

LC-MS/MS 法测定婴幼儿配方奶粉中 氯酸盐和高氯酸盐



杭州谱育科技发展有限公司

浙江省杭州市临安区青山湖街道

科技大道 2466-1 号

网址: www.puyukeji.cn

LC-MS/MS 法测定婴幼儿配方羊奶粉中 氯酸盐和高氯酸盐

1 前言

高氯酸盐常用作化肥原料，大气中也能够产生高氯酸根，它是一种持久性污染物，毒理学研究表明，高氯酸盐会减少人体的甲状腺吸收碘，进而影响正常的新陈代谢，危害人体健康。氯酸盐是二氧化氯消毒产生的副产物，也可以由自然界中含氯化合物分解产生。氯酸盐具有强氧化性，会影响人体的血液系统，可引起贫血症，也可以导致神经和呼吸中毒，降低精子活力和数量。氯酸盐和高氯酸盐可以通过食物链富集在食品中，从而对人体产生危害。2015年欧洲食品安全局（EFSA）规定氯酸盐和高氯酸盐的每日允许摄入量（tolerable daily intake, TDI）分别为 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg BW}/\text{day}$ 。2017年 EFSA 评估了高氯酸盐在欧洲人群中膳食暴露，发现欧洲各年龄层人群的高氯酸盐暴露均超过每日耐受摄入量。

在食品生产、包装过程中，为抑制微生物的生长繁殖，需要频繁对食品的原料、生产设备进行清洗消毒，氯酸盐和高氯酸盐可能作为中间生产的污染物残留在婴幼儿配方奶粉中，引发食品安全隐患。婴幼儿体内的高氯酸盐过量会出现智商偏低、学习障碍、发育迟缓、多动症、注意力分散甚至等症。国家目前还没有制定相关限量标准，因此，对于婴幼儿奶粉中氯酸盐、高氯酸盐残留量进行监控具有重要意义。目前有关氯酸盐、高氯酸盐的检测方法主要有离子色谱法、离子色谱-串联质谱法和高效液相色谱-串联质谱法。超高效液相色谱-串联质谱法因其灵敏度高、选择性好，在复杂基质样品测定上具有较大分析优势。

本文使用杭州谱育科技发展有限公司生产的超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪建立了婴幼儿羊奶粉中氯酸盐、高氯酸盐的检测方法。高氯酸盐在 $1-100 \text{ ng}/\text{mL}$ ，氯酸盐在 $2-200 \text{ ng}/\text{mL}$ 范围内线性良好，相关系数 r 大于 0.998；分别对高氯酸盐浓度为 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ 、氯酸盐浓度为 $20 \text{ ng}/\text{mL}$ 和高氯酸盐浓度为 $50 \text{ ng}/\text{mL}$ 、氯酸盐浓度为 $100 \text{ ng}/\text{mL}$ 的混合标准工作溶液平行测定 6 次，氯酸盐和高氯酸盐保留时间的相对标准偏差和相对峰面积的相对标准偏差 RSD 分别在 0.21-0.55%之间和 1.61-4.87%之间，表明仪器精密度良好。高氯酸盐和氯酸盐的检出限分别为 $0.05 \text{ ng}/\text{mL}$ 和 $0.09 \text{ ng}/\text{mL}$ ，仪器灵敏度良好。对样品进行加标回收率实验，高氯酸盐回收率为 116.7%，氯酸盐回收率为 109.6%。使用高灵敏、高抗污染能力的 EXPEC 5210

系统，可以对婴幼儿奶粉中氯酸盐和高氯酸盐残留量进行灵敏、准确的定量检测。

2.实验部分

2.1 标准品、试剂和设备：

仪器：ULC 510 超高效液相色谱仪（具体配有二元超高压输液泵、超高压自动进样器、柱温箱）、EXPEC 5210 三重四极杆串联质谱仪。

标准品：氯酸盐（1000mg/L 溶于水）、高氯酸盐（1000mg/L 溶于水），购自安谱，冷藏保存。乙腈为色谱级，甲酸铵为质谱级。HLB 固相萃取柱，200mg/6mL，购自安谱。



图 1 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪

2.2 液相和质谱条件

表 1 测试条件

LC 条件	流动相	水相 A（20mM 甲酸铵）和有机相 B（乙腈），梯度洗脱
	流速	0.5mL/min
	色谱柱	Waters Torus DEA 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m)
	柱温	40 °C
	进样量	2uL
	运行时间	9min

	梯度方法	Time (min)	A (%)	B (%)
		0	10	90
		1	10	90
		4	70	30
		5	70	30
		5.5	10	90
		9	10	90
MS 条件	毛细管高压	4.0 kV		
	离子源类型	ESI-		
	雾化气流量	1.4 L/min		
	去溶剂气流量	6.0 L/min		
	反吹气流量	0.8 L/min		
	去溶剂气温度	425°C		
	碰撞气流量	0.6 mL/min (6.03e-3Torr)		

监测模式为多反应监测(MRM)，各化合物监测离子对、碰撞电压(CE)等参数见下表。

The screenshot shows a software interface for MRM method configuration. At the top, the method name is '高氯酸盐MRM-1'. Below it, there are controls for '开碰撞气' (checked), 'MCA模式', '智能MRM', and buttons for '添加片段', '插入片段', and '删除片段'. A table below lists method segments with columns for '方法片段值', '开始时间(min)', '结束时间(min)', '离子化模式', and '扫描模式'. The first segment is selected, showing a start time of 0 and end time of 9, with ESI- ionization and MRM scanning mode. To the right, a table lists target compounds with columns for '化合物名称', '母离子质量', '子离子质量', '驻留时间(s)', '锥孔电压', '碰撞能量', and '分辨率'. The table contains six rows of data for various chlorate and perchlorate species.

化合物名称	母离子质量	子离子质量	驻留时间(s)	锥孔电压	碰撞能量	分辨率
1 高氯酸盐-内标	107	89	0.08	50	24	Unit-Unit
2 氯酸盐-内标	89	71	0.08	50	18	Unit-Unit
3 高氯酸盐	99	83	0.08	50	24	Unit-Unit
4 高氯酸盐	101	85	0.08	50	24	Unit-Unit
5 氯酸盐	83	67	0.08	50	18	Unit-Unit
6 氯酸盐	85	69	0.08	50	18	Unit-Unit

图 2 目标化合物多反应离子监测条件

2.3 样品前处理及溶液的配制

样品前处理方法：

准确称取 2 g (精确至 0.001g) 试样置于 50 mL 具塞离心管中，加入 75 μ L 混合同位素内标使用液 (2.2.2)，准确加入 5.0 mL 的 0.1%甲酸水溶液，涡旋混匀 10 s，水浴超声提取 20 min，再准确加入 10.0 mL 乙腈，混匀，水浴超声提取 10 min，10000 r/min 常温离心 10 min，取上清液待净化。移取约 3.0 mL 上述上清液，过 HLB 固相萃取柱及 0.22 μ m 滤膜，收集约 1

mL 初始滤液，供液相色谱串联质谱仪测定。

溶液的配制：

(1) 甲酸铵溶液 (20mmol/L)：称取 0.63g 甲酸铵，用超纯水溶解并稀释至 500mL，混匀，过 0.22 μm 滤膜。

(2) 甲酸铵乙腈溶液：取 100 mL 的 20mM 甲酸铵水溶液，加入 200 mL 乙腈，混匀。

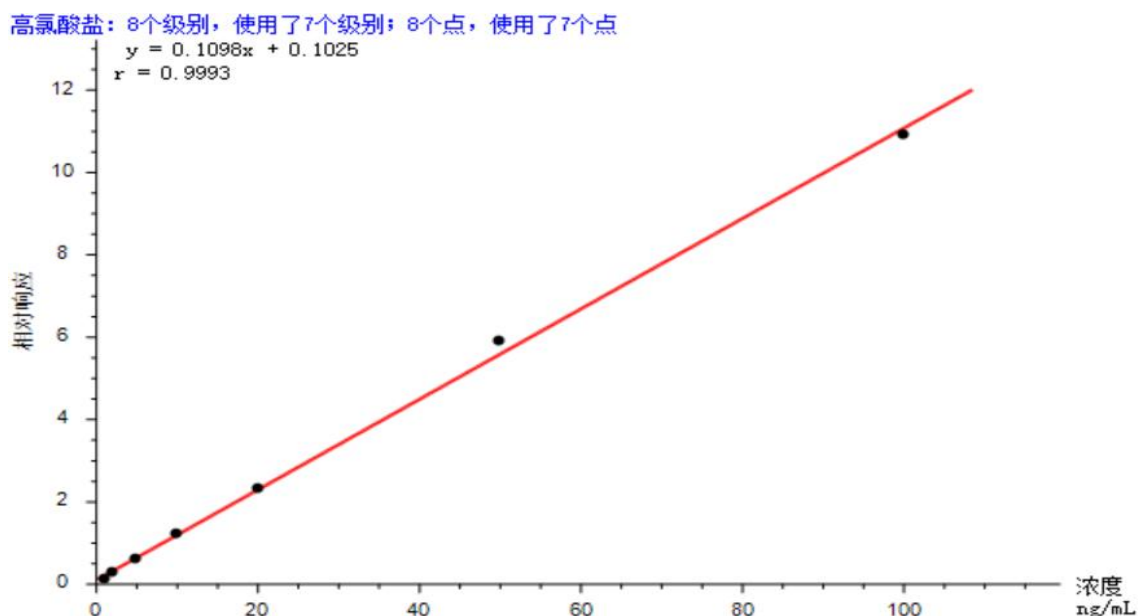
(3) 标准曲线的配制：

分别准确移取适量标准混合溶液，然后向其中加入适量内标混合溶液，用甲酸铵乙腈 (2.3) 溶液稀释配制标准曲线，此标准系列中高氯酸盐浓度依次为：0.00 ng/mL、1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL，氯酸盐浓度依次为：0.00 ng/mL、2.00 ng/mL、4.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、40.0 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL，标准系列中同位素内标 $\text{Cl}^{18}\text{O}_4^-$ 和 $\text{Cl}^{18}\text{O}_3^-$ 浓度分别为 5.0 ng/mL 和 10.0 ng/mL，临用前现配现用。

3. 结果与讨论

3.1 线性和检出限

将系列标准溶液依次进样分析，以各目标物的定量离子相对色谱峰面积为纵坐标，目标物标准溶液的质量浓度(X)为横坐标，采用该方法拟合后的标准曲线如图 2 所示。标准曲线最低点高氯酸盐、氯酸盐定量离子色谱图如图 3。将曲线最低点进样分析，按照 $S/N=10$ 和 $S/N=3$ 计算定量限和检出限，结果如表 3 所示。



氯酸盐: 8个级别, 使用了7个级别; 8个点, 使用了7个点

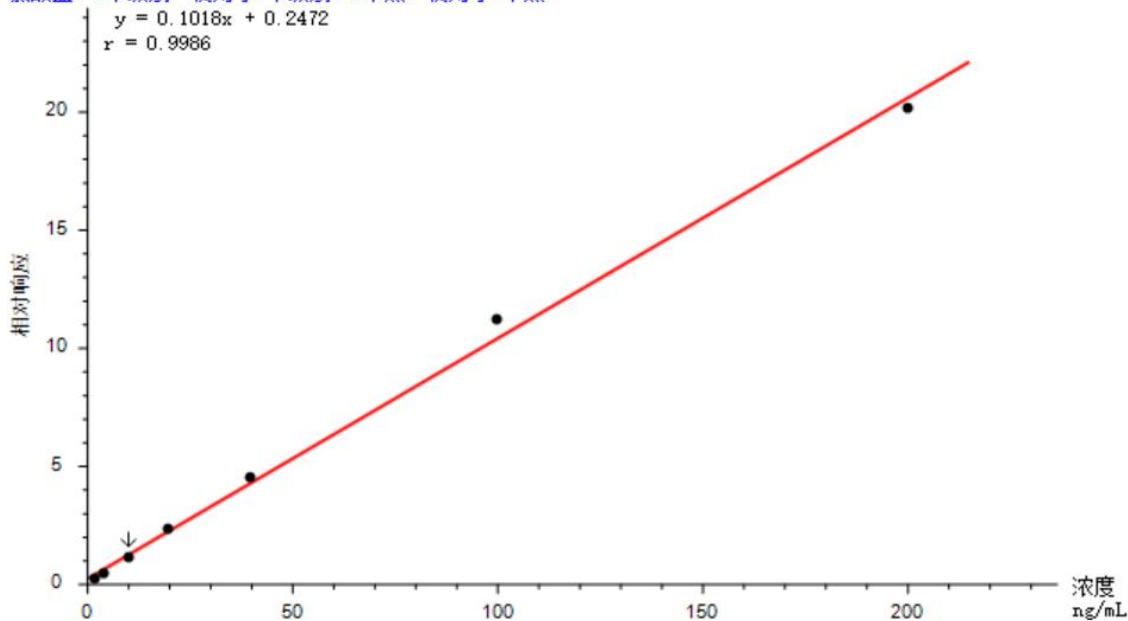


图2 氯酸盐和高氯酸盐的标准曲线

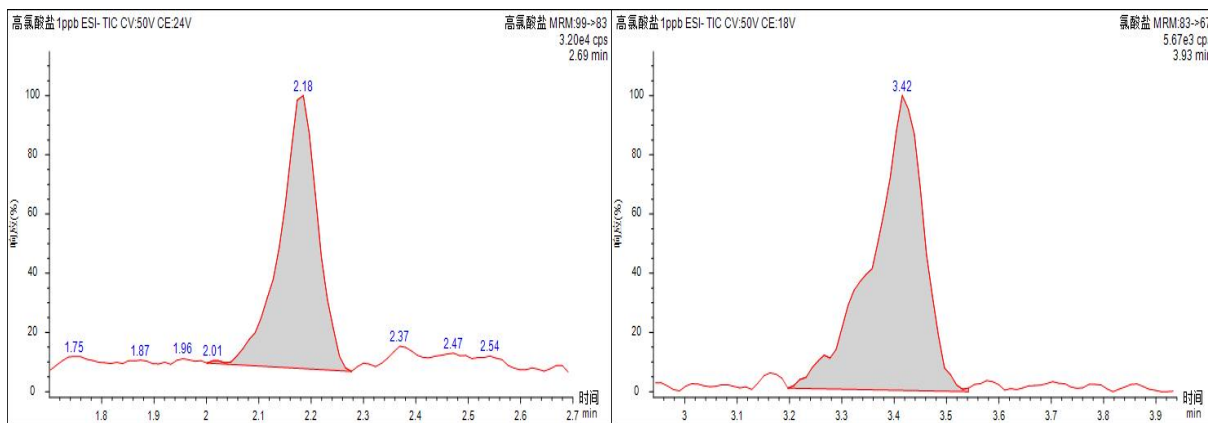


图3 标准曲线最低点定量离子色谱图

表3 氯酸盐、高氯酸盐检出限和定量限

序号	化合物名称	S/N	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	氯酸盐	34	0.09	0.29
2	高氯酸盐	65	0.05	0.15

由上可知, 高氯酸盐在 1-100 ng/mL, 氯酸盐在 2-200 ng/mL 范围内线性良好, 线性相关系数均 r 大于 0.998。高氯酸盐和氯酸盐的检出限分别为 0.05 ng/mL 和 0.09 ng/mL, 仪器灵敏度良好。

3.2 重复性

对高氯酸盐浓度为 10 ng/mL、氯酸盐浓度为 20 ng/mL, 高氯酸盐浓度为 50 ng/mL、氯酸

盐浓度为 100 ng/mL 的标准溶液分别连续进样 6 次，考察保留时间和相对峰面积的重复性，结果如图 4 所示。

高氯酸盐浓度为 10ng/mL、氯酸盐浓度为 20ng/mL 的精密度

	样品信息			高氯酸盐-内标			高氯酸盐				氯酸盐-内标			氯酸盐			
	数据文件	定量方法		保留时间	峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度
1	高氯酸盐10ppb-cfx-1	曲线2		2.19	775222.40	5.00	2.19	978775.60	1.26	10.57	3.42	129519.58	10.00	3.42	313068.60	2.42	21.32
2	高氯酸盐10ppb-cfx-2	曲线2		2.19	813402.88	5.00	2.17	992039.44	1.22	10.18	3.43	138998.86	10.00	3.40	312678.88	2.25	19.67
3	高氯酸盐10ppb-cfx-3	曲线2		2.21	747029.81	5.00	2.20	934085.31	1.25	10.46	3.44	130400.98	10.00	3.43	314980.09	2.42	21.30
4	高氯酸盐10ppb-cfx-4	曲线2		2.20	821937.63	5.00	2.19	1009968.88	1.23	10.26	3.42	124654.67	10.00	3.43	297052.59	2.38	20.98
5	高氯酸盐10ppb-cfx-5	曲线2		2.21	721805.56	5.00	2.21	910947.13	1.26	10.56	3.44	136325.11	10.00	3.44	298699.41	2.19	19.09
6	高氯酸盐10ppb-cfx-6	曲线2		2.20	780405.69	5.00	2.20	982087.81	1.26	10.53	3.45	127706.28	10.00	3.44	302231.09	2.37	20.82
Min				2.19	721805.56	5.00	2.17	910947.13	1.22	10.18	3.42	124654.67	10.00	3.40	297052.59	2.19	19.09
Max				2.21	821937.63	5.00	2.21	1009968.88	1.26	10.57	3.45	138998.86	10.00	3.44	314980.09	2.42	21.32
AVG				2.20	776633.99	5.00	2.19	967984.03	1.25	10.42	3.43	131267.58	10.00	3.43	306451.78	2.34	20.53
SD				0.01	38218.20	0.00	0.01	37574.18	0.02	0.17	0.01	5395.76	0.00	0.01	8019.34	0.09	0.93
RSD				0.47	4.92	0.00	0.55	3.88	1.48	1.61	0.41	4.11	0.00	0.39	2.62	4.04	4.52
IDL				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

高氯酸盐浓度为 50ng/mL、氯酸盐浓度为 100ng/mL 的精密度

	样品信息			高氯酸盐-内标			高氯酸盐				氯酸盐-内标			氯酸盐			
	数据文件	定量方法		保留时间	峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度
1	高氯酸盐50ppb-cfx-1	曲线2		2.19	603257.60	5.00	2.17	3536149.00	5.86	52.46	3.42	112501.23	10.00	3.43	1160905.75	10.32	98.93
2	高氯酸盐50ppb-cfx-2	曲线2		2.19	613454.00	5.00	2.19	3616593.75	5.90	52.77	3.43	105556.46	10.00	3.42	1225212.25	11.61	111.59
3	高氯酸盐50ppb-cfx-3	曲线2		2.20	596354.30	5.00	2.20	3599811.00	6.04	54.05	3.44	104079.50	10.00	3.43	1219084.00	11.71	112.63
4	高氯酸盐50ppb-cfx-4	曲线2		2.19	619675.50	5.00	2.17	3713470.50	5.99	53.65	3.43	107329.30	10.00	3.40	1245678.25	11.61	111.58
5	高氯酸盐50ppb-cfx-5	曲线2		2.19	613263.38	5.00	2.17	3529850.75	5.76	51.50	3.40	101643.99	10.00	3.42	1188337.38	11.69	112.41
6	高氯酸盐50ppb-cfx-6	曲线2		2.19	624494.44	5.00	2.17	3669201.00	5.88	52.59	3.40	109323.53	10.00	3.39	1224870.88	11.20	107.63
Min				2.19	596354.30	5.00	2.17	3529850.75	5.76	51.50	3.40	101643.99	10.00	3.39	1160905.75	10.32	98.93
Max				2.20	624494.44	5.00	2.20	3713470.50	6.04	54.05	3.44	112501.23	10.00	3.43	1245678.25	11.71	112.63
AVG				2.19	611749.87	5.00	2.18	3610846.00	5.90	52.84	3.42	106739.00	10.00	3.41	1210681.42	11.36	109.13
SD				0.00	10388.23	0.00	0.01	72431.73	0.10	0.91	0.01	3864.25	0.00	0.01	30609.61	0.54	5.31
RSD				0.21	1.70	0.00	0.44	2.01	1.69	1.72	0.41	3.62	0.00	0.39	2.53	4.76	4.87
IDL				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

图 4 氯酸盐、高氯酸盐精密度

由结果可知，氯酸盐和高氯酸盐的保留时间相对标准偏差 RSD 在 0.21-0.55%之间，相对峰面积的相对标准偏差 RSD 值在 1.61-4.87%之间，该方法精密度良好，满足检测要求。

3.3 加标回收率实验

称取 2g（精确到 0.001g）奶粉，按照 3.2 前处理方式进行处理，同时做样品空白和加标回收率实验，加标含量：高氯酸盐 75ng/g、氯酸盐 150 ng/g，换算为加标浓度：高氯酸盐 10 ng/mL、氯酸盐 20 ng/mL，批处理结果见图 5。

	样品信息			高氯酸盐-内标			高氯酸盐				氯酸盐-内标			氯酸盐					
	数据文件	定量方法		保留时间	峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度	回收率	保留时间	峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度	回收率
1	样品2-2	曲线2		2.17	908454.06	5.00	2.17	1476115.25	1.62	13.87		3.43	47597.68	10.00	3.40	519301.63	10.91	104.74	0.00
2	样品2-加标-2	曲线2		2.19	854627.10	5.00	2.17	2484010.00	2.91	25.54	116.72	3.44	51736.45	10.00	3.43	679863.00	13.14	126.65	109.56

图 5 样品加标回收率结果

由结果可知，高氯酸盐加标回收率为 116.7%，氯酸盐加标回收率为 109.6%。

3.4 实际样品测试

分别称取 2g（精确到 0.001g）奶粉，按照 3.2 前处理方式进行处理，每个样品平行处理两份，同时做样品空白，测样结果如表 5 所示，样品测试谱图见图 6。

	样品信息		高氯酸盐-内标			高氯酸盐				氯酸盐-内标			氯酸盐			
	数据文件	定量方法	保留时间	峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度
1	☑ 样品空白	曲线2	2.21	345363.50	5.00	2.20	75287.02	0.22	1.05	3.43	100831.80	10.00	3.43	39002.25	0.39	1.37
2	☑ 样品1-1	曲线2	2.16	777400.88	5.00	2.16	2175798.00	2.80	24.56	3.43	45567.93	10.00	3.40	496648.06	10.90	104.63
3	☑ 样品1-2	曲线2	2.19	683307.06	5.00	2.17	2270586.75	3.32	29.33	3.43	42954.55	10.00	3.42	448299.19	10.44	100.09
4	☑ 样品2-1	曲线2	2.16	891386.25	5.00	2.16	1538585.13	1.73	14.79	3.42	49542.75	10.00	3.42	577647.56	11.66	112.10
5	☑ 样品2-2	曲线2	2.17	908454.06	5.00	2.17	1476115.25	1.62	13.87	3.43	47597.68	10.00	3.40	519301.63	10.91	104.74
6	☑ 样品3-1	曲线2	2.17	852196.88	5.00	2.17	2316457.50	2.72	23.83	3.43	52366.49	10.00	3.40	96624.23	1.85	15.70
7	☑ 样品3-2	曲线2	2.19	830846.31	5.00	2.17	2379272.75	2.86	25.15	3.42	49707.11	10.00	3.42	100077.12	2.01	17.35
8	☑ 样品4-1	曲线2	2.17	852092.56	5.00	2.17	2714387.00	3.19	28.08	3.42	52154.15	10.00	3.40	221519.19	4.25	39.29
9	☑ 样品4-2	曲线2	2.16	730430.38	5.00	2.16	2530736.25	3.46	30.63	3.42	40056.14	10.00	3.42	201054.94	5.02	46.88

表 5 实际样品测试结果

名称	高氯酸盐		氯酸盐	
	计算浓度 (ng/mL)	含量 (μg/kg)	计算浓度 (ng/mL)	含量 (μg/kg)
样品 1	25.90	194.23	100.99	757.42
样品 2	13.28	99.58	103.37	802.88
样品 3	23.44	175.79	15.15	113.64
样品 4	28.30	212.28	41.71	312.86

4 结论

本文使用杭州谱育科技发展有限公司生产的超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪建立了婴幼儿奶粉中氯酸盐、高氯酸盐残留量的检测方法。考察了方法的线性、精密度、灵敏度及加标回收率，并对 4 份样品中氯酸盐及高氯酸盐的含量进行分析。结果表明：高氯酸盐在 1-100 ng/mL，氯酸盐在 2-200 ng/mL 范围内线性良好，相关系数 r 大于 0.998；分别对高氯酸盐浓度为 10 ng/mL、氯酸盐浓度为 20 ng/mL 和高氯酸盐浓度为 50 ng/mL、氯酸盐浓度为 100 ng/mL 的混合标准工作溶液平行测定 6 次，氯酸盐和高氯酸盐保留时间的相对标准偏差 RSD 在 0.21-0.55% 之间，相对峰面积的相对标准偏差 RSD 在 1.61-4.87% 之间，表明仪器精密度良好。高氯酸盐和氯酸盐的检出限分别为 0.05 ng/mL 和 0.09 ng/mL，仪器灵敏度良好。对样品进行加标回收率实验，高氯酸盐回收率为 116.7%，氯酸盐回收率为 109.6%。对 4 份婴幼儿奶粉进行处理，上机检测，具体结果见表 5。使用高灵敏、高抗污染能力的 EXPEC 5210 系统，可以对婴幼儿羊奶粉中氯酸盐和高氯酸盐残留量进行灵敏、准确的定量检测。