

高效液相色谱串联质谱法测定奶粉中的双氰胺

周 亮

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

1. 引言

双氰胺又名二氰二氨，缩写 DICY 或 DCD。是氰胺的二聚体，也是胍的氰基衍生物。白色结晶粉末，可溶于水、醇、乙二醇和二甲基甲酰胺，几乎不溶于醚和苯。干燥时稳定。双氰胺化肥，双氰胺复合肥料可控制硝化菌的活动，使氮肥在土壤中的转化速度得到调节，减少氮的损失，提高肥料的使用效率。农民普遍会在牧场使用双氰胺，目的是防止硝酸盐等对人体有害的肥料副产品流入河流或湖泊。新西兰的奶牛养殖是采取放养的方式，如果草木干旱，奶农往往会使用一些肥料增强草木的抗旱性以及肥力，这就造成了污染。而由于新西兰国内注重环保，因此使用双氰胺对草木中的有害物质进行中和，这就导致了残留的药品流入奶牛体内，造成奶品的污染。2013年1月25日，新西兰牛奶中发现了有害物质—双氰胺。虽然国际标准未对食品中的双氰胺限量，但高剂量的双氰胺对人体是有毒的。

奶粉中双氰胺的 LCMSMS 检测的难点在于：首先双氰胺本身的分子量很小，极性很大，一般的 C18 柱保留不住，其次婴幼儿奶粉的基质非常复杂，含有大量糖类和蛋白质，必须有合适的前处理方法以获得更好的净化效果。本实验选用 Thermo Scientific Synchronis HILIC 色谱柱配合 Hypercarb 净化柱，建立了双氰胺 LCMSMS



的检测方法，结果显示该方法具有灵敏度高，重现性较好等特点。

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂：

TSQ Quantum Ultra 三重四极杆串联质谱仪（赛默飞世尔科技 Thermo Fisher Scientific 公司），配置有电喷雾电离源（ESI）；Dionex Ultimate 3000 RSLC 超高压液相色谱

标准品：双氰胺纯度大于 98%，内标双氰胺-¹⁵N₄ 纯度为 95%。用乙腈溶解并配制成 1.0 mg/mL 标准储备液，再根据需要稀释成适当含量的混合标准工作液。其他试剂均为 HPLC 色谱纯。

表 1. 液相梯度

时间 /min	水 (含 0.5mM NH ₄ Ac, pH=4.0)	乙腈	流速 / μ L/min
0.00	5	95	300
4.00	5	95	300
4.50	50	50	300
8.50	50	50	300
8.60	5	95	300
15.00	5	95	300

2.2 仪器方法:

2.2.1 液相条件:

色谱柱: Synchronis HILIC, 100mm×2.1mm, 5 μ m;
梯度洗脱程序见表 1, 其中 A 为 0.5mM NH₄Ac (pH=4.0) 水溶液, B 为乙腈。进样量 10 μ L。

2.2.2 质谱条件:

电喷雾电离源(ESI), 正离子模式; 选择反应监控(SRM)扫描模式, 喷雾电压: 3000V; 气化器温度 350 $^{\circ}$ C, 离子传输管温度: 350 $^{\circ}$ C; 氮气作为鞘气和辅助气, 其中鞘气为 30arb, 辅助气为 8arb, 氩气用作碰撞气, 碰撞压力为 1.5mTorr; 选择反应监测(SRM), 离子对见表 2。

表 2. 化合物离子对信息

化合物	母离子(Parent)	子离子(Product)	碰撞能量(CE)	T-Lens 电压
双氰胺	85.30	43.40	12	100
	85.30	68.30	18	100
双氰胺- ¹⁵ N ₄	89.15	45.5	16	32
	89.15	71.5	16	32

3 结果分析

3.1 灵敏度:

经实验测定, 双氰胺的 LOD 为 0.25ng.mL⁻¹, 信噪比为 20, 提取离子流图见图 1。

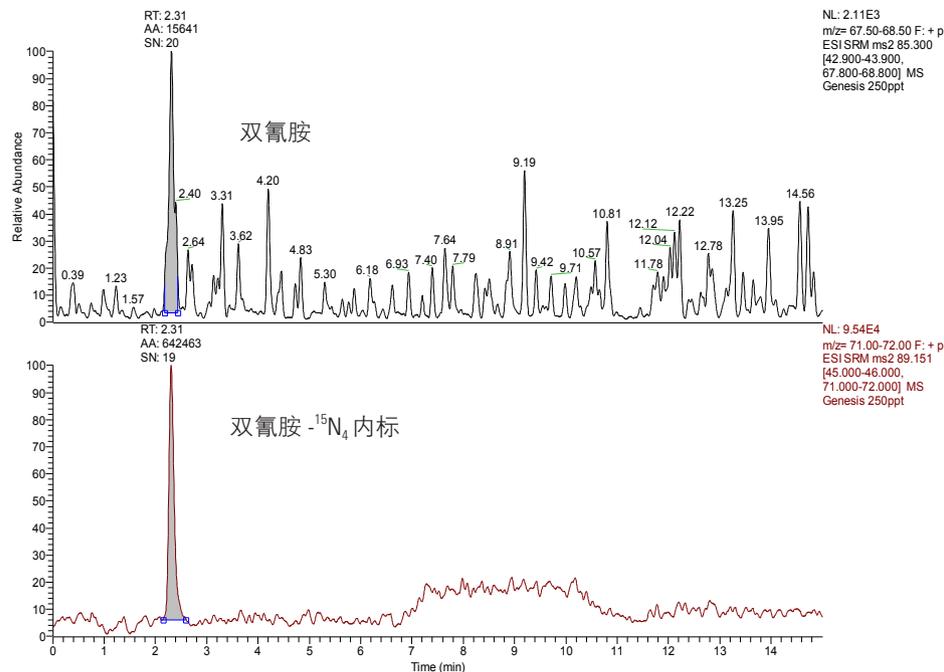


图 1. 双氰胺最低检测限图

3.2 线性范围

采用上述仪器方法进行测定, 双氰胺在 0.5ng.mL⁻¹-100ng.mL⁻¹ 呈现良好的线性相关性, 线性相关系数为

0.9998, 浓度水平分别为: 0.5ng.mL⁻¹、1ng.mL⁻¹、5ng.mL⁻¹、10 ng.mL⁻¹、50ng.mL⁻¹、100ng.mL⁻¹, 内标双氰胺-¹⁵N₄ 浓度为 5ng.mL⁻¹, 线性方程见图 2。

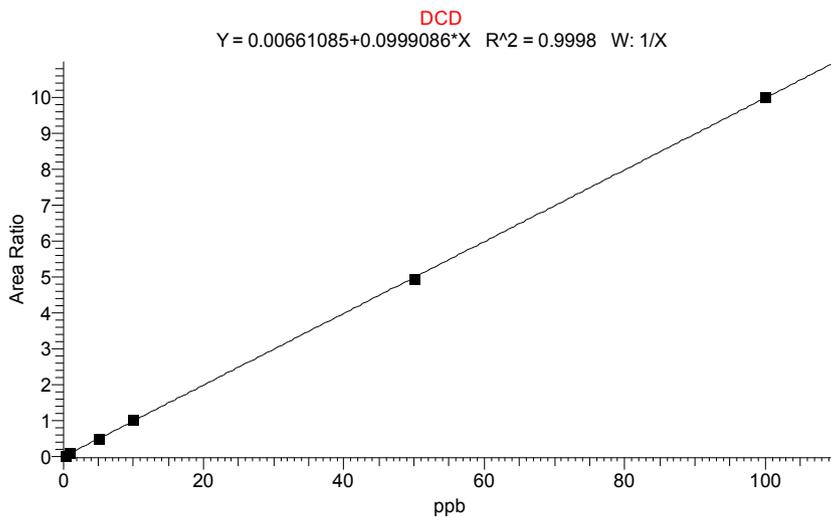


图 2. 线性方程图

3.3 精密度

对 $1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的双氰胺，采用上述仪器方法，连续进样 7 针，计算 RSD 值。结果为 1.19%，离子流图如图 3。

E:\data\...\good data\RSD-1ppb-01

3/12/2013 3:35:15 PM

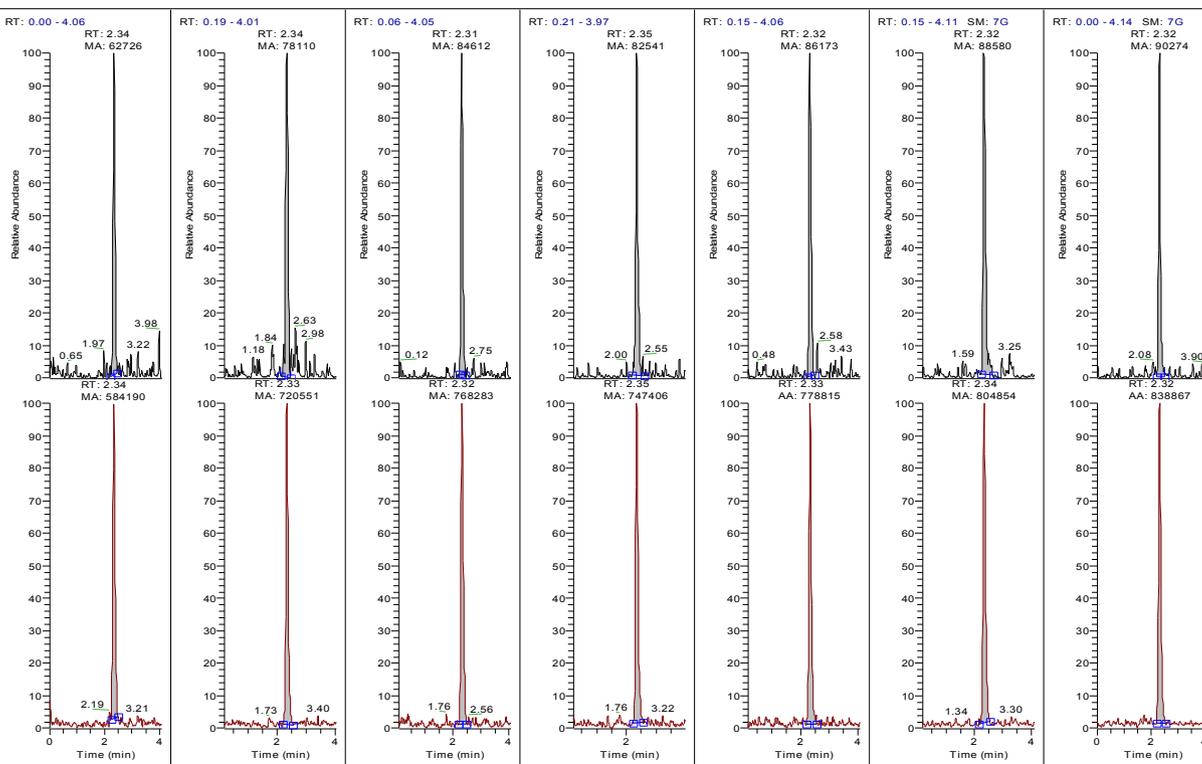


图 3. 平行进样 7 针的色谱图

3.4 奶粉样品分析

取某市售婴幼儿奶粉试样，进行添加回收实验。

奶粉的前处理方法如下：称奶粉基质样品 2.000g，加 10mL 1% 的甲酸 / 水提取液，涡旋震荡提取 5min，超声萃取 10min；冷冻离心机 6000R/min，离心 10min，取上清液 5mL 到小离心管中，14000R/min 离心 10min，上清液全部过净化柱（3cc,200mg/Hypercarb），控制流速

1mL/min，用 10mL 超纯水清洗柱子；用甲醇 / 乙腈（4/6）洗脱，接取洗脱液氮气吹干（40℃），用 1mL（乙腈 / 水，9:1）定容，0.22 微米有机滤膜过滤，上机检测。结果表明，空白基质在双氰胺及内标双氰胺- $^{15}\text{N}_4$ 的出峰位置没有干扰，添加 5ng.mL $^{-1}$ 的色谱图如图 4，该图中上方为基质添加，下方为基质空白。

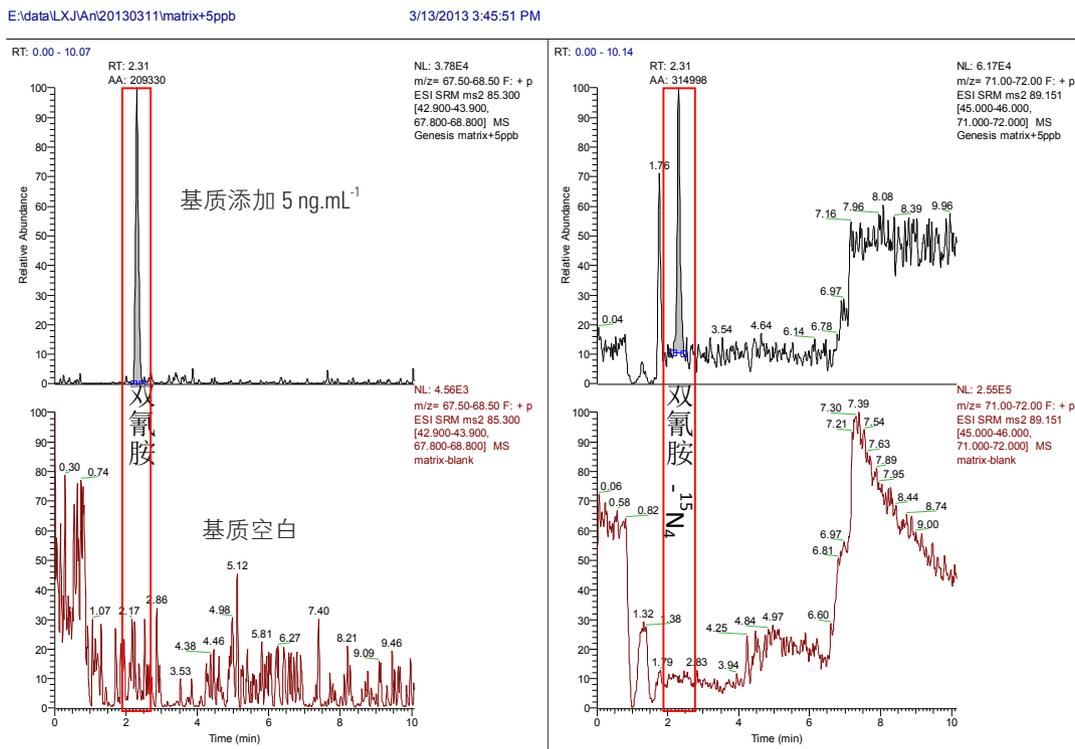


图 4. 基质添加及空白基质色谱图

结论:

TSQ Quantum Ultra 三重四极杆液质联用系统检测奶粉中双氰胺具有灵敏度高、特异性好的优点，检测定量限可以做到 0.25ng.mL $^{-1}$ 。并且该方法具有良好的线性范围与精密度，在 0.5ng.mL $^{-1}$ -100ng.mL $^{-1}$ 的线性相关系数

为 0.9998，重复进样 7 针 1ng.mL $^{-1}$ 的双氰胺的 RSD 值为 1.19%。使用 Hypercarb 净化柱能很好的处理奶粉样品，空白基质没有干扰，证明该方法检测双氰胺具有很好的适用性。

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC