

# 气相色谱-四极杆/飞行时间质谱法同时测定茶叶中 10 种香料化合物

陈玉珍<sup>1,2</sup>, 梁志森<sup>1,2\*</sup>, 曾广丰<sup>3</sup>, 甘奕挺<sup>1,2</sup>

[1. 广州检验检测认证集团有限公司, 广州 511447; 2. 国家加工食品质量检验中心(广东), 广州 511447;  
3. 广州海关技术中心, 广州 510623]

**摘要:** **目的** 考察 3 种前处理方法的提取效果, 建立结合气相色谱-四极杆/飞行时间质谱法(gas chromatography-high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry, GC-Q-TOF/MS)同时测定茶叶中 10 种香料[1,8-桉叶素、(+)-异薄荷酮、胡椒酚甲醚、茴香烯、甲基丁香酚、反式肉桂醛、香豆素、樟脑、反式-甲基异丁香酚、顺式-甲基异丁香油酚]的分析方法。**方法** 样品经乙酸乙酯提取, 加入无水硫酸镁和氯化钠, 涡旋离心后取上清液过滤膜。采用 GC-Q-TOF/MS 仪, 目标化合物以全扫描模式测定, 以基质匹配标准曲线法进行定量。优化色谱及质谱条件后, 从操作步骤、加标回收率等方面考察 3 种前处理方法对目标化合物的提取效果。**结果** 直接提取法最为适用于同时提取茶叶中 10 种香料化合物。茴香烯在 10.0~1000.0  $\mu\text{g/L}$  范围内, 1,8-桉叶素和反式肉桂醛在 30.0~2000.0  $\mu\text{g/L}$  范围内, 其余 7 种香料化合物在 15.0~1000.0  $\mu\text{g/L}$  范围内呈良好线性关系, 相关系数  $r$  均大于 0.9991, 平均回收率为 85.3%~108.7%, 检出限为 0.03~0.10 mg/kg, 定量限为 0.10~0.30 mg/kg, 日内、日间精密密度 ( $n=6$ )分别小于 11%和 13%。**结论** 该方法准确、灵敏、回收率高, 适用于茶叶中 10 种香料的批量检测。

**关键词:** 气相色谱-四极杆/飞行时间质谱法; 茶叶; 香料

## Simultaneous determination of 10 kinds of fragrance compounds in tea by gas chromatography-high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry

CHEN Yu-Zhen<sup>1,2</sup>, LIANG Zhi-Sen<sup>1,2\*</sup>, ZENG Guang-Feng<sup>3</sup>, GAN Yi-Ting<sup>1,2</sup>

[1. *Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Company Limited, Guangzhou 511447, China*; 2. *National Quality Testing Center for Processed Food (Guangdong), Guangzhou 511447, China*; 3. *Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou 510623, China*]

**ABSTRACT: Objective** To investigate the extraction effects of 3 kinds of pretreatment methods, and establish a method for the simultaneous determination of 10 kinds of fragrance compounds [1,8-cineole, (+)-isomenthone, 4-allylanisole, trans-anethole, methyl eugenol, trans-cinnamaldehyde, coumarin, camphor, trans-methyl isoeugenol, cis-methyl isoeugenol] in tea by gas chromatography-high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry (GC-Q-TOF/MS). **Methods** The samples were extracted with ethyl acetate, following which anhydrous magnesium

基金项目: 广州市市场监督管理局科技项目(2020kj46)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of Guangzhou Market Supervision Administration (2020kj46)

\*通信作者: 梁志森, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品分析与检测技术。E-mail: 522794556@qq.com

\*Corresponding author: LIANG Zhi-Sen, Ph.D, Engineer, Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Company Limited, Guangzhou 511447, China. E-mail: 522794556@qq.com

sulfate and sodium chloride were added to the extracting solution, after vortex and centrifugation, the supernatant was filtered over a membrane. The target compounds were determined in full scan mode by using GC-Q-TOF/MS, quantified by matrix-matched standard curve method. After the chromatographic and mass spectrometric conditions were optimized, the extraction effects of 3 kinds of pretreatment methods on the target flavorings were investigated from the aspects of operation steps and spiked recovery rates. **Results** Direct extraction method was most suitable for the simultaneous determination of 10 kinds of fragrance compounds in tea. In the range of 10.0–1000.0  $\mu\text{g/L}$ , 30.0–2000.0  $\mu\text{g/L}$  and 15.0–1000.0  $\mu\text{g/L}$ , trans-anethole, 1,8-cineole and trans-cinnamaldehyde, as well as other 7 target flavorings had good relationships, respectively, the correlation coefficients were more than 0.9991, and the average recoveries were 85.3% to 108.7%. Further, the limits of detection were 0.03–0.10 mg/kg, the limits of quantification were 0.10–0.30 mg/kg, and the intra-day and inter-day relative standard deviations ( $n=6$ ) were less than 11% and 13%, respectively. **Conclusion** This method is accurate, sensitive with high recovery rate, it is suitable for the batch detection of 10 kinds of fragrance compounds in tea.

**KEY WORDS:** gas chromatography-high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry; tea; flavorings

## 0 引言

茶叶市场商机巨大,在利益的驱动下,不法商家将香料添加至茶叶中,以增加干茶和茶汤的香韵,出现以假乱真的现象。香料大多具有怡人的气息,1,8-桉叶素具有清凉香气<sup>[1]</sup>;胡椒酚甲醚、茴香烯带甜味呈似茴香香气;香豆素带有甜味、类似香草种子气味,带有苦味,稀释后有坚果的味道<sup>[2]</sup>;甲基丁香酚呈丁香气味,有茶样的温和辛香味;樟脑呈芳香气味<sup>[3]</sup>;反式肉桂醛来自于肉桂树皮中的提取物<sup>[4]</sup>,呈强烈的肉桂气味。这类化合物因其香气被广泛用作于香料。然而,据研究香豆素可能会致癌,甲基丁香酚有一定程度的遗传毒性、肝脏毒性和细胞毒性<sup>[5-9]</sup>。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)对可添加在食品中的香料做出了明确限定<sup>[10-11]</sup>,而且 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》“不得添加食品用香料、香精的食品名单”中有茶叶。因此香精香料非法添加至茶叶的问题需要引起关注。

食品中香料化合物含量较低、沸点低,不同香料化合物有性质差异,因此样品的前处理技术是影响食品中多种香料化合物同时检测的关键。近年来,应用于香料化合物分析的前处理方法众多<sup>[12]</sup>。QuEChERS法(quick、easy、cheap、effective、rugged、safe)由于其操作简单、快速、成本低廉,已在食品中多种香精香料物质的检测得到应用<sup>[11,13-15]</sup>。而固相萃取法能有效去除干扰物<sup>[15-16]</sup>,处理基质复杂的食品基体时得到广泛使用。直接提取法无需经过吸附净化步骤,操作最为简便,能实现多种不同性质化合物同时提取<sup>[17]</sup>,但需要考虑基质效应的影响。为了更有效地对茶叶中非法添加香精香料进行监管,筛选出通用、高效、操作简便的前处理方法显得尤为重要,但鲜有针对测定茶叶中多种香料化合物的前处理方法进行对比的研究报道。

目前,高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[18]</sup>和超高效液相色谱-串联质谱法

(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)能用于食品基质中香料化合物的测定。采用 UPLC-MS/MS 能对茶叶中 7 种香料同时进行快速检测,但液相色谱法对易挥发的香料成分分离效果不佳<sup>[19]</sup>。气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)是香料化合物的主流分析方法<sup>[11,20-21]</sup>。大部分香料化合物的挥发性较强,GC-MS 和 GC-MS/MS 法更适用于这类化合物的定性定量检测<sup>[12,22-24]</sup>。但由于食品基质复杂、香料化合物痕量且种类多,而高分辨质谱法特异性强、检出限低、灵敏度高,相比于 GC-MS 和 GC-MS/MS 更能避免样品假阳性,对于含有干扰挥发物的高度复杂基质样品也能获得准确的定性定量分析检测结果,而且能辨别同分异构体。

本研究从操作步骤、加标回收率、基质效应等多个角度考察了 QuEChERS 法、固相萃取法和直接提取法 3 种常用前处理方法对茶叶中多种香料化合物提取效果的影响,配合气相色谱-四极杆/飞行时间质谱法(gas chromatography-high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry, GC-Q-TOF/MS)进行茶叶中 10 种香料化合物的检测分析,为香精香料非法添加至茶叶的检测提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

茶叶(广州市售); Florisil 固相萃取柱(6 mL, 500 mg)、石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)固相吸附剂(120~400  $\mu\text{m}$ )(德国 CNW Technologies GmbH 公司); N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)固相吸附剂(40~60  $\mu\text{m}$ )、碳十八( $\text{C}_{18}$ )固相吸附剂(50  $\mu\text{m}$ )、1,8-桉叶素、甲基丁香酚、樟脑标准品(纯度大于 99%)(上海安谱科技仪器有限公司); 乙酸乙酯、二氯甲烷、乙腈(色谱纯,德国默克公司); 氯化钠、无水硫酸钠、无水硫酸镁(分析纯,广州

化学试剂厂); 胡椒酚甲醚、香豆素标准品(纯度大于 99%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); (+)-异薄荷酮、茴香烯、反式肉桂醛、反式-甲基异丁香酚、顺式-甲基异丁香油酚标准品(纯度大于 99%, 中国上海源叶生物科技有限公司)。

## 1.2 仪器与设备

Agilent 7890B-7200B 气相色谱-四极杆/飞行时间质谱仪(美国安捷伦公司); MS3 basic 旋涡混合器、HS260 basic 往复振荡摇床(德国 IKA 公司); Milli-Q Gradient 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 3K15 高速离心机(德国 Sigma 公司); XPE 304 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ3200DE 型数控超声波清洗器(中国昆山市超声仪器有限公司); DB-5MS 毛细管柱(250  $\mu\text{m}$ ×30 m, 0.25  $\mu\text{m}$ )(美国安捷伦公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 标准溶液配制

标准储备液的配制: 准确称取 10 种目标物标准品 0.1 g(精确至 0.0001 g), 分别置于 100 mL 容量瓶中, 用乙酸乙酯配制成 1000 mg/L 的标准储备液。

溶剂标准系列溶液的配制: 将 10 种目标物的标准储备液按比例用乙酸乙酯稀释成混合标准系列溶液, 质量浓度范围为 10.0~2000.0  $\mu\text{g/L}$ 。

### 1.3.2 样品前处理

#### (1) 采样和样品制备

在广州市内, 购买 20 份市售茶叶样品, 粉碎后过 300 目筛, 混合均匀后四分法缩减至 200 g, 储于样品袋密封, 避光, 备用。

#### (2) QuEChERS 法

准确称取茶叶样品 1 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙酸乙酯, 涡旋振荡 1 min, 8000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 取 1 mL 上清液至 15 mL 离心管中, 依次加入 40 mg PSA、40 mg  $\text{C}_{18}$ 、20 mg GCB 和 120 mg 无水硫酸镁, 涡旋振荡 1 min, 8000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜, 供 GC-Q-TOF/MS 分析。

### (3) 固相萃取法

准确称取茶叶样品 1 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 0.5 g 氯化钠、15 mL 二氯甲烷-乙腈(1:1, V:V)溶液, 涡旋振荡 3 min, 超声 15 min, 8000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 转移上清液至另一离心管中, 再加入 15 mL 二氯甲烷-乙腈(1:1, V:V)溶液, 重复上述提取、离心过程, 合并两次上清液。称取 1.0 g 无水硫酸钠装载至 Florisil 柱中, 转移样液至 Florisil 柱, 待样液完全通过后, 加入 5 mL 乙腈淋洗, 收集全部流出液于 45  $^{\circ}\text{C}$  氮吹至近干, 并用乙酸乙酯定容至 10 mL, 涡旋 1 min, 将净化液通过 0.22  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜, 供 GC-Q-TOF/MS 分析。

### (4) 直接提取法

准确称取茶叶样品 1 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙酸乙酯, 混匀, 室温下充分振荡 3 min, 加入 0.5 g 无水硫酸镁, 0.5 g 氯化钠, 涡旋 1 min, 3000 r/min, 离心 5 min, 4000 r/min, 取适量上清液通过 0.22  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜, 供 GC-Q-TOF/MS 分析。

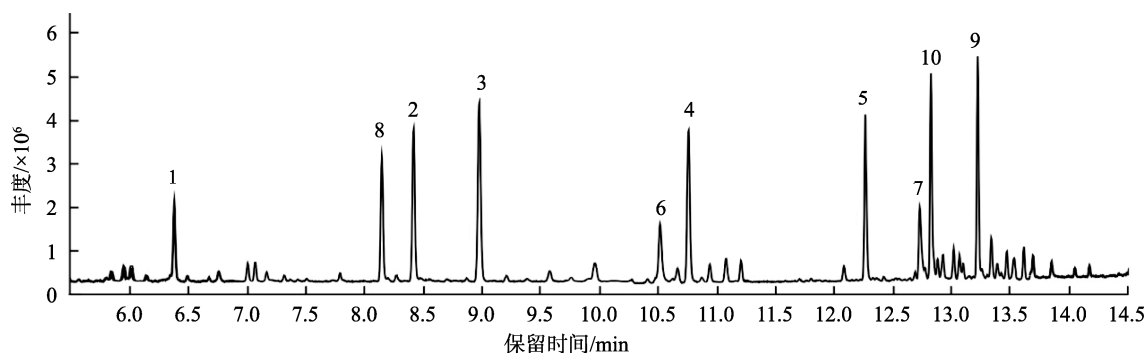
### 1.3.3 基质标准曲线的制备

分别称取不含目标物的空白茶叶样品 1 g(精确至 0.01 g), 按照 1.3.2 节的方法进行预处理。分别用 1.3.2 节中(2)、(3)、(4)制得的基质提取液, 将 10 种目标物的标准储备液按比例稀释成系列混合标准溶液, 浓度同溶剂标准系列溶液。

### 1.3.4 分析条件

色谱条件: DB-5MS 毛细管柱(250  $\mu\text{m}$ ×30 m, 0.25  $\mu\text{m}$ ); 色谱升温程序: 40  $^{\circ}\text{C}$  (2 min), 以 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 220  $^{\circ}\text{C}$  (2 min), 再以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 250  $^{\circ}\text{C}$  (5 min); 进样口温度: 280  $^{\circ}\text{C}$ ; 载气 He, 流速 1.5 mL/min, 进样量 1.0  $\mu\text{L}$ , 不分流进样。

质谱条件: 电离源为电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)源, 离子温度: 230  $^{\circ}\text{C}$ ; 接口温度: 280  $^{\circ}\text{C}$ ; 电子轰击电离源 70 eV; 溶剂延迟 5 min。工作模式: 全扫描; 扫描范围:  $m/z$  35~400 amu; 采集速率: 5 spect/s; 10 种香料化合物的标准溶液总离子流色谱图见图 1, 各化合物质量浓度均为 500  $\mu\text{g/L}$ 。



注: 1. 1,8-桉叶素; 2. (+)-异薄荷酮; 3. 胡椒酚甲醚; 4. 茴香烯; 5. 甲基丁香酚; 6. 反式肉桂醛; 7. 香豆素; 8. 樟脑; 9. 反式-甲基异丁香酚; 10. 顺式-甲基异丁香油酚。

图 1 10 种香料的标准溶液总离子流色谱图

Fig.1 Total ion chromatogram of standard solution for 10 kinds of flavorings

### 1.3.5 数据处理

测量数据使用 origin 6.0 进行数据处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 GC-Q-TOF/MS 分析方法的建立

对 10 种香料在 TOF 全扫描模式下进行采集, 得到每种香料的全扫描质谱图, 建立 TOF 全扫描精确质量数的数据库, 再结合各个物质的保留时间进行定性分析。从每种香料物质中选择 2 个碎片离子的精确质量数, 建立 TOF 的定量方法, 10 种香料物质的碎片离子的精确质量数和保留时间信息见表 1。

### 2.2 3 种样品前处理方法操作步骤对比

从操作步骤来看, QuEChERS 法经过提取、分散净化剂净化, 每个样品的前处理时间约为 15 min。固相萃取法经过提取、Florisil 柱净化、氮吹和复溶, 每个样品的前处理时间约为 100 min。直接提取法仅经过样品提取, 每个样品的前处理时间约为 10 min。QuEChERS 法和固相萃取法多了净化步骤。固相萃取法使用溶剂用量较大, 需要氮吹浓缩样品液, 操作步骤更加烦琐。因此, 3 种前处理方法中直接提取法操作最为简单快捷、成本低, 但可能存在样品提取液基质复杂, 需要进一步研究。

### 2.3 3 种方法的加标回收率实验

选取不含 10 种目标香料化合物的茶叶样品进行加标和重复性实验, 样品基质中添加 3 个不同浓度水平(1、2、4 倍定量限)的香料化合物, 以基质匹配标准曲线法进行定量, 每个水平做 3 次平行, 放置 120 min, 使目标物与样品基质充分作用, 按照 1.3.2 节中 3 种前处理方法进行操作, 其加标回收率见表 2。

在茶叶基质中, 3 个浓度水平 3 次重复测定实验的相对标准偏差为 4.1%~10.9%, 符合方法学要求。从表 2 中可以

看出, 经过 QuEChERS 法前处理, 3 个加标水平均未检出目标物反式肉桂醛, 其他目标化合物的回收率在 60.0%~113.2%之间。经过固相萃取法前处理, 3 个加标水平均未检出目标物 1,8-桉叶素、(+)-异薄荷酮、樟脑, 胡椒酚甲醚、茴香烯、甲基丁香酚、反式-甲基异丁香酚、顺式-甲基异丁香油酚 5 种目标化合物在添加 1 倍定量限的加标样品中未检测出目标物, 其他目标化合物的回收率在 17.2%~82.0%之间。经过直接提取法前处理, 10 种香料目标化合物回收率为 87.0%~107.5%。可见, 在加标实验中, QuEChERS 法无法提取反式肉桂醛, 固相萃取法仅能有效提取反式肉桂醛和香豆素 2 种目标物。本研究中 QuEChERS 法用乙酸乙酯作为提取剂萃取样品中的香料化合物, PSA、C<sub>18</sub>、GCB 和无水硫酸镁作为吸附剂净化萃取液。其中 C<sub>18</sub> 和 GCB 可以去除生育酚、有机酸、色素等干扰物<sup>[18]</sup>。反式肉桂醛为平面结构化合物, 可能被 GCB 等净化剂吸附。固相萃取法用提取剂反复萃取样品中的香料化合物, 经过 Florisil 固相萃取柱净化、氮吹、复溶, Florisil 固相萃取柱能吸附极性干扰物<sup>[16]</sup>, 1,8-桉叶素、(+)-异薄荷酮等极性物质可能被 Florisil 固相萃取柱吸附。樟脑等具有挥发性的香料化合物在氮吹过程中容易损失<sup>[25]</sup>。因此, 3 种前处理方式, 直接提取法能同时提取 10 种目标物, 其提取效果最好。

### 2.4 基质效应

基质对目标物分析有干扰, 并影响分析结果的准确性, 因此有必要考察基质效应。按 1.3.1 节方法得到溶剂标准系列溶液, 按照 1.3.3 节方法得到基质标准系列溶液, 分别绘制标准曲线。10 种香料化合物按照表 1 的精确分子量提取定量离子, 结合碎片离子的精确分子量、有机物的同位素峰丰度关系以及保留时间进行测定。以 10 种目标物的基质曲线的斜率与溶剂曲线斜率之比来确定基质效应(matrix effect, ME)<sup>[19]</sup>, 计算公式见式(1)。直接提取法的基质效应结果见表 3。

表 1 10 种香料的定性定量分析数据  
Table 1 Qualitative and quantitative data for 10 kinds of flavorings

化合物	CAS 号	保留时间/min	定量离子( <i>m/z</i> )	定量离子-1 ( <i>m/z</i> )	定量离子-2 ( <i>m/z</i> )
1,8-桉叶素	470-82-6	6.386	154.1323	93.0667	139.1088
(+)-异薄荷酮	1196-31-2	8.420	154.1323	112.0848	97.0612
胡椒酚甲醚	140-67-0	8.980	148.0848	71.0826	117.0661
茴香烯	4180-23-8	10.762	148.0851	117.0666	77.0355
甲基丁香酚	93-15-2	12.266	178.0962	71.0825	147.0775
反式肉桂醛	14371-10-9	10.520	131.0457	103.0503	51.0207
香豆素	91-64-5	12.730	146.0333	118.0379	89.0354
樟脑	76-22-2	8.148	152.1164	95.0824	81.0668
反式-甲基异丁香酚	6379-72-2	13.222	178.0964	107.0461	163.0727
顺式-甲基异丁香油酚	6380-24-1	12.822	178.0966	107.0461	91.0515

表 2 茶叶中 10 种香料化合物的加标回收率和相对标准偏差( $n=3$ )  
Table 2 Recoveries and relative standard deviations of 10 kinds of flavorings in tea ( $n=3$ )

化合物	QuEChERS 法平均回收率/%			固相萃取法平均回收率/%			直接提取法平均回收率/%		
	水平 1	水平 2	水平 3	水平 1	水平 2	水平 3	水平 1	水平 2	水平 3
1,8-桉叶素	104.0±5.9	113.2±5.1	91.8±4.8	/	/	/	101.4±6.4	102.6±5.1	104.2±4.9
(+)-异薄荷酮	77.3±9.1	97.0±7.3	93.5±5.6	/	/	/	89.3±8.5	103.5±5.2	101.7±4.1
胡椒酚甲醚	80.7±9.4	88.0±8.5	87.3±7.6	/	22.3±10.1	17.2±9.4	105.4±10.2	104.9±8.1	100.9±6.3
茴香烯	96.0±8.2	106.0±6.4	105.3±5.9	/	46.5±9.2	43.8±9.8	87.0±9.3	104.3±8.2	105.8±5.4
甲基丁香酚	67.3±8.9	97.3±8.0	86.8±7.1	/	67.7±9.7	68.2±8.6	105.9±8.5	103.7±8.2	94.7±6.2
反式肉桂醛	/	/	/	40.4±10.9	50.6±8.3	50.1±6.7	103.8±10.3	102.9±7.8	102.8±5.5
香豆素	74.0±8.9	74.3±8.4	92.7±6.8	82.0±9.1	63.0±7.2	74.8±6.8	93.2±8.6	103.1±6.3	105.3±4.7
樟脑	70.0±8.7	74.3±9.1	81.5±6.5	/	/	/	88.2±8.7	106.4±7.6	99.7±4.4
反式-甲基异丁香酚	60.0±7.9	80.3±6.3	85.0±5.4	/	60.3±6.9	63.8±6.2	104.1±9.8	102.4±7.5	103.9±6.3
顺式-甲基异丁香油酚	68.7±10.5	90.3±8.1	92.2±4.3	/	70.7±9.8	72.0±8.1	100.6±10.2	107.5±7.4	103.6±5.6

注: /表示测定值小于定量限。

$$ME=(S_s/S_m-1)\times 100\% \quad (1)$$

其中,  $S_s$  为基质曲线的斜率,  $S_m$  为溶剂曲线的斜率。当  $-50\% < ME < 50\%$  时, 基质效应不明显, 当  $ME < -50\%$  或  $ME > 50\%$  时, 基质效应明显。从表 3 可见, 使用直接提取法提取后, 只有(+)-异薄荷酮表现出明显的基质效应。胡椒酚甲醚、甲基丁香酚、香豆素、反式-甲基异丁香酚和顺式-甲基异丁香油酚 5 种目标物的 ME 值在  $-41.7\% \sim -48.3\%$ , 也表现出一定的基质效应。为了保证分析结果的准确性, 本研究采用基质标准系列溶液对 10 种目标化合物进行定量分析。

## 2.5 线性关系、检出限与定量限

按 1.3.2 (4)和 1.3.3 节制备基质标准系列溶液, 在最优的色谱、质谱条件下对 10 种目标物的系列基质标准溶液进行测定, 以峰面积为纵坐标( $Y$ ), 相应的质量浓度为横坐标( $X$ ,  $\mu\text{g/L}$ ), 绘制工作曲线并得到相应的线性回归方程, 相关系数( $r$ )均大于 0.9991, 表明 10 种目标物在浓

度范围内呈良好的线性。实验分别以 3 倍信噪比( $S/M$ )、10 倍信噪比响应时所对应的浓度为相应目标物方法的检出限(limits of detection, LODs)和定量限(limits of quantity, LOQs)。LODs 在 0.03~0.10 mg/kg 范围内, LOQs 在 0.10~0.30 mg/kg 范围内, 详细结果见表 3, 表明本方法具有较高的灵敏度。

## 2.6 回收率与精密度

以空白茶叶为样品, 采用直接提取法进行前处理, 添加 3 个不同浓度水平的混合标准溶液进行加标回收实验, 每个添加水平平行测定 6 次, 计算平均回收率。日内、日间精密度实验分别在同一天和连续 3 d 进行 6 次平行测定。10 种目标物的平均回收率为 85.3%~108.7%, 日内、日间精密度(相对标准偏差)分别小于 11%和 13%, 实验结果表明, 应用该方法测定 10 种目标物获得的回收率较高且较稳定, 详细结果见表 4。

表 3 茶叶基质中方法的线性方程、相关系数( $r$ )、基质效应、检出限和定量限  
Table 3 Linear equations, correlation coefficients, MEs, LODs and LOQs in tea matrix

化合物	浓度范围/ $(\mu\text{g/L})$	标准曲线	相关系数( $r$ )	ME/%	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
1,8-桉叶素	30~2000	$Y=76.382419X+1065.658925$	0.9996	-26.4	0.10	0.30
(+)-异薄荷酮	15~1000	$Y=343.903146X+2099.279592$	0.9997	-75.3	0.05	0.15
胡椒酚甲醚	15~1000	$Y=478.426032X+5742.935647$	0.9998	-46.7	0.05	0.15
茴香烯	10~1000	$Y=598.571470X+5318.821501$	0.9994	-37.3	0.03	0.10
甲基丁香酚	15~1000	$Y=333.157615X+2535.710274$	0.9998	-48.3	0.05	0.15
反式肉桂醛	30~2000	$Y=506.661145X-5689.356851$	0.9997	-35.7	0.10	0.30
香豆素	15~1000	$Y=330.855140X-3286.304356$	0.9995	-41.7	0.05	0.15
樟脑	15~1000	$Y=386.439651X+1470.853821$	0.9991	-38.9	0.05	0.15
反式-甲基异丁香酚	15~1000	$Y=482.071817X+8994.234950$	0.9997	-45.0	0.05	0.15
顺式-甲基异丁香油酚	15~1000	$Y=460.032354X-2573.496532$	0.9999	-42.1	0.05	0.15

表4 10种待测物的回收率、日内和日间精密度内(n=6)  
Table 4 Recoveries, intra-day and intra-day precision of the 10 kinds of analytes (n=6)

化合物	添加水平/( $\mu\text{g/L}$ )			平均回收率/%			日内精密度/%			日间精密度/%		
	水平1	水平2	水平3	水平1	水平2	水平3	水平1	水平2	水平3	水平1	水平2	水平3
1,8-桉叶素	30.0	60.0	120.0	103.7	105.3	101.8	6.4	5.1	4.9	11.3	9.1	6.8
(+)-异薄荷酮	15.0	30.0	60.0	85.3	106.3	103.8	8.5	5.2	4.1	12.1	8.3	6.5
胡椒酚甲醚	15.0	30.0	60.0	104.7	107.7	102.0	10.2	8.1	6.3	10.4	8.7	4.8
茴香烯	10.0	20.0	40.0	89.0	102.0	104.3	9.3	8.2	5.4	12.7	10.4	7.1
甲基丁香酚	15.0	30.0	60.0	107.3	105.0	96.0	8.5	8.2	6.2	11.3	9.7	7.6
反式肉桂醛	30.0	60.0	120.0	105.2	103.8	105.1	10.3	7.8	5.5	8.2	7.3	5.8
香豆素	15.0	30.0	60.0	91.3	101.0	107.3	8.6	6.3	4.7	8.5	6.3	5.7
樟脑	15.0	30.0	60.0	87.3	108.7	99.2	8.7	7.6	4.4	10.1	8.2	5.3
反式-甲基异丁香酚	15.0	30.0	60.0	103.3	101.7	103.7	9.8	7.5	6.3	11.2	8.6	6.8
顺式-甲基异丁香油酚	15.0	30.0	60.0	101.3	106.0	101.5	10.2	7.4	5.6	12.0	9.3	7.1

## 2.7 实际样品测定

应用直接提取法对 20 份青茶样品进行前处理, 并采用 GC-Q-TOF/MS 仪进行分析检测, 其中 1 份有检出, 香豆素最高检出值为 2.1 mg/kg, 其余 9 种物质未有检出。香豆素有可能是茶叶样品中的内源性天然成分, 有必要对其来源开展进一步研究<sup>[26]</sup>。

## 3 结论与讨论

本研究对比了 QuEChERS 法、固相萃取法以及直接提取法 3 种前处理提取、净化手段, 建立了气相色谱-四极杆/飞行时间质谱法同时测定茶叶中 10 种可能非法添加香料化合物的分析方法。其中, 只有直接提取法能够实现 10 种香料化合物的同时高效提取, 而且检测结果稳定, 操作过程简便、回收率高、使用试剂少、耗时短。在优化后的仪器条件下, 结合 GC-Q-TOF/MS 精确测定分子量, 10 种目标物均有良好的分离度。日后将从优化色谱质谱条件、使用同位素内标物等方面改善(+)-异薄荷酮在茶叶基质中的基质效应, 使本检测方法更加简便有效。本研究所建立的检测方法具有灵敏度高、重现性好等优点, 可以为茶叶中 10 种香料物质的快速检测提供技术支持。

## 参考文献

- [1] 孔庆龙, 荆雯, 杨云程, 等. 硬糖类产品中桉叶素的含量测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(3): 919-924.  
KONG QL, JING W, YANG YC, *et al.* Determination of the content of cineole in hard candy [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(3): 919-924.
- [2] BURDOCK GA. Fenaroli's handbook of flavor ingredients 6th ed [M]. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- [3] LEWIS RJ. Sax's dangerous properties of industrial materials 11th ed [M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2004.
- [4] 石超, 郭都, 张文婷, 等. 反式肉桂醛与温和加热结合对复原婴幼儿牛乳中阪崎克罗诺杆菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2018, 39(7): 107-112.  
SHI C, GUO D, ZHANG WT, *et al.* Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde treatment coupled with mild heating [J]. *Food Sci*, 2018, 39(7): 107-112.
- [5] BERGAU N, HERFURTH UM, SACHSE B, *et al.* Bioactivation of estragole and anethole leads to common adducts in DNA and hemoglobin [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112253.
- [6] HSIEH CYJ, SUN M, OSBORNE G, *et al.* Cancer hazard identification integrating human variability: The case of coumarin [J]. *Int J Toxicol*, 2019, 38(6): 501-552.
- [7] YAO HN, PENG Y, ZHENG J. Identification of glutathione and related cysteine conjugates derived from reactive metabolites of methyleugenol in rats [J]. *Chem-Biol Interact*, 2016, 253: 143-152.
- [8] 郭鹏杰, 林志健, 张晓朦, 等. 香豆素类化合物毒理研究及安全性思考[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 518-522.  
GUO PJ, LIN ZJ, ZHANG XM, *et al.* Toxicological research and safety consideration of coumarins [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(3): 518-522.
- [9] 李英超, 谢小倩, 王梦真, 等. 甲基丁香酚药理及毒理作用的研究进展[J]. 中南药学, 2018, 16(9): 1249-1253.  
LI YC, XIE XQ, WANG MZ, *et al.* Research progress in pharmacological effect and toxicology of methyleugenol [J]. *Cent South Pharm*, 2018, 16(9): 1249-1253.
- [10] NONE. Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements [J]. *EFSA J*, 2012, 10(5): 2663.
- [11] 王玉娇, 刘通, 邓亚美, 等. QuEChERS-气相色谱-串联质谱法快速检测茶叶中 6 种禁用香精成分[J]. 色谱, 2019, 37(7): 766-772.  
WANG YJ, LIU T, DENG YM, *et al.* Rapid determination of six banned fragrance components in tea by QuEChERS-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(7): 766-772.
- [12] 王玉娇, 邓伟, 刘通, 等. 食品中香料香精分析方法研究进展[J]. 食品

- 安全质量检测学报, 2019, 10(2): 400–406.
- WANG YJ, DENG W, LIU T, *et al.* Research progress of detection techniques for food flavors and fragrances [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(2): 400–406.
- [13] XING L, ZOU L, LUO R, *et al.* Determination of five *Alternaria* toxins in wolfberry using modified QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2020, 311: 125975.
- [14] HUANG Y, SHI T, LUO X, *et al.* Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2019, 275: 255–264.
- [15] 周思, 邓龙, 杜伟锋, 等. 固相萃取-气相色谱-质谱法测定植物饮料中的 9 种植物毒素[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(3): 311–316.
- ZHOU S, DENG L, DU WF, *et al.* Determination of nine phytotoxins in botanical beverage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(3): 311–316.
- [16] 祝伟霞, 李唯, 张丽, 等. 气相色谱-质谱法测定食品中黄樟素及其衍生物含量[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(12): 1596–1600.
- ZHU WX, LI S, ZHANG L, *et al.* Determination of safrole and its derivatives in foodstuffs by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2016, 35(12): 1596–1600.
- [17] LOPEZ P, SISSEREN MV, MACRO SD, *et al.* A straightforward method to determine flavouring substances in food by GC-MS [J]. *Food Chem*, 2015, 174: 407–416.
- [18] MA YJ, BI AQ, WANG XY, *et al.* Dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavor enhancers in ready-to-eat seafood by HPLC-PDA [J]. *Food Chem*, 2020, 309: 125753.
- [19] 梁志森, 陈玉珍, 周朗君. 超高效液相色谱-串联质谱法快速同时检测茶叶中 7 种香料[J]. *食品与机械*, 2020, 36(11): 51–57.
- LIANG ZS, CHEN YZ, ZHOU LJ. An UPLC-MS/MS method for rapid analysis of tea for the potential presence of illegally added flavorings [J]. *Food Mach*, 2020, 36(11): 51–57.
- [20] PENG JF, WEI ML, HU YW, *et al.* Simultaneous determination of maltol, ethyl maltol, vanillin, and ethyl vanillin in foods by isotope dilution headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Anal Methods*, 2019, 12(8): 1725–1735.
- [21] 付铭, 曹续, 孙宝阳, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定香紫苏香气成分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(4): 1508–1512.
- FU M, CAO X, SUN BY, *et al.* Determination of aromatic ingredients of *Salvia sclarea* by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(4): 1508–1512.
- [22] 王洁茹, 朱星宇, 郭东起. 枣醋香气成分的分析[J]. *中国调味品*, 2020, 45(11): 136–139.
- WANG JR, ZHU XY, GUO DQ. Analysis of aromatic components of jujube vinegar [J]. *China Cond*, 2020, 45(11): 136–139.
- [23] 王立艳, 陈吉江, 安骏, 等. 混合原料制取花椒油工艺优化及挥发成分分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(8): 18–23.
- WANG LY, CHEN JJ, AN J, *et al.* Process optimization and analysis of volatile compounds in zanthoxylum oil from mixed materials [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38(8): 18–23.
- [24] 于海英, 丁鹏霞, 李美萍, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱分析细叶韭花水提液易挥发成分[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(14): 169–176.
- YU HY, DING PX, LI MP, *et al.* Analysis of volatile component from *Allium tenuissimum* flowers water extracts by HS-SPME-GC-MS [J]. *Food Res Dev*, 2020, 41(14): 169–176.
- [25] 林正锋, 李实飞, 黄杰英, 等. 液相色谱-串联质谱法测定乳制品中四种常用香料[J]. *食品工业科技*, 2021, DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021010170
- LIN ZF, LI SF, HUANG JY, *et al.* Determination of 4 kinds of frequently-used spices in dairy products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021010170
- [26] YANG ZY, KINOSHITA T, TANIDA A, *et al.* Analysis of coumarin and its glycosidically bound precursor in Japanese green tea having sweet-herbaceous odour [J]. *Food Chem*, 2009, 114(1): 289–294.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

## 作者简介



陈玉珍, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。  
E-mail: 374905704@qq.com



梁志森, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品分析与检测技术。  
E-mail: 522794556@qq.com