

应用纪要

使用沃特世阴离子型极性农药分析色谱柱和 UPLC-MS/MS测定婴儿奶粉中的氯酸盐和 高氯酸盐

Janitha De-Alwis, Euan Ross, Stuart Adams

Waters Corporation



摘要

氯酸盐和高氯酸盐的传统分析方法为离子色谱法，需要使用专用设备。本应用纪要评估了ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-XS质谱仪联用测定乳制品中氯酸盐和高氯酸盐的性能。

优势

一种用于测定婴儿奶粉及其他乳制品中氯酸盐和高氯酸盐的替代分析方法。该方法对于官方控制和食品经营者的尽职调查检测均适用。其具有以下优点：

- 在5 min运行时间内即可获得优异的色谱保留性能、峰形和分离效果。
- 灵敏度优异，能够测定以QuPPE-AO方法提取的样品中含量低至mg/kg级别甚至更低的残留物。

简介

欧洲食品安全局(EFSA)近期发布的报告强调，欧盟(EU)境内的大多数食品基本上不含农药¹。但是，最新的监测数字显示，与往年相比，食品超标数量有所增加。这些差异可归因于氯酸盐残留，该化合物在2016年控制计划中首次被纳入控制范围，以支持正在进行的确定农药最大残留量(MRL)的工作。该报告还指出，有很大一部分婴儿食品的氯酸盐残留超出MRL。EFSA目前正在审查食品中氯酸盐和高氯酸盐的MRL²。

食品可能在生产的不同阶段被氯酸盐和高氯酸盐污染。使用肥料可能导致食品中残留高氯酸盐，而食品生产过程中所用的氯化消毒剂则可能导致氯酸盐残留。乳制品行业经常使用次氯酸盐和二氧化氯作为消毒剂。研究证实，使用此类消毒剂可能导致最终产品中的氯酸盐含量升高³。

由于氯酸盐在食物链及更宽泛的环境中对公共安全所构成的健康风险不断上升，欧盟不再批准使用氯酸盐作为农药，因此规定默认MRL为0.01 mg/kg²。但在食品中检出的含量通常高于该MRL²。

氯酸盐和高氯酸盐的传统分析方法为离子色谱法，需要使用专用设备。新方法采用LC-MS/MS技术，利用极性农药快速提取方法(QuPPE)中强调的分析柱⁴。

沃特世公司早前发表的一份应用纪要（部件号：[720006421EN](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135006256&locale=en_US) <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135006256&locale=en_US>）中率先概述了一种用于氯酸盐和高氯酸盐分析的替代UPLC-MS/MS方法，该方法使用新型亲水相互作用液相色谱(HILIC)分析柱，能够实现优异的色谱保留性能和分离效果。该色谱柱现已提供针对特定应用的规格，称为沃特

世阴离子型极性农药(APP)分析色谱柱。该方法能够以快速、经济有效的方式定量分析婴儿奶粉产品中的氯酸盐和高氯酸盐，提取和净化按照针对动物源产品的极性农药快速提取方法(QuPPE-AO)进行⁴。

实验

按照改良版QuPPE-AO提取程序对样品进行提取和净化。按照标签说明，使用LC-MS级水冲兑婴儿配方奶粉，并用1%甲酸的甲醇溶液提取10 mL样品。进行提取之前，将同位素标记的内标加入所有样品中，以校正任何提取和进样差异性。将样品离心处理，将所得上清液的等分试样与乙腈和C₁₈吸附剂混合。将样品涡旋混合并离心，然后进行LC-MS/MS分析。图1概述了分析所用的样品前处理方法。

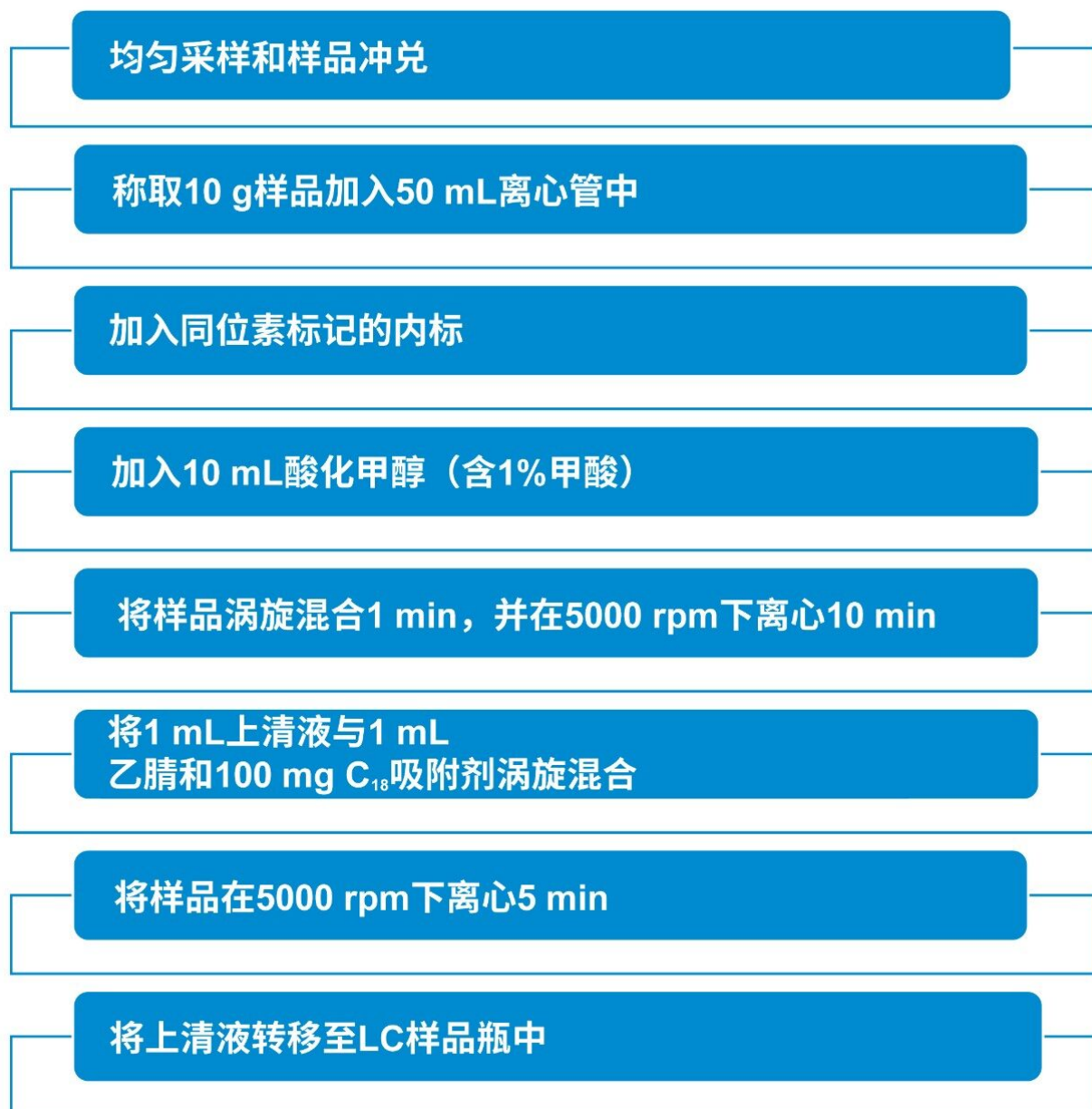


图1.分析所用的样品前处理工作流程

使用SANTE指南11813/2017评估方法性能⁵。为评估方法的正确度和精密度，在婴儿奶粉样品中分别加入0.010 mg/kg、0.020 mg/kg和0.050 mg/kg的标准品。在稀释的QuPPE溶剂中制备溶剂校准标样，浓度范围为0.004–0.800 mg/kg（以样品瓶浓度计为1.0–200 ng/mL）。还添加带有标记的氯酸盐和高氯酸盐作为内标。利用分段校准曲线确定氯酸盐和高氯酸盐加标样品的浓度。

方法条件

LC条件

系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
色谱柱:	沃特世阴离子型极性农药(APP)色谱柱, 2.1 × 50 mm, 5 μm (部件号: 186009286)
柱温:	50 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	2 μL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	含0.9%甲酸和50 mM甲酸铵的水溶液 (LC-MS级)
流动相B:	0.9%甲酸的乙腈溶液 (LC-MS级)

梯度

时间 (min)	%B	曲线
初始	90	初始
2.00	40	5
3.00	40	6
5.00	90	1

表1.分析所用的梯度

(注: 梯度在350 μL进样延迟后开始)

MS条件

系统:	Xevo TQ-XS三重四极杆质谱
-----	-------------------

仪

软件： MassLynx 4.2版

电离模式： ESI-

采集模式： MRM

毛细管电压： 0.50 kV

锥孔电压： 15 V

锥孔气流速： 150 L/h

脱溶剂气温度： 600 °C

脱溶剂气流速： 800 L/h

离子源温度： 150 °C

化合物	MRM通道	碰撞能量 (eV)	保留时间 (min)
氯酸盐	83 > 51	15	1.24
氯酸盐	83 > 67	14	
氯酸盐	83 > 69	14	
氯酸盐内标	89 > 71	14	1.24
高氯酸盐	99 > 67	45	2.05
高氯酸盐	99 > 83	18	
高氯酸盐	101 > 85	15	
高氯酸盐内标	107 > 89	18	

表2.MRM通道以及使用自动驻留功能自动设定的最佳驻留时间

结果与讨论

通过评估流动相组成、缓冲液浓度、梯度斜率和MS通道进行方法优化。实验部分详细列出的条件表现出出色的总体性能。

乳制品样品包含可能在各个阶段干扰分析的基质组分，例如蛋白质、脂肪和糖。为尽量降低这些基质组分的影响，分析方法通常包括蛋白沉淀和脱脂步骤。QuPPE-AO提取和净化程序能够充分去除婴儿奶粉样品中的蛋白质和脂肪，提高方法的耐用性。同位素标记的氯酸盐和高氯酸盐内标能够校正任何提取和进样差异性。

已使用SANTE指南11813/2017中概述的标准评估了方法性能，包括重现性(RSD_r)和正确度。该方法的内部验证表明，其在氯酸盐和高氯酸盐的鉴定和定量方面具有优异的性能。图2展示了0.004 mg/kg溶剂标准品的示例色谱图，其中显示了峰间信噪比。

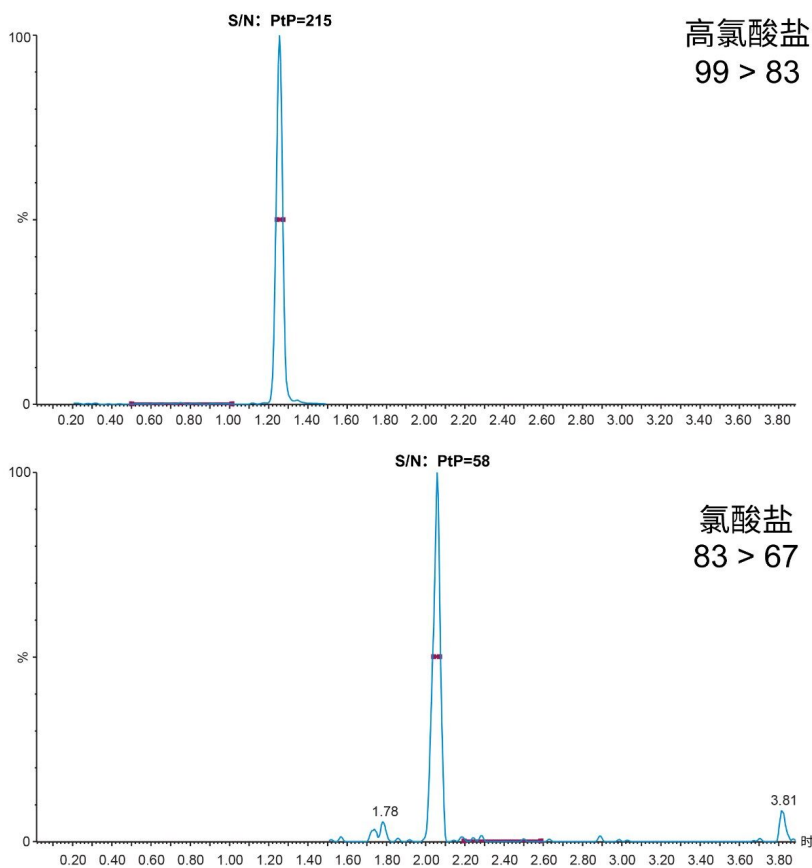


图2.0.004 mg/kg溶剂标准品的色谱图，证明该方法具有优异的灵敏度。

图3所示的示例色谱图显示了两种目标化合物的保留性能和分离效果。以0.24 min处计算该APP色谱柱的死体积积(t_0)，所有化合物的保留时间均大于SANTE指南中所述色谱柱死体积标准的两倍。该方法的总运行时间（包括色谱柱重新平衡时间）为5 min。

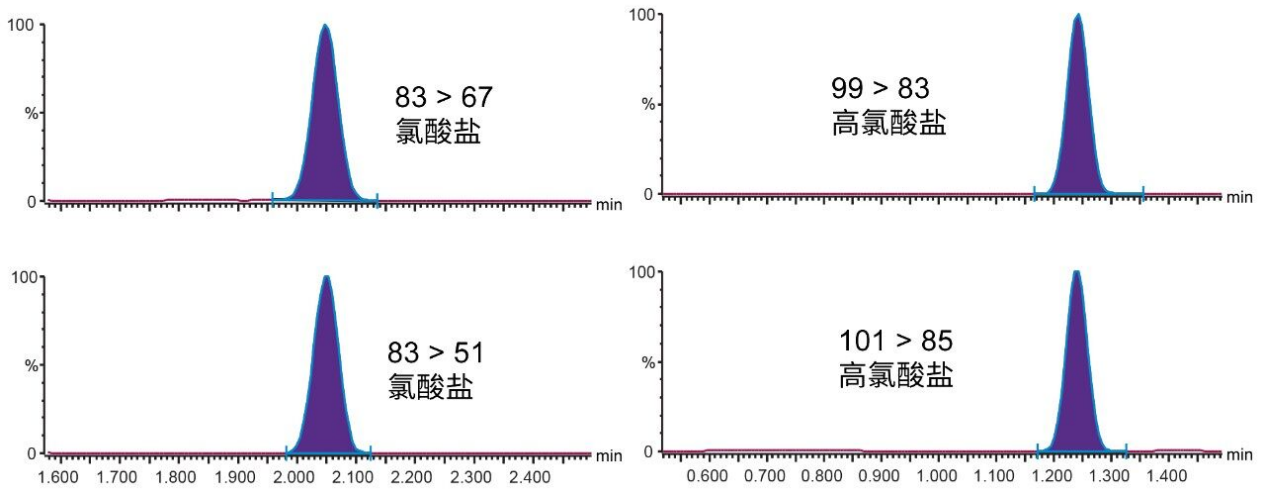


图3.加标婴儿配方奶粉中0.01 mg/kg氯酸盐和高氯酸盐的色谱图

使用分段校准曲线对氯酸盐和高氯酸盐的校准线性进行评估。如图4所示，将校准曲线标准品加入溶剂中，浓度范围为0.004–0.800 mg/kg（以样品瓶浓度计为1.0–200 ng/mL）。相关系数和残差均表现优异（ $r^2 > 0.999$ ，残差 $< 10\%$ ）。

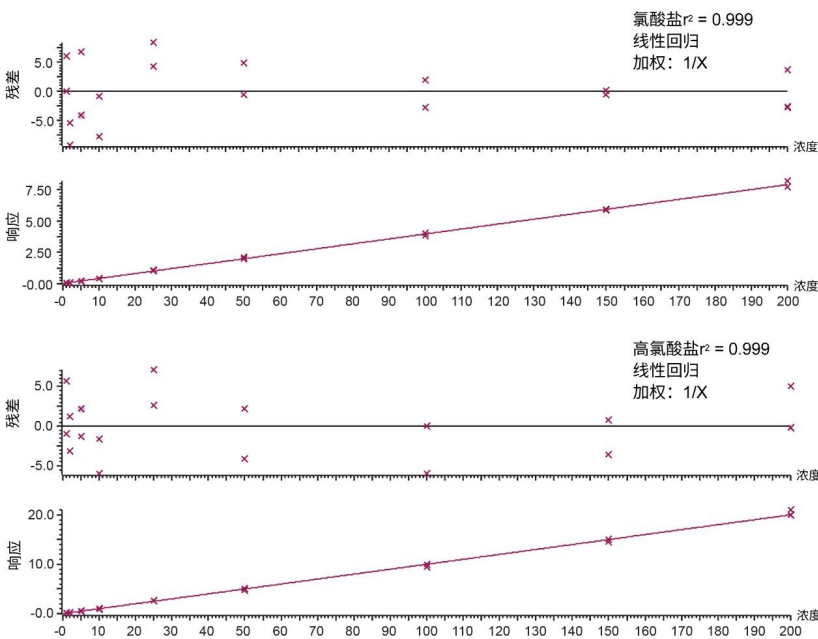


图4.使用分段校准曲线得到的氯酸盐和高氯酸盐的校准线性。校准范围为0.004–0.800 mg/kg（以样品瓶浓度计为1.0–200 ng/mL）。

通过提取并进样分析各种加标浓度的样品（0.010 mg/kg [n=5]、0.020 mg/kg [n=5]和0.050 mg/kg [n=5]）来确定方法的重现性和正确度。表3列出了婴儿配方奶粉分析的重现性(RSD%)和回收率。保留时间和离子丰度比处于SANTE指南中规定的偏差范围内。表4总结了根据SANTE指南中规定的关键标准对婴儿配方食品中氯酸盐和高氯酸盐测定方法的验证结果。

加标浓度	氯酸盐		高氯酸盐	
	正确度(%)	RSD%	正确度(%)	RSD%
0.01 mg/kg	100.5	3.0	95.6	1.0
0.02 mg/kg	98.5	2.1	93.2	1.5
0.05 mg/kg	102.4	3.8	92.9	3.2

表3.加标婴儿配方奶粉中氯酸盐和高氯酸盐的正确度和重现性，已使用带标记的标准品校正，每个加标水平下n=5，取平均值

参数	SANTE 标准	氯酸盐	高氯酸盐	标准评估
保留时间	±0.1 min	2.05 min	1.24 min	✓
离子丰度比	±30%	≤5.0%	≤5.0%	✓
残差	±20%	<8%	<8%	✓
平均正确度 (经标记的标 准品校正)	70-120%	100%	94%	✓
平均重现性 (RSDr)	≤20%	3.0%	1.9%	✓

表4.婴儿配方奶粉中氯酸盐和高氯酸盐测定方法的验证总结

结论

本研究的目的是评估ACQUITY UPLC I-Class系统和沃特世阴离子型极性农药(2.1×50 mm)分析色谱柱与Xevo TQ-XS质谱仪联用测定乳制品中氯酸盐和高氯酸盐的性能。内部验证结果表明,该方法在氯酸盐和高氯酸盐的检测、鉴定和定量分析中均具有出色的灵敏度。该方法可以进行有效的提取和净化步骤,适用于各种乳制品基质。Xevo TQ-XS在线性和校准范围方面的性能堪称典范。在各种QC浓度下对该方法的正确度和精密度进行测定,均得到了优异的偏差和RSD%结果。

参考文献

1. EFSA (2019) *The 2016 European Union Report on Pesticide Residues in Food*.
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2018.5348> <
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2018.5348>> .
2. European Commission.(2015) *Chlorate* https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/chlorate_en <
https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/chlorate_en> .
3. McCarthy, W.; O' Callaghan, T.; Danahar, M.; Gleeson, D.; O' Connor, C.; Fenelon, M.; and Tobin, J. Chlorate and Other Oxychlorine Contaminants Within the Dairy Supply Chain.*Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2018, 17, 1561–75.
4. European Commission (2017) QuPPE Method.https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200 <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200> .
5. European Union (2017), Document No.SANTE 11813/2017.*Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed*.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf <
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf>

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx质谱软件 <<https://www.waters.com/513164>>

720006686ZH, 2020年7月修订

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.