

茶叶中三甲基砷的 HPLC-MS/MS 检测方法和基质干扰消除作用

李丽¹, 周洪斌²

摘要:

[目的] 建立茶叶中三甲基砷的高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)检测方法,应用该方法检测市售茶叶中三甲基砷的含量。

[方法] 应用酸性乙酸铵和过氧化氢混合溶液加热提取茶叶中三甲基砷,所得样品提取液用N-丙基乙二胺净化,过膜后进样。再经亲水柱分离,采用多反应监测模式进行检测。基质匹配配制标准曲线,外标法定量。抽取市售茶叶45份,检测其三甲基砷的含量。

[结果] 目标化合物在0.032~1.00 μg/L范围内线性关系良好,相关系数大于0.995。方法的定量限和检出限分别为10.0、4.00 μg/kg。加标水平在10.0、20.0、40.0 μg/kg时,样品的平均回收率为78.1%~127.0%,相对标准偏差为3.9%~10.4%。45份市售茶叶中有2份检出三甲基砷,分别为茉莉花茶32.9 μg/kg和铁观音30.7 μg/kg。

[结论] HPLC-MS/MS法检测茶叶中的三甲基砷,可消除茶叶基质干扰,方法简便快速,精密度、准确性、检出限均能满足相关的技术规范的要求,并成功应用于市售茶叶中三甲基砷的检测。

关键词: 高效液相色谱-质谱联用; 三甲基砷; 茶叶; 样品处理

引用: 李丽,周洪斌. 茶叶中三甲基砷的HPLC-MS/MS检测方法和基质干扰消除作用[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(10): 938-942.

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.18223

Application of high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to trimethylsulfonium determination in tea and its elimination of sample matrix LI Li¹, ZHOU Hong-bin² (1.Mechatronics Engineering Faculty of Zhenjiang Vocational Technical College, Jiangsu Union Technical Institute Zhenjiang Branch, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China; 2.Technology Center of Zhenjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhenjiang, Jiangsu 212008, China). Address correspondence to ZHOU Hong-bin, E-mail: 1303490434@qq.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To apply high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) to the quantitative determination of trimethylsulfonium in retail tea products.

[Methods] Trimethylsulfonium in tea product samples was extracted with heated mixed solution of acidic ammonium acetate and hydrogen peroxide. The extraction was purified with primary secondary amine, injected after passing hydrophilic membranes, and separated on hydrophilic column. The analyte was determined by HPLC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified by external matrix matched standard method. A total of 45 samples of retail tea products were detected.

[Results] The calibration curve showed good linearity in the range of 0.032-1.00 μg/L with a correlation coefficient greater than 0.995. The limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) were 10.0 μg/kg and 4.00 μg/kg, respectively. The average recoveries varied from 78.1% to 127.0% with the relative standard deviations (RSDs) of 3.9%-10.4% at three spiked levels (10.0, 20.0, and 40.0 μg/kg). Two samples were positive among the 45 samples, of which the trimethylsulfonium levels in jasmine tea and tieguanyin were 32.9 μg/kg and 30.7 μg/kg, respectively.

[Conclusion] HPLC-MS/MS is a simple, accurate, and precise method to eliminate matrix in tea samples, with a limit of detection meeting relevant technical requirements; therefore, it is successfully applied to the determination of trimethylsulfonium in retail tea products.

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[作者简介] 李丽(1982—),女,硕士,讲师;研究方向:化学分析;E-mail: 25338276@qq.com

[通信作者] 周洪斌, E-mail: 1303490434@qq.com

[作者单位] 1.江苏联合职业技术学院镇江分院 镇江高等职业技术学校机电工程系,江苏 镇江 212000; 2.镇江出入境检验检疫局技术中心,江苏 镇江 212008

Keywords: liquid chromatography tandem mass spectrometry; trimethylsulfonium; tea; sample treatment

Citation: LI Li, ZHOU Hong-bin. Application of high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to trimethylsulfonium determination in tea and its elimination of sample matrix[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(10): 938-942. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.18223

农药草甘膦(glyphosate)是一种广谱、植物出苗之后喷洒的、非选择性的除草剂。为了增加草甘膦的水溶性,其市售制剂通常为草甘膦三甲基硫盐^[1]。在茶叶等作物中喷洒该农药可导致三甲基硫(trimethylsulfonium)残留。基于三甲基硫对人体健康、环境影响以及暴露水平的评估^[2],欧盟对输入该地区的茶叶中三甲基硫和草甘膦均设定了最高残留限量,非有机茶叶中三甲基硫残留限量为50 µg/kg^[3],而有机茶叶则依据国际有机农业联盟^[4]以及国际食品法典委员会制定的原则^[5],均要求不得检出(检出限为10 µg/kg)^[6]。中国是世界最大的茶叶生产和贸易国,也是欧盟茶叶的最大输入国^[7-8],2014年中国出口到欧盟的茶叶为2.49万t,货值达到1.04亿美元。但根据欧盟自定的限量标准,2015年,欧盟通报中国产茶叶的农药残留不合格就达到22次,造成中国茶叶出口多次受阻^[9]。但欧盟并未公开茶叶中三甲基硫的检测方法,为此本研究拟结合三甲基硫的理化特性,采用特殊的样品处理方法,进而应用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)技术检测茶叶中的三甲基硫残留量,同时以市售的绿茶、红茶、铁观音、茉莉花茶进行检测验证。

1 材料与方法

1.1 仪器

Thermo TSQ Quantan Access液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源(ESI)和自动进样器(Finnigan Surveyor,美国);电子天平:感量0.1 mg(梅特勒公司,瑞士);3K15高速冷冻离心机(Sigma公司,德国);DS-1组织捣碎机(上海右一仪器有限公司,中国)。

1.2 试剂及耗材

乙腈为色谱纯(Merck公司,德国),甲酸、乙酸铵、过氧化氢为分析纯(上海国药集团,中国),N-丙基乙二胺固体粉末(PSA)、高脚烧杯(直径30 mm, 50 mL)、15 mL带刻度的离心管、亲水膜(0.22 µm)(上海安普公司,中国),实验用水为Milli-Q高纯水(Millipore公司,美国),石墨化炭黑(GCB,深圳逗点公司,中国),样品提取液(1000 mL水中含有0.77 g乙

酸铵和2 mL甲酸)。

三甲基溴化硫(CAS: 3084-53-5 分子式C₃H₉BrS)标准品购自德国Dr.Ehrenstorfe公司,纯度大于99%。标准溶液:用乙腈将标准品配制为10.0 mg/L的标准储备液,于4℃保存。根据实验需要分别用样品提取液和绿茶样品基质液稀释至适当浓度生成标准曲线。

1.3 样品处理

1.3.1 样品的来源 用于方法确认的茶叶样品均为经过有机认证公司认证的有机产品;用于筛查的45份茶叶样品从本地市场采购以及由江西、福建等出入境检验检疫局提供。

1.3.2 茶叶样品的制备 取100 g茶叶样品,用组织捣碎机打碎后过100目的筛子,收集筛下物20 g充分混合均匀用于检测。

1.3.3 茶叶样品基质液的制备 称取有机茶叶样品100 mg(精确至1 mg),置于高脚烧杯中,加入15 mL提取液以及2 mL过氧化氢溶液,浸泡20 min。放到电炉上加热沸腾至剩余的提取液大约为3 mL左右,取下冷却至室温后,转移至15 mL带刻度的离心管中。用少量提取液分3次清洗高脚烧杯,合并于上述离心管中,用提取液定容至刻度,以8000 r/min(离心半径8 cm)离心5 min。取上清液8 mL加入300 mg PSA,涡旋1 min,10000 r/min(离心半径8 cm)离心5 min,取上清液6 mL过亲水膜,滤液用于倍比稀释三甲基溴化硫的标准溶液生成标准曲线。

1.3.4 茶叶样品中三甲基硫的提取和净化 称取样品100 mg(精确至1 mg),置于高脚烧杯中,加入15 mL提取液以及2 mL过氧化氢溶液,浸泡20 min。放到电炉上加热沸腾至剩余的提取液大约为3 mL左右,取下冷却至室温后,转移至15 mL带刻度的离心管中。用少量提取液分3次清洗高脚烧杯,合并于上述离心管中,用提取液定容至刻度,以8000 r/min(离心半径8 cm)离心5 min。取上清液1 mL加入100 mg PSA,涡旋1 min,10000 r/min(离心半径8 cm)离心5 min,取上清液过亲水膜,备用。

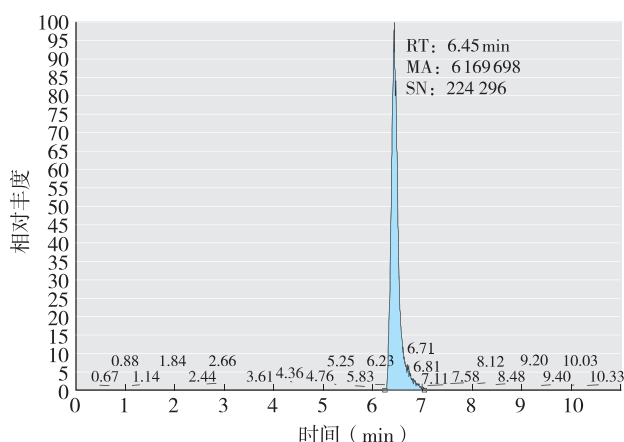
1.4 仪器条件

Se Quant[™] Zic[®]-Hilic亲水柱(150 mm × 2.1 mm,

5 μm); 流动相C为乙腈, 流动相D为乙酸铵-甲酸溶液(15 mmol/L, 含1.5 mL甲酸), 梯度洗脱(表1)。流速0.30 mL/min, 进样量25 μL , 柱温25 $^{\circ}\text{C}$ 。电喷雾离子源(ESI), 正离子模式扫描; 质谱扫描方式: 多反应监控(MRM); 喷雾电压4200 V; 离子源温度360 $^{\circ}\text{C}$; 辅助气流速3 mL/min; 壳气流速4 mL/min; 碰撞气(氮气)流速0.45 mL/min。定性、定量离子对和碰撞能量分别为77.1/47.4、25 eV, 77.1/62.4、15 eV, 保留时间为6.45 min。标准溶液的总离子流图见图1。

表1 色谱梯度洗脱条件

保留时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相C (乙腈)(%)	流动相D (15 mmol/L 乙酸铵含1.5 mL 甲酸)(%)
0.00	0.30	100	0
1.00	0.30	100	0
1.50	0.30	80	20
3.50	0.30	80	20
4.00	0.30	50	50
6.00	0.30	50	50
8.00	0.30	5	95
8.50	0.30	100	0
11.00	0.30	100	0



[注] RT: 保留时间; MA(手动积分): 峰面积; SN: 信噪比; 母离子: 77.1 m/z; 子离子: 47.395~47.405 m/z, 62.395~62.405 m/z。

图1 三甲基溴化锡的总离子流图(浓度1.00 $\mu\text{g/L}$)

2 结果

2.1 方法的标准曲线、线性范围、检出限和定量限

吸取50.0 μL 三甲基溴化锡标准溶液(20.0 $\mu\text{g/L}$)于950.0 μL 滤液中, 涡旋混合均匀, 浓度为1.00 $\mu\text{g/L}$ 。再用滤液倍比稀释浓度为1.00 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液, 共计6个点: 0.032、0.062、0.125、0.250、0.500、1.00 $\mu\text{g/L}$ 。以峰面积对质量浓度作图, 得到标准工作曲线 $\hat{Y}=5.64 \times 10^5 X-1.63 \times 10^4$ (图2)。结果显示, 在所测定的质量浓度范围(0.032~1.00 $\mu\text{g/L}$)内工作曲线呈良好的线性, 相关系数(r)为0.9988。

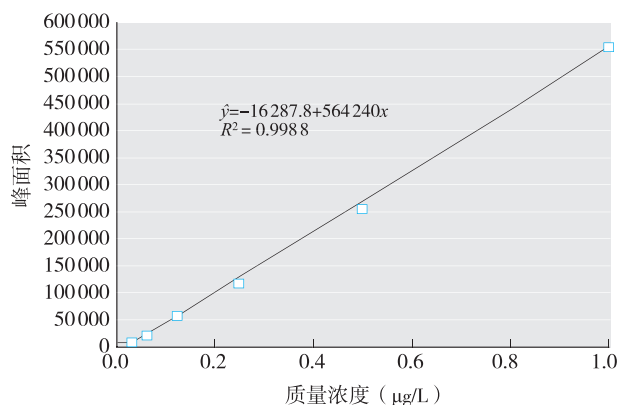


图2 三甲基溴化锡的标准曲线(绿茶基质匹配, 0.032~1.00 $\mu\text{g/L}$)

参照美国环保署(EPA)^[10]的方法, 先计算仪器的检出限和定量限, 然后在仪器的定量限上做实际样品的加标回收。以7次平行试验的标准偏差计算方法得到的检出限为4.00 $\mu\text{g/kg}$ 和定量限为10.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.2 实验的回收率和精密度

用四种有机茶叶的阴性样品做加标回收实验, 添加水平为10.0、20.0和40.0 $\mu\text{g/kg}$, 每个加标水平测定6次, 方法的平均回收率78.1%~127.0%, 相对标准偏差为3.9%~10.4%(表2)。绿茶、红茶阴性样品以及加标样品的总离子流图分别见图3~6。

表2 茶叶阴性样品的加标回收率、精密度($n=6$)

样品	加标量($\mu\text{g/kg}$)	检出值($\mu\text{g/kg}$)	回收率(%)	变异系数(%)
绿茶	10.0	9.90	99.0	5.20
	20.0	20.1	100.0	4.11
	40.0	39.5	98.8	3.90
红茶	10.0	8.90	89.0	4.42
	20.0	17.9	89.5	6.03
	40.0	35.9	89.8	5.22
茉莉花茶	10.0	12.7	127.0	8.81
	20.0	25.0	125.0	9.21
	40.0	47.7	119.0	7.94
铁观音	10.0	7.81	78.1	10.40
	20.0	16.0	79.9	10.20
	40.0	31.4	78.4	9.83

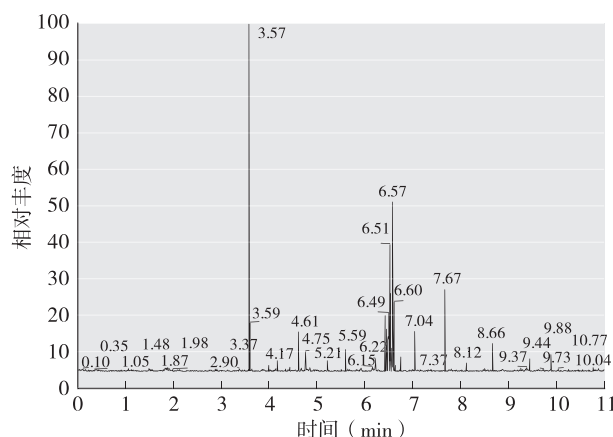
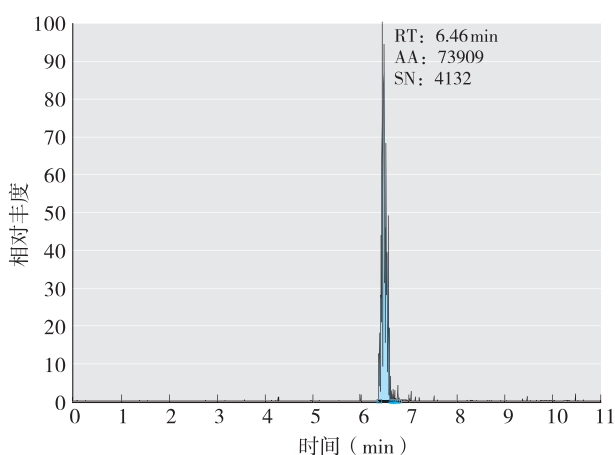


图3 绿茶阴性样品总离子流图



[注]RT: 保留时间; AA(自动积分): 峰面积; SN: 信噪比。

图4 绿茶加标样品总离子流图(10.0 μg/kg)

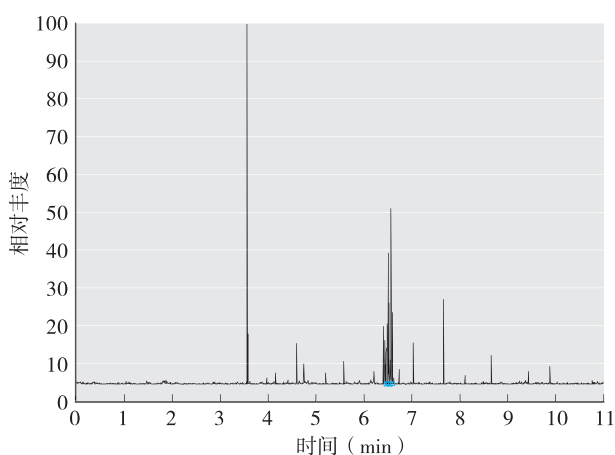
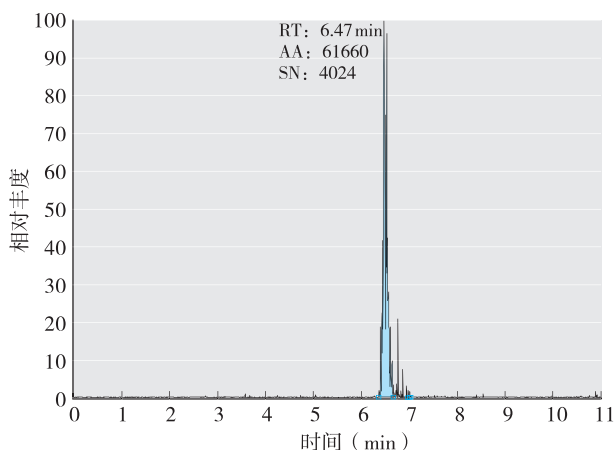


图5 红茶阴性样品总离子流图



[注]RT: 保留时间; AA(自动积分): 峰面积; SN: 信噪比。

图6 红茶加标样品总离子流图(10.0 μg/kg)

2.3 样品的筛查

45份茶叶样品,其中有机茶叶10份,均未检出三甲基砷。其他35份非有机茶叶中有两份检出,分别为茉莉花茶(32.9 μg/kg)和铁观音(30.7 μg/kg),其他均未检出。

2.4 样品基质干扰消除后的线性关系

采用“1.3.3”方法处理样品之后,分别用绿茶、红茶、铁观音、茉莉花茶的样品基质液配制标准曲线,曲线的重合度较高,样品基质的干扰基本消除。结果见图7。

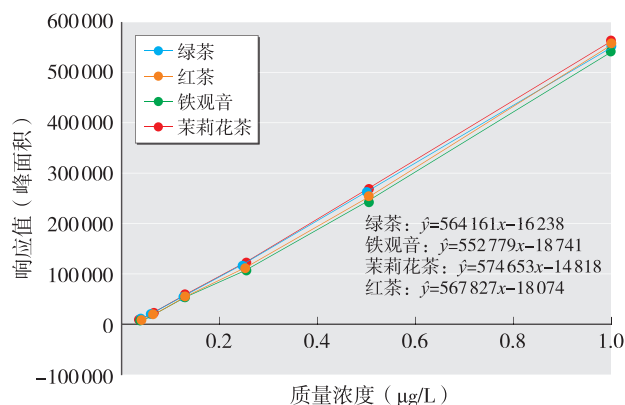


图7 绿茶、红茶、铁观音、茉莉花茶样品基质液配制的标准曲线

3 讨论

目前有C18柱、C8柱、亲水柱、离子交换柱(MCX柱、SCX柱)等色谱柱可用于待测组分的分离。比较发现:其中C18、C8柱对待测组分没有保留,基质干扰大,样品的回收率低。离子交换柱的保留性强,峰型拖尾。亲水柱在峰型、保留时间、消除样品基质等方面,都能够满足相关的技术要求。所以,本研究选Se Quantum™ Zic®-Hilic亲水柱作为分离柱。

参照QuEChERS^[11-12]的方法进行样品的预处理,用GCB、PSA对样品提取液进行净化。虽然采用梯度洗脱的方式分离待测组分,保留时间达到6.45 min,但是采用提取液配制标准曲线计算加标回收率,四种茶叶的回收率均不到15%。

采用QuEChERS的方法分别处理四种茶叶样品,用各自的空白样品基质液配制标准曲线,再各自检测自己品种的加标回收率、精密度,可以获得满意的结果。实验结果显示,不同茶叶的基质对待测组分的干扰程度不同,常规的QuEChERS的方法并不能消除这种干扰。

三甲基砷是一种良好的甲基化试剂,DIEZ等^[13]采用了三甲基砷衍生化的方法,检测了植物产品中的酸性除草剂(双氯芬酸、二氯吡啶酸、碘草腈等)。在250℃的高温条件下,带酸性基团的物质和酚类能与三甲基砷产生衍生化反应,被甲酯化。茶叶中也含有一些酸性物质,在液质的离子源加热喷雾的过

程中存在这些活性物质被甲酯化的可能。去除这些干扰物质,采用过离子交换柱(MCX)、硅胶柱以及QuEChERS等方法,均未得满意的回收率。

低浓度的高锰酸钾、重铬酸钾以及过氧化氢等氧化剂能够氧化这些酸性的基团。过量的高锰酸钾、重铬酸钾的清除需要加入还原剂,导致实验步骤比较复杂。过氧化氢有氧化性,高温加热易于分解。通过正交试验,对处理的时间、温度、过氧化氢的用量进行了考察。实验数据显示:加热提取液挥发至3 mL左右不仅能够加速这种氧化效果,还可以将剩余的过氧化氢清除干净,不会对色谱柱和质谱产生损害,并且方法的回收率、精密度、检出限等参数均能满足相关的技术规范的要求。

本研究建立了茶叶中三甲基砷的液相色谱串联质谱的检测方法。采用了茶叶样品与氧化性提取液加热的预处理方法,消除了茶叶基质干扰。该方法具有良好的分离效果、线性关系,也具有理想的回收率和精密度。方法的检出限、定量限分别为4.00 $\mu\text{g/kg}$ 和10.0 $\mu\text{g/kg}$ 。筛查的茶叶中三甲基砷的含量均小于50 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法简便、快速、准确,适用于茶叶中三甲基砷的检测,为出口茶叶的质量安全的监测提供技术支持。

参考文献

- [1] PENNER D, MICHAEL J, BROWN W G. A novel water conditioning adjuvant for use with formulated and nonformulated glyphosate [J]. J ASTM Int, 2005, 2(4): 267-272.
- [2] Amending Annexes to Council Directive 90/642/EEC as regards the maximum residue levels of trifloxystrobin, thiabendazole, abamectin, benomyl, carbendazim, thiophanate-methyl, myclobutanyl, glyphosate, trimethylsulfonium, fenpropimorph and chlormequat (Commission directive 2006/60/CE of 27 July 2006) [S]. Brussels: European Union, 2006.
- [3] EU Pesticides Database [EB/OL]. [2018-02-07]. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=product.resultat&language=EN&selectedID=243>.
- [4] The IFOAM NORMS for organic production and processing version 2014 [EB/OL]. [2018-02-07]. https://www.ifoam.bio/sites/default/files/ifoam_norms_july_2014_t.pdf.
- [5] Guidelines for the production, processing, labeling and marketing of organically produced foods [EB/OL]. [2018-02-07]. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/it/>.
- [6] EU legislation on MRLs [EB/OL]. [2018-02-01]. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules_en.
- [7] 赵悦伶, 王冬梅, 沈程文. 中国茶叶出口欧盟市场影响因素的实证分析[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(24): 339-342.
- [8] 焦知岳, 赵凌云. 欧盟茶叶农药残留限量措施对中国茶叶出口的影响及对策[J]. 世界农业, 2015(6): 132-136.
- [9] 焦广霞, 肖颖. 欧盟茶叶限量标准对茶叶出口的影响及建议[J]. 农业开发与装备, 2016(9): 47.
- [10] Assigning values to non-detected/non-quantified pesticide residues in human health food exposure assessments [EB/OL]. [2018-02-01]. <https://archive.epa.gov/pesticides/trac/web/pdf/trac3b012.pdf>.
- [11] 宋碧君, 魏荣. 应用QuEChERS快速前处理检测茶叶中农药残留方法的研究[J]. 现代食品, 2017(4): 95-99.
- [12] 叶江雷, 金贵娥, 吴云辉, 等. QuEChERS法提取净化结合气-质联法快速检测茶叶中农药残留[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 265-271.
- [13] DIEZ C, BARRADO E, MARINERO P, et al. Study of different parameters affecting the derivatization of acidic herbicides with trimethylsulfonium hydroxide to make them suitable for gas chromatography analysis [J]. J Chromatogr A, 2006, 1125(2): 244-253.

(收稿日期: 2018-03-15; 录用日期: 2018-07-10)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 王晓宇)