

# 液相色谱-串联质谱同位素稀释法测定 奶粉中双氰胺的残留

许娇娇, 张京顺, 黄百芬, 任一平\*

(浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051)

**摘要:** **目的** 建立并优化高压液相色谱-串联质谱法快速检测奶粉中双氰胺残留的方法。**方法** 奶粉样品经1%三氯乙酸溶液沉淀蛋白后, 通过 Sep-pak AC-2 离子交换固相萃取柱净化样品提取液, 去除奶粉中其他复杂基质的干扰, 浓缩后用初始流动相复溶、过膜。采用电喷雾正离子电离(ESI<sup>+</sup>)模式和多反应监测(MRM)扫描模式, 通过 Acquity BEH Amide(3.0 mm×150 mm, 1.7 μm)色谱柱分离检测双氰胺目标化合物, 同位素 <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-双氰胺稀释法定量。**结果** 该方法在 50~1200 μg/kg 范围内线性良好, 相关系数  $r>0.998$ , 在三种不同基质样品中的最低检测限与最低定量限分别为 2.5 μg/kg 和 8 μg/kg, 加标回收率为 93.4%~112.3%, 相对标准偏差均<10.3%。**结论** 该方法简便、灵敏、精确, 不仅筛选优化了液相、质谱条件参数, 同时优化了奶粉样品的前处理方法, 适用于奶粉中双氰胺残留的检测。

**关键词:** 双氰胺; 奶粉; 高压液相色谱-串联质谱法; 同位素稀释法

## Isotope dilution determination of dicyandiamide in milk powder by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Jiao-Jiao, ZHANG Jing-Shun, HUANG Bai-Fen, REN Yi-Ping\*

(Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a rapid analytical method to determine the residues of dicyandiamide in milk powder. **Methods** After precipitating proteins of the milk powder sample by 1% trichloroacetic acid solution, the sample extract was purified by Sep-pak AC-2 ion exchange solid phase extraction column, which could remove the interference of complex matrix in the milk powder. Then it was concentrated and reconstituted by the initial mobile phase, and went through the film. The dicyandiamide target compounds were separated by Acquity BEH Amide (3.0 mm×150 mm, 1.7 μm) column and were detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS) with electrospray ionization (ESI) in multiple reaction monitoring method (MRM). Accurate determination was achieved by using isotope <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-dicyandiamide as internal standard. **Results** The method showed a good linearity over the range of 50~1200 μg/kg with  $r>0.998$  and the lowest detection limit and the lower limit of quantification in three different matrix samples were 2.5 μg/kg and 8 μg/kg. The mean recoveries ranged from 93.4% to 112.3%. The relative standard deviation was less than 10.3%.

基金项目: 公益性行业科研专项(2012104003-6)

**Fund:** Supported by Public Science and Technology Research Funds project(2012104003-6)

\*通讯作者: 任一平, 教授级高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检验技术及食品安全检测技术。E-mail:renyiping@263.net

\*Corresponding author: REN Yi-Ping, Professorate Senior Engineer, Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, No.3399, Binsheng Road, Binjiang District, Hangzhou 310051, China. E-mail: renyiping@263.net

**Conclusion** This method is simple, sensitive and accurate, and can not only optimize the parameters of the liquid phase and the conditions of mass spectrometry, but also optimize the pre-treatment methods of the milk powder sample. It can be applied to detect the residues of dicyandiamide in milk powder.

**KEY WORDS:** dicyandiamide; milk product; LC-MS; isotope dilution

## 1 引言

目前,食品中非蛋白含氮物质的检测尚未引起足够重视,尤其是乳制品中的非蛋白氮的残留、掺假等问题严重影响了乳制品企业乃至行业的生存发展,危害人体健康,影响人们的生活。继三聚氰胺事件之后,2013年1月,新西兰牛奶及其奶制品被检测出有低含量的有毒物质双氰胺事件<sup>[1]</sup>再次引起人们对乳制品安全问题的关注。因此,建立一种快速检测并能准确定量奶粉中的双氰胺残留量的方法迫在眉睫。

双氰胺(Dicyandiamide),别名二氰二胺,分子式 $C_2N_4H_4$ ,近年来有不少文献涉及双氰胺的研究<sup>[2]</sup>,主要有薄层色谱法、分光光度法、高压液相色谱法等,Pretorius<sup>[3]</sup>等人采用比色法测定了地表水和地下水中的双氰胺,中国药典2000版和2005<sup>[4,5]</sup>版先后采用薄层色谱法、磺酸基阳离子交换-液相色谱法测定相关物质中双氰胺的浓度,而吴莉和周靖平<sup>[6,7]</sup>等均采用反相高效液相色谱法测定双氰胺含量,但是这些方法均存在不足之处,检测灵敏度相对较低,难以满足食品中微量双氰胺的检测要求。液相-质谱串联检测技术的发展为检测双氰胺的残留提供了痕量检测方法,且专属性强,Macmahon<sup>[8]</sup>和王祖翔<sup>[9]</sup>等人采用HPLC-MS/MS方法测定食品中的双氰胺残留,但两者均采用外标法定量。

为降低不同样品基质对双氰胺检测的影响,达到准确定量的目的,本文通过采用HPLC-MS/MS同位素稀释法来检测定量双氰胺的含量,并通过Water Sep-pak Plus AC-2固相萃取小柱来净化和富集双氰胺。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 试剂与amp;仪器

双氰胺(纯度99%,美国Sigma-Aldrich); $^{15}N_4$ -双氰胺同位素(纯度99.3%,加拿大TRC);乙腈、甲醇、乙酸、甲酸(色谱纯,德国Merck);三氯乙酸(分析纯,上海试剂有限公司);醋酸铵(分析纯,上海试剂有限公司);实验用水为超纯水。

Xevo TQ 超高压液相色谱-质谱联用仪(美国Waters公司);分析电子天平(AL204,瑞士Mettler Toledo);离心机(Allegra 64R,美国Beckman Coulter);涡流混合器(WH-861,江苏太仓市华利达实验设备有限公司);氮吹仪(N-EVAP 112,美国Organomation Associates公司);超声波清洗机(KQ-500E,江苏昆山市超声仪器有限公司);离心管(50 mL,浙江拱东医疗科技有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 实验条件

液相条件:

1) 色谱柱1: Waters Acquity UPLC BEH Amide柱,3.0 mm×150 mm,粒径1.7 μm;柱温:40 °C;样品温度:4 °C;进样体积:5 μL;流动相为A:0.1%甲酸,B:乙腈;线性梯度洗脱条件:0~1.5 min B% 85%,1.5~3.2 min B% 85%~50%,3.2~4.2 min 保持B% 50%,4.2~4.3 min B% 50%~85%,4.3~7.0 min B% 保持85%;流速:0.3 mL/min;总运行时间为7 min。

2) 色谱柱2: Dionex HILIC-10柱,3.0 mm×150 mm,粒径3.0 μm;柱温:40 °C;样品温度:4 °C;进样体积:5 μL;流动相为A:10 mmol/L 乙酸铵,B:乙腈;线性梯度洗脱条件:0~3.5 min B% 97%,3.5~4.0 min B% 97%~60%,4.0~7.0 min 保持B% 60%,7.0~7.5 min B% 60%~97%,7.5~15 min B% 保持97%;流速:0.4 mL/min;总运行时间为15 min。

质谱条件:

质谱扫描方式:多离子反应检测模式检测(MRM);离子源(Source):ESI(+);毛细管电压:2.5 kV,离子源温度:150 °C,脱溶剂气温度:500 °C,碰撞梯度:1.5,脱溶剂气流量:800 L/hr,反吹气流量:30 L/hr,电子倍增电压:650 V,碰撞室压力: $3.0 \times 10^{-3}$  mbar。双氰胺质谱参数详见表1。

#### 2.2.2 样品前处理

提取:称取样品2.0 g于50 mL离心管中,加入18 mL 1%三氯乙酸溶液,超声5 min、涡旋提取1 min后,15000 r/min离心10 min,取上清液。

表1 双氰胺质谱参数  
Table 1 Dicyandiamide MS parameters

化合物	母离子	子离子	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)	驻留时间(s)	保留时间(min)
双氰胺	85.1	67.9*	22	12	0.25	3.49
		42.9	22	20	0.25	3.49
15N <sub>4</sub> -双氰胺	88.9	70.9*	22	12	0.25	3.5
		44.9	22	12	0.25	3.5

注: \*为定量离子

活化: 用 5 mL 乙腈活化, 5 mL 超纯水平衡 Sep-pak Plus AC-2 固相萃取小柱。

净化: 取上述试样上清液 2 mL 转移至小柱上, 再用 10 mL 超纯水洗涤小柱。

洗脱: 20 mL 乙腈:甲醇(60:40, v/v)溶液洗脱, 收集洗脱液, 在 50℃下氮气吹干。用 2.0 mL 初始流动相复溶, 0.22 μm 的微孔滤膜过滤至进样小瓶中, 待测。

### 2.2.3 标准溶液的配制

1. 标准储备液的配制: 准确称取双氰胺 50 mg, 乙腈定容至 250 mL, 得 200 μg/mL 标准储备液; 再用乙腈稀释得到 1 μg/mL 中间储备液, 室温下保存。

2. 同位素标准储备液的配制: 准确称取 <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-双氰胺同位素 5 mg, 甲醇定容至 50 mL, 得 100 μg/mL 标准储备液; 用乙腈稀释得到 1 μg/mL 中间储备液, 室温下保存。

3. 空白基质标准曲线的配制: 取按 2.2.2 部分前处理后的阴性试样作为空白基质, 配制 50、100、200、500、750、1000、1200 μg/kg 的系列基质标准溶液, 其中同位素标记双氰胺浓度为 400 μg/kg。

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱柱的选择

双氰胺易溶于水, 属于有机胺类物质, 分子结构中带有氨基, 结合已报道文献<sup>[8-12]</sup>, 选取了 Waters BEH HILIC、HSS T3 以及 BEH Amide 色谱柱进行考察(图 1)。结果表明, BEH HILIC 和 HSS T3 柱对目标物质保留较弱, 且 BEH HILIC 柱得到的色谱峰欠佳, 而 BEH Amide 柱则有一定程度的保留。其中, 柱径为 3.0 mm 的 Amide 色谱柱对目标化合物有保留且色谱峰峰形、峰宽适宜, 因此首先选择了该色谱柱作为本方法的分离柱。

分析检测奶粉样品时, 发现在 <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-双氰胺的定

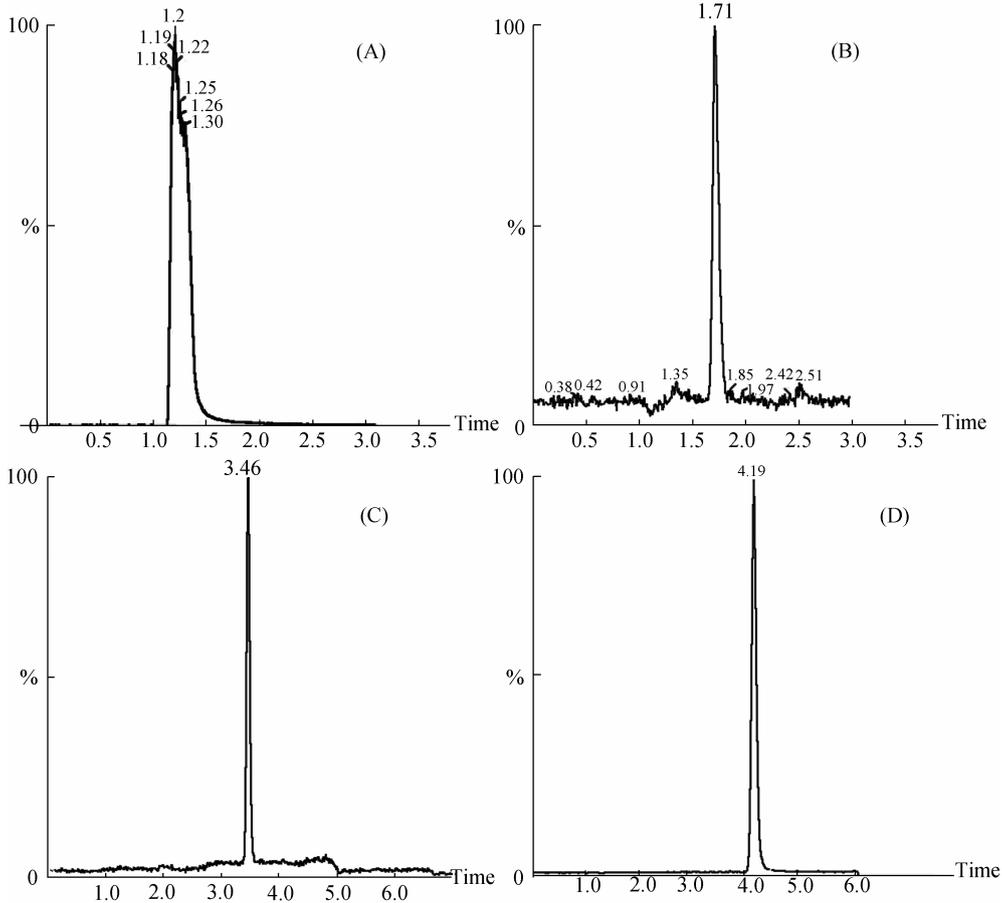
性离子通道仍然出现样品内源性干扰, Amide 色谱柱能分离, 但分离度有待进一步提高, 继而考察了 Dionex HILIC-10 柱。结果表明, HILIC-10 色谱柱可获得更为理想的分离效果(图 2), 并在 10 mmol/L 乙酸铵:乙腈(3:97, v/v)流动相条件下灵敏度与 Amide 相当。但相较于 Amide 色谱柱 0.2 min 的理想峰宽以及 7 min 的快速分析时间, HILIC-10 色谱柱不仅表现出接近 0.4 min 的宽展峰, 而且在使用过程中所需平衡时间较长, 否则易造成保留时间的漂移。

### 3.2 前处理条件的优化

考虑不同配方成分奶粉基质的复杂性, 分别考察了仅蛋白沉淀和蛋白沉淀后用固相萃取柱净化样品两种前处理方法对检测定量的影响。结果显示, 用固相萃取柱净化后得到的样品基质溶液对待测化合物的基质效应较弱, 仅为未通过净化处理的样品基质效应的 1/3。同时, 考察了几种不同固相萃取柱(Waters MCX、WCX 和 Sep-pak Plus AC-2)对样品净化的效果。结果显示, Waters MCX 和 WCX 净化小柱对待测化合物均未起到离子交换作用, 而 Sep-pak Plus AC-2 净化柱对样品起到较好的净化的作用。

### 3.3 线性关系与检出限

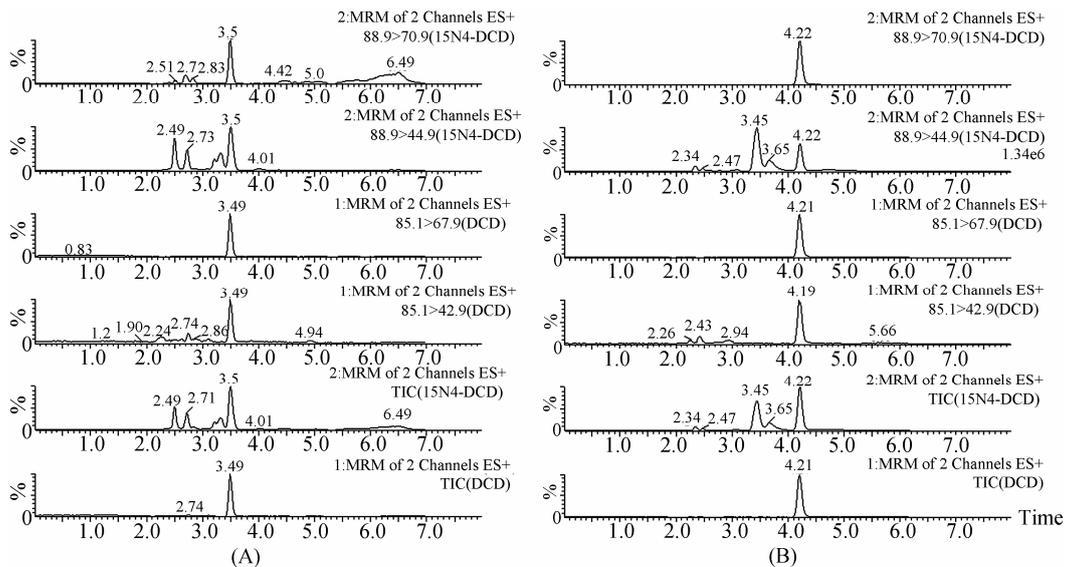
选取原料奶粉、婴幼儿配方奶粉和乳清粉(样品源自相关进口奶粉加工生产企业)按 2.2.2 方法处理得到三种不同样品基质, 与适量的双氰胺和双氰胺同位素标准中间储备液配成一系列不同浓度的基质标准溶液, 在优化的色谱和质谱参数下进样分析, 采用 MRM 多离子监控扫描模式采集信号。以双氰胺和双氰胺同位素定量离子对的峰面积比(Y)与双氰胺浓度(X)绘制标准曲线, 得到线性方程如表 2 所示。结果表明, 在 50~1200 μg/kg 范围内线性关系良好, 定量限与检出限可以满足食品中双氰胺残留量的检测。



(A) BEH HILIC 色谱柱(2.1 mm×100 mm); (B) HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm); (C) BEH AMIDE(3.0 mm×150 mm); (D)Dionex HILIC-10(3.0 mm×150 mm)

图 1 不同色谱柱对双氰胺标准溶液的保留效果及其色谱峰

Fig. 1 The retention effects and the peak of dicyandiamide standard solution with different columns



(A) BEH Amide(3.0 mm×150mm); (B)Dionex HILIC-10(3.0 mm×150mm)

图 2 不同色谱柱对样品中双氰胺的分离情况

Fig. 2 The separation of the dicyandiamide in the sample with different columns

表2 不同基质的线性范围及最低定量限、检出限  
Table 2 The linear range of different substrates, and the lowest limits of quantification and detection

色谱柱	基质名称	标准曲线	相关系数	线性范围( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Amide	原料奶粉	$Y=0.543X+1.283$	0.9997	50 ~ 1200	8	2.5
	配方奶粉	$Y=0.419X+0.8898$	0.9980	50 ~ 1200	17	5
	乳清粉	$Y=0.540X+0.1384$	0.9983	50 ~ 1200	25	8
HILIC-10	原料奶粉	$Y=0.513X+1.016$	0.9980	50 ~ 1200	10	3
	配方奶粉	$Y=0.500X+0.573$	0.9996	50 ~ 1200	9	2.7
	乳清粉	$Y=0.515X+0.3159$	0.9994	50 ~ 1200	10	3

### 3.4 基质效应

液质联用技术具有高灵敏度和高特异性的显著特点, 但由于质谱检测是基于化合物离子化并通过特定的核质比来检测和定量, 因此任何干扰待测物离子化的物质都可能影响检测方法的灵敏度和选择性。为避免基质效应影响数据的准确性, 本实验不仅采用同位素稀释法进行定量, 并采用提取后加入法<sup>[13]</sup>进行基质效应的评价。选取原料奶粉、配方奶粉和乳清粉为考察基质, 分别以 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的同位素双氰胺和 50、200、1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三个浓度点的双氰胺为检测点, 重复测定3次取平均值(见表3), 其中基质效

应因子(matrix factor, MF)是待测化合物与同位素内标响应峰面积的比值, 内标归一化基质效应因子(IS-normalized MF)为待测化合物与同位素内标物基质效应因子的比值。结果表明, 该方法满足食品安全评估检测要求, 采用同位素稀释法定量样品中待测物含量时基质干扰可忽略不计。

### 3.5 回收率与精密度

在 50、200、800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三个加标浓度水平下, 对原料奶粉、配方奶粉、乳清粉三种样品进行加标回收实验, 每个浓度平行实验 5 次, 计算每种样品的加标回收率与所得值的相对标准偏差(表 4)。

表3 不同样品基质效应评价( $n=3$ )  
Table 3 The evaluation of matrix effects of different samples ( $n=3$ )

色谱柱	基质名称	15N <sub>4</sub> -双氰胺(MF)( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	双氰胺(MF)( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			IS-normalized MF
		400	50	200	1000	
Amide	原料奶粉	0.33	0.45	0.31	0.31	1.1
	配方奶粉	0.42	0.39	0.31	0.43	0.9
	乳清粉	0.41	0.46	0.35	0.38	1.0
HILIC-10	原料奶粉	0.53	0.67	0.53	0.51	1.1
	配方奶粉	0.64	0.71	0.61	0.58	1.0
	乳清粉	0.46	0.51	0.43	0.43	1.0

表4 样品中双氰胺的加标回收率与相对标准偏差( $n=5$ )  
Table 4 The mean recoveries and relative standard deviation of dicyandiamide in the sample ( $n=5$ )

加标浓度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		原料奶粉			配方奶粉			乳清粉		
		50	200	800	50	200	800	50	200	800
Amide	回收率%	98.8	107.0	112.0	98.2	101.5	112.3	93.4	99.3	100.2
	RSD%	4.1	3.7	5.6	8.0	5.8	9.2	10.3	4.4	0.9
HILIC-10	回收率%	118.2	121.5	117.3	92.4	99.7	109.3	86.7	101.1	104.9
	RSD%	17.5	15.4	15.9	2.1	14.1	1.8	13.6	2.7	2.4

## 4 结论

本文采用同位素稀释法高效液相色谱-串联质谱联用技术,使用 AC-2 固相萃取小柱对不同基质样品作净化预处理,经 Amide 色谱柱分离,串联三重四极杆的多反应离子监测方式检测,本法可用以应对目前对奶粉中双氰胺残留的监控。该方法快速高效,前处理简单快捷,灵敏度高,其定量准确性与方法的可操作性可以满足日常监测工作的要求。

## 5 致谢

感谢沃特世科技(上海)有限公司在样品预处理优化中提供的技术指导,感谢赛默飞世尔科技(中国)提供的 Dionex HILIC-10 色谱柱。

## 参考文献

- [1] Craymer L. Milk Scare Hits Dairy Power New Zealand[EB/OL]. [http://www.cn.wsj.com/gb/20130125/bas104835\\_ENversion.shtml](http://www.cn.wsj.com/gb/20130125/bas104835_ENversion.shtml).
- [2] 周靖平, 金念祖. 双氰胺及其测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1921-1922.  
Zhou JP, Jin NZ. Dicyandiamide and its determination [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(10): 1921-1922.
- [3] Pretorius DC, Vanstaden JF, Botha ADP. An automated colorimetric method for the determination of cyanoguanidine in water [J]. Water SA, 1991, 4(17): 273-280.
- [4] 中华人民共和国药典[S]. 二部. 北京, 2005.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S], Second part, Beijing, 2005.
- [5] 中华人民共和国药典[M]. 二部. 北京, 2000.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Second part. Beijing, 2000.
- [6] 吴莉, 石蓓佳, 王玉. 反相离子对 HPLC 法测定盐酸二甲双胍中双氰胺的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(2): 110-113.  
Wu L, Shi BJ, Wang Y. Determination of dicyandiamide in metformin hydrochloride by RP Ion-pair HPLC [J]. Chin J Biochem Pharm, 2009, 30(2): 110-113.
- [7] 周长美, 周靖平, 吴健, 等. 高效液相色谱测定工作场所空气中双氰胺方法的验证[J]. 江苏预防医学, 2009, 20(3): 63-64.  
Zhou CM, Zhou JP, Wu J, *et al.* HPLC method for determination of dicyandiamide in workplace air [J]. Jiangsu J Prev Med, 2009, 20(3): 63-64.
- [8] Macmahon S, Begley TH, Diachenko GW, *et al.* A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods [J]. J Chromatogr A, 2012, 1220: 101-107.
- [9] 王祖翔, 蒋俊, 孙莉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的尿素、缩二脲与双氰胺[J]. 分析测试学报, 2012, 31(5): 593-599.  
Wang ZX, Jiang J, Sun L, *et al.* Determination of Urea, Biuret and Dicyandiamide in Foods by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(5): 593-599.
- [10] The Commission of the European Communities 2002/657/EC[S]. 2002.
- [11] 吴莉, 石蓓佳, 王玉. HPLC-MS/MS 测定盐酸苯乙双胍及片剂中双氰胺的含量[J]. 中国药学杂志, 2010, (10): 780-783.  
Wu L, Shi PJ, Wang Y. Determination of dicyandiamide in phenformin hydrochloride and phenformin hydrochloride tablets by HPLC-MS/MS [J]. Chin Pharm J, 2010, (10): 780-783.
- [12] Turowski M, Deshmukh B. Direct Chromatographic Method for Determination of Hydrogen Cyanamide and Dicyandiamide in Aqueous Solutions [J]. Anal Lett, 2004, 9(37): 1981-1989.
- [13] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3019-3030.

(责任编辑: 赵静)

## 作者简介



许娇娇, 硕士, 主要研究方向为卫生理化检验。  
E-mail: jjxucdc@163.com



任一平, 本科, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全化学检验技术。  
E-mail: renyiping@263.net