

# 三聚氰胺检测技术研究进展

阳丽芝, 陈志伟\*

(山东理工大学 生命科学学院, 山东淄博 255049)

**摘要** 三聚氰胺是一种用途广泛的化工原料, 若被人或动物长期摄入会造成生殖、泌尿系统的损害, 尤其会对婴幼儿的身体造成严重伤害。本文介绍了三聚氰胺的性质, 重点论述了高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱法等三聚氰胺检测技术的研究进展。

**关键词** 三聚氰胺; 性质; 检测方法

三聚氰胺 (Melamine), 分子式  $C_3N_6H_6$ , 分子量 126.12, 又可叫 2,4,6-三氨基-1,3,5-三嗪、蜜胺、三聚氰酰胺、氰脲三酰胺。三聚氰胺最早由李比希 (Liebig) 于 1834 年合成, 主要作为生产三聚氰胺甲醛树脂 (MF) 的原料, 该树脂广泛运用于木材、塑料、涂料、造纸、纺织、皮革、电气、医药等行业<sup>[1]</sup>。同时还可用作阻燃剂、减水剂、甲醛清洁剂等。人和动物长期摄入三聚氰胺, 会造成生殖、泌尿系统的损害。其较强的黏性, 可吸附形成结石的草酸、鞣酸及钙等物质沉积于泌尿系统, 形成肾、输尿管和膀胱结石, 还可诱发膀胱癌<sup>[2]</sup>。

2007 年 3 月, 美国相继发生多起猫狗宠物非正常死亡事件, 美国食物及药物管理局 (FDA) 经过调查后确认是宠物食品原料受三聚氰胺污染造成的, 由此国内外开始对食品中三聚氰胺污染产生了高度关注<sup>[3]</sup>。2008 年 9 月, 中国爆发了含三聚氰胺的婴幼儿问题奶粉事件, 导致食用受污染奶粉的婴幼儿患肾结石。国家质检总局在全国开展婴幼儿奶粉三聚氰胺含量专项检查, 对 109 家乳品企业的 491 批次产品进行了排查, 检查结果显示有 22 家婴幼儿奶粉生产企业的 69 批次产品检出了含量不同的三聚氰胺<sup>[4]</sup>。2008 年 10 月, 韩国当局在乐天企业生产的饼干, 玛氏和雀巢企业生产的部分巧克力都检出了三聚氰胺<sup>[5]</sup>。2008 年 11 月, 香港检测出新鲜鸡蛋中含大量三聚氰胺<sup>[6]</sup>。

## 1 三聚氰胺简介

### 1.1 三聚氰胺的性质

三聚氰胺性状为纯白色单斜晶体, 密度  $1.573g/cm^3$  (16), 常温下较稳定, 但在高温下可能会分解释

放出氰化物, 快速加热至 300 升华。三聚氰胺溶于热水, 微溶于冷水, 极微溶于热乙醇, 不溶于醚、苯和四氯化碳, 可溶于甲醇、甲醛、乙酸、热乙二醇、甘油、吡啶等<sup>[7]</sup>。它呈弱碱性 ( $pK_b=8$ ), 与盐酸、硫酸、硝酸、乙酸、草酸等都能形成三聚氰胺盐。在中性或弱碱性条件下, 与甲醛缩合而成各种羟甲基三聚氰胺, 在弱酸性中 ( $pH$  值 5.5-6.5) 与羟甲基的衍生物进行缩聚反应而生成树脂产物。遇强酸或强碱水溶液水解, 胺基逐步被羟基取代, 先生成三聚氰酸二酰胺, 进一步水解生成三聚氰酸一酰胺, 最后生成三聚氰酸<sup>[8]</sup>。

目前三聚氰胺被认为毒性轻微, 大鼠口服的半数致死量大于  $3g/kg$  体重。三聚氰胺在婴儿体内最大耐受量为  $15mg/kg$  奶粉<sup>[9]</sup>。根据 (FDA) 的标准, 三聚氰胺每日可容忍摄入量为  $0.63mg/kg$  体重。

### 1.2 三聚氰胺的合成

#### 1.2.1 双氰胺法<sup>[10]</sup>

早期合成三聚氰胺使用双氰胺法: 由电石 ( $CaC_2$ ) 制备氰胺化钙 ( $CaCN_2$ ), 氰胺化钙水解后二聚生成双氰胺, 再加热分解制备三聚氰胺。

#### 1.2.2 尿素法<sup>[11]</sup>

与双氰胺法相比, 尿素法成本低, 目前大都采用此法。尿素以氨气为载体, 硅胶为催化剂, 在 380~400 温度下沸腾反应, 先分解生成氰酸, 并进一步缩合生成三聚氰胺。反应方程式为:  $6CO(NH_2)_2 + 6NH_3 + 3CO_2$  生成的三聚氰胺气体经冷却捕集后得粗品, 然后经溶解, 除去杂质, 重结晶得成品。尿素法生产三聚氰胺每吨产品消耗尿素约 3800kg、液

作者简介: 阳丽芝 (1986-), 硕士研究生。E-mail: yanglizhi666@163.com

通讯作者: 陈志伟, Tel 0533-2786781, E-mail: 12chen@163.com

课题来源: 山东省科学仪器设备技术攻关项目 (2008GG2TC01011-5), 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (2007BS06021)。

氨 500kg。按照反应条件不同,三聚氰胺合成工艺又可分为高压法(7MPa~10MPa, 370 ~450 ,液相)、低压法(0.5MPa~1MPa, 380 ~440 ,液相)和常压法(<0.3MPa, 390 ,气相)三类。

国外三聚氰胺生产工艺大多以技术开发公司命名,如德国巴斯夫(BASF Process)、奥地利林茨化学法(Chemical Linz Process)、鲁奇法(Lurgi Process)、美国联合信号化学公司化学法(Allied Signal Chemical)、日本新日产法(Nissan Process)、荷兰斯塔米卡邦法(既DSM法)等。这些生产工艺按合成压力不同,可基本划分为高压法、低压法和常压法三种工艺。目前世界上技术先进、竞争力较强的主要有日本新日产 Nissan 法和意大利 Allied-Eurotechnica 的高压法,荷兰 DSM 低压法和德国 BASF 的常压法<sup>[12,13]</sup>。我国三聚氰胺生产企业多采用半干式常压法工艺,该方法是以前尿素为原料 0.1MPa 以下,390 左右时,以硅胶做催化剂合成三聚氰胺,并使三聚氰胺在凝华器中结晶,粗品经溶解、过滤、结晶后制成成品。

## 2 食品中三聚氰胺的来源

一般认为,三聚氰胺不可能通过环境污染的方式进入食品原料中。但是三聚氰胺作为塑料制品生产的添加剂,可能会由包装材料游离进入食品。有研究报告,咖啡、果汁、发酵奶、柠檬汁中三聚氰胺的含量分别为 0.45、0.72、1.42、2.2 (mg/kg)<sup>[14]</sup>。另外,研究表明莴苣、芹菜、番茄、土豆、蘑菇等农产品中,也发现有残留的三聚氰胺,且蘑菇中残留量甚至高达 17mg/kg<sup>[15]</sup>。

三聚氰胺被人为添加的主要原因是,三聚氰胺含氮量高达 66% 左右,每 100g 牛奶中添加 0.1g 三聚氰胺,就能提高 0.4% 粗蛋白质。乳制品中存在高剂量的三聚氰胺主要是由于人为添加导致的,一种原因是奶源管理不善,不法分子向原料奶中直接添加,另一种原因是在乳制品制造过程中添加三聚氰胺。

## 3 三聚氰胺的检测方法

### 3.1 工业方面的检测方法

在工业上测定较高含量的三聚氰胺通常采用苦味酸法和升华法<sup>[10]</sup>。

#### 3.1.1 苦味酸法<sup>[16]</sup>

苦味酸法是国标 GB/T9567-1997《工业三聚氰胺》<sup>[16]</sup>中规定的检测方法。将水加入试样,加热溶解后,加入苦味酸溶液,称量所生成的苦味酸三聚

氰胺沉淀的质量,即测得三聚氰胺纯度含量。称试样 1g(精确至 0.0002g),置于 500mL 锥形瓶中,同时加入 400mL 水,加热溶解;冷却后,加入酚酞指示液 3 滴,若显色,加入硫酸溶液,直至溶液颜色消失,若有不溶物,需过滤,水洗;把滤液和洗液合并,移入 500mL 容量瓶中,加水至刻度,仔细振摇混合后,准确吸取 100mL 置于 500mL 烧杯里;将此溶液加热至 80 ,另加入已加热至 80 的 100mL 苦味酸溶液,冷却至室温后,保持在 15 以下约 8h;用已恒重的玻砂过滤器过滤,之后,先用约 100mL 苦味酸三聚氰胺的饱和溶液洗涤,再用 10mL 水洗;在 100-105 下经 2h 烘干玻砂过滤器,置于干燥器中冷却后,称量(精确至 0.0002g)求得沉淀物质量。

#### 3.1.2 升华法<sup>[17]</sup>

在升华装置中将试样在负压下进行加热,让三聚氰胺完全升华后,称其残渣量,即测得三聚氰胺纯度。称取试样,置于预先干燥了的且已知质量的试样容器里;将试样容器置入减压升华装置内,待完全密闭后,开启真空装置缓缓吸引,并调节装置内的温度,经 2 小时升华结束;取出试样容器,冷至室温后,称量试样容器的质量。

#### 3.1.3 电位滴定法

袁立勇等<sup>[18]</sup>利用电位滴定法测定溶液中三聚氰胺的含量。硫酸溶液和三聚氰胺反应生成弱酸性化合物。以 pH3 为终点指示,通过硫酸溶液的消耗体积计算三聚氰胺的含量。相对标准偏差不大于 0.50%。

## 3.2 食品中的检测方法

2007 年 06 月 14 日,农行行业标准 NY/T1372-2007《饲料中三聚氰胺的检测》<sup>[19]</sup>中规定测定饲料中三聚氰胺的含量方法为高效液相色谱(HPLC)和气相色谱质谱联用法(GC-MS)。2008 年 10 月 07 日,国家标准 GB/T22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》<sup>[20]</sup>中规定原料乳、乳制品以及含乳制品中三聚氰胺检测方法为高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS)和气相色谱-质谱联用法[包括气相色谱-质谱法(GC-MS),气相色谱-质谱/质谱法(GC-MS/MS)]。2008 年 10 月 15 日,国家标准 GB/T22400-2008《原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法》<sup>[21]</sup>中规定了液相色谱法作为快速检测原料乳及不含添加物的液态乳制品中三聚氰胺的方法。目前,三聚氰胺的检测方法还包括试剂盒检测法(ELISA)、离子交换色谱-紫外检测法等。

### 3.2.1 高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[19]</sup>

试样中的三聚氰胺用三氯乙酸溶液提取, 提取液离心后经混合型阳离子交换固相萃取柱净化, 洗脱物吹干后用甲醇溶液溶解, 用高效液相色谱仪进行测定。在添加浓度 2mg/kg ~ 10mg/kg 浓度范围内, 回收率在 80% ~ 110% 之间, 相对标准偏差小于 10%。

称取 5g 试样, 准确加入 50ml 10g/L 三氯乙酸溶液, 加入 2ml 22g/L 乙酸铅溶液。摇匀, 超声提取 20min。静止 2min, 取上层提取液约 30ml 转入离心管。在 10000r/min 离心机上离心 5min。分别用 3ml 甲醇, 3ml 水活化混合型阳离子交换固相萃取柱, 准确移取 10ml 离心液分次上柱, 控制过柱速度在 1ml/min 以内。再用 3ml 水和 3ml 甲醇洗涤混合型阳离子交换固相萃取柱, 抽干后用氨水甲醇 3ml 洗脱。洗脱液 50 °C 氮气吹干, 准确加入甲醇溶液, 涡旋震荡 1min, 过 0.45 μm 滤膜, 上机测定。

### 3.2.2 气相色谱-质谱联用法 (GC-MS 和 GC-MS/MS)<sup>[20]</sup>

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。其中 GC-MS 法在添加浓度 0.05mg/kg ~ 2mg/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 0.005mg/kg ~ 1mg/kg 浓度范围内, 回收率在 90% ~ 105% 之间, 相对标准偏差小于 10%。

GC-MS 法, 称取 1g (精确至 0.01g) 试样于 50mL 具塞塑料离心管中, 加入 25mL 1% 三氯甲烷振荡 30s, 再加入 15mL 三氯乙酸溶液, 超声提取 15min, 加入 2mL 乙酸铅溶液, 用三氯乙酸溶液定容至刻度。充分混匀后, 转移上层提取液约 30mL 至 50mL 离心试管, 以不低于 4000r/min 离心 10min。上清液待净化。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。准确移取 5mL 的待净化滤液至固相萃取柱中。再用 3mL 水、3mL 甲醇淋洗, 弃淋洗液, 抽近干后用 3mL 5% 氨化甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液, 50 °C 氮气吹干。

GC-MS/MS 法, 称取 0.5g (精确至 0.01g) 试样, 加入 5mL 甲醇水溶液, 涡旋混匀 2min 后, 超声提取 15min-20min, 以不低于 4000r/min 离心 10min, 取上清液 200 μL 用微孔滤膜过滤, 50 °C 氮气吹干。

取氮气吹干残留物, 加入 600 μL 的吡啶和

200 μL 衍生化试剂, 混匀, 70 °C 反应 30min 后, 供 GC-MS 或 GC-MS/MS 法定量检测或确证。

### 3.2.3 液相色谱-质谱/质谱法 (LC-MS/MS)<sup>[20]</sup>

试样用三氯乙酸溶液提取, 经阳离子交换固相萃取柱净化后, 用液相色谱-质谱/质谱法测定和确证, 外标法定量。在添加浓度 0.01mg/kg ~ 0.5mg/kg 浓度范围内, 回收率在 80% ~ 110% 之间, 相对标准偏差小于 10%。

称取 1g (精确至 0.01g) 试样于 50mL 具塞塑料离心管中, 加入 8mL 1% 三氯乙酸溶液和 2mL 乙腈, 超声提取 10min, 再振荡提取 10min 后, 以不低于 4000r/min 离心 10min。上清液经三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤后, 做待净化液。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。

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

### 3.2.4 试剂盒检测法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay ELISA)<sup>[22]</sup>

试剂盒检测法即为酶联免疫吸附剂测定, 是利用萃取液通过均质及震荡的方式提取样品中的三聚氰胺进行免疫测定的一种方法。

将三聚氰胺 HRP 酶标记物、标样及样品提取液加入包被三聚氰胺抗体的试验孔中孵育在 30min 的孵育过程中, 样品中的三聚氰胺与 HRP 酶标记物竞争结合三聚氰胺抗体。孵育完后, 倾去孔内液体洗涤除去未结合的三聚氰胺和 HRP 酶标记物。每孔加入清澈的底物溶液, 结合的酶标记物将无色的底物转化为蓝色的物质。孵育 30min 后终止反应, 用酶标仪读取 450nm 下各孔的 OD 值。比较未知样品的 OD 值与标样的 OD 值, 就可计算出样品中的三聚氰胺浓度, 最低可检测到 10ppb 以下的三聚氰胺残留, 检测过程约需 65min。

### 3.2.5 离子交换色谱-紫外检测法

何强<sup>[23]</sup>建立离子交换色谱-紫外检测法测定乳制品中三聚氰胺。样品用水和乙腈提取, 分析时用 LC-SCX 离子交换色谱柱分离, 浓度为 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH3.0) - 乙腈 (70 : 30) 为流动相, 在紫外波长 240nm 处检测。三聚氰胺为 0.5mg/L-100.0mg/L 时, 质量浓度与色谱峰面积呈良好的线性关系

( $r=0.9999$ ), 最低检出限为 1.0mg/kg, 加标回收率为 93.8%~102.5%, RSD<3.5%。

### 3.3 其他检测法<sup>[24]</sup>

利用抗原与抗体相互识别的原理, 制作出能识别三聚氰胺的抗体试纸, 将试纸插入稀释的奶制品中, 则可检测出其中是否含有三聚氰胺。使用膜分离技术萃取样品溶液, 然后采用紫外可见光度法或化学检验的方法检测样品中三聚氰胺的含量。

## 4 结束语

三聚氰胺事件不仅损害了广大消费者的利益, 而且还威胁了人们的身体健康, 使广大消费者对多数食品产生了畏惧感。建议对于有蛋白质含量要求的产品, 增加三聚氰胺检测项目, 以保证食品和饲料的食用安全。本文总结了三聚氰胺的多种检测方法, 现在使用最多的检测技术有高效液相色谱法、气相质谱联用法、液相质谱联用法等。三聚氰胺事件只是食品和饲料掺假的一个方面, 在其他方面也可能出现类似的掺假现象, 如乳制品中抗生素、脂肪以及最近出现的皮革蛋白粉的掺假等。对此则要求在质量检测方面能得到更进一步的完善和提高, 研究出各种便捷和高效的检测方法, 例如制作传感芯片检测牛奶中抗生素残留物等。

## 参考文献

- [1] 谢荣国, 武晓宏, 杨俊华. 饲料中三聚氰胺检测及其危害[J]. 饲料广角, 2008,(9):20-22
- [2] 三聚氰胺是何物[J]. 山西农业, 2008,(28):55
- [3] 冯家望, 余以刚, 欧阳颖瑜等. 食品中三聚氰胺的检测技术现状与展望[J]. 现代食品科技, 2008,24(10):1048-1050
- [4] 陈江萍. 食品中三聚氰胺的危害及其检测方法[J]. 中国农村小康科技, 2008(11):68-72
- [5] 雀巢玛氏多种含乳产品在韩国检出三聚氰胺[J]. 饮料工业, 2008,11(10):45
- [6] 齐广海. 三聚氰胺鸡蛋事件的影响[J]. 饲料与畜牧, 2008(11):1
- [7] 三聚氰胺相关知识[J]. 饲料工业, 2008,(19):9
- [8] 王世朋. 三聚氰胺的制造、应用及其在验乳制品中的检验分析[J]. 金卡工程, 2008,(9):146
- [9] 什么是三聚氰胺[J]. 中国乳业, 2008,(9):10
- [10] 李姝萍. 浅谈三聚氰胺的生产与应用[J]. 山西化工. 2008,28(5):52-53
- [11] N. A. 德维特, R.K. 古尔佩斯. 由脲制备三聚氰胺的方法. 荷兰:01802394.0 [P]. 2004.07.21
- [12] 黄洋俊. 三聚氰胺产需现状与发展[J]. 辽宁化工, 2001(6):311-315
- [13] 刘政, 刘军, 曾世琼等. 三聚氰胺生产现状及发展趋势[J]. 川化, 2005(3):1-4
- [14] 朱宏. 三聚氰胺可能从包材中进入食品[J]. 中国乳品工业, 2008,36(10):51
- [15] 三聚氰胺风波向蔬菜蘑菇蔓延[J]. 浙江食用菌, 2008,16(6):2
- [16] GB/T9567-1997, 工业三聚氰胺[S]. 1997.6.26
- [17] 孙秀兰. 果蔬变温贮藏控制冷害研究进展[J]. 北方园艺, 2006,(6):31-33
- [18] 袁立勇, 马朝卫, 杜亚辉. 溶液中三聚氰胺含量的快速测定[J]. 河南化工, 2004(4):42
- [19] NY/T1372-2007, 饲料中三聚氰胺的测定[S]. 2007:1-6
- [20] GB/T22388-2008, 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S]. 2008:1-12
- [21] GB/T22400-2008, 原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法[S]. 2008:1-7
- [22] 邵伟, 仇敏, 吴炜. 食品或饲料中三聚氰胺的危害、检测方法及其启示[J]. 中国酿造, 2008,(23):92-94
- [23] 何强. 离子交换色谱-紫外检测法测定乳制品中三聚氰胺[J]. 中国乳品工业, 2008,36(6):55-57
- [24] 博士团队开发出三种三聚氰胺快速检测方法[J]. 发明与创新, 2008(11):32

## A Review on Detection Technology of Melamine

Lizhi Yang, Zhiwei Chen

(School of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo, PRC, 255049)

**Abstract** Melamine is a widely used chemical raw material, intaken long-term by humans or animals will damage their reproductive and urinary system, especially cause serious bodily injury of infants. This paper introduces the character of melamine, and describes the research progress of melamine detection, including High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Liquid Chromatography-mass spectrometry (LC/MS) and so on.

**Key words** Melamine; Character; Detection method