

实验技术与方法

高效液相色谱-串联质谱法测定乳制品中高氯酸盐

吴映璇^{1,2}, 林峰^{1,2}, 谢敏玲^{1,2}, 姚仰勋^{1,2}, 蓝草^{1,2}, 陈思敏^{1,2}

(1. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东 广州 510623; 2. 广州出入境检验检疫局广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广东 广州 510623)

摘要:目的 建立乳制品中高氯酸盐的高效液相色谱-串联质谱定量分析检测方法。方法 样品采用1%乙酸-乙腈溶液(1:2, V/V)提取, C₁₈固相萃取柱净化, 在IC-Pak™ Anion HR 色谱柱(4.6 mm × 75 mm, 6 μm)上, 以乙腈-乙酸铵溶液(60:40, V/V)作为流动相, 等度分离。采用液相色谱-质谱联用技术-电喷雾离子源多反应监测模式检测, 内标法定量。结果 高氯酸盐在0.1~10.0 μg/L范围内具有良好的线性关系, 牛奶和奶粉的定量限分别为1.0和3.0 μg/kg; 在三个添加水平下回收率范围在87.6%~122.0%之间, 相对标准偏差(RSD)范围为2.0%~10.0%。结论 本方法灵敏、准确, 适用于乳制品中高氯酸盐的分析测定, 具有较好的实际应用价值。

关键词: 高氯酸盐; 固相萃取; 同位素; 高效液相色谱-串联质谱; 乳制品; 测定

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)02-0160-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.02.009

Determination of perchlorate in dairy products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WU Ying-xuan^{1,2}, LIN Feng^{1,2}, XIE Min-ling^{1,2}, YAO Yang-xun^{1,2}, LAN Cao^{1,2}, CHEN Si-min^{1,2}

(1. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Guangzhou 510623, China; 2. Key Laboratory of Animals and Plants and Food Import and Export of Technical Measures in Guangdong Province, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective An analytical method based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was developed for the determination of perchlorate in dairy products. **Methods** Samples were extracted with 1% acetic acide-acetonitrile solution (1:2, V/V), and the extract was then cleaned up on a solid-phase extraction (SPE) cartridge and separated on a IC-Pak™ Anion HR column (4.6 mm × 75 mm, 6 μm) by using acetonitrile and ammonium acetate solution (60:40, V/V) as mobile phase. The analytes were determined by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with electrospray ionization source in multiple reaction monitoring (MRM). The internal standard calibration was used for quantification. **Results** Good linearity was observed in the range of 0.1 to 10.0 μg/L. The limit of quantitation of the established method was 1.0 μg/kg in milk and 3.0 μg/kg in milkpowder. The recovery rate of perchlorate was 87.6% -122.0% at three spiked levels in deferent samples, with relative standard deviation of 2.0% -10.0%. **Conclusion** The method was sensitive, accurate, and suitable for the analysis of perchlorate in dairy products.

Key words: Perchlorate; solid-phase extraction; isotope; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; dairy products; test

高氯酸盐是固体火箭燃料、炸药和烟火的成分之一, 因其水溶性高、流动性强、具有高度的扩散性和持久性, 广泛存在于环境中。如果饲喂奶牛的饲

料和水源受到污染都有可能引入高氯酸盐^[1-3]。若长期食用含有高氯酸盐的乳制品, 可抑制碘的摄入, 给消费者的健康带来巨大威胁。有研究^[4-5]表明, 按照食物摄入量模型预测, 婴儿比成人具有更高的高氯酸盐暴露剂量。基于乳制品对婴幼儿和儿童的健康具有潜在的影响, 其安全问题显得非常重要。目前, 国内外已有关于饮用水、水源、奶类、酒、大米、蔬菜以及营养补充剂等中高氯酸盐含量的相关调查研究^[6-7], 我国也有关于饮用水、牛奶和

收稿日期: 2016-12-14

基金项目: 广东省科技计划项目(2014A040401064); 广东检验检疫局科技计划项目(2015GDK10); 检验检疫行业标准计划项目(2009B535); 国家质检总局项目(2012IK150)

作者简介: 吴映璇 女 高级工程师 研究方向为食品安全检测
E-mail: allanwyx@126.com

奶粉中高氯酸盐污染情况的研究^[8-10],鲜有关于乳制品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乳制品中高氯酸盐含量的同位素稀释方法,以保障消费者尤其是婴幼儿等敏感群体的健康。

高氯酸盐的测定方法主要有离子色谱法^[11]、表面增强拉曼散射法^[12]和离子色谱-串联质谱法^[13-14]等,高效液相色谱-串联质谱法应用较少^[8-9]。常用的离子色谱-串联质谱法需要配备用于基体转换的在线转换阀等配件,在进入质谱仪检测前,需要将含有氢氧化钠或氢氧化钾的洗脱液转化成水,而且离子色谱仪与质谱仪的联用设备较少且价格昂贵,难以普及。而高效液相色谱-串联质谱法具有良好的灵敏度和选择性,无需额外的配件要求,成本低、通用性强,有利于方法的推广和应用;因此,本课题组在之前的研究基础上采用液相色谱-串联四极杆质谱结合同位素稀释、固相萃取等技术,建立了乳制品中高氯酸盐的检测方法。与现有的高效液相色谱-串联质谱法比较^[8-9],本方法全程引入同位素内标,确保了定量分析结果的可靠性,提高了方法的准确性和重复性。与黄晓兰等^[8]的样品净化量为10 g,将55 ml的溶液浓缩至2 ml比较,本方法样品净化量仅为0.25 g,无需浓缩,操作更简便、快捷、灵敏度高,改善了峰形不对称、拖尾的现象,能够为乳制品中高氯酸盐污染状况的监测工作和产品质量控制提供科学依据和技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

牛奶、奶粉样品均购自超市,于4℃冰箱保藏备用。

1.1.2 主要仪器与试剂

4000QTRAP液相色谱-串联质谱仪(美国AB Sciex)、C₁₈固相萃取柱(200 mg/3 ml,美国Waters, 3 ml乙腈、3 ml 1%乙酸活化后备用)、离心机、涡旋混合器。

高氯酸盐标准溶液(美国Inorganic Ventures),¹⁸O标记高氯酸根溶液(美国Cambridge Isotope Laboratories),乙腈、乙酸均为HPLC级,乙酸铵(优级纯)。1%乙酸溶液:移取10.0 ml乙酸至1 L容量瓶中,加水至刻度,摇匀备用。乙酸铵溶液(100 mmol/L):称取7.708 g乙酸铵,用水定容至1 000 ml,混匀后备用。

1.2 方法

1.2.1 溶液的制备

标准储备溶液(10 mg/L)、标准中间溶液(100

μg/L):准确吸取适量高氯酸盐标准溶液,分别置于100 ml容量瓶中,用水定容至刻度,于4℃保存。

¹⁸O标记高氯酸根储备溶液(10 mg/L)、¹⁸O标记高氯酸根中间溶液(100 μg/L):准确吸取适量的¹⁸O标记高氯酸根标准溶液,分别置于10 ml容量瓶中,用水定容至刻度,于4℃保存。

标准工作溶液:吸取一定量的标准中间溶液和¹⁸O标记高氯酸根中间溶液,用水配制成质量浓度为0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/ml的标准工作溶液,¹⁸O标记高氯酸根浓度均为2.0 ng/ml,当天配制。

1.2.2 样品提取

称取样品5 g(精确至0.01 g)至50 ml离心管中,加100 μl ¹⁸O标记高氯酸根中间溶液(100 μg/L),加10 ml 1%乙酸溶液(牛奶样品加5.0 ml),涡旋振荡2 min,加20.0 ml乙腈,水平振荡器振荡30 min,10 000 r/min离心10 min,分离上清液于具塞离心管中,用1%乙酸溶液定容至30 ml,摇匀,待净化。

1.2.3 样品净化

吸取1.5 ml上清液过C₁₈固相萃取柱,收集流出液,涡旋振荡30 s,供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.2.4 仪器条件

色谱条件:IC-PakTM Anion HR柱(4.6 mm × 75 mm,6 μm),流动相为乙腈-乙酸铵溶液(60:40, V/V),等度洗脱。流速0.70 ml/min,柱温40℃,进样量10 μl。

质谱条件:电喷雾负离子模式(ESI-)扫描,多反应监测(MRM),气帘气压力(CUR)207 kPa,雾化气压力(GS1)414 kPa,辅助加热气压力(GS2)483 kPa,碰撞气压力(CAD)17 kPa,电喷雾电压(IS)-1 000 V,离子源温度(TEM)550℃,监测离子对、碰撞能量、去簇电压和保留时间见表1。

表1 高氯酸根离子的质谱分析参数

化合物	保留时间 /min	母离子 /(<i>m/z</i>)	子离子 /(<i>m/z</i>)	去簇电 压/V	碰撞能 量/V
高氯酸盐	4.61	99	83*	-44	-36
	4.61	101	85	-65	-37
¹⁸ O标记高氯酸根	4.61	107	89	-80	-37

注:*表示定量离子。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

牛奶、奶粉等乳制品中含有多种有机成分,如蛋白质、脂肪、糖类等,蛋白质可用乙腈沉淀去除,脂肪不溶于水-乙腈体系,不会被提取出来。通过试

验发现,采用1%乙酸-乙腈溶液作为提取溶剂的添加回收要优于采用水-乙腈作为提取溶剂,因此,本试验选用1%乙酸-乙腈溶液作为提取溶剂。

采用不同体积比的提取溶剂对回收率进行测定,结果表明,1%乙酸溶液-乙腈的体积比为1:1时,杂质干扰较大,提取液呈混浊;1%乙酸溶液-乙腈的体积比分别为1:2、1:3和1:4时,杂质干扰较小,脂肪、蛋白质沉淀效果较好,提取液澄清透明。但随着乙腈体积比的增加,高氯酸盐的提取效率逐渐降低,综合考虑各影响因素,选用1%乙酸溶液-乙腈(1:2, V/V)作为提取溶剂。

表2 不同体积比的提取溶剂对回收率的影响

Table 2 Comparison the effect of volume ratio on the recovery

1%乙酸-乙腈体积比(V/V)	高氯酸盐回收率/%
1:1	99.0
1:2	99.7
1:3	96.8
1:4	95.0

2.2 固相萃取柱的选择

本试验考察了3种不同填料量的C₁₈固相萃取柱,分别为60、200和500 mg/3 ml。结果发现,样液过上述3种不同填料量的柱子净化后,均可得到澄清透明的溶液,但将样液放置于4℃冷藏2 h后,采用填料量为60 mg/3 ml净化的样液有白色絮状物析出,而其他2种填料量的样液并未发现异常。其原因可能是柱子超载,杂质未去除干净;此外,经仪器分析后发现,200和500 mg/3 ml净化后的样品添加回收率无明显区别;因此本方法采用200 mg/3 ml的C₁₈固相萃取柱为净化柱。

2.3 基质效应

大气压喷雾电离离子源质谱分析容易受样品基质的影响,为解决此问题,本试验采用固相萃

取的方式对样品提取液进行净化,以减少样品基质效应;另外,在待测样品中加入同位素内标,使得高氯酸盐及其同位素内标在样品进行前处理操作过程中,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^[15]。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,补偿了高氯酸盐由于基质效应的影响引起的响应信号的改变;因此,为了准确地定量乳制品中的高氯酸盐,确保定量分析结果的可靠性,本试验采用固相萃取净化,结合同位素内标法进行定量,以减少基质效应的影响,从而明显提高方法的准确性和重复性。

2.4 线性范围的确定

在所确定的试验条件下,取一系列不同质量浓度(0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/ml)的高氯酸盐标准工作液,以仪器响应峰面积(y)对高氯酸盐的质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)进行线性回归,结果表明,当高氯酸盐的质量浓度在0.1~10.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性关系,其回归方程为 $y = 0.451x + 0.0136$,相关系数 $r = 1.0000$ 。在本方法的测定条件下,按照3倍信噪比计,高氯酸盐在牛奶和奶粉样品中的检出限(LOD)分别为0.01和0.05 $\mu\text{g/kg}$;当在牛奶样品中添加水平为1.0 $\mu\text{g/kg}$ 时,信噪比大于10,表明其定量限(LOQ)可达到1.0 $\mu\text{g/kg}$,见图1。当在奶粉样品中添加水平为3.0 $\mu\text{g/kg}$ 时,信噪比大于10,表明其定量限可达到3.0 $\mu\text{g/kg}$,见图2。当样品中的高氯酸盐浓度超过此线性范围时,可适当加大样品的稀释倍数。

2.5 回收率和精密度

采用牛奶和奶粉样品进行添加回收和精密度试验,其中高氯酸盐含量分别为0.1和1.4 $\mu\text{g/kg}$,添加水平为1.0、2.0、10.0 $\mu\text{g/kg}$ 和3.0、6.0、

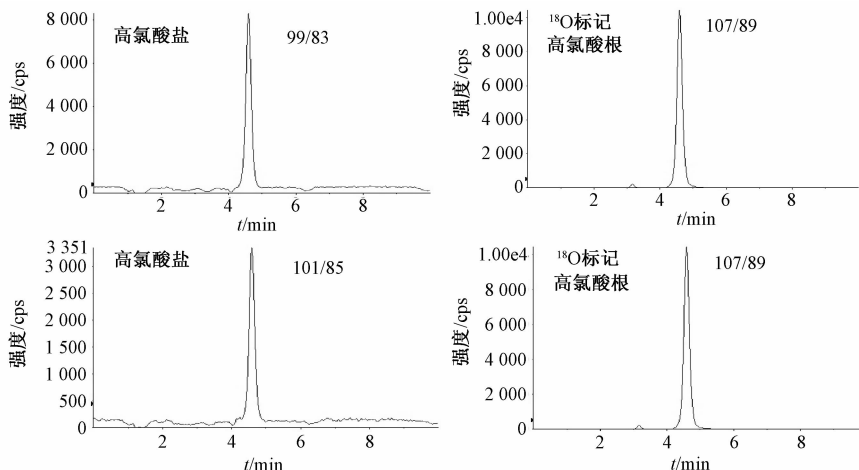


图1 牛奶基质标准添加(添加水平1.0 $\mu\text{g/kg}$)的MRM色谱图

Figure 1 MRM of perchlorate in milk at the spiked level of 1.0 $\mu\text{g/kg}$

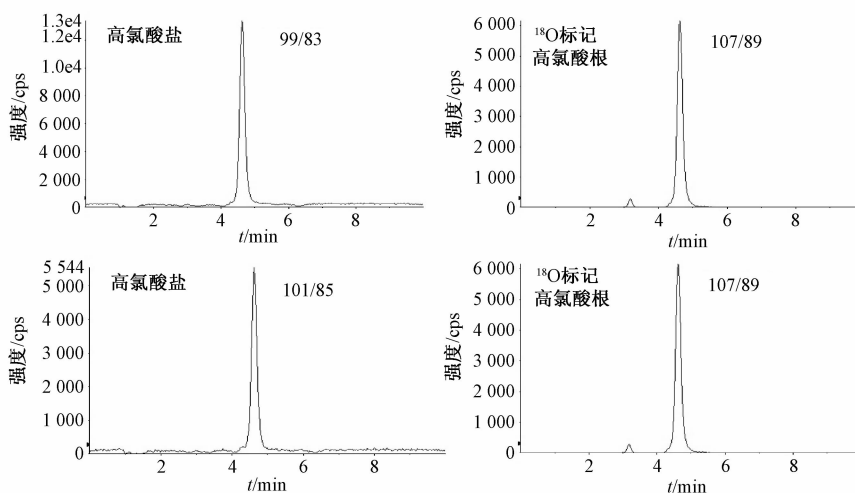


图2 奶粉基质标准添加(添加水平 3.0 μg/kg)的MRM 色谱图

Figure 2 MRM of perchlorate in milk powder at the spiked level of 3.0 μg/kg

30.0 μg/kg,按本试验所用方法提取和净化,每个添加水平平行测定 10 次,回收率和精密度见表 3。结果表明,添加水平为 1.0 ~ 30.0 μg/kg 时,高氯酸盐的平均回收率为 87.6% ~ 122.0%,相对标准偏差(RSD)为 2.0% ~ 10.0%。本方法适用于乳制品中高氯酸盐残留量的测定,具有简便、快速、灵敏度高等优点。

度比的相对偏差为 0.75%,奶粉样品与标准溶液相对丰度比的相对偏差为 3.30%。

表 3 方法回收率和精密度试验 (n = 10)

Table 3 Recoveries and precisions of determination

样品	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	RSD/%
牛奶	1.0	92.7 ~ 122.0	10.0
	2.0	97.9 ~ 104.0	2.9
	10.0	97.3 ~ 104.0	2.0
奶粉	3.0	96.0 ~ 118.0	7.1
	6.0	91.2 ~ 103.0	3.3
	30.0	87.6 ~ 100.0	4.6

3 小结

本试验采用同位素稀释,建立了以固相萃取柱净化的高效液相色谱-串联质谱测定乳制品中高氯酸盐的方法。结果表明采用固相萃取柱净化方法,在一定程度上降低了样品的基质效应,分析过程中引入同位素内标,对于分析全过程中导致目标物损失给予完全的校正,改善了方法的精密度。本方法应用于乳制品中高氯酸盐的检测和确证,有较好的灵敏度和精密度。

2.6 实际样品的测定

采用本试验所建立的分析方法,检测 135 份奶粉和 29 份牛奶样品中的高氯酸盐含量。结果表明,大多数样品中均检出高氯酸盐,超出方法定量限的牛奶和奶粉样品中高氯酸盐含量分别为 1.4 ~ 6.4 和 3.1 ~ 94.0 μg/kg。

2.7 二级质谱碎片的相对丰度比

质谱分析中同一分析物的质谱碎片离子间的相对丰度比是对分析物定性(确证)的重要依据,欧盟 2002/657/EC^[16]规定了样品中的某一分析物的质谱碎片离子间的相对丰度比与同一批次检验的标准样品(溶液)的质谱碎片离子间的相对丰度比的相对偏差。本试验对添加回收试验的样品进行碎片离子间的相对丰度比计算,牛奶和奶粉添加样品与标准溶液碎片离子间的相对丰度比分别为 0.400、0.410 和 0.397,牛奶样品与标准溶液相对丰

参考文献

- [1] 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):617-624.
- [2] KIRK A B, DYKE J V, MARTIN C F, et al. Temporal patterns in perchlorate, thiocyanate, and iodide excretion in human milk[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(2):182-186.
- [3] SANCHEZ C A, BLOUNT B C, VALENTIN-BLASINI L, et al. Perchlorate in the feed-dairy continuum of the southwestern United States[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(13):5443-5450.
- [4] VALENTIN-BLASINI L, BLOUNT B C, OTERO-SANTOS S, et al. Perchlorate exposure and dose estimates in infants[J]. Environ Sci Technol, 2011, 45(9):4127-4132.
- [5] LEUNG A M, BRAVERMAN L E, HE X M, et al. Environmental perchlorate and thiocyanate exposures and infant serum thyroid function[J]. Thyroid, 2012, 22(9):938-943.
- [6] TAKATSUKI S, WATANABE T, MATSUDA R. Surveillance of perchlorate level in wine, seafood, polished rice, milk, powdered milk and yogurt[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2011, 52(1):78-85.
- [7] KUBAŇ P, KIPLAGAT I K, BOČEK P. Electrokinetic injection across supported liquid membranes: new sample pretreatment technique for online coupling to capillary electrophoresis. Direct

- analysis of perchlorate in biological samples[J]. Electrophoresis, 2012,33(17):2695-2702.
- [8] 黄晓兰,罗辉泰,吴惠勤,等. 奶粉中高氯酸盐的液相色谱-串联质谱测定[J]. 分析测试学报,2009,28(8):896-899.
- [9] 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.
- [10] 史亚利. 离子色谱与 API 2000(IC/MS/MS)联用分析食品和饮料中的高氯酸盐[J]. 环境化学,2006,25(1):117-120.
- [11] SUNGUR S, ATAN M M. Determination of nitrate, nitrite and perchlorate anions in meat, milk and their products consumed in Hatay region in Turkey[J]. Food Addit Contam Part B Surveill, 2013,6(1):6-10.
- [12] GU B H, RUAN C M, WANG W. Perchlorate detection at nanomolar concentrations by surface-enhanced Raman scattering [J]. Applied Spectroscopy, 2009,63(1):98-102.
- [13] FURDUI V I, TOMASSINI F. Trends and sources of perchlorate in Arctic snow[J]. Environmental Science and Technology, 2009,44(2):588-592.
- [14] KANG N, JACKSON W A, DASGUPTA P K, et al. Perchlorate production by ozone oxidation of chloride in aqueous and dry systems[J]. Science of the Total Environment, 2008,405(1/3):301-309.
- [15] 齐美玲. 液相色谱-质谱法在生物样品药物定量分析中的基质效应[J]. 药物分析杂志, 2005,25(4):476-479.
- [16] Commission decision 2002/657/EC Implementing council directive 96/23/EC Concerning the performance of analytical methods and interpretation of results[Z]. Official Journal of the European Communities, 2002.

实验技术与方法

高效液相色谱法测定保健食品中红景天苷

谭莹,倪竹南,胡争艳,张晶,王志园,汤鋈

(浙江省疾病预防控制中心,浙江 杭州 310051)

摘要:目的 改进保健食品中红景天苷的高效液相色谱(HPLC)测定方法。方法 用不同溶剂稀释对照品及提取样品,以 HPLC 法测定红景天苷含量,选择最佳溶剂,优化色谱条件,并作方法学论证。结果 以 50% 甲醇作为对照品的稀释溶液和样品的提取溶剂,红景天苷在 1.305 ~ 130.5 μg/ml 的线性范围内线性良好,回归方程 $y = 7.377395 \times 10^{-5}x + 0.1873961$ ($r = 0.9999$),最低检出浓度为 0.015 mg/g;平均回收率为 92.1% ~ 98.4%,RSD 为 1.98% ~ 3.26%。结论 本方法操作简便、定量准确可靠。

关键词:红景天苷;保健食品;高效液相色谱;功效成分;测定;方法

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)02-0164-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.02.010

Determination of salidroside in health food by high performance liquid chromatography

TAN Ying, NI Zhu-nan, HU Zheng-yan, ZHANG Jing, WANG Zhi-yuan, TANG Jun

(Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310051, China)

Abstract: Objective To improve the high performance liquid chromatography method for quantitation of salidroside in health food. **Methods** The solvent and chromatography condition were optimized according to the determination of standard and extracted samples. **Results** Salidroside content exhibited a linear relation within 1.305-130.5 μg/ml using 50% methanol as solvent. The regression equation was $y = 7.377395 \times 10^{-5}x + 0.1873961$ ($r = 0.9999$) and the detection limit was 0.015 mg/g. Furthermore, the average recoveries were 92.1%-98.4%, and the RSD was 1.98% - 3.26%. **Conclusion** This method was simple, accurate and reliable for determination of salidroside in health food.

Key words: Salidroside; health food; high performance liquid chromatography; efficacy components; detection; method

红景天为景天科植物,是被康熙帝御封为“仙

赐草”的“高原人参”,其主要功效成分为红景天苷(salidroside)。红景天苷能保护心脑血管,调节神经、内分泌系统、免疫系统,具有抗疲劳、抗衰老、抗肿瘤、抗辐射等功效^[1-7]。

市场上以红景天作为主要原料的保健食品琳琅满目,测定红景天苷含量是对这些保健食品质量控制