

Advances in the Examination Methods of Food Illegal Additives of Melamine

Mixia Ma^{1,2}, Yuanzhi Li¹, Wenxiang Hu^{2*}

¹Beijing Union University, Beijing

²Xianghu Microwave Chemistry Union Laboratory in North China, Beijing Excalibur Space Military Academy of Medical Sciences, Beijing

Email: *huwx66@163.com

Received: Jul. 15th, 2017; accepted: Aug. 4th, 2017; published: Aug. 7th, 2017

Abstract

This paper introduces the structure of Melamine, an illegal food additive, and its potential danger to human body. The paper also summarizes the detection method of Melamine, liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-mass spectrometry, molecularly imprinted polymers, enzyme-linked immunosorbent assay, and aims to help people form a correct understanding of food additives and illegal additives in order to use food additives reasonably and legitimately, maintaining food safety.

Keywords

Melamine, Detection Methods, Food Additives

食品非法添加剂三聚氰胺及其检测方法研究进展

马密霞^{1,2}, 李元稚¹, 胡文祥^{2*}

¹北京联合大学, 北京

²北京神剑天军医学科学院华北祥鹤微波化学联合实验室, 北京

Email: *huwx66@163.com

收稿日期: 2017年7月15日; 录用日期: 2017年8月4日; 发布日期: 2017年8月7日

摘要

本文介绍了食品非法添加剂三聚氰胺的结构及其添加到食品中对人体的危害。综述了三聚氰胺的检测方法*通讯作者。

法。包括：高效液相色谱法、高效液相色谱 - 串联质谱法、气相色谱 - 质谱法、分子印迹聚合物、酶联免疫法等方法。引导人们正确认识食品添加剂和非法添加剂，合理合法使用食品添加剂，维护食品安全。

关键词

三聚氰胺，检测方法，食品添加剂

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

三聚氰胺又名蜜胺、氰尿酸胺，是一种含氮杂环类有机化合物，主要用于生产三聚氰胺 - 甲醛树脂，并广泛应用于木材加工、塑料、医药、食品包装材料生产等。2008 年我国发生了三聚氰胺添加到牛奶中的事件，是一些不法商贩为提高乳制品蛋白质的含量，将三聚氰胺充当蛋白质的氮源加入到牛奶中，婴幼儿食用受污染的奶粉后导致肾结石甚至死亡。“奶粉事件”发生后，国家质检总局随后就出台了原料乳与乳制品中三聚氰胺国家标准检测方法：(GB/T22388-2008)和(GB/T22400-2008)。国家标准三聚氰胺的检测限高效液相色谱法的定量限为 2 mg/kg，液相色谱 - 质谱/质谱法的定量限为 0.01 mg/kg，气相色谱 - 质谱法的定量限为 0.05 mg/kg，气相色谱 - 质谱/质谱法的定量限为 0.005 mg/kg。但这些检测方法的前处理较复杂，仪器分析用时较长(30 min)，不适合现场检测。因此，快速、准确、简单地分析牛奶及奶制品中的三聚氰胺的含量成为食品企业、食品管理机构和广大民众密切关注的问题。

2. 三聚氰胺的结构、性质及其对人体的危害

2.1. 食品添加剂及非法添加剂概念

我国对于食品添加剂有明确的规定，食品添加剂是为改善食品品质和色、香、味，以及为防腐、保鲜和加工工艺的需要而加入食品中的人工合成或者天然物质。食品用香料、胶基糖果中基础剂物质、食品工业用加工助剂。2014 年 12 月，国家卫生计生委颁布《食品添加剂使用标准》(GB2760-2014)，本标准代替 GB2760-2011《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》[1]。本标准规定了食品添加剂的使用原则、允许使用的食品添加剂品种及最大使用量或残留量。标准中指出，一般不属于传统上认为是食品原料的，不属于批准使用的新资源食品的，不属于卫生部门公布的药食两用或作为普通食品管理物质的，未列入各国食品添加剂的和其他法律法规允许使用的物质，都是非法添加剂[2]。三聚氰胺就属于食品非法添加剂，它是一种含氮杂环有机化工原料，食用添加三聚氰胺的食品会对人体造成危害，因此，三聚氰胺是我国明令禁止添加在食品尤其是乳制品中的物质。

2.2. 三聚氰胺的结构和性质

三聚氰胺(Melamine)化学式 $C_3H_6N_6$ ，结构式如图 1，IUPAC 命名为“1,3,5-三嗪-2,4,6-三胺”，俗名密胺、蜜胺、蛋白精、氰尿酸胺、三聚氰酰胺。其常温常压下为纯白色晶体，其单斜晶体如图 2，无刺激性气味，溶解度为 3.1 g/L，可溶于热水、乙酸、甘油、甲醇、吡啶、甲醛等，微溶于乙二醇、(热)乙醇，不溶于冷水、乙醚、苯、丙酮、四氯化碳等。水溶液呈弱碱性。一般情况下较稳定，但在高温下能分解放出有毒的氰化物。三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物，是重要的有机化工原料，也是杀



Figure 1. Structure of melamine

图 1. 三聚氰胺的结构



Figure 2. Monoclinic crystals of melamine

图 2. 三聚氰胺的单斜晶体

虫剂环丙氨嗪在动物和植物[3]体内的代谢产物。

2.3. 三聚氰胺添加到食品中对人体的危害

按照 2010 年的国家食品安全标准规定[4]，鲜牛奶的蛋白质含量为 $100\text{ mL} \geq 2.8\text{ g}$ ，而一般的生鲜乳的蛋白质含量在 3% 以上，通常都能达到国家标准。一些商家为了提高牛奶产量，往原奶中兑水，往奶粉中添加糊精等，致使牛奶及乳制品中的含氮量达不到国家标准($100\text{ mL} \geq 2.8\text{ g}$)。为了使掺假牛奶及乳制品检测合格，非法商贩将三聚氰胺加入其中用以提高含氮量，造成其蛋白质含量合格的假象。三聚氰胺是非食品添加剂，食用它会对人和动物体造成一定的危害。

三聚氰胺具有肾毒性。三聚氰胺毒性主要作用于泌尿系统，会导致膀胱发炎、膀胱结石、膀胱上皮细胞增生、肾结石、肾炎、肾功能衰竭甚至死亡，而且结石的存在可能引发尿道和膀胱的癌变[5]。三聚氰胺进入人体消化道后，会在胃酸的作用下部分转化为氰尿酸，与三聚氰胺形成微溶于水的结晶。经常饮水的成年人结晶会随尿液排出体外，但哺乳期婴儿饮水较少且肾脏狭小，则较易形成肾结石。

儿童食用加入三聚氰胺的奶粉后，导致泌尿系统结石的病例增加。Zhang L [6]对曾食用三聚氰胺且有泌尿系统结石的儿童临床病理学资料进行研究分析，他采用质谱分析法测定了这些儿童尿液中的三聚氰胺和三聚氰酸的含量。结果发现，儿童肾结石的大小和尿液中的三聚氰胺浓度呈强相关。说明三聚氰胺是导致儿童泌尿系统结石的直接原因。

魏学智[7]对三聚氰胺所致婴幼儿泌尿系统结石的临床研究进行了综述，指出了目前主要采用碱化尿液、溶石排石、中医中药和手术治疗等方法治疗婴幼儿泌尿系统结石，其疗效并不能确切评估肾功能。

对远期肾毒性也没有精确的评价方法,对三聚氰胺所致“肾结石”的定义及目前临床所用的“治愈标准”有待进一步研究。

3. 三聚氰胺检测技术

自从2008年发现“奶粉事件”之后,生鲜乳及奶制品中三聚氰胺的检测技术迅速发展。文献报道的检测方法有:高效液相色谱法、紫外分光光度法、近红外光谱法、表面增强拉曼光谱法、酶联免疫吸附法等。报道较多的是将各种仪器联用,如:高效液相色谱-串联质谱法、气相色谱-串联质谱法、固相萃取-高效液相色谱法、固相萃取-表面增强拉曼光谱法、胶体金免疫层析法、介孔分子印迹聚合物分离法、金纳米粒子比色探针检测法等。另外,有研究者制备了试剂盒和测试试纸,如:三聚氰胺ELISA试剂盒、三聚氰胺多克隆抗体的制备、三聚氰胺胶体金免疫层析试纸条的研制。以下就国内外食品中三聚氰胺的检测方法作以介绍。

3.1. 高效液相色谱法

高效液相色谱法对液态奶和奶制品中三聚氰胺进行测定,需要对样品进行提取、净化等前处理,选择适当的色谱条件进行检测,可以达到分离效率高、分析速度快、准确度高的效果。高效液相色谱法适用于含少量三聚氰胺的液态奶及奶制品的快速检验。样品的前处理比较复杂,难以实现对大量样品的快速检测。实验结果的不确定度也给检测自动化的实现带来一定难度。

乔勇升[8]建立了有机溶剂提取和离子对色谱相结合三聚氰胺快速检测方法。通过对实验条件的选择和优化,确定了色谱条件,对丙酮、乙腈、乙醇和异丙醇的提取物分别在甲醇-离子对试剂流动相体系和乙腈-离子对试剂流动相体系中进行测定和比较。结果显示,在本实验条件下提取物的提取效果较好。在甲醇-离子对试剂流动相体系中,三聚氰胺的质量浓度在1.0~100.0 mg/L范围内,线性关系良好,检出限为0.1 mg/kg,加标回收率为97%~103%。

杨洋[9]等人建立高效液相色谱法测定奶粉中三聚氰胺结果不确定度评定的数学模型。他们全面考虑测量过程中的不确定度来源,分别运用最小二乘法对标准曲线拟合的不确定度,以及极差法对测定次数较少时引起的不确定度进行评定。结果表明,取样量2.00 mg时,测定奶粉中三聚氰胺含量为 (2.00 ± 0.088) mg/kg。本方法适用于高效液相色谱法测定奶粉中三聚氰胺的不确定度评定。

邸万山[10]采用高效液相色谱内标法测定奶粉中三聚氰胺含量。以双氰胺为内标物,优化色谱条件,样品经20 mL 50℃热水,0.5g无水硫酸镁,10 mL乙腈提取后,采用Nova-Pak C18色谱柱分离,以0.01 mol/L乙酸铵:乙腈=90:10 (V:V)作为流动相,波长选择218 nm。结果表明,双氰胺在该条件下能够与三聚氰胺完全分离,双氰胺可以作为内标物,在0.500~1.500 mg/kg的添加范围内,三聚氰胺的回收率为98.2%~100.5%。

3.2. 高效液相色谱-串联质谱法

为了使分析技术更快速,准确,人们将高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)进行三聚氰胺的检测,把液相色谱的分离能力同质谱的高灵敏、特异性相结合,简化了样品的处理步骤,并且提高了检测速度和准确性,该方法已得到广泛应用。

刘红河[11]建立高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定奶及奶制品中双氰胺和三聚氰胺的方法。用乙腈沉淀蛋白,经微孔滤膜净化,色谱柱分离,含0.1% (V/V)的乙腈-水为流动相,梯度洗脱,采用串联四极杆质谱、电喷雾电离源正离子多反应监测模式检测,外标法定量。结果双氰胺和三聚氰胺浓度在5.0~1000.0 μg/L时,线性关系良好,双氰胺和三聚氰胺的检出限均为10.0 μg/kg;该法快速、准确、

灵敏, 优于传统的 HPLC 分析方法。

初晓娜[12]等人采用高效液相色谱-串联质谱法测定生鲜乳中三聚氰胺残留量。样品经乙腈溶液超声提取, 过 Waters OasisMCX 固相萃取小柱净化, 50℃氮气吹干, 再用 1.0 mL 乙腈溶解后供高效液相色谱-串联质谱分析。以 Waters Hilic 色谱柱为固定相, 用乙腈-乙酸铵溶液洗脱, 采用电喷雾正离子模式多反应监测, 内标法定量。三聚氰胺的质量浓度在 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内呈线性, 检出限(3 S/N)为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。用该法重复性好, 灵敏度高, 可满足乳制品中的三聚氰胺残留检测分析的需要。

邹游[13]等人以 GB/T22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》为基础改良方法, 测定婴儿奶粉中的三聚氰胺。对液相色谱-串联质谱法测定婴儿奶粉中的三聚氰胺的不确定度进行评估。结果显示, 内标法的线性拟合对测量不确定度贡献较小, 对三聚氰胺的常规检测具有重要意义。

3.3. 气相色谱-质谱联(GC-MS)

气相色谱-质谱法(GC-MS)测定三聚氰胺时具有灵敏度高、重现性好、可靠性强等优点, 适用于进行微量三聚氰胺的定量分析。

李红敏[14]等人采用气相色谱-串联质谱检测羊肉中三聚氰胺。样品经 0.1%三氯乙酸溶液和乙腈超声提取, 乙酸铅沉淀蛋白, 酸性氧化铝脱脂, 经混合型阳离子交换固相萃取柱净化, 采用多反应监测质谱扫描模式。在 $0.0050\sim 1.0 \text{ mg/L}$ 范围内线性关系良好, 三聚氰胺平均回收率范围为 80%~110%, 定量限为 0.0050 mg/kg 。此方法样品前处理简单、定性准确, 适用于测定羊肉中的三聚氰胺。金春爱[15]采用气相色谱-质谱联用法测定牛奶中三聚氰胺的含量。采用三氯乙酸溶液提取牛奶中的三聚氰胺, 选择离子监测模式, 外标法定量。在优化的条件下, 三聚氰胺的回收率达 90%~110%, 相对偏差 0.3%~6%。结果表明该方法重现性好、回收率高等优点。

3.4. 分子印迹聚合物

胡静[16]等人利用分子印迹固相萃取技术结合紫外分光光度法检测奶粉中三聚氰胺的残留量。以三聚氰胺为模板分子, α -甲基丙烯酸(MAA)为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂, 采用本体聚合方式合成三聚氰胺分子印迹聚合物(MIP), 样品经分子印迹固相萃取法进行净化, 紫外分光光度计测定。结果表明, 该方法的线性范围为 $0.007 \text{ mmol/L}\sim 0.1 \text{ mmol/L}$; 试验数据的稳定性、重现性、准确度较好, 因此利用分子印迹固相萃取技术结合紫外分光光度法检测奶粉中三聚氰胺可作为一种简单快速检测三聚氰胺的方法。

臧顺平[17]以灭蝇胺为虚拟模板分子, 采用溶胶凝胶技术制备灭蝇胺介孔分子印迹聚合物(MIP)。将 MIP 作为固相萃取吸附剂, 与高效液相色谱联用检测奶粉样品中的三聚氰胺。应用合成的 MIP 对 2 g 奶粉样品提取液中痕量三聚氰胺进行净化和富集, 回收率为 94.73%~98.56%, 检出限为 $0.015 \mu\text{g/g}$ 。此方法快速、选择性高, 为三聚氰胺的残留分析开辟了一条新途径。

3.5. 表面增强拉曼散射效应

曲干[18]等人利用表面增强拉曼散射效应无标记、无分离检测奶粉中的三聚氰胺。通过柠檬酸钠还原法制得平均粒径为 30 nm 的纳米金溶胶, 利用 Au-S 之间的共价键作用, 将对巯基苯硼酸自组装到纳米金的表面, 溶液中三聚氰胺与巯基苯硼酸之间存在强烈的氢键作用, 使巯基苯硼酸功能化的纳米金发生聚集。三聚氰胺的浓度越高, 纳米金的聚集程度越大, 拉曼信号越强。以 I_{715} 与 I_{1076} 的特征峰的比值为依据, 可以实现三聚氰胺的定性及定量的检测, 线性检测范围为 $0.1\sim 1.5 \mu\text{mol/L}$, 检出限为 $0.02 \mu\text{mol/L}$ 。本方法适用于奶粉中三聚氰胺的检测, 是一种快速、灵敏、无标记、无分离的检测三聚氰胺的分析方法。

陈小曼[19]建立了奶粉中三聚氰胺分析的固相萃取-表面增强拉曼光谱法, 对标准奶粉进行了表面增

强拉曼光谱分析,同时使用国家标准 HPLC 方法进行比对。待测物经乙腈提取、活性炭吸附及氢氧化钠溶液洗脱后进行表面增强拉曼光谱检测。该方法的线性范围为 0.005 0~1.6 mg/L,检出限为 0.100 mg/kg,回收率为 75.3%~125%。该法灵敏度高、杂质干扰小、结果准确可靠,能满足奶粉中三聚氰胺的快速检测,在奶粉质量监控方面具有良好的应用潜力。

3.6. 酶联免疫法

酶联免疫分析(CLEIA)法检测奶制品中的三聚氰胺具有一定的优点。汤慕瑾[20]采用酶联免疫吸附法在奶制品(奶粉、液态奶)、成品饲料、饲料原料、肉类等样品基质中添加一定浓度的三聚氰胺进行测定,并对检测结果进行分析。结果酶联免疫试剂盒对奶制品和肉类检出限均能达到 1.0 mg/kg;对成品饲料基质中的三聚氰胺的检测,检出限可达到 2 mg/kg,而对饲料原料中的三聚氰胺的检测,检出限都不能达到 2 mg/kg。结论对奶制品、成品饲料中的三聚氰胺检测完全符合我国的临时限量标准;而对饲料原料中的三聚氰胺的检测,由于不同基质中检出限不同,不能直接采用酶联免疫法进行快速筛查;酶联免疫法也适用于肉类中的三聚氰胺的检测。此快速检测方法,为快速筛查不同种类食品中非法添加三聚氰胺提供技术保障。酶联免疫法操作较为简单,特异性强,灵敏度高,适于现场大量样本的筛查,并且不需要昂贵的仪器和复杂的样品制备过程。

4. 结语

食品安全越来越受到社会广大民众密切关注,三聚氰胺对人体的危害机理、毒理学研究还在不断的深入。建立快速、准确、简单地分析牛奶及食品中的三聚氰胺的含量检测是研究者不断追求的目标。目前比较常用的分析方法有:高效液相色谱-串联质谱法、气相色谱-串联质谱法、固相萃取-高效液相色谱法、固相萃取-表面增强拉曼光谱法、胶体金免疫层析法、介孔分子印迹聚合物分离法、金纳米粒子比色探针检测法、酶联免疫试剂盒法、氧化石墨烯色谱固定相等。各种检测方法都有其优缺点,建立快速、准确、简单地分析牛奶及食品中的三聚氰胺的含量检测系统成为三聚氰胺分析的一个重要研究方向。

参考文献 (References)

- [1] 国家卫生计生委食品安全与监测评估司. GB2760-2014. 国家标准“食品添加剂使用标准”[S]. 北京:中国质检出版社,2014.
- [2] 廖水莲. 食品非法添加物问题研究[J]. 轻工科技,2014,2(2): 6-7.
- [3] Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006) FAO Report on Cyromazine. http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2006_rep/Cyromazine
- [4] 国家卫生计生委食品安全与监测评估司. GB19301-2010. 国家标准“食品安全国家标准”[S]. 北京:中国质检出版社,2010.
- [5] 肖明,王长晔. 三聚氰胺毒理学特征及检测方法[J]. 工企医刊,2011,24(5): 1-3.
- [6] Zhang, L., Wu, L.L., Zou, C.C. and Zhao, Z.Y. (2009) Melamine-Contaminated Milk Products Induced Urinary Tract Calculi in Children. *World Journal of Pediatrics*, 5, 31-35. <http://www.wjpc.com/> <https://doi.org/10.1007/s12519-009-0005-6>
- [7] 魏学智,钱培贤,安立文. 三聚氰胺所致婴幼儿泌尿系结石的临床研究进展[J]. 黑龙江医学,2016,40(10): 974-975.
- [8] 乔勇升,李兴根,韩芷玲,等. 高效液相色谱对液态奶中三聚氰胺的快速测定[J]. 分析测试学报,2009,28(10): 1202-1205.
- [9] 杨洋,徐春祥,车文军. 高效液相色谱法测定奶粉中的三聚氰胺及其不确定度分析[J]. 食品科学,2010,31(4): 250-253.
- [10] 邸万山. 高效液相色谱内标法测定奶粉中三聚氰胺[J]. 中国酿造,2016,35(3):145-147.
- [11] 刘红河,廖仕成,康莉,等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定奶及奶制品中双氰胺和三聚氰胺[J]. 卫生研

- 究, 2014, 43(6): 978-981.
- [12] 初晓娜, 矫秀燕, 穆阿丽, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定生鲜乳中三聚氰胺的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2015, 51(3): 394-397.
- [13] 邹游, 蓝草, 欧阳少伦, 等. 液相色谱-串联质谱法测定婴儿奶粉中三聚氰胺残留量的不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2435-2441.
- [14] 李红敏, 王静, 赵爽, 等. 气相色谱-串联质谱法测定羊肉中的三聚氰胺[J]. 广东化工, 2016, 43(11): 253-254.
- [15] 金春爱, 王玉方, 罗婧, 等. 牛奶中三聚氰胺的气相色谱-质谱联用快速测定[J]. 中兽医学杂志, 2014(7): 49-50.
- [16] 胡静, 高文惠. 分子印迹-紫外分光光度法测定乳品中三聚氰胺[J]. 食品科学, 2016, 27(18): 144-145.
- [17] 臧顺平, 吕云辉, 苗文凯, 等. 介孔分子印迹聚合物分离分析奶粉中的三聚氰胺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(16): 67-75.
- [18] 曲干, 张冠男, 苏艳, 等. 表面增强拉曼散射效应无标记, 无分离检测三聚氰胺[J]. 分析化学, 2014(7): 1022-1027.
- [19] 陈小曼, 雷皓宇, 胡玉玲, 等. 固相萃取-表面增强拉曼光谱法测定奶粉中三聚氰胺[J]. 分析测试学报, 2016, 35(10): 1343-1346.
- [20] 汤慕瑾, 张恒, 郑晓燕, 等. 酶联免疫吸附法快速测定不同样品基质中三聚氰胺[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(4): 340-343.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2574-4127, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: cc@hanspub.org