

岛津应用数据集

● 色谱分析

LC-091

亲水相互作用液相色谱法测定奶粉中双氰胺

摘要: 本文建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 测定奶粉中双氰胺的方法。前处理采用分散固相萃取法结合旋转蒸发浓缩方法, 样品处理时间短。使用二元高压梯度系统利用亲水相互作用色谱法(HILIC)在 15 min 内实现快速分析。实验结果表明: 线性范围 0.05 mg/L~ 5 mg/L, 相关系数大于 0.9999; 标样的仪器检出限为 0.005 mg/L, 仪器定量限为 0.015 mg/L; 0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 2 mg/L 三个浓度标样 7 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.27~0.39% 和 0.20 ~1.06% 之间; 2 mg/kg 奶粉样品平均加标回收率为 107%。

关键词: 双氰胺 HPLC HILIC 奶粉 分散固相萃取法

2013年1月份, 新西兰第一产业部的官员证实, 在新西兰出产的牛奶和奶粉中于2012年9月检测出少量的双氰胺化学残留物, 但是这些残留物不会影响食品安全或者导致健康问题。乳制品是新西兰主要的出口商品, 中国是新西兰最大的出口市场, 因此相关新闻引起了国内媒体和老百姓的关注。央视新闻直播间对此进行了报道。

双氰胺(英文名Dicyandiamide, 缩写DICY或DCD), 又名二聚氰胺、二氰二氨, 是一种白色棱形结晶性粉末, 可用作三聚氰胺生产原料及医药和染料中间体。国内研究者报道, 双氰胺与氮肥配用时, 能抑制亚硝酸菌、硝酸菌、脱氮菌活动, 减少氮肥硝化、脱氮作用, 提高氮肥利用率; 同时促进了蔬菜的生长和发育。因此, 双氰胺作为一种硝化抑制剂在化肥中使用。此次奶粉中双氰胺的来源据推测主要就是喷洒在草场上的化

肥中的硝化抑制剂被奶牛食入体内而从乳汁中分泌出来。新西兰约5%的牧场使用含有双氰胺的化肥来培养草场, 新西兰两家主要的化肥生产商已经主动停止生产含有双氰胺的化肥。

本文使用岛津液相色谱仪、HILIC色谱柱和分散固相萃取法分析了奶粉中双氰胺, 供相关检测人员参考。

1. 实验条件

1.1 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 二元高压梯度系统。具体配置为 LC-20AD 输液泵, DGU-20A_{3R} 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, SPD-M20A 二极管阵列检测器, CBM-20A 系统控制器, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

作者: 姚劲挺 上海分析中心 Email: sshyjt@shimadzu.com.cn

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: GL InertsilHILIC 2.1 mm I.D.×150

mm L., 3μm

流动相: A—水; B—乙腈

流速: 0.2 mL/min

进样体积: 4 μL

柱温: 40℃

检测波长: 218 nm (波长范围: 190-370nm)

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 95%,
时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	95
5.00	Pumps	Pump B Conc.	70
7.00	Pumps	Pump B Conc.	70
7.10	Pumps	Pump B Conc.	95
15.00	Controller	Stop	

1.3 样品制备

标准溶液配制: 用甲醇配制 20 mg/L 双氰胺标准储备液。用乙腈将标准储备液稀释成 0.05mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5mg/L、1mg/L、2 mg/L、5mg/L 不同浓度的工作液。

样品前处理方法: 使用分散固相萃取结合旋转蒸发浓缩方法来处理奶粉样品。1g 奶粉, 用 2 mL 60℃ 的热水溶解, 加入约 8 mL 乙腈定容到 10 mL, 漩涡混合 2min, 于 4000 rpm 离心 10min。取 4 mL 上清液, 加入安谱 DSPE 双氰胺净化管中, 漩涡混合 30 秒, 离心取上清用旋转蒸发浓缩定容至 1 mL, 经 0.22μm 针式滤器过滤后进样。

2. 实验结果

2.1 标准样品的色谱图

混合标准样品的色谱如图 1 所示, 保留时间为 3.563 min, 最大吸收波长 218 nm。

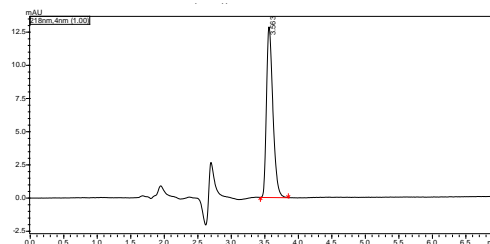


图 1 1mg/L 标准溶液的色谱图

2.2 线性关系

将 7 个不同浓度的标准工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 外标法制作校准曲线, 如图 2 所示。线性方程为 $Y = (86851.9)X + (-664.992)$ 、线性范围 0.05~ 5 mg/L, 相关系数大于 0.9999, 线性关系良好。

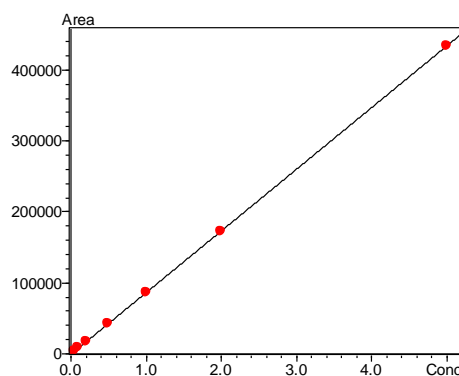


图 2 双氰胺的标准工作曲线

2.3 检出限和定量限

0.05 mg/L 的标样色谱图如下所示, 按照 ASTM 计算信噪比, 选取基线为 4-5 min, 信噪比为 31.65。以 3 倍信噪比为检测限, 计算仪器检出限为 0.005 mg/L, 定量限为 0.015 mg/L。

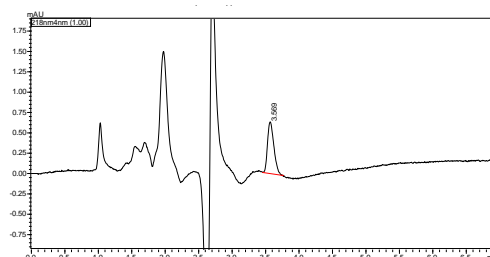


图 3 0.05 mg/L 标准溶液的色谱图

2.4 精密度实验

取标准工作液中 0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 2 mg/L 三个浓度，分别平行进样 7 次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.27~0.39% 和 0.20~1.06% 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=7)

浓度(mg/L)	保留时间 RSD	峰面积 RSD
0.1	0.27%	1.06%
0.5	0.39%	0.43%
2	0.34%	0.20%

2.5 基质加标实验

按照 1.3 中样品制备方法，在样品中添加标样，加标含量为 2 mg/kg，平行 2 次。空白奶粉中未检出双氰胺，奶粉加标平均回收率为 107%。1 mg/L 标准溶液的色谱图如图 4 所示，奶粉空白样品的色谱图如图 5 所示，2 mg/kg 奶粉加标样品的色谱图如图 6 所示。

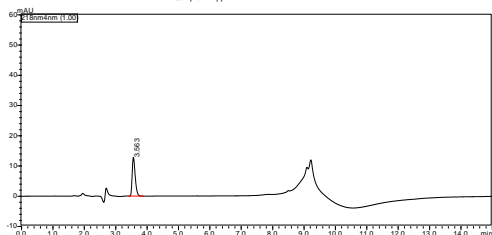


图 4 1 mg/L 标准溶液的色谱图（全部采集时间）

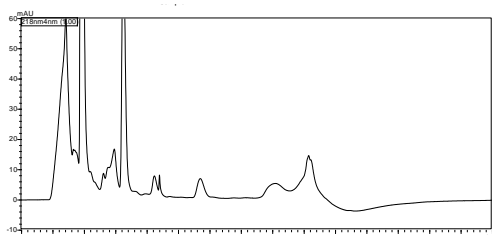


图 5 奶粉空白样品的色谱图

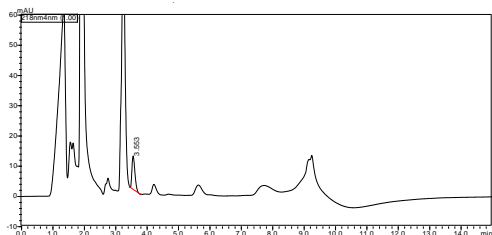


图 6 2 mg/kg 奶粉加标样品的色谱图

3. 实验总结和讨论

本方法前处理简单，分析快速，灵敏度高。实验总结和讨论如下：

1. 双氰胺极性较三聚氰胺更强，使用反相离子对色谱法无法保留。使用 C18 和 SCX 混合填料色谱柱则很难洗脱下来。HILIC 柱特别适合分析双氰胺等亲水性化合物，且适合液质联用使用。HILIC 柱有多种固定相基团种类，分为中性基团（如二醇基）、带电基团（如氨丙基和酰胺基）和两性离子基团（如 ZIC®-HILIC）等。以上柱子均可以用于双氰胺分析，但是它们的保留机理和保留能力各不相同。

2. 双氰胺的前处理，如果使用 C18 固相萃取柱无法保留，但可以用于除杂；使用 SCX 固相萃取柱则很难洗脱下来。分散固相萃取法是目前热门的前处理方法，具有成本低、分析速度快等优点，适合双氰胺分析。

3. 溶解样品的溶剂应避免使用高溶解性溶剂，对于 HILIC 分析，而应尽量使用流动相初始比例溶剂或更高比例乙腈来稀释样品。本文中分散固相萃取后，用旋转蒸发浓缩近干，然后用纯乙腈定溶即是为了避免溶解性效应导致的峰前延。配制标样时可以用极性强的溶剂甲醇来溶解双氰胺，乙腈作为稀释到工作液的溶剂。

4. LC-MS/MS 方法具备更高的检测灵敏度，同时 MRM 模式具备高选择性可以避免基质干扰。具体结果可以参考岛津 LCMS-8040 分析奶粉中双氰胺应用报告。

岛津应用数据集

● 色谱分析

LCMSMS-089

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定奶粉中的双氰胺残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定奶粉中双氰胺的方法。奶粉样品经提取和净化后,用超高效液相色谱 LC-30A 进行分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定性和定量分析。双氰胺在 1 $\mu\text{g/L}$ ~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好,标准曲线的相关系数为 0.9997;对 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 低中高不同浓度的混合标准工作液连续测定 6 次,保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.11%~0.12% 和 0.93%~2.78% 之间,仪器精密度良好。

关键词: 奶粉双氰胺三重四极杆质谱

双氰胺(dicyandiamide, 缩写 DCD)也称二聚氰胺,或者二氰二胺,常用作化工原料,医药及染料中间体。近年来,双氰胺的应用领域还在不断地扩展。2013 年 1 月 24 日,新西兰初级产业部(MPI)宣布,该国牛奶和奶粉中发现存在低毒的化学物质双氰胺残留,新西兰政府已经下令禁止含有双氰胺的奶制品销售和出口。MPI 表示,为了保持草场的肥沃,农民会在牧场喷洒双氰胺,以防止因人工施用的肥料中对人体有害物质硝酸盐流入河流和湖泊。由于牧草含有双氰胺,导致牛奶中双氰胺的残留。

高效液相色谱-串联质谱联用技术灵敏度高,适合于复杂基体中的有机物痕量分析。本文建立了一种用于检测奶粉中双氰胺的方法,包括样品前处理和 LC-MS/MS 方法,可实现乳制品中双氰胺残留快速准确检测。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: InertsilAmide 2.1 mm I.D. \times 150mm L., 3 μm

流动相 A: 含 0.2% 乙酸和 10 mM 乙酸铵的水溶液

流动相 B: 含 0.2% 乙酸的乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 97%,

时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	Pumps	Pump B Conc.	97
2.70	Pumps	Pump B Conc.	70
2.90	Pumps	Pump B Conc.	70
2.91	Pumps	Pump B Conc.	97
5.00	Controller	Stop	

流速：0.4mL/min

柱温：40℃

进样量：10 μL

质谱条件

离子化模式：ESI(+)

离子喷雾电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

DL 温度：250℃

加热模块温度：450℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：100 msec

延迟时间：3 msec

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	DL Bais(V)	Qarray Bais(V)	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
双氰胺	85.2	68.1*	25	25	-17	-18	-28
		43.1	25	25	-17	-16	-16

*表示定量离子

1.3 标准品溶液的配制及样品前处理

标准工作溶液配制：

用乙腈配制 20 mg/L 的混合标准中间溶液，再用乙腈稀释成 1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L 和 100 μg/L 不同浓度的混合标准工作液。

奶粉样品前处理：

准确称取 1 g 奶粉，用 2 mL 热水溶解，加入约 8 mL 乙腈定容到 10 mL，漩涡混合 2 min，于 4000 rpm 离心 10min。取 4mL 上清液，加入 dSPE 双氰胺净化管中，漩涡混合 30 秒。静置 2 min，取上清液旋转蒸发至近干，用乙腈定容至 1 mL。在混合器上混匀后，用 0.22μm 滤膜过滤，待测。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

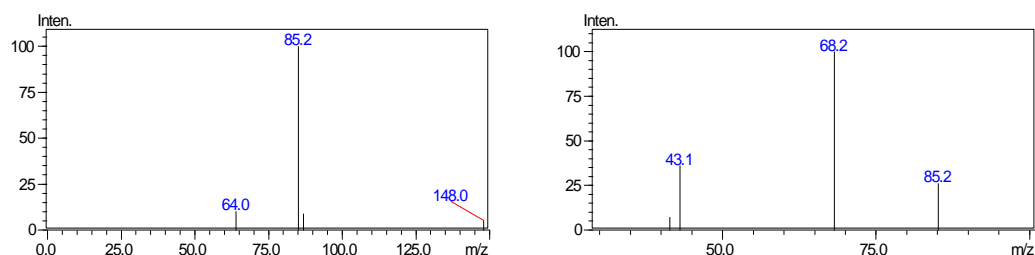


图1 双氰胺的一级质谱图图2 双氰胺的产物离子扫描质谱图(CE值-18V)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

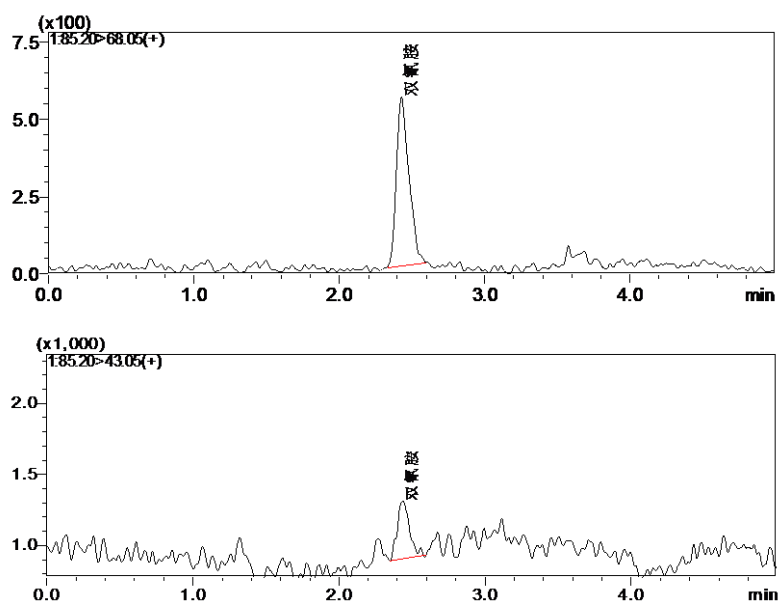


图3 1 µg/L 双氰胺标准样品的色谱图

2.3 线性关系

1 µg/L、2 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/L 不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 4 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程为 $Y = (4985.44)X$ ；相关系数 $R=0.9997$ 。

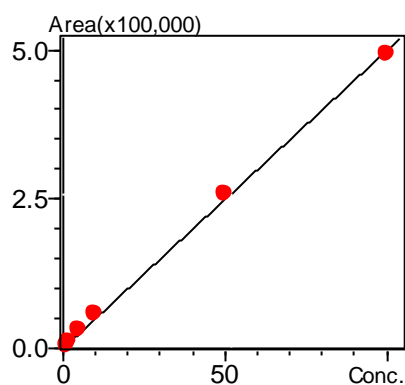


图 4 双氰胺校准曲线

2.4 精密度试验

对 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.11%~0.12% 和 0.93%~2.78% 之间，仪器精密度良好。

表 3 双氰胺保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

Conc. ($\mu\text{g/L}$)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
5	0.12	2.78
10	0.11	1.35
50	0.12	0.93

2.5 灵敏度实验

为了考察仪器灵敏度，配制浓度为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 测试样品 7 份，平行进样 7 次分析结果。由 7 次进样测定的标准偏差(S)计算出检测限和最低定量浓度，此时检出限 $\text{MDL}=3.14 \times \text{S}$ ，定量下限 $\text{LOQ}=4 \times \text{MDL}$ 。测定结果如表 4 所示。

表 4 双氰胺的检出限和定量下限

名称	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量下限($\mu\text{g/L}$)
双氰胺	0.08	0.24	0.96

2.6 回收率实验

取空白奶粉样品 1 g，加入少量双氰胺标准溶液，使加标浓度均为 50 $\mu\text{g/kg}$ ，样品经提取与净化后，按照按 1.2 中的分析条件进行测定双氰胺的加标回收率。空白奶粉样 MRM 色谱图如 5 所示，加标样品 MRM 色谱图如 6 所示，回收率为 71%。

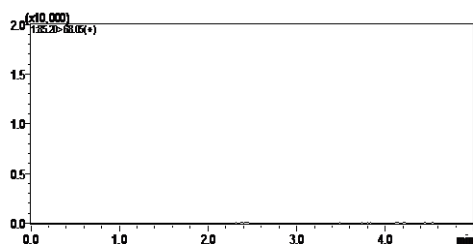
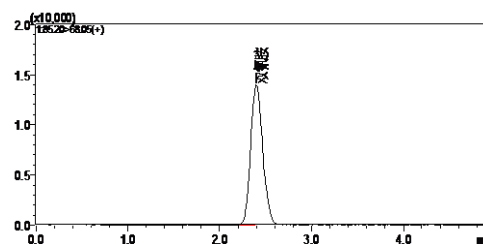


图 5 空白奶粉样品 MRM 色谱图

图 6 50 $\mu\text{g/kg}$ 加标样品 MRM 色谱图

3 结论

建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定奶粉中双氰胺的方法。奶粉样品经提取和净化后，用超高效液相色谱 LC-30A 进行分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定性和定量分析。双氰胺在 1 $\mu\text{g/L}$ ~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，对低中高不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.12% 和 2.78% 以下。本方法操作简单，可用于乳制品中双氰胺的快速准确检测，实现高通量的产品筛查。