 psi)。
- 干燥气:氮气,流速 10 L/min,温度 350 °C。

4.5.5 定性判定

按照上述条件测定试样和标准工作溶液,如果试样中的质量色谱峰保留时间与标准工作溶液一致(变化范围在 $\pm 2.5\%$ 之内);样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度与浓度相当标准溶液的相对丰度一致,相对丰度偏差不超过表1的规定,则可判断样品中存在三聚氰胺。

表1 定性离子相对丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%至50%	>10%至20%	$\leq 10\%$
允许的相对偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

4.5.6 结果计算

同3.5.4。

4.6 空白实验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

4.7 方法定量限

本方法的定量限为0.01 mg/kg。

4.8 回收率

在添加浓度0.01 mg/kg~0.5 mg/kg浓度范围内,回收率在80%~110%之间,相对标准偏差小于10%。

4.9 允许差

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15%。

5 第三法 气相色谱-质谱联用法(GC-MS和GC-MS/MS法)

5.1 原理

试样经超声提取、固相萃取净化后,进行硅烷化衍生,衍生产物采用选择离子监测质谱扫描模式(SIM)或多反应监测质谱扫描模式(MRM)用化合物的保留时间和质谱碎片的丰度比定性。外标法

定量。

5.2 试剂与材料

除非另有说明,所有试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的一级水。

5.2.1 吡啶:优级纯。

5.2.2 乙酸铅。

5.2.3 衍生化试剂:*N,O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)+三甲基氯硅烷(TMCS)(99+1),色谱纯。

5.2.4 乙酸铅溶液(22 g/L):取22 g乙酸铅用约300 mL水溶解后定容至1 L。

5.2.5 三聚氰胺标准溶液:准确吸取三聚氰胺标准储备液(3.2.12)1 mL于100 mL容量瓶中,用甲醇

5.4 样品处理

5.4.1 GC-MS 法

5.4.1.1 提取

5.4.1.1.1 液态奶、奶粉、酸奶和奶糖等

称取 5 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 具塞比色管,加入 25 mL 三氯乙酸溶液(3.2.8),涡旋振荡 30 s,再加入 15 mL 三氯乙酸溶液,超声提取 15 min,加入 2 mL 乙酸铅溶液(5.2.4),用三氯乙酸溶液

10 min。上清液待净化。

5.4.1.1.2 奶酪、奶油和巧克力等

称取 5 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 具塞比色管中,用 5 mL 热水溶解(必要时可适当加热),再加入 20 mL 三氯乙酸溶液(3.2.8),涡旋振荡 30 s,再加入 15 mL 三氯乙酸溶液超声提取及以下操作同 5.4.1.1.1。若样品中脂肪含量较高,可以先用乙醚脱脂后再用三氯乙酸溶液提取。

5.4.1.2 净化

准确移取 5 mL 的待净化滤液至固相萃取柱(3.2.13)中。再用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗,弃淋洗液,抽近干后用 3 mL 氨化甲醇溶液(3.2.9)洗脱,收集洗脱液,50 °C 下氮气吹干。

5.4.2 GC-MS/MS 法

5.4.2.1 奶粉、奶酪、奶油、巧克力和奶糖等

称取 0.5 g(精确至 0.01 g)试样,加入 5 mL 甲醇水溶液(3.2.7),涡旋混匀 2 min 后,超声提取 15 min~20 min,以不低于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL 用微孔滤膜(3.2.16)过滤,50 °C 下氮气吹干。

5.4.2.2 液态奶和酸奶等

称取 1 g(精确至 0.01 g)试样,加入 5 mL 甲醇,涡旋混匀 2 min 后,超声提取及以下操作同 5.4.2.1。

5.4.3 衍生化

取上述氮气吹干残留物,加入 600 μL 的吡啶和 200 μL 衍生化试剂(5.2.3),混匀,70 °C 反应 30 min 后,供 GC-MS 或 GC-MS/MS 法定量检测或确证。

- b) 流速:1.3 mL/min。
- c) 程序升温:75 °C保持1 min,以30 °C/min的速率升温至220 °C,再以5 °C/min的速率升温至250 °C,保持2 min。
- d) 进样口温度:250 °C。
- e) 接口温度:250 °C。
- f) 进样方式:不分流进样。
- g) 进样量:1 μ L。
- h) 电离方式:电子轰击电离(EI)。
- i) 电离能量:70 eV。
- j) 离子源温度:220 °C。
- k) 四级杆温度:150 °C。
- l) 碰撞气:氩气,0.239 4 Pa(1.8 mTorr)。
- m) 碰撞能量:15 V。
- n) 扫描方式:多反应监测(MRM),定量离子 m/z 342>327,定性离子 m/z 342>327,342>171。

5.5.2 标准曲线的绘制

5.5.2.1 GC-MS 法

准确吸取三聚氰胺标准溶液(5.2.5)0、0.4、0.8、1.6、4、8、16 mL,分别置于7个100 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度。各取1 mL用氮气吹干,按照5.4.3步骤衍生化。配制成衍生化产物浓度分别为0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 μ g/mL的标准溶液。反应液供GC-MS测定。以标准工作溶液浓度为横坐标,定量离子质量色谱峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。标准溶液的GC-MS选择离子质量色谱图参见附录A中的图A.3,三聚氰胺衍生物选择离子质谱图参见附录A中的图A.4。

5.5.2.2 GC-MS/MS 法

准确吸取三聚氰胺标准溶液(5.2.5)0、0.04、0.08、0.4、0.8、4、8 mL,分别置于7个100 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度。各取1 mL用氮气吹干,按照5.4.3步骤衍生化。配制成衍生化产物浓度分别为0、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 μ g/mL的标准溶液。反应液供GC-MS/MS测定。以标准工作溶液浓度为横坐标,定量离子质量色谱峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。标准溶液的GC-MS/MS多反应监测质量色谱图参见附录A中的图A.5。

5.5.3 定量测定

待测样液中三聚氰胺的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应对净化液稀释,重新衍生化后再进样分析。

5.5.4 定性判定

5.5.4.1 GC-MS 法

以标准样品的保留时间和监测离子(m/z 99、171、327和342)定性,待测样品中4个离子(m/z 99、171、327和342)的丰度比与标准品的相同离子丰度比相差不大于20%。

5.5.4.2 GC-MS/MS 法

以标准样品的保留时间以及多反应监测离子(m/z 342>327、342>171)定性,其他定性判定原则同4.5.5。

5.5.5 结果计算

同3.5.4。

5.6 空白实验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

5.7 方法定量限

本方法中,气相色谱-质谱法(GC-MS法)的定量限为0.05 mg/kg,气相色谱-质谱/质谱法(GC-

MS/MS法)的定量限为0.005 mg/kg。

5.8 回收率

GC-MS法:在添加浓度0.05 mg/kg~2 mg/kg浓度范围内,回收率在70%~110%之间,相对标准偏差小于10%。

GC-MS/MS法:在添加浓度0.005 mg/kg~1 mg/kg浓度范围内,回收率在90%~105%之间,相

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15%。

附录 A
(资料性附录)
三聚氰胺标准品色谱图

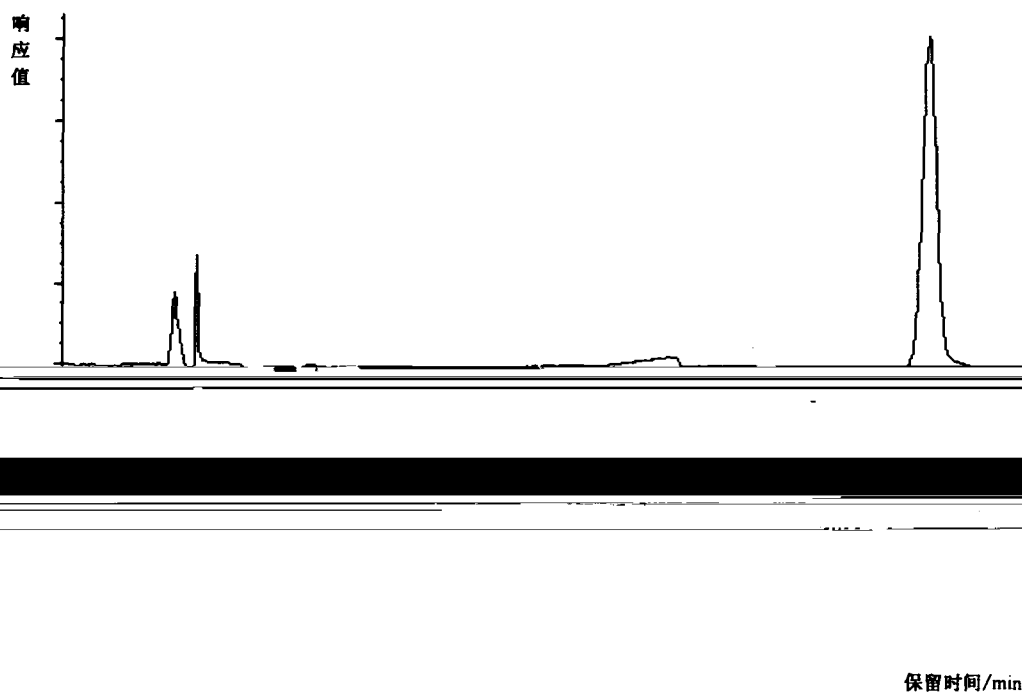


图 A.1 基质匹配加标三聚氰胺的样品 HPLC 色谱图
(检测波长 240 nm, 保留时间 13.6 min, C₈ 色谱柱)

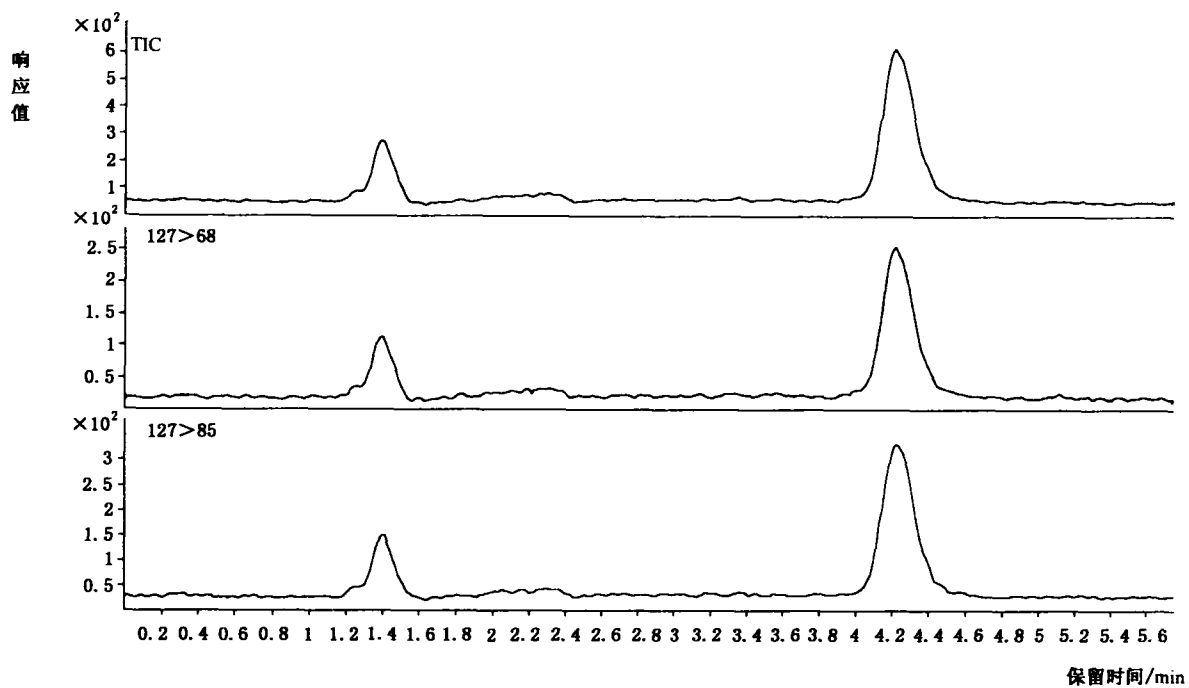


图 A.2 基质匹配加标三聚氰胺的样品 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图
(保留时间 4.2 min, 定性离子 m/z 127 > 85 和 m/z 127 > 68)

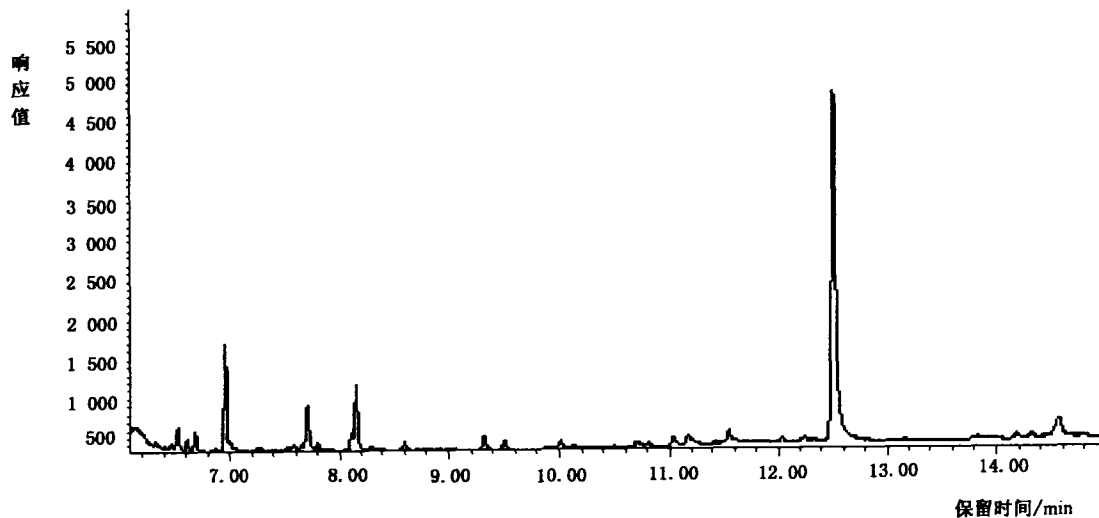


图 A.3 三聚氰胺衍生物 GC-MS 选择离子色谱图
(保留时间 12.514 min)

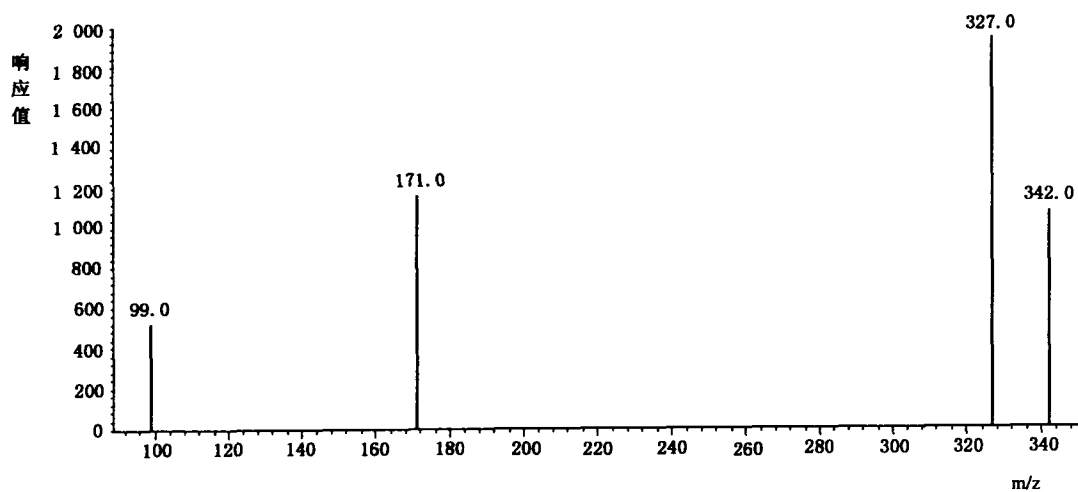


图 A.4 三聚氰胺衍生物 GC-MS 选择离子质谱图

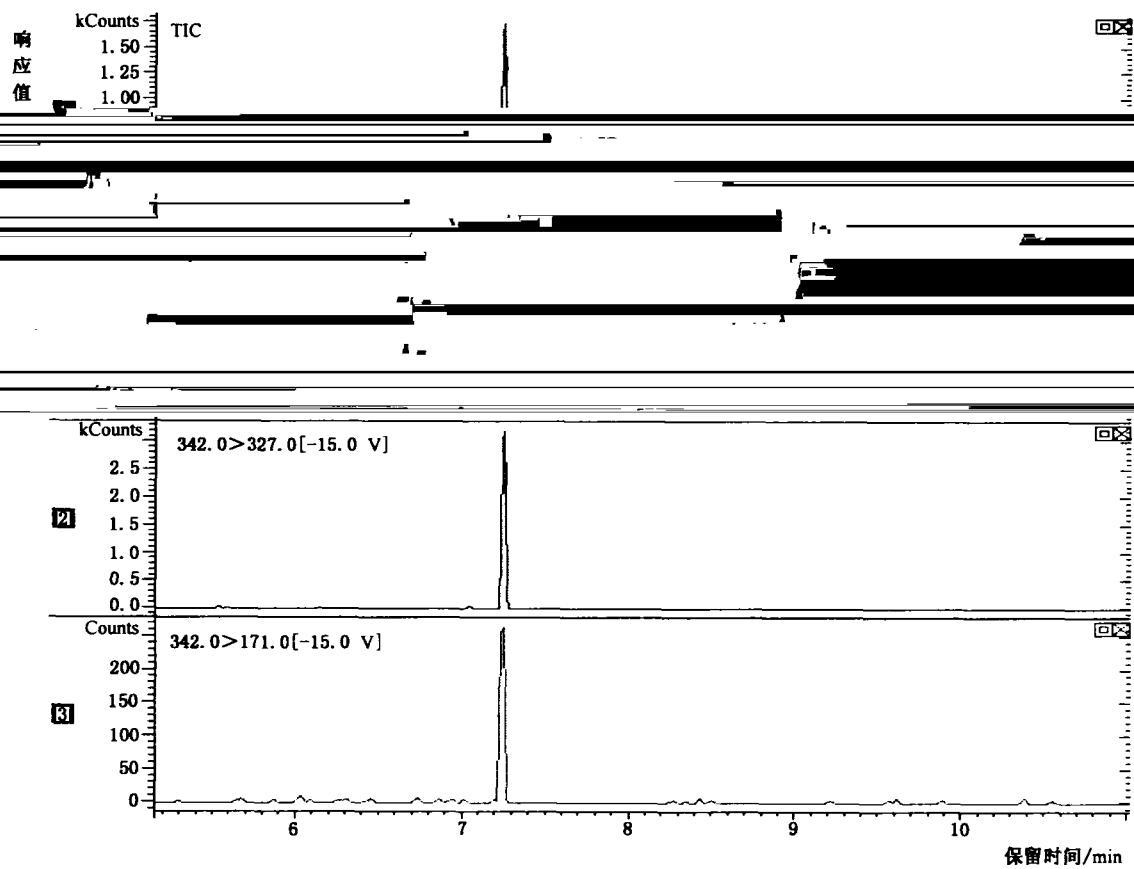


图 A.5 三聚氰胺衍生物 GC-MS/MS 多反应监测质量色谱图
 (保留时间 7.25 min, 定性离子 m/z 342 > 171 和 m/z 342 > 327)

中华人民共和国
国家标准
原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法
GB/T 22388—2008

*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码 100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 23 千字
2008年11月第一版 2008年11月第一次印刷

*
书号: 155066·1-34948 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 22388-2008