

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定 土壤中的高氯酸盐

孙文闪, 诸骏杰, 钟寒辉*, 董叶菁, 俞 婕, 刘 静, 郑剑峰

(绿城农科检测技术有限公司, 杭州 310051)

摘要: **目的** 建立了一种同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法测定土壤中高氯酸盐含量的分析方法。**方法** 试样经 0.2% 乙酸水溶液和二氯甲烷提取, 上清液经 HLB 小柱净化, 液相色谱-串联质谱法测定, 内标法定量。**结果** 高氯酸盐在 0.1~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好, 相关系数为 0.9995, 检出限为 0.3 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$, 加标回收率在 85.2%~102%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 8.0%。**结论** 该方法简便、可靠、稳定, 可用于土壤中高氯酸盐含量的测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 高氯酸盐; 土壤

Determination of perchlorate in soil by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SUN Wen-Shan, ZHU Jun-Jie, ZHONG Han-Hui*, DONG Ye-Qing, YU Jie, LIU Jing, ZHENG Jian-Feng

(Greentown Agricultural Testing Technology Co., Ltd., Hangzhou 310051, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of perchlorate content in soil by isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by 0.2% acetic acid solution and dichloromethane, purified by HLB column, determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantified by internal standard method. **Results** Perchlorate had a good linear relationship in the concentration range of 0.1–100 $\mu\text{g/L}$, the correlation coefficient was 0.9995, the limit of detection was 0.3 $\mu\text{g/kg}$, the limit of quantification was 1.0 $\mu\text{g/kg}$, the recovery rates were 85.2%–102%, and the relative standard deviation (RSD) was less than 8.0%. **Conclusion** This method is simple, reliable, and stable, and can be used for the determination of perchlorate in soil.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; perchlorate; soil

1 引言

高氯酸盐是无机含氯化合物的一种, 成年人每天摄入量超过 0.072 μg 时会破坏红细胞, 影响血液运输氧气,

造成矿物质流失, 内环境紊乱^[1]。高氯酸盐是一种持久性污染物, 会干扰甲状腺素的合成与分泌, 影响人体正常的新陈代谢功能, 阻碍人体生长发育, 对儿童影响尤为严重, 会出现智商偏低、学习障碍、发育迟缓、多动症、注意力

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1602800)

Fund: Supported by National Key Research and Development Program Funding (2018YFC1602800)

*通讯作者: 钟寒辉, 工程师, 主要研究方向为食品安全分析检测。E-mail: 233245005@qq.com

*Corresponding author: ZHONG Han-Hui, Engineer, Greentown Agricultural Testing Technology Co. Ltd, No.688, Bin'an Road, Binjiang District, Hangzhou 310051, China. E-mail: 233245005@qq.com

分散、弱智等症状^[2,3]。高氯酸盐通过人类的生产活动和一些工业活动进入土壤, 造成土壤污染, 农产品在污染的土壤上生长而富集, 进而通过食物进入人体对人类造成危害。最典型的就是近年来茶叶中高氯酸盐的污染^[4], 茶树经土壤-植物系统吸收土壤中的高氯酸盐, 在叶片中造成富集, 通过饮用茶水进入人体。高氯酸盐具有高溶解性和低吸附性, 通过生物积累传递给人类, 其污染问题已经引起环境学家和卫生学家的极大重视, 因此对土壤中的高氯酸盐的检测也非常重要。

目前高氯酸盐的检测方法有: 离子色谱法^[5]、表面增强拉曼散射法^[6]、离子色谱-质谱法^[7-12]和液相色谱-质谱^[13-17]法等。离子色谱法测定高氯酸盐主要适用于生活引用水等简单基质样品, 且灵敏度有限; 表面增强拉曼散射法主要用来定性分析; 离子色谱-质谱法分析高氯酸盐, 具有较高的灵敏度和稳定性, 但是需要手动连接, 目前没有自动化的设备, 不便于普遍应用。液相色谱-质谱法具有检出限低, 应用普遍, 张峰等^[18]对液相色谱串联质谱法测定污染土壤中高氯酸盐含量的不确定度进行了评定, 该方法前处理繁琐, 提取时间长, 提取液需旋蒸浓缩然后过柱净化, 效率低, 采用外标法, 未考虑基质效应影响。

本研究采用固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定土壤中的高氯酸盐, 通过对色谱柱和流动相的优化, 使高氯酸盐具有高灵敏度和较好的分离效果, 前处理无需浓缩, 提取液直接净化后上机分析, 且采用同位素内标法定量可以有效的消除基质干扰, 进而满足土壤这种复杂基质中高氯酸盐检测的要求, 为相关检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LC30A 超高效液相色谱 8050 三重四级杆质谱仪(配电喷雾离子源, 日本岛津公司); ST16R 高速离心机(美国赛默飞世尔公司); Milli-Q 型超纯水仪(美国密理博公司); BSA224S 电子天平(德国赛多利斯公司); T18 高速组织匀浆机(德国 IKA 公司)。

HLB 小柱(60 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司); Waters

BEH Amide 氨基柱(美国 Waters 公司); 二氯甲烷、氨水、乙酸(色谱纯, 德国 CNW 科技公司); 乙腈和乙酸铵(质谱纯, 美国赛默飞世尔公司); 高氯酸盐同位素内标(纯度 > 98%, 美国 Sigma 公司); 高氯酸盐标准溶液(1000 mg/L, 中国标准物质研究中心); 实验用水为一级水, 由娃哈哈纯净水通过 Milli-Q 型超纯水仪二次净化得到。

土壤样品从茶叶生长基地和农田采样。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters BEH Amide 氨基柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL; 流速: 0.25 mL/min; 流动相: A: 乙腈, B: 10 mmol/L 乙酸铵溶液, 氨水调节至 pH=10, 洗脱程序为: 0~0.5 min, 80% A; 0.5~4.0 min, 80% A~20% A; 4.0~4.2 min, 20% A~80% A; 4.2~8 min 80% A。

2.3 质谱条件

采用 ESI 源, 负离子多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)测定模式, 离子源参数: 毛细管电压 4.0 kV, 雾化气流量 3.5 L/min, 加热气流量 10.0 L/min, Heat Block 温度 400 °C, DL 管温度 250 °C, Interface 温度 300 °C, 其他相关质谱参数见表 1。

2.4 标准溶液的制备

准确称取适量高氯酸盐同位素内标, 配制质量浓度为 200 mg/L 内标标准储备液。取高氯酸盐标准溶液配制分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100 μg/L 的标准曲线。在标准工作溶液中加入浓度为 1.0 μg/L 的高氯酸盐同位素内标。

2.5 样品前处理

称取土壤样品(自然风干, 缩分, 过 0.25 mm 筛)(2.50±0.01) g 于 50 mL 离心管中, 加入 250 μL 高氯酸盐同位素内标(100 μg/L), 加入 25 mL 0.2% 的乙酸溶液和 5 mL 二氯甲烷, 高速匀浆 1 min, 10000 r/min 离心 2 min, 上层清液待净化。取上清液 3 mL 过 HLB 小柱(预先用 5 mL 的超纯水和 5 mL 色谱甲醇活化)净化, 前 2 mL 弃去不要, 收集后 1 mL, 过 0.22 μm 水溶性滤膜, 待上机测定。

表 1 高氯酸盐及其内标的质谱条件参数
Table 1 Mass spectrometry conditional parameters of perchlorate and internal standard

化合物	离子对(<i>m/z</i>)	Q ₁ -偏转电压/V	碰撞能量/V	Q ₃ -偏转电压/V
高氯酸盐定量离子对	98.9/82.9	19.0	35	18.0
高氯酸盐定性离子对	100.9/84.9	22.0	33	31.0
高氯酸盐内标	106.9/88.9	26.0	30	33.0

3 结果与分析

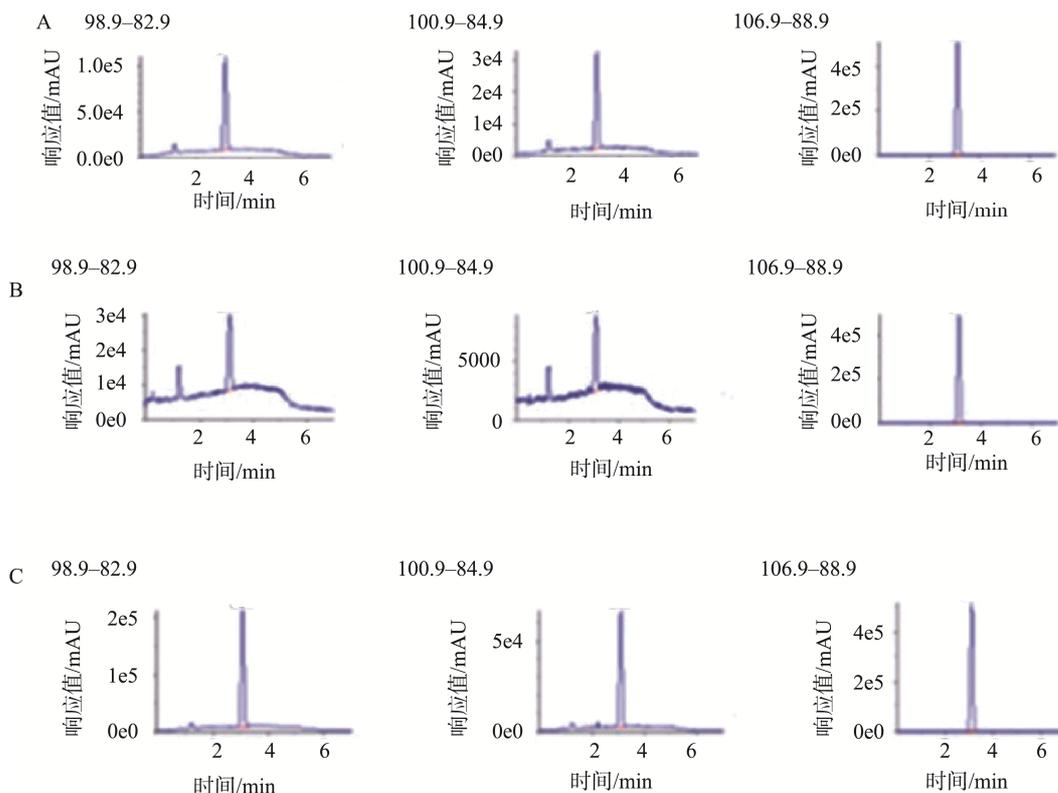
3.1 质谱条件的优化

高氯酸盐为强阴离子, 适合采用负离子模式检测, 在 ESI 源负离子模式下对高氯酸盐及其内标以蠕动泵的方式进行优化, 一级扫描得到母离子 98.9/106.9, 然后再进行二级扫描, 发现分别只有子离子 82.9、88.9, 为了满足检测方法 2 对离子对同时定性的要求, 选取高氯酸盐同位素峰作为另外一对定性离子对 100.9-84.9, 然后对 Q_1 -偏转电压、碰撞能量、 Q_3 -偏转电压进行优化得到最佳的质谱条件(见表 1), 最后再对毛细管电压、雾化气流量、加热气流量、Heat Block 温度、DL 管温度、Interface 温度等离子源参数进行优化, 得到最佳的仪器条件。

3.2 色谱柱和流动相的优化

质谱检测虽然具有高的灵敏度和选择性, 但是对于高氯酸盐的强极性和水溶性, 需要选择合适的色谱柱和流动相以及洗脱条件使其具有尖锐对称的峰型和一定的分离

度, 才能发挥出质谱的优势, 常规的 C_{18} 和 T_3 等色谱柱对高氯酸盐没有保留, 需要亲水作用色谱(hydrop interaction liquid chromatography, HILIC)模式色谱柱对其进行分离。氨基柱是 HILIC 模式中的一种, 在糖类碳水化合物分析中广泛应用。氨基柱常用的流动相是乙腈和水, 高氯酸盐是负离子模式, 于是在流动相中加入适当浓度的乙酸铵和氨水提高离子化效率, 同时改善色谱峰的峰型, 实验发现乙酸铵的浓度为 10 mmol/L 时, 峰型尖锐对称, 继续增加乙酸铵的浓度会对检测器造成污染, 于是确定乙酸铵的浓度为 10 mmol/L, 再添加氨水调节乙酸铵溶液的 pH, 由于考虑 Waters BEH Amide 氨基柱 pH 上限, 最终确定乙酸铵溶液的 pH 为 10。同时梯度洗脱有助于减少基质对目标化合物的干扰, 获得更好的质谱响应, 于是选择梯度洗脱。通过实验得到最佳的液相条件为: 氨基柱色谱柱梯度洗脱分离, 流动相为 pH=10 的 10 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈, 色谱图见图 1。从图 1 可以看出, 优化后的条件色谱峰尖锐对称, 可以进行准确的定量。



注: A:标准样品典型多反应监测扫描色谱图, B:土壤样品典型多反应监测扫描色谱图,

C: 土壤样品添加回收的典型多反应监测扫描色谱图。

图 1 高氯酸盐相关的典型多反应监测扫描色谱图

Fig.1 Scanning chromatograms for typical multireaction monitoring of perchlorate correlation

3.3 提取剂的选择

高氯酸盐大多数溶于水, 故采用纯水对土壤中高氯酸盐进行提取, 但是发现提取回收率在 60%~100%之间, 部分土壤的回收率不高, 有文献^[7,13,15]报道用乙酸水溶液进行提取, 于是尝试用乙酸水溶液进行提取, 经过实验发现采用 0.2% 的乙酸溶液进行提取时, 回收率在 85.2%~102%之间, 可能原因为高氯酸根与一些金属离子形成结合态, 加入乙酸之后可将结合态置换出来, 回收率提高^[4], 因此选择 0.2% 的乙酸溶液作为提取剂。

3.4 提取方法的选择

本研究比较了震荡提取、匀浆提取和超声提取 3 种方法的提取效率和提取时间, 当达到预期的提取率时, 匀浆提取的时间最短(1 min)。这是因为高速组织匀浆机高速转动过程形成了较大的固液接触面积, 从而在较短的时间内达到良好的提取效果, 因此选择匀浆提取。

3.5 净化方法的选择

土壤样品用二氯甲烷和水提取, 二氯甲烷可以除去一些脂溶性杂质, 再用固相萃取小柱进行净化。OasisHLB 小柱的填料为亲水亲脂的反相吸附剂, 对蛋白质、脂肪、色素等物质具有很好吸附, 在激素和抗生素等测定中应用广泛, 因此用 OasisHLB 小柱作为净化柱。将 1.0 μg/L 高氯酸盐及其内标标准溶液过 HLB 小柱, 收集流出液, 测其回收率在 93.8%~98.5%之间, 说明 HLB 小柱对高氯酸盐及其内标标准溶液没有吸附, 因此可以采用过滤式净化吸附杂质。称取样品 2.5 g, 进行匀浆提取, 离心上层清液过 HLB 小柱, 每隔 0.5 mL 收集流出液, 进样测定, 2 mL 以后高氯酸盐测定结果达到稳定, 因此本实验需要净化液的体积为 3 mL, 收集后面的 1mL 进样分析。本研究的净化方法为 HLB 小柱过滤净化。

3.6 基质效应的考察

基质效应是由基质引起的响应信号减弱或者增强的现象, 普遍存在于质谱分析之中, 其干扰物主要是一些憎水性半极性和热不稳定的一些化合物。降低基质效应的方法主要有: 同位素内标法、净化法、基体匹配标准曲线法、基体补偿剂法。本研究将固相萃取净化与同位素内标法结合起来消除基体效应的影响而保证定量分析的准确性。直接提取进样分析回收率为 30.5%~47.2%, 固相萃取净化进样分析回收率为 50.1%~67.4%, 固相萃取净化与同位素内标法结合进样分析回收率为 85.2%~102%, 可见固相萃取净化与同位素内标法可以有效解决基质效应对定量的影响。

3.7 方法的线性范围、准确度与精密度、检出限、定量限

在 3.1~3.2 实验条件下, 高氯酸盐在 0.1~100 μg/L 浓

度范围内有良好的线性关系, 其中 Y 为峰面积, X 为浓度, 峰面积对浓度进行线性拟合, 线性方程为 $Y=25056X-389$, 相关系数为 0.9995。检出限的确定通过空白样品不断降低添加高氯酸盐标准溶液的浓度, 当达到 3 倍信噪比时对应的加标浓度, 定量下限的确定通过空白样品不断降低添加高氯酸盐标准溶液的浓度, 当达到 10 倍信噪比时对应的加标浓度^[9], 目前未遇到空白土壤样品, 因此把 3 倍信噪比对应的土壤样品中的浓度作为检出限, 10 倍信噪比对应的土壤样品中浓度作为定量限。通过实验分析得到检出限和定量限分别为 0.3、1.0 μg/kg。方法的准确度、精密度分别通过添加回收率和相对标准偏差来衡量, 添加浓度分别为样品本底值的 0.5、1、2 倍左右, 回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)的结果见表 2。该方法中高氯酸盐的回收率在 85.2%~102%之间, 回收率的结果比较满意, 方法的准确性较高, 方法精密度 RSD 值小于 8%, 说明方法的稳定性好。

表 2 高氯酸盐的回收率和精密度实验结果($n=3$)
Table 2 Experimental results of the spike recovery and RSDs of perchlorate($n=3$)

本底值 /(μg/kg)	添加浓度 /(μg/kg)	测定值 /(μg/kg)	回收率 /%	RSD/%
5.23	2.50	7.36	85.2	6.58
	5.00	9.61	87.6	5.49
	10.0	14.3	90.7	4.48
20.4	10.0	29.8	94.0	7.15
	20.0	39.6	96.0	6.78
	40.0	61.2	102	5.23
214	100	308	94.0	7.19
	200	407	96.5	6.43
	400	618	101	5.68

3.8 实际样品测定

运用此方法对茶叶生长基地以及部分农田土壤采样 20 份, 自然风干, 磨碎缩分, 过 0.25 mm 筛, 然后进行测定, 所有土壤样品均有高氯酸盐检出, 测定值在 0.0052~1.31 mg/kg。

4 结论

本研究通过对前处理条件、色谱柱、流动相以及质谱条件进行优化, 建立了同位素稀释内标-液相色谱-串联质谱测定土壤中高氯酸盐的分析方法。该方法灵敏度高, 检出限为 0.3 μg/kg, 定量限为 1.0 μg/kg, 回收率在 85.2%~102%之间, RSD 值小于 8%, 准确度高, 为土壤中高氯酸盐的监控提供技术支撑。

参考文献

- [1] Parma. Scientific opinion on risks for public health related to the presence of chlorate in food [J]. EFSA J, 2015, 13(6): 4135.
- [2] Furdul VI, Tomassini F. Trends and sources of perchlorate in arctic snow [J]. Environ Sci Technol, 2010, 44: 88–592.
- [3] Kang N, Jackson WA, Dasgupta PK, *et al.* perchlorate production by ozone oxidation of chloride in aqueous and dry system [J]. Sci Total Environ, 2008, 405: 301–309.
- [4] 邓家军, 潘华, 张富生, 等. 茶叶中高氯酸盐污染及分析技术[J]. 茶叶科学, 2019, 39(4): 372–381.
Deng JJ, Pan H, Zhang FS, *et al.* Perchlorate contamination in tea and its analytical techniques [J]. J Tea Sci, 2019, 39(4): 372–381.
- [5] 张振城, 于雪荣, 单晓梅, 等. 饮用水中高氯酸盐的离子色谱测定法[J]. 职业与健康, 2018, 34(1): 40–43.
Zhang ZC, Yu XR, Shan XM, *et al.* Determination of perchlorate in drinking water by ion chromatography [J]. Occup Health, 2018, 34(1): 40–43.
- [6] 蔡亚岐, 史亚利, 张萍, 等. 高氯酸盐的环境污染问题[J]. 化学进展, 2006, 18(11): 1554–1564
Cai YQ, Shi YL, Zhang P, *et al.* Environmental pollution of perchlorate [J]. Prog Chem, 2006, 18(11): 1554–1564.
- [7] 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(11): 986–988.
Liu XF, Fang CR, Liu H, *et al.* Determination of perchlorate in tea by IC-MS/MS [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(11): 986–988.
- [8] 孙文闪, 诸骏杰, 余鹏飞, 等. 分散固相萃取净化离子色谱-串联质谱测定茶叶中高氯酸盐[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(20): 6927–6932.
Sun WS, Zhu JJ, Yu PF, *et al.* Determination of perchlorate in tea by ion chromatography triple quadrupole mass spectrometry using dispersive solid-phase extraction sorbent [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(20): 927–6932.
- [9] 张萍, 史亚利, 蔡亚岐, 等. 离子色谱-质谱连用测定牛奶中的高氯酸盐、溴酸盐和碘离子[J]. 分析测试学报, 2007, 26(5): 690–693.
Zhang P, Shi YL, Cai YQ, *et al.* Determination of perchlorate, chlorate and iodide ions in milk by IC-MS [J]. J Instrum Anal, 2007, 26(5): 690–693.
- [10] 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): 3680–3685.
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): 3680–3685.
- [11] Alexander J, Krynisky RA, Niemann AD, *et al.* Streamlined sample preparation procedure for determination of perchlorate Anion in foods by ion chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Tica Chem Acta, 2006, 567: 94–99.
- [12] Aribi H, LeBlanc YJC, Antonsens, *et al.* Aanalysis of Perchlorate in foods and beverages by ion chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry (IC-MS-MS) [J]. Anal Chim Acta, 2006, 567: 39–47.
- [13] 刘艳英, 吴敏, 林立毅, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的高氯酸盐[J]. 分析测试学报, 2011, 30(7): 821–824.
Liu YY, Wu M, Lin LY, *et al.* Determination of perchlorate in milk by LC-MS/MS [J]. J Instrum Anal, 2011, 30(7): 821–824.
- [14] 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(11): 1–4.
Feng DJ, Zou Y, Shi XF, *et al.* Study on perchlorate in tea by LC-MS/MS [J]. Chin Measur Test Technol, 2016, 42(11): 1–4.
- [15] 宋正规, 张书芬, 周子焱, 等. 超高液相色谱-串联质谱测定同时测定茶叶中的高氯酸盐和氯酸盐[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 UPLC-MS-MS [J]. J Tea Sci, 2017, 37(6): 597–604
- [16] 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, (10): 244–246.
Wang J, Hu M, Zhang T, *et al.* Detecmination of chlorate and perchlorate in drinking water by LC-MS/MS [J]. Food Sci, 2010, (10): 244–246.
- [17] 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].
- [18] 张峰, 赵雅芳, 李冠华, 等. 液相色谱串联质谱法测定污染土壤中高氯酸盐含量的不确定度评定[J]. 环境科学导刊, 2015, 34(4): 102–105.
Zhang F, Zhao YF, Li GH, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of perchloratet in soil by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Environ Sci Surv, 2015, 34(4): 102–105.
- [19] GB/T 27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S].
GB/T 27417-2017 Comformity assessment-Guidance on validation and verification of chemical analytical methods [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



孙文闪, 硕士, 工程师, 主要研究方向为色谱质谱分析。

E-mail: 627268600@qq.com



钟寒辉, 工程师, 主要研究方向为食品安全分析检测。

E-mail: 233245005@qq.com