

使用优化的萃取/净化程序和安捷伦 7000 系列三重四极杆气相质谱系统测定茶叶中的多农药残留

应用简报

食品安全

作者

Tomas Cajka, Veronika Bachanova,
Lucie Drabova, Kamila Kalachova,
Jana Pulkrabova, and Jana Hajslova

食品分析与营养系

布拉格化工学院

Technicka 3

166 28 Prague 6

捷克共和国

Chris Sandy

安捷伦科技（英国）有限公司

610 Wharfedale Road Winnersh

Triangle Wokingham

Berkshire RG41 5TP

英国



摘要

研究开发了一种新型的样品制备技术，可用于茶叶样品的萃取和净化。新型样品制备技术不仅快速、简便、经济、高效、耐用和安全（QuEChERS），还可以有效地萃取茶叶中的农药，同时还能将咖啡因和其他可能影响色谱峰形、导致保留时间漂移和灵敏度损失的共萃取物的萃取率降至最低。茶叶的萃取液使用安捷伦 7890 气相色谱和安捷伦 7000B 的三重四极杆气相色谱-串联质谱系统采用 MRM 模式进行分析。



Agilent Technologies

前言

茶叶（茶树）是全球最受欢迎的饮料之一，已经有几个世纪的历史。绿茶尤其以它的抗癌性和抗老化性闻名。每年，都有数以百万吨计的茶叶在中国和印度这样的出口大国生长成熟并出口到世界各地。农业化学品如杀虫剂（如蚜虫，食叶甲虫，毛虫等等，用于控制害虫）和杀螨剂及杀真菌剂在茶园中都在高度密集的使用，这已经引起了消费者对接触农药残留造成的潜在健康风险的重视。因此，有必要提供农残的有效控制方法。干茶叶样品基质复杂，含有多种不同类别的化合物，表 1 列出了干茶叶中的主要成分。

表 1. 干茶叶中的主要成分

化合物	含量 (% 干茶叶重)
茶多酚	25-35
类黄酮	占总茶多酚 80%
糖类	25
聚糖类	14-22
蛋白质	15
矿物质	5
游离氨基酸	4
叶绿素	0.5
咖啡因	2.5-5.5

如果在样品处理过程中未有效清除茶叶中浓度较高的咖啡因，就会导致很多色谱问题，如保留时间漂移和抑制质谱响应。

本应用介绍了一种新型样品萃取和净化技术，可以从样品最终萃取液中消除绝大多数的咖啡因和其他共萃取物，并与后运行色谱柱和柱后反吹联用，在不同运行间隙消除停留在色谱柱上的高沸点基体组分，使气相色谱-串联质谱在对茶叶中的农残分析表现出更强大的色谱性能和更灵敏的检出水平。

实验

样品制备

称量 2 g 经干燥和均质化处理的茶叶到 50 mL 的塑料离心管中，加入 10 mL 蒸馏水搅拌 30 s 后，离心 30 min。向管中加入 10 mL 乙腈，剧烈搅拌 1 min，然后加入 4 g 硫酸镁和 1g 氯化钠（Agilent Bond Elut 部件号 5982-5550），以及磷酸三苯酯（TPP）作为内标（ISTD）。进一步剧烈搅拌 1 min，将离心管以 10000 rpm 的速度离心 5 min。

将 1 mL 乙腈上清液转移至 15 mL 塑料离心管中，加入 1 mL 正己烷和 5 mL 20% 的氯化钠水溶液。将离心管剧烈摇匀 1min 后以 10000 rpm 的速度离心 1 min。

将正己烷上清液转移到 2 mL 自动进样器的样品瓶中，准备向气相色谱-串联质谱系统进样。图 1 总结了整个样品萃取和净化的步骤。

通过使用这种简单快速的样品制备方法，一个工作人员可以在 1 个小时内可以完成 6 个样品的制备，并将有机溶剂的使用量降至最低。

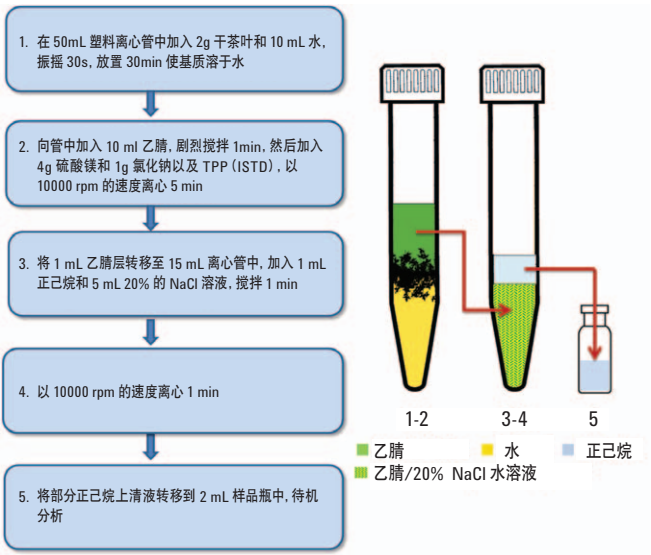


图 1. 样品的萃取和净化步骤流程图

样品分析

气相色谱方法对氟乐灵在 6.219 min 进行保留时间锁定，并使用后运行和柱后反吹。柱后反吹能够确保在序列的下一个运行前快速而高效地（通过分流出口）去除上一次运行残留在色谱柱上的任何高沸点基质。反吹^[1]可以：

- 使分析物的保留时间和响应保持一致
- 确保强大的色谱性能和一致的色谱峰形
- 防止高沸点基质污染质谱离子源
- 通过消除运行间隙的高温烘烤延长了色谱柱寿命并缩短了循环时间

色谱分析条件见表 2。

表 2. 茶叶萃取液的气相色谱分析条件

色谱柱 (1)	15 m × 0.25 mm, 0.25 µm HP-5MSUI (19091S-431UI)
色谱柱 (2)	0.50 m × 0.15 mm, 0.15 µm DB-5MSUI (cut from 165-6626)
毛细管流装置	带微板流控模块 (PCM) 的压力控制三通
自动进样器	安捷伦 7693A 自动液体进样器
进样	2 µL 冷柱头不分流进样, 使用 CO ₂ 冷却多模式进样口 (MMI)
不分流持续时间	1 min
进样口衬管	2 mm 内径带凹槽去活衬管 (5190-2296)
进样口程序升温	50 °C (0.1 min), 600 °C/min 升至 300 °C
吹扫至分流阀	50 mL/min 保持 1.0 min
RTL 化合物	氟乐灵, 保留时间锁定在 6.219 min
载气	氮气
进样口压力	17.460 psi 恒压模式 (运行期间)
PCM 压力	2.0 psi 恒压模式 (运行期间)
柱箱升温	50 °C (1.0 min), 50 °C/min 升至 150 °C, 6 °C/min 升至 200 °C, 16 °C/min 升至 280 °C (4.07 min)
后运行时间	2.0 min
后运行温度	280 °C
后运行压力	进样口 1.0 psig, PCM 60.0 psig
质谱传输线温度	280 °C

安捷伦 7000B 三重四级杆气相质谱系统采用串联质谱电子电离源 (EI) 模式, 使用多反应监测模式 (MRM) 对每个化合物的 2-8 个跃迁进行定性和定量。质谱条件见表 3。

表 3. 茶叶中农残分析的质谱条件

离子源模式	EI 源
电子能量	-70 eV
调谐	EI 自动调谐
EM 增益	10
MS1 分辨率	半峰宽 1.2 amu
MS2 分辨率	半峰宽 1.2 amu
跃迁	见参考文献 [2]
碰撞能量	见参考文献 [2]
驻留时间	2-28 ms, 依据每个时间窗口的跃迁数, 实现 5 个循环/秒
碰撞池气体流量	氮气 1.5 mL/min, 氦气 2.25 mL/min
质谱温度	离子源 280 °C, 四级杆1 150 °C, 四级杆2 150 °C

图 2 为气相色谱-串联质谱系统硬件配置的示意图。

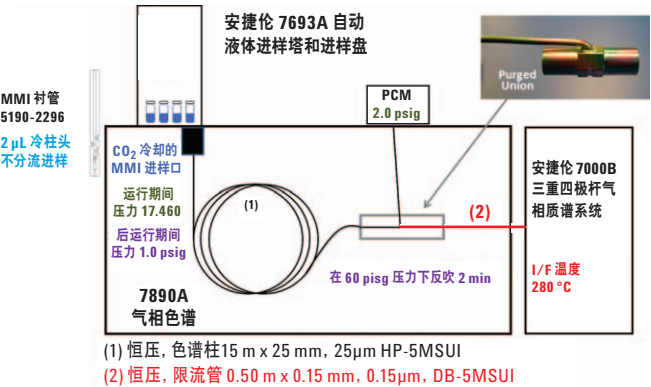


图 2. 气相色谱-串联质谱硬件配置示意图

结果和讨论

色谱图

QuEChERS 初次萃取液和液液萃取后的最终萃取液中咖啡因和其他共萃取物的净化效果见图 3 所示，谱图为全扫描采集到的质谱谱图。

图 4 显示了气相色谱-串联质谱系统分析物质响应的稳定性。茶叶萃取液的前 5 次进样运行完毕后（当一个新的衬管刚开始使用时，需要稳定分析物的响应，这称为气相色谱系统基质老化），对 8 种浓度为 0.1 mg/kg 的农药加标茶叶萃取液连续进样 150 次，得到的响应具有很高的重现性。这充分显示了样品运行期间反吹去除色谱柱上高沸点基质的有效性。

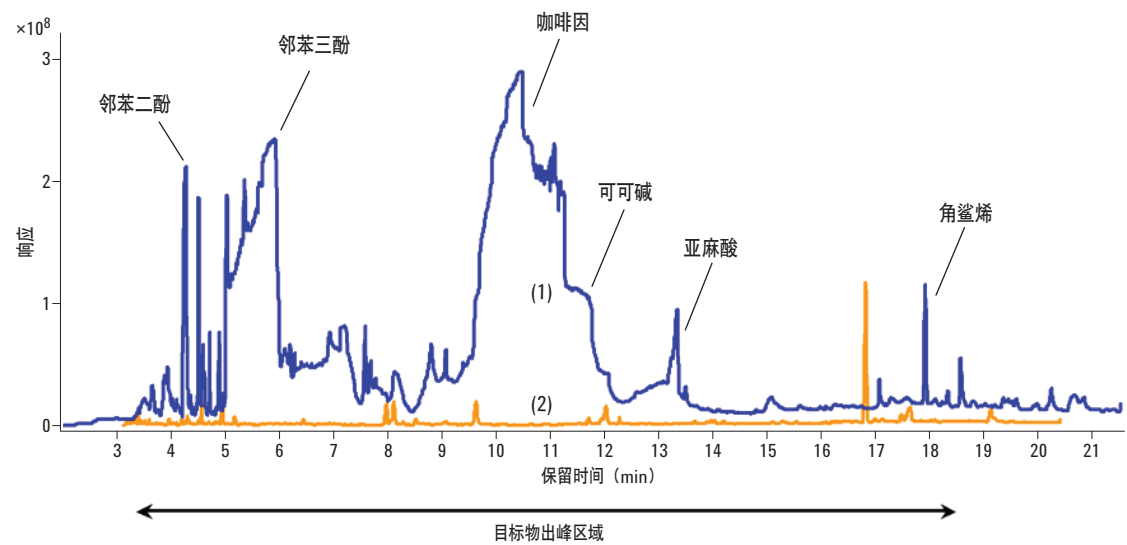


图 3. 经乙腈萃取后的 QuEChERS 萃取液的全扫描质谱谱图显示有大量咖啡因和其他共萃取物存在（蓝色曲线），与之形成鲜明对比的是经过液液萃取后，最终萃取液中咖啡因和其他共萃取物的丰度显著下降（黄色曲线）

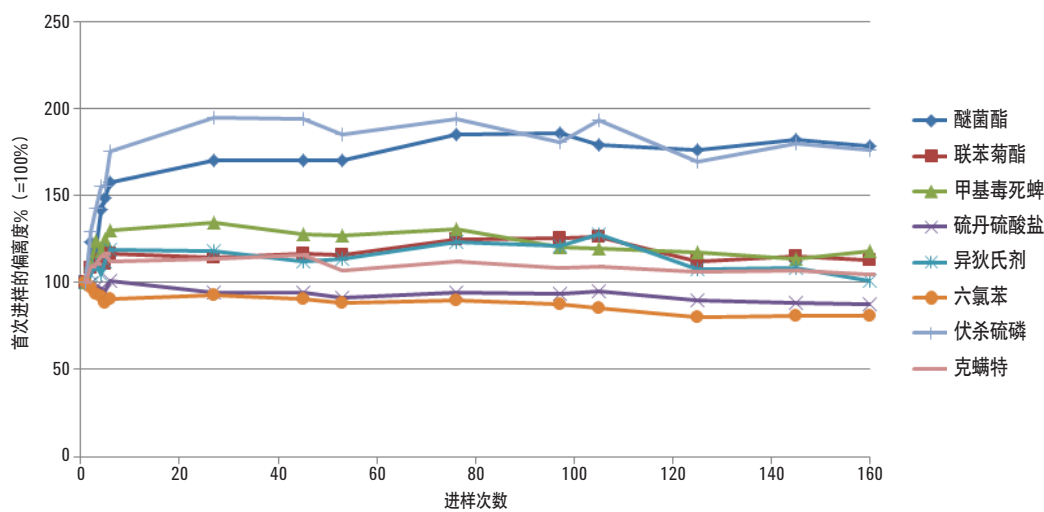


图 4. 气相色谱-串联质谱系统对茶叶萃取液响应的长期稳定性。每个点都代表浓度为 0.1 mg/kg 的基质加标液在序列中的一次进样

仪器校准

在正己烷溶剂中制备农残的茶叶基质加标溶液，浓度依次为 0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、50、100、200 和 300 ng/mL，在茶叶样品中的浓度分别为 0.001、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.15、0.25、0.5、1 和 1.5 mg/kg。每个基质加标溶液中都含有 20 ng/mL 的 TPP 作为 ISTD（对应于茶叶样品为 0.1 mg/kg）。

图 5 为 0.1 mg/kg (20 ng/mL) 基质加标溶液的 MRM 谱图。

图 6 分别为 0.05 mg/kg (10 ng/mL) 基质加标溶液中早期、中期和晚期流出的分析物（分别为二氯苯腈，三唑磷，醚菌酯）的 SRM 谱图。

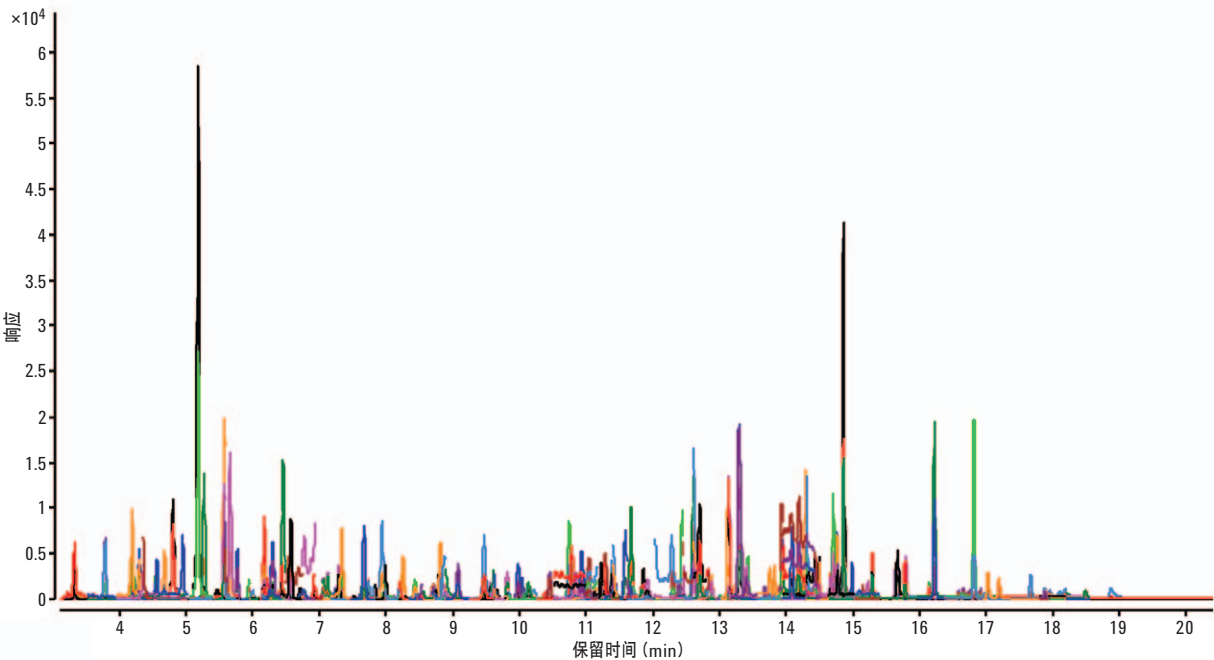


图 5. 利用优化的串联质谱采集得到的基质加标溶液 (0.1 mg/kg) 中农药 MRM 谱图叠加数据

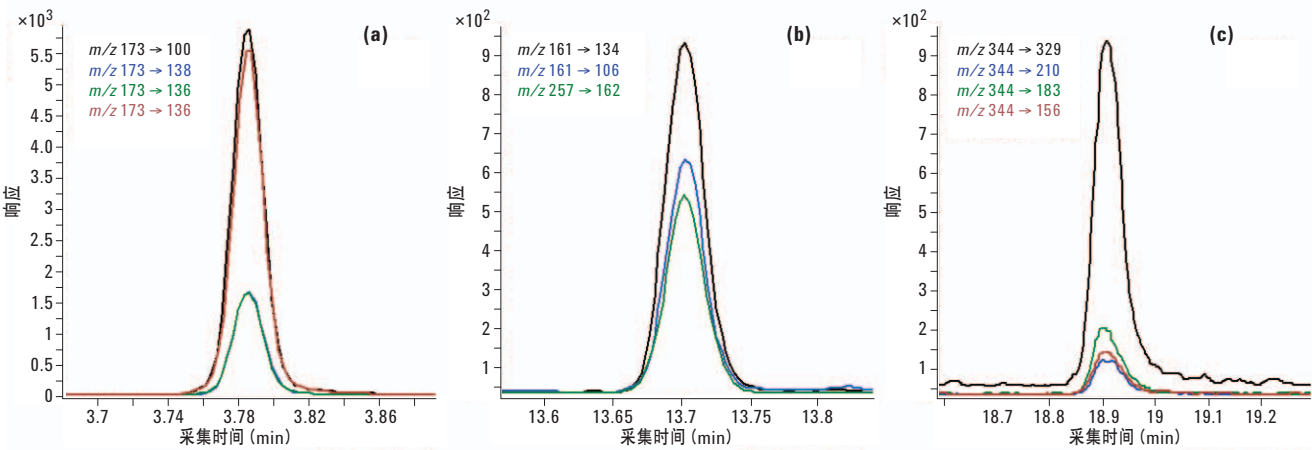


图 6. 10 ng/mL (相当于 0.05 mg/kg) 茶叶基质加标液的 SRM 谱图 (a) 二氯苯腈 (b) 三唑磷 (c) 醚菌酯

方法性能

此报告中实验部分涉及的样品制备方法和在应用的实验部分细化的 气相色谱-串联质谱分析条件的优化都经过了 6 个绿茶和红茶平行样品的评估，每个加标样品的农药浓度分别为 0.01、0.1 和 1 mg/kg。图 7 为分析两种茶叶基质得到的平均回收率和相对标准偏差（RSD）。数据表明，在两种茶叶样品农药浓度低至 0.01 mg/kg 的水平上进行定量，回收率和重复性都取得了出色的结果。

样品分析

将方法推广到 37 个样品中进行试点研究，进一步验证了其性能和适用性。样品包括绿茶和红茶，其中还有一部分带有香气。测试结果如图 8 所示。

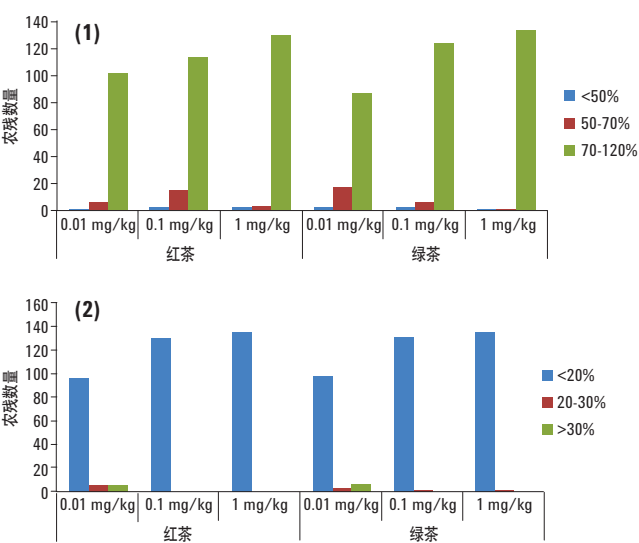


图 7. 上图分别为 (1) 平均回收率 (2) 农药加标浓度分别为 0.01, 0.1 和 1 mg/kg 的绿茶和红茶的 RSD

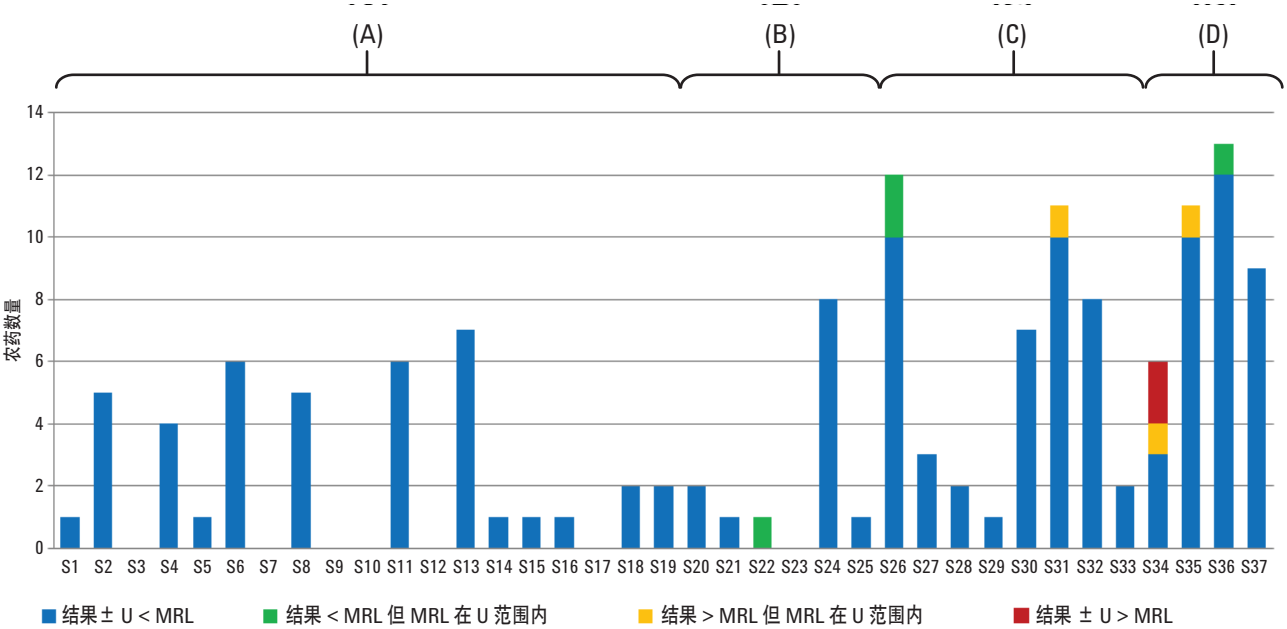


图 8. 茶叶样品中检测到的农药数量 (A) 红茶 (B) 红茶 (有香味) (C) 绿茶 (D) 绿茶 (有香味)。测量的不确定度 (U) 默认为 50% (依据 SANCO/12495/2011 附录 C [4])

总体而言, 81 % 的测试样品呈阳性 (0.01 mg/kg), 含有至少一种农药。氯氰菊酯 (68%)、硫丹 (41%)、克螨特 (38%)、联苯菊酯 (38%)、高效氯氟氰菊酯 (24%) 和噻嗪酮 (24%) 是最常见的农药。一些样品包含接近 EU MRL 水平的农药, 甚至还发现一个样品中有两种农药 (噻嗪酮和三唑磷) 都超过了 EU MRL 水平。绿茶的阳性率比红茶高, 带有香味的绿茶农药检出率更高, 这可能是由于精油和花瓣容易将更多的农药引入到茶叶中。这表明, 为了减少消费者的膳食暴露, 茶叶作为一种食品类商品的代表, 需要开展更频繁的农残监测。

结论

在干茶叶中对农残的测定极富挑战性。干茶叶基质很复杂, 所以在进行多农残分析时无论是在样品处理还是在色谱/质谱分析上都具有一定的挑战性。

研究开发了一种新型萃取和快速净化方法, 用于分析茶叶样品中的农药残留。此项萃取和净化技术以 QuEChERS 方法为基础, 先用乙腈萃取, 之后辅以液液萃取。这种样品处理方法显著降低了终端萃取液中咖啡因 (茶叶中一种天然成分) 和其他半挥发共萃取物的含量。终端萃取液中咖啡因的降低能够提高保留时间的重复性和那些与咖啡因共流出或在其之后出峰的组分的检出限。

为了缩短色谱循环周期、消除高沸点组分残留并减少离子源的污染, 可使用微板流控技术对色谱柱进行后运行和柱后反吹的操作。

对大多数被分析物, 方法的性能指标能够满足 SANCO/12495/2011 文件 [3] 的要求, 回收率在可接受的 70%-120% 范围内, 三个加标浓度的重复性都满足 20% 的要求 (0.01、0.1 和 1 mg/kg)。对少数被分析物 (如醚菌酯和六氯苯) 来说, 回收率较低, 范围在

50% 到 70%。因为这些化合物的测定比较一致 (20% RSD), 可以通过已知的回收率系数对结果进行校正。在灵敏度方面, 大多数被分析物可以在 0.001-0.005 mg/kg (相当于 0.2-1 ng/mL) 的范围内定量, 多数情况下, EU MRL 远远高于这个范围, 这就使得在 EU MRL 水平上对这些目标物进行准确的定性和定量成为可能。

总而言之, 优化了的样品制备步骤和气相色谱-串联质谱分析条件赋予方法的性能和指标可确保在欧盟立法设定的 MRL 水平上对茶叶中的农残进行可靠的控制 (No. 396/2005) [4]。

参考文献

- [1] C. Sandy, “使用微板流控和反吹技术提高 GC/MS 的耐用性并缩短分析周期”, 安捷伦科技出版物, 5990-3367CHCN (2009)
- [2] T. Cajka, C. Sandy, V. Bachanova, L. Drabova, K. Kalachova, J. Pulkrabova, J. Hajslova: Streamlining sample preparation and gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis of multiple pesticide residues in tea. *Analytica Chimica Acta*, 742 (2012) 51-60. (doi:10.1016/j.aca.2012.06.051)
- [3] Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- [4] Document No. SANCO/12495/2011: Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed.

更多信息

此数据仅代表实验的典型结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 8 月 14 日，中国印刷
5990-9865CHCN



Agilent Technologies