

- [J]. *BMJ*, 1976, 1(6011): 691.
- [5] Carlson M A, Bargeron C B, Benson R C. An automated, handheld biosensor for aflatoxin [J]. *Biosens Bioelectron*, 2000, 14(11): 841-848.
- [6] Hasan A, Abdurrahman A, Sahar S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara [J]. *Food Control*, 2005, 16(3): 263-266.
- [7] 黄亚伟, 魏光, 王若兰, 等. 乳品中黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 检测方法研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(3): 770-775.
- [8] Abdolazim B, Zahra N K, Ziyaaddin A, et al. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> levels in produced pasteurized milk in Ahvaz City by using HPLC [J]. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 2012, 7(2): 80-84.
- [9] Ghiasian S A, Maghsood A H. Infants exposure to aflatoxin M<sub>1</sub> from mother's breast milk in Iran [J]. *Iranian J Publ Health*, 2012, 41(3): 119-126.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 2761—2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [11] 胡晓飞, 职爱民, 刘庆堂, 等. 真菌毒素 ELISA 检测方法新进展 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(8): 100-103.
- [12] LIN L M, ZHANG J, WANG P. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatography methods [J]. *J Chromatogr A*, 1998(815): 3.
- [13] 李佐卿, 章再婷, 谢东华, 等. 免疫亲和柱高效液相色谱法快速测定牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> [J]. *理化检验(化学分册)*, 2005, 41(6): 406-408.
- [14] 丁俭, 李培武, 李光明, 等. 在线固相萃取富集-高效液相色谱法快速测定牛奶中黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> [J]. *食品科学*, 2013, 34(10): 289-293.

## 实验技术与方法

# 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

李雨哲, 杨杰, 王雨昕, 陈达炜, 周爽, 方从容, 赵云峰

(国家食品安全风险评估中心, 北京 100021)

**摘要:**目的 建立茶叶中高氯酸盐的超高效液相色谱-串联质谱测定方法。方法 茶叶中高氯酸盐用 0.2% 乙酸提取, 经石墨炭黑柱净化, 优选 Synergi<sup>TM</sup> MAX-RP 柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm) 为分析柱, 以超高效液相色谱-串联质谱法测定, 内标法定量。结果 高氯酸盐在 0.25 ~ 50.0 μg/L 范围内线性良好, 回归方程  $y = 1.569x + 0.0268$ , 相关系数  $r^2 = 0.9996$ 。加标浓度为 0.05 ~ 0.50 mg/kg 时, 回收率 95.6% ~ 120.0%, 相对标准偏差(RSD) 1.9% ~ 17.5%。检出限为 2.5 μg/kg。结论 本方法前处理简单、准确、灵敏度高, 适用于茶叶中高氯酸盐的测定。

**关键词:** 同位素稀释; 超高效液相色谱-串联质谱; 高氯酸盐; 茶叶; 食品污染物; 检测方法

**中图分类号:** R155 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2016)05-0616-04

**DOI:** 10.13590/j.cjfh.2016.05.013

## Detection of perchlorate in tea by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and isotope dilution method

LI Yu-zhe, YANG Jie, WANG Yu-xin, CHEN Da-wei, ZHOU Shuang, FANG Cong-rong, ZHAO Yun-feng  
(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To establish a method for the determination of perchlorate in tea by ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Methods** The perchlorate residue in tea was extracted with 0.2% acetic acid, and the supernatant was cleaned up with Carb SPE, the detection was performed by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with internal standard method for quantitative. **Results** The calibration curve was linear in the concentration range of 0.25-50 μg/L ( $r^2 = 0.9996$ ), the recovery was in the range of 95.6%-120.0%, the relative standard deviation (RSD) was in the range of 1.9%-17.5%, and the limit of detection of perchlorate was 2.5 μg/kg. **Conclusion** The method is suitable for the determination of perchlorate in tea with more simplicity, accuracy and high sensitivity.

收稿日期: 2016-04-29

基金项目: 新型含卤污染物的环境暴露组与健康效应的毒理学机制 (21537001)

作者简介: 李雨哲 女 助理研究员 研究方向为食品安全标准 E-mail: liyuzhe@cfsa.net.cn

通信作者: 赵云峰 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail: zhaoyf@cfsa.net.cn

**Key words:** Isotope dilution; ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry; perchlorate; tea; food contaminants; detection method

高氯酸盐是一种持久性的有毒无机物质,欧洲食品安全局(EFSA)对慢性和“短期”内暴露于高氯酸盐的风险进行评估,认为单次暴露于食品和水中的高氯酸盐对人类健康影响不大,但长期摄入高氯酸盐对人体的危害应当引起关注,尤其是中度缺碘的年轻群体<sup>[1]</sup>。2015年EFSA重新发布了食品中高氯酸盐对公众健康风险的科学意见,并设定0.3 μg/kg BW的每日容许摄入量<sup>[1]</sup>。近期中国出口欧盟的茶叶被检出高氯酸盐<sup>[2]</sup>,引起社会上的广泛关注,使用含有高氯酸盐的天然肥料和高氯酸盐污染的灌溉水都可能引起茶叶污染<sup>[1]</sup>。目前欧盟没有对食品中高氯酸盐的限量标准,2015年欧盟食物链及动物健康常务委员会发布了欧盟内部成员之间贸易的高氯酸盐限量,干燥茶叶中高氯酸盐的参考限量为0.75 mg/kg<sup>[1]</sup>。我国是茶叶生产、消费和出口大国,因此准确测定茶叶中高氯酸盐含量,了解国内茶叶中高氯酸盐污染水平是十分必要的。

目前,离子色谱法是水样中高氯酸盐测定的最常规方法<sup>[3-4]</sup>,离子色谱-串联质谱法(IC-MS/MS)由于灵敏度和特异性的大大提高被广泛用于食品、牛奶、植物、土壤的检测<sup>[5-11]</sup>。但由于IC-MS/MS存在普及率低、仪器操作复杂等问题,近年来有报道采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)进行水、牛奶等食品中高氯酸盐的检测<sup>[12-14]</sup>。SN/T 4089—2015《进出口食品中高氯酸盐的测定》<sup>[15]</sup>采用液相色谱-串联质谱法,但色谱柱为阴离子色谱柱,存在高氯酸盐峰型宽(时间跨度为1 min),流动相含有高浓度的盐溶液,易对质谱造成污染等问题。

本方法优选 Synergi™ MAX-RP 为分析柱,采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)进行分析,同位素内标法定量,有效克服了液相色谱-质谱法和离子色谱-质谱法测定食品中高氯酸盐易出现的操作性差、质谱易污染等不足,提高了方法的准确性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要仪器与试剂

8050超高效液相色谱-串联质谱仪[配电喷雾离子源(ESI)、色谱工作站,日本岛津]、超声波清洗器、固相萃取装置、涡旋振荡器、冷冻离心机(最大转速10 000 r/min)、Synergi™ MAX-RP柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm, 美国 Phenomenex)、Envi™ Carb 石墨碳黑柱(6 ml, 500 mg, 美国 Supelco)。

乙腈、甲醇、乙酸、甲酸均为色谱纯,高氯酸盐(1 000 μg/ml, 美国 INORGANIC),高氯酸盐内标( $\text{Cl}^{18}\text{O}_4^-$ , 100 μg/ml, OLM-7310, 美国 Cambridge Isotope Laboratories);超纯水(电导率 < 1.0 μs/cm),由 Milli-Q 超纯水系统制得。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准溶液的配制

高氯酸盐标准使用液(1 mg/L):量取高氯酸盐标准中间液(10 mg/L)1.0 ml置10 ml容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,混匀,置4℃冰箱中保存。

高氯酸盐内标使用液(1 mg/L):量取高氯酸盐内标中间液(10 mg/L)1.0 ml置10 ml容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,混匀,置4℃冰箱中保存。

高氯酸盐标准工作液:使用前,分别量取高氯酸盐标准使用液和高氯酸盐内标使用液适量,用0.2%乙酸稀释。制成含高氯酸盐浓度分别为0.25、0.50、1.0、2、10、20和50 μg/L的标准工作液,内标高氯酸盐的浓度为5.0 μg/L。

#### 1.2.2 样品制备

提取:取代表性茶叶样品约20 g,经食物粉碎机粉碎成粉末,混匀后装入洁净的容器中,密闭保存。称取茶叶粉末样品1 g于50 ml离心管中,加高氯酸盐内标使用液(1 mg/L)250 μl和0.2%乙酸溶液25 ml,涡旋混匀,用0.2%乙酸稀释至50 ml,超声提取30 min,15 min时振摇一次。在4℃条件下10 000 r/min离心10 min,取上清液待净化。

净化:石墨碳黑柱在使用前依次用5 ml乙腈、5 ml水活化,重力条件下自然流出。吸取样品上清液6.5 ml,过石墨碳黑柱,弃去前5 ml流出液,收集流出液1.5 ml,涡旋10 s,供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

#### 1.2.3 仪器条件

色谱条件:Synergi™ MAX-RP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm);流速0.7 ml/min;流动相A:0.1%甲酸溶液(V/V),流动相B:甲醇;梯度洗脱:5% B保持1 min,在5 min内增至15% B,保持4 min,再在1 min内增至85% B,保持2 min;柱温30℃;进样量10 μl。

质谱条件:电喷雾负离子化电离源(ESI),负离子模式;毛细管电压4 kV;雾化气流速3 L/min;干燥气流速10 L/min;加热气流速10 L/min;脱溶剂气温度300℃;接口温度350℃;加热模块温度400℃;碰撞器压力270 kPa;多反应监测(MRM)离

子对:高氯酸  $m/z$  99.1/83.0<sup>\*</sup>、101.1/85.0,高氯酸内标  $m/z$  107.1/88.9<sup>\*</sup>、109.1/90.9;离子对碰撞能均为 -26 V。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱柱的选择

高氯酸盐为极性水溶性化合物,在  $C_{18}$  柱上难以保留,且峰型宽,容易出现分叉和拖尾现象,难以完成复杂基质茶叶样品中高氯酸盐的分析。SN/T 4089—2015<sup>[15]</sup> 和 FDA 方法<sup>[11]</sup> 中都采用的是 IC-PaKTMAnion HR 柱,为阴离子交换型色谱柱,流动相为 100 mmol/L 乙酸铵-乙腈溶液,高氯酸盐峰型宽,时间跨度为 1 min,流动相含有高浓度的盐溶液,易对质谱造成污染。Synergi<sup>TM</sup> MAX-RP 色谱柱能适用于宽广 pH 范围(1.5~10),是以硅胶为基质的键合  $C_{12}$  反相色谱柱,由于  $C_{12}$  比  $C_{18}$  碳链短,空间位阻小,高氯酸根与硅胶上的硅羟基反应,得以保留,因此,选用了 Synergi<sup>TM</sup> MAX-RP 柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm) 为分析柱,流动相为 0.1% 甲酸-甲醇溶液,出峰时间为 7.8 min 左右,峰型尖锐,常见的溴酸盐、氯酸盐不对高氯酸盐形成干扰。溴酸盐、氯酸盐和高氯酸盐标准总离子流图见图 1。

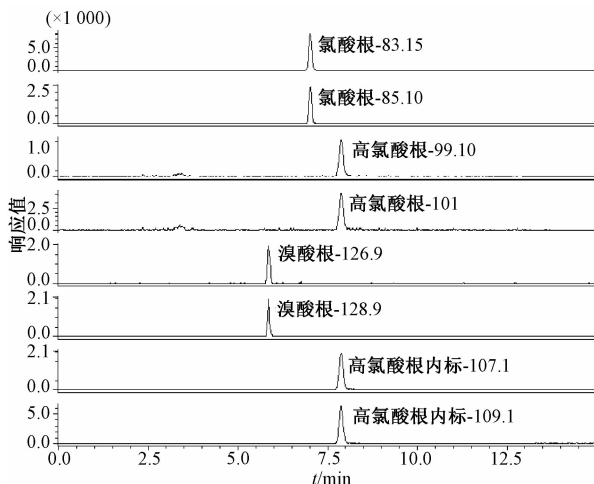


图 1 溴酸盐、氯酸盐、高氯酸盐和高氯酸盐内标标准总离子流图

Figure 1 Total ion chromatograms of bromate, chlorate, perchlorate standard and the internal standard of perchlorate

### 2.2 提取溶剂的优化

称取 1 g 绿茶样品,加入高氯酸盐内标,分别选用 0.05%、0.1%、0.2%、0.5% 和 1% 乙酸溶液进行提取,采用石墨碳黑柱净化,计算高氯酸盐内标绝对回收率,结果显示随着酸度的增加,高氯酸盐内标绝对回收率也逐步提高,分别为 31%、48%、62%、66% 和 73%。但用 Synergi<sup>TM</sup> MAX-RP 柱进行分析时,发现 1% 和 0.5% 乙酸溶液配制的高氯酸盐

标准使用液为双峰,0.2% 乙酸溶液以下配制的为单峰,且以 0.2% 乙酸为提取溶液,其内标绝对回收率为 62%,综合考虑后,采用 0.2% 乙酸溶液为提取溶剂。

### 2.3 净化柱的选择与优化

#### 2.3.1 净化柱的选择

选择 Dionex OnGuard II RP 柱和石墨碳黑柱去除茶叶提取液中的色素和大分子类物质,石墨碳黑柱去除色素的效果明显优于 Dionex OnGuard II RP 柱,且 Dionex OnGuard II RP 柱成本较高,无法进行批量化检测,因此最终选择石墨碳黑柱为净化柱。

#### 2.3.2 石墨碳黑柱净化体积的优化

分别选择内标浓度为 5 μg/L 的红茶提取液和苦丁茶提取液,在石墨碳黑柱经 5 ml 乙腈活化、5 ml 水平衡后,将上述两种溶液每间隔 1 ml 分别接收流出液,混匀,测定高氯酸盐内标峰面积,以流出体积为横坐标,内标峰面积响应值为纵坐标,绘制高氯酸盐内标在石墨碳黑柱的流出曲线图,见图 2。从红茶提取液(颜色深)和苦丁茶提取液(颜色近乎无色)高氯酸盐内标的流出曲线图可看出,用 5 ml 茶叶提取液平衡后,接收流出液 1.5 ml 进行测定,其高氯酸盐内标基本处于稳定状态,因此弃去前 5 ml 流出液,收集后续流出液 1.5 ml 进行测定。

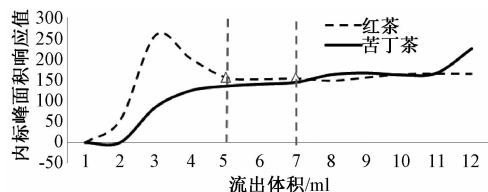


图 2 茶提取液经石墨碳黑柱净化后高氯酸盐内标流出曲线图

Figure 2 Internal standard curve of outflow of perchloric acid by carbon SPE in tea extract

### 2.4 线性范围

用 0.2% 乙酸溶液制成含高氯酸盐浓度分别为 0.25~50.0 μg/L 的标准工作液,高氯酸盐内标的浓度为 5.0 μg/L。取 10 μl 注入 UPLC-MS/MS 进行分析,内标法定量,得线性回归方程为  $y = 1.569x + 0.0268$ ,  $r^2 = 0.9996$ 。

### 2.5 回收率、精密度和检出限

选择低本底的 6 种茶叶(绿茶、红茶、普洱茶、铁观音、茉莉花茶及苦丁茶)样品,分别添加 0.05、0.1、0.5 mg/kg 的高氯酸盐,进行三个水平的加标回收试验,内标法定量,6 种茶叶的平均回收率范围在 95.6%~120.0%,RSD 在 1.9%~17.5%。加标回收率和精密度结果见表 1。根据加标回收试验结果得出,

表1 不同茶叶准确度及精密度结果( $n=5, \%$ )

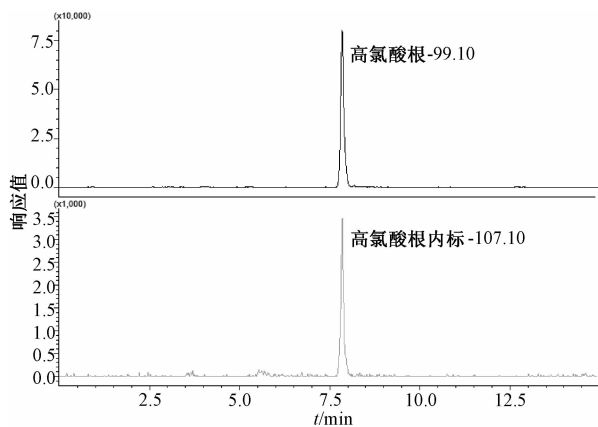
Table 1 Recovery and precision of the kinds of tea

加标水平 (mg/kg)	绿茶		红茶		普洱茶		茉莉花茶		苦丁茶		铁观音	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
0.05	115.0	17.5	102.6	7.58	104.0	2.6	96.1	12.0	100.0	15.2	103.8	8.6
0.1	120.0	2.1	96.2	4.2	100.0	5.6	95.6	4.6	115.0	6.1	109.0	3.3
0.5	109.0	3.3	108.5	2.4	103.0	2.7	99.0	3.9	102.0	4.4	103.0	1.9

当取样量为 1.0 g,定容体积为 50 ml 时,以三倍信噪比计算出本方法茶叶中高氯酸盐的检出限为 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 2.6 样品测定

应用本方法对 26 份茶叶样品进行测定,绿茶、苦丁茶、乌龙茶和铁观音各 1 份样品中高氯酸盐含量  $>0.75 \text{ mg}/\text{kg}$ ,高氯酸盐含量最高达 1.8  $\text{mg}/\text{kg}$ (见图 3),应引起有关部门的重视。

图3 绿茶样品(1.8  $\text{mg}/\text{kg}$ )中高氯酸盐总离子流图Figure 3 Total ion chromatograms of perchlorate of tea sample(1.8  $\text{mg}/\text{kg}$ )

## 3 小结

本方法选用 Synergi<sup>TM</sup> MAX-RP 为分析柱,流动相体系为 0.1% 甲酸-甲醇溶液,采用 UPLC-MS/MS 进行分析,同位素内标法定量,适用于茶叶中高氯酸盐的测定。

## 参考文献

- [1] European Commission. Statement as regards the presence of perchlorate in food endorsed by the Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed [EB/OL]. (2015-07-23) [2015-04-19]. [http://www.globalgap.org/uk\\_en/media-events/news/articles/Statement-as-regards-the-presence-of-perchlorate-in-food-endorsed-by-the-Standing-Committee-on-Plants-Animals-Food-and-Feed-on-10-March-2015/](http://www.globalgap.org/uk_en/media-events/news/articles/Statement-as-regards-the-presence-of-perchlorate-in-food-endorsed-by-the-Standing-Committee-on-Plants-Animals-Food-and-Feed-on-10-March-2015/).
- [2] 张卫. 关于茶叶中的新型污染物高氯酸盐[J]. 中国食品, 2016(6):130-131.
- [3] ZHU B H, ZHONG Z X, YAO J. Ion chromatographic determination of trace iodate, chlorite, chlorate, bromide, bromate and nitrite in drinking water using suppressed conductivity detection and visible detection[J]. J Chromatogr A, 2006, 1118(1):106-110.
- [4] 彭银仙, 夏远, 陈传祥, 等. 环境中高氯酸盐的分析方法研究[J]. 江苏科技大学学报(自然科学版), 2009, 23(6): 548-552.
- [5] CAI Y Q, SHI Y L, ZHANG P, et al. Perchlorate related environmental problems [J]. Prog Chem, 2006, 18(11): 1554-1564.
- [6] Aribih E, Le-Blanc Y J C, Antonsen S, et al. Analysis of perchlorate in foods and beverages by ion chromatography coupled with tandem mass spectrometry (IC-ESI-MS/MS) [J]. Anal Chim Acta, 2006, 567(1):39-47.
- [7] Dyke J V, Kirk A B, Mart I K, et al. Sample processing method for the determination of perchlorate in milk [J]. Anal Chim Acta, 2006, 567(1):73-78.
- [8] Kirk A B, Martinelango P K, Tian K, et al. Perchlorate and iodide in dairy and breast milk[J]. Environ Sci Technol, 2005, 39(7): 2011-2017.
- [9] Tian K, Canas J E, Dasgupta P K, et al. Preconcentration/preelution ion chromatography for the determination of perchlorate in complex samples[J]. Talanta, 2005, 65(3):750-755.
- [10] 张萍, 史亚利, 蔡亚岐, 等. 离子色谱-质谱联用技术测定污泥样品中的痕量高氯酸盐[J]. 分析化学研究简报, 2007, 35(1):131-134.
- [11] FDA. Rapid determination of perchlorate anion in foods by ion chromatography-tandem mass spectrometry. Revision 2 [EB/OL]. (2005-04-12) [2016-04-19]. <http://www.fda.gov/Food/Foodbor-nellnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm077793.htm>.
- [12] Liy T, George E J. Analysis of perchlorate in water by reversed-phase LC/ESI-MS/MS using an internal standard technique[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(14):4453-4458.
- [13] Aleksey N, Pisarenkoa B, Benjamin D, et al. Rapid analysis of perchlorate, chlorate and bromate ions in concentrated sodium hypochlorite solutions[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 659(1/2):216-223.
- [14] 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.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 4089—2015 进出口食品中高氯酸盐的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2015.