DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260415006
引用格式: 白彤彤, 连莹莹, 韩永红, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定液体奶中的氯酸盐和高氯酸盐[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(14): 176–184.
Bai Tongtong, Lian Yingying, Han Yonghong, et al. Simultaneously determination of chlorate and perchlorate in liquid milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(14): 176–184. (in Chinese with English abstract).

液相色谱-串联质谱法同时测定液体奶中的氯酸盐和高氯酸盐

白彤彤, 连莹莹, 韩永红, 李伟昊*
(邯郸市疾病预防控制中心, 邯郸 056008)

摘 要: 目的 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)同时检测液体奶中氯酸盐和高氯酸盐的方法。**方法** 以液体奶为基质, 采用 LC-MS/MS 测定其中氯酸盐和高氯酸盐的污染水平, 对仪器条件, 试样的样本提取, 样本净化等进行测试优化, 并对优化的方法进行方法学考察。**结果** 优化后的检测方法采用 ACQUITY UPLC®HSS T_3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈和 0.1%甲酸水溶液, 流速为 0.1 mL/min, 进样量为 5 μL。样品中提取液为 2.0 mL 0.1%甲酸水溶液和 8.0 mL 乙腈, 固相萃取柱为 SelectCore HLB-V 高氯酸盐专用柱(150 mg/3 mL), 内标法定量检测液体奶中氯酸盐及高氯酸盐含量。经方法学考察氯酸盐和高氯酸盐在各自线性范围内线性关系良好, 氯酸盐与高氯酸盐溶剂标准曲线决定系数分别为 0.9995、0.9998。氯酸盐检出限为 2.4 μg/kg, 高氯酸盐检出限为 0.8 μg/kg。实际样品检测加标回收率在 81.9%~105.4%, 相对标准偏差小于 10%, 满足定量检测需求。**结论** 该方法具有操作简便, 灵敏度高, 定量准确, 重复性好等特点, 适合基质较复杂的液体奶中氯酸盐和高氯酸盐的同时检测。

关键词: 液体奶; 高氯酸盐; 氯酸盐; 液相色谱-串联质谱法
中图分类号: TS207.3 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)14–0176–09

Simultaneously determination of chlorate and perchlorate in liquid milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

BAI Tong-Tong, LIAN Ying-Ying, HAN Yong-Hong, LI Wei-Hao*
(*Handan Center for Disease Control and Prevention*, *Handan* 056008, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous deterction of chlorate and perchlorate in liquid milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Using liquid milk as the base, the contamination levels of chlorate and perchlorate were determined by LC-MS/MS. The instrument conditions, sample

收稿日期: 2026-04-15
基金项目: 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(25422083162ZC)
第一作者: 白彤彤(1994—), 女, 主管技师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: 1121620297@qq.com
***通信作者:** 李伟昊(1976—), 男, 博士, 主任技师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: hdlwh@alumni.tongji.edu.cn

extraction and sample purification were tested and optimized, and the methodology of the optimized method was investigated. **Results** The optimized detection method employed an ACQUITY UPLC®HSS T_3 chromatographic column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), with the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution, at a flow rate of 0.1 mL/min and an injection volume of 5 μL. The extract from the sample was 2.0 mL of 0.1% formic acid aqueous solution and 8.0 mL of acetonitrile. The solid-phase extraction column was used the SelectCore HLB-V high chlorate-specific column (150 mg/3 mL). The internal standard method was used for quantitative detection of chlorate and perchlorate in liquid milk. The linear relationship of chlorate and perchlorate in their respective linear ranges was good. The determination coefficient of chlorate was 0.9995, and that of perchloric acid salt was 0.9998. The limit of detection chlorate was 2.4 μg/kg and that of perchlorate was 0.8 μg/kg. The recovery rate of actual sample detection with spiked samples was between 81.9% and 105.4%. The relative standard deviation (RSD) was less than to 10%, meeting the requirements for quantitative detection. **Conclusion** This method has the characteristics of simple operation, high sensitivity, accurate quantification and good repeatability. It is suitable for the simultaneous detection of chlorate and perchlorate in complex liquid milk matrices.

KEY WORDS: liquid milk; perchlorate; chlorate; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0　引　言

液体奶富含优质蛋白, 维生素及矿物质等对儿童生长发育, 成年人维持骨密度, 老年人预防骨质疏松和肌肉流失至关重要。另有报道指出乳制品可有效降低高血压风险, 预防代谢综合征、心血管疾病、中风、肥胖等问题[1]。随着国民健康营养意识与消费水平不断提升, 液体奶的消费需求正在快速增长。2020 年我国的牛奶总消费量为 3234 万吨, 是 2000 年的三倍多, 占全球牛奶消费量的 7.7%[2]。《中国居民膳食指南(2022)》推荐儿童, 青少年及成人每天应摄入 300 mL 及以上液体奶或相当量的奶制品[3]。液体奶已逐渐成为日常饮食不可或缺的一部分。

然而奶牛从饲养, 产奶到奶制品被使用的全过程可能会通过水源、饲料、包装材料、消毒剂等污染氯酸盐和高氯酸盐[4−7]。人体摄入过量的氯酸盐会对血液系统红细胞造成损伤, 影响血液携氧能力[8]。高氯酸盐通过干扰碘离子的吸收抑制甲状腺激素的合成, 引起甲状腺疾病[9−10]。氯酸盐和高氯酸盐作为新兴的食品污染物目前受到广泛关注[11−12], 它们在环境中普遍存在且具有化学性质稳定性和生物积累性, 对生态安全和人类健康带来严重威胁[13−14]。我国 GB 5749—2022《生活饮用水卫生标准》规定了水中高氯酸盐的标准限值为 0.07 mg/L, 欧盟委员会发布的法规 2023/915 条例规定了婴儿及幼儿配方食品中高氯酸盐的最大残留量为 0.01 mg/kg。美国国家科学院及美国环境保护署推荐食品中高氯酸盐的参考剂量为 0.7 μg/kg • bw, 欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)设定食品中氯酸盐的每日参考计量为 3 μg/kg • bw[15]。

液体乳作为居民膳食宝塔中重要的组成部分, 精准检测其中的氯酸盐和高氯酸盐的含量并长期监测对食品安全有重要意义。氯酸盐和高氯酸盐在环境及食品中的低浓度存在(μg/kg; μg/L)[16−20], 使得直接检测具有一定的挑战性。目前氯酸盐及高氯酸盐的检测方法主要包括离子色谱法(ion chromatography, IC)、离子色谱-质谱法(ion chromatography-mass spectrometry, IC-MS)、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 3 种[21−23]。离子色谱法作为传统检测技术, 具有特异性强, 操作简单, 重复性好等优势, 常应用于水中高氯酸盐及氯酸盐的检测, 但液体奶中基质干扰明显, 难以满足样品检测需求。IC-MS 抗基质干扰能力显著提升, 减少固相萃取步骤, 但设备成本较高, 能检项目较少, 限制了方法的推广使用。LC-MS/MS 凭借高灵敏度、高选择性及多组分同时检测能力, 已成为食品中微量污染物检测的重要技术。现行有效的 GB 5009.291—2023《食品安全国家标准 食品中氯酸盐和高氯酸盐的测定》同样采用液相色谱质谱仪检测。GB 5009.291—2023 推荐的色谱柱为“五氟苯基柱”, 本研究主动探索复杂基质中无机阴离子检测的新型色谱柱(Waters UPLC BEH C_{18} 和 ACQUITY UPLC®HSS T_3), 通过优化流速、进样量、固相萃取柱等建立一套 LC-MS/MS 同时检测液体奶中氯酸盐和高氯酸盐的方法。

本研究结合日常生活中液体牛奶消费习惯选取市场上常见的液体奶包括鲜牛乳、巴氏消毒奶、灭菌乳对其中氯酸盐和高氯酸盐进行检测, 优化 LC-MS/MS 检测条件和前处理方式, 为提高液体奶中氯酸盐和高氯酸盐的检测质量提供更可靠的技术支持。

1　材料与方法

1.1　液体奶样品来源

依据《国家食品污染物和有害因素监测工作手册》要

求采集 2026 年邯郸地区各个县区生产市售的鲜牛乳 9 份, 巴氏杀菌乳 9 份, 灭菌乳 8 份。鲜牛乳采自路边摊位或养殖基地, 巴氏杀菌乳及灭菌乳采自农贸市场和超市。

1.2 仪器与试剂

岛津 LC-30AD 液相色谱仪、LC-MS 8050 三重四极杆串联质谱仪(日本 Shimadzu 公司); Mettler AE240 电子天平(精度 0.1 mg, 瑞士梅特勒托利多公司); H2500R 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 5510 超声振荡仪(美国 Branson 公司); HP-M20 涡旋振荡器[华派科仪(青岛)仪器有限公司]; Waters UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC®HSS T_3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、PRiME HLB 固相萃取柱(200 mg/6 cc)(美国 Waters 公司); 石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)固相萃取柱(500 mg/6 mL, 苏州纳谱分析技术有限公司); SelectCore HLB-V 高氯酸盐专用柱(150 mg/3 mL, 苏州纳谱分析技术有限公司); 安捷伦再生纤维素滤膜(13 mm, 0.2 μm)。

甲酸、乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 高氯酸盐标准溶液、氯酸盐标准溶液(质量浓度 1000 μg/mL)、高氯酸盐-$^{18}O_4$ 标准物质(质量浓度 100 μg/mL)、氯酸盐-$^{18}O_3$ 标准物质(质量浓度200 μg/mL)(坛墨质检科技股份有限公司); 实验用水为符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》规定的一级水。

1.3 实验方法

1.3.1 仪器条件

(1)色谱条件

色谱柱: Waters UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC®HSS T_3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司); 流动相: 乙腈和 0.1%甲酸水溶液, 甲醇和 0.1%甲酸水溶液; 流速: 0.1 mL/min。进样量: 5.0 μL。流动相梯度洗脱程序见表 1。

(2)质谱条件

离子化模式: 电喷雾电离负离子模式; 扫描方式: 多反应监测扫描; 毛细管电压: 2.0 kV; 离子源温度: 150 ℃; 脱溶剂气温度: 400 ℃。质谱参数见表 2。

1.3.2 混合内标及混合标准溶液的配制

(1)混合内标的配置

配制氯酸盐和高氯酸盐同位素混合内标中间液质量浓度分别为 20 μg/mL 和 1 μg/mL; 氯酸盐和高氯酸盐混合标准品中间液质量浓度分别为 2 μg/mL 和 1 μg/mL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of mobile phase

时间/min	A 相(0.1%甲酸水)/%	B 相(乙腈或甲醇)/%
0	5	95
0.5	5	95
4.0	45	55
5.0	75	25
7.0	75	25
7.5	5	95
10.0	5	95

表 2 氯酸盐、高氯酸盐及其内标化合物的主要质谱参数

Table 2 Main mass spectrometry parameters of chlorate, perchlorate and internal standard compound

化合物	母离子 (*m*/*z*)	子离子 (*m*/*z*)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
氯酸盐	83.0	67.0	25.0	18.0
	85.0	69.0	25.0	17.0
高氯酸盐	99.0	83.0	18.0	18.0
	101.0	85.0	18.0	18.0
氯酸盐内标	89.0	71.0	25.0	18.0
高氯酸盐内标	107.0	89.0	18.0	18.0

(2)标准曲线的配制

选取液体乳目标分析物空白值做空白基质配制混合标准系列工作溶液, 临用现配, 质量浓度梯度如表 3 所示。

1.3.3 不同体积分数提取液提取效果比较

将液体乳全部充分混匀后, 准确称取 2.00 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 离心管中(各 8 份), 加入 20 μL 氯酸盐和高氯酸盐同位素混合内标中间液, 振荡混合后静置 30 min。加入 0.1%甲酸水后具塞涡旋混匀 30 s, 超声提取 15 min, 加入有机试剂(甲醇或乙腈)后具塞涡旋混匀 30 s, 超声提取 30 min, 取上清液待净化。

1.3.4 3 种固相萃取柱净化效果的比较

吸取 2.0 mL 上清液过固相萃取柱(GCB 固相萃取柱, HLB-V 高氯酸盐专用柱, PRiME HLB 固相萃取柱), 弃去流出液, 随后再吸取 2.0 mL 上清液过固相萃取柱, 流出液再过 0.22 μm 再生纤维素滤膜, 收集流出液待上机测定。

表 3 混合标准溶液中各组分的终质量浓度(μg/L)

Table 3 Final mass concentrations of each component in the mixed standard solution (μg/L)

待测组分	系列混合标准溶液							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
高氯酸盐	2	5	10	20	50	100	150	200
氯酸盐	4	10	20	40	100	200	300	400
高氯酸盐内标	2	2	2	2	2	2	2	2
氯酸盐内标	40	40	40	40	40	40	40	40

1.3.5　结果计算

样品中氯酸盐和高氯酸盐含量计算公式如(1)所示:

$$X=\frac{(C-C_0)\times V\times 1000}{m\times 1000} \quad (1)$$

式中: X 表示试样中待测组分的含量, 以氯酸根或高氯酸根计, μg/kg; C 为由标准曲线计算得到的试样溶液中待测组分的质量浓度, ng/mL; C_0 由标准曲线计算得到的空白试样中待测组分的质量浓度, ng/mL; V 为试样提取中加入提取液的体积, mL; m 为试样的质量, g。

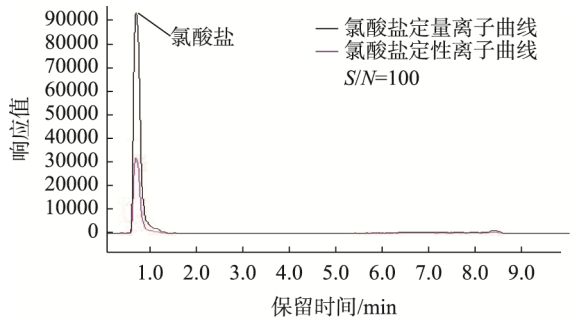
1.4　数据处理

采用 Labsolutions LCMS-8050 对图谱进行采集与分析采用 Excel 2017 软件对数据进行处理及绘图。

2　结果与分析

2.1　色谱柱的选择

建立合适的色谱条件, 使得氯酸盐和高氯酸盐的色谱峰实现基线分离是进行研究的首要任务[24]。本次研究对比杂化基质通用型 C_{18} 色谱柱: Waters UPLC BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)和高强度硅胶基质极性增强型 C_{18} 色谱柱 ACQUITY UPLC®HSS T_3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)。Waters UPLC BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱对目标分析物几乎无保留(保留时间均在 1 min 内, 图 1~2)。ACQUITY UPLC®HSS T_3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱对高氯酸盐保留时间较长, 因此选择 ACQUITY UPLC®HSS T_3 色谱柱。通过查阅相关文献[25–26]可知, Waters UPLC BEH C_{18} 色谱柱为硅胶材料键合非极性或弱极性的固定相, 常用于分离一些弱极性或中等极性的化合物。氯酸盐和高氯酸盐为负离子极性物质所以在 C_{18} 色谱柱上保留比较弱。ACQUITY UPLC®HSS T_3 与 Waters UPLC BEH C_{18} 色谱柱相比其键合的 C_{18} 链密度较低, 其表面增加了更多的残留硅羟基(–SiOH), 增强了对极性化合物和复杂基质代谢物的保留性, 从而便于对高极性化合物进行分析。



注: S/N 为信噪比, 图 2~6 同。

图 1　不同色谱柱氯酸盐保留时间

Fig.1　Retention time of chlorate in different chromatographic columns

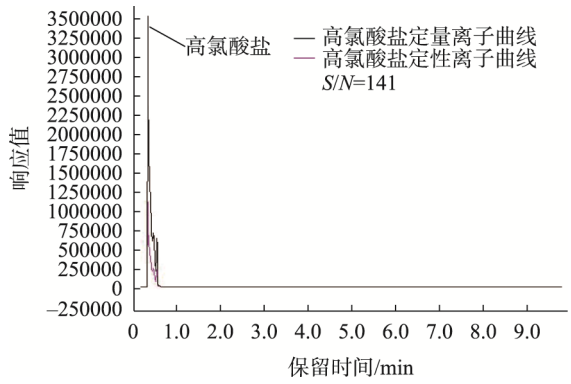


图 2　不同色谱柱高氯酸盐保留时间

Fig.2　Retention time of perchlorate in different chromatographic columns

2.2　流动相的确定

A 相为乙腈或甲醇; B 相为 0.1%甲酸水溶液, 在等度洗脱条件下进行分离。结果发现甲醇做流动相峰形不稳定, 杂峰较多(图 3~4), 且在反向系统中乙腈洗脱强度大于甲醇[27], 响应值更高, 最终确定 A 相为乙腈、B 相为 0.1%甲酸水溶液为流动相体系(图 5~6)。

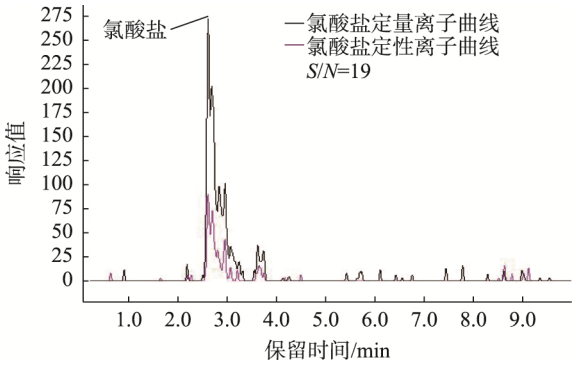


图 3　甲醇为流动相氯酸盐色谱图

Fig.3　Chromatogram of chlorate with methanol as the mobile phase

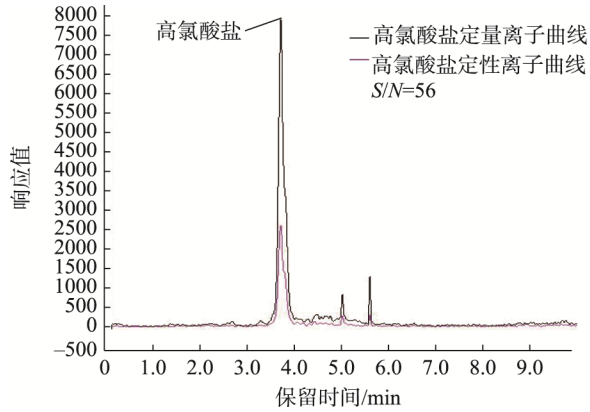


图 4　甲醇为流动相高氯酸盐的色谱图

Fig.4　Chromatogram of perchlorate with methanol as the mobile phase

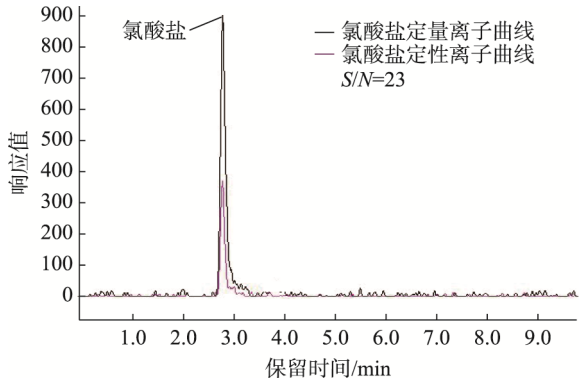


图 5 乙腈为流动相的氯酸盐色谱图

Fig.5 Chromatogram of chlorate with acetonitrile as the mobile phase

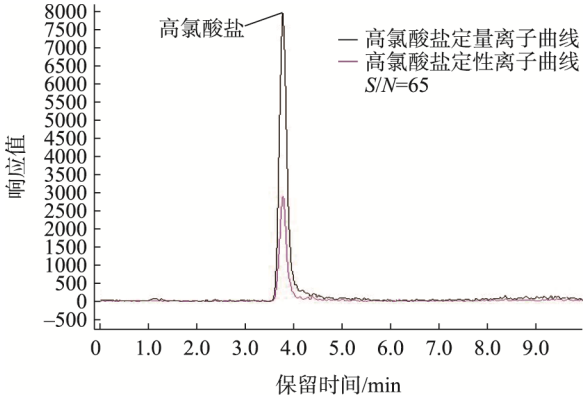


图 6 乙腈为流动相的高氯酸盐色谱图

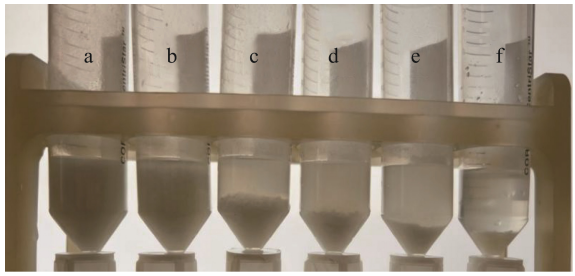
Fig.6 Chromatogram of perchlorate with acetonitrile as the mobile phase

2.3 流速和进样量的确定

为优化色谱检测条件，试验选取 0.1、0.2、0.3、0.5 mL/min 不同流速，与 3.0、5.0、10.0 μL 不同进样量分水平进行对比实验。通过研究发现流速越大保留时间越短，且峰形易出现拖尾，为使色谱峰得到更好的分离且最大程度保护色谱柱最终选择流速为 0.1 mL/min。进样量增大会提高检测灵敏度[28]，但过大的进样量会使色谱峰峰底变宽，同时容易污染色谱柱，经研究发现，进样量为 5 μL 时，色谱峰峰形最佳，且对色谱柱的影响较小。因此确定进样量为 5 μL。

2.4 前处理条件的优化

液体奶的成分较为复杂，高效且稳定的前处理方式是后续准确定量检测的关键步骤[29]。本研究采用 0.1%甲酸水溶解液体奶，甲醇或乙腈分离沉淀蛋白。经查阅相关文献[30–32]可知，甲醇作为提取试剂放置时间过长容易析出结晶和白色絮状物，不适合大批量样本的使用。本研究最终确定用乙腈做沉淀蛋白的有机试剂。由图 7 可见，加入 2 种提取液超声提取结束后上清液随着加入乙腈的体积分数增加逐渐变清澈。因此加入的乙腈的量越大，分离蛋白等大分子物质的效果越好。



注: a~f 为甲酸水:乙腈(*V*:*V*)依次为 8:2、6:4、5:5、4:6、2:8、0:10。

图 7 2 种提取液沉淀蛋白效果

Fig.7 Protein precipitation effects of 2 kinds of extraction solutions

6 种提取液组合方式对比氯酸盐和高氯酸盐加标量分别为 50 μg/kg、25 μg/kg 时的加标回收率，考察不同比例提取液的提取效果。经实验可以得出，只加入乙腈有机试剂提取样品，目标化合物的回收率明显降低，存在蛋白质和目标提取物共沉淀的现象[33]。说明在提取过程中需要用 0.1%甲酸水将氯酸盐和高氯酸盐充分溶解和离子化。由表 4 可见甲酸水与乙腈的比例为 4:6 和 2:8 (*V*:*V*)时，加标回收率均在 80%~120%，且 RSDs 小于 10%，相关研究表明较高含量的乙腈提取液可以防止氯酸盐和高氯酸盐内标过固相萃取柱时被部分吸附，影响实验结果[34]。结合有机试剂的净化效果(图 7)，综合考虑选择 2 mL 0.1%甲酸水溶液和 8 mL 乙腈为样品提取液。

表 4 不同提取液的回收率和相对标准偏差(%, *n*=6)

Table 4 Recovery rates and relative standard deviations of different extract solutions (%, *n*=6)

甲酸水:乙腈 (*V*:*V*)	氯酸盐回收率	RSDs	高氯酸盐回收率	RSDs
8:2	74.2~90.8	6.0	76.8~86.5	3.4
6:4	79.4~85.7	2.5	76.1~81.8	2.2
5:5	73.8~107.7	8.5	90.7~102.2	4.1
4:6	80.9~89.9	3.0	91.6~106.4	5.1
2:8	90.1~95.6	1.9	100.5~106.4	2.1
0:10	66.5~75.3	3.2	76.7~83.6	2.6

注: 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.5 净化方式的确定

固相萃取法(solid-phase extraction, SPE)是根据填料基质的特性，选择性吸附脂质、色素、蛋白质，有机酸等

干扰物质, 实现有效净化[35]。本研究选择 GCB、HLB-V、PRiME HLB 3 种不同固相萃取柱对液体奶提取样品进行净化。由图 8 可知, 经过内标法定量, 3 种固相萃取柱对目标分析物的损失均较少, 回收率均在 90%~110%之间, RSDs 均小于 10%, 可以满足实验需求。与相关报道研究结果相似[36–37]。但由于固相萃取柱均为一次性耗材, PRiME HLB 和 GCB, 价位相对较高, GCB 固相萃取柱需要活化和平衡。因此最终选择简便且性价比较高的高氯酸盐专用固相萃取柱 HLB-V。HLB-V 核心填料成分由 N-乙烯基吡咯烷酮(亲水极性基团)与二乙烯基苯(疏水非极性基团)共聚而成, 表面优化了阴离子作用位点, 是氯酸盐和高氯酸盐专属的改进 HLB。GB 5009.291—2023 推荐 GCB 有色素吸附的优势, 更适用于茶叶等样品前处理[38]。

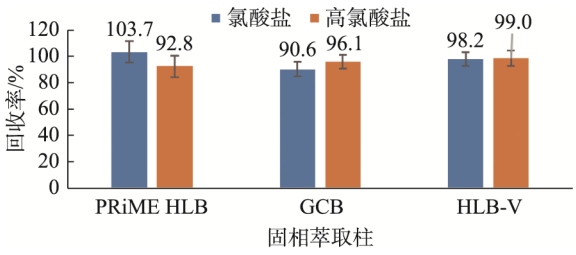


图 8　加标样品经过 3 种固相萃取柱净化后的回收率(n=3)
Fig.8　Recovery rates of the spiked samples after purification by 3 kinds of solid-phase extraction columns (n=3)

2.6　基质效应的评估及标准曲线的应用

基质效应的评估通过比较空白基质校准曲线的斜率与纯溶剂标准曲线的斜率, 评估基质效应。基质效应=(基质校准曲线斜率/溶剂标准曲线斜率)×100%。当比值在 0.8~1.2 之间, 可认为基质效应基本无影响[32,34]。采用纯溶剂和液体奶的空白基质配制氯酸盐和高氯酸盐标准系列溶液, 经 LC-MS/MS 测定, 获得相应的峰面积, 以标准系列工作溶液中氯酸盐和高氯酸盐的质量浓度为横坐标(X, μg/mL), 峰面积比为纵坐标(Y), 绘制校准曲线。其线性回归方程和决定系数(r^2)见表 5。结果显示, 高氯酸盐的基质效应为 1.13, 氯酸盐的基质效应为 0.94。表明样品经本研究优化的提取液比例提取, 固相萃取柱净化, 结合内标法校正后, 有效地减小了基质效应。因此本研究方法选择溶剂标准曲线测定氯酸盐及高氯酸盐的含量。

2.7　检出限和定量限

向空白液体奶基质中添加浓度梯度标准工作液进行实验, 当高氯酸盐添加终质量浓度为 0.8 μg/kg, 氯酸盐添加终质量浓度为 2.4 μg/kg 时, S/N 均大于 3, 高氯酸盐添加终质量浓度为 2.5 μg/kg, 氯酸盐添加终质量浓度为 8 μg/kg 时, S/N 均大于 10, 因此本研究的高氯酸盐的检出限(limit of detection, LOD)为 0.8 μg/kg, 定量限(limit of quantitation, LOQ)为 2.5 μg/kg。氯酸盐的检出限为 2.4 μg/kg, 定量限为 8 μg/kg。经实验验证本研究选取空白样品基质 20 个平行样品, 分别添加终质量浓度为 0.8 μg/kg 的高氯酸盐标准物质和 2.4 μg/kg 的氯酸盐标准物质, 测定高氯酸盐的检出率为 100%, 氯酸盐的检出率为 100%。

表 5　氯酸盐和高氯酸盐的回归方程和决定系数
Table 5　Regression equations and determination coefficients for chlorates and perchlorates

曲线	目标物	线性范围/(μg/L)	线性方程	r^2
基质校准曲线	高氯酸盐	0~200	Y=0.808373X–0.722618	0.9996
	氯酸盐	0~400	Y=0.0308579X–0.0923967	0.9998
溶剂标准曲线	高氯酸盐	0~200	Y=0.712607X–0.163662	0.9998
	氯酸盐	0~400	Y=0.0329581X+0.0255416	0.9995

2.8　加标回收实验验证方法的准确度和精密度

结合日常生活习惯, 本实验室选取生牛乳, 巴氏杀菌乳和灭菌乳作为代表样品, 在样品中分别加入液体终浓度为氯酸盐 8、16、80 μg/kg 和高氯酸盐 2.5、5.0、25.0 μg/kg (LOQ、2LOQ、10LOQ)的标准溶液进行回收率实验, 以加标回收率结果反应实验的准确性, 加标回收率的 RSD 表示方法的精密度。每个浓度水平独立检测 3 次, 实验得出氯酸盐在 8~80 μg/kg, 高氯酸盐在 2.5~25.0 μg/kg 添加水平范围的回收率在 81.9~105.4%之间, RSD 小于 10% (n=3)(表 6), 说明方法具有良好的准确度和精密度。

2.9　实际样品检测结果

3 种液体乳均有氯酸盐和高氯酸盐检出, 氯酸盐检出范围为未检出~34.5 μg/kg, 高氯酸盐检出范围为未检出~27.5 μg/kg, 本研究在液体奶中氯酸盐和高氯酸盐的检测有一定的适用性。检测结果见表 7。

2.10　与国家标准方法的不同实验条件

本研究方法与 GB 5009.291—2023 主要在色谱柱、色谱条件、提取试剂比例、固相萃取柱的选择等不同。相较于 GB 5009.291—2023 的 ACQUITY UPLC®HSS T_3 色谱柱建立的检测体系检出限和定量限均更低(表 8), 提高了低浓度阴离子定量的准确性, 为复杂基质中无机阴离子检测拓展了新思路。

表 6 3 种基质加标实验的回收率及精密度实验结果(n=3)

Table 6 Recovery rates and precision test results of the 3 kinds of matrix spiked experiments (n=3)

待测物	氯酸盐			高氯酸盐		
	添加量/(μg/kg)	回收率范围/%	RSDs/%	添加量/(μg/kg)	回收率范围/%	RSDs/%
鲜牛乳	8	86.9~104.1	8.8	2.5	88.7~93.5	2.4
	16	88.2~103.9	8.5	5.0	94.6~105.4	5.4
	80	89.6~102.2	6.3	25.0	87.4~93.5	3.1
巴士杀菌乳	8	90.2~104.2	7.6	2.5	86.4~95.4	4.6
	16	91.8~105.3	6.8	5.0	85.5~96.4	5.9
	80	82.8~93.2	5.4	25.0	83.5~95.1	5.9
灭菌乳	8	85.8~103.4	8.8	2.5	82.9~92.9	5.2
	16	90.5~96.9	3.5	5.0	81.9~93.2	6.5
	80	85.3~99.7	7.5	25.0	83.6~96.7	6.6

表 7 实际样品检测结果

Table 7 Test results of actual sample

种类	样品数	氯酸盐检测结果			高氯酸盐检测结果		
		检出率/%	范围/(μg/kg)	均值/(μg/kg)	检出率/%	范围/(μg/kg)	均值/(μg/kg)
鲜牛乳	9	44.4	ND~30.5	10.2	100.0	7.5~22.9	11.5
巴士杀菌乳	9	44.4	ND~34.5	12.4	88.9	ND~27.5	9.1
灭菌乳	8	25.0	ND~26.0	10.0	100.0	4.0~15.0	7.5
合计	26	38.5	ND~34.5	10.9	96.2	ND~27.5	9.5

注: ND 表示未检出(氯酸盐低于 2.4 μg/kg, 高氯酸盐低于 0.8 μg/kg), 计算平均数时, 未检出样本以 1/2LOQ 处理。

表 8 本研究方法与 GB 5009.291—2023 的实验条件比较

Table 8 Comparison of experimental conditions between this research method and GB 5009.291—2023

评价指标	GB 5009.291—2023	本研究方法
色谱柱	五氟苯基柱	ACQUITY UPLC® HSS T_3
色谱条件	流速: 0.3 mL/min; 进样量: 3 μL	流速: 0.1 mL/min; 进样量: 5 μL
提取试剂	4 mL 0.1%甲酸水溶液+6 mL 乙腈	2 mL 0.1%甲酸水溶液+8 mL 乙腈
固相萃取柱	GCB 固相萃取柱	高氯酸盐专用柱
LOD	氯酸盐 10.0 μg/kg; 高氯酸盐 1.0 μg/kg	氯酸盐 2.4 μg/kg; 高氯酸盐 0.8 μg/kg
LOQ	氯酸盐 25.0 μg/kg; 高氯酸盐 2.5 μg/kg	氯酸盐 8.0 μg/kg; 高氯酸盐 2.5 μg/kg

3 讨论与结论

本研究优化了 LC-MS/MS 同时测定液体奶中氯酸盐和高氯酸盐的检测方法。探究了色谱柱、流动相、检测流速和进样量对待测物的影响。优化后的检测方法采用 ACQUITY UPLC®HSS T_3 色谱柱, 流动相为乙腈和 0.1%甲酸水溶液, 流速为 0.1 mL/min, 进样量为 5 μL。经优化后, 氯酸盐和高氯酸盐得到有效的分离, 基线平稳, 峰形对称。经实验确定当称样量为 2.0 g 时, 样品提取液为 2.0 mL 0.1%甲酸水溶液和 8.0 mL 乙腈可使氯酸盐和高氯酸盐从液体奶中解离出来, 且有效地沉淀液体奶中的蛋白质, 目标化合物的回收率为 80%~120%。净化的过程采用 HLB-V 固相萃取柱, 省去了固相萃取柱活化, 平衡的烦琐步骤, 节省了实验成本。本研究通过前处理乙腈沉淀蛋白, HLB-V 淋洗去除蛋白、脂肪、色素、乳糖等, 净化后的液体过 0.22 μm 滤膜去除微粒, 加入氯酸盐及高氯酸盐同位素内标定量校正几个方面有效消除基质效应。最终实现了液体奶中氯酸盐和高氯酸盐的同时精准检测。

本研究主动探索复杂基质中无机阴离子检测的新型色谱柱, 选用了高强度的硅胶基质极性增强型 C_{18} 色谱柱 ACQUITY UPLC®HSS T_3。经实验方法验证得出 ACQUITY UPLC®HSS T_3 色谱柱满足氯酸盐及高氯酸盐的定量检测。本研究方法与 GB 5009.291—2023 相比降低了目标化合物的 LOD, 氯酸盐由原来的 10.0 μg/kg 降低至 2.4 μg/kg。高氯酸盐由原来的 1.0 μg/kg 降低至 0.8 μg/kg。提高了检测的灵敏度, 更适用于含量较低的氯酸盐和高氯酸盐液体奶的检测。

经实际样品加标回收实验得出氯酸盐和高氯酸盐的回收率均在 80%~120%。3 种不同液体奶氯酸盐及高氯酸盐均有检出。本研究液体乳中高氯酸盐的检测均值远小于 GB 5749—2022 中规定的水中高氯酸盐的标准限值和欧盟委员会发布法规 2023/915 中婴儿及幼儿配方食品中高氯酸盐的最大残留量。与其他地区的液体乳检测结果相比, 内蒙地区液体乳中氯酸盐及高氯酸盐检测均值分别为

6.06 μg/kg 和 7.86 μg/kg[39], 意大利牧场检测的 148 批次生鲜乳样品氯酸盐及高氯酸盐检测均值分别为 7.10 μg/kg 和 4.06 μg/kg[7], 均略低于本次研究结果。造成以上差别可能与地域环境和牛奶牧场采购的饲料等有关[4–7], 本次研究检测实际样品数据量太小, 也可能造成地区液体乳检测结果的差异。

综上所述, 该方法研究出与 ACQUITY UPLC®HSS T_3 色谱柱适配的实验条件, 实现了氯酸盐和高氯酸盐的同时检测和分析, 操作简便, 回收率稳定, 具有较强的稳定性, 灵敏性和良好的重复性, 适合大批量样品的检测, 有利于推广应用。为今后国内食品中氯酸盐和高氯酸盐的检测和限量标准的制定提供强有力的技术支持。今后的研究会加大液体乳中氯酸盐及高氯酸盐样品量的检测, 结合《中国居民膳食指南(2022)》推荐的不同年龄段人群的乳制品日均消费量, 计算不同人群通过乳制品摄入氯酸盐和高氯酸盐的每日暴露量, 评估本地区居民的健康风险程度。

参考文献

[1] Yang S, Bhargava N, O'Connor A, et al. Dairy consumption in adults in China: a systematic review [J]. BMC nutrition, 2023, 9(1): 116.

[2] Yan Meilin, Niu Chenyue, Li Xin, et al. Heavy metal levels in milk and dairy products and health risk assessment: a systematic review of studies in China [J]. Science of the Total Environment, 2022, 851: 158–161.

[3] 中国营养学会. 中国居民膳食指南(2022)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2022: 49.
Chinese Nutrition Society. Dietary guidelines for Chinese residents (2022) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2022: 49.

[4] 李琳瑶, 高超, 储小军, 等. 婴幼儿配方乳粉中氯酸盐和高氯酸盐污染状况及来源分析[J]. 乳业科学与技术, 2023, 46(4): 28–34.
Li Linyao, Gao Chao, Chu Xiaojun, et al. Pollution and source analysis of chlorate and perchlorate in infant formula milk powder [J]. Dairy Science and Technology, 2023, 46(4): 28–34.

[5] Fairey J L, Pifer A D, Wahman D G. Intrinsic disinfection byproducts in free chlorine and chloramine systems: Formation of chlorite, chlorate, perchlorate, and chloronitramide anion [J]. Current Opinion in Environmental Science & Health, 2025: 100684.

[6] 张卿, 毛伟峰, 郭卫东, 等. 某市液态奶中氯酸盐和高氯酸盐污染来源分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 7940–7945.
Zhang Qing, Mao Weifeng, Guo Weidong, et al. Analysis of the sources of chlorate and perchlorate pollution in liquid milk in a city [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(20): 7940–7945.

[7] Nobile M, Danesi L, Pavlovic R, et al. Presence of chlorate and perchlorate residues in raw bovine milk from Italian farms [J]. Foods, 2022, 11(18): 2741.

[8] Chen Yining, Zhu Zhou, Ji Jiajia, et al. Chlorate in foodstuffs from south China and its implication for human exposure [J]. Food and Chemical Toxicology, 2025, 195: 115120.

[9] Dou Diancheng, He Ming, Liu Jinxin, et al. Occurrence, distribution characteristics and exposure assessment of perchlorate in the environment in China [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 474: 134805.

[10] Handler S N, cuadros M A L, Pearce E N. Perchlorate and thyroid function [J]. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research, 2025: 100589.

[11] Youngblut M D, Wang O, Barnum T P, et al. (Per) chlorate in biology on earth and beyond [J]. Annual review of microbiology, 2016, 70(1): 435–457.

[12] Logan B E. A review of chlorate-and perchlorate-respiring microorganisms [J]. Bioremediation Journal, 1998, 2(2): 69–79.

[13] Chen Lixiang, Yan Xinyu, Zhou Xudong, et al. Advances in the on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry analysis of emerging organic contaminants [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2023, 160: 116976.

[14] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (Contam), Knutsen H K, Åkesson A, et al. Update of the scientific opinion on the risks for human health related to the presence of perchlorate in food [J]. EFSA Journal, 2025, 23(5): e9393.

[15] 周密, 马娇, 么赛, 等. 婴幼儿配方乳粉高氯酸盐污染风险分析研究[J]. 中国乳业, 2024(10): 78–83, 92.
Zhou Mi, Ma Jiao, Yao Sai, et al. Risk analysis of perchlorate contamination in infant formula milk powder [J]. China Dairy, 2024(10): 78–83, 92.

[16] 黄彬红. 婴幼儿配方奶粉中氯酸盐和高氯酸盐污染情况的调查分析[J]. 中国乳品工业, 2024, 52(3): 30–35.
Huang Binhong. Investigation and analysis of chlorate and perchlorate pollution in infant formula milk powder [J]. China Dairy Industry, 2024, 52(3): 30–35.

[17] 朱舟, 罗若荣, 李春, 等. 市售婴幼儿食品中高氯酸盐的含量及健康风险评估[J]. 环境与健康杂志, 2025, 42(1): 29–32.
Zhu Zhou, Luo RuoRong, Li Chun, et al. Content and health risk assessment of perchlorate in commercially available infant food [J]. Journal of Environment and Health, 2025, 42(1): 29–32.

[18] 张志君. 2023 年衡阳市县级以上饮用水源地高氯酸盐健康风险初步评价[J]. 环保科技, 2024, 30(6): 16–19.
Zhang Zhijun. Preliminary health risk assessment of perchlorate in drinking water sources above county level in Hengyang City in 2023 [J]. Environmental Protection Technology, 2024, 30(6): 16–19.

[19] 张海燕, 孙卓然, 包玉兰, 等. 2023 年呼和浩特市生活饮用水中高氯酸盐暴露水平调查及健康风险评估[J]. 职业与健康, 2024, 40(22): 3118–3122.
Zhang Haiyan, Sun Zhouran, Bao Yulan, et al. Investigation and health risk assessment of perchlorate exposure level in drinking water in Hohhot in 2023 [J]. Occupation and health, 2024, 40(22): 3118–3122.

[20] 杨春霞, 张芳. 枸杞园土壤中氯酸盐和高氯酸盐污染水平及污染源分析[J]. 北方园艺, 2024(22): 67–72.
Yang Chunxia, Zhang Fang. Analysis of chlorate and perchlorate pollution levels and pollution sources in soil of wolfberry orchard [J]. Northern Horticulture, 2024(22): 67–72.

[21] 方晓丽, 李瑞芬, 杨舒然, 等. 食品中氯酸盐、高氯酸盐检测方法研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2023, 33(12): 1531–1534.
Fang Xiaoli, Li Ruifang, Yang Shuran, et al. Research progress on detection methods of chlorate and perchlorate in food [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2023, 33(12): 1531–1534.

[22] 陈何燊. 液相色谱-串联质谱法测定奶粉中高氯酸盐, 氯酸盐的含量[J].

广东化工, 2021, 48(20): 227–230.
Chen Heshen. Determination of perchlorate and chlorate in milk powder by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(20): 227–230.

[23] 李婷婷, 史蓉, 曾文锦, 等. 高氯酸盐在食品中的暴露情况及检测技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 342–348.
Li Tingting, Shi Rong, Zeng Wenjin, et al. Research progress on exposure and detection technology of perchlorate in food [J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(11): 342–348.

[24] 纪晓萌, 王真, 任南, 等. 高效液相色谱法测定肉制品中多种游离核苷酸[J]. 食品科学, 2025, 46(13): 341–350.
Ji Xiaomeng, Wang Zhen, Ren Nan, et al. Determination of multiple free nucleotides in meat products by high performance liquid chromatography [J]. Food Science, 2025, 46(13): 341–350.

[25] 叶凡凡. 多孔石墨化碳对极性化合物吸附和保留的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2020: 5.
Ye Fanfan. Adsorption and retention of polar compounds on porous graphitized carbon [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2020: 5.

[26] 宋文龙, 李一晗. 超高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄果实中的高氯酸盐[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(13): 41–48.
Song Wenlong, Li Yihan. Determination of perchlorate in grape fruit by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(13): 41–48.

[27] 詹胜群, 张浩, 周钧, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿配方乳粉中氯酸盐和高氯酸盐[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 312–318.
Zhan Shengqun, Zhang Hao, Zhou Jun, et al. Determination of chlorate and perchlorate in infant formula milk powder by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food science and technology, 2022, 47(1): 312–318.

[28] 王浩, 贾婧怡, 张杉, 等. 液质联用法同时测定婴幼儿配方乳粉中氯酸盐和高氯酸盐残留[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(2): 48–50, 64.
Wang Hao, Jia Jingyi, Zhang Shan, et al. Simultaneous determination of chlorate and perchlorate residues in infant formula milk powder by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. China Dairy Industry, 2019, 47(2): 48–50, 64.

[29] Ma Ling, Gu Yue, Guo Liqiang, et al. The determination of 11 sulfonamide antibiotics in water and foods by developing a N-rich magnetic covalent organic framework combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. RSC advances, 2024, 14(30): 21318–21327.

[30] 马晓冲, 王瑶, 李兴佳, 等. 液相色谱串联质谱法测定饲料中高氯酸盐含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(13): 4171–4176.
Ma Xiaochong, Wang Yao, Li Xingjia, et al. Determination of perchlorate content in feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(13): 4171–4176.

[31] 许小茜, 李清清, 顾颖娟. 高效液相色谱联用质谱法测定羊奶粉中的氯酸盐和高氯酸盐[J]. 分析仪器, 2020(5): 46–51.
Xu Xiaoqian, Li Qingqing, Gu Yingjuan. Determination of chlorate and perchlorate in goat milk powder by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Analytical Instruments, 2020(5): 46–51.

[32] 陈曦, 周明慧, 伍燕湘. 高效液相色谱-串联质谱法测定谷物中的氯酸盐和高氯酸盐[J]. 中国粮油学报, 2025, 40(6): 181–188.
Chen Xi, Zhou Minghui, Wu Yanxiang. Determination of chlorate and perchlorate in cereals by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Grain and Oil, 2025, 40(6): 181–188.

[33] 张强. 生鲜乳与乳品加工产品中高氯酸盐污染现状及检测方法研究进展[J]. 中国奶牛, 2025(1): 47–52.
Zhang Qiang. Current status of perchlorate pollution in raw milk and dairy products and research progress on detection methods [J]. China Dairy Cows, 2025(1): 47–52.

[34] 王浩, 张旭, 张杉, 等. 液质联用法测定食品中氯酸盐和高氯酸盐[J]. 食品工业, 2021, 42(8): 305–308.
Wang Hao, Zhang Xu, Zhang Shan, et al. Determination of chlorate and perchlorate in food by LC-MS [J]. Food industry, 2021, 42(8): 305–308.

[35] 朱懿杰, 李艳妮, 闵婉妮, 等. 食品中高氯酸盐的样品前处理及检测方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2026, 52(6): 407–416.
Zhu Yijie, Li Yanni, Min Wanni, et al. Research progress on sample pretreatment and detection methods of perchlorate in food [J]. Food and fermentation industry, 2026, 52(6): 407–416.

[36] 李冬桂, 吕丽兰, 陆覃昱, 等. 三种固相萃取柱在农产品高氯酸盐检测中应用比较[J]. 农业研究与应用, 2022, 35(6): 44–52.
Li Donggui, Lv Lilan, Lu tanyu, et al. Comparison of three solid phase extraction columns in the detection of perchlorate in agricultural products [J]. Agricultural research and application, 2022, 35(6): 44–52.

[37] 刘春波, 陈旭, 张海燕, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛乳中高氯酸盐含量及其暴露水平[J]. 食品科技, 2024, 49(8): 329–334.
Liu Chunbo, Chen Xu, Zhang Haiyan, et al. Determination of perchlorate content and its exposure level in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science and Technology, 2024, 49(8): 329–334.

[38] 陈巧. 液质联用测定福鼎白茶中高氯酸盐含量及其污染情况研究[J]. 福建分析测试, 2024, 33(3): 12–15, 22.
Chen Qiao. Determination of perchlorate content and its pollution in Fuding white tea by LC-MS [J]. Fujian Analytical Test, 2024, 33(3): 12–15, 22.

[39] 张卿. 内蒙古地区乳及乳制品中氯酸盐和高氯酸盐的污染水平分析及风险暴露评估[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2022: 29.
Zhang Qing. Pollution level analysis and risk exposure assessment of chlorate and perchlorate in milk and dairy products in Inner Mongolia [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2022: 29.

(责任编辑: 曹岱琳 韩晓红)