

# 戴安离子色谱及液相色谱在奶制品检测中的应用

- 三聚氰胺和三聚氰酸
- 硝酸盐
- 亚硝酸盐
- 胆碱
- 微量碘
- 硫氰酸根
- 高氯酸盐
- 羟脯氨酸
- 三价铬和六价铬



简单准确快速经济的检测方法



戴安中国有限公司

# 目 录

离子色谱法及液相色谱法同时检测奶制品中三聚氰胺和三聚氰酸 .....	2
离子色谱法（等度法、梯度法） .....	2
液相色谱法（C18分析柱法、CS10分析柱法） .....	4
液相色谱/质谱法 .....	5
离子色谱法检测奶粉和奶制品中的硝酸盐及亚硝酸盐.....	8
奶制品中的有机阳离子、胆碱、乙酰胆碱以及乌拉胆碱的分析 .....	10
离子色谱检测奶制品中的微量碘.....	11
牛奶中硫氰酸根的测定 .....	12
牛奶中高氯酸盐的测定 .....	13
牛奶中羟脯氨酸的测定 .....	15
牛奶中三价铬和六价铬的测定.....	17

# 离子色谱法和液相色谱法检测奶制品中 三聚氰胺和三聚氰酸

三聚氰胺, 简称三胺, 学名三氮三嗪, 别名蜜胺、氰尿酸胺、三聚酰胺, 是一种重要的氮杂环有机化工原料, 具有一定的肾毒性。因为其分子中含有大量氮元素(大约66%), 而用全氮法检测蛋白质含量时不能够区分这种“伪蛋白氮”, 所以一些不法乳制品厂家或无良的奶农, 为了追求最大利益而不顾消费者的生命健康和安危, 向产品中大量添加三聚氰胺粉以提高“蛋白质”含量。

三聚氰酸与三聚氰胺结构类似, 在化工生产过程中经常同时存在。因此, 如果在奶粉生产过程中直接加入化工原料三聚氰胺, 事实上也同时掺入了混在三聚氰胺当中的三聚氰酸, 当三聚氰胺和三聚氰酸同时存在时, 分子结构上的氢氧基与氨基之间会形成水合键, 将二者连接起来, 形成网格结构, 当混在奶粉中的这种网格结构被摄入人体后, 由于胃酸的作用, 三聚氰胺和三聚氰酸相互解离, 分别被吸收入血液, 并被运送到肾脏, 准备随尿液排出体外, 但在肾脏细胞中, 两种物质又一次相遇, 再次结合成网格结构-不溶于水的大分子复合物-并沉积下来, 形成结石, 结果造成肾小管的物理阻塞, 导致尿液无法顺利排除, 使肾脏积水, 最终导致肾脏衰竭。婴幼儿由于主要营养来源来自于奶粉, 而一旦大量食用含有三聚氰胺和三聚氰酸的奶粉, 会形成肾结石, 长期摄入会造成肾衰竭和死亡。成年人长期摄入三聚氰胺和三聚氰酸, 也会造成不同程度的肾损伤, 因此, 无论从任何层面上讲, 三聚氰胺和三聚氰酸都应该被严令禁止加入到任何食品中。

据2007年6月的《美国兽医学会杂志》报道, 2007年3月中旬以来, 美国发生4000多起猫、狗等宠物中毒死亡事件。美国食品药品监督管理局(FDA)从进口的部分小麦蛋白粉和大米蛋白粉中检出三聚氰胺等成分。调查结果表明: 掺杂了6.6%三聚氰胺的小麦蛋白粉是导致宠物食品中毒的祸端。

2008年9月由于多例婴幼儿因饮用奶粉发生肾结石而爆发的奶粉掺有三聚氰胺事件, 引起中国政府的极度重视, 开始对牛奶及奶制品进行大规模监查。

目前三聚氰胺的检测方法主要集中在色谱或色谱与质谱联用技术上。目前文献报道过的方法包括GC-MS方法, 离子对试剂液相色谱-紫外检测法, LC-MS法和LC-MS/MS法等, 但是上述各种方法都或多或少存在一些缺陷。

本资料为您介绍快速准确检测三聚氰胺的方法—离子色谱法和液相色谱/质谱法。

## 离子色谱法

本法是采用阳离子交换离子色谱-紫外检测的技术, 对奶粉中三聚氰胺进行了准确定量, 戴安公司为您提供等度以及梯度两种测定方法, 为三聚氰胺的测定提供可靠的保障。

### 奶粉及液态奶样品前处理方法:

#### 奶粉

一、奶粉: (使用RP柱前处理, 进样体积100微升)

- 称取1.00 g 奶粉样品, 充分溶解于4mL去离子水中。
- 使用色谱纯乙腈定容至10mL, 充分混匀。
- 室温沉降蛋白十分钟。
- 取上清液, 使用去离子水稀释十倍, 依次过0.22微米尼龙滤头和活化过的RP柱。
- 准备进样分析。

二、奶粉: (使用NG1在线前处理, 进样体积10微升)

- 称取1.00 g 奶粉样品, 充分溶解于4mL去离子水中。
- 使用色谱纯乙腈定容至10mL, 充分混匀。
- 室温沉降蛋白十分钟。
- 取上清液, 过0.22微米尼龙滤头。

- 准备进样分析。（由于在定量环后，保护柱前，加一个可以去除疏水性组分的NG1柱，乙腈已将绝大部分蛋白沉淀，而残余的蛋白及脂肪则可被NG1小柱去除。）

## 液态奶

一、液态奶：（使用RP柱前处理，进样体积100微升）

- 取4mL牛奶样品。
- 加入5mL色谱纯乙腈,充分混匀。
- 室温沉降蛋白十分钟。
- 取上清液，使用去离子水稀释十倍，依次过0.22微米尼龙滤头和活化过的RP柱。
- 准备进样分析。

二、液态奶：（使用NG1在线前处理，进样体积10微升）

- 取4mL牛奶样品。
- 加入5mL色谱纯乙腈,充分混匀。
- 室温沉降蛋白十分钟。
- 取上清液，过0.22微米尼龙滤头。
- 准备进样分析。（由于在定量环后，保护柱前，加一个可以去除疏水性组分的NG1保护柱，乙腈已将绝大部分蛋白沉淀，而残余的蛋白及脂肪则可被NG1小柱去除。）

注：使用NG1时，在NG1柱前串接200微升体积的一段绿管，用于样品与流动相预混合。每折合进样100针，应使用80%乙腈对NG1进行清洗，前后用水过度。

## 方法一：等度法测定奶粉及奶制品中的三聚氰胺

测试对象：

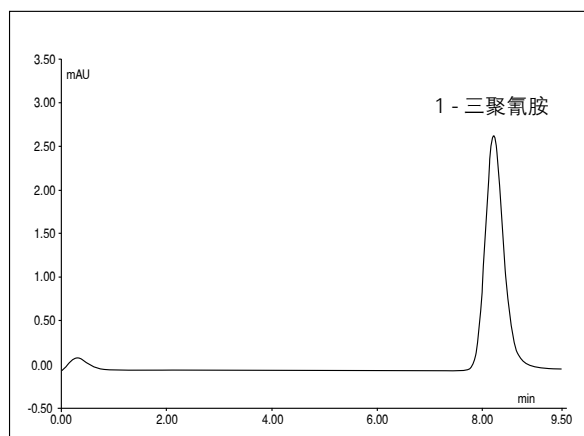
奶粉、生鲜牛奶，本方法最低检出限为0.06 mg/Kg（液态奶）或者0.1 mg/Kg（奶粉样品），样品加标回收率为85%-105%，实际样品重现性RSD小于4%。

仪器准备：

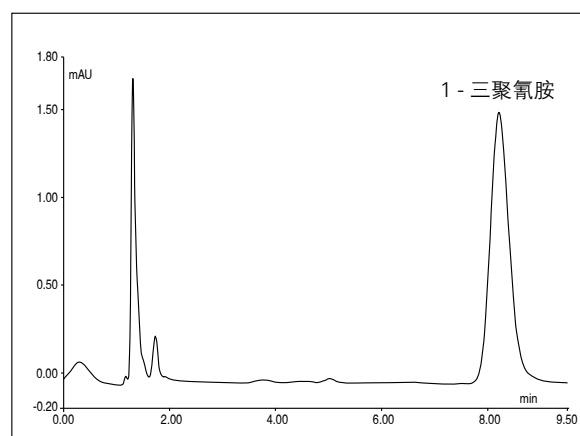
戴安公司离子色谱 紫外检测器

色谱条件：

- 淋洗液：MSA（6 mmol/L）或硫酸（3 mmol/L）等度
- 色谱柱：CS17色谱柱+CG17保护柱
- 柱温：30℃
- 进样体积：10 μL
- 检测器：紫外检测器UV，240 nm
- 分析时间：12 min



5 mg/L三聚氰胺，出峰时间8.5min左右



阳性牛奶样品，三聚氰胺浓度67.2 mg/kg

## 方法二：梯度法测定奶粉及奶制品中的三聚氰胺

测试对象：

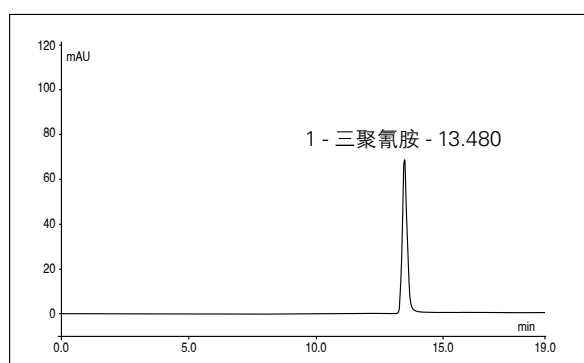
奶粉、生鲜牛奶、液态奶、巧克力豆、奶糖、饼干等，本方法最低检出限为0.03 mg/Kg（液态奶）或者0.05 mg/Kg（奶粉样品），样品加标回收率为77-121%，实际样品重现性RSD小于4%，结果令人满意。

仪器准备：

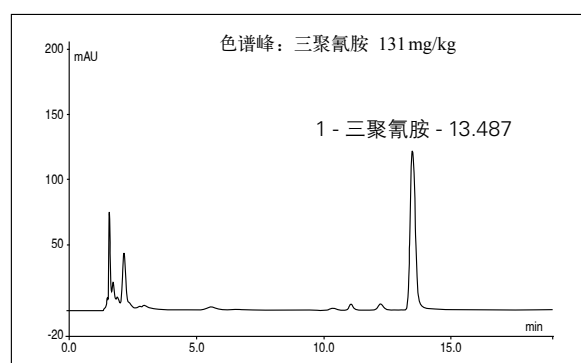
仪器：戴安公司离子色谱 紫外检测器

色谱条件：

- 淋洗液：MSA梯度或硫酸梯度
- 色谱柱：CS17色谱柱+CG17保护柱
- 柱温：30℃
- 进样体积：25  $\mu$ L
- 检测器：紫外检测器，240 nm



10ppm三聚氰胺标准溶液色谱图，13.5分钟左右出峰



三聚氰胺阳性样品色谱图

## 液相色谱法

戴安也为您提供液相色谱检测三聚氰胺的方法，方法都与国家标准相符。

方法一：

样品前处理：

与原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法（GB/T 22388—2008）方法一致

色谱条件：

流动相：10mM的庚烷磺酸钠与柠檬酸（10 mM）缓冲溶液：乙腈 = 92：8

检测波长：240 nm

色谱柱：Dionex Acclaim 120, C18, 5  $\mu$ m, 120A, 4.6  $\times$  250mm

仪器：Dionex U3000 高效液相色谱仪

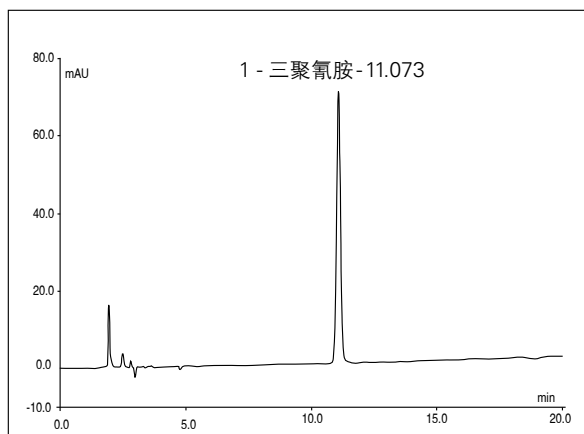
Pump：LPG-3400 低压四元梯度泵，内置真空脱气机

AutoSampler：WPS-3000

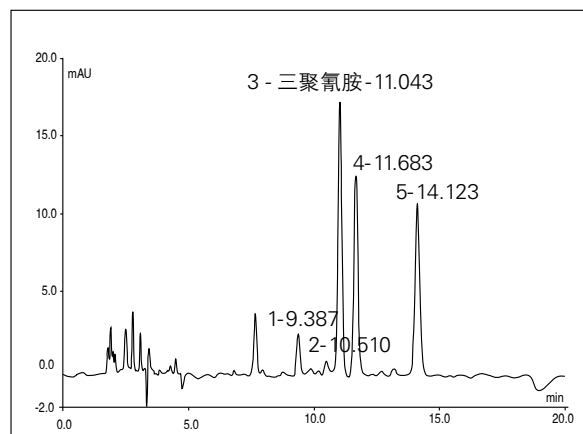
ColumnOven：TCC-3000

Detector：DAD-3000 二极管阵列检测器

该方法三聚氰胺约11 min出峰，方法检测限是0.29 ppm



浓度为10ppm的三聚氰胺标准品色谱图，进样量20 $\mu$ L



加标样品色谱图，三聚氰胺与样品中的杂质均能被基线分离，最大限度的将杂质引起的误差降到最低

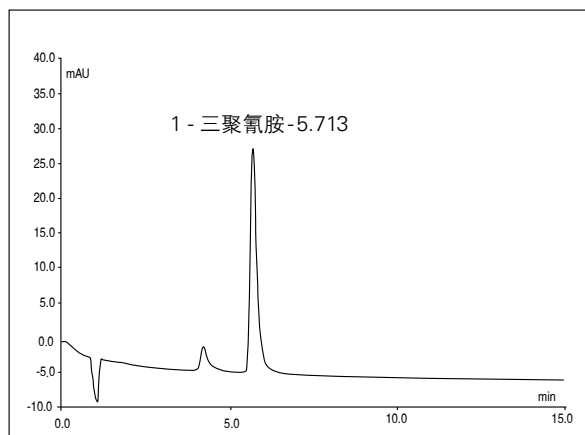
## 方法二：

### 样品前处理：

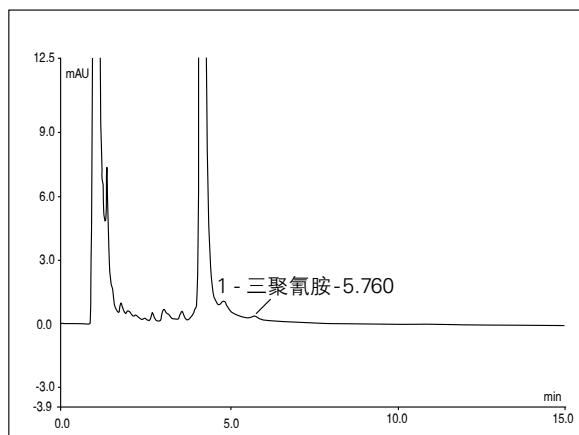
与原料乳中三聚氰胺快速检测 液相色谱法（GB/T22400-2008）方法完全一致

### 方法条件：

- 实验仪器：戴安U3000液相色谱或戴安离子色谱
- 检测器：紫外检测器
- 色谱柱：IONPAC CS10分析柱
- 流动相：磷酸盐缓冲溶液 - 乙腈（70+30，体积比），混匀。（磷酸盐缓冲液：0.05 mol/L。称取6.8 g磷酸二氢钾（准确至0.01 g），加水800 mL完全溶解后，用磷酸调节pH至3.0，用水稀释至1 L，用滤膜（水相，0.45 $\mu$ m）过滤。）
- 流速：1.5 mL/min
- 检测波长：240 nm
- 进样量：25 $\mu$ L
- 最低检出限：0.06 mg/kg(样品稀释一百倍后进样，计算检出限为0.6 ppb)



2ppm标准品谱图



稀释100倍样品谱图检测含量：6.825 ppb

## 液相色谱/质谱法

特点：使用戴安公司最新开发的混合基质柱WAX-1分离被分析物。该色谱柱利用疏水和离子交换混合作用机理来达到特殊的选择性和保留。液相色谱运行时间仅用8分钟，戴安公司的MSQ质谱检测器确保选择性和灵敏度。对于两种物质（2-200 ng/mL）的线性都能达到 $R^2 > 0.9995$ 。方法检出限（MDL），三聚氰胺为3.97 ng/mL，三聚氰酸为3.32 ng/mL。本检测条件下MSQ质谱检测器的检出限 $< 5$  ng/mL。

### 样品前处理：

#### 提取

##### 1、液态奶、奶粉、酸奶等样品：

- 称取2.0 g样品（精确到0.01 g）于50 mL具塞塑料离心管中
- 加入15 mL三氯乙酸溶液和5 mL乙腈
- 混匀后超声10 min，再振荡10 min
- 4000 r/min离心10 min
- 上清液经三氯乙酸润湿的滤纸过滤
- 用三氯乙酸溶液定容到25 mL
- 取5 mL滤液，加入5 mL水混匀后待净化

##### 2、奶酪、奶油等样品：

- 称取2.0 g样品（精确到0.01 g）于研钵中
- 加入海沙研磨成干粉状转入50 mL具塞塑料离心管中
- 用15 mL三氯乙酸溶液清洗研钵并加入离心管
- 加入5 mL乙腈
- 混匀后超声10 min，再振荡10 min
- 4000 r/min离心10 min
- 上清液经三氯乙酸润湿的滤纸过滤
- 用三氯乙酸溶液定容到25 mL
- 取5 mL滤液，加入5 mL水混匀后待净化

#### 净化

- 固相萃取柱：混合型阳离子固相萃取柱，使用前依次用3 mL甲醇、5 mL水活化
- 将待净化液转移至固相萃取柱中，依次用3 mL水、3 mL甲醇洗涤后抽干
- 用6 mL氨化甲醇洗脱，流速不超过1 mL/min
- 洗脱液用50℃氮气吹干
- 残留物加1 mL液相的流动相定容，涡旋1 min混匀
- 过0.2 μm滤膜

### 仪器：

戴安Summit HPLC或U3000液相色谱系统

自动进样器

柱温箱

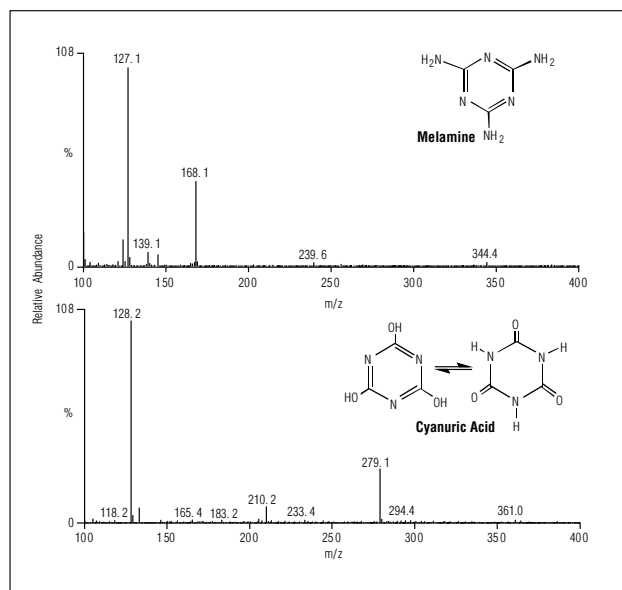
戴安MSQ Plus单四极质谱检测器，ESI源

Chromeleon®变色龙软件

### 色谱条件：

分析柱：戴安公司Acclaim 混合基质柱WAX-1 (150 × 2.1 mm, 5 μm)

淋洗液：等度90%乙腈/10% 20 mM pH4醋酸铵缓冲液 (v/v)



全波段扫描三聚氰胺和三聚氰酸的质谱图

流速：0.25 mL/min

柱温：20℃

进样量：5 µL

### MSQ质谱条件

分析模式：SIM带极性切换

锥孔电压：50 V

间隔时间：0.5 S，对于所有SIM通道

探针温度：500℃

扫描：4 SIM全程扫描（每次500ms），两个不同极性的全扫描（100-400 m/z，250 ms）分析物及内标结果见表和色谱图。

### MSQ质谱条件

名称	开始质量数 (m/z)	结束质量数 (m/z)	时间范围 (分钟)	扫描时间(毫秒)	极性	锥电压 (V)
正极全扫描	100	400	0 – 8	250	pos.	50
负极全扫描	100	400	0 – 8	250	pos.	50
名称	Mass (m/z)	Span (m/z)	时间范围 (分钟)	扫描时间(毫秒)	极性	锥电压 (V)
SIM GROUP 1						
三聚氰胺	127	0.5	0 – 5	500	pos.	50
三聚氰胺-15N3 (内标)	130	0.5	0 – 5	500	pos.	50
SIM GROUP 2						
三聚氰酸	128	0.5	5 – 8	500	neg.	50
三聚氰酸-13C3 (内标)	131	0.5	5 – 8	500	neg.	50

# 离子色谱法检测奶粉和奶制品中的硝酸盐及亚硝酸盐

自然界中的硝酸盐及亚硝酸盐的形成机理：含氮有机物在微生物的作用下，可逐渐分解成氨，在氧的作用下，氨可进一步被微生物转化为亚硝酸盐和硝酸盐，硝酸盐在一定条件下亦可还原为亚硝酸盐。大量的亚硝酸盐被人体血液吸收后，可使正常的血红蛋白（二价铁）变成变性血红蛋白（三价铁），从而失去携带氧气的功能，出现组织缺氧现象；另外亚硝酸盐与蛋白质代谢的中间产物仲胺反应，还能生成亚硝胺，亚硝胺具有一定的致癌性。

在奶牛的喂养过程中，如果环境水源、喂养饲料的添加剂以及奶牛生长环境等硝酸盐、亚硝酸盐含量过高，都会发生牛奶中的硝酸盐及亚硝酸盐的超标，随着人们生活质量的提高，牛奶及奶制品在人们日常生活中所占比重越来越大，因此，加强预防和检测牛奶及奶制品的硝酸盐污染是非常必要的。

本部分介绍了离子色谱检测牛奶及奶制品中硝酸盐、亚硝酸盐的方法，该方法对亚硝酸盐和硝酸盐检出限分别为0.05 mg/L和0.075 mg/L。

注：本方法为国标GB5009食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定中的推荐方法

## 样品前处理

### 提取：

**牛奶：**准确量取5 mL试样于25 mL比色皿中，加5-10 mL纯水，加入3%乙酸2 mL，摇匀超声10 min，75℃放置5 min。采用定量滤纸初步过滤。取部分溶液于10000 rpm速度离心15 min，取上清液备用。

**奶粉，奶制品：**准确称取试样2.50 g，置于50 mL容量瓶中，加水40 mL，加入3%乙酸2 mL，摇匀，超声30 min，置75℃水浴中放置5 min，用水稀释至刻度。溶液经滤纸过滤后，取部分溶液于10000 rpm离心15 min，取上清液备用。

### 净化：

取滤液15 mL依次通过OnGuard II RP柱（如果氯离子大于100 mg/L，则需要依次通过OnGuard II Ag柱和Na柱），弃去前面3 mL（1.0 cc），收集后面洗脱液待测。

OnGuard II RP柱（1.0 cc）使用前依次用10 mL甲醇、10 mL水通过，活化30 min

OnGuard II Ag柱（1.0 cc）和OnGuard II Na柱（1.0 cc）用10 mL水通过，活化30 min

OnGuard II RP柱、Ag柱和Na柱可以用C18柱、Ag型树脂柱和Na型树脂柱代替

## 色谱条件：

**色谱柱：**氢氧化物选择性，可兼容梯度洗脱的高容量阴离子交换柱，如IonPac AS11-HC 4 mm × 250 mm（带IonPac AG11-HC型保护柱4 mm × 50 mm）。

**淋洗液：**淋洗液自动发生器，浓度为6~70 mmol。或选配二元或四元梯度泵混合产生梯度程序（使用高纯的、质量浓度为50%浓氢氧化钠溶液，配制成含OH<sup>-</sup>为100 mmol/L的淋洗液，然后再进行调整稀释）。

**抑制器：**连续自动再生膜阴离子抑制器

**检测器：**电导检测器，检测池温度：35℃

**淋洗液流速：**1.0 mL/min

**进样体积：**50 μL

## 测定：

### 标准曲线

移取硝酸盐和亚硝酸盐混合标准使用液，加水稀释，制成系列标准溶液，其中由于不同样品中硝酸盐含量差

别较大，故针对不同类型的样品，需制作不同标准曲线，含硝酸盐浓度为0.0、0.03、0.75、0.15、0.3、0.45、0.6 mg/L或0.0、5.0、10.0、20.0、50.0、75.0和100.0 mg/L和亚硝酸盐浓度为0.00、0.005、0.010、0.025、0.50、0.75、1.00 mg/L的混合标准溶液，用1.0mL注射器从低到高浓度依次进样，得到上述各浓度标准溶液的色谱图。以硝酸盐和亚硝酸盐的浓度（μg/L）为横坐标，以峰高（μS）或峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，并计算线性回归方程。

### 样品测定：

用1.0mL注射器分别吸取空白和试样溶液，在相同工作条件下，依次注入离子色谱仪中，记录色谱图。根据保留时间定性，分别测量空白和样品的峰高（μS）或峰面积（μS\*min）。

### 结果计算：

试样中硝酸盐或亚硝酸盐含量按式（1）计算

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中硝酸盐（以NO<sub>3</sub><sup>-</sup>计）或亚硝酸盐（以NO<sub>2</sub><sup>-</sup>计）的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）

c —— 测定用试样溶液中的硝酸盐或亚硝酸盐浓度，单位为毫克每升（mg/L）

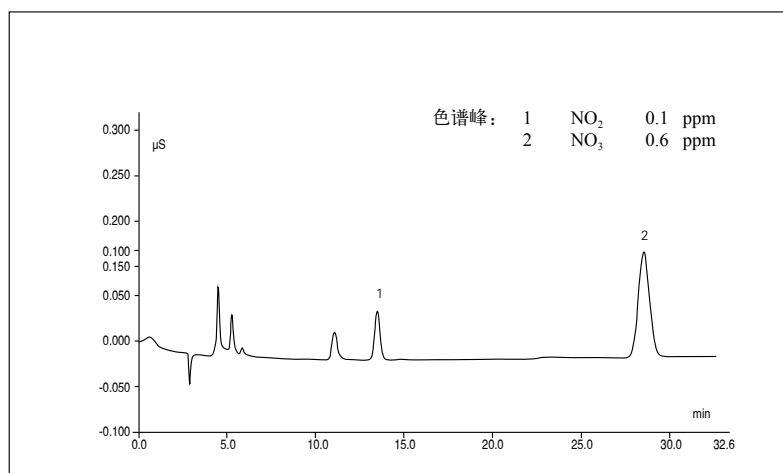
c<sub>0</sub> —— 试剂空白液中硝酸盐或亚硝酸盐的浓度，单位为毫克每升（mg/L）

V —— 试样溶液体积，单位为毫升（mL）

f —— 试样溶液稀释倍数

m —— 试样取样量，单位为克（g）

计算结果表示到小数点后两位。



硝酸盐和亚硝酸盐混合标准溶液的色谱图

## 奶制品中的有机阳离子、胆碱、乙酰胆碱 以及乌拉胆碱的分析

胆碱又被称为“记忆因子”，是合成乙酰胆碱的重要原料，能帮助中枢神经传递资讯，是大脑思维、记忆等智力活动的必需物质，胆碱在心血管和肝健康以及人体正常的新陈代谢中发挥着重要作用。婴幼儿以及幼小动物由于自身尚无合成胆碱的功能，体内所需要胆碱全部依赖外界供给，氯化胆碱是维生素之一，卵磷脂的主要成份，氯化胆碱经常作为胆碱添加剂添加到婴幼儿食品、维生素配方、运动饮料和小动物饲料中。

胆碱是一种季胺碱，具有强碱性，氯化胆碱是胆碱的盐酸盐，化学名称为三甲基（2-羟乙基）氯化铵，传统的氯化胆碱的检测为间接检测，根据检测的 $\text{Cl}^-$ 含量进行计算得出胆碱含量，故一些不法商人趁机掺假，许多廉价无机氯化物和有机酸盐，如 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、三甲胺盐酸盐等均可能作为掺假物添加到奶制品及小动物饲料中。

戴安公司的离子色谱法检测胆碱采用阳离子交换柱，电导检测器，可以直接得到胆碱的色谱峰，方法准确快速。

### 色谱条件

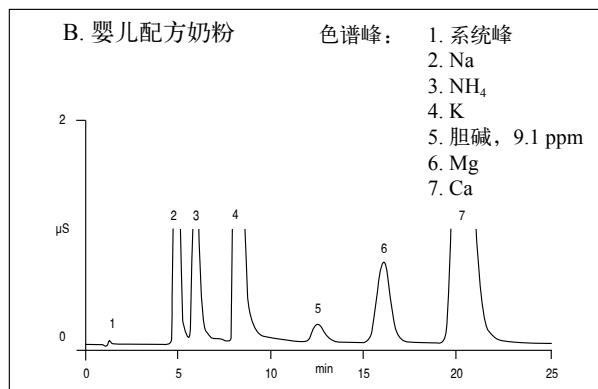
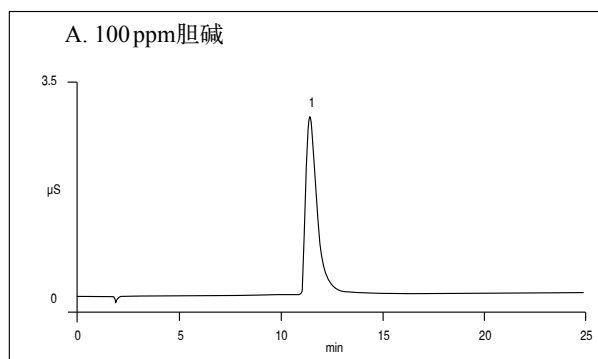
分析柱：IonPac CS12A，CG12A

淋洗液：18 mN硫酸

流速：1 mL/min

进样体积：10  $\mu\text{L}$

检测方式：抑制型电导，CSRS II，自循环模式



婴儿配方奶粉中胆碱与常规阳离子的分离谱图

## 离子色谱检测奶制品中的微量碘

碘是人体必需的微量元素，碘的缺乏或过量摄入都会使人的甲状腺功能紊乱，影响身体和智力的发展，婴幼儿所需碘主要来源于母乳和婴幼儿配方奶粉，所以对产妇和婴幼儿配方奶粉以及牛奶中碘的检测是十分必要的。

本方法用带有脉冲安培检测器的离子色谱检测了婴儿配方奶粉、孕产妇专用奶粉以及鲜牛奶中的微量碘，以NaOH作淋洗液，直接进样，方法的检测限达1 µg/L

### 样品前处理：

#### 牛奶

- 量取7.0 mL牛奶
- 加入2 mL体积分数为3% 的醋酸稀释至10 mL，摇匀
- 于3500转/分速度下离心3 min
- 上清液用0.45 µm滤膜过滤，取5.0 mL滤液
- 加入0.2 mL 3 mol/L NaOH混匀
- 于3500转/分下离心3分钟
- 用0.45 µm滤膜再过滤

样品经过上述两步处理分别脱去蛋白质和脂肪等有机物后可用于离子色谱直接进样分析。

#### 脱脂奶粉

- 在100 mL烧杯中称取脱脂奶粉样品0.95 g
- 加入10 mL水溶解
- 加入2 mL 3%乙酸混合
- 再加入8 mL去离子水混合
- 通过滤膜进行过滤
- 将5 mL滤液通过OnGuard RP柱，收集此滤液并进样

### 仪器：

戴安离子色谱仪

安培检测器

AS11分离柱

G11保护柱

### 标准溶液：

标准溶液：1.0 g/L I<sup>-</sup>储备液：称取1.308 g KI(分析纯)，溶于二次石英蒸馏水中稀释至1 L，其他浓度的I<sup>-</sup>标准溶液用储备液稀释成低于10 mg/L的I<sup>-</sup>标准溶液，当天使用，当天稀释配制。

### 色谱条件：

淋洗液：0.04 mol/L NaOH

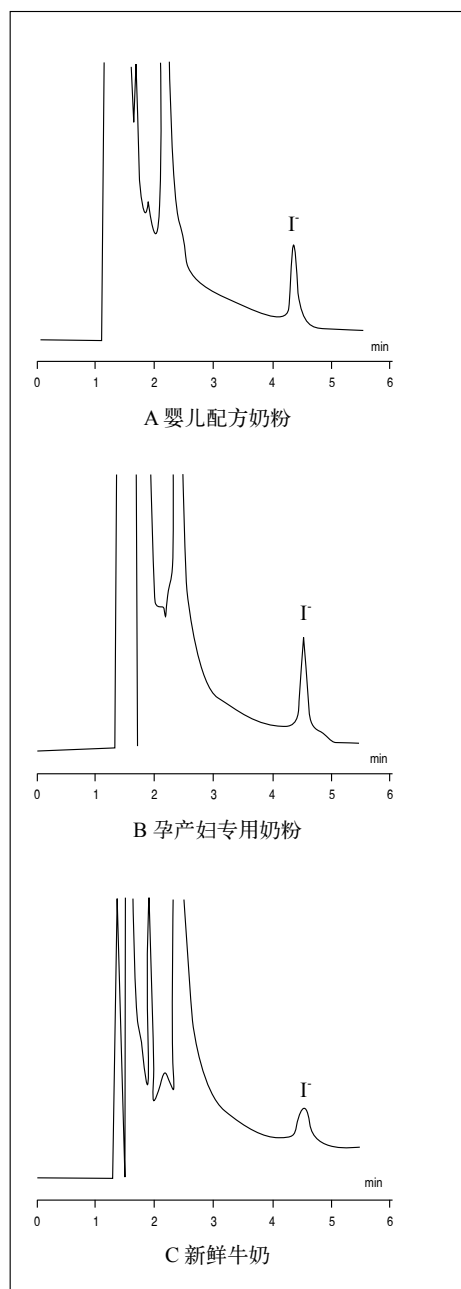
流速：1.0 mL/min

脉冲安培检测器

Ag工作电极；Ag/AgCl参比电极

工作电压：0.07 V

进样量：50 µL



实际样品色谱图

## 牛奶中硫氰酸根的测定

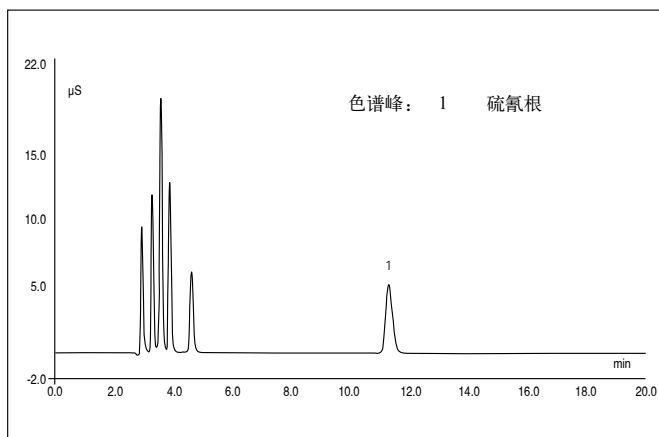
硫氰酸钠( $\text{NaSCN}$ ) 是白色斜方晶系结晶或粉末,毒害品。它的毒性主要由其在体内释放的氰根离子而引起。氰根离子在体内能很快与细胞色素氧化酶中的三价铁离子结合,抑制该酶活性,使组织不能利用氧而产生中毒。原料乳或奶粉中掺入硫氰酸钠后可有效的抑菌、保鲜,延长产品的保质期,故很多不法奶户利用这点将硫氰酸钠掺入原料乳或者奶粉中,损害了消费者的健康。

随着卫生部在食品安全方面的工作力度逐渐加大,2008年12月12卫生部发布的《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)》中明确规定乳及乳制品中硫氰酸钠属于违法添加物质。近日卫生部食品整治办[2009]29号文件全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治中,规定的牛奶中的硫氰酸钠检验方法,使用了戴安公司的“离子色谱法测定牛奶中硫氰酸根”方法,该方法使用戴安公司离子色谱仪和AS16离子色谱柱进行检测。该检测方法结果准确,重复性良好,检测限低。值得一提的是,方法中梯度洗脱的方式,采用了戴安公司“只加水”淋洗液发生专利技术,能够自动产生需要的淋洗液浓度,替代了传统人工配制的方式,克服了因手动配置带来的浓度不准确,操作繁复缺点。

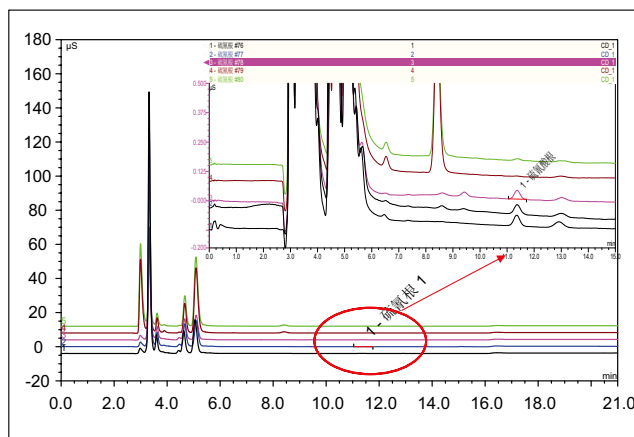
### 样品前处理方法:

取牛乳样品4mL,加乙腈5mL,摇匀,静置,取清液1mL,加水稀释至10mL,0.22m尼龙滤膜过滤后,过OnGuard RP柱,即可进样。

### 标准溶液分离谱图:



6种常见阴离子( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ )及硫氰酸根(10 ppm)混合标准溶液的色谱图



5个样品的平行色谱图

## 牛奶中高氯酸盐的测定

有消息报导部分美国品牌婴幼儿奶粉中检测出高氯酸盐，这是继我国牛奶及奶制品的三聚氰胺事件后又一波引起关注的奶制品污染事件。

高氯酸盐是一种持久性环境污染物质，广泛用于火箭推进剂、导弹和烟火制造工业，使高氯酸盐很容易释放到环境中。研究表明，由于高氯酸盐和碘离子具有相似的电荷和离子半径，会与碘竞争进入人体甲状腺，抑制甲状腺对碘的吸收，从而减少甲状腺荷尔蒙的生成，影响甲状腺功能，导致成人新陈代谢功能紊乱、影响胎儿和婴儿神经中枢的正常生长和发展，高氯酸盐的高暴露还会导致甲状腺癌。2002年美国国家环保署（US EPA）规定饮用水中高氯酸盐的最大容许浓度为 $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 。美国的一些州将高氯酸盐的限定浓度规定为 $1\text{--}18\text{ }\mu\text{g/L}$ 。高氯酸盐的分析已进入美国EPA系列标准方法中（EPA314.0、314.1、314.2、331、332、6850）。

需要关注的是，除了奶粉本身的污染外，冲调奶粉的水中如果被高氯酸污染，也会引起冲调牛奶的高氯酸超标。目前随着人们对环境与食品安全意识的加强，国内高氯酸盐的检测受到了各行业广泛的关注，对于水中高氯酸盐的离子色谱检测，戴安公司提供符合EPA314.0和314.1的成熟分析方法，专门推出了IonPacAS20和AS21色谱分析柱。目前戴安公司的IC/MS技术用于牛奶中的高氯酸盐检测，满足了大量科研分析人员对该项技术的需求，更大程度和范围推广该项检测技术。

### 样品前处理及标准溶液的配制：

精密称取奶粉样品0.50g，加去离子水3.5mL使充分溶解混匀，再加入5mL乙腈振荡混匀，静置10分钟以沉淀蛋白。取上清液1mL，用去离子水定容至10mL，将稀释后的溶液经过0.22 $\mu\text{m}$ 尼龙滤膜和RP柱过滤，滤液直接上机分析。

标准溶液的配制： $\text{NaClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ （化学纯  $\geq 98.0\%$ ），精密称取0.1422g，去离子水定容至1000ppm，分别稀释至10ppm、100ppb，再依次稀释分别配制得到标准工作溶液5、2.5、1、0.5、0.25、0.1、0.05 ppb  $\text{ClO}_4^-$ 。

### 分析条件

色谱柱：IonPac AS20  $2\times 250\text{mm}$  分析柱， IonPac AG20  $2\times 50\text{mm}$  保护柱

淋洗液组成：EG-KOH，0-17min，40mM；17-22min，70mM，22-27min，40mM（带CR-ATC）

流速：0.25mL/min

抑制器：连续自动再生膜阴离子抑制器

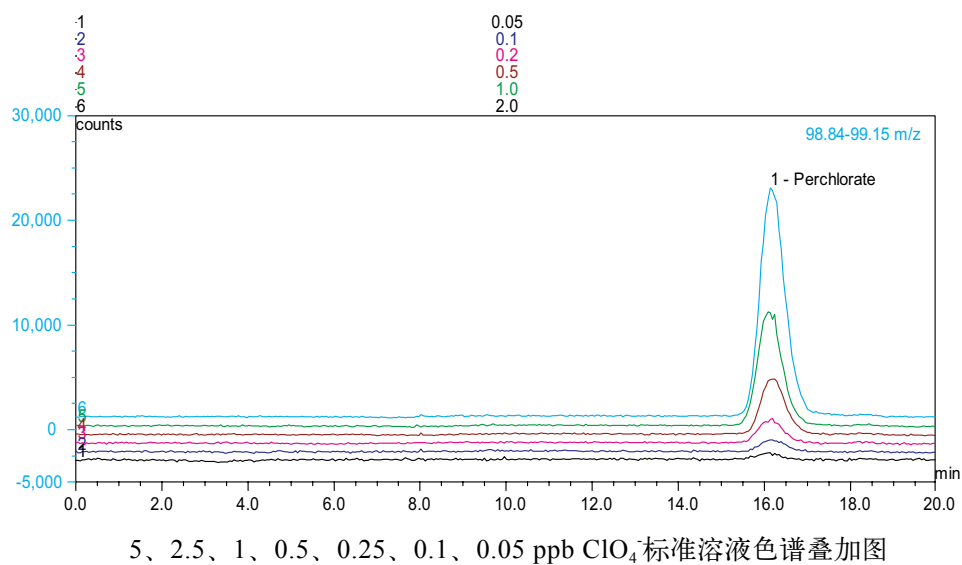
检测器：电导检测器

质谱参数：

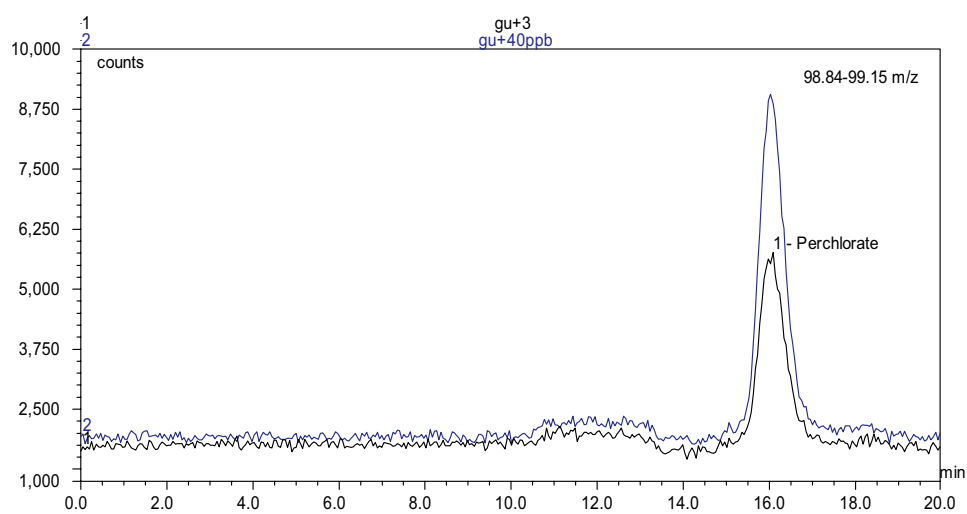
Mode: -ESI;  
Probe Voltage: -3KV;  
Cone Voltage: 70V;  
Probe Temp: 450℃;  
SIM channels, 99,101,m/z;  
SIM parameters;  
Span 0.3amu;  
Dwell time: 1s

## 测定

标准溶液色谱叠加图:



## 某奶粉样品测定及加标谱图



## 牛奶中羟脯氨酸的测定

动物胶原水解蛋白是一种廉价蛋白原料，是将牛皮及其制品下脚料等成分粗加工后制成的水解蛋白质，某些非法厂家在乳粉中掺入廉价的水解动物蛋白来冒充或替代乳蛋白质，提高乳中蛋白的质量分数，降低成本。掺加动物胶原水解蛋白不但会影响乳的口感和风味，改变牛乳的溶解度，因其氨基酸的组成不合理，且不易消化，所以营养价值低下，导致人体吸收利用率降低，会严重影响消费者的健康状况。而羟脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp) 又名反式-4-羟基-L-脯氨酸，为胶原蛋白中的特有氨基酸，其含量占10%以上；而乳蛋白中不含有此成分，如若样品中检测出来含有L(-)-羟脯氨酸，可判定添加了动物水解蛋白。

戴安公司提供羟脯氨酸的测定方法，为乳制品中是否掺入动物胶原水解蛋白的判断提供依据。

### 样品前处理方法：

前处理方法参考《GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定》：

将适量样品（奶粉或者牛奶）到安培瓶中，加入6 mol/L盐酸溶液10mL，液氮冷冻，抽真空，在酒精喷灯上烧结瓶口，于(110±1)℃恒温干燥箱中水解22 h。冷却后，混匀，开管，用移液管吸取200 μL滤液，置浓缩仪或旋转蒸发器中蒸发至干。加入3 mL 0.02 mol/L盐酸和20 mg/L叠氮化钠混合溶液，摇匀后备用。

测定前，取适量该样品溶液，以20 mg/L叠氮化钠溶液稀释至10 mL，摇匀后通过0.22μm尼龙滤膜和OnGuard RP柱（1 cc，经甲醇和水活化），弃去初始3 mL后收集1mL流出液，直接进样分析。

### 色谱条件

仪器型号：ICS-3000

色谱柱类型尺寸 分析柱：AminoPac PA10，250×2mm

保护柱：AminoPac PA10G，50×2mm

检测方式：脉冲积分安培检测，Au电极，氨基酸检测电位，pH参比电极模式

淋洗液组成：NaOH/NaOAc/HOAc梯度淋洗：

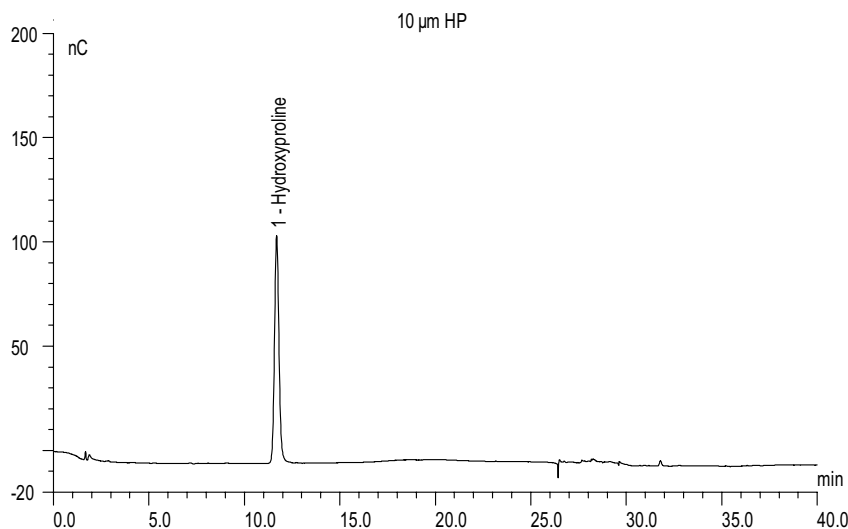
AminoPac PA10使用说明中Table 3 Gradient Conditions for Amino Acids and Carbohydrates

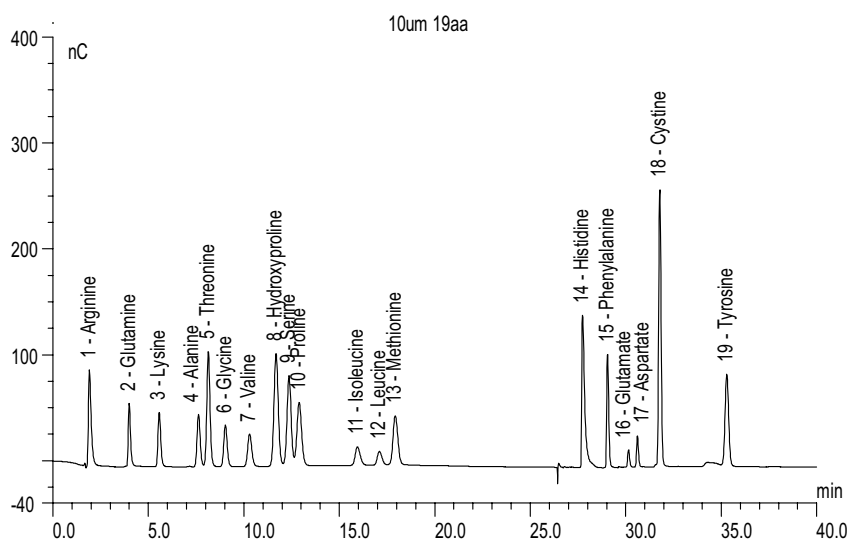
添加42.2-44.2min，0.1 mol/L HOAc冲洗步骤，其余同

流速：0.25 mL / min

进样体积：25 μL

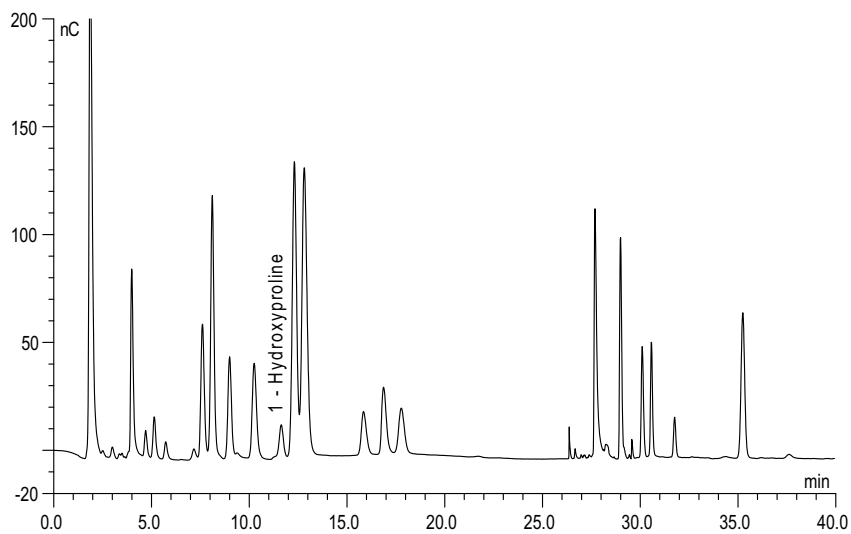
### 10 μmol/L 羟脯氨酸标准溶液分离谱图：



10  $\mu\text{mol/L}$  19AA标准溶液分离谱图:

由标准谱图可见，羟脯氨酸与另外常见18种氨基酸可以实现较好的分离，与相距较近的丝氨酸也可以实现基线分离。

奶粉样品水解液的分离谱图



## 牛奶中三价铬和六价铬的测定

某些非法厂家在乳粉中掺入廉价的水解动物蛋白来冒充或替代乳蛋白质，提高乳中蛋白的质量分数，降低成本，而这些水解动物蛋白是将牛皮及其制品下脚料等成分粗加工后制成的水解蛋白质，由于制革过程中需要大量的三价铬作为铬鞣剂，因此皮革水解蛋白即使经过脱铬处理也会存在一定量的重金属铬。这些铬主要以Cr(III)和Cr(VI)的形态存在，六价铬具有很强的毒性，可干扰重要的酶体系，具有致癌和诱发基因突变的作用。三价铬是人体的一种必需微量元素，在正常食品补给剂量下，三价铬是无毒的，但较高剂量的三价铬仍表现出细胞毒性反应，因此对于含“皮革水解蛋白粉”的乳制品，同时检测其中三价铬和六价铬的含量具有重要意义。

原子吸收和发射光谱等方法只能检测铬的总量；直接分光光度法检测时两种铬精确度难以保证。有文献报道用离子色谱分离，UV或电感耦合等离子体质谱同时检测三价铬和六价铬，用UV检测的方法中六价铬没有经过络合，因而灵敏度较低。戴安公司采用离子色谱法对三价铬和六价铬分别进行柱前和柱后衍生，大大提高了检测灵敏度，六价铬的检测限与使用ICP-MS检测接近，而仪器设备成本大大降低。

本文采用带有pH缓冲体系和三价铬络合剂的溶液完成了两种铬的同时提取，并且提取、沉降蛋白、柱前衍生同时完成，使前处理步骤大大减少。

### 色谱条件

色谱柱：IonPac CS5A 4mm×250mm分析柱及IonPac CG5A 4mm×50mm保护柱；

淋洗液：2 mM PDCA，2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，10 mM NaI，50 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>，2.8 mM LiOH混合水溶液；

衍生试剂：2 mM DPC，10 % (V/V) 甲醇，2.5 % (V/V) 硫酸。

淋洗液流速：1.0 mL/min；衍生液流速：0.5 mL/min。

检测波长：0~4.3 min 365 nm，4.3~8 min 530 nm。

仪器：ICS-3000离子色谱仪（Dionex，美国）；Ultimate 3000可变波长紫外可见检测器；PC-10柱后衍生装置；375 μL编结反应管；OnGuard II RP前处理柱（1.0 cc）；0.22 μm尼龙滤膜。

### 样品溶液的制备

在一个50 mL容量瓶中，按顺序加入牛奶或牛奶加标样品0.5 mL，超纯水4.5 mL，淋洗液储备液5 mL，33%硝酸0.1 mL，煮沸2-3分钟，冷却定容后过0.22 μm尼龙滤膜和OnGuard II RP前处理柱，弃去前面3 mL，后面溶液用于进样。

方法利用吡啶二羧酸铬（Cr(III)-PDCA）的紫外吸收和二苯卡巴腓铬（Cr(VI)-DPC）在可见光区的吸收来进行检测。由于三价铬的配位交换的动力较弱，所以需要进行柱前衍生生成Cr(III)-PDCA，进样后在分析柱中以Cr(PDCA)<sup>2-</sup>的形式被分离，而六价铬则以铬酸根离子（CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>）的形式被分离出来。在分离之后再采用柱后衍生生成Cr(VI)-DPC，两种物质在不同波长下进行检测。两种铬的标准品分离谱图和牛奶加标样品分离谱图见图1和图2。由图2可见，牛奶基体对两种铬的检测都没有干扰，分析快速准确。

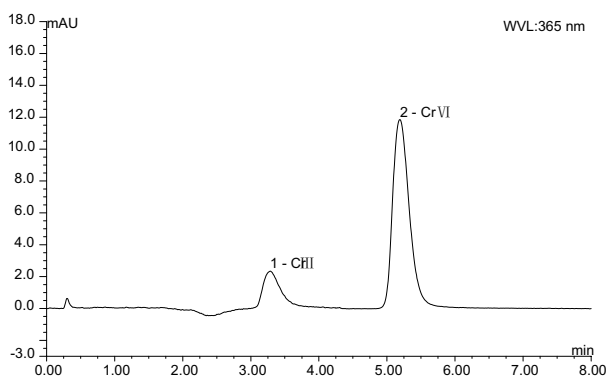


图1. 三价铬和六价铬标准品分离谱图

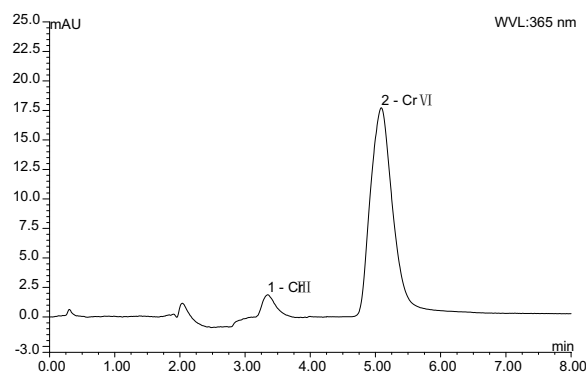


图2. 牛奶加标样品分离谱图



IC | HPLC | EXTRACTION | PROCESS | AUTOMATION

## 戴安中国有限公司

### 香港总部

香港新界葵涌兴芳路223号  
新都会广场1座16楼1618-1619室  
电话: (852) 24283282  
传真: (852) 24287898  
E-mail: dionex@dionex.com.hk

### 北京代表处

北京市朝阳区安定路33号  
化信大厦A座606室  
邮编: 100029  
电话: (010) 64436740  
(010) 64436741  
传真: (010) 64432350  
E-mail: beijing@dionex.com.cn

### 上海代表处/维修站

上海淮海中路1号  
柳林大厦2311室  
邮编: 200021  
电话: (021) 63735493  
(021) 63735348  
传真: (021) 63848294  
E-mail: shanghai@dionex.com.cn

### 应用研究中心

北京市海淀区双清路18号  
中科院生态环境中心  
邮编: 100085  
电话: (010) 62849182  
传真: (010) 62849239  
E-mail: Dionex\_App@dionex.com.cn

### 维修服务中心

北京市朝阳区安定路33号  
化信大厦A座606室  
邮编: 100029  
电话: (010) 64436740  
(010) 62936510  
传真: (010) 62923552  
E-mail: service@dionex.com.cn

### 广州联络处/维修站

广州市天河区天府路237号  
华建大厦C座906室  
邮编: 510630  
电话: (020) 88316797/39442165  
传真: (020) 85613258  
E-mail: penghong@dionex.com.cn

### 成都联络处/维修站

四川省成都市顺城大街308号  
冠城广场8楼F座  
邮编: 610017  
电话: (028) 86528208  
传真: (028) 86528204  
E-mail: chengdu@dionex.com.cn

戴安公司客户服务专线:  
400-610-0104



中文网址: [www.dionex.com.cn](http://www.dionex.com.cn)



Dionex products are designed, developed, and manufactured under an ISO 9001 Quality System.

2006 Dionex Corporation Analyst is a registered trademark of Applied Biosystems. Hystar is a trademark of Bruker Biosystems. FastLoc, MSQ, and Xcalibur are trademarks of Thermo Electron Corporation. All other trademarks and registered trademarks are the property of Dionex Corporation.

2009年7月印于北京