

液相色谱-串联质谱法测定茶叶中二氰蒽醌残留量

刘 菡*

(江苏联合职业技术学院常州分院常州刘国钧高等职业技术学校本科部, 常州 213000)

摘要: 目的 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定茶叶中二氰蒽醌残留。**方法** 茶叶用乙腈(含0.1%甲酸)提取, 经固相萃取柱(HC-C₁₈ SPE)净化后采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行检测, 外标法定量。**结果** 目标化合物在一定范围内(0.391~12.5 μg/L)线性关系良好, 相关系数(r^2)大于0.995。样品中二氰蒽醌的定量限(limit of quantification, LOQ)和检出限(limit of detection, LOD)分别为10.0、5.00 μg/kg; 不同加标浓度样品10.0 μg/kg(LOQ)、20.0 μg/kg (2×LOQ)、50.0 μg/kg(5×LOQ)的平均回收率为84.1%~103%, 相对标准偏差(RSDs)为3.18%~4.62%。25份市售茶叶中均未检出二氰蒽醌。**结论** 该方法简便、快速, 准确。各项性能参数均能符合技术规范的要求, 已应用于市售茶叶的检测。

关键词: 液相色谱串联质谱仪; 二氰蒽醌; 茶叶

Determination of dicyanoanthraquinone residues in tea using liquid chromatography tandem mass spectrometry

LIU Han*

(Jiangsu Union Vocational Technical Institute Changzhou Branch: Changzhou Liuguojun Vocational Technology School
Department of Undergraduate, Changzhou 213000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of dicyanoanthraquinone residues in tea. **Methods** Dicyanoanthraquinone residue in tea was extracted with acetonitrile (containing 0.1% formic acid). After purification with HC-C₁₈ solid-phase extraction column, the analyte was tested by LC-MS/MS in multi-reaction monitoring model and quantified by external standard method. **Results** The linear relationship of the target compound was good in a certain range (0.391–12.5 μg/L), and the correlation coefficient (r^2) was greater than 0.995. The limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) of dicyanoanthraquinone in the sample were 10.0 and 5.00 μg/kg respectively. The average recoveries of 10.0 μg/kg (LOQ), 20.0 μg/kg (2×LOQ) and 50.0 μg/kg (5×LOQ) were 84.1%–103%, and the relative standard deviations (RSDs) were 3.18%–4.62%. Dicyanoanthraquinone was not detected in 25 commercial tea leaves. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate. All the performance parameters can meet the requirements of the technical specifications, and the method has been applied to the detection of commercial tea.

KEY WORDS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; dicyanoanthraquinone; tea

基金项目: 江苏省青蓝工程(苏教师 2019[3])

Fund: Supported by the "To be More Excellent Project of Jiangsu Province"(苏教师 2019[3])

*通讯作者: 刘菡, 讲师, 主要研究方向为生物健康与化学分析。E-mail: 15580960@qq.com

*Corresponding author: LIU Han, Lecturer, Jiangsu Union Vocational Technical Institute Changzhou Branch: Changzhou Liuguojun Vocational Technology School Department of Undergraduate, No.296, Fumin Road, Wujin District, Changzhou 213000, China. E-mail: 15580960@qq.com

1 引言

中国是世界最大的茶叶生产和贸易国,也是世界主要出口国。2019年,我国茶叶出口量达到了38.1万吨,比2018年增长0.94%;出口额为21.74亿美元,增长14.01%,占农产品出口总额的2.75%。但对欧盟的出口量和出口额均有小幅的下降^[1],其中农药残留超标是非常重要的原因^[2,3]。

二氰蒽醌(分子式 $C_{14}H_4N_2O_2S_2$, CAS: 3347-22-6, 分子结构式见图 1),属于蒽醌类的广谱杀菌剂,对酵母和细菌有良好的杀灭效果,在植物源性产品的种植领域得到了广泛的运用^[4]。

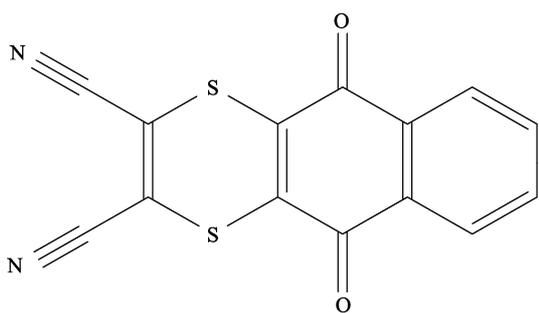


图 1 二氰蒽醌分子结构式

Fig.1 Molecular structure of dicyanoanthraquinone

国家标准 GB 2763-2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[5]对植物源性产品中二氰蒽醌残留设定了临时的限量,但是没有明确茶叶的限量要求,也未给出相应的测定方法。而欧盟规定二氰蒽醌在茶叶种植上是禁用的,其最大残留限量不得大于 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6,7]。目前,二氰蒽醌的测定方法包括液相色谱法^[8,9]、聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[10]、拉曼光谱法^[11]、液相色谱串联质谱法^[12]。拉曼光谱不适用痕量残留的鉴定;液相色谱、电泳法的灵敏度无法满足实际检测需求。液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测方法针对的是草莓样品,前处理的程序相对简单。但是茶叶的品种多样、色素含量高、基质复杂干扰大,需要建立新的方法用于茶叶中二氰蒽醌的测定。

本研究选择了生产工艺不同、样品基质干扰相差较大的绿茶、红茶、茉莉花茶作为考察对象,在优化样品提取、净化、质谱参数等条件后,建立了 LC-MS/MS 的测定方法并用于样品的筛查。以期为确保茶叶的质量安全,提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

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,美国热电公司]; XPE205 电子天平(瑞士梅特勒公司); Allegra X-30R 高速离心机(德国 Beckman 公司)。

乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司); 甲酸(分析纯,上海国药集团); 实验用水为 Milli-Q 高纯水(美国 Millipore 公司); N-丙基乙二胺固体粉末(PSA, 上海安谱公司); 石墨化炭黑(GCB, 深圳逗点公司); 亲水膜($0.22 \mu\text{m}$, 上海安谱公司); HC- C_{18} SPE 柱($500 \text{ mg } 6 \text{ mL}$, 上海安谱公司); 二氰蒽醌标准品(CAS 318-98-9)(纯度 98.7%, 德国 Dr.Ehrenstorfe GmbH 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

称取二氰蒽醌标准品 $12.5 \text{ mg}(\pm 0.1 \text{ mg})$ 于 250.0 mL 容量瓶中,加入 $100 \text{ mL } 0.1\%$ 甲酸乙腈手动振荡溶解,补加乙腈溶液定容于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。根据实验需要进行稀释配制标准工作曲线和加标。

2.2.2 制样

取 300 g 茶叶,用组织捣碎机充分打碎过 100 目筛子,取筛下物混合均匀备用。

2.2.3 样品的前处理

称取 $0.200 \text{ g}(\pm 1.0 \text{ mg})$ 样品于 50 mL 具塞离心管中,加入 $200 \mu\text{L}$ 去离子水涡旋 $1 \text{ min}^{[13]}$,静置 30 min 。加入 $20.0 \text{ mL } 0.1\%$ 甲酸乙腈涡旋 30 s 超声 25 min ;以 $10000 \text{ r}/\text{min}$ (离心半径 8 cm)速率离心 5 min ,分取 18.0 mL 上清液于 50 mL 离心管中氮吹至干(温度 $< 35 \text{ }^\circ\text{C}$)。加入 1.8 mL 乙腈超声复溶 1 min ,再加入 0.2 mL 去离子水涡旋 20 s ,待净化。

HC- C_{18} SPE 柱用 $2 \times 2 \text{ mL}$ 的乙腈/水溶液清洗(乙腈:水=9:1, V/V)。加入 2 mL 提取液过柱。用 4 mL 乙腈/水(乙腈:水=9:1, V/V)溶液洗清柱床,收集全部滤液氮吹至 $100 \mu\text{L}$ 左右(温度 $< 35 \text{ }^\circ\text{C}$),补加 0.1% 甲酸乙腈至 2.0 mL 刻度,超声 1 min 复溶,过亲水膜供 LC-MS/MS 测定。

2.2.4 液相色谱-串联质谱仪的条件

(1)液相色谱的条件

安捷伦 Eclipse Plus C_8 柱($150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$); 流动相 C: 乙腈,流动相 B: 乙酸铵($15 \text{ mmol}/\text{L}$),梯度洗脱(表 1)。流速 $0.35 \text{ mL}/\text{min}$; 进样量 $25 \mu\text{L}$; 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

(2)质谱条件

电喷雾离子源(ESI),负离子模式扫描;质谱扫描方式:多反应监控(MRM);喷雾电压 3000 V ;传输毛细管温度 $360 \text{ }^\circ\text{C}$;辅助气 $3 \text{ mL}/\text{min}$;壳气 $12 \text{ mL}/\text{min}$ 。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的优化

采用适当浓度的标准溶液在负离子模式下进行全扫描,可以观察到 2 个响应值较大的、峰高几乎相等的同位素离子峰,分别为 $295.9 \text{ m}/\text{z}$ 和 $296.9 \text{ m}/\text{z}$ 。经过二级离子的

优化, 采用 50.0 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液进样, 母离子为 295.9 m/z 的峰面积要高于 296.9 m/z 的面积, 因此选择 295.9 m/z 作为检测的母离子。质谱参数、保留时间见表 2。标准溶液的总离子流图和质谱见图 2。

表 1 色谱梯度洗脱条件
Table 1 Conditions of gradient elute

保留时间/min	流速/(mL/min)	流动相 B	流动相 C
0.0	0.35	95	5
1.0	0.35	95	5
1.5	0.35	90	10
2.0	0.35	90	10
2.5	0.35	70	30
3.0	0.35	70	30
3.5	0.35	50	50
4.0	0.35	50	50
4.5	0.35	2	98
8.0	0.35	2	98
8.2	0.35	95	5
11.0	0.35	95	5

3.2 样品提取和净化条件的优化

3.2.1 提取溶剂的选择

实验考察了乙腈、0.1%甲酸乙腈、甲醇、甲苯、三氯甲烷等溶剂的提取效率和基质干扰。甲苯、甲醇、三氯甲烷提取的色素较多, 经过 HC-C₁₈ SPE 柱净化后仍然会对待测组分的响应值产生抑制效应。乙腈、0.1%甲酸乙腈提取效率相似, 提取液经过净化后基质干扰小, 回收率、精密度等指标均能满足相关技术规范的要求。但鉴于二氰蒽醌可能的降解^[14], 采用了酸性的乙腈溶剂进行样品的提取。

3.2.2 提取液的净化

在条件实验中, 对农药残留分析常用的试剂 GCB 和 PSA 进行了净化效果的评估。分别取 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液 1.0 mL 分成 3 组: 一组加入 50 mg 的 GCB、一组加入 50 mg 的 PSA、剩下一组不加 PSA、GCB 进行测定。结果显示: GCB 对二氢蒽醌几乎是 100% 的吸附; PSA 的吸附率也超过了 90%(图 3)。经过综合测试, 提取液用 C₁₈ SPE 柱净化, 各项指标均能满足要求。

3.3 方法的线性范围、检出限和定量限

吸取 125 μL 标准溶液(100 $\mu\text{g/L}$)于 875 μL 0.1%甲酸乙腈溶液中涡旋 10 s。用 0.1%甲酸乙腈进行倍比稀释, 共计 6 个点: 0.391、0.780、1.56、3.12、6.25、12.5 $\mu\text{g/L}$ 。在线性范围内相关系数 r^2 大于 0.995(图 4)。

表 2 二氰蒽醌的质谱参数、保留时间
Table 2 Mass parameters, retention time of dicyanoanthraquinone

待测组分	保留时间/min	监测的离子对(m/z)	碰撞能量/ev
二氰蒽醌		295.9/264*	21
dicyanoanthraquinone	6.0	295.9/294.8	22

注: *定量离子。

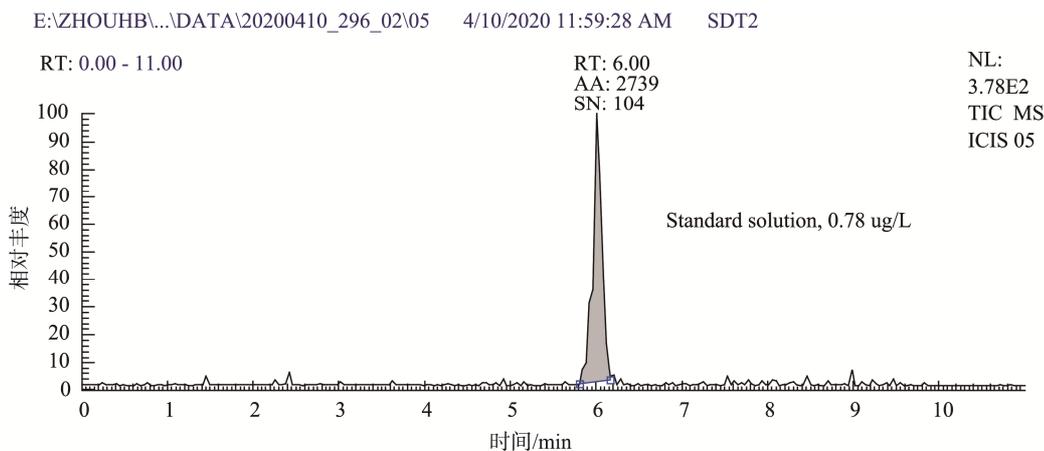


图 2 二氰蒽醌的总离子流图和质谱图(0.780 $\mu\text{g/L}$)
Fig.2 TIC and mass spectrum of dicyanoanthraquinone (0.780 $\mu\text{g/L}$)

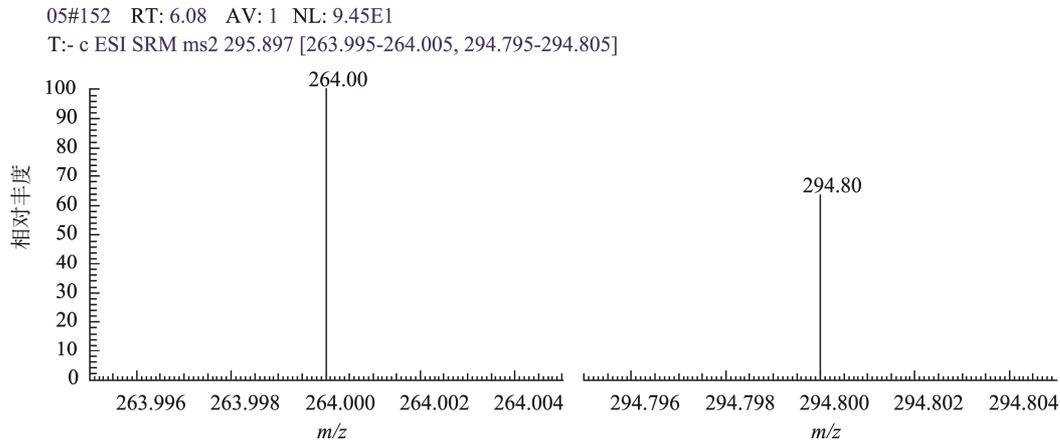
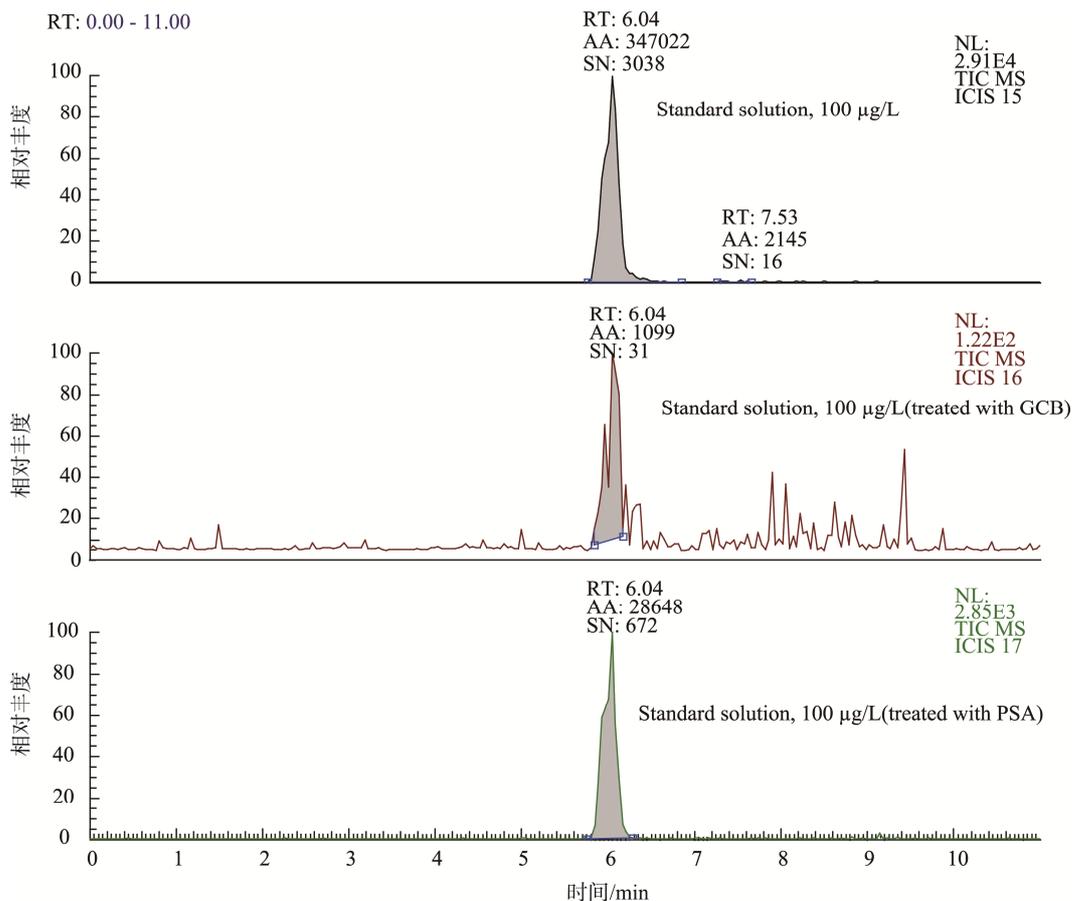
续图 2 二氰蒽醌的总离子流图和质谱图(0.780 $\mu\text{g/L}$)Fig.2 TIC and mass spectrum of dicyanoanthraquinone (0.780 $\mu\text{g/L}$)

图 3 GCB、PSA 对二氢蒽醌吸附率的比较

Fig.3 Comparison on the adsorption efficiency of GCB and PSA for dicyanoanthraquinone

参照美国环保署 (United States Environmental Protection Agency, EPA)^[15]的方法进行计算, 仪器的检出限和定量限分别为 0.20 $\mu\text{g/L}$ 和 0.60 $\mu\text{g/L}$ 。然后按照 8 $\mu\text{g/kg}$

的量用阴性样品进行加标, 以 7 次平行试验的标准偏差计算检测方法的检出限和定量限(见表 3)。测定方法的定量限 (LOQ)和检出限(LOD)分别为 10.0 $\mu\text{g/kg}$ 、5.00 $\mu\text{g/kg}$ 。

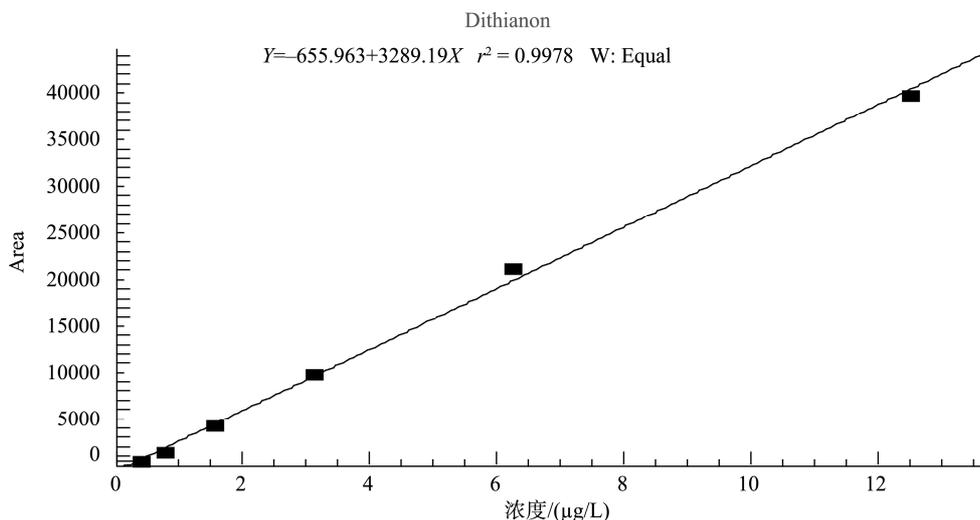


图 4 二氰蒽醌标准曲线图

Fig.4 Standard curve of dicyanoanthraquinone

表 3 线性关系、检出限和定量限

Table 3 Linear equation, LOD and LOQ

待测组分	线性范围/(µg/L)	回归方程	相关系数 r^2	检出限 LOD/(µg/kg)	定量限 LOQ/(µg/kg)
二氰蒽醌	0.391~12.5	$Y = 3.29 \times 10^3 X - 6.56 \times 10^2$	0.9978	5.00	10.0

注: Y: 峰面积; X: 浓度, µg/L。

3.4 实验的回收率和精密度

用阴性样品做加标回收实验, 添加水平: 10.0 µg/kg(LOQ)、20.0 µg/kg(2×LOQ)、50.0 µg/kg(5×LOQ),

每个加标水平测定 6 次, 方法的平均回收率为 84.1%~103%, 相对标准偏差(RSDs)为 3.18%~4.62%。空白样品、加标样品检测的总离子流见图 5、图 6。

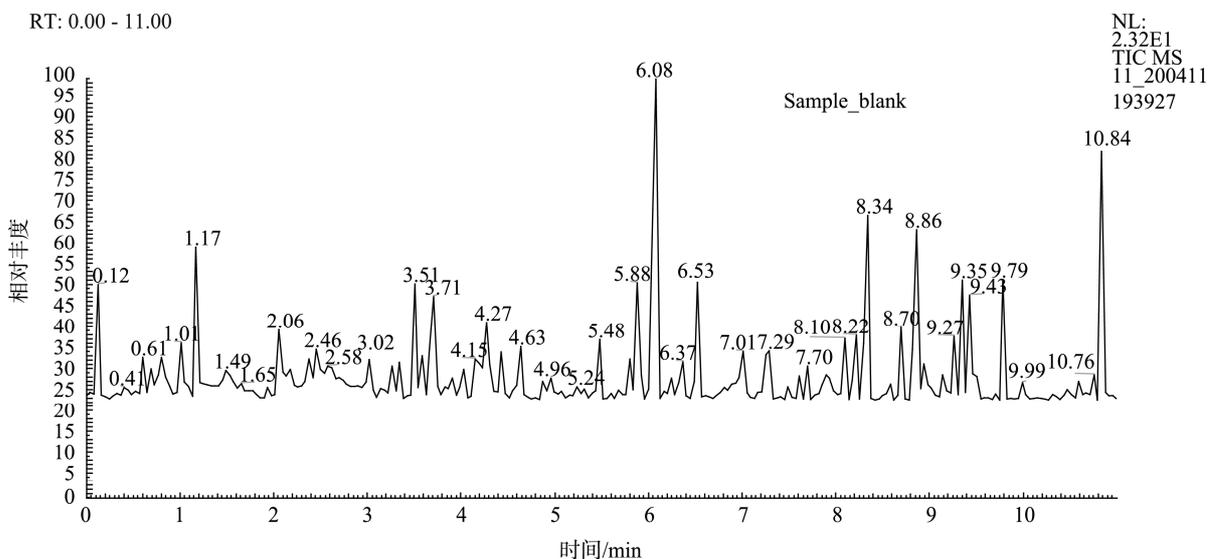


图 5 绿茶空白样品的总离子流图

Fig.5 TIC of green tea blank sample(control group)

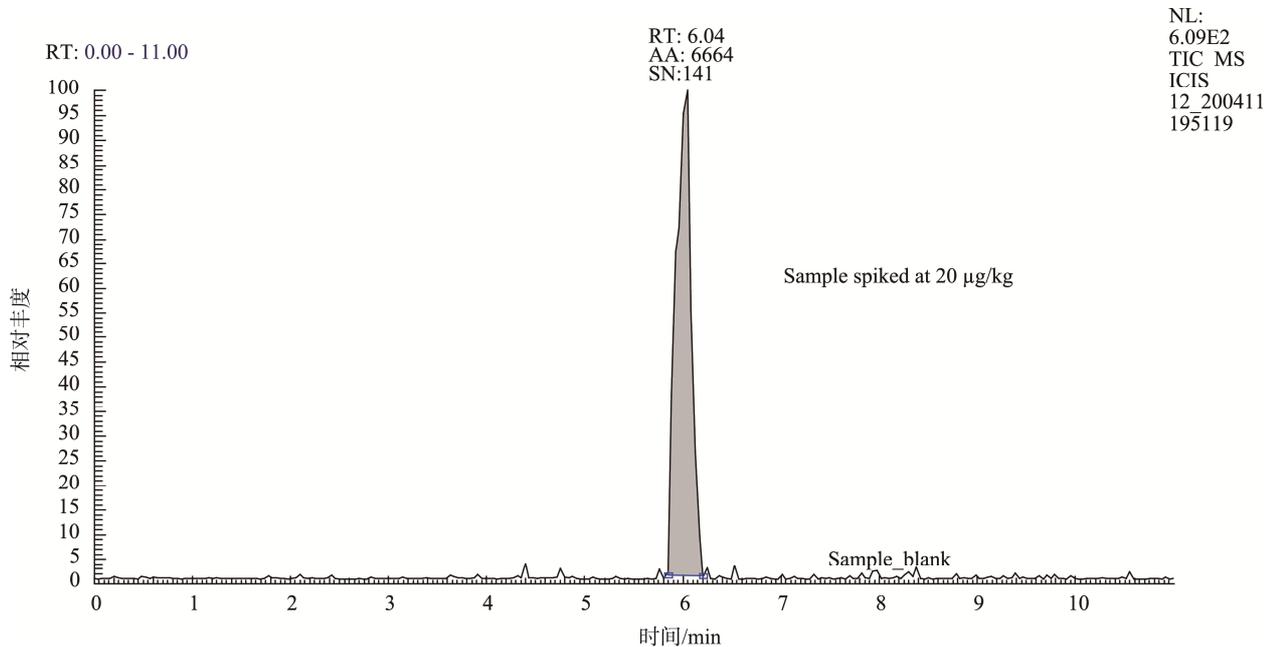


图 6 绿茶加标样品检测的总离子流图(加标浓度 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
Fig.6 TIC of green tea spiked samples(spiked at 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

3.5 样品的筛查

25 份从当地市场采购的绿茶、红茶、茉莉花茶中均未检出二氰蒽醌的残留。

4 结论

茶叶样品用乙腈(含 0.1%甲酸)提取并净化后,在优化质谱参数的基础上建立了 LC-MS/MS 检测茶叶中二氰蒽醌残留的测定方法,并应用于市售茶叶的筛查。25 份市售样品中均未检出二氰蒽醌的残留。该方法的建立为提高茶叶安全质量和防止禁用物质的使用,提供了检测方法的参考。

参考文献

- [1] 2019 年我国茶叶进出口贸易情况简析[EB/OL]. [2020-04-10]. https://www.sohu.com/a/382767816_239838.
Brief introduction of import and export tea trade of our country in 2019[EB/OL]. [2020-04-10]. https://www.sohu.com/a/382767816_239838.
- [2] 焦彦朝, 李至, 徐孟怀, 等. 国内外茶叶农药最大残留限量标准比较分析[J]. 四川理工学院学报(自然科学版), 2019, 32(3): 7-12.
Jiao YC, Li Z, Xu MH, *et al.* Comparative analysis of maximum pesticide residues levels in tea of domestic and overseas [J]. J Sichuan Univ Sci Eng (Nat Sci Ed), 2019, 32(3): 7-12.
- [3] 张菲, 杨芳琴. 欧洲茶叶市场及对中国茶叶出口的启示[J]. 中国茶叶, 2019, 2: 17-22.
Zhang F, Yang FQ. European tea market and enlightenment for export of Chinese tea [J]. Chin Tea, 2019, 2: 17-22.
- [4] Scariot FJ, Jahn L, Paula A, *et al.* Necrotic cell death induced by dithianon on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Pestic Biochem Physiol, 2018, (149): 137-142.
- [5] GB 2763-2019 中华人民共和国国家标准 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763-2019 National standard National food safety standard- Maximum residue limits for pesticides in food [S].
- [6] 欧盟关于农药残留限量的要求[EB/OL]. [2020-04-10]. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules_en
EU legislation on MRLs [EB/OL]. [2020-04-10]. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules_en.
- [7] 欧盟农药残留数据库[EB/OL]. [2020-04-10]. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=product.resultat&language=EN&selectedID=243>
EU pesticides database[EB/OL]. [2020-04-10]. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=product.resultat&language=EN&selectedID=243>.
- [8] 秦旭, 徐应明, 赵立杰, 等. QuEChERS 法前处理结合 HPLC 法测定苹果和土壤中二氰蒽醌的残留[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 273-277.
Qin X, Xu YM, Zhao LJ, *et al.* Determination and dissipation kinetics of dithianon residue in and soil by modified QuEChERS Coupled with HPLC [J]. Food Sci, 2017, 38(20): 273-277.
- [9] 马婧玮, 李萌, 张军峰, 等. 液相色谱法测定葡萄及柑橘中二氰蒽醌的残留量[J]. 现代农药, 2014, 13(3): 43-46.
Ma JW, Li M, Zhang JF, *et al.* Determination of dithianon residues in grape and citrus by liquid chromatography [J]. Mod Agrochem, 2014, 13(3): 43-46.
- [10] Wanner P, Burauel F, Fuèhr. Characterisation of soil-bound residue fractions of the fungicide dithianon by gel permeation chromatography

- and polyacrylamide gel electrophoresis [J]. Environ Poll, 2000, 108: 53-59.
- [11] 陈漾, 李攻科, 胡玉玲. 表面增强拉曼光谱法快速定量分析食品中福美双、二氰蒽醌和灭蝇胺的残留[J]. 分析科学学报, 2015, 31(3): 307-312.
Chen Y, Li GK, Hu YL. Rapid analysis of pesticide residues in food using surface-enhanced raman spectroscopy [J]. J Anal Sci, 2015, 31(3): 307-312.
- [12] 郝秀萍, 毕瑞峰. 液相色谱-串联质谱法测定草莓中二噻农残留[J]. 化学分析计量, 2014, 23(4): 48-50.
Hao XP, Bi RF. Determination of dithianon residue in strawberry by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chem Anal Meterage, 2014, 23(4): 48-50.
- [13] SANTE 2017/10632 欧盟关于残留分析方法提取效率的技术指南 [A].
SANTE 2017/10632 EU technical Guideline on the Evaluation of extraction efficiency of residue analytical methods [A].
- [14] EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides (Single residue methods) [A].
- [15] 美国环境保护署“关于对人类健康食品中农药残留残留暴露水平进行评估时, 未检出或者不可定量的物质予以赋值的规定”[A].
Assigning values to non detected/non-quantified pesticide residues in human health food exposure assessments [A].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

刘 茵, 讲师, 主要研究方向为生物健康与化学分析。
E-mail: 15580960@qq.com

“现代分析仪器在食品检测中的应用”专题征稿函

食品不仅是维持人体生命活动所必需的各种营养物质和能量的最主要来源, 而且以其色、香、味、质地及口感给人们以愉悦的感官享受。随着食品工业和食品科学技术的不断发展, 民众对食品品质和卫生要求也越来越高。因此, 对食品质量的控制与安全保障尤为重要, 而这在很大程度上依赖于先进的分析检测技术。现代仪器分析技术在生命科学、环境科学、材料科学等领域发挥着越来越重要的作用, 在食品科学和食品安全领域同样有着不可替代的重要作用。

鉴于此, 本刊特别策划了“现代分析仪器在食品检测中的应用”专题。本专题将围绕气相色谱、液相色谱、离子色谱、质谱、原子光谱、红外光谱、拉曼光谱、表面等离子共振等现代分析仪器在食品检测与质量安全控制领域的应用, 阐述现代仪器的原理、特点、适用范围、优势与局限性, 展示这些仪器技术在食品安全检测中的应用实例, 或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。本专题计划在 **2020 年 10 月出版**(学报为中国科技核心, 2019 年知网影响因子 1.201)。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 **2020 年 8 月 20 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**现代分析仪器在食品检测中的应用**):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: **现代分析仪器在食品检测中的应用**)

邮箱投稿: E-mail: jfoods@126.com(备注: **现代分析仪器在食品检测中的应用**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部