

亲水相互作用液相色谱法测定奶粉中双氰胺

LC-091

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。

实验部分

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-20A3R 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。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: GL Inertsil HILIC 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°C

检测波长: 218 nm (波长范围: 190~370 nm)

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 0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、5 mg/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。1 g 奶粉，用 2 mL 60°C 的热水溶解，加入约 8 mL 乙腈定容到 10 mL，漩涡混合 2 min，于 4000 rpm 离心 10 min。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 0.22 μm 针式过滤器过滤后进样。

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。

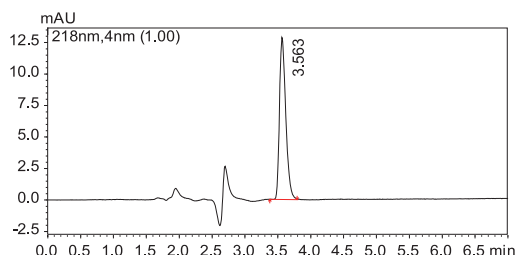


图 1 1 mg/L 标准溶液的色谱图

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。

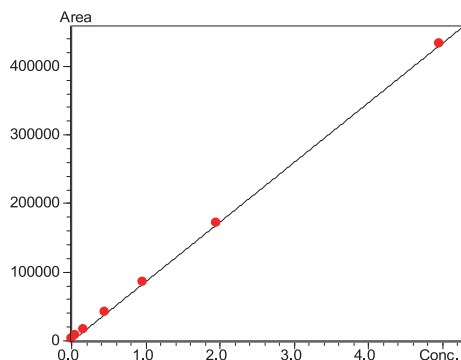


图 2 双氰胺的标准工作曲线

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。

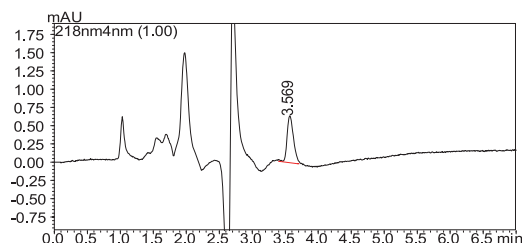


图 3 0.05 mg/L 标准溶液的色谱图

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 2 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。

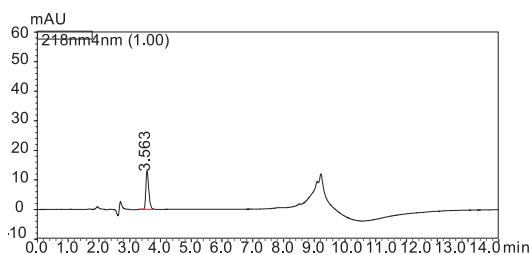


图 4 1 mg/L 标准溶液的色谱图(全部采集时间)

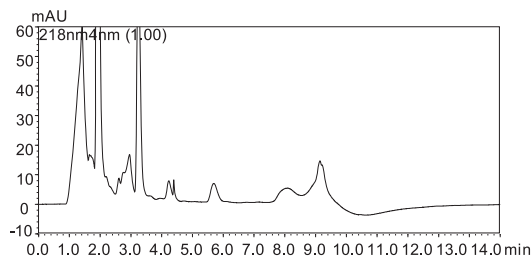


图5 奶粉空白样品的色谱图

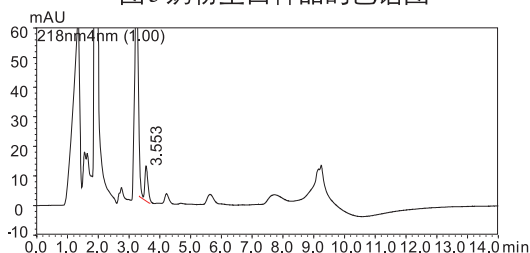


图6 2 mg/kg 奶粉加标样品的色谱图

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。