

液相色谱串联质谱法测定饲料中高氯酸盐含量

马晓冲, 王瑶, 李兴佳*, 柴艳兵, 张耀广, 李飞

(君乐宝乳业集团农业农村部乳品质量安全控制重点实验室, 石家庄 050021)

摘要: **目的** 建立液相色谱串联质谱检测饲料中高氯酸盐含量的方法。**方法** 饲料样品经乙腈-水(2:1, V:V)超声提取, 高速离心后, 上清液经石墨炭黑固相萃取柱净化, 液相色谱串联质谱测定, 内标法定量。**结果** 高氯酸盐在 0~100 ng/mL 浓度范围内呈良好线性关系($r^2=0.9998$)。本方法的定量限为 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。高氯酸盐在 15~150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内, 回收率为 95.1%~102.4%, 相对标准偏差为 1.13%~9.82%。**结论** 本方法前处理简单, 具有较高准确度、灵敏度、稳定性, 可以满足饲料中高氯酸盐的含量检测。

关键词: 饲料; 高氯酸盐; 液质联用; 同位素内标法; 含量检测

Determination of perchlorate in feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry

MA Xiao-Chong, WANG Yao, LI Xing-Jia*, CHAI Yan-Bing, ZHANG Yao-Guang, LI Fei

(Junlebao Dairy Group, Shijiazhuang Key Laboratory of Dairy Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture and Villages, Shijiazhuang 050021, China)

ABSTRACT: Objective To established a method for the determination of perchlorate content in forage by liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS). **Methods** Samples of forage were ultrasound extracted by acetonitrile - aqueous solution (2:1, V:V) and centrifugated at a high speed. Then the supernatant was purified by graphitized carbon black solid phase extraction column, and determined by LC-MS/MS, then quantified by internal standard method. **Results** The perchlorate showed a good linear relationship in the concentration range of 0–100 ng/mL ($r^2=0.9998$). The quantitative limit of the method was 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recoveries rate of perchlorate in the range of 15–150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was 95.1%–102.4% and relative standard deviations were 1.13%–9.82%. **Conclusion** This method has the advantages of simple pretreatment, high accuracy, sensitivity and stability, and can satisfy the determination of perchlorate content in feed.

KEY WORDS: forage; perchlorate; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; isotopic internal standard method; content determination

1 引言

高氯酸盐是一种持久的污染物^[1], 能够竞争性抑制甲

状腺吸收碘离子, 影响甲状腺和脑垂体的激素水平, 阻碍人体正常的新陈代谢和生长发育^[2,3], 给消费者的健康带来巨大威胁。按照食物摄入量模型预测^[4], 婴儿的高氯酸

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFC1604304)

Fund: Supported by Key Projects of National Key R & D Projects in the 13th Five-Year Plan (2018YFC1604304)

*通讯作者: 李兴佳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为乳品质量安全。E-mail: lixingjia@jlby.com

*Corresponding author: LI Xing-Jia, Master, Engineer, Junlebao Dairy Group, No.36, Shitong Road, Luquan District, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: lixingjia@jlby.com

盐暴露剂量高于成人。乳制品可能是婴幼儿这类敏感群体最主要的食物,所以乳制品的安全显得尤为重要。近年来,乳及乳制品中高氯酸盐污染引起消费者和生产者的普遍关注^[5,6]。饲料作为乳制品的前期风险物质,如苜蓿饲料中高氯酸盐具有极高的生物富集能力^[7], Sanchez 等^[8]调查发现紫花苜蓿中高氯酸盐平均干重可达 297~764 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 远高于棉籽(80 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、甜菜粕(86 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、玉米(87 $\mu\text{g}/\text{kg}$)等饲料,并且发现牛奶中高氯酸盐含量和饲料中高氯酸盐存在显著正相关。目前,国内外已有关于饮用水、奶类、酒、大米、蔬菜、茶叶以及营养补充剂等中高氯酸盐含量的相关研究^[9-11],未有关于饲料中高氯酸盐的同位素稀释方法研究。因此,需要尽快建立快速准确测定饲料中高氯酸盐含量的同位素稀释方法,以保障牛奶的品质,保障消费者健康,从源头控制住。

目前高氯酸盐的检测方法主要有离子色谱法^[12]、离子色谱-质谱联用法^[13]、液相色谱-串联质谱法^[14-18]等。但离子色谱法和离子色谱-质谱联用法存在离子色谱柱不耐受有机溶剂,大体积进样易造成色谱柱过载等问题。而液相色谱串联质谱法检测灵敏度高,检测限低等优势已广泛应用于食品检测中,但未有饲料中高氯酸盐的报道,且饲料基质复杂,部分饲料中色素含量高,因此亟待建立检测方法。

本研究建立了一种采用液质联用法测定饲料中高氯酸盐含量的方法,为饲料监测和管控提供科研依据和技术支持。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

高氯酸钠标准品(含量大于 99.9%,德国 Fluka 公司);高氯酸盐内标(浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,美国剑桥公司);乙腈、甲醇(色谱纯,德国默克公司);甲酸(质谱级,美国 Sigma 公司);甲酸铵(色谱级,美国 Sigma 公司);实验用水为超纯水(18.0 M Ω ·cm)。

Primer HLB 固相萃取柱(150 mg/3 mL, 200 mg/6 mL, 500 mg/6 mL, 美国 Waters 公司); Supelclean ENVI-18 固相萃取柱(500 mg/6 mL, 美国 Sigma 公司); 石墨炭黑柱(HyperSep Hypercarb, 1 g/6 mL, 美国赛默飞世尔公司); Thermo Acclaim TRINITY P1 离子交换色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 3 μm , 美国赛默飞世尔公司)。

7 种饲料 21 个样品(苜蓿、压片玉米、膨化大豆、甜菜粕、豆粕、棉籽、燕麦)取自全国 8 个牧场,打碎研磨,过筛备用。

2.2 主要仪器及设备

4000 QTRAP 液相色谱-串联质谱仪(美国 AB Sciex 公司); Milli-Q ZMQS50001 超纯水机(美国密理博公司);

LYNX4000 高速落地离心机(美国赛默飞世尔公司); ME203E/02 电子分析天平(瑞士梅特勒公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

2.3 标准溶液配制

准确称取适量高氯酸钠标准品,用超纯水溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 标准储备液。吸取适量高氯酸盐标准储备溶液,用超纯水稀释成浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准中间溶液。吸取适量的 ^{18}O 标记高氯酸根标准溶液用超纯水稀释成浓度为 200 ng/mL 同位素内标液。分别吸取适量的高氯酸盐标准中间溶液和高氯酸根同位素内标液,用超纯水配制浓度为 0、2、5、10、20、50、100 ng/mL 的系列标准液,各溶液中内标高氯酸根浓度为 2.0 ng/mL。

2.4 实验方法

2.4.1 样品前处理

(1) 提取

准确称取饲料试样 1 g(精确至 0.0001 g)试样置于 50 mL 具塞离心管中,加入 150 μL 高氯酸盐同位素内标液,准确加入 5 mL 水溶液,再准确加入 10 mL 乙腈,涡旋振荡 5 min,置于水浴超声提取 30 min, 10000 r/min 常温离心 10 min,取上清液待净化。

(2) 净化

石墨炭黑固相萃取柱依次用 3 mL 乙腈和 3 mL 水活化。吸取 5.0 mL 上清液,过石墨炭黑固相萃取柱,弃去 2 mL 流出液,收集续滤液,上机检测。

2.4.2 色谱条件

Acclaim TRINITYPI 复合离子交换柱(100 mm \times 2.1 mm, 3 μm),柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 10 μL ,流速为 0.5 mL/min,流动相采用乙腈+20 mmol 甲酸铵溶液(梯度方式),梯度比例见表 1。

表 1 高效液相色谱流动相梯度条件
Table 1 Conditions of HPLC mobile phase gradient

时间/min	乙腈/%	20 mmol 甲酸铵溶液/%
0	70	30
0.20	70	30
3.0	90	10
7.0	90	10
8.0	70	30
13.0	70	30

2.4.3 质谱条件

电离方式为电喷雾负离子源(ESI-);检测模式为多反应监测模式(multiple- reaction monitoring, MRM);电喷雾电压为-5500 V;离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$,高氯酸盐和高氯酸盐内标特征离子(表 2)。

3 结果与分析

3.1 色谱柱的选择

高氯酸盐为极性化合物, 在反相色谱柱 C₁₈ 柱上保留困难, 无法实现分析基质成分复杂的饲料样品中的高氯酸盐。所以选取 Acclaim TRINITY PI 复合离子交换柱, 高氯酸盐能够保留并得到良好的分离。高氯酸盐的干扰物质氯酸盐可以实现分离, 因此, 本实验选取 Acclaim TRINITY PI 复合离子交换柱作为色谱柱。高氯酸盐标准溶液和内标

溶液多反应监测色谱图见图 1。

表 2 高氯酸盐和高氯酸盐内标特征离子
Table 2 Characteristic ion pairs of perchlorate and perchlorate internal standards

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
高氯酸根	99.0	83.1	-59	-32
	100.9	85.0	-59	-32
高氯酸根内标	107.0	88.9	-66	-38

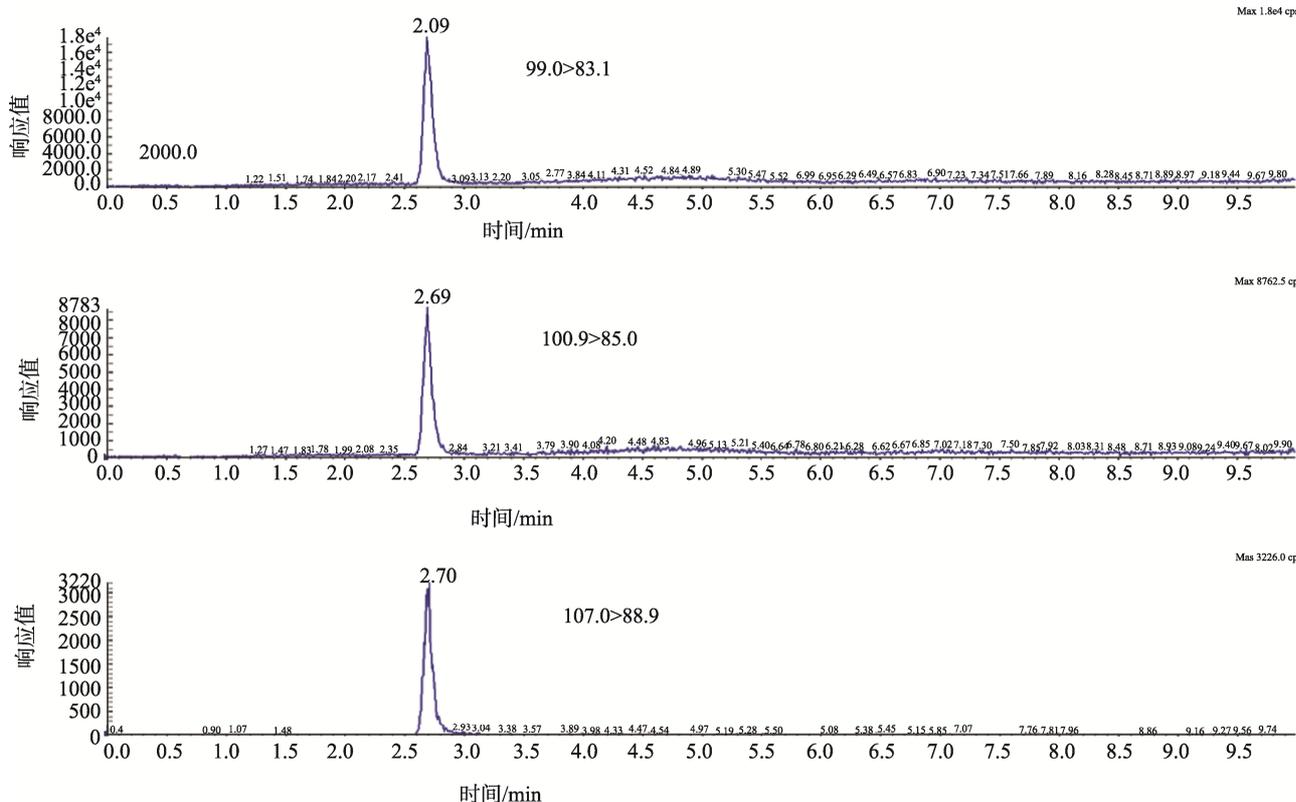


图 1 高氯酸盐标准溶液和内标溶液多反应监测色谱图

Fig.1 Chromatograms of the standards of perchlorate and perchlorate internal by MRM mode

3.2 提取溶剂的选择

选择甲醇-水体系(有机相和水相比比例 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0, V:V), 乙腈-水体系(有机相和水相比比例 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0, V:V)为提取溶剂, 对苜蓿进行提取, 比较在两种提取溶剂中不同提取体积的色谱行为。

结果表明(表 3), 以甲醇-水为提取液, 水与有机相比在 1:2 体积比时, 加标回收率能够达到 80%~110%, 其余比例萃取效率波动大, 提取效果不稳定, 但以甲醇水为提取液, 上机液放置一段时间后容易析出结晶, 影响上机效果, 且易损坏仪器, 也不利于大量的处理样品。以乙腈-水为提取液, 水与有机相比在 1:2, 1:1, 2:1(V:V), 加标回收率均能达到 80%~110%, 但在水与有机相比在 1:2(V:V)

时, 萃取效率稳定, 且不易析出结晶。综合考虑, 选取乙腈-水(2:1, V:V)作为提取溶剂。

表 3 提取溶剂试验结果
Table 3 Test results of extraction solvents

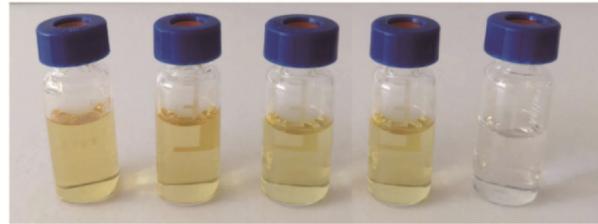
水: 有机相 比例(V:V)	甲醇		乙腈	
	回收率范围/%	RSD/%	回收率范围/%	RSD/%
0: 1	100.9~115.2	7.02	71.3~121.7	26.25
1: 2	90.5~104.5	7.21	88.2~89.2	0.65
1: 1	75.3~125.5	31.08	87.3~100.3	7.17
2: 1	76.7~117.9	21.09	89.7~106.7	9.68
1: 0	79.5~96.5	10.06	79.5~96.5	10.06

3.3 固相萃取柱选择

试验选取 Primer HLB(150 mg/200 mg/500 mg), C₁₈, Supellean ENVI-Carb 石墨碳黑柱 5 种 SPE 柱, 采用通过式净化方式, 结果表明 Primer HLB 和 C₁₈SPE 柱对苜蓿中的色素干扰有一定的去除作用, 但仍存留颜色。石墨炭黑柱对苜蓿中的色素干扰去除显著, 明显优于 Primer HLB 和 C₁₈SPE 柱, 见图 2。

样品经 Primer HLB 和石墨炭黑柱净化后, 加标回收率在 80%~110%范围内, 相对标准偏差 (relative standard deviation RSD) 值均小于 10%, 优于 C₁₈ SPE 柱的净化效果见图 3。在萃取效率上, Primer HLB 和石墨炭黑固相萃取柱均达到预期要求, 但在去除色素干扰上, 石墨炭黑柱对叶绿素、叶黄素、胡萝卜素等色素干扰去除显著, 上机液呈

无色透明, 综合考虑, 选择石墨炭黑柱作为净化柱。



Primer HLB 150mg Primer HLB 200mg Primer HLB 500mg C₁₈ 500mg 石墨炭黑 1g

图 2 经不同的固相萃取柱净化后苜蓿样液效果比较图
Fig.2 Comparison of the effects of alfalfa-like liquids purified by different solid-phase extraction columns

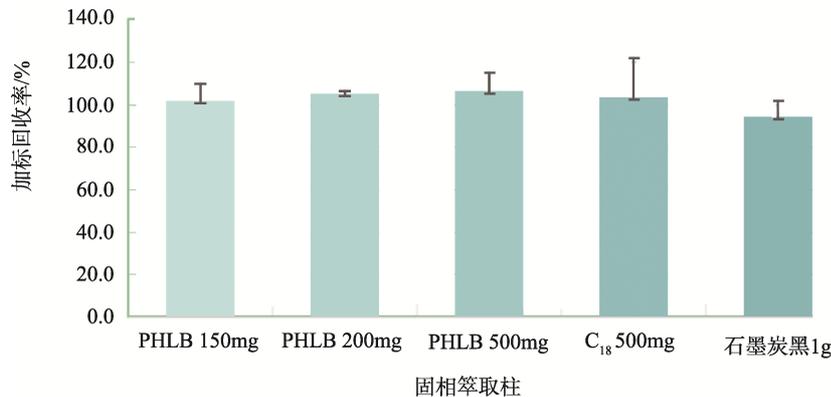


图 3 苜蓿样品经 5 种 SPE 柱净化后加标回收率的比较(n=3)

Fig.3 Comparison of recovery rates of alfalfa samples after purification with 5 SPE columns(n=3)

3.4 基质效应

液相色谱串联质谱分析容易受样品基质的影响, 产生基质效应^[19,20], 本实验采用固相萃取柱净化饲料样液, 减少饲料样品的绝对基质效应。选择在样液中加入高氯酸盐同位素内标, 在前处理过程中, 即使发生丢失, 也不会改变同位素标记组成, 避免了由此带来的测量误差。在色谱分离过程中, 同位素内标与高氯酸盐的色谱和质谱行为相似, 补偿了由于基质效应的影响引起的高氯酸盐信号改变。因此, 为了准确地定量饲料中的高氯酸盐, 确保定量分析结果的可靠性, 本实验采用固相萃取净化方式, 同位素内标法进行定量, 以减少基质效应的影响, 从而提高该方法的准确性和稳定性。

3.5 标准曲线绘制、检出限及定量限

移取不同体积的高氯酸盐标准中间溶液和高氯酸根同位素内标液, 用水稀释, 得到浓度为 0、2、5、10、25、50、100 ng/mL 的标准溶液, 上机检测, 以目标峰面积与内标峰面积比值为纵坐标, 以浓度为横坐标, 建立标准曲线方程, 见图 4, 结果表明, 在 0~100 ng/mL 范围内, 相关线

性均满足 $r^2 \geq 0.995$ 的要求。向空白样品中添加不同浓度的高氯酸盐, 经上述方法测定, 观察特征离子质量色谱峰信噪比(S/N), 按 $S/N \geq 3$ 确定方法检出限, $S/N \geq 10$ 确定方法定量限。当取样量为 1.0 g, 定容体积为 15 mL 时, 本方法饲料中高氯酸盐的检出限为 6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

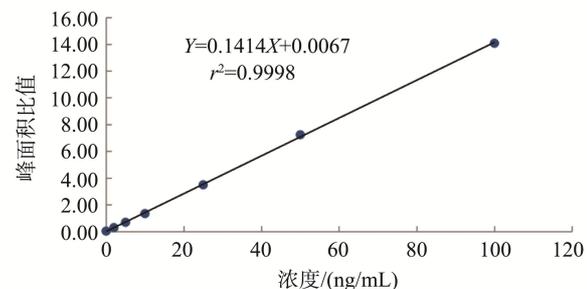


图 4 高氯酸盐标准曲线

Fig.4 Standard curve of perchlorate

3.6 准确度和精密度考察

选择苜蓿样品为空白样本进行高氯酸盐方法学考察。

分别添加 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 150.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的高氯酸盐, 每个浓度 6 份平行试样, 按最佳方法提取、净化和测定, 计算加标回收率, 考察方法准确度。计算相对标准偏差考察方法精密度。试验结果见表 4。

结果显示, 饲料中各浓度的高氯酸盐含量测定回收率范围在 95.1%~102.4%之间, 准确度较高。相对标准偏差在 1.13%~9.82%之间, 精密度较高。

表 4 饲料样品准确度和精密度实验结果($n=6$)
Table 4 Accuracy and precision experiments results of feed samples($n=6$)

添加浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	高氯酸盐	
	平均回收率/%	RSD/%
15.0	102.4	1.13
30.0	96.1	1.69
150.0	95.1	9.82

3.7 对不同饲料进行加标测定

对不同产地的 7 种饲料 21 个样品进行方法学验证和测定, 加标量为 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 见表 5。结果表明, 7 种饲料加标回收率均在 80%~110%之间。5 种饲料高氯酸盐实测值均高于检出限, 其中苜蓿的高氯酸盐含量达到 105 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 应建立对该物种高氯酸盐预警平台。

表 5 不同饲料的高氯酸盐含量、加标回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 5 Results of perchlorate content, spiked recovery and relative standard deviation of different feeds($n=6$)

样品名称	高氯酸盐		
	含量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	平均回收率/%	RSD/%
膨化大豆	5.27	87.9	0.08
玉米	15.6	90.8	2.80
甜菜粕	4.65	88.2	0.40
豆粕	9.84	89.9	4.80
棉籽	14.7	95.8	9.53
燕麦	14.7	97.2	5.82
苜蓿	105	88.5	0.80

4 结论与讨论

本研究考察 2 种常见的提取液和提取体积比例对饲料中高氯酸盐的提取效率, 选取最优提取方法, 采用同位素内标法进行定量, 方法灵敏度高, 检测效率高、简单快捷、前处理过程简单, 可满足饲料中高氯酸盐含量的检测要求, 并考察不同饲料样品中高氯酸盐含量的检测效果, 5

种饲料 15 个样本中检测出高氯酸盐存在, 苜蓿中高氯酸盐含量最高。

参考文献

- [1] 方齐乐, 陈宝梁. 新型环境污染物高氯酸盐的环境化学行为、食品安全及健康风险[J]. 科学通报, 2013, 58(26): 2626-2642.
Fang QL, Chen BL. Environmental chemical behavior, food safety and health risks of new environmental pollutant perchlorate [J]. Chin Sci Bull, 2013, 58(26): 2626-2642.
- [2] Blount BC, Pirkle JL, Osterloh JD, *et al.* Urinary perchlorate and thyroid hormone levels in adolescent and adult men and women living in the United States [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114: 1865-1871.
- [3] Pearce EN, Alexiou M, Koukkou E, *et al.* Perchlorate and thiocyanate exposure and thyroid function in first-trimester pregnant women from Greece [J]. Clin Endocrinol, 2012, 77: 471-474.
- [4] Valentin-Blasini L, Blount BC, Otero-Santos S, *et al.* Perchlorate exposure and dose estimates in infants [J]. Environ Sci Technol, 2011, 45(9): 4127-4132.
- [5] Kirk AB, Smith EE, Tian K, *et al.* Perchlorate in milk [J]. Environ Sci Technol, 2003, 37: 4979-4981.
- [6] Kirk AB, Martinelango PK, Tian K, *et al.* Perchlorate and iodide in dairy and breast milk [J]. Environ Sci Technol, 2005, 39: 2011-2017.
- [7] Jackson WA, Joseph P, Laxman P, *et al.* Perchlorate accumulation in forage and edible vegetation [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 369-373.
- [8] Sanchez CA, Blount BC, Valentin-Blasini L, *et al.* Perchlorate in feed-dairy continuum of the southwestern United States [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 5443-5450.
- [9] 李雨哲, 杨杰, 王雨昕, 等. 同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中的高氯酸盐[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 16(5): 616-619.
Li YZ, Yang J, Wang YX, *et al.* Detection of perchlorate in tea by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and isotope dilution method [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 16(5): 616-619.
- [10] 贺巍巍, 杨杰, 王雨昕, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中高氯酸盐[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(4): 438-444.
He WW, Yang J, Wang YX, *et al.* Determination of perchlorate in food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 29(4): 438-444.
- [11] 王骏, 胡梅, 张卉, 等. 液相色谱-质谱测定饮用水中的溴酸盐和高氯酸盐[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 244-246.
Wang J, Hu M, Zhang H, *et al.* HPLC-MS Determination of bromate and perchlorate in drinking water [J]. Food Sci, 2010, 31(10): 244-246.
- [12] 丛鑫, 苏葳艺, 赵晓云, 等. 离子色谱法同时测定牛乳及牛乳制品中硫氰酸盐和高氯酸盐[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(8): 601-604.
Cong X, Su WY, Zhao XY, *et al.* Simultaneous determination of thiocyanide and per-chlorate in the milk by ion chromatography [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2013, 30(8): 601-604.
- [13] 刘小芳, 方从容, 刘慧, 等. 离子色谱-串联质谱法检测茶叶中的高氯酸盐[J]. 色谱, 2016, 34(10): 986-988.
Liu XF, Fang CR, Liu H, *et al.* Determination of perchlorates in tea by ion chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(10): 986-988.
- [14] SN/T 4089—2015 出口食品中高氯酸盐的测定 液相色谱-质谱/质谱法[S].

- SN /T 4089—2015 Determination of perchlorate in exported foodstuffs by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [S].
- [15] Li YT, George EJ. Analysis of perchlorate in water by reversed phase LC /ESI-MS /MS using an internal standard technique [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(14): 4453–4458.
- [16] Pisarenko AN, Stanfor DBD, Quinones O, *et al.* Rapid analysis of perchlorate, chlorate and bromate ions in concentrated sodium hypochlorite solutions [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 659(1/2): 216–223.
- [17] 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]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(4): 925–929.
Chen D, Fan S, Sha BY, *et al.* Determination of perchlorate in tea by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(4): 925–929.
- [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-peryethylene liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Tea Sci*, 2017, 37(6): 597–604.
- [19] 苏萌, 艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(2): 511–515.
Su M, Ai LF. Matrix effects and elimination methods of liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(2): 511–515.
- [20] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. *质谱学报*, 2011, 32(6): 321–332.
Wang LQ, He LM, Zeng ZL, *et al.* Progress in matrix effect of veterinary drug residues analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2011, 32(6): 321–332.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



马晓冲, 硕士, 工程师, 主要研究方向乳品质量安全。

E-mail: maxc0040@163.com



李兴佳, 硕士, 工程师, 主要研究方向乳品质量安全。

E-mail: lixingjia@jlbry.com