

ICS 67.100
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 22400—2008

原料乳中三聚氰胺快速检测 液相色谱法

Rapid determination of melamine in raw milk
High performance liquid chromatography method

2008-10-15 发布

2008-10-15 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录A为资料性附录。

本标准由中国计量科学研究院提出。

本标准由全国仪器分析测试标准化技术委员会归口。

本标准主要起草单位：中国计量科学研究院。

本标准参加起草单位：陕西出入境检验检疫局、中国人民解放军总医院、北京市产品质量监督检验所、国家地质实验测试中心、北京理工大学、北京出入境检验检疫局、北京大学、北京市营养源研究所、军事医学科学院、北京科技大学、清华大学。

本标准主要起草人：李红梅、张庆合、汤桦、何雅娟、全灿、李秀琴、黄挺、苏福海、戴新华、马康、李晓敏、宋德伟、徐蓓。

原料乳中三聚氰胺快速检测 液相色谱法

1 范围

本标准规定了液相色谱法快速检测原料乳中三聚氰胺的方法。

本标准适用于原料乳，也适用于不含添加物的液态乳制品。

本标准定量检测范围为0.30 mg/kg~100.0 mg/kg，方法检测限为0.05 mg/kg。

注：当原料乳中三聚氰胺的含量大于100.0 mg/kg时，具体操作方法见6.2.2.3.2。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第1部分：总则与定义

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

3 原理

用乙腈作为原料乳中的蛋白质沉淀剂和三聚氰胺提取剂，强阳离子交换色谱柱分离，高效液相色谱-紫外检测器/二极管阵列检测器检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯或以上规格，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

4.2 磷酸（ H_3PO_4 ）。

4.3 磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）。

4.4 三聚氰胺标准物质（ $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$ ）：纯度大于或等于99%。

4.5 三聚氰胺标准贮备溶液： 1.00×10^3 mg/L。

称取100 mg三聚氰胺标准物质（准确至0.1 mg），用水完全溶解后，100 mL容量瓶中定容至刻度，混匀，4℃条件下避光保存，有效期为1个月。

4.6 标准工作溶液：使用时配制。

4.6.1 标准溶液A： 2.00×10^2 mg/L。

准确移取20.0 mL三聚氰胺标准贮备溶液（4.5），置于100 mL容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。

4.6.2 标准溶液B：0.50 mg/L。

准确移取0.25 mL标准溶液A（4.6.1），置于100 mL容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。

4.6.3 按表1分别移取不同体积的标准溶液A（4.6.1）于容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。按表2分别移取不同体积的标准溶液B（4.6.2）于容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。

表1 标准工作溶液配制（高浓度）

标准溶液A体积 (mL)	0.10	0.25	1.00	1.25	5.00	12.5
定容体积 (mL)	100	100	100	50.0	50.0	50.0
标准工作溶液浓度 (mg/L)	0.20	0.50	2.00	5.00	20.0	50.0

表2 标准工作溶液配制（低浓度）

标准溶液B体积 (mL)	1.00	2.00	4.00	20.0	40.0
定容体积 (mL)	100	100	100	100	100
标准工作溶液浓度 (mg/L)	0.005	0.01	0.02	0.10	0.20

4.7 磷酸盐缓冲液：0.05 mol/L。

称取6.8 g磷酸二氢钾（4.3）（准确至0.01 g），加水800 mL完全溶解后，用磷酸（4.2）调节pH至3.0，用水稀释至1 L，用滤膜（4.9）过滤后备用。

4.8 一次性注射器：2 mL。

4.9 滤膜：水相，0.45 μm。

4.10 针式过滤器：有机相，0.45 μm。

4.11 具塞刻度试管：50 mL。

5 仪器

5.1 液相色谱仪：配有紫外检测器/二极管阵列检测器。

5.2 分析天平：感量 0.0001 g 和 0.01 g。

5.3 pH 计：测量精度±0.02。

5.4 溶剂过滤器。

6 测定步骤

6.1 试样的制备

称取混合均匀的15 g原料乳样品（准确至0.01 g），置于50 mL具塞刻度试管（4.11）中，加入30 mL乙腈（4.1），剧烈振荡6 min，加水定容至满刻度，充分混匀后静置3 min，用一次性注射器（4.8）吸取上清液用针式过滤器（4.10）过滤后，作为高效液相色谱分析用试样。

6.2 高效液相色谱测定

6.2.1 色谱条件

a) 色谱柱：强阳离子交换色谱柱，SCX，250 mm × 4.6 mm (i.d.)，5 μm，或性能相当者。

注：宜在色谱柱前加保护柱（或预柱），以延长色谱柱使用寿命。

b) 流动相：磷酸盐缓冲溶液（4.7）- 乙腈（70+30，体积比），混匀。

c) 流速：1.5 mL/min。

d) 柱温：室温。

e) 检测波长：240 nm。

f) 进样量：20 μL。

6.2.2 液相色谱分析测定

6.2.2.1 仪器的准备

开机，用流动相平衡色谱柱，待基线稳定后开始进样。

6.2.2.2 定性分析

依据保留时间一致性进行定性识别的方法。根据三聚氰胺标准物质的保留时间，确定样品中三聚氰胺的色谱峰（参见附录A）。必要时应采用其他方法进一步定性确证。

6.2.2.3 定量分析

校准方法为外标法。

6.2.2.3.1 校准曲线制作

根据检测需要，使用标准工作溶液（4.6.3）分别进样，以标准工作溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线。

6.2.2.3.2 试样测定

使用试样（6.1）分别进样，获得目标峰面积。根据校准曲线计算被测试样中三聚氰胺的含量（mg/kg）。试样中待测三聚氰胺的响应值均应在方法线性范围内。

注：当试样中三聚氰胺的响应值超出方法的线性范围的上限时，可减少称样量再进行提取与测定。

6.2.3 结果计算

6.2.3.1 计算公式

结果按式（1）计算：

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1000}{1000} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——原料乳中三聚氰胺的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c ——从校准曲线得到的三聚氰胺溶液的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V ——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——样品称量质量，单位为克（g）。

6.2.3.2 计算结果有效数字

通常情况下计算结果保留3位有效数字；结果在0.1~1.0 mg/kg时，保留2位有效数字；结果小于0.1 mg/kg时，保留1位有效数字。

6.3 平行试验

按以上步骤，对同一样品进行平行试验测定。

6.4 空白试验

除不称取样品外，均按上述步骤同时完成空白试验。

6.5 方法检测限

本方法的检测限为0.05 mg/kg。

6.6 回收率

在添加浓度0.30 mg/kg~100.0 mg/kg范围内，回收率在93.0%~103%之间，相对标准偏差小于10%。

7 精密度

本标准精密度数据按照GB/T 6379.1和GB/T 6379.2规定确定，其重复性和再现性值以95%的置信度计算。

7.1 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测量结果的绝对差值不超过重复性限 r ，样品中三聚氰胺含量范围及重复性方程见表3。

如果两次测定值的差值超过重复性限 r ，应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

7.2 再现性

在再现性的条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ，样品中三聚氰胺的含量范围及再现性方程见表3。

表3 三聚氰胺含量范围及重复性和再现性方程

成分	含量范围 (mg/kg)	重复性限 (r)	再现性限 (R)
三聚氰胺	0.3~100.0	$\lg r = -1.260 + 0.9286 \lg m$	$\lg R = -0.7044 + 0.7744 \lg m$
注: m 表示两次测定结果的算术平均值, 单位为mg/kg。			

7.3 重复性与再现性参考值

表4列出了 m 在不同范围时的 r 与 R 值, 供参考。

表4 m 在不同范围时的 r 与 R 值

m (mg/kg)	0.30~0.40	0.40~0.50	0.50~1.00	1.00~2.00	2.00~2.50	2.50~10.0
r	0.02	0.02	0.03	0.05	0.10	0.13
R	0.08	0.10	0.12	0.20	0.34	0.40
m (mg/kg)	10.0~20.0	20.0~40.0	40.0~60.0	60.0~80.0	80.0~100.0	
r	0.47	0.89	1.69	2.46	3.22	
R	1.17	2.01	3.44	4.71	5.88	

8 试验报告

试验报告应包括以下内容:

- 鉴别样品、实验室和分析日期等资料;
- 遵守本标准规定的程度;
- 分析结果及其表示;
- 测定中观察到的异常现象;
- 对分析结果可能有影响而本部分未包括的操作或者任选的操作。

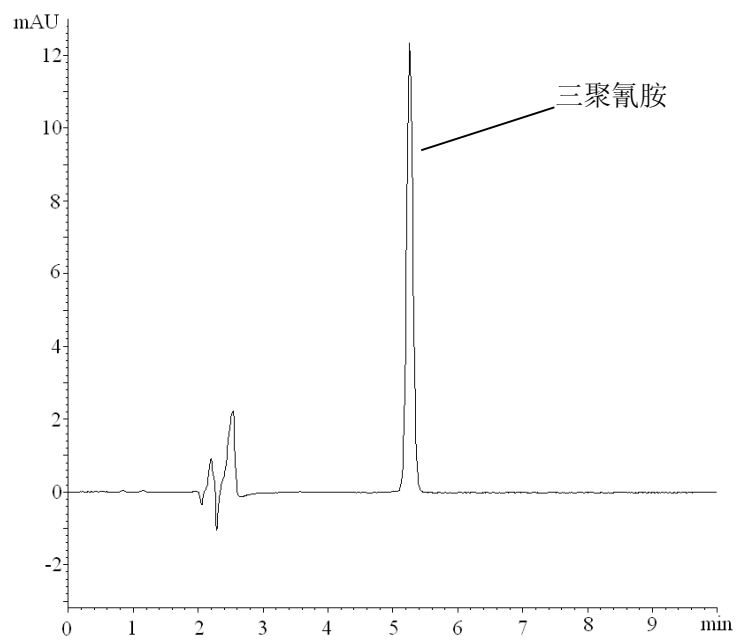
9 质量保证

- 操作人员应按照国家相关规定, 并具备从事相应实验技术的能力;
- 仪器及相关计量器具应通过检定或校准, 并在有效使用期内;
- 宜采用有证标准物质, 若采用自配标样, 应使用有证标准物质对自配标样进行验证;
- 原料乳样采集和保存应严格执行本标准和国家相关规定, 实施全过程质量保证。

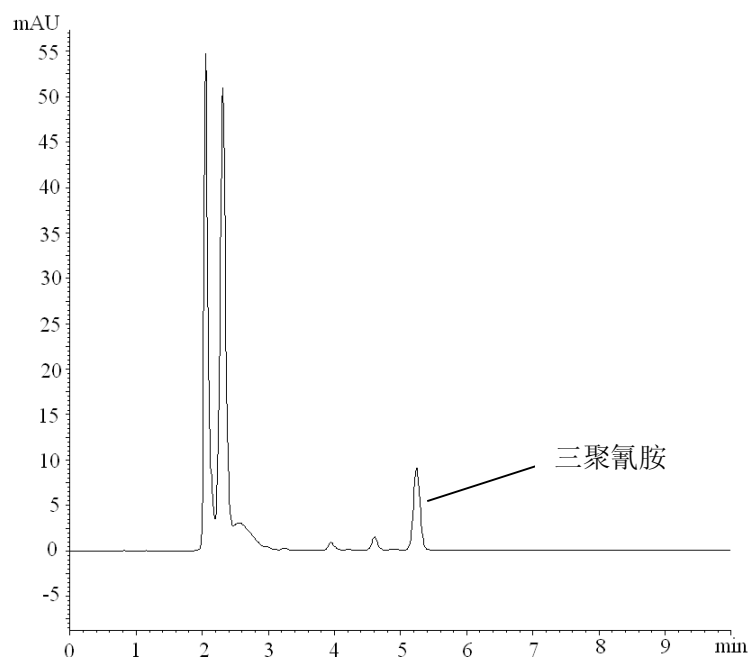
10 注意事项

- 如果保留时间或柱压发生明显的变化, 应检测离子交换色谱柱的柱效以保证检测结果的可靠性;
- 使用不同的离子交换色谱柱, 其保留时间有较大的差异, 应对色谱条件进行优化;
- 强阳离子交换色谱的流动相为酸性体系, 每天结束实验时应以中性流动相冲洗仪器系统进行维护保养。

附录 A
(资料性附录)
三聚氰胺参考色谱图



图A.1 三聚氰胺标准样品色谱图 (浓度5.00 mg/kg)



图A.2 原料乳中添加三聚氰胺的色谱图 (浓度4.00 mg/kg)