



三聚氰胺分析手册

前言	1
三聚氰胺分析方法包组件清单	3
三聚氰胺固相萃取 (SPE) 方法.....	4
三聚氰胺含量测定 LC-UV 方法.....	6
三聚氰胺含量测定 LC-MS 参考方法.....	8

前 言

事件简介：

三聚氰胺常用于制造三聚氰胺树脂，是建筑业中常用的防火材料，本来与食品、饲料行业毫不相干，但是发生在美国的数起饲料致死宠物的事件和近期国内婴儿奶粉受三聚氰胺污染导致婴儿肾结石事件，使两者联系在一起。

07年3月份，据不完全统计，北美地区仅美国因食用有毒饲料而暴毙的宠物就有上万只，相关投诉不计其数，美国食品药品监督管理局调查显示，在回收的宠物食品、死亡动物的尿液结晶和肾脏细胞中都发现有三聚氰胺，研究人员还发现，回收宠物食品所用的小麦谷蛋白添加物中有较高浓度的三聚氰胺存在，于是美国大量召回被三聚氰胺污染的宠物饲料。

经过调查，发现这些进口自中国的饲料含有三聚氰胺，对此，美国食品药品监督管理局（FDA）要求中国厂商提供三聚氰胺的检测报告。尽管国内尚无动物中毒死亡或产生不良反应的报道，对于三聚氰胺的毒性也有些争议，但三聚氰胺不是饲料原料，也不是国家允许使用的饲料添加物。

2008年9月，中国人民解放军第一医院接收了14名婴儿，均患有“双肾多发性结石”和“输尿管结石”病症。他们有许多相同点：来自甘肃农村，均不满周岁，都长期食用过三鹿牌婴幼儿奶粉。随后，患病婴儿食用的三鹿婴幼儿奶粉中发现部分批次婴幼儿奶粉受三聚氰胺污染，随即召回；同时有关部门立即派专家紧急处理。

某些不法厂商添加三聚氰胺主要是利用三聚氰胺的高含氮量来增加产品的表观蛋白质含量。致使不仅是饲料生产商，其它的食品工厂也要求进行三聚氰胺的检测以保证他们产品的安全。所以对饲料生产商、奶制品厂家、水产品企业、肉制品企业和食品生产工厂（除农产品外）都有要进行三聚氰胺检测的要求，从而掀起三聚氰胺检测方法的开发热潮。

三聚氰胺理化性质:

三聚氰胺: 英文名“melamine”, 简称三胺, 学名三氨三嗪, 别名蜜胺、氰尿酸胺、三聚酰胺

分子式: $C_3N_6H_6$ 、 $C_3N_3(NH_2)_3$

分子量: 126.12

物理性能: 白色结晶粉末, 无毒, 无味

相对密度: 1570kg/m^3

熔点: 在常压下, 354°C 分解

升华温度: 300°C

溶解性: 能溶于甲醇、甲醛、乙酸、热乙二醇、甘油、吡啶; 微溶于水、乙醇; 不溶于乙醚、苯和四氯化碳, 水溶液呈弱碱性

化学性能: 三聚氰胺是一种重要的氮杂环有机化工原料, 显弱碱性, 能够与各种酸反应生成三聚氰胺盐; 在强酸或强碱液中, 三聚氰胺发生水解, 胺基逐步被羟基取代, 生成三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸; 三聚氰胺与醛类反应生成加成化合物; 三聚氰胺与甲醛反应制成树脂, 三聚氰胺树脂是一种多种用途的材料, 防火耐热且有很高的稳定性, 用于生产塑料、地板砖, 厨房用具, 防火纤维, 商业滤膜, 胶水和阻燃剂。

三聚氰胺分析方法包组件清单

包括:

- 1、Venusil ASB-C18 或 ASB-C8 分析色谱柱 (4.6*250mm, 5 μ m,150Å) 1 支
- 2、混合型的阳离子交换柱(PCX, 60mg/3mL)1 包
- 3、三聚氰胺标准品 1 瓶 (500mg, \geq 99.5%)
- 4、庚烷磺酸钠(10g/瓶或25g/瓶) 1瓶
- 5、三聚氰胺分析方法手册 1 份

固相萃取(SPE)方法

1 固相萃取(SPE)柱的选择:

三聚氰胺呈弱碱性(弱阳离子化合物), 净化过程一般选择阳离子交换柱。混合型的阳离子交换柱(PCX)通过将磺酸基团($-\text{SO}_3\text{H}$)键合在极性高聚物聚苯乙烯/二乙烯苯 (PEP) 吸附剂上, 具有阳离子和反相两种吸附机理, 并具有以下优点:

1) 可通过两种不同溶液的洗涤(水/一定 pH 值的缓冲溶液和有机溶剂), 使样品更干净, 提高检测的灵敏度。

2) 批次重复性好。

3) 回收率高, 重现性好, 即使小柱跑干也可以得到较高回收率。

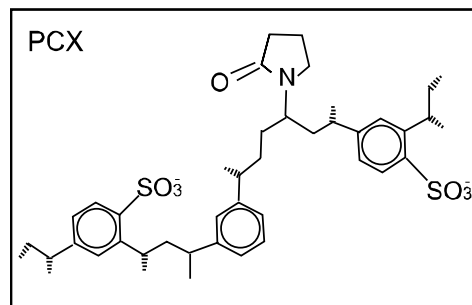


图 1 PCX 结构式

2 样品前处理步骤:

2.1 标准样品配制:

取 50mg 三聚氰胺标准品, 以 20% 甲醇溶解定容至 50mL 得到 1000ppm 的标准溶液, 使用时, 以提取液(0.1%三氯乙酸)稀释至所要的浓度。

2.2 提取:

称取饲料/奶粉样品 5g (或牛奶 10ml), 加入 50ml 0.1%三氯乙酸提取液, 充分混匀, 加入 2mL 2%乙酸铅溶液, 超声 20min。然后取部分溶液转移至 10mL 离心管中, 8000rpm/min 离心 10min, 取上清液 3mL 过混合型阳离子交换小柱

(PCX)。

2.3 净化(PCX 小柱, 60mg/3mL) :

- 1) 活化及平衡: 3mL 甲醇, 3mL 水
- 2) 上样: 加入提取液 3mL
- 3) 淋洗: 3mL 水; 3mL 甲醇; 弃去淋洗液并将小柱抽干。
- 4) 洗脱: 5mL 5%氨化甲醇(v/v)洗脱。(5%氨化甲醇的配制: 5mL 氨水+95mL 甲醇)。
- 5) 浓缩: 50℃, 氮气吹干, 20%甲醇/水定容至 2mL。

2.4 检测:

用 HPLC-UV 中国农业部颁标准检测方法分析, 测得 PCX 柱的回收率结果如下:

添加水平 (mg/L)	回收率
空白	
0.01	116%
0.1	108%
0.5	92%
2	96%

由上表可以看出: 用 PCX 柱净化样品, 可以得到满意的回收率。

HPLC-UV 检测方法

三聚氰胺在传统的 C18 柱上保留很差，需要用离子对试剂色谱方法才能有好的保留与分离，按照美国食品药品监督管理局（FDA）的三聚氰胺检测方法和中国农业部颁布的三聚氰胺检测方法，采用 ASB 系列亲水色谱柱，均能得到良好的结果，分析色谱图如下：

1、三聚氰胺的 FDA 检测方法

色谱柱：Venusil ASB C8 4.6×250mm

缓冲液：10mM 柠檬酸，10mM 庚烷磺酸钠，调 pH 为 3.0。

流动相：缓冲液：乙腈=85：15

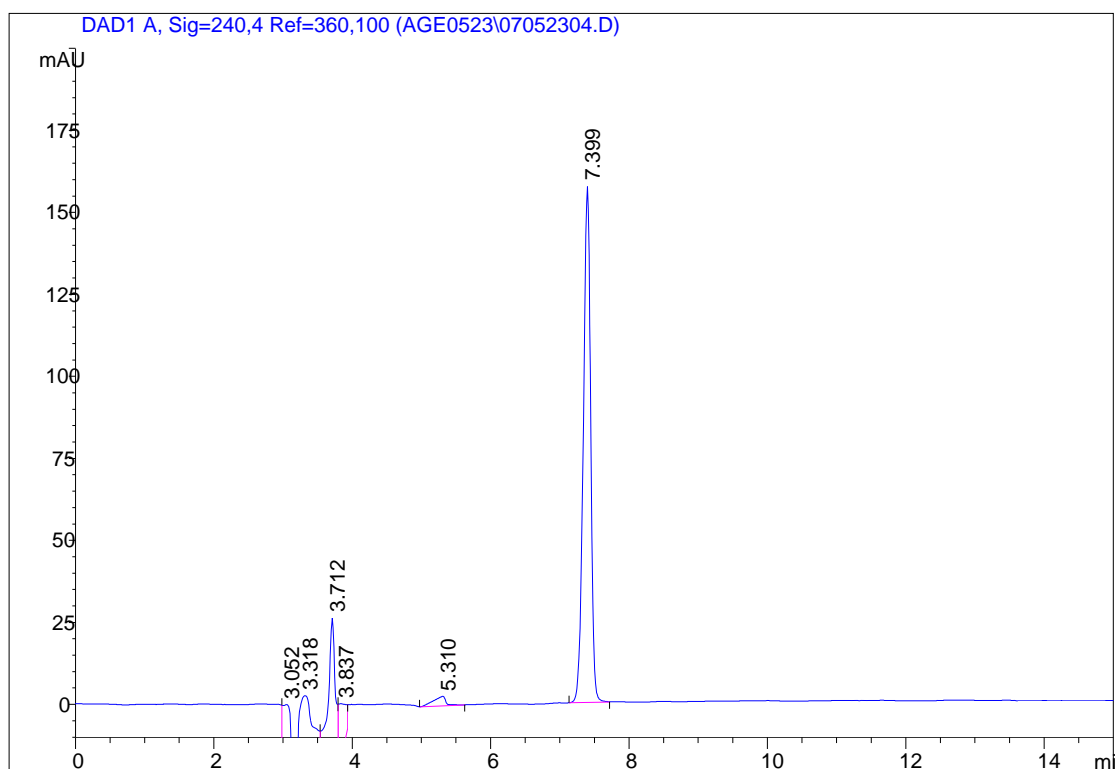
进样量：样品用缓冲液溶解成约0.1mg/mL，进10uL

流 速：1.0mL/min

柱 温：40℃

波 长：240nm

色谱图：



2、三聚氰胺的中国农业部颁标准检测方法

色谱柱: Venusil ASB-C18 4.6×250mm

缓冲液: 10mM 柠檬酸, 10mM 庚烷磺酸钠

流动相: 缓冲溶液:乙腈=85:15

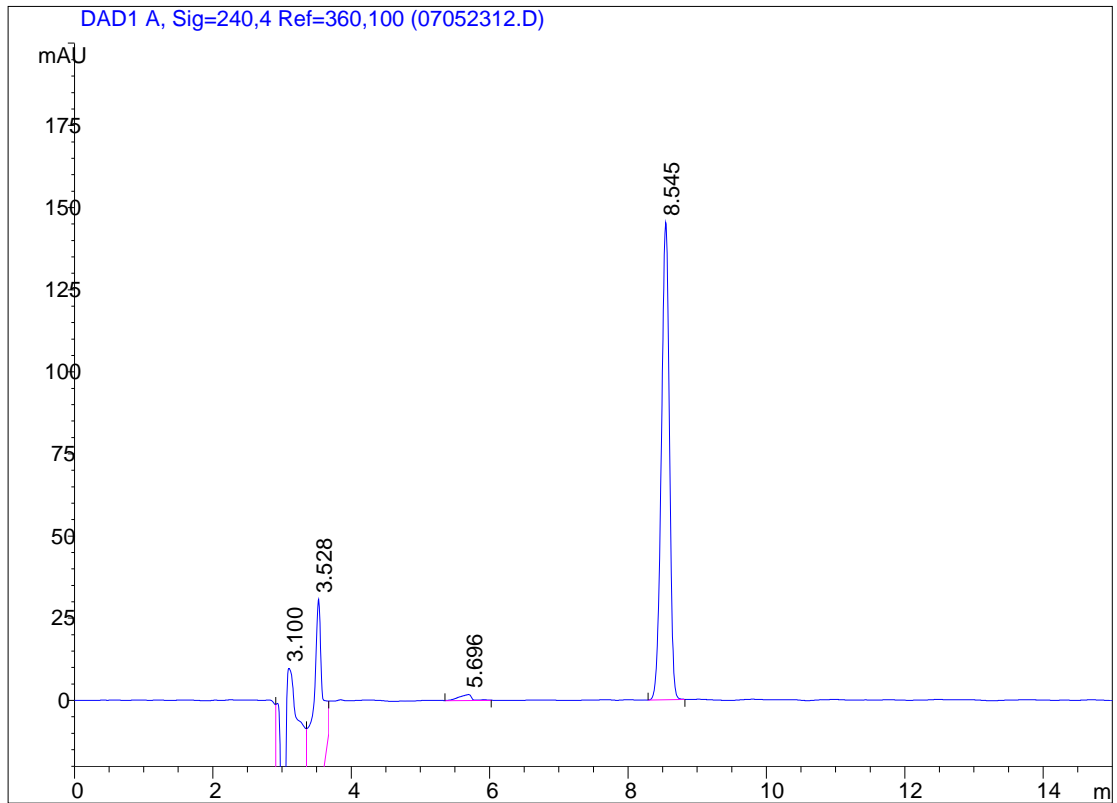
进样量: 样品用缓冲液溶解成约0.1mg/mL, 进10uL

流 速: 1.0mL/min

柱 温: 40℃

波 长: 240nm

色谱图:



三聚氰胺 LC-MS 参考方法

由于 HPLC-UV 方法中，流动相添加了离子对试剂，限制了液质联用方法的使用；但不用离子对试剂色谱方法，三聚氰胺在传统的 C18 柱上保留很差，没有良好的保留与分离。

源于此问题，采用ASB系列亲水色谱柱，不用离子对试剂也能得到有效的保留与分离，参考方法如下：

缓冲液：10mM NH₄AC

流动相：缓冲液：ACN=95：5

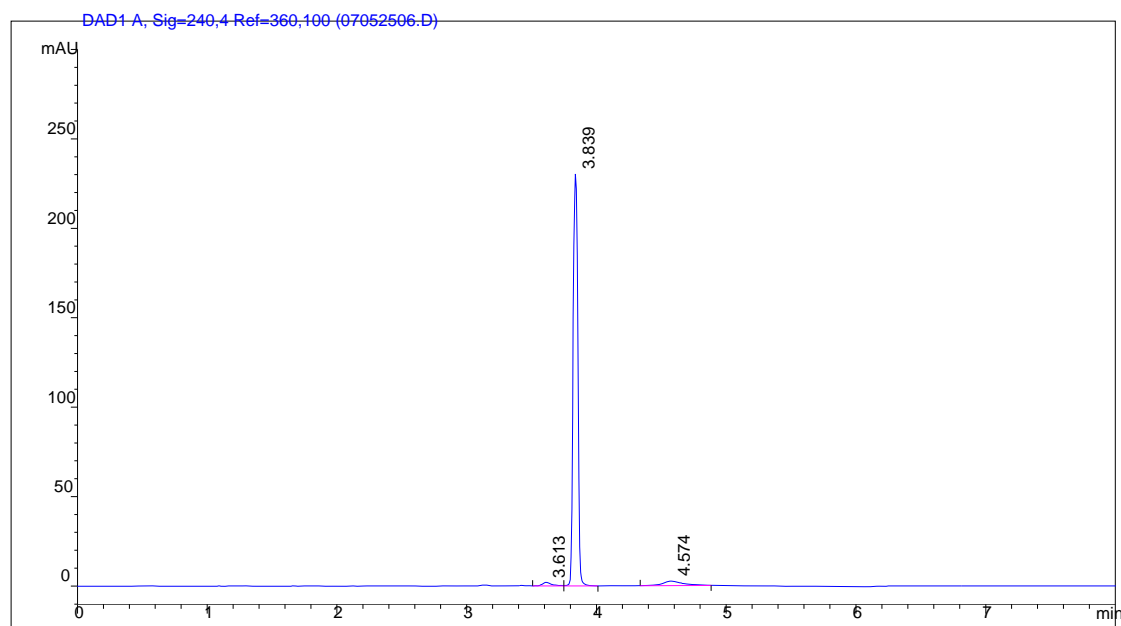
流 速：1.0mL/min

进样量：先用70%ACN溶解成约1mg/mL，用ACN稀释成0.1mg/mL，进10uL

柱 温：40℃

波 长：240nm

用ASB-C8 4.6×250mm色谱柱做的图谱(Rt=3.839min; TF(5%)=1.00):



用 ASB-C18 4.6×250mm 色谱柱做的图谱(Rt=3.651min; TF(5%)=1.05):

