

# LC-MS/MS 内标法测定乳制品中的三聚氰酸

邢丽红, 孙伟红, 苗钧魁, 谭志军, 冷凯良\*

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 建立快速测定乳制品中三聚氰酸残留量的高效液相色谱-串联质谱分析方法。用乙腈和水提取样品中的三聚氰酸, 乙腈二次去蛋白, 10000r/min 离心后, 以电喷雾离子源负离子多反应监测模式进行质谱分析, 内标法定量。三聚氰酸在 0.005~0.2 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数  $r > 0.999$ 。在空白样品中添加三聚氰酸的平均回收率在 91.7%~99.6% 之间, 相对标准偏差  $< 10\%$ 。液态奶类样品和奶粉的定量限均为 0.2 mg/kg。

**关键词:** 乳制品; 三聚氰酸; 液相色谱-串联质谱

## Determination of Cyanuric Acid in Dairy Products by HPLC-MS/MS

XING Li-hong, SUN Wei-hong, MIAO Jun-kui, TAN Zhi-jun, LENG Kai-liang\*

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** A sensitive HPLC-MS/MS method with high selectivity was developed for the determination of cyanuric acid residues in dairy products. Cyanuric acid in samples was extracted into acetonitrile/water system. The extract was deproteinized by adding additional acetonitrile, followed by high-speed centrifugation, before HPLC-MS/MS analysis in the internal standard mode. Electrospray ionization was applied and operated in the negative ion mode. An excellent linear range of this method for the determination of cyanuric acid was 0.005—0.2 μg/mL with a correlation coefficient of more than 0.999. The average recovery rates in dairy products spiked with standard material at concentration levels of 0.2, 0.5, 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg were in the range of 91.7% to 99.6% with relative standard deviations less than 10%. The limit of detection of this method was 0.2 mg/kg.

**Key words:** dairy products; cyanuric acid; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)04-0143-05

三聚氰酸(cyanuric acid, CYA), 属于三嗪类含氮杂环有机化合物, 学名 1,3,5-三嗪-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)三酮、*S*-三嗪-2,4,6-三醇、2,4,6-三羟基-1,3,5-三嗪, 分子式  $C_3H_3N_3O_3$ , 相对分子质量 129.07, 简称氰尿酸、异氰脲酸。工业上用于有机合成氰尿酸-甲醛树脂、涂料、黏合剂、农药除草剂、金属氧化缓蚀剂、高分子材料改性剂和用于药物卤三羟嗪的生产, 此外可作为游泳池的氯稳定剂<sup>[1]</sup>。

对三聚氰酸的毒理学研究表明, 三聚氰酸的急性毒性作用很低, 体内为惰性代谢, 大部分以原型从尿液中排出, 三聚氰酸大鼠经口  $LD_{50}$  为 7700 mg/kg, 家兔经皮  $LD_{50}$  为 1000 mg/kg, 属于低毒和实际无毒级物质<sup>[2-3]</sup>。大剂量作用时, 主要对肾脏产生毒性, 同时还可对心脏等肾脏以外的器官产生毒性作用, 且对雄性动物的毒性大于雌性动物<sup>[4-7]</sup>。三聚氰酸还可由三聚氰胺水解生

成, 当三聚氰酸和三聚氰胺在酸性条件下同时存在时, 容易形成结晶, 导致肾结石的发生。

目前, 三聚氰酸主要的检测方法有气相色谱-质谱法<sup>[8-11]</sup>、高效液相色谱法<sup>[1,12-13]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[14-15]</sup>等。高效液相色谱法采用紫外检测器检测, 灵敏度较差, 且无法确证, 不能满足残留检测的要求, 一般作为筛选方法。GC-MS 法虽可对目标物进行确证, 但需对样品进行衍生化, 操作比较繁琐, 且灵敏度较差。LC-MS/MS 法不需衍生, 前处理操作简单, 是理想的的确证方法。本实验旨在建立 LC-MS/MS 内标法快速测定乳制品中三聚氰酸的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

市售鲜牛奶、酸奶、奶粉, 购于青岛。

收稿日期: 2010-04-08

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2009-CB-02); 国家“863”计划项目(2008AA100805)

作者简介: 邢丽红(1981—), 女, 研究实习员, 硕士, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: xinglh@ysfri.ac.cn

\* 通信作者: 冷凯良(1966—), 男, 高级工程师, 本科, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: lengkl@ysfri.ac.cn

三聚氰酸标准品(纯度98.5%) Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司; 氘代三聚氰酸内标标准品(100  $\mu\text{g/mL}$ ) 美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司; 乙腈(色谱纯) 美国 Merck 公司; 水为超纯水; Oasis MAX 固相萃取柱 (60mg, 3mL) 美国 Waters 公司; HR-XA 固相萃取柱 (60mg, 3mL) Chromabond 公司; PAX 固相萃取柱 (60mg, 3mL) 艾杰尔公司。

## 1.2 仪器与设备

TSQ Quantum Access 液相色谱-串联质谱仪 赛默飞世尔科技有限公司; CR 22G 冷冻离心机 日本日立公司; 小型高速离心机 美国 Sigma 公司; KQ-600DE 超声波清洗器 江苏昆山超声仪器有限公司; 涡旋混合器 美国 Talboys 公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 样品处理

液态奶类样品: 称取约 1g 样品, 加入适量氘代三聚氰酸内标, 再加入 8mL 乙腈, 用水定容至 10mL, 充分涡旋混合 1min, 超声 20min, 10000r/min 离心 10min, 取上清液 500  $\mu\text{L}$  于 2mL 塑料离心管, 再加入 500  $\mu\text{L}$  乙腈, 充分涡旋混合 1min, 14000r/min 离心 10min, 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机相微孔滤膜, 供 LC-MS/MS 测定。

奶粉: 称取约 1g 样品, 加入适量内标, 再加入 8mL 乙腈和 2mL 水, 充分涡旋混合 1min, 超声 20min, 10000r/min 离心 10min, 取上清液 500  $\mu\text{L}$  于 2mL 塑料离心管, 再加入 500  $\mu\text{L}$  乙腈, 充分涡旋混合 1min, 14000r/min 离心 10min, 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机相微孔滤膜, 供 LC-MS/MS 测定。

### 1.3.2 仪器条件

色谱条件: PC HILIC(2.0mm  $\times$  150mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 进样量: 10  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 室温; 流动相: 乙腈-水=(90:10, V/V), 等度洗脱。

质谱条件: 离子化模式: 大气压喷雾离子源 (ESI), 负离子模式; 喷雾电压: 3500V; 鞘气压力: 30L/min, 辅助气流量: 15L/min; 离子传输毛细管温度: 300  $^{\circ}\text{C}$ ; 源内诱导解离电压: 10V; 碰撞压力: 氩气, 1.5mTorr; 扫描模式: 选择反应监测 (SRM), 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 1。

表 1 SRM 模式下三聚氰酸质谱测定的特征离子

Table 1 Characteristic ions for MS determination of cyanuric acid

目标化合物	分子式	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	碰撞能量/eV
三聚氰酸	$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_3$	128.0	42.5 84.7*	17 11
三聚氰酸- $^{13}\text{C}_3$	$^{13}\text{C}_3\text{H}_3^{15}\text{N}_3\text{O}_3$	134.0	44.7*	17

注: \*. 定量碎片离子。

### 1.3.3 标准工作液的配制

准确称取三聚氰酸标准品 0.01g, 用乙腈溶解并定容至 10mL, 配成 1mg/mL 母液。将 0.1mg/mL 氘代三聚氰酸内标储备液用乙腈稀释 0.01mg/mL 中间液。将 1mg/mL 母液三聚氰酸和氘代三聚氰酸内标溶液用乙腈稀释成三聚氰酸的质量浓度分别为 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2  $\mu\text{g/mL}$ , 氘代三聚氰酸内标质量浓度为 0.25  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作溶液, 进行 LC-MS/MS 测定。

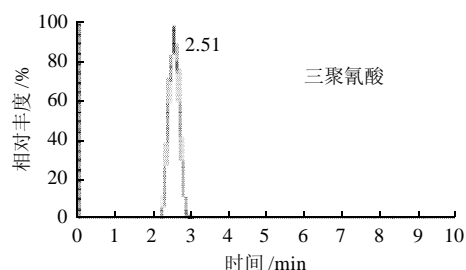
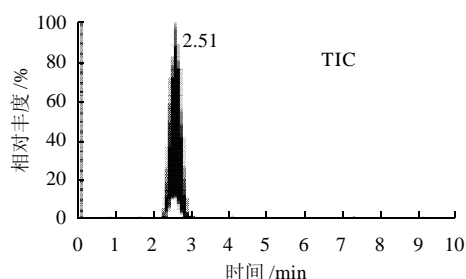
## 2 结果与分析

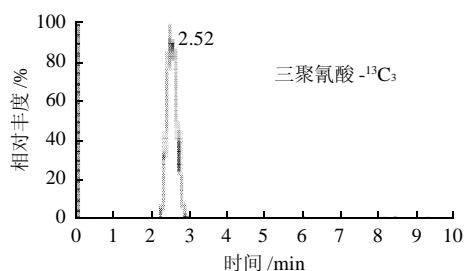
### 2.1 质谱条件的优化

采用针泵流动注射三聚氰酸标准溶液, 在  $m/z$  100~150 扫描范围内以 ESI 负离子模式进行母离子全扫描, 确定三聚氰酸的分子离子  $[\text{M}-\text{H}]^-$  为  $m/z$  128。然后, 以  $m/z$  128 为母离子, 对其子离子进行全扫描, 主要产生  $m/z$  42.5、84.7 等子离子。其中  $m/z$  84.7 为三聚氰酸开环分子重排失去 CNO 的碎片离子峰 ( $[\text{M}-\text{H}-\text{CNO}]^-$ ),  $m/z$  42.5 为碎片离子峰 ( $[\text{CNO}]^-$ )。选取丰度最强的子离子  $m/z$  84.7 和  $m/z$  42.5 作为三聚氰酸的监测离子, 最后以选择反应监测 (SRM) 负离子模式优化锥孔电压 (skimmer offset)、碰撞能量 (collision energy) 等质谱参数, 优化后的质谱条件见表 1。三聚氰酸以子离子  $m/z$  84.7 和  $m/z$  41.5 及二者的相对丰度比来定性, 以子离子  $m/z$  84.7 为定量离子, 以色谱峰面积按内标法定量。

### 2.2 色谱条件的优化

三聚氰酸含有三个有机氮基团, 属于强极性化合物, 色谱柱的选择至关重要。分别研究 Agilent Inertsil ODS-3、Zorbax SB-C<sub>18</sub>、Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 和 PC HILIC 色谱柱, 结果发现, 三聚氰酸在普通 C<sub>18</sub> 反相色谱柱上峰形较宽, 保留较差, 强度较低, 见图 1。



图1 三聚氰酸在C<sub>18</sub>色谱柱上的色谱图Fig.1 Chromatogram of cyanuric acid in C<sub>18</sub> Column

根据化合物的性质特点, 本实验选择了既具有离子交换、又具有反相分离特点的PC HILIC色谱柱进行分离, 三聚氰酸能够在此色谱柱上较好的保留, 峰形比较尖锐, 强度较高, 并具有良好的重现性和适宜的保留时间, 见图2。

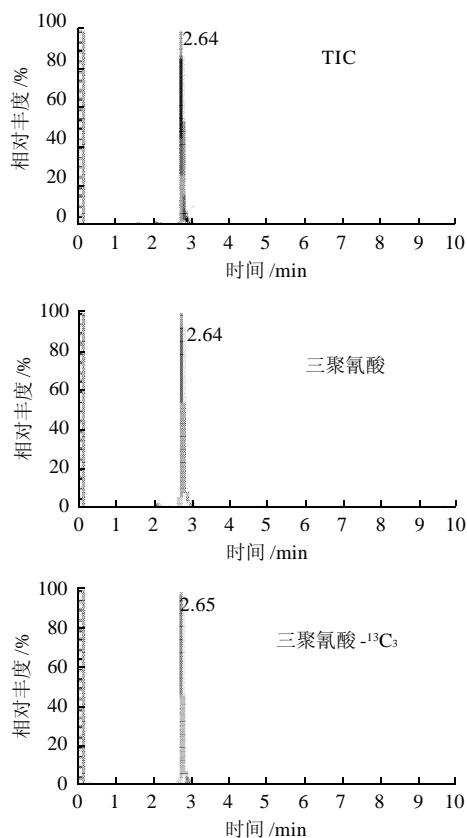


图2 三聚氰酸在PC HILIC色谱柱上的色谱图

Fig.2 Chromatogram of cyanuric acid on PC HILIC column

对于流动相中的有机相, 一般采用甲醇和乙腈, 由于采用电喷雾模式, 而电离机理中一个重要的过程为去溶剂化, 在负离子模式下, 乙腈比甲醇更容易促进离子化, 故选择乙腈为流动相中的有机相。流动相中的水相, 应尽量避免加入缓冲盐, 本实验采用超纯水作为水相。经过反复实验验证, 本方法采用乙腈和水

按照9:1的比例等度洗脱, 就可使三聚氰酸及其内标氘代物在色谱柱上达到很好的分离效果, 流动相的配制简单快捷。

## 2.3 提取与净化条件的优化

### 2.3.1 提取溶剂的选择

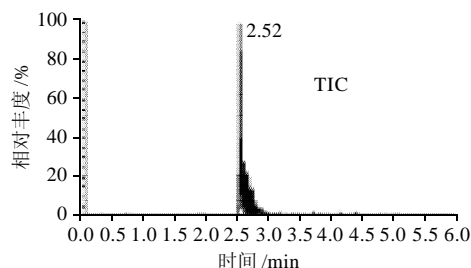
三聚氰酸微溶于水, 能溶于热水、热乙醇、吡啶、浓盐酸及硫酸, 也溶于氢氧化钠和氢氧化钾水溶液, 不溶于冷乙醇、醚、丙酮、苯和氯仿<sup>[2,7]</sup>。因此提取溶剂一般都选用极性较强的有机溶剂、缓冲溶液或水和有机溶剂的混合溶液。常见的提取溶剂有二乙胺-乙腈-水溶液、乙腈溶液和甲酸溶液、酸化甲醇、高氯酸等。

乙腈具有沉淀蛋白和去除部分脂肪的功能。本实验采用乙腈和水作为提取剂, 以有机相乙腈和水相的体积比例分别为4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1进行提取, 结果发现, 当乙腈和水的比例低于5:5时, 离心之后的上清液仍然很浑浊, 当乙腈的比例逐渐升高时, 上清液逐渐变得澄清透明。这是由于乳制品中蛋白质含量较高, 降低乙腈比例时, 沉淀蛋白的效果较差, 只有提高乙腈的比例才能将乳制品中绝大多数蛋白质沉淀。但当乙腈与水相的比例达到9:1时, 又会降低提取效率。本实验最终选择乙腈与水相的比例为8:2为最优提取条件, 即液态奶的提取剂乙腈与水的比例约为8:1, 奶粉提取剂乙腈:水=8:2。

### 2.3.2 离心转速的影响

由于蛋白是干扰色谱柱分离、影响峰形、造成峰拖尾极其重要的一个因素, 因此离心在本实验中是一个关键因素。转速越高, 离心时间越长, 沉淀蛋白、脂肪及其他杂质的效果越好。对于乳制品类蛋白质含量较高的样品, 当高速离心机转速不低于8000r/min时, 才能达到较好的分离效果。本实验选用10000r/min离心10min, 即可保证去除绝大多数干扰物的影响。

在上清液中进一步加入等体积的乙腈, 其目的是进一步去除提取液中的蛋白质等杂质干扰。为了使提取液中微量的蛋白质、脂肪等杂质能够沉淀析出, 在提高乙腈比例的同时, 提高转速至14000r/min, 在二者的双重作用下, 提取液中的干扰物基本可以去除干净。二次去除蛋白前后色谱对照图见图3、4。



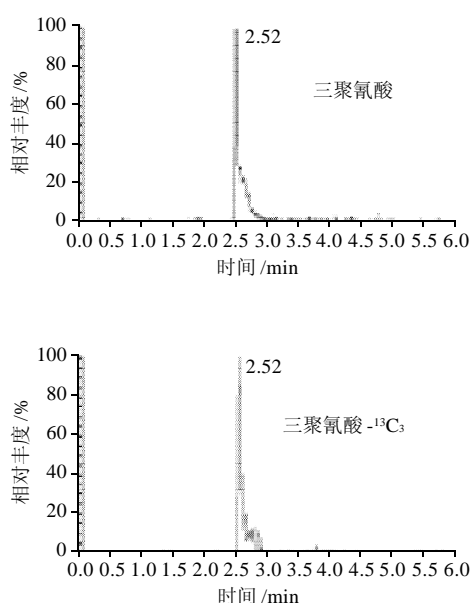


图3 二次除蛋白前的色谱图

Fig.3 Chromatogram of cyanuric acid before protein removal

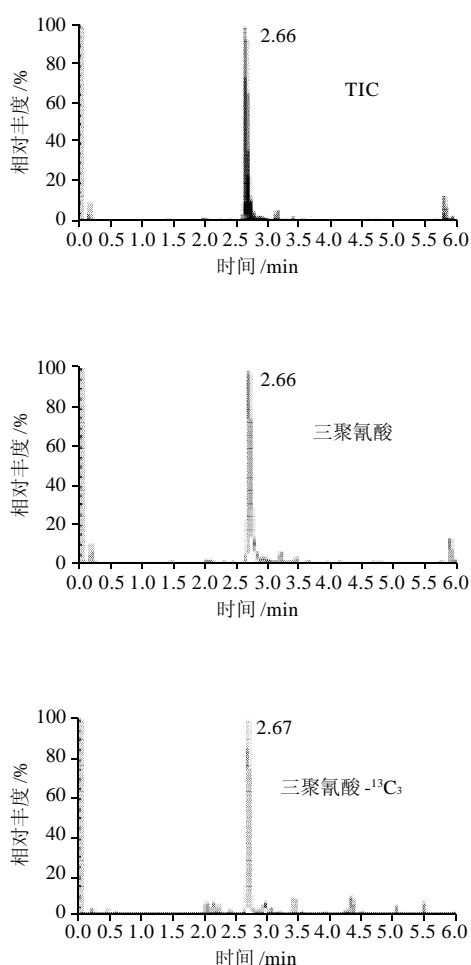


图4 二次除蛋白后的色谱图

Fig.4 Chromatogram of cyanuric acid after protein removal

### 2.3.3 净化方式

根据三聚氰酸的化合物结构和性质,对于基质复杂的样品,应选择混合阳离子相萃取柱净化。将三聚氰酸标准溶液分别过 Waters Oasis MAX、Chromabond HR-XA、Agele PAX 固相萃取柱,比较3款固相萃取柱的净化效果。结果发现,3款固相萃取柱的回收率均较好,在90%以上。但实际样品测定过程中,操作较为繁琐,且成本较高。而本实验采用乙腈沉淀和高速离心二次去除蛋白的方法处理样品,既节约成本,又简化了前处理方法。

### 2.4 线性范围和检测限

按照1.3.2、1.3.3节方法配制标准系列并进行测定,以色谱峰面积按内标法定量,结果表明,三聚氰酸标准溶液浓度在0.005~0.2 μg/mL范围内线性关系良好,线性方程为 $Y=9.12 \times 10^{-3}X - 6.55 \times 10^{-3}$ ,相关系数大于0.999。本实验结果表明,在阴性样品中添加水平为0.2mg/kg时,三聚氰酸的信噪比( $R_{SN}$ )均大于10,而且方法学数据是可靠的,表明方法的定量限可以达到0.2mg/kg。

### 2.5 回收率和精密度实验

选择阴性鲜牛奶、酸奶和奶粉样品,分别添加一定量的标准溶液,使添加水平分别为0.2、0.5、1.0、2.0mg/kg,按上述方法处理,每个添加质量浓度重复测定5次,做3个批次,考察方法的精密度,结果见表2。在空白样品中添加三聚氰酸的平均回收率在91.7%~99.6%之间,相对标准偏差<10%。

表2 乳制品中三聚氰酸的添加回收率

Table 2 Recovery rates of cyanuric acid in dairy products spiked with standard material

乳制品	添加水平 / (mg/kg)	平均回 收率 /%	相对标准偏差 /%	
			批内	批间
鲜牛奶	0.2	92.4	7.5	7.9
	0.5	91.7	7.2	7.4
	1.0	96.4	5.7	6.1
	2.0	95.9	4.6	5.2
酸奶	0.2	93.6	7.0	7.6
	0.5	92.2	6.4	7.3
	1.0	99.6	5.1	5.6
	2.0	96.2	3.2	4.4
奶粉	0.2	93.8	7.4	8.0
	0.5	94.4	7.0	7.6
	1.0	93.3	5.3	6.4
	2.0	98.5	3.2	4.5

### 2.6 样品测定

通过对市售20份鲜奶、酸奶及奶粉样品进行测定,均未检出三聚氰酸。

### 3 结 论

通过乙腈和水提取样品中的三聚氰酸, 乙腈二次去蛋白, 以及优化高效液相色谱及质谱条件, 建立了一种快速测定乳制品中三聚氰酸的方法, 前处理简单, 无需固相萃取柱净化, 降低了成本, 精确度高, 重现性好, 是一种理想的测定方法。本实验对市售 20 份乳制品进行测定, 均未检出三聚氰酸。

### 参考文献:

- [1] CANTU R, EVANS O, MAGNUSON M L. Rapid analysis of cyanuric acid in swimming pool waters by high performance liquid chromatography using porous graphitic carbon[J]. *Chromatographia*, 2001, 53(7/8): 454-456.
- [2] 黄琼, 杨杏芬. 三聚氰胺的毒理学研究进展[J]. *毒理学杂志*, 2008, 22(6): 481-484.
- [3] SUCHY P, STRAKOVA E, HERZIG I, et al. Toxicological risk of melamine and cyanuric acid in food and feed[J]. *Interdisc Toxicology*, 2009, 2(2): 55-59.
- [4] CANELLI E. Chemical, bacteriological, and toxicological properties of cyanuric acid and chlorinated isocyanurates as applied to swimming pool disinfection[J]. *Am J Public Health*, 1974, 64(2): 155-162.
- [5] HAMMOND B G, BARBEE S J, INOUE T. A review of toxicology studies on cyanurate and its chlorinated derivatives[J]. *Environ Health Perspect*, 1986, 69: 287-292.
- [6] HODGE H C, PANNER B J, DOWNS W L, et al. Toxicity of sodium cyanurate[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1965, 7(5): 667-674.
- [7] 胡虎, 盛宏强, 马晓琼, 等. 三聚氰胺及其同系物三聚氰酸的生物学效应和毒理学研究进展[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2008, 36(6): 546-550.
- [8] FDA. GC-MS screen for the presence of melamine and cyanuric acid[EB/OL]. (2007-05-07) [2010-04-08]. [http://www.fda.gov/cvc/GC-MS\\_Melamine.htm](http://www.fda.gov/cvc/GC-MS_Melamine.htm).
- [9] GB/T 22288—2008 植物源产品中三聚氰胺、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺和三聚氰酸的测定: 气相色谱-质谱法[S].
- [10] 董颖超, 齐涛, 李俊, 等. GC/MS 法检测包装材料中的三聚氰酸残留[J]. *质谱学报*, 2009(11): 244-246.
- [11] 李锋格, 姚伟琴, 苏敏, 等. 气相色谱-质谱法快速测定牛奶中的三聚氰胺和三聚氰酸[J]. *色谱*, 2009, 27(2): 233-236.
- [12] 王强, 洗燕萍, 罗海英, 等. 高效液相色谱法检测鸡蛋中三聚氰胺[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(6): 711-713.
- [13] EHLING S, TEFERA S, HO I P. High-performance liquid of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24(12): 1319-1325.
- [14] TURNIPSEED S, CASEY C, NOCHETTO C, et al. Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS. LIB No.4421, 2008, 24[EB/OL]. [2010-04-08]. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/DrugChemicalResiduesMethodology/ucm071637.htm>.
- [15] FILIGENZI M S, PUSCHNER B, ASTON L S, et al. Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17): 7593-7599.