

高效液相色谱-串联质谱法检测新鲜蔬菜中的 氯酸盐残留

邓锁成, 毕瑞锋*, 张伟伟, 赵春华, 焦杰颖
(诺安实力可商品检验(青岛)有限公司, 青岛 266012)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)检测新鲜蔬菜中氯酸盐的分析方法。**方法** 称5 g样品, 分别用5 mL乙腈提取2次, 合并提取溶液, 定容, 无需净化步骤, 选择Hypercarb多孔石墨化碳色谱柱作为固定相, 1%乙酸-水溶液和1%乙酸-甲醇溶液作为流动相进行梯度洗脱色谱分离, 然后采用电喷雾离子化三重四极杆串联质谱测定。**结果** 氯酸盐在0.0025~0.2 mg/L范围内峰面积与质量浓度的线性关系良好, 相关系数(r^2)大于0.999; 平均回收率为72.9%~100.2%, 相对标准偏差为1.8%~6.2%, 氯酸盐的定量限为0.01 mg/kg。**结论** 该方法简单快速、准确可靠、成本低廉, 适合新鲜蔬菜中氯酸盐的测定。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 氯酸盐; 新鲜蔬菜

Determination of chlorate residue in fresh vegetables by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

DENG Suo-Cheng, BI Rui-Feng*, ZHANG Wei-Wei, ZHAO Chun-Hua, JIAO Jie-Ying
(Sino Silliker Testing Services (Qingdao) Co., Ltd, Qingdao 266012, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of chlorate residue in vegetables by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The sample (5 g) was extracted by 5 mL acetonitrile twice, and extraction solution was mixed without further cleanup. Hypercarb column was used as stationary phase, and the mixture of 1% acetic acid-water solution and 1% acetic acid-methanol solution mixed in different ratios were used as mobile phases in gradient elution. The analyte was determined using a triple quadrupole mass spectrometry equipped with an electrospray ionization source operated in the negative ion mode. **Results** The linear relationship between the peak area and the mass concentration of chlorate was good in the range of 0.0025–0.2 mg/L, and the correlation coefficient (r^2) was greater than 0.999. The mean recoveries of chlorate were 72.9%–100.2% with relative standard deviations of 1.8%–6.2%. The limit of quantification of chlorate was 0.01 mg/kg. **Conclusion** This method is simple, fast, accurate, reliable, low-cost, and is suitable for detecting chlorate in fresh vegetables.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; chlorate; fresh vegetable

*通讯作者: 毕瑞锋, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: prefers@163.com

*Corresponding author: BI Rui-Feng, Master, Senior Engineer, Sino Silliker Testing Services (Qingdao) Co., Ltd, No.63, Shanghe Road, Shibei District, Qingdao 266012, China. E-mail: prefers@163.com

1 引言

氯酸盐是一种无机阴离子,具有强氧化性,作为非选择性除草剂曾在农业生产中大量使用,作为植物生长剂在反季节龙眼的种植过程中获得应用^[1]。不过氯酸盐对人体的危害作用日益受到重视,氯酸盐长期暴露对人体的影响主要表现为对甲状腺吸收碘离子的抑止,欧盟食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)设定氯酸盐的每日耐受摄入量(tolerable daily intake, TDI)为 3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ ^[2]。2008 年欧盟撤销对含氯酸盐活性物质的植物保护产品的授权,导致欧盟对食品中氯酸盐的最大残留限量默认采用 0.01 mg/kg ^[3]。

氯酸盐同时也是二氧化氯、次氯酸盐消毒产生的副产物,研究表明食品中氯酸盐主要来自饮用水以及食品加工时的卫生消毒过程^[3]。WHO 设定饮用水中氯酸盐的指导水平为 0.7 mg/L ^[4],我国卫生部 2006 年发布的《生活饮用水卫生标准》规定,可以使用二氧化氯对饮用水进行消毒并且将氯酸盐限值设定为 0.7 mg/L ^[5],蔬菜在种植过程可通过灌溉水带入氯酸盐。我国 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[6]规定二氧化氯可用于新鲜蔬菜水果的保鲜和防腐,当使用二氧化氯对蔬菜进行保鲜时也会带来氯酸盐残留。我国的出口蔬菜普遍面临着由氯酸盐污染导致的技术性贸易壁垒,因此建立蔬菜中氯酸盐定量检测方法是必要的。

氯酸盐的检测方法主要有离子色谱法^[7-9]、离子色谱-质谱联用法^[10,11]、液相色谱-串联质谱法^[12-18]。离子色谱法检出限较高,而且由于只依靠保留时间定性,分析物容易受到样品基体和其他离子的干扰;离子色谱与质谱联用技术成功克服了离子色谱法的不足,通过引入抑制器消除了无机酸和碱对质谱离子源的污染,检测灵敏度高,其缺点是仪器的普及率较低,不利于方法的推广。但应用高效液相色谱-串联质谱法检测新鲜蔬菜中氯酸盐的研究相对较少。

本研究基于非修饰多孔石墨化碳柱(hypercarb)分离的高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS),通过比较几种常用有机溶剂的提取效率和基质效应,选择乙腈作为提取溶剂,建立了新鲜蔬菜中氯酸盐的检测方法,本方法简单快速,基质效应低、适合氯酸盐残留的痕量检测,为我国蔬菜出口提供了有效的技术支持。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

AB Sciex 5500 QTRAP 型液相色谱—三重四极杆串联质谱仪(美国应用生物系统公司);旋涡混合器(德国 IKA

公司);X3R 型台式离心机(美国 Thermo-Fisher 公司);聚苯乙烯离心管(15 mL, 美国 BD 公司);聚四氟乙烯针头过滤器(美国 Agilent 公司)。

氯酸盐标准品(浓度 100 mg/L , 美国 Accustandard 公司);乙腈、甲醇(HPLC 级, 美国 Merck 公司);甲酸、乙酸(分析纯, 美国 Sigma 公司);实验用水为超纯水(18.0 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

样品来自山东省内出口蔬菜种植基地。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

标准溶液的配制:移取 100 μL 浓度为 100 mg/L 的氯酸盐标准品溶液至 10 mL 的容量瓶中,用超纯水定容至刻度,配制成质量浓度为 1 mg/L 的中间标准溶液;移取 1 mL 中间标准溶液至 10 mL 的容量瓶中,用超纯水定容至刻度,配制成质量浓度为 0.1 mg/L 的标准工作溶液。

系列标准溶液的配制:用水-乙腈(1:2, V:V)溶液将 0.1 mg/L 的氯酸盐标准工作溶液稀释成 0.0025、0.005、0.010、0.025、0.05、0.1、0.2 mg/L 系列标准溶液。

2.2.2 样品前处理

取出新鲜蔬菜的测定部位,用组织捣碎机制成匀浆备用。准确称取 5 g 样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中。制备加标样品,例如在样品中添加 50 μL 浓度为 1 mg/L 的标准工作溶液制备得到质控水平为 0.01 mg/kg 的加标样品,加标样品需在室温下静置 30 min。加入 5 mL 乙腈溶液,涡旋 2 min, 4000 r/min 下离心 5 min。移取全部上清液至 15 mL 离心管;用 5 mL 乙腈溶液重复提取 1 次,离心,合并上清液,用纯水定容至 15 mL,涡旋,取一定体积溶液过 0.45 μm 针头过滤器至进样小瓶中,待上机检测。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1)液相色谱条件

Thermo Hypercarb 色谱柱(100 $\text{mm}\times 2.1$ mm, 5 μm);流动性: A 为 1%(体积比)乙酸-水溶液, B 为 1%(体积比)乙酸-甲醇溶液;梯度洗脱程序: 0 ~ 5.0 min, 100%A; 5.0 ~ 6.0 min, 100%A ~ 10%A; 6.0 ~ 9.5 min, 10%A; 9.5 ~ 10.0 min, 10%A ~ 100%A; 10.0 ~ 15.0 min, 100%A。流速: 0.4 mL/min 。柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量: 2 μL 。

(2)质谱条件

电喷雾负离子源(ESI⁻);检测模式:多反应监测模式(multiple response monitoring, MRM);电喷雾电压: -4500 V;离子源温度: 450 $^{\circ}\text{C}$;其他质谱参数见表 1。

3 结果与分析

3.1 色谱质谱条件的建立

氯酸根为阴离子,实验选择在负离子模式下进行母离子扫描,得到氯酸根离子本身的质量数 m/z 82.9(³⁵ClO₃⁻)

和 m/z 84.9($^{37}\text{ClO}_3^-$)。然后再以这两个离子为母离子进行轰击, 氯氧键断裂, 分别失去一个氧原子和两个氧原子得到子离子, 选择响应最大的子离子 m/z 66.9($^{35}\text{ClO}_2^-$)作为定量离子, 其他子离子 m/z 68.9($^{37}\text{ClO}_2^-$)、 m/z 50.9($^{35}\text{ClO}^-$)和 m/z 52.9($^{37}\text{ClO}^-$)作为定性离子。对去簇电压和碰撞能量进行优化, 优化后的质谱参数见表 1。

表 1 氯酸盐的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters of chlorate

化合物	化学式	离子对 (m/z)	去簇电压 /V	碰撞能量 /eV
氯酸盐	$^{35}\text{ClO}_3^-$	82.9/66.9*	-100	-35
		82.9/50.9	-100	-40
氯酸盐	$^{37}\text{ClO}_3^-$	84.9/68.9	-105	-35
		84.9/52.9	-105	-40

注: *表示定量离子对。

氯酸盐在溶液中以离子状态存在, 在普通键合 C_{18} 色谱柱上保留能力差, 文献中使用的色谱柱主要有多孔石墨化碳柱^[13,14]和阴离子交换柱^[15-17]等, 阴离子交换柱通常需要高浓度的缓冲盐作为流动相。本研究参考欧盟 QuPpe 方法^[13]采用 Hypercarb 色谱柱, 该色谱柱以非修饰多孔石墨化碳为固定相, 碳原子以 sp^2 杂化轨道和周围的碳原子形成六边形平面网状结构, 具有很好的刚性和机械稳定性, 在任何流动相中都极其稳定, 适合于 pH 0~14 条件下使用。实验分别考察了 1%甲酸和 1%乙酸作为流动相酸度调节剂时目标物的色谱行为, 甲酸的洗脱能力强于乙酸, 但有拖尾现象; 乙酸的峰型好、目标物响应高。经综合考虑, 实验选择用 1%乙酸作为流动相的酸度调节剂, 优化后的色谱图如图 1。

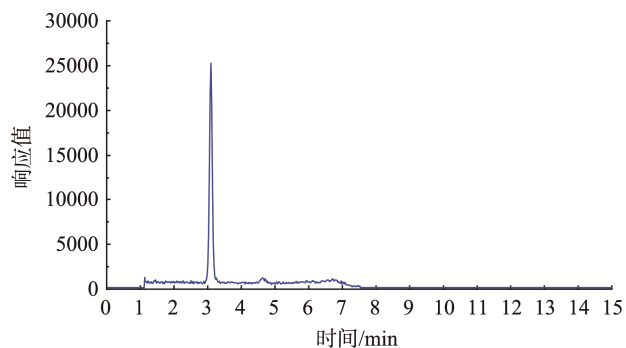


图 1 氯酸盐标准溶液的 MRM 色谱图
Fig.1 MRM spectrogram of chlorate standard

3.2 前处理条件的选择和优化

植物源样品基质中氯酸盐的提取溶剂主要有甲醇-水^[15]、乙腈-水^[17]、1%甲酸-甲醇溶液^[13]、1%甲酸-乙腈溶液^[14]和

0.1%乙酸-水溶液^[18]。本实验选取甜豌豆、大蒜、杏鲍菇、芦笋 4 种常见出口型蔬菜作为实验基质, 分别考察了乙腈、甲醇、1%甲酸-乙腈和 1%甲酸-甲醇 4 种有机溶剂对氯酸盐的提取效率, 考察水平为 0.2 mg/kg。实验过程为: 称取 5 g 样品至 50 mL 塑料离心管, 加入标准品溶液, 室温下静置 30 min, 分别用 5 mL 的有机溶剂提取 2 次, 在转速 4000 r/min 下离心 5 min 后, 移取合并上清液至 15 mL 离心管, 用纯水定容至 15 mL。相对于甲醇和 1%甲酸-甲醇溶液, 乙腈和 1%甲酸-乙腈溶液对 4 种基质均表现出较好的沉淀效果。通过比较加标样品提取溶液与基质匹配校正标准品中目标物的响应得到回收率, 结果见图 2(A), 对大蒜、杏鲍菇和芦笋, 4 种提取溶剂的提取回收率都能得到 80%以上, 然而, 对于甜豌豆, 4 种提取溶剂的提取效率差异较大, 按照回收率由高到低依次为: 乙腈 > 甲醇 > 1%甲酸-乙腈溶液 > 1%甲酸-甲醇溶液, 因此最终选择乙腈作为提取溶剂。

基质效应(matrix effect, ME)可通过比较基质匹配校正标准品与溶剂校正标准品中目标物的响应进行评价, ME 在 0.9 到 1.1 之间, 可认为没有基质效应; ME 小于 0.9, 说明存在基质抑制效应; ME 大于 1.1, 说明存在基质增强效应。基质效应的评价结果见图 2(B), 无论采用乙腈、甲醇还是 1%甲酸-乙腈、1%甲酸-甲醇作为提取溶剂, 氯酸盐的基质效应结果 ME 均介于 0.9 到 1.1 之间, 这可能与色谱分离条件有关, 100%水相流动相从多孔石墨化碳固定相上洗脱出来的氯酸盐共流出物较少, 基质效应可以忽略。

同时, 本实验对聚四氟乙烯有机相滤膜对目标物的吸附情况进行了考察, 分别用水-乙腈(1:2, V:V)、水-甲醇(1:2, V:V)溶液配制质量浓度为 1 mg/L 的标准品溶液, 取其中 1 mL 标准品溶液过滤膜, 与未过滤膜的标准品溶液进行比较。结果表明, 该聚四氟乙烯滤膜对溶液中的目标物无吸附现象。

3.3 线性范围与定量限

在上述色谱质谱条件下(3.1)测定配制好的系列标准溶液 0.0025、0.005、0.010、0.025、0.05、0.1、0.2 mg/L(2.2.1)。以峰面积对质量浓度采用加权最小二乘法建立标准曲线, 权重选择 $1/x$ 。结果表明: 氯酸盐的线性范围为 0.0025 ~ 0.2 mg/L, 线性回归方程为 $Y=17562X-1638$, 相关系数(r^2)为 0.9995。综合考虑溶剂标准品的响应信噪比和前处理稀释倍数, 按照 $S/N \geq 10$ 将 4 种基质中氯酸盐的定量限初步设定为 0.01 mg/kg。

3.4 回收率和精密度

根据 SANTE/11813/2017 指导文件^[19], 农药残留分析方法的回收率应为 70%~120%, 相对标准偏差应小于 20%。通过筛选, 在甜豌豆、大蒜、杏鲍菇、芦笋 4 种基质的空白样品上进行 1 倍、10 倍和 20 倍定量限 3 个浓度水平的添加回收实验, 每个水平做 6 个平行。回收率和精

密度实验结果见表 2, 氯酸盐的平均回收率为 72.9% ~ 100.2%, 相对标准偏差为 1.8% ~ 6.2%, 方法的回收率和精密度均满足要求, 同时证明将定量限设定为 0.01 mg/kg 符合要求。

3.5 实际样品测定

利用本文建立的方法测定了 83 份样品, 包括豆类蔬菜(荷兰豆、毛豆、甜豌豆)20 份、蘑菇类蔬菜(杏鲍菇、滑子菇、香菇、平菇)18 份、大蒜 20 份、芦笋 25 份。检测结果见表 3, 总体阳性检出率为 49%, 这与文献中报道的阳性发现率接近^[3]。

4 结论与讨论

本研究基于非修饰多孔石墨化碳柱的 HPLC-MS/MS 技术建立了新鲜蔬菜中氯酸盐的快速检测方法。通过比较几种常用提取溶剂的提取效率和基质效应, 选择乙腈作为提取溶剂, 在 0.01、0.1、0.2 mg/kg 添加水平上得到满意的回收率结果, 避免了文献中因回收率较低或者基质效应通常采用的稳定同位素内标法^[11], 从而降低了检测成本; 同时本检测方法前处理步骤简单, 检测效率高, 非常适合我国出口蔬菜中氯酸盐的质量控制, 也为国内新鲜蔬菜中氯

酸盐暴露水平的监测提供了技术手段。

表 2 氯酸盐的回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 2 Recoveries and RSDs of chlorate($n=6$)

基质	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测量值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 /%	相对标准 偏差/%
甜豌豆	10	7.5	75.0	4.2
	100	72.9	72.9	2.2
	200	145.2	73.6	2.9
大蒜	10	10.0	100.2	6.2
	100	97.5	97.5	3.5
	200	196.9	98.4	3.7
杏鲍菇	10	8.6	85.9	5.4
	100	82.7	82.7	2.8
	200	169.0	84.5	3.1
芦笋	10	8.8	88.2	3.9
	100	87.0	87.0	2.4
	200	169.2	84.6	1.8

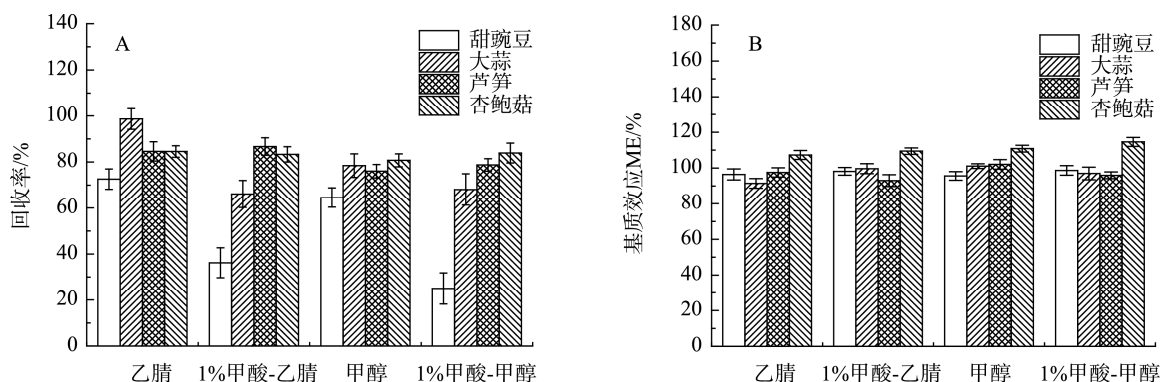


图 2 不同提取溶剂对氯酸盐的提取回收率(A)和基质效应(B)($n=3$)

Fig.2 Extraction recoveries (A) and matrix effects (B) of chlorate under different extraction solvents($n=3$)

表 3 83 份蔬菜样品中的氯酸盐的含量
Table 3 Content of chlorate in 83 vegetable samples

样品种类	样品数	阳性检出数	阳性检出率/%	结果范围 [*] /(mg/kg)	平均值/(mg/kg)
豆类蔬菜(荷兰豆、毛豆、甜豌豆)	20	7	35	0 ~ 1.2	0.182
蘑菇类蔬菜(杏鲍菇、滑子菇、香菇、平菇)	18	13	72	0 ~ 0.35	0.049
大蒜	20	6	30	0 ~ 0.45	0.039
芦笋	25	15	60	0 ~ 0.29	0.045
合计	83	41	49	0 ~ 1.2	0.077

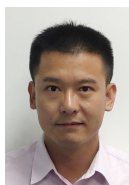
*注: 0 为小于定量限 0.01 mg/kg。

参考文献

- [1] 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 advance in ecotoxicological effects of chlorates [J]. Chin J Ecol, 2005, 24(11): 1323-1328.
- [2] Chlorate in food: Risks for public health [EB/OL]. [2019-11-23]. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150624a>.
- [3] Kettlitz B, Kemendi G, Thorgrímsson N, *et al.* Why chlorate occurs in potable water and processed foods: A critical assessment and challenges faced by the food industry [J]. Food Addit Contam A, 2016, 33(6): 968-982.
- [4] Guidelines for drinking-water quality, 4th ed [S].
- [5] GB 5749-2006 生活饮用水卫生标准[S].
GB 5749-2006 Standards for drinking water quality [S].
- [6] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Standards for use of food additives [S].
- [7] 曾力. 离子色谱法测定饮用水中无机消毒副产物[J]. 分析测试学报, 2004, 23(2): 78-80.
Zeng L. Determination of inorganic disinfectant by-products in drinking water by ion chromatography[J]. J Instrum Anal, 2004, 23(2): 78-80.
- [8] SN/T 4049-2014 出口食品中氯酸盐的测定 离子色谱法[S].
SN/T 4049-2014 Determination of chlorate in food for export—Ion chromatography method [S].
- [9] 赵峰, 任恒植, 胡炜, 等. 离子色谱法测定食品中的二氧化氯及其副产物[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4212-4215.
Zhao F, Yim H, Hu W, *et al.* Determination of chlorine dioxide and its by-products in food by ion chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(11): 4212-4215.
- [10] 高峰, 刘岩, 孔维恒, 等. 离子色谱-质谱测定碳酸饮料中的亚氯酸盐、氯酸盐和高氯酸盐[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 261-264.
Gao F, Liu Y, Kong WH, *et al.* Determination of chlorite chlorate and perchlorate in carbonated beverage by ion chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2013, 34(22): 261-264.
- [11] 孙文闪, 周敏, 刘志成, 等. 同位素稀释离子色谱-串联质谱法同时测定食品中的氯酸盐和高氯酸盐[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3679-3685.
Sun WS, Zhou M, Liu XC, *et al.* Simultaneous determination of chlorate and perchlorate in food by isotope dilution ion chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3679-3685.
- [12] Smith D J, Taylor J B. Chlorate analyses in matrices of animal origin [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(5): 1598-1606.
- [13] QuPpe-Method: Version 9.2 [S].
- [14] Alves RD, Romero G, López-Ruiz R, *et al.* Fast determination of four polar contaminants in soy nutraceutical products by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(28): 8089-8098.
- [15] BJS 201706 食品中氯酸盐和高氯酸盐的测定[S].
BJS 201706 Determination of chlorate and perchlorate in food [S].
- [16] 余婷婷, 张莉, 万旭刚, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饮用水中的卤氧化物[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 651-656.
Yu TT, Zhang L, Wan XG, *et al.* Determination of oxyhalides in drinking water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(2): 651-656.
- [17] 盛华栋, 潘项捷, 张水锋, 等. 改良 QuEChERS 技术结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中高氯酸盐、氯酸盐和溴酸盐[J/OL]. [2019-04-23]. 食品科学. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190422.1649.030.html>.
Sheng HD, Pan XJ, Zhang SF, *et al.* Simultaneous determination of perchlorate, chlorate and bromate in vegetables and fruits by modified QuEChERS method coupled with UPLC-MS/MS [J/OL]. [2019-04-23]. Food Sci, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190422.1649.030.html>.
- [18] 宋正规, 张书芬, 周子焱, 等. 超高效液相色谱-串联质谱同时测定茶叶中高氯酸盐和氯酸盐[J]. 茶叶科学, 2017, 37(6): 597-604.
Song ZG, Zhang SF, Zhou ZY, *et al.* Simultaneous determination of perchlorate and chlorate in tea by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Tea Sci, 2017, 37(6): 597-604.
- [19] SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



邓锁成, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: robert.deng@mxns.com



毕瑞锋, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: prefers@163.com