

反相超高效液相色谱-串联质谱法测定大米中 氯酸盐和高氯酸盐

才 凤^{1*}, 贾宏新¹, 周 明², 许笑微³

(1. 辽宁省食品检验检测院, 沈阳 110015; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016;
3. 沈阳诺亚荣康生物制药有限公司, 沈阳 110179)

摘 要: **目的** 建立反相超高效液相-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定大米中氯酸盐和高氯酸盐的方法。**方法** 大米样品采用水和甲醇提取, 经固相萃取(solid-phase extraction, SPE)净化, 在电喷雾离子源负离子多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下进行测定, 内标法定量。**结果** 氯酸盐和高氯酸盐在 1.00~200 ng/mL 范围内线性关系良好($r > 0.9955$), 方法检出限为 4.0~6.0 $\mu\text{g/kg}$ 。添加水平分别为 12.5、25、50 $\mu\text{g/kg}$ 时, 加标回收率为 82.7%~99.5%, 相对标准偏差为 1.01%~7.90%。**结论** 该方法简便、灵敏度高, 适用于大米中氯酸盐和高氯酸盐的检测。

关键词: 大米; 氯酸根; 高氯酸根; 反相高效液相串联质谱

Determination of chlorate and perchlorate in rice by reversed-phase ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CAI Feng¹, JIA Hong-Xin¹, ZHOU Ming², XU Xiao-Wei³

(1. Liaoning Provincial Food Quality Supervision and Inspection Center, Shenyang 110015, China; 2. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Shenyang Noah Rongkang Biotechnology Pharmaceutical Limited Company, Shenyang 110179, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of chlorate and perchlorate in rice by reversed-phase ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The rice samples were extracted with water and methanol, and purified by solid-phase extraction (SPE). The samples were determined by multiple reaction monitoring (MRM) mode under electrospray ionization and quantified by internal standard method. **Results** The linear relationship between chlorate and perchlorate in the range of 1.00–200 ng/mL was good ($r > 0.9955$), and the detection limit of the method was 4.0–6.0 $\mu\text{g/kg}$. When the addition levels were 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/kg}$, the recoveries were 82.7%–99.5%, and the relative standard deviations were 1.01%–7.90%. **Conclusion** The method is simple, sensitive, which is suitable for the detection of chlorate and perchlorate in rice. **KEY WORDS:** rice; chlorate root; perchlorate root; reversed-phase high performance liquid phase tandem mass spectrometry

*通讯作者: 才凤, 高级工程师, 主要研究方向为药品、保健食品和食品质量研究。E-mail: 311cf03@163.com

*Corresponding author: CAI Feng, Senior engineer, the Health Food and the Food Quality Research, Liaoning Provincial Salt Quality Supervision and Inspection Center. No. 58, Changqing Street, Shenhe District, Shenyang, Liaoning 110015, China. E-mail: 311cf03@163.com

1 引言

高氯酸盐是一种具有高度扩散的持久性的有害有毒物质。随着生产和使用中高氯酸盐的排放和废弃,使其越来越多进入到环境中,高氯酸盐极易溶于水,从而污染土壤及地下水,随着地下水和地表水的流动,被植物等吸收、积累,经食物链进入人体^[1]。它不仅妨碍甲状腺吸收碘,减少对碘的吸收,造成甲状腺激素 T3 和 T4 的合成减少,还对神经、生殖和免疫等其他系统功能,严重危害人体健康。出口茶叶中高氯酸根的检出引起国内广泛关注^[2,3]。事实上,饮用水、谷物、饮料、果蔬、肉制品等食品中均普遍存在高氯酸盐污染,水产品还因富集作用成为高氯酸盐摄入高风险产品,这是一个世界范围内的污染问题。高氯酸盐具有吸附性低、溶解度高,稳定性和流动扩散性都很强的特点,可在自然环境中持久存在,持续的污染^[4]。氯酸盐是一种重要化工原料,在工农业生产中有广泛应用。国际癌症研究中心已将氯酸盐列为中等毒性化合物,不能作为食品添加剂使用,在食品中不得添加^[5,6]。

目前,关于高氯酸盐的研究主要以美国为主,其他的国家研究相对比较少,我国处于起步研究阶段,缺乏系统的研究数据。高氯酸盐的检测技术主要有离子色谱(测水中)、液相色谱-质谱联用、离子色谱-质谱联用等技术^[7-10];氯酸盐的测定方法主要有滴定法、分光光度法和离子色谱法等^[11-16]。离子色谱法虽然是常用方法,但对其目标物的测定只能依靠保留时间定性,容易受其他共存离子干扰,灵敏度会降低。随着高效液相色谱-串联质谱法在各类检验检测实验机构中普及,反相液相色谱-串联质谱法正取代传统离子色谱等方法测定高氯酸盐和氯酸盐。液相色谱-串联质谱已经应用于饮用水、奶粉等样品中高氯酸盐的测定。

本研究优化了大米中氯酸盐和高氯酸盐的样品前处理方法和超高相液相色谱质谱(ultra high phase liquid chromatography mass spectrometry, UPLC-MS/MS)联用分离检测条件,建立了大米中氯酸盐和高氯酸盐的检验及确证方法,以期为市场中大米的安全监管提供更便捷的方法。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

大米,市售。

氯酸钠和高氯酸钠标准品(100%,英国 HEMSERVIC 公司);氯酸盐同位素内标(200 $\mu\text{L/mL}$, EURL-SRMLotNo:024),高氯酸盐同位素内标(100 $\mu\text{L/mL}$, CILOLM-7310-1.2),乙腈(色谱级),甲醇(色谱级)(美国 Fisher 公司);甲酸铵(液质联用级,美国 Technoigies 公司);实验用水为超纯水(18.0 M Ω)。

2.2 仪器与设备

ESI TQD 三重四级杆质谱仪, Oasis HLB 固相萃取柱, XEVO 超高相液相色谱仪(美国 Waters 公司); X1R 高速冷冻离心机, AcclaimTRINITYP1 复合离子交换柱(美国赛默飞公司); Milli-Q A10 超纯水仪(法国 Millipore 公司); Vortex3 旋涡混匀器(德国 IKA 公司); DT 512H 超声波恒温水浴振荡器(朗博仪器制造有限公司); TTL-DCII 氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 试剂配制

氯酸盐和高氯酸盐标准储备液:分别精密称取各标准品适量,用超纯水溶解稀释制成浓度为 1 mg/mL 标准储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

混合标准中间液:分别准确量取 0.2 mL 氯酸盐标准储备液、0.1 mL 高氯酸盐标准储备液,置于同一 100 mL 容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,摇匀,制成氯酸盐、高氯酸盐浓度分别为 2.0、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

混合同位素内标液:分别准确量取 75 μL 氯酸盐同位素内标、20 μL 高氯酸盐同位素内标置于同一 10.0 mL 容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,摇匀,制成氯酸盐- $^{18}\text{O}_3$ 、高氯酸盐- $^{18}\text{O}_4$ 浓度分别为 1500、200 ng/mL 的混合同位素内标液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

混合标准工作溶液:依需要配制适当浓度的混合标准工作液,临用新制。

2.3.2 样品提取与净化

准确称取 2 g(精确至 0.001 g)试样置于 50 mL 具塞离心管中,加入 200 μL 混合同位素内标液,准确加入 7.0 mL 超纯水,涡旋振荡 5 min,再准确加入 13.0 mL 甲醇,混匀,振荡超声提取 30 min,10000 r/min 常温离心 10 min,取上清液待净化。

依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化 HLB 小柱,吸取样品溶液约 3.0 mL 过固相萃取柱及 0.22 μm 再生纤维素滤膜,弃去约 1 mL 流出液,收集续滤液,供液相色谱-串联质谱仪测定。

2.3.3 空白基质匹配混合标准溶液的配制

取空白基质大米样品,加入混合标准工作溶液 1.00 mL,按 2.3 方法样品提取与净化,即得空白基质匹配混合标准溶液。

2.3.4 色谱条件

色谱柱: AcclaimTRINITYP1 复合离子交换柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3 μm)。流动相: A 为乙腈, B 为 20 mmol/L 甲酸铵溶液。流速: 0.5 mL/min。柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量: 3 μL 。梯度洗脱程序见表 1。

2.3.5 质谱条件

电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 负离子扫描; 多反应监测(multi reaction monitor, MRM); 离子源温度: 500 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气流速: 0.8 L/min; 质谱采集参数见表 2。

表 1 梯度洗脱程序 Table 1 Gradient elution procedure		
时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
0.2	70	30
3.0	90	10
7.0	90	10
8.0	70	30
10.0	70	30

表 2 质谱参数 Table 2 Mass spectrum parameters				
化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
氯酸根	83.0	67.0*	60	15
	85.0	69.0	60	15
高氯酸根	99.0	83.0*	60	18
	101.0	85.0	60	18
氯酸根内标	89.0	71.0*	60	16
高氯酸根内标	107.0	89.0*	60	18

注: 标注*的碎片为定量离子。

3 结果与分析

3.1 仪器条件优化

3.1.1 色谱条件

参照 BJS201706 食品中氯酸盐和高氯酸盐的测定^[14], 本研究流动相选择乙腈作为有机相, 分别考察了在水相中添加甲酸铵和乙酸铵、添加 5 mmol/L 甲酸铵和 20 mmol/L 甲酸铵对于质谱灵敏度和色谱分离的影响。结果表明, 在水相中添加缓冲盐后, 各化合物的离子化率明显提高, 比较相同体积分数的甲酸铵和乙酸铵, 甲酸铵的离子化程度高于乙酸铵, 峰形更好; 向水相中添加不同摩尔浓度的甲酸铵时, 5 mmol/L 甲酸铵各化合物的离子化效率比 20 mmol/L 甲酸铵小, 20 mmol/L 甲酸铵溶液可以满足需求。最终流动相选择乙腈和 20 mmol/L 甲酸铵。

采用选定的流动相和色谱柱, 对混合标准溶液进行分离, 优化梯度洗脱条件, 使所有待测物均具有高灵敏度和尖锐的峰形, 优化后的液相梯度洗脱程序见表 1。图 1 为 4 μg/kg 添加水平下, 大米中氯酸根和高氯酸根的总离子流色谱图。

3.1.2 质谱条件

采用质谱直接进样的方式将 1.0 mg/L 的混合标准中间液进样, 分别在电喷雾负离子模式下进行母离子全扫描, 确定其母离子均为[M-H]⁻。再以各化合物的分子离子峰为

母离子, 进行子离子全扫描, 得到它的碎片离子信息; 通过改变碰撞能量和锥孔电压, 选择信号较强的子离子作为特征子离子, 其中丰度相对较强的为定量离子, 另一个作为定性离子, 再进行两个碎片离子的碰撞能量和锥孔电压等质谱条优化, 使定量离子和定性离子的响应达最优, 各种物质的灵敏度、峰形达到最佳^[11]。优化得到的质谱参数见表 2。

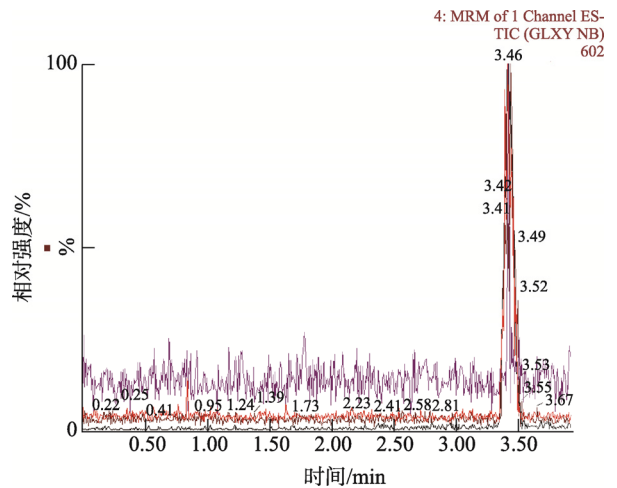


图 1 大米中氯酸根和高氯酸根的总离子流色谱图
Fig.1 Total ion chromatography of chlorate and perchlorate in rice

3.2 基质效应分析

一般 UPLC-MS/MS 检测会存在基质效应, 基质效应是由样品前处理过程中带入到最终测试溶液中的干扰物, 在质谱中同目标化合物竞争电离所致, 进而影响目标化合物的检测灵敏度和重现性^[12]。本研究中, 分别配制了相同含量的基质工作曲线和溶剂标准曲线, 分别进样测试, 得到 2 条标准曲线, 通过计算同一目标化合物的 2 条曲线的斜率的比值, 来评价各目标化合物的基质效应影响大小, 具体结果见表 3。

由表 3 可以看出, 基质效应比值均大于 1, 基质效应的比值越大, 影响越小, 因此基质对其目标化合物高氯酸盐和氯酸盐影响较小。通过加标回收实验发现, 该方法的回收率为 82.7%~99.5%, 满足实验需求。

3.3 线性方程、检出限与定量限

按照 2.3.4 项下的方法配制 6 个水平的基质混合工作曲线, 并在优化的质谱条件和色谱条件下进行测定。以氯酸根和高氯酸根的定量离子的峰面积与内标物定量离子的峰面积的比值(*Y*)作为纵坐标、质量浓度(*X*, ng/mL)为横坐标绘制曲线, 线性范围为 1.0~200 ng/mL, 相关系数 *r* 均大于 0.995, 线性关系良好。以 3 倍基线噪音测定检出限, 以 10 倍基线噪音测定定量限, 结果见表 4, 说明该方法较灵敏。

表 3 大米空白样品中氯酸根和高氯酸根的基质效应、回收率、精密度($n=6$)
Table 3 Matrix effect, recovery and precision of chlorate and perchlorate in rice blank samples ($n=6$)

药物	基质效应	12.5 $\mu\text{g/kg}$		25.0 $\mu\text{g/kg}$		50.0 $\mu\text{g/kg}$	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
氯酸盐	1.01	97.0	6.51	92.8	7.90	99.5	5.50
高氯酸盐	1.02	82.7	1.58	95.1	1.01	98.5	2.94

表 4 氯酸根、高氯酸根的基质混合工作曲线方程、相关系数、检出限和定量限

Table 4 equation, correlation coefficient, detection limit and quantitative limit of matrix mixed operation of chlorate and perchlorate

药物	线性方程	相关系数	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	定量限 ($\mu\text{g/kg}$)
氯酸盐	$Y=1.622X+0.0037$	0.9996	6.0	20
高氯酸盐	$Y=0.2511X+0.2334$	0.9955	4.0	10

3.5 实际样品检测

采用本研究建立的方法,对辽宁省抽送检的 50 批次大米样品进行检测,样品未检出氯酸盐和高氯酸盐。

4 结 论

本研究采用改进的 QuEChERS 方法,结合固相萃取净化方法,建立了反相 UPLC-MS/MS 同时测定氯酸盐和高氯酸盐的分析方法。该方法分离度良好,具有较好的精密度、准确度和良好线性关系。操作简便、准确,可以为食品检验检测机构进行氯酸盐和高氯酸盐检测提供技术支持。

参考文献

[1] 方齐乐,陈宝梁. 高氯酸盐污染土壤及地下水的植物-微生物修复研究进展[J]. 环境科学学报, 2011, 31(8): 1569–1579.
Fang QL, Chen BL. Research progress on plant-microbial remediation of perchlorate contaminated soil and groundwater [J]. J Environ Sci, 2011, 31(8): 1569–1579.

[2] 陈东,范赛,沙博郁,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中高氯酸盐[J]. 食品安全质量学报, 2018, 9(4): 925–929.
Chen D, Fan S, Sha BY, *et al.* Determination of perchlorate in tea by ultra-highperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(4): 925–929.

[3] 冯德建,邹燕,史谢飞,等. 茶叶中高氯酸盐的液相色谱-串联质谱测定方法研究[J].中国测试, 2016, 42(4): 1–4.
Feng DJ, Zou Y, Shi XF, *et al.* Determination of perchlorate in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Test, 2016, 42(4): 1–4.

[4] 姜苏,李院生,马红梅,等. 环境中高氯酸盐的来源、污染现状及其分析方法[J]. 地球科学进展, 2010, 25(6): 617–623.
Jiang S, Li YS, Ma HM, *et al.* Sources, pollution status and analysis methods of perchlorate in the environment [J]. Progr Earth Sci, 2010,

25(6): 617–623.

[5] 黎华寿,张修玉,姜春晓. 氯酸盐生态毒理研究进展[J]. 生态学杂志, 2005, 24(11): 1323–1328.
Li HS, Zhang XY, Jiang CX. Research progress on ecotoxicology of chlorate [J]. J Ecol, 2005, 24(11): 1323–1328.

[6] 王丽,黄君礼,李百祥. 二氧化氯、亚氯酸盐和氯酸盐溶液小鼠微核实验研究[J]. 哈尔滨建筑大学学报, 2000, 35(1): 58–60.
Wang L, Huang JL, Li BX. Micronuclear experiment of chlorine dioxide, chlorite and chlorate solution in mice [J]. J Harbin Univ Civil Eng Architect, 2000, 35(1): 58–60.

[7] 金军,常瀛月,丁问微,等. 超高效液相色谱-电喷雾离子源-串联三重四极杆质谱分析饮用水中的高氯酸盐[J]. 分析测试学报, 2010, 29(9): 974–977.
Jin J, Chang YY, Ding WW, *et al.* Analysis of perchlorate in drinking water by high performance liquid chromatography-electrospray ion sources-tandem triple quadrupole mass spectrometry [J]. J Anal Test, 2010, 29(9): 974–977.

[8] 彭银仙,吴春笃,盛建国,等. 离子色谱法测定城市污水中的高氯酸盐[J]. 中国给水排水, 2010, 26(24): 97–99.
Peng YX, Wu CD, Sheng JG, *et al.* Determination of perchlorate in urban sewage by ion chromatography [J]. China Water Suppl Drainae, 2010, 26(24): 97–99.

[9] 方黎,吴杰,苏宇亮. 离子色谱法测定水中高氯酸盐[J]. 广东微量元素学, 2008, 15(12): 61–63.
Fang L, Wu J, Su YL. Determination of perchlorate in water by ion chromatography [J]. Guangdong Microelem Sci, 2008, 15(12): 61–63.

[10] 孟维伟. 茶叶中高氯酸盐的检测-离子色谱法[J]. 轻工科技, 2016, 11(11): 12–13.
Meng WW. Determination of perchlorate in tea - ion chromatography [J]. Light Ind Technol, 2016, 11(11): 12–13.

[11] 方义红,陈斌,戎军,等. 离子色谱法测定饮用水消毒副产物亚氯酸盐、氯酸盐和溴酸盐[J]. 安徽预防医学杂志, 2014, 24(4): 248–251.
Fang YH, Chen B, Rong J, *et al.* Determination of chlorite, chlorate and bromate in drinking water by ion chromatography [J]. J Anhui Prev Med, 2014, 24(4): 248–251.

[12] 齐春华,张颖,王化勇. 用离子色谱法同时测定生活饮水中溴酸盐、亚氯酸盐、氯酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(10): 2284–2287.
Qi CH, Zhang Y, Wang HY. Simultaneous determination of bromate, chlorite and chlorate in drinking water by ion chromatography [J]. Chin J Health Inspect, 2012, 22(10): 2284–2287.

[13] 张桃英,崔悦,赵连佳,等. 离子色谱法同时测定饮用水中氯酸盐、亚氯酸盐和溴化物的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 590–591.
Zhang TY, Cui Y, Zhao LJ, *et al.* Simultaneous determination of chlorate, chlorite and bromide in drinking water by ion chromatography [J]. Chin J

- Health Inspect, 2011, 21(3): 590–591.
- [14] BJS 201706 食品中氯酸盐和高氯酸盐的测定(2017 年第 64 号公告发布)[EB/OL].[2017.9.20]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1933/177672.html>.
- BJS 201706 Determination of chlorate and perchlorate in foods (Announcement No. 64 of 2017) [EB/OL].[2017.9.20]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1933/177672.html>
- [15] 张科明, 梁飞燕, 邓鸣, 等. QuEChERS 结合液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中多类兽药残留[J]. 色谱, 2016, 36(9): 860–867.
- Zhang KM, Liang FY, Deng M, *et al.* Rapid determination of several veterinary drug residues in pork by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chromatography, 2016, 36(9): 860–867.
- [16] 赵飞, 高广慧, 贾宏新. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法测定麻辣烫中喹诺酮类药物残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(6): 768–772.

Zhao F, Gao GH, Jia HX. Determination of quinolone residues in malatang by ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. J Anal Test, 2017, 36(6): 768–772.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介

才 凤, 高级工程师, 主要研究方向为药品、保健食品和食品质量研究。
E-mail: 311cf03@163.com