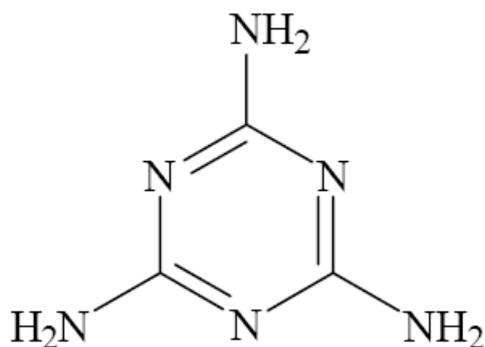


三聚氰胺检测方法汇编



注意: 所有待检样品和实验器皿避免接触塑料——它有可能滤过三聚氰胺，而且会造成污染，三聚氰胺粘性很强。一切重新使用的玻璃容器都需要用乙腈水溶液清洗过。

三聚氰胺，Melamine，CAS：108-78-1，C₃N₆H₆，分子量126.12，又称蜜胺。为白色结晶粉末，无毒，无味；在常压下，354℃分解；升华温度300℃；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。是一种重要的有机化工中间产品，主要用来制作三聚氰胺树脂，可用于装饰板的制作，用于氨基塑料、粘合剂、涂料、纺织助剂等。

目前三聚氰胺被认为毒性轻微，长期摄入会造成生殖、泌尿系统的损害，膀胱、肾结石，并可进一步诱发膀胱癌。为安全计，一般采用三聚氰胺制造的食具都会标明“不可放进微波炉使用”。2007年3月，美国发生多起猫、狗宠物中毒死亡事件，美国食品药品监督管理局调查认为宠物食品中含有的三聚氰胺是导致猫、狗中毒死亡的原因。

2007年6月，国家农业部颁布《饲料中三聚氰胺的测定》（NY-T 1372-2007）标准。同年，美国食品应急反应中心出台《猪肉和家禽产品中三聚氰胺LC/MS/MS快速筛选方法》（《LC/MS/MS Screen for the Presence of Melamine in swine and poultry tissues FERN-CHE.0003.00》）。

2008年9月，三聚氰胺再次成为国人的焦点，我们愿意把我们收集的资料与全国食品安全卫士分享。

饲料中三聚氰胺的测定

样品前处理：饲料样品用匀浆机捣碎，称取5.0g 试样(精确至0.01g)于150mL 具塞锥形瓶中，准确加入50mL1%乙酸溶液，加入2.0mL 乙酸铅溶液，摇匀，超声提取20min，静置2min，取上层液约30mL 于50mL 具塞离心管中，10 000r/min 离心5min。取上清液10mL，分次过预先经3mL 甲醇和3mL 水活化的Strata-X-C 柱¹，再用3mL 水和3mL 甲醇洗涤固相萃取柱，抽干后用3 mL 氨水甲醇溶液洗脱，50℃氮气吹干。准确加入2.0mL 甲醇溶液，旋涡振荡1min，过0.45 μ m 滤膜后上机测定。回收率> 80%

色谱柱:Luna C8(2) 5u 250x4.6mm

流动相：取2.02g庚烷磺酸钠于1L容量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，加乙酸调节pH=3.3，取该溶液850mL，加入150mL乙腈，混匀，过滤，脱气。

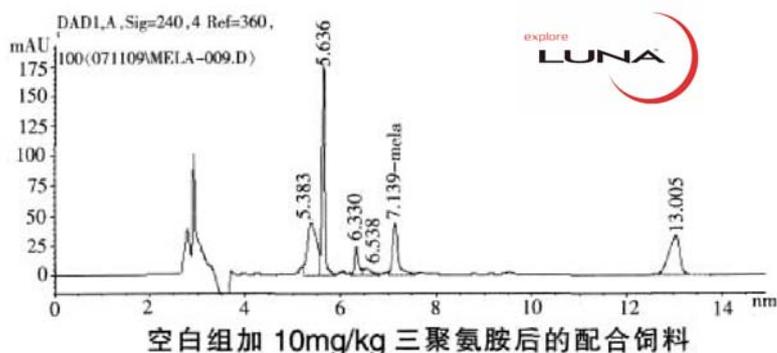
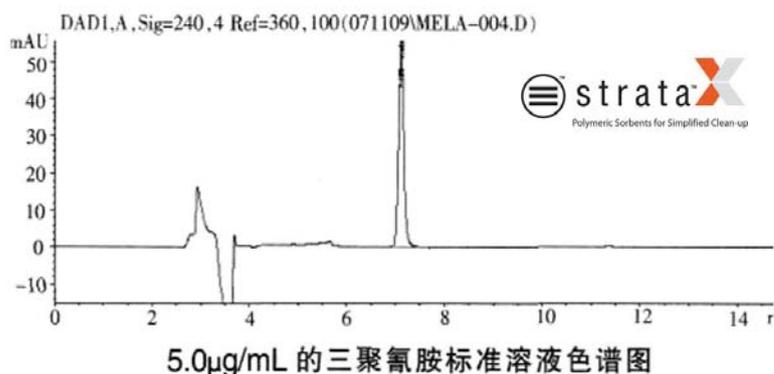
流速：1mL/min

柱温：30℃

检测波长：240nm

进样：20 μ l

线性范围：1.0 μ g - 50 μ g



注1：Strata X-C为混合型阳离子交换固相萃取柱

LC/MS/MS 快速测定三聚氰胺 (FERN-CHE.0003.00 摘录)

1. 仪器 :

HPLC - Waters Alliance 2695.

MS 检测器

固相萃取小柱 : Strata X-C, 60 mg, 3mL, Phenomenex

色谱柱 : Phenomenex Synergi™ Polar RP (150 x 4.6mm; 4 μm particle size)

2. 试剂 :

a. 乙酸 MS 级, Cat. No. 49199 Fluka / Sigma Aldrich.

b. 乙腈 HPLC 级, Cat. No. 015-4, Burdick & Jackson.

c. 醋酸铵 MS 级, Cat. No. 73594 Fluka / Sigma Aldrich.

d. 氢氧化铵 30%, Cat. No. 9721-33, J.T. Baker

e. 浓盐酸 Cat. No. 9535-05, J.T. Baker

f. 甲醇 HPLC 级, Cat. No. 230-4, Burdick & Jackson.

g. 二氯甲烷 HPLC 级, Cat. No. D151-4, Fisher

h. 去离子水 由微孔过滤系统制得

3. 溶液

a. ACN:H₂O (1:1, v/v): 将500ml ACN和500ml 去离子水混合起来。

b. 冲洗溶液 : 大概一半的水和一半乙腈 , 没有一定的量度。

c. 1N HCl: 用 100ml 量筒量出 83ml 浓盐酸溶液 , 置于 1L 容量瓶中 , 用去离子水稀释至刻度。

d. 0.1N HCl: 用移液管吸取 8.33 ml 浓盐酸溶液于 1L 容量瓶中 , 用去离子水稀释至刻度。

e. 5% 氢氧化铵-甲醇溶液 : 用 A 级量筒量取 25 ml 氢氧化铵和 475ml 甲醇 , 混合于玻璃瓶中。

f. 流动相 A : (25 mM 醋酸铵/25 mM 醋酸溶液)

称取 1.93g 醋酸铵于 1L 容量瓶中 , 加入 1430 μL 醋酸 , 再加入去离子水至刻度。

4. 标准品

a) 三聚氰胺 Cat. No. M2659, Aldrich

b) ¹⁵N3 三聚氰胺 (用于内标) Cat. No. IN 5451, ICON Services.

Cat. No. 592889, Aldrich (no longer available from either source 5/17/07)

5. 三聚氰胺供试品(100 µg/mL):

称 5 mg 三聚氰胺于 50 mL 容量瓶中, 加入 25 mL 50% ACN:H₂O, 超声使其溶解, 再加入 ACN:H₂O (1:1, v/v)至刻度。

6. 三聚氰胺对照品 (1 µg/mL):

吸取 500 µL 三聚氰胺供试品于 50 mL 容量瓶, 用 ACN:H₂O (1:1, v/v)稀释至刻度。

7. ⁵N3 三聚氰胺内标 (1 µg/mL):

配置1 µg/mL ⁵N3 三聚氰胺溶液, 以ACN:H₂O (1:1, v/v)为溶剂。

8. 标准曲线制备

Concentration	Tissue equivalent	Volume melamine working std. (1 µg/mL)	Volume IS (1 µg/mL)	Volume ACN:H ₂ O (1:1, v/v)
0 ng/mL	0 ppb	0 µL	500 µL	500 µL
125 ng/mL	25 ppb	125 µL	500 µL	375 µL
250 ng/mL	50 ppb	250 µL	500 µL	250 µL
500 ng/mL	100 ppb	500 µL	500 µL	0 µL

9. 储存方法: 存于2 - 8 °C.

10. 样品预处理:

将肉类样品除去脂肪, 切成小块再用机器粉碎均匀. 将肉末转到塑料袋中冷藏于 -20°C以下, 分析之前将样品解冻。

11. 分析程序

注意：避免接触塑料——它有可能滤过三聚氰胺，而且会造成污染，三聚氰胺粘性很强。一切重新使用的玻璃容器都需要用乙腈水溶液清洗过。

肉样处理：

- a. 称取 5.00 ± 0.05 样品于50mL 玻璃离心管中，同时称取两个空白（不含三聚氰胺）的组织。
- b. 在其中一个空白组织中加入 $250\mu\text{L}$ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三聚氰胺对照品，作为50 ppb 的正极对照。
- c. 分别加入25 mL ACN:H₂O (1:1, v/v).
- d. 组织高速匀浆0.5-1.0min，处理每个样品之前，用冲洗溶液清洗搅拌针 5 次。冲洗搅拌针要在50 mL的玻璃管里加入足够的冲洗液（~ 40 - 45 mL）。将针在玻璃管中高速旋转5秒，重复四次以上，每次需用新的冲洗溶液。
- e. 3500 g离心10 minutes，使组织沉淀。
- d. 将5 mL 浓缩物转移到50 mL 玻璃离心管中
- e. 加入 $110\mu\text{L}$ 1 N HCl 并摇匀。
- f. 加入10 mL 二氯甲烷，震荡2分钟
- g. 3500 g 离心10 min，使其分层。
- h 转移上清液1至戴帽的玻璃离心管中，加入25 mL到原来的50 mL 管中，摇2min，再3500 g 离心10 min，至其分层得上清液2，小心将上清液2吸出，与上清液1合并。
- i. 盖上管帽，摇匀10s。必要时再3500 g 离心10 min。
- j. 彻底清洁SPE 小柱，以适量冲洗溶液冲洗，再用5ml 甲醇活化小柱，接着用5ml水
- k. 上样，
- l. 用2 mL 0.1N HCl 冲洗，接着1 mL 甲醇冲洗，弃去流出液，真空泵抽取1min.
- m. 用5 mL 5% 氢氧化铵-甲醇溶液洗脱，用玻璃管收集洗脱液。
- n. 将氮吹仪清洗干净，用氮吹仪在50 - 60 °C将洗脱液干燥。
- o. 加入 $100\mu\text{L}$ ACN:H₂O (1:1, v/v)，含 $100\mu\text{L}$ IS ($^{15}\text{N}_3$ Melamine, $1\mu\text{g}/\text{mL}$).
 - aa. 摇匀样品并超声至少1min，使溶质溶解。
 - bb. 用 $0.45\mu\text{m}$ 过滤，滤液用带帽的玻璃管储存，用于LC-MS/MS 分析。

12. 仪器参数

a. HPLC 条件

流动相A : 25 mM 醋酸铵/ 25 mM 醋酸水溶液

流动相B : 乙腈

流动相C : 甲醇

流速 : 0.5 mL/min

梯度 :

时间 (min)	%A	%B	%C
0.0	80	15	5
5.0	30	65	5
5.1	5	90	5
7.0	5	90	5
7.1	80	15	5
12.0	80	15	5

进样 : 50 μ L

柱温 : 25°C

13. Interface Conditions

- i. Polarity: Positive
- ii. Ion Source: Electro Spray
- iii. Source Temperature : 125
- iv. Desolvation Temperature : 450
- v. Cone Gas Flow : 20 L/hour

vi. Desolvation Gas Flow : 900 L/hour

Multiple Reaction Monitoring (MRM) Parameters:

i. Resolution Q1 & Q3 Unit

ii. Cone Voltage : 35V

iii. Dwell Time : 0.2 sec

iv. Melamine Transitions:

(a) m/z 127 \rightarrow 85 27eV collision voltage (quant. Ion)

(b) m/z 127 \rightarrow 68 17eV collision voltage

¹⁵

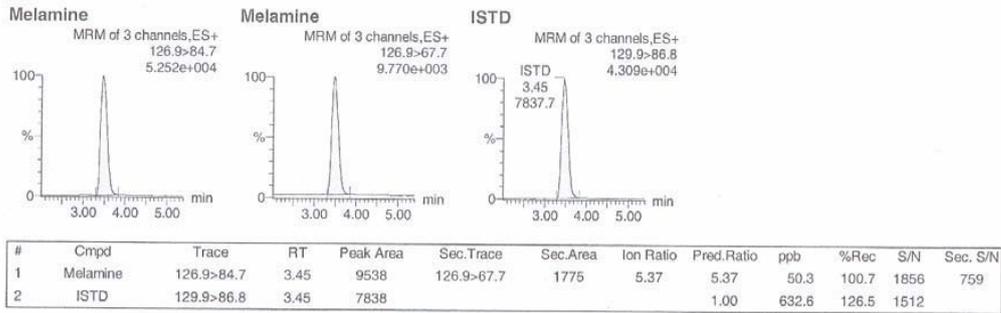
N3 Melamine Transition:

(a) m/z 130 \rightarrow 87 17eV collision voltage

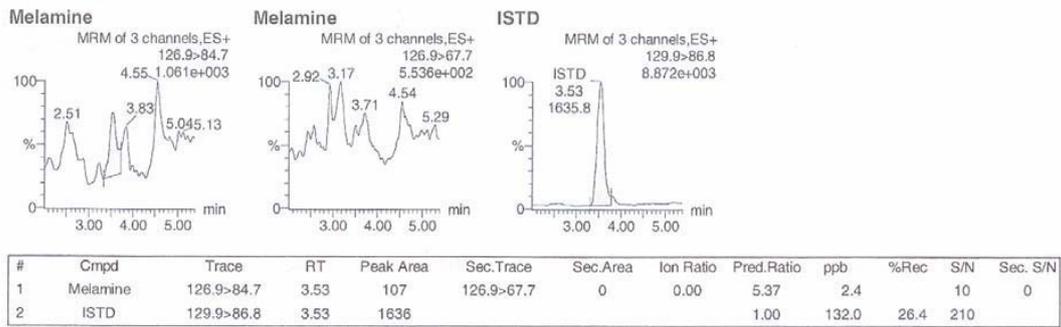
销售热线 : 020 - 38785061/62/63
www.gzflm.com

参考图谱：

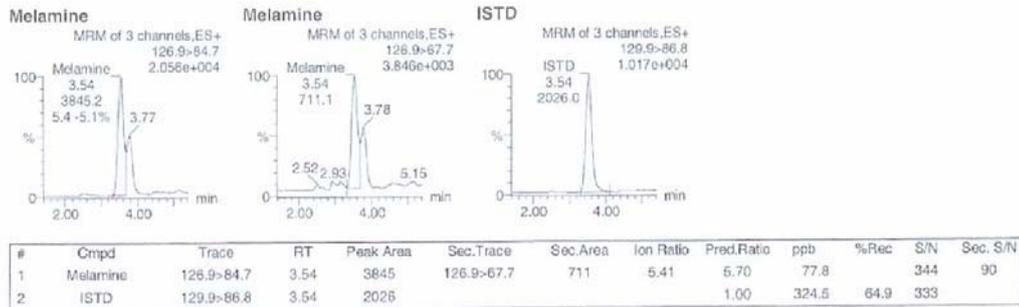
50 ppb External Standard



Blank Poultry Muscle



50 ppb Poultry Muscle Recovery



HPLC Application

ID No.: 1177

Melamine and Impurities

Column: Aqua 5u C18 125A

Dimensions: 250 x 4.6 mm ID

Order No: 00G-4299-E0

Elution Type: Isocratic

Eluent A: 20mM Potassium phosphate, pH 7

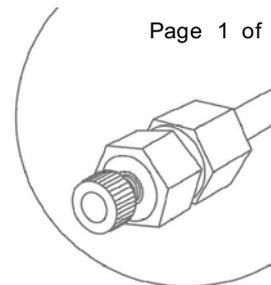
Pct. A: 100

Flow Rate: 1.5 mL/min

Col. Temp.: ambient

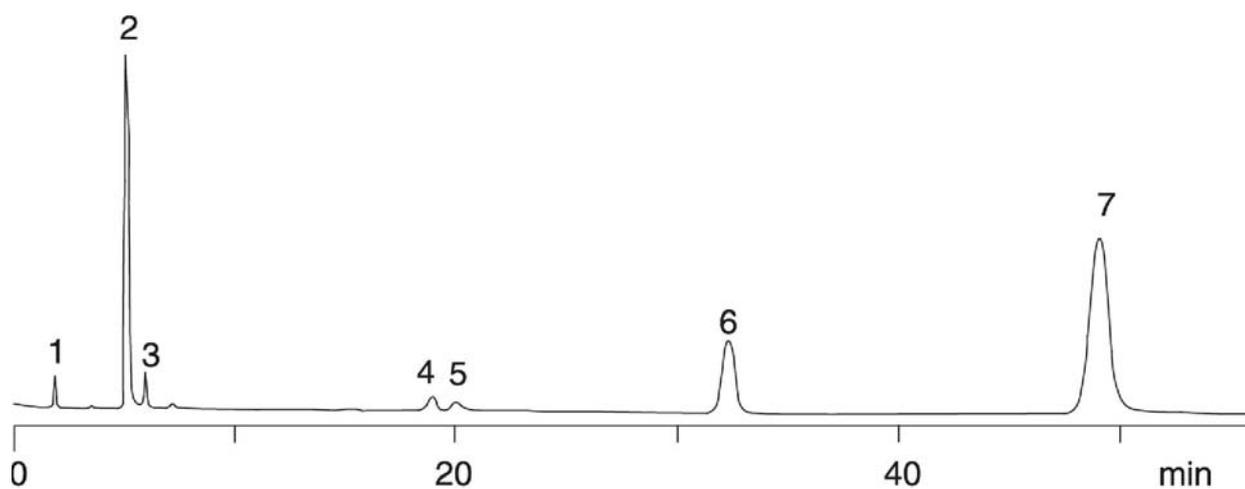
Detection: UV-Vis Abs. - Variable Wave. @ 254 nm (ambient)

Page 1 of 1



Products used in this Application:

AQUA™



ANALYTES:

- 1 Ammelide
- 2 Melamine
- 3 Cyanuric acid
- 4 Guanyl
- 5 Ureidomelamine
- 6 Melem
- 7 Melam

新

Luna Hilic 色谱柱测定奶粉中三聚氰胺

优点：方法简单，无需添加离子对试剂、无需衍生也能获得良好的保留，并可直接转移至 LC/MS/MS 方法中予以确证。

仪器：HITACHI L2000 HPLC 色谱仪 (L2130 泵+L2400 紫外检测器)

色谱柱：Luna Hilic 5u 250x4.6mm 色谱柱 (货号：00G-4450-E0)

SPE 小柱：Strata X-C 60mg/3ml

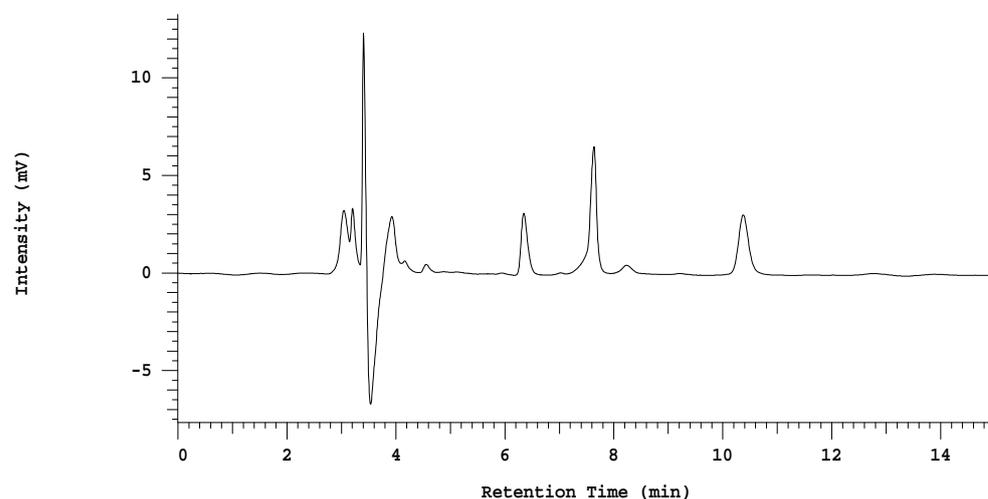
试剂：乙腈、甲酸、水、氨水、甲醇

样品前处理：

取奶粉样品 5g,精密加入甲醇 50ml,并精密称定重量,超声处理 30min,精密称量并用甲醇补足重量,摇匀,滤过,取续滤液 30ml,离心 10000r/min 5min,精密取上清液液 20ml,分次过预先经 3ml 甲醇和 3ml 水处理的 Strata X-C 小柱,再分别用 3ml 水和 3ml 甲醇清洗,用 1ml5%氨水甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,氮气吹干,1ml 甲醇溶解,虑膜滤过,续滤液作为供试品溶液,HPLC 测定。回收率 96.2% (RSD=3.4%, n=6)。

色谱条件：

※流动相：乙腈-0.1%甲酸 (90:10) ※流速：1ml/min ※检测波长：240nm ※进样量：5ul



市售某品牌成人奶粉样品图谱

RT (min)	Name	Area	N (EP)
10.37	三聚氰胺	42767	15028

销售热线：020 - 38785061/62/63
www.gzflm.com

三聚氰胺检测所需材料

序号	描述	备注
1	Strata X-C 60mg/3ml 8B-S029-UBJ	前处理小柱, 混合型阳离子交换 固相萃取柱
2	Luna C8 (2) 5u 250×4.6mm 00G-4249-E0	依据 NY/T 1372-2007
3	Polar-RP 4u 150×4.6mm 00F-4336-E0	FERN-CHE.0003.00
4	Polar-RP 4u 150×2.0mm 00F-4336-B0	FERN-CHE.0003.00
5	Zebron ZB - 5ms 30m× 0.25mm×0.25um 7HG-G010-11	依据NY/T 1372-2007
5	Melamine 三聚氰胺标准品	99.5% , CAS : 108-78-1 , 2.5g/瓶
6	庚烷磺酸钠 25g	离子对试剂
7	BSTFA+TMCS,99:1 20瓶×1ml	GC/MS衍生化试剂