

气相色谱-质谱法转化测定茶叶中灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺残留量

郜效儒, 史海传, 周红, 袁方正, 田寒雪, 高艾英*

(泰安市食品药品检验检测研究院(泰安市纤维检验所), 泰安 271000)

摘要: **目的** 建立一种准确高效的 QuEChERS 结合气相色谱-质谱 (GC-MS/MS) 测定茶叶中灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺的总残留量的方法。**方法** 在样品提取和纯化之前, 通过优化的加热条件, 将茶叶样品在 75°C 水浴中加热 30 min, 使灭菌丹转化为邻苯二甲酰亚胺, 随后通过 QuEChERS 法前处理, 结合 GC-MS/MS 测定茶叶中的邻苯二甲酰亚胺和由灭菌丹转化而来的邻苯二甲酰亚胺总残留量。**结果** 邻苯二甲酰亚胺基质标准曲线线性良好, 线性相关系数在 0.998 以上; 测得质控样品的回收率在 84.5%~90.4% 之间, 相对标准偏差 (RSD) \leq 6.5%。邻苯二甲酰亚胺的检出限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 本方法可以准确测定邻苯二甲酰亚胺和由灭菌丹转化而来的邻苯二甲酰亚胺总残留量, 以满足欧盟法规要求。

关键词: 灭菌丹; 邻苯二甲酰亚胺; 茶; 气相色谱-串联质谱

0 引言

灭菌丹属于硫代邻苯二甲酰亚胺类, 是一种广谱、高效的杀菌剂, 主要用于防治某些水果、蔬菜和其他作物中的多种真菌病害^[1], 对茶云纹叶枯病、轮斑病、茶白星病等多种叶部病害的防治有良好效果。灭菌丹化学性质不稳定, 在样品制备的热加工和分析过程中, 它在碱性和高温条件下容易降解为邻苯二甲酰亚胺 (PI)^[2]。因此, 欧洲食品安全局 (EFSA) 于 2016 年对灭菌丹残留物的法规进行了修改, 将其降解产物纳入其中, 茶叶中灭菌丹的最大残留限量现定义为灭菌丹和 PI 的总和, 从 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 提高到 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3]。同时, 相关研究表明, 邻苯二甲酰亚胺也可以来源于多种途径^[4-5]。一种是邻苯二甲酰亚胺可以通过降解其他农药生成; 另一种来源是无处不在的环境污染物邻苯二甲酸酯 (PAEs), PAEs 及其衍生物在食品中可以与氨基酸在高温下生成邻苯二甲酰亚胺。

灭菌丹通常通过气相色谱法 (GC) 或气相色谱质谱联用法 (GC-MS) 进行分析检测, GC 进样端口的高温设置是导致灭菌丹降解的主要原因。目前许多研究报告聚焦于避免灭菌丹转化为邻苯二甲酰亚胺, 主要集中在降低灭菌丹样品处理或气相色谱进样中的转化率^[6-7], 一些方法前处理过程烦琐, 使用的仪器类型市场占有率不高, 不适合常

规分析。因此, 亟待开发一种高效、简单、准确性高、可重复性高的可靠检测方法用于测定灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺总含量。

QuEChERS 是目前复杂样品预处理的合适选择, 高效、简单、成本低、净化效果好^[8]。气相色谱-串联质谱 GC-MS/MS 抗干扰能力强、灵敏度高, 已广泛用于各种食品中的农药残留分析检测^[9]。

本研究通过优化灭菌丹转化条件, 将茶叶中的灭菌丹残留尽可能全部转化为邻苯二甲酰亚胺, 利用 QuEChERS 结合 GC-MS/MS 测定茶叶中灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺总残留量, 为分析茶叶中灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺污染水平, 协助市场监管和保障我国茶叶出口提供可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所有样品 (绿茶, $n=30$; 红茶, $n=15$) 均在当地市场随机购买。

邻苯二甲酰亚胺、灭菌丹 (纯度 99.9%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 坛墨质检); 乙腈 (色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 乙酸 (色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); QuEChERS 盐析试剂包 (含 6 g 无水硫酸镁、1.5 g 醋酸

第一作者: 郜效儒, 硕士, 工程师, 主要研究方向为农产品中农药残留检测。

* 通信作者: 高艾英, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: aygao@126.com

钠, 天津氏安科技发展有限公司); QuEChERS 萃取净化管(含 1200 mg 无水硫酸镁、400 mg 乙二胺基-N-丙基硅烷 PSA、400 mg 封端十八烷基硅胶 C18、200 mg 石墨化炭黑 GCB, 天津氏安科技发展有限公司); 陶瓷均质子(上海安谱实验科技股份有限公司); 微孔滤膜(有机相, 0.22 μm , 上海安谱实验科技股份有限公司); 实验用水均为超纯水(18.2 M Ω)。

1.2 仪器与设备

HP-5MS 色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , 美国安捷伦); 8890-7000D 三重四极杆气相色谱质谱联用仪(美国安捷伦); XSE204 电子天平(精度 0.1 mg, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Milli-Q 超纯水机(德国默克); 5430R 高速冷冻离心机(德国艾本德); IKA MS3 漩涡混合仪(德国艾卡)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

准确称取 2.00 g 待测样品(精确至 ± 0.01 g)置于 50 mL 离心管内, 加 10 mL 超纯水后密闭管盖, 经漩涡混合仪混匀, 室温静置 30 min。然后, 将混合物放入在 75 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中加热 30 min。加入 15 mL 含 1% 乙酸的乙腈溶液, 漩涡混匀 5 min, 加入 QuEChERS 盐析试剂包及陶瓷均质子, 立即密闭管盖剧烈涡旋 3 min, 随后 4000 r/min 离心 5 min。吸取 8 mL 上清液转移至萃取净化管, 漩涡混匀 1 min 后经 4000 r/min 离心 5 min。取离心后上清液经有机系微孔滤膜过滤, 收集滤液于 2 mL 棕色进样小瓶内, 并于 24 h 内完成仪器分析。

1.3.2 标准系列工作溶液配制

将 100 $\mu\text{g/mL}$ 的邻苯二甲酰亚胺标准品, 用乙腈稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液, 避光-18 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

使用乙腈, 逐级稀释标准储备溶液, 分别配制成浓度为 5、10、20、50、100 和 200 ng/mL 的标准系列工作溶液。

1.3.3 GC-MS/MS 条件

气相色谱条件: HP-5MS(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 载气为 He, 纯度为 99.999%; 柱流量为 1.0 mL/min; 进样量为 1 μL ; 进样口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$; 进样方式为不分流; 柱温箱升温程序为 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min, 以 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 170 $^{\circ}\text{C}$, 再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 310 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min。传输线温度为 280 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件: 电子轰击源(EI 源)为 70 eV; 离子源温度为 280 $^{\circ}\text{C}$; 传输线温度为 280 $^{\circ}\text{C}$; 邻苯二甲酰亚胺保留时间为 5.52 min, 定量离子对(m/z 147.0 > 103.0)和定性离子(m/z 147.0 > 76.0), 碰撞能量(CE)分别为 10 eV 和 25 eV; 灭菌丹保留时间为 10.25 min, 定量离子对(m/z

259.8 > 130.1)和定性离子(m/z 259.8 > 232.0), 碰撞能量(CE)分别为 15 eV 和 5 eV。

1.3.4 质量控制

为保证数据的准确性, 每个样品测定 3 次, 取平均值。按照 1.3.1 样品前处理方法, GC-MS/MS 分析后, 筛选出 2 个邻苯二甲酰亚胺和灭菌丹未检出的茶叶样品。经 1.3.1 前处理后得到茶叶基质, 取 1 mL 氮吹至近干后并在基质中加入 1 mL 标准系列工作溶液, 使得基质标准系列工作溶液为 5、10、20、50、100、200 ng/mL。

1.3.5 数据处理

采用 Masshunter 软件(Agilent)获取数据, 并对其进行谱图分析、数据定量分析, 采用 Office Excel 2024 对数据进行整理和分析。

2 结果与分析

2.1 转化动力学

为确保茶叶样品中的所有灭菌丹都转化为邻苯二甲酰亚胺, 在对茶叶样品中的灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺进行提取和净化之前, 我们优化了转化条件。灭菌丹的化学性质不稳定, 在高温下容易降解为邻苯二甲酰亚胺。将浸泡 30 min 的茶叶溶液在 45、60、75 $^{\circ}\text{C}$ 下分别加热 15、30、45 和 60 min, 随着温度的升高, 灭菌丹转化为邻苯二甲酰亚胺的比例增加。在 75 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 30 min 时, 灭菌丹的转化率为 92.5%; 因此, 几乎所有的灭菌丹都转化为邻苯二甲酰亚胺(图 1)。随着加热时间的延长, 转换率并没有显著增加。考虑到转换效率, 加热温度设置为 75 $^{\circ}\text{C}$, 加热时间为 30 min。

2.2 样品提取和净化

相较于传统索氏萃取(耗时耗能)、超声辅助萃取(基质干扰显著)及涡流萃取(重现性受限), QuEChERS 技术展现出显著的实用优势。设备需求简易(仅需离心机与漩涡装置)、单样本处理时间可缩短至 40 min 内, 且通过多机制协同作用(吸附净化+盐析分离)保障目标物回收率。QuEChERS 原理与固相萃取相似, 都是基于“基质分散固相萃取”原理, 通过吸附剂与干扰物的特异性结合实现净化。均质后的样品经有机溶剂提取后, 引入 $\text{MgSO}_4/\text{NaAc}$ 混合盐包(6.0 g+1.5 g), 通过离子强度调控与水分子竞争结合, 迫使乙腈-水双相体系快速分离。随后采用 PSA 去除脂肪酸、C18 吸附非极性杂质、GCB 消除色素及过量 MgSO_4 深度脱水的多维净化策略, 达到净化目的。在提取前将茶叶浸泡在超纯水中 30 min, 水浸有助于有机溶剂渗透到茶叶中, 提高农药和其他污染物的提取效率^[10]。对于提取目标物的有机溶剂的选择, 丙酮虽对多类农药具广谱提取性, 但其与水相混溶度过高, 导致相分离困难

(需用 > 10% NaCl 盐析), 影响定量结果; 中等极性溶剂乙酸乙酯只能部分和水互溶, 对于强极性农药无法从含水基质中萃取完全, 因而也不是合适的选择。乙腈可以通过氢键与偶极作用靶向结合农药分子, 减少共萃干扰物, 且相较于丙酮, 更易相分离。在乙腈中加入 1% 乙酸酸化, 避免碱性或中性环境下不稳定的农药的降解和损失^[11]。在萃取过程中加入陶瓷均质子可以使茶叶基质与提取溶剂充分接触, 提高 QuEChERS 方法对痕量目标化合物的检测效率, 还可以防止萃取过程中萃取盐结块, 保证萃取过程的重现性^[12]。

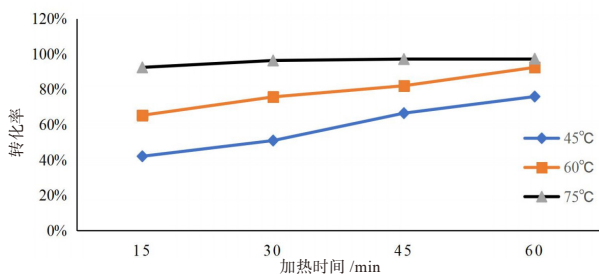


图 1 加热温度和时间对灭菌丹转化为邻苯二甲酰亚胺速率的影响

2.3 GC 进样口温度优化

如图 2 所示, 将 GC 进样口温度分别设为 200、220、240、260、280°C 和 300°C 来研究进样口温度对邻苯二甲酰亚胺响应值的影响。从图中可以看出邻苯二甲酰亚胺的响应值随着温度的升高不断增加, 峰型也在逐步改善, 保留时间逐渐稳定, 但在进样口温度到达 300°C 时, 响应值几乎不变, 并且出现峰型加宽的副反应。进样口温度的高低会直接影响到样品的汽化和进样的效果。过低的进样口温度可能会导致样品不能完全挥发, 从而导致被测物质响应值低; 若进样口温度过高, 样品可能会分解或挥发过快, 在进样口附近部分流失, 也会造成响应值降低。因此将 280°C 设置为邻苯二甲酰亚胺的最适进样温度。

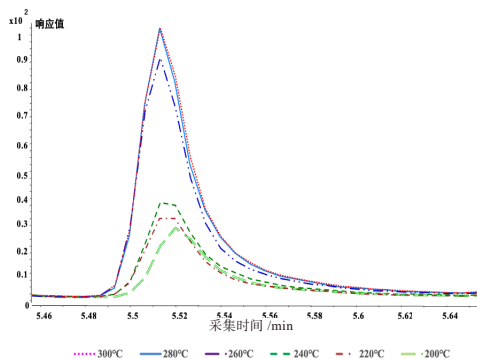


图 2 GC 进样口温度对邻苯二甲酰亚胺的影响

2.4 基质效应的影响

取 1.3.2 中配制的标准系列工作溶液和 1.3.4 中配制的基质标准系列工作溶液, 按照 1.3.3 仪器方法进行检测。标准曲线线性方程和相关系数(r^2)如表 1 所示。

表 1 溶剂、基质标准曲线的线性方程、相关系数(r^2)汇总

曲线	线性方程	相关系数(r^2)
溶剂标准曲线	$Y=2587.918199X-37713.428025$	0.9803
基质标准曲线	$Y=3963.916089X+38306.071834$	0.9987

通过相对响应值法计算基质效应^[13], 见式(1)。

$$ME = \frac{B-A}{A} \times 100\% \quad (1)$$

式中, A 表示溶剂标中待测物的离子响应值, B 表示相同浓度基质标中待测物的离子响应值。如果 ME 的值介于 0%~20%, 则称为弱基质效应, 在 20%~50%, 则称为中等效应, 高于 50%, 则称为强效应。

六种浓度下邻苯二甲酰亚胺的基质效应见表 2。

表 2 六种浓度下邻苯二甲酰亚胺的基质效应

浓度/(ng/mL)	基质标中离子响应值	溶剂标中离子响应值	ME/%
5	64610	290	22179
10	81587	907	8895
20	115821	7731	1398
50	239338	39770	501.8
100	414055	237229	74.5
200	840534	484141	73.6

茶叶基质复杂, 富含多酚、多糖、咖啡因、色素等成分。基质效应会影响色谱峰形状, 使色谱峰更宽且不对称, 即会干扰目标物的定性和定量分析^[14]。由表 1 可知本实验中邻苯二甲酰亚胺基质标准曲线的线性范围为 5、10、20、50、100 和 200 ng/mL, 相关系数为 0.9987, 优于同样范围的溶剂标准曲线的 0.9803。因此采用基质标准曲线校正可有效补偿定量分析中基质效应对准确度和精密度的影响, 提高定量结果准确性^[15]。

在 GC-MS/MS 中, 基质效应多表现为增强效应。如表 2 所示, 邻苯二甲酰亚胺在线性范围内的 6 个浓度点均表现出强基质效应。基质中的干扰组分堵塞了 GC 色谱柱和衬管上的活性位点, 这意味着有更多的农药到达 MS 检测器。从表 2 还可以看出, 随着浓度的增大, ME 逐渐降低, 说明低浓度点的基质效应增强程度高于高浓度点, 得出低浓度点的邻苯二甲酰亚胺使用基质标准曲线定量更准确。

2.5 定量限、检出限、回收率和精密度

选取空白茶样品, 按本研究提及的前处理方法进行灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺加标水平分别为 5.0、10.0 和 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的回收率实验($n=6$)。结果表明, 邻苯二甲酰亚胺和由灭菌丹转化而来的邻苯二甲酰亚胺的总回收率在 84.5%~90.4% 之间, $RSD \leq 6.5\%$ 。定量限为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检出限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.6 邻苯二甲酰亚胺总量检测结果

采用本方法对 30 个绿茶样品、15 个红茶样品中的灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺进行检测。采用转化测定方法将茶叶中的灭菌丹转化为邻苯二甲酰亚胺, 确定绿茶样品邻苯二甲酰亚胺检出率为 90%, 红茶样品检出率为 85%, 总残留量在 12.5~45.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间, 均不超过 EFSA 规定的最高残余限量 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。这表明邻苯二甲酰亚胺茶叶中虽广泛存在, 但含量低, 不对茶叶的出口贸易产生负面影响。

3 讨论与结论

本研究设计了一种新颖、准确的 QuEChERS 结合气相色谱-串联质谱法测定茶叶中灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺总残留量的方法。通过灭菌丹易在高温下转化为邻苯二甲酰亚胺的化学特性, 将茶样品在 75 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 30 min, 将灭菌丹转化为邻苯二甲酰亚胺, 以准确测定茶叶样品中的邻苯二甲酰亚胺和由灭菌丹转化而来的邻苯二甲酰亚胺总量。采用基质标准曲线定量消除了基质效应的影响, 保证了低浓度邻苯二甲酰亚胺的准确定量。该方法样品前处理步骤简单成本低, 回收率、精密度良好(回收率为 84.5%~90.4%, $\text{RSD} \leq 6.5\%$), 为实际分析检测中灭菌丹和邻苯二甲酰亚胺的测定提供了新思路, 满足了欧盟法律要求, 也为协助市场监管, 保障茶叶质量安全, 给予技术支撑。但本研究尚有不足之处, 只研究了温度变量对转化过程的影响, 并未探究在前处理过程中是否有其他条件也可促使灭菌丹转化为邻苯二甲酰亚胺, 其转化机制还需进一步深入。

参考文献

- [1] TOMLIN CDS. The pesticide manual [M]. 7th ed. Surrey: The British Crop Protection Council, 1997.
- [2] European Food Safety Authority (EFSA). Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for folpet according to Article 12 of Regulation (EC) No396/2005 [J]. EFSA Journal, 2014, 12(5): 3700-3755.
- [3] European Commission (2016). Commission regulation (EC) No 2016/156 of 18 January 2016 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for boscalid, clothianidin, thiamethoxam, folpet and tolclofos-methyl in or on certain products [J]. Official Journal of the European Union, 2016, (L31), 1-43.
- [4] 叶美君, 郑浩哲, 刘相真, 等. 固相萃取净化-气相色谱

- 质谱法检测茶叶中邻苯二甲酰亚胺 [J]. 中国茶叶加工, 2017, (Z2): 28-31.
- [5] 高贯威, 陈红平, 柴云峰, 等. 茶叶中邻苯二甲酰亚胺残留气相色谱-串联质谱测定 [J]. 茶叶科学, 2018, 38(4): 416-424.
- [6] MARTINS J, ESTEVES C, LIMPO-FARIA A, *et al.* Analysis of six fungicides and one acaricide in still and fortified wines using solid-phase microextraction-gas chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 630-636.
- [7] CUTILLAS V, JESÚS F, FERRER C, *et al.* Overcoming difficulties in the evaluation of captan and folpet residues by supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Talanta, 2021, 223(1): 121714.
- [8] 宋红波, 李旭鹏, 王栋, 等. 茶叶农药残留检测前处理新技术研究进展 [J]. 食品安全导刊, 2024, (10): 190-192.
- [9] HUERTAS-PÉREZ JF, ERNEST M, VARELA J, *et al.* Quantification of folpet and phthalimide in food by gas chromatography and mass spectrometry: Overcoming potential analytical artefacts [J]. Food Chemistry, 2018, 260: 213-220.
- [10] CHEN H P, GAO G W, CHAI Y F, *et al.* Multiresidue method for the rapid determination of pesticide residues in tea using ultra performance liquid chromatography orbitrap high resolution mass spectrometry and in-syringe dispersive solid phase extraction [J]. ACS Omega, 2017, 2(9), 5917-5927.
- [11] 刘华文, 苏海雁, 陆小康, 等. QuEChERS/超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中 28 种农药残留 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 223-229+236.
- [12] 闫君, 陈婷, 张文, 等. 气相色谱-串联质谱动态多反应监测模式测定陈皮中 88 种农药残留 [J]. 分析测试学报, 2020, 39(5): 632-639.
- [13] KMELLAR B, FODOR P, PAREJA L, *et al.* Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1215(1/2): 37-50.
- [14] 孙羽婕, 陈璐, 王顾希, 等. 气相色谱-串联质谱法测定六类茶叶中 11 种农药的基质效应 [J]. 山东化工, 2024, 53(11): 122-125+130.
- [15] 史海传, 郜效儒, 袁方正, 等. 新烟碱类农药残留检测中基质效应的影响及校正 [J]. 实验室检测, 2024, 2(1): 117-122.