同位素稀释内标 GC-MS/MS 法分析乳粉中三聚氰酸

李东刚，李春娟，鞠福龙，刘敬东
(黑龙江省质量监督检测研究院，黑龙江 哈尔滨 150050)

摘 要：建立以三聚氰酸-^{13}C为内标，利用三重四极杆气相色谱质谱联用(GC-MS/MS)的多反应监测(MRM)技术分析乳粉中三聚氰酸的方法。三聚氰酸以甲醇提取，利用衍生化试剂BSTFA(99%)-TMCS(1%)进行衍生化处理、分析三聚氰酸衍生物的裂解规律、考察基质效应，以三聚氰酸-^{13}C为内标、利用多反应监测(MRM)技术定量分析，三聚氰酸的定性定量离子对为*m/z* 345＞215、345＞330，对应的三聚氰酸-^{13}C衍生物的离子对为*m/z* 348＞217、348＞333。以*m/z* 345＞215与*m/z* 348＞217的峰面积比值进行定量，方法在0.010～0.50mg/L范围内呈良好线性关系。三聚氰酸的检测限为0.014mg/kg，精密度为3.4%～4.8%，回收率为90.0%～102.5%，以能力验证和外标法对此方法进行考察，数据表明方法准确、可靠。

关键词：同位素稀释质谱法；多反应监测；衍生化；三聚氰酸；乳粉

Analysis of Cyanuric Acid in Milk Powder by Gas Chromatography Tandem Triple Quadruple Mass Spectrometry with an Isotopic Internal Standard

LI Dong-gang，LI Chun-juan，JU Fu-long，LIU Jing-dong
(Heilongjiang Academy of Quality Inspection and Research, Harbin 150050, China)

Abstract：The method for analyzing cyanuric acid in milk powder by gas chromatography tandem triple quadruple mass spectrometry (GC-MS/MS) with an isotopic internal standard and a multiple-reaction monitoring (MRM) system was established. The milk powder samples were extracted by methanol, and derivatized with BSTFA+TMCS (1%). The optimal parameters for instruments, matrix effects, fragment pathways of cyanuric acid derivatives and MRM scanning modes were explored. The ion peaks of cyanuric acid were *m/z* 345＞215 and *m/z* 345＞330 for qualitative and quantitative analysis, which was consistent with the ion peaks of isotopic internal standard with *m/z* 345＞215 and *m/z* 348＞217. The linear range of the developed method was between 0.010 mg/L and 0.50 mg/L and limit of detection was 0.014 mg/kg (R_{SN}= 3). The relative standard deviations of the developed method varied between 3.4% and 4.8% and the average recovery rates of cyanuric acid from spiked samples between 90.0% and 102.5% in the range of 0.20 mg/kg to 2.0 mg/kg. The validation results and comparison with external standard method revealed that the developed method was accurate and reliable.

Key words：isotopic dilution mass spectrometry；multiple-reaction monitoring (MRM)；derivation；cyanuric acid；milk powder

中图分类号：O658 **文献标识码：**A **文章编号：**1002-6630(2011)10-0227-05

三聚氰酸(cyanuric acid)，分子式为$C_3H_3N_3O_3$[1]，又称氰尿酸，有两种互变异构体，其分子结构见图1，主要用于有机合成，与三聚氰胺结构类似，同属非蛋白类含氮有机化学品，而非食品添加剂。WHO[2]的资料和文献[3]显示三聚氰酸具有一定危害，作为一种非食用物质，我国已禁止将其掺入到食品中。分析乳粉三聚氰酸的方法有气质联用法[4-7]，液相色谱-质谱联用法[8-10]。采用外标法，质谱仪器条件的变化、基质效应、样品处理过程、环境条件等均会影响定量准确性；内标法在一定程度上能改善外标法的不足，但内标物的结构、性质和质谱特征也会影响定量分析结果。实验综合外标法和内标法的影响，利用同位素与待测物色谱保留行为一

收稿日期：2010-08-11
作者简介：李东刚(1976－)，男，高级工程师，本科，主要从事色谱质谱应用技术研究。E-mail：lidg86@yahoo.com.cn
© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

致、溶解性质一致以及质谱规律相近的特点，以三聚氰酸-^{13}C同位素(分子式为$^{13}C_3H_3N_3O_3$，分子结构见图2)为内标，利用N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(简称BSTFA)对三聚氰酸进行衍生化，质谱多反应监测(multiple reaction monitoring，MRM)分析乳粉中三聚氰酸，并利用能力验证[9]和方法比对考察方法的效果。

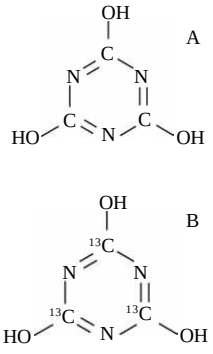

图1 三聚氰酸(A)和三聚氰酸-^{13}C(B)的结构

Fig.1 Structure of cyanuric (A) acid and cyanuric acid-^{13}C (B)

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

婴幼儿1段、2段、3段乳粉、全脂乳粉、中老年乳粉 市售。

三聚氰酸标准品(纯度＞99.0%) 德国Dr Ehrenstorfer公司；三聚氰酸同位素标准品(^{13}C原子丰度＞99%) 德国Witega公司；BSTFA(99%)-TMCS(1%)衍生化试剂 美国Regis公司；甲醇、吡啶均为色谱纯。

Varian 320-MS气相色谱质谱联用仪(配CP-8400型自动进样器) 美国瓦里安公司；VF-5MS色谱柱(30m×0.25mm，0.25μm) 美国安捷伦公司；BT25S十万分之一电子天平 北京赛多利斯公司；KQ5200DE超声波提取仪 昆山市超声仪器有限公司；XK96-A快速混匀器 姜堰市辛康医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 溶液的配制

内标溶液：称取0.01g(精确至0.01mg)三聚氰酸-^{13}C于50mL容量瓶中，加入甲醇超声溶解，定容，此溶液中三聚氰酸-^{13}C质量浓度为200mg/L；并以甲醇稀释成20.0mg/L内标溶液。

三聚氰酸标准工作溶液：称取0.01g(精确至0.01mg)三聚氰酸标准品于50mL容量瓶中，加入甲醇超声溶解，配制成三聚氰酸标准储备溶液，该溶液中三聚氰酸质量浓度为200mg/L；然后以甲醇稀释成10.0mg/L次级储备液。移取一定量的10.0mg/L次级储备液，以甲醇逐级稀释成含三聚氰酸0.010、0.020、0.050、0.10、0.20、0.50mg/L标准工作溶液，并在其中准确加入一定体积内标溶液，使每个标准工作溶液中三聚氰酸-^{13}C质量浓度均为0.20mg/L。

1.2.2 仪器条件

色谱条件：载气：氦气(99.9995%)；柱流速：1.0mL/min；汽化室温度：260℃；进样方式：不分流；进样量：1.0μL；柱温程序：初始温度90℃，保持1min，以12℃/min速率升温至200℃，保持14min，在该色谱条件下，三聚氰酸衍生物的色谱保留时间为9.50min。

质谱条件：传输线温度：240℃；离子源温度：240℃；离子化方式：EI；电离能量：70eV；溶剂延迟时间：6min；质谱采集时间：16min；EDR电压：1200V；碰撞气：高纯氩气(纯度为99.999%)；碰撞气压力：1.5mtorr；质谱扫描方式：多反应监测(MRM)；三聚氰酸衍生物母离子*m/z* 345；子离子*m/z* 330、215；三聚氰酸-^{13}C衍生物母离子*m/z* 348，子离子*m/z* 333、217。

1.2.3 样品处理

1.2.3.1 样品提取

称取均匀乳粉样品0.5g(精确至0.1mg)于10mL具塞比色管中，加入50μL三聚氰酸-^{13}C内标溶液，并加入5.0mL甲醇，先涡旋混合2min，再以超声波提取25min，最后以5000r/min转速离心，收集清液并过0.45 μm滤膜，制得提取液，此溶液中三聚氰酸-^{13}C质量浓度为0.20mg/L。

1.2.3.2 衍生化

取200μL样品提取液或标准工作溶液加入到自动进样瓶中，在60℃水浴下以氮气吹扫至干；再加入300μL吡啶，涡旋5s溶解残渣，再加入衍生化试剂200μL，涡旋5s，盖好密封，置于70℃干燥箱内衍生处理45min，取出冷至室温待测，同时作空白实验。

2 结果与分析

2.1 提取方法的选择

2.1.1 提取溶剂

FDA方法[5]和文献[6]以二乙胺-水-乙腈作为提取溶剂，对于乳粉体系，发现该提取溶剂与乳粉的分散效果不够理想，本实验依据文献[4]和三聚氰酸的溶解性，利用水、甲醇、乙腈和一定组成的水-甲醇、水-乙腈等不同溶剂对三聚氰酸溶解性进行实验，考察提取溶剂对乳粉的分散效果。实验选定甲醇为提取溶剂，一方面甲醇对三聚氰酸具有良好的溶解性，另一方面甲醇与乳粉具有良好的分散效果，便于分离。

2.1.2 提取方法

涡旋混合和超声波提取是常用的提取技术，为提高

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

提取效率，实验将旋涡混合提取和超声波提取配合使用作为乳粉中三聚氰酸的提取方法。参照文献[4]和实验，确定提取条件为涡旋混合2min、超声提取25min。

2.2 三聚氰酸、三聚氰酸-^{13}C衍生物的质谱分析

2.2.1 一级质谱(SCAN)

依据三聚氰酸与BSTFA衍生化反应机理，三聚氰酸、三聚氰酸-^{13}C衍生物结构和全扫描质谱图分别见为图2。全扫描质谱图显示，三聚氰酸衍生物主要碎片离子为*m/z* 345、346、347、330、147、73；三聚氰酸衍生物含3个氮原子，其相对分子质量为345，根据氮律，判断出三聚氰酸衍生物*m/z* 345为分子离子峰，*m/z* 346、347则为其同位素离子峰。

主要碎片离子产生过程：*m/z* 330由分子离子峰发生*α*碎裂，失去三甲基硅基[—Si(CH$_3$)$_3$]上的甲基(—CH$_3$)而成；*m/z* 330发生重排和消去反应，分别产生三甲基硅基[Si(CH$_3$)$_3$]自由基和二甲基硅氧基[O=Si(CH$_3$)$_2$]自由基，两者结合生成(CH$_3$)$_2$Si=O—Si(CH$_3$)$_3$离子，即碎片离子*m/z* 147，而*m/z* 73则为*m/z* 345发生*α*碎裂失去的三甲基硅离子[—Si(CH$_3$)$_3$]。

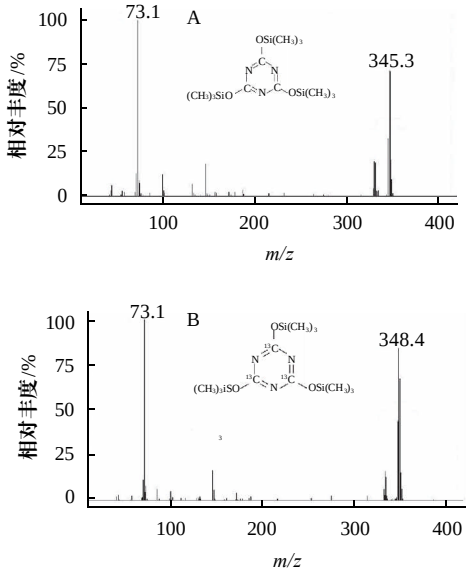

图2 三聚氰酸衍生物(A)和三聚氰酸-^{13}C(B)的衍生物结构和质谱图

Fig.2 Structure and mass spectrogram of cyanuric acid derivative (A) and cyanuric acid-^{13}C derivative (B)

2.2.2 选择反应监测(selected reaction monitoring, SRM)和多反应监测

利用选择反应监测研究三聚氰酸衍生物母离子*m/z* 345的碎裂规律，在碰撞能为5V条件下，采集*m/z* 100～350范围内的碎片离子。三聚氰酸衍生物SRM质谱中的主要碎片离子为*m/z* 147、215、330(由于*m/z* 73质荷比较低未选用其用于定性定量)，对应三聚氰酸-^{13}C衍生物为*m/z* 147、217、333。通过对乳粉基体的分析，*m/z* 215、330基体干扰较小；而*m/z* 147碎片离子虽然灵敏度高，但存在较严重的基体干扰，质量色谱图分离效果差。最终确定三聚氰酸衍生物的定性离子对为*m/z* 345＞330、345＞215，对应三聚氰酸-^{13}C *m/z* 348＞333、348＞217，并以*m/z* 345＞215作为定量离子，对应其衍生物为*m/z* 348＞217。

定性方法采用与标准物质比较，在多反应监测(MRM)色谱图中，保留时间变化在2.5%，离子对相对丰度比例变化在20%范围内即可定性确认。

2.2.3 三聚氰酸、三聚氰酸-^{13}C衍生物多反应监测碰撞能的优化

利用多反应监测(MRM)扫描技术，分别测定*m/z* 345＞215、330在3、5、10、15、20、25、30V碰撞能下的离子对峰面积，以离子最大峰面积确定最优碰撞能。实验结果表明：三聚氰酸衍生物离子对*m/z* 345＞215、330的最优碰撞能均为5V。在此条件下，*m/z* 215与*m/z* 330离子对的相对丰度比例为63/100。

在上述仪器条件下，标准样品和典型样品的MRM质量色谱图见图3。

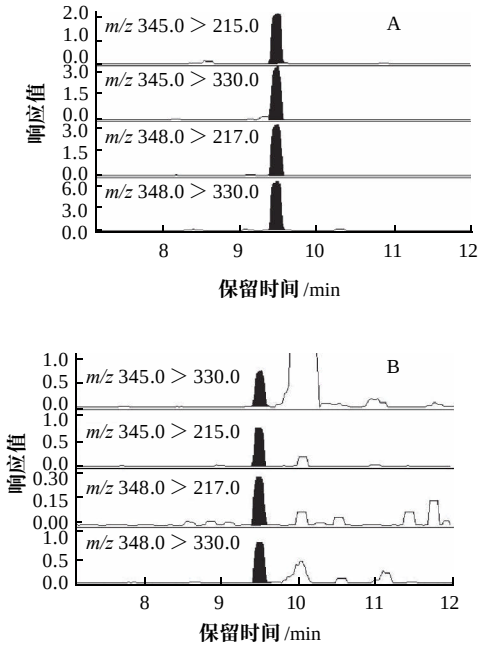

图3 三聚氰酸衍生物(A)和乳粉样品(B)的MRM质量色谱图

Fig.3 MRM mass chromatogram of cyanuric acid derivative (A) and milk powder sample (B)

2.3 乳粉基质对分析三聚氰酸的影响

2.3.1 基质匹配标准系列

实验选定婴幼儿1段乳粉、2段乳粉、3段乳粉、

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

全脂乳粉、中老年乳粉作为基体，考察不同基体对分析三聚氰酸的影响。通过检测，筛选出不含三聚氰酸的上述5种乳粉，配制标准工作溶液，利用三聚氰酸与三聚氰酸-^{13}C衍生物定量离子峰面积S的比值K对三聚氰酸质量浓度(C)绘制标准工作曲线，实验结果见表1。

表1 不同基质下的标准工作系列线性方程和相关系数

Table 1 Linear equations and correlation coefficients of detection for cyanuric acid using different matrixes

基质类型	质量浓度范围/(mg/L)	三聚氰酸线性方程	相关系数
甲醇	0.010～0.50	K=2.54C＋0.011	0.9991
1段乳粉	0.010～0.50	K=2.51C＋0.023	0.9990
2段乳粉	0.010～0.50	K=2.58C－0.020	0.9989
3段乳粉	0.010～0.50	K=2.51C＋0.008	0.9997
全脂乳粉	0.010～0.50	K=2.56C＋0.011	0.9988
中老年乳粉	0.010～0.50	K=2.52C＋0.018	0.9990

不同基体的相关性方程斜率变异系数为1.1%，相关系数平均值为0.9991。表明不同基质的标准工作曲线相关性好；与甲醇相比，5种乳粉基质相关性方程的斜率与甲醇一致，表明同位素稀释内标技术分析三聚氰酸的基质效应小。此外，本方法数据优于文献[4]数据(相关性方程斜率精密度为1.7%，相关系数平均值为0.9982)。

2.3.2 空白基质加标实验

为进一步考察基质对三聚氰酸影响，选用经检测不含三聚氰酸的空白乳粉基质加入三聚氰酸和三聚氰酸-^{13}C，基质加标水平为0.020mg/kg。实验表明，检测限含量水平的空白基质加标的质量色谱图中三聚氰酸有良好的信噪比，表明基质效应小，结论与文献[4]一致。

2.4 方法的线性、检测限、精密度和回收率

2.4.1 标准工作曲线、线性范围和检测限

按照上述方法，在0.01～0.50mg/L范围内，以三聚氰酸衍生物m/z 215与三聚氰酸-^{13}C衍生物m/z 217定量离子的峰面积S的比值K对质量浓度C作图，绘制标准工作曲线，计算相关系数，实验数据见表1。数据显示，方法在0.01～0.50mg/L范围内呈良好线性。以信噪比R_{SN}=3，三聚氰酸的最小检测量为0.0014mg/L，根据实验过程，三聚氰酸的方法检测限为0.014mg/kg。

2.4.2 精密度和回收率实验

分取制备均匀的婴幼儿配方乳粉样品18份，其中6份做空白实验，考察本底值；12份作添加实验，其中的6份添加量均为0.20mg/kg，另6份添加量均为2.00mg/kg。利用上述方法进行提取测定，以扣除空白的实测添加值相对标准偏差表征方法的精密度，以扣除空白的实测添加值与实际添加值的比值作为回收率，实验数据见表2。

添加实验的回收率为90.0%～102.5%，在高低两个添加水平上平均回收率分别为94.6%和96.8%，精密度在3.4%～4.8%之间，方法的回收率和精密度均满足分析要求，而外标法[4]的平均回收率分别为95.6%、93.7%、精密度在4.5%～8.6%。因此，回收效果与文献[4]相当，而精密度指标则有所改进。由此可见，采用内标法较外标法能有效的克服仪器条件、基质、操作过程和环境条件等因素的影响，能够改善重复性测定效果。

2.5 方法的考察

2.5.1 能力验证

能力验证是实验室质量保证和评价实验室检测能力的一种重要方式，稳健统计技术[11]是数据处理中常用的技术手段，利用该统计技术评价实验室Z比分数，$|Z| \leq 2$为满意结果。本实验室参加了乳粉中三聚氰酸能力验证计划(编号为CNCA-09-08A-02)，并以此提交了数据，实验结果分别为2.23、4.08mgkg，评价结果为实验室间Z_B=1.34，实验室内Z_W=0.17；评价结论为满意，表明方法准确、可靠。

2.5.2 与外标法[4]比对

利用本方法、外标法[4]对编号为1#～4#的4个乳粉样品以及5#(2#样品添加三聚氰酸，添加水平为2.00mg/kg)、6#(3#样品添加三聚氰酸，添加水平为4.0mg/kg)进行分析，每个样品均重复测定两次，得到本方法平均结果X_2和外标法平均结果X_1，按$\Delta X=X_2-X_1$计算偏差、$R=\Delta X/X_1$计算相对偏差，数据见表3。

利用t检验[12]对数据进行分析，$t=\Delta\overline{X}\sqrt{n}/s$，其中$n$为自由度($n$=5)，$\Delta\overline{X}$=0.015，标准偏差$s$=0.072，计算

表2 三聚氰酸的回收率、精密度实验结果(n=6)

Table 2 Recovery rates and precision of in milk powder samples spiked with cyanuric acid (n=6)

序号	本底实验			加标水平1(0.20mg/kg)			加标水平2(2.00mg/kg)		
	三聚氰酸/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	精密度/%	实测添加值/(mg/kg)	回收率/%	精密度/%	实测添加值/(mg/kg)	回收率/%	精密度/%
1	0.263	0.259	4.2	0.181	90.5	4.8	2.04	102.0	3.4
2	0.248			0.192	96.0		1.93	96.5	
3	0.265			0.186	93.0		1.89	95.0	
4	0.271			0.205	102.5		1.86	93.0	
5	0.243			0.191	95.5		1.90	95.0	
6	0.262			0.180	90.0		1.98	99.0	

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

得 $t_{实验值}$=0.47；取置信水平 α=95%，查表得 $t_{临界}$=2.57，$t_{实验值} < t_{临界}$，表明内标法和外标法数据无显著性差异。通过能力验证的数据以及本方法与外标方法的比对分析，表明方法可靠准确。

表 3 方法比对数据

Table 3 Comparison results of different methods

样品	X_1/(mg/kg)	X_2/(mg/kg)	ΔX/(mg/kg)	R/%
1#	未检出	未检出	—	—
2#	0.713	0.736	0.023	3.2
3#	2.28	2.20	−0.08	−3.5
4#	1.31	1.33	0.020	1.5
5#	4.69	4.83	0.14	3.0
6#	0.272	0.259	−0.013	−4.8

3 结 论

以三聚氰酸-^{13}C同位素为内标，利用三重四极杆气质联用(GC-MS/MS)的多反应监测(MRM)分析乳粉三聚氰酸，探讨三聚氰酸-BSTFA衍生物主要碎片离子的产生机理，并从基质效应、线性相关性、精密度、回收率和检测限等做了评价。实验数据表明，内标法的相关性方程斜率的精密度、相关系数和方法的精密度等指标优于外标法；采用同位素内标法还可校正仪器条件、基质的变化、样品处理过程以及环境条件的影响，提高准确性；此外，通过能力验证和和外标法的考察，证明了方法的可靠性，为分析乳粉三聚氰酸提供了同位素内标的定性定量分析方法。

参考文献：

[1] 王箴. 化工词典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 795.

[2] WHO. Melamine and cyanuric acid: toxicity, preliminary risk assessment and guidance on levels in food [EB/OL]. (2008-09-25)[2008-12-10].http://www.who.int/entity/foodsafaty/fs_management/infosan_events/en/index.htmL.

[3] OSBORNE C A, LULICH J P, ULRICH L K, et al. Melamine and cyanuric acid-induced crystalluria, uroliths, and nephrotoxicity in dogs and cats[J]. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 2009, 39(1): 1-14.

[4] 李东刚, 鞠福龙, 李春娟. 三重四极杆气质联用法分析乳粉中三聚氰酸和三聚氰胺[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 180-184.

[5] FDA. GC-MS screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid[EB/OL].(2008-10-28)[2008-12-10]. http://www.fda.gov/cvm/gcmsmelamine.htmL.

[6] MIAO Hong, FAN Sai, WU Yongning, et al. Simultaneous determination of melamine, ammelide, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2009, 22(2): 87-94.

[7] 左海根. 大米蛋白粉中三聚氰酸及其类似物的硅烷衍生化GC/MS检测方法研究[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 201-205.

[8] FDA. Interim method for determination of melamine and cyanuric acid residues in foods using LC-MS/MS: version 1.0[EB/OL]. (2008-10-19)[2008-12-10]. http://www.cfsan.fda.gov/～frf/lib4422.htmL.

[9] FDA. Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS[EB/OL].(2008-10-17)[2008-12-10].http://www.cfsan.fda.gov/～frf/lib4421.htmL.

[10] 吴彩梅, 白洁, 贾刚, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定鸡肉及组织中的三聚氰胺和三聚氰酸[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 185-192.

[11] CNAS-GL02 能力验证结果的统计处理和能力评价指南[S].

[12] 许禄. 化学计量学方法[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 9.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net