

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

An UHPLC-MS/MS method for rapid analysis of tea for the potential presence of illegally added flavorings

梁志森^{1,2}

陈玉珍^{1,2}

周朗君^{1,2}

LIANG Zhi-sen^{1,2} CHEN Yu-zhen^{1,2} ZHOU Lang-jun^{1,2}

(1. 广州检验检测认证集团有限公司, 广东 广州 511447;

2. 国家加工食品质量检验中心〔广东〕, 广东 广州 511447)

(1. Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Company Limited, Guangzhou, Guangdong 511447, China;

2. National Quality Testing Center for Processed Food [Guangdong], Guangzhou, Guangdong 511447, China)

摘要:基于超高效液相色谱—串联质谱(UHPLC-MS/MS),建立了同时检测茶叶中7种可能非法添加的香料(茴香烯、香豆素、胡椒酚甲醚、指甲花醌、甲基丁香酚、蒲勒酮和反式肉桂醛)的定性、定量方法。茶叶样品经过乙腈—水混合溶剂提取,涡旋振荡,适当稀释并加入无水硫酸钠、十八烷基键合硅胶(C₁₈)和N-丙基乙二胺(PSA)进行净化,涡旋离心后,上清液过膜待测。以Kinetex C₁₈色谱柱分离,在多反应检测扫描(MRM)模式下经MS/MS进行基质外标法定量检测。试验结果表明,7种目标物在0.8~1 600.0 μg/L范围内呈良好线性,线性相关系数(R²)均大于0.999。方法的检出限为0.02~0.03 mg/kg,定量限为0.05~0.10 mg/kg,平均回收率为82.5%~102.5%,日内、日间精密度的分别小于16%和18%。该方法快速、可靠、灵敏度高,用于检测市面流通的100个茶叶样品,结果检出了反式茴香脑、香豆素和胡椒酚甲醚等物质,最大浓度值分别为65.0、2.0、72.2 mg/kg。

关键词:超高效液相色谱—串联质谱;茶叶;香料;非法添加

Abstract: A qualitative and quantitative method for simultaneous detection of 7 potential presence of illegally-added flavorings, including trans-anethole, coumarin, estragole, lawsone, methyl-eugenol, pulegone and trans-cinnamaldehyde in tea samples. Tea samples were extracted with acetonitrile-water served as a mixed solvent, subjected to whirlpool oscillation and then diluted properly. After that, anhydrous sodium sulfate, primary secondary amine (PSA) and octadecylsilyl silica gel (C₁₈) were added to the solvent for purification. The centrifugation, the supernatant was filtered over a membrane and separated on a Kinetex C₁₈ column. These 7 target compounds were determined by UHPLC-MS/MS in MRM mode, and quantified utilizing a matrix-matched external standard method. The results showed a good linearity from 0.8~1 600.0 μg/L and the value of the corresponding correlation coefficients (R²) were all larger than 0.999. The values of limit of detection were 0.02~0.03 mg/kg, and those of limit of quantification were 0.05~0.10 mg/kg, the average recoveries were 82.5%~102.5%, and the intra-day and inter-day RSD values were below 16% and 18%, respectively. A survey of 100 commercial tea samples was conducted, showing that trans-anethole, coumarin and estragole were present in green and black tea with maximum concentrations of 65.0, 2.0 and 72.2 mg/kg, respectively.

Keywords: ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); tea; flavorings; illegal-added

茶叶是世界上主要的无酒精饮品之一。茶叶的风味是评价茶叶质量和影响其售价的重要因素^[1-2],因此人们常担心不法商家往劣质茶叶中非法添加香料以改善茶叶的香气香型,以次充好、牟取暴利。香豆素是豆香型主要香料之一,对小鼠胚胎有毒性,对大鼠可能会诱发癌症、中毒等不良反应^[3-4],有研究^[5-6]表明在绿茶中检出低含量的香豆素。胡椒酚甲醚是藿香、小茴香、茴香等植物的主要香气成分^[7],可用于无酒精饮料的调味,但具有一定的基因毒性和致癌性^[8]。茴香烯具有八角茴香样味,属于茶花属花香气成分^[9],是重要的食品香料,按成

基金项目:广州市市场监督管理局科技项目(编号:2020kj46)

作者简介:梁志森(1989—),男,广州检验检测认证集团有限公司工程师,博士。E-mail:522794556@qq.com

收稿日期:2020-08-06

年人体重计每日可接受摄入量为 $0.0 \sim 2.0 \text{ mg/kg}^{[10-11]}$ 。有研究^[12-13]指出,摄入高剂量的茴香烯会对大鼠干细胞、人类精子功能产生不良影响。指甲花醌具有桂花香气,广泛用作海娜染发剂^[14],高剂量摄入可以引起小鼠溶血性贫血和肾小管坏死^[15-16],在化妆品和食品中均被禁止添加。反式肉桂醛是重要的香料和食品添加剂,具有肉桂香味,有研究^[17]指出其对人体是一种敏化剂,毒性较低。

中国 GB 2760—2014 规定茶叶中不允许添加香料,但未规定检测方法。根据美国《联邦规章典集》^[18](CFR) 的 189.180 节,香豆素不能直接添加到食品中。欧盟的法规^[19]严格限制如香豆素、蒲勒酮等香料在食品中的使用,并规定胡椒酚甲醚、甲基丁香酚在非酒精饮料中的最大允许使用限值分别为 10.1 mg/kg 。

气相色谱—质谱联用法^[20-23]、液相色谱质谱联用法^[24-25]被广泛地应用于食品中农药残留、污染物、禁用物质等的检测。Bousova 等^[26]使用气相色谱串联质谱结合固相顶空微萃取法,建立了检测食品中 7 种香料的方法,但未研究不同的茶叶基质且未覆盖茴香烯、反式肉桂醛和指甲花醌等物质。Lopez 等^[21]使用气相色谱—质谱的方法,检测了 4 类不同食品基质中 14 种香料物质,分析时间长达 25 min,且该试验未覆盖绿茶、红茶等茶叶基质,此外,该方法对茴香烯的回收率仅有 53%,难以满足实际检测的需求。

使用有机溶剂对茶叶中香料进行直接提取是一种简便有效的方法。使用超高效液相色谱—串联质谱(UHPLC-MS/MS),可以对茶叶中非法添加的香料进行快速定性、定量分析。试验拟基于 UHPLC-MS/MS 系统建立同时检测茶叶中 7 种可能非法添加香料(香豆素、胡椒酚甲醚、指甲花醌、甲基丁香酚、蒲勒酮、茴香烯和反式肉桂醛)的定性、定量方法,以期提高检测效率,节约成本,为政府监管部门及检测行业提供有效的分析技术。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蒲勒酮、茴香烯、反式肉桂醛标准品:纯度 $>99\%$,中国上海源叶生物科技有限公司;

香豆素标准品、指甲花醌标准品:纯度 $>99.5\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;

胡椒酚甲醚标准品、甲基丁香酚标准品:纯度 $>99.5\%$,中国上海安谱实验科技股份有限公司;

十八烷基键合硅胶(C_{18})吸附剂(120~400 目)和 N-丙基乙二胺(PSA)吸附剂(40~60 mm):上海安谱科学仪器有限公司;

无水硫酸钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

乙醇、乙腈、甲酸:色谱纯,德国 Merck 公司;

其他试剂均为分析纯;

Kinetex C_{18} 柱(100 mm $\times$ 3.0 mm,2.6 μm):美国菲罗门公司;

试验用水:超纯水,美国 Millipore 超纯水仪制备;

茶叶(绿茶和红茶各 50 份):市售。

1.2 仪器与设备

超高效液相色谱仪:1290 Infinity II 型,安美国捷伦科技公司;

三重四级杆串联质谱仪:API 5500 型,配电喷雾离子源(ESI),美国 AB SCIEX 公司;

超纯水系统:Mill-Q Gradient 型,美国密理博公司;

快速匀器:MS3 型,德国 IKA 公司;

混合研磨仪:GM200 型,德国 Restch 公司;

高速离心机:3K15 型,德国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制 分别取(20.0 ± 0.1) mg 的茴香烯、香豆素、胡椒酚甲醚、指甲花醌、甲基丁香酚、蒲勒酮和反式肉桂醛的标准品,分别置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈配制成 2 000 mg/L 的标准储备液,并转移至棕色瓶中。分别移取上述 7 种目标物的标准储备液 1 mL 至 10 mL 容量瓶中,配制成 200 mg/L 的混合标准储备液。取混合标准储备液,用 0.1% 甲酸乙腈溶液逐级稀释成浓度为 0.8, 1.0, 2.0, 40.0, 160.0, 400.0, 800.0, 1 200.0, 1 600.0 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作溶液,现配现用。所有标准储备液均于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.3.2 样品提取、稀释、净化 茶叶样品经过充分粉碎、均匀后,过筛(300 μm),分别独立储存于样品袋中,并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。称取均匀后的茶叶样品 1.00 g 于玻璃比色管中,加入乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=1:1$)提取溶剂并定容至 10 mL,涡旋 2 min(3 000 r/min),取 1 mL 上清液于 15 mL 离心管中,并使用乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=1:1$)稀释至 5 mL。于稀释后溶液中加入 5 mg PSA 吸附剂、5 mg C_{18} 吸附剂和 20 mg 无水硫酸钠,涡旋振荡 2 min(3 000 r/min),8 000 r/min 离心 2 min,取上清液过 0.22 μm 有机微孔滤膜置于棕色进样瓶,待测。

1.3.3 前处理条件优化 分别对样品前处理中提取溶剂种类、提取溶剂用量、净化剂种类、净化剂总用量、无水硫酸钠用量进行优化,其余步骤按照 1.3.2 操作。

1.3.4 质谱条件 离子源 ESI,正离子扫描;气帘气 $1.38 \times 10^5 \text{ Pa}$;雾化气(GS1) $3.45 \times 10^5 \text{ Pa}$;辅助加热气(GS2) $4.83 \times 10^5 \text{ Pa}$;碰撞气(CAD) $4.83 \times 10^4 \text{ Pa}$;电喷雾电压(IS) 5 500 V;离子源温度(TEM) 400 $^{\circ}\text{C}$;在电喷雾正模式下,分别对 7 种目标物各个碎片进行参数采集,选择响应强度较高的两对碎片离子作为依据,其中响应最高的子离子作为定量离子对,通过多反应检测 MRM 模式优化各个碎片离子的去簇电压(DP)和碰撞电压(CE)。

1.3.5 色谱条件 色谱柱为 Kinetex C₁₈ 柱(100 mm×3.0 mm, 2.6 μm)。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。梯度洗脱程序: 0~2 min, 10% B~90% B; 2~4 min, 90% B; 4~6 min, 10% B。流速 0.4 mL/min, 柱温 20 °C, 进样量 10 μL。

1.3.6 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 1.00 g, 按 1.3.1 的方法进行处理。用基质提取液稀释标准溶液, 以峰面积(Y)为纵坐标对各被测组分的质量浓度(X)为横坐标作图, 绘制基质标准曲线。

1.3.7 回收率的计算 按照 1.3.2 的方法称取均匀后的茶叶样品, 在样品中添加 30 mg/kg 混合标准溶液, 进行加标回收试验, 每个添加水平平行测定 6 次计算平均回收率。

1.3.8 精密度的计算 按照 1.3.7 的方法进行加标回收试验后, 在同一天内进行 6 次平行测定日内精密度试验, 连续 3 d 内进行平行测定 6 次日间精密度试验。

1.3.9 数据处理 测量数据采用 Analyst 1.61 进行采集和处理, 使用 Origin 8.0 进行科学作图。

2 结果与分析

2.1 前处理条件优化

2.1.1 提取溶剂种类的优化 茶汤一般使用水作为溶剂, 而乙腈和乙醇是超高效液相色谱常用的提取溶剂。考虑到指甲花醌、反式肉桂醛较易溶于水, 而蒲勒酮、香豆素、茴香烯等物质难溶于水。为了实现 7 种目标物的高效提取, 以空白茶叶为基质在 20 mg/kg 的加标水平下, 考察了乙腈、乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=4:1$)、乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=1:1$)、乙醇—水($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}=4:1$)、乙醇—水($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}=1:1$)、乙醇和水 7 种提取溶剂对 7 种目标物的提取效率, 结果如图 1 所示。当使用乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=1:1$)为提取溶剂时, 7 种目标物的回收率均在 75.2%~85.6%, 基本满足试验的要求。当使用纯乙腈、乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=4:1$)为提取溶剂时, 胡椒酚甲醚和指甲花醌的平均回收率分别为 56.2% 和 65.6%, 而茴香烯的平均回收率达到 114%, 显然不能满足 7 种目标物同时提取的要求。当使用其他提取溶剂时, 7 种目标物的平均回收率均比使用乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=1:1$)时低。因此, 最终选择乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=1:1$)为最佳提取溶剂。

2.1.2 提取溶剂用量的优化 根据 2.1.1 的试验结果, 以乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=1:1$)为提取溶剂, 考察 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 mL 不同提取溶剂体积对 7 种目标物回收率的影响, 结果如图 2 所示。当提取体积为 2.5 mL 和 5.0 mL 时, 香豆素和反式肉桂醛的平均回收率分别高达 111.5% 和 97.2%, 而茴香烯、胡椒酚甲醚以及指甲花醌等物质的平均回收率均低于 56.0%。当提取体积为 10.0 mL 时, 7 种目标物的平均回收率较稳定, 处于

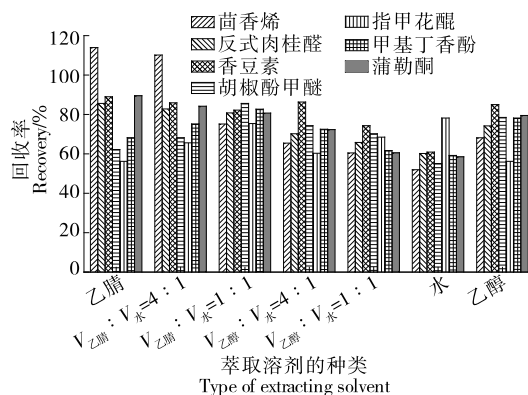


图 1 提取溶剂种类与 7 种目标物回收率的关系

Figure 1 Relationship between the type of extraction solvent and recoveries of 7 analytes

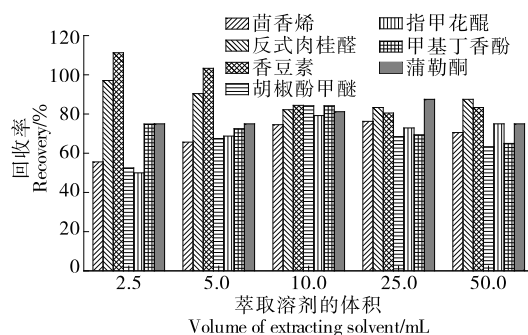


图 2 提取溶剂体积与 7 种目标物回收率的关系

Figure 2 Relationship between the volume of extraction solvent and recoveries of 7 analytes

74.5%~84.4%, 符合方法学的要求。当提取体积为 25.0 mL 和 50.0 mL 时, 茴香烯、胡椒酚甲醚和甲基丁香酚的平均回收率逐渐变低。因此, 最终选择 10.0 mL 为提取溶剂的体积。

2.1.3 净化剂种类的优化 茶叶的基质复杂, 试验将 C₁₈ 和 PSA 组合作为净化剂, 以去除茶叶基质中多酚、脂类、色素等干扰物。在净化剂总质量为 10 mg、无水硫酸钠用量为 10 mg 时, 考察了 5 种不同比例的 C₁₈ 和 PSA 组合($m_{\text{C}_{18}}:m_{\text{PSA}}$ 分别为 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1)对 7 种目标物回收率的影响, 结果如图 3 所示。当 $m_{\text{C}_{18}}:m_{\text{PSA}}=1:4$ 时, 茴香烯、指甲花醌和甲基丁香酚的平均回收率均低于 68.0%, 当 $m_{\text{C}_{18}}:m_{\text{PSA}}=3:2$ 或 4:1 时, 蒲勒酮的平均回收率分别达到 103.2% 和 115.0%, 但是指甲花醌的回收率均低于 62.0%。当 $m_{\text{C}_{18}}:m_{\text{PSA}}=2:3$ 时, 茴香烯的平均回收率为 68.0%, 低于 70.0% 的回收率要求。仅当 $m_{\text{C}_{18}}:m_{\text{PSA}}=1:1$ 时, 7 种目标物的平均回收率达到 76.3%~85.5%, 满足方法学的要求, 且回收率更稳定。因此, 选用净化剂的组合比例为 $m_{\text{C}_{18}}:m_{\text{PSA}}=1:1$ 。

2.1.4 净化剂总用量的优化 在无水硫酸钠用量为 10 mg 时, 净化剂的组合比例为 $m_{\text{C}_{18}}:m_{\text{PSA}}=1:1$, 考察

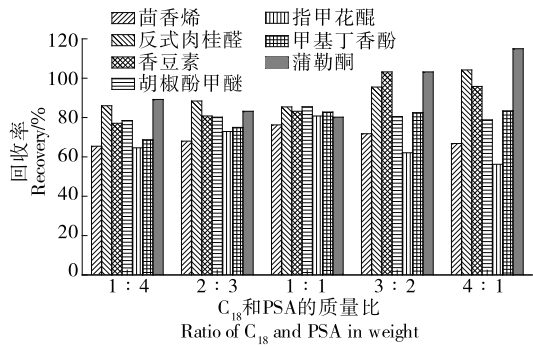


图 3 净化剂种类与 7 种目标物回收率的关系

Figure 3 Relationship between the composition of purification agents and recoveries of 7 analytes

5 个不同净化剂总用量(5,10,20,30,40 mg)对 7 种目标物回收率的影响,结果如图 4 所示。当净化剂总用量为 5 mg 时,茴香烯、指甲花醌的平均回收率分别为 46.8% 和 56.2%,不能满足试验要求。当净化剂总用量为 30 mg 和 40 mg 时,7 种目标物的回收率差异较大,其中茴香烯、指甲花醌的回收率均低于 65.0%,仍不能满足试验要求。当净化剂总用量为 10 mg 时,7 种目标物的平均回收率为 75.5%~85.4%,而当净化剂总用量为 20 mg 时,7 种目标物的平均回收率较高且比较稳定,在 80.5%~95.5% 范围内,均符合方法学的要求,因此净化剂的用量确定为 20 mg。

2.1.5 无水硫酸钠用量的优化 无水硫酸钠作为吸水剂和盐析剂,能吸附水溶性干扰物,又能增强液液萃取中两相的分离程度,有利于目标物的提取。试验考察无水硫酸钠的用量(5,10,20,30,40 mg)对 7 种目标物回收率的

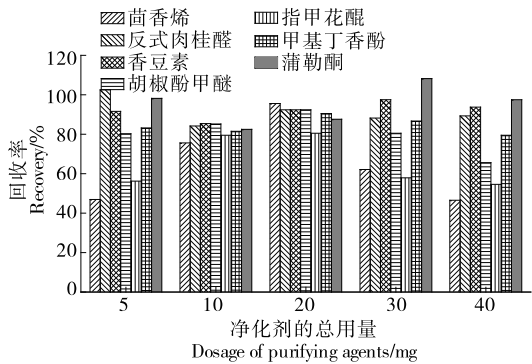


图 4 净化剂总用量与 7 种目标物回收率的关系

Figure 4 Relationship between the dosage of purification agents and recoveries of 7 analytes

影响。结果显示,当无水硫酸钠的用量为 5 mg 时,指甲花醌的平均回收率仅为 60.2%,不能满足提取的要求。当无水硫酸钠用量为 10 mg 和 20 mg 时,目标物均能获得较高的回收率,分别为 79.5%~95.0% 和 89.4%~100.4%,当无水硫酸钠的用量增多时,7 种目标物的平均回收率逐步下降。因此,最终确定无水硫酸钠用量为 20 mg。

2.2 仪器条件优化

2.2.1 质谱条件的优化 试验 7 种目标物的单独标准溶液分别通过针泵注射进入质谱,在电喷雾正模式下,分别对 7 种目标物的各个碎片进行参数采集,选择信号强度高的两个碎片离子作为定性依据,其中信号最强的一对碎片离子作为定量离子对,并通过 MRM 模式优化各个碎片离子的相关质谱参数,具体见表 1。

表 1 7 种分析物的保留时间和质谱参数表[†]

Table 1 Retention time and MS parameters of 7 analytes

物质	保留时间/min	定量与定性离子对(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞电压/V
茴香烯	2.97	149.2/121.2 [*]	214.0	22
		149.2/93.2		25
反式肉桂醛	2.15	133.2/55.2 [*]	13.0	17
		133.2/115.2		19
香豆素	1.92	148.1/104.0 [*]	160.0	22
		148.1/92.0		30
胡椒酚甲醚	3.65	149.2/65.0 [*]	218.0	30
		149/121.2		22
指甲花醌	1.53	177.1/89.1 [*]	52.5	12
		177.1/61.1		25
甲基丁香酚	2.45	179.2/138.2 [*]	90.0	20
		179.2/77.2		45
蒲勒酮	2.53, 2.67	153.2/81.2 [*]	80.0	24
		153.2/55.2		30

[†] * 表示定量离子对。

2.2.2 色谱条件的优化 为保证色谱峰峰型尖锐以及较好的分离效果,探索了不同的流动相组成和比例,最终选用 0.1%甲酸乙腈溶液和 0.1%甲酸水溶液作为流动相,使用优化后的条件仅 6 min 内就能实现 7 种目标物的全部出峰,且满足基线分离,试验谱图见图 5。

2.3 方法的验证

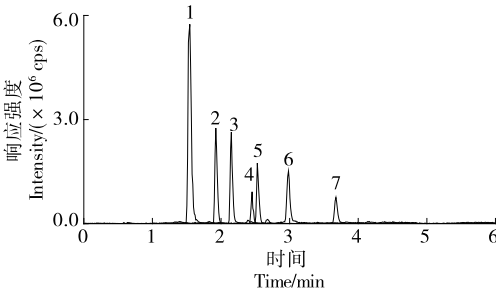
2.3.1 基质效应的考察 由于茶叶基质复杂,含有脂肪、色素、酚类等可能干扰检测结果的物质,因此需要对基质效应进行考察。用 1.3.2 的前处理方法对样品进行处理,得到基质溶液,并以此基质溶液按照 1.3.6 的方法配制标准工作曲线得到基质匹配曲线,同时按照 1.3.1 的方法用 0.1%甲酸乙腈溶液配制溶剂并绘制标准曲线。以 7 种目标物的基质曲线的斜率与纯溶剂曲线斜率之比来确定基

质效应(ME),当 ME 的绝对值>50%时,说明基质效应明显。正值代表基质增强作用,负值代表基质减弱作用。如表 2 所示,对于绿茶基质,ME 数值在 74.7%~105.9%;对于红茶基质,ME 数值在-5.2%~-84.1%。结果表明,对于绿茶基质,7 种目标物都存在明显的基质效应;对于红茶基质,茴香烯和胡椒酚甲醚的基质效应明显,因此进行定量分析时需要使用基质匹配曲线进行校正。

$$ME = [(K_{\text{mat}}/K_{\text{std}}) - 1] \times 100\%, \quad (1)$$

式中:
ME——基质效应,%;
 K_{mat} ——基质匹配曲线的斜率;
 K_{std} ——标准曲线的斜率。

2.3.2 线性范围、检出限、定量限、回收率和精密度 按照 1.3.6 的方法配制 7 种目标物的基质标准溶液(0.8~1 600.0 $\mu\text{g/L}$),绘制工作曲线,得到相应的线性回归方程,相关系数 R^2 为 0.999 1~0.999 9(见表 2),表明 7 种目标物在浓度范围内呈良好的线性。试验以外标法进行定量,以 3 倍信噪比(S/N)响应时所对应的质量浓度作为检出限(LOD),以 10 倍信噪比对应的质量浓度作为定量限(LOQ)。方法的检出限范围为 0.02~0.03 mg/kg,定量限范围为 0.06~0.10 mg/kg,具体见表 2。在空白绿茶和空白红茶样品中添加 3 个不同浓度水平的混合标准溶液进行加标回收试验,每个添加水平平行测定 6 次计算平均回收率。日内、日间精密度的试验在同一天和连续 3 d 内分别进行平行测定 6 次。试验结果显示,不同茶叶基质中所有目标物的平均回收率为 82.5%~102.5%;日内、日间精密度分别小于 16%和 18%(相对标准偏差)。具体结果见表 3。



1. 指甲花醌 2. 香豆素 3. 反式肉桂醛 4. 甲基丁香酚 5. 蒲勒酮 6. 茴香烯 7. 胡椒酚甲醚
图 5 质量浓度为 30 mg/kg 时 7 种目标物基质混合标准溶液的 UHPLC-MS/MS 色谱图

Figure 5 UHPLC-MS/MS chromatograms of a matrix-matched mixed standard solution of 7 analytes at 30 mg/kg

表 2 0.8~1 600.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内茶叶基质中方法的标准曲线、 R^2 、基质效应、检出限和定量限
Table 2 Standard curve, R^2 , matrix effect (ME), LOD and LOQ values of the method in tea matrix at the concentration range of 0.8~1 600.0 $\mu\text{g/L}$

基质	物质	标准曲线	R^2	ME/%	LOD/(mg · kg ⁻¹)	LOQ/(mg · kg ⁻¹)
绿茶	茴香烯	$Y=1.41 \times 10^4 X - 3.63 \times 10^3$	0.999 5	74.7	0.02	0.06
绿茶	反式肉桂醛	$Y=7.51 \times 10^3 X + 1.47 \times 10^3$	0.999 7	86.4	0.02	0.06
绿茶	香豆素	$Y=1.23 \times 10^4 X - 7.23 \times 10^3$	0.999 5	78.0	0.02	0.06
绿茶	胡椒酚甲醚	$Y=4.44 \times 10^4 X - 7.26 \times 10^3$	0.999 9	94.7	0.03	0.10
绿茶	指甲花醌	$Y=1.62 \times 10^4 X + 1.30 \times 10^3$	0.999 1	105.9	0.02	0.06
绿茶	甲基丁香酚	$Y=1.62 \times 10^4 X - 8.71 \times 10^3$	0.999 8	92.6	0.03	0.10
绿茶	蒲勒酮	$Y=1.59 \times 10^4 X + 4.00 \times 10^3$	0.999 1	79.3	0.03	0.10
红茶	茴香烯	$Y=4.48 \times 10^3 X + 2.90 \times 10^3$	0.999 5	-82.2	0.02	0.06
红茶	反式肉桂醛	$Y=4.02 \times 10^3 X - 1.22 \times 10^3$	0.999 6	-25.3	0.02	0.06
红茶	香豆素	$Y=4.91 \times 10^3 X + 2.59 \times 10^3$	0.999 6	-13.9	0.02	0.06
红茶	胡椒酚甲醚	$Y=9.91 \times 10^3 X - 1.05 \times 10^3$	0.999 1	-84.1	0.03	0.10
红茶	指甲花醌	$Y=1.81 \times 10^4 X - 1.45 \times 10^3$	0.999 5	-5.2	0.02	0.06
红茶	甲基丁香酚	$Y=2.01 \times 10^3 X - 1.12 \times 10^3$	0.999 6	-36.8	0.03	0.10
红茶	蒲勒酮	$Y=5.04 \times 10^3 X - 4.89 \times 10^3$	0.999 7	-25.9	0.03	0.10

表 3 不同茶叶基质样品中 7 种待测物的回收率、日内和日间精密度
Table 3 Recovery, intra-and inter-day for 7 analytes in different tea matrix

基质	物质	添加水平/(mg·kg ⁻¹)			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
绿茶	茴香烯	0.05	0.10	20	101.2	102.5	95.0	8.0	6.0	4.0	12.0	10.0	8.0
绿茶	反式肉桂醛	0.05	0.10	20	89.5	93.8	85.0	16.0	14.0	5.0	18.0	15.0	8.0
绿茶	香豆素	0.05	0.10	20	95.5	96.3	91.2	5.0	6.0	2.0	8.0	6.0	8.0
绿茶	胡椒酚甲醚	0.10	0.20	40	101.5	102.5	95.0	14.0	16.0	4.0	16.0	12.0	6.0
绿茶	指甲花醌	0.05	0.10	20	90.0	88.5	82.5	8.0	6.0	6.0	12.0	8.0	5.0
绿茶	甲基丁香酚	0.10	0.20	40	92.5	91.7	87.2	6.0	6.0	5.0	10.0	8.0	5.0
绿茶	蒲勒酮	0.10	0.20	40	90.2	89.5	85.2	10.0	12.0	8.0	12.0	8.0	6.0
红茶	茴香烯	0.05	0.10	20	92.5	95.5	88.5	10.0	6.0	4.0	12.0	8.0	8.0
红茶	反式肉桂醛	0.05	0.10	20	89.0	87.5	85.0	14.0	8.0	4.0	18.0	10.0	10.0
红茶	香豆素	0.05	0.10	20	94.0	92.0	90.0	8.0	6.0	4.0	8.0	8.0	4.0
红茶	胡椒酚甲醚	0.10	0.20	40	99.0	99.5	92.2	12.0	10.0	8.0	14.0	8.0	8.0
红茶	指甲花醌	0.05	0.10	20	97.0	98.0	89.5	10.0	11.0	6.0	12.0	8.0	6.0
红茶	甲基丁香酚	0.10	0.20	40	96.2	95.0	86.2	8.0	8.0	4.0	8.0	4.0	4.0
红茶	蒲勒酮	0.10	0.20	40	89.0	87.4	85.0	12.0	8.0	4.0	15.0	10.0	8.0

2.3.3 实际样品检测 应用该法对 100 个茶叶样品(其中红茶 50 个,绿茶 50 个)进行检测,结果如表 4 所示。其中,茴香烯、香豆素和胡椒酚甲醚在实际样品中有检出,在绿茶样品中其检出的最高浓度分别为 65.0,2.4,72.2 mg/kg;在红茶样品中其检出的最高浓度分别为 18.1,1.0,65.0 mg/kg,而其他 5 种物质均未检出,具体结果见表 4。说明市售茶叶中存在非法添加香料的情况。

表 4 不同茶叶样品中分析物的浓度[†]
Table 4 Concentration levels for the analytes of interest in different tea samples

基质	物质	检出率/%	平均浓度/(mg·kg ⁻¹)	浓度范围/(mg·kg ⁻¹)
绿茶	茴香烯	12.0	34.2	0.06~65.00
绿茶	反式肉桂醛	0.0	ND	ND
绿茶	香豆素	20.0	1.8	0.06~2.40
绿茶	胡椒酚甲醚	10.0	51.8	0.10~72.20
绿茶	指甲花醌	0.0	ND	ND
绿茶	甲基丁香酚	0.0	ND	ND
绿茶	蒲勒酮	0.0	ND	ND
红茶	茴香烯	18.0	12.4	0.06~18.10
红茶	反式肉桂醛	0.0	ND	ND
红茶	香豆素	8.0	0.8	0.06~1.00
红茶	胡椒酚甲醚	6.0	42.2	0.10~65.00
红茶	指甲花醌	0.0	ND	ND
红茶	甲基丁香酚	0.0	ND	ND
红茶	蒲勒酮	0.0	ND	ND

[†] ND 代表未检出。

3 结论

利用超高效液相色谱—串联质谱系统,建立了茶叶中 7 种可能非法添加的香料的快速检测方法,优化了前处理和仪器条件,并考察了不同的茶叶基质效应。方法学评价和实际样品检测结果表明,该方法灵敏度高,操作简便,分析时间短,能同时对 7 种目标物进行准确的定性定量分析,目标物回收率较高且稳定。在市售 100 个茶叶样品中检测出茴香烯、香豆素和胡椒酚甲醚等非法添加香料,准确反映了市售茶叶中非法添加香料的实际情况,满足实际监管的要求。

参考文献

[1] ALASALVAR C, TOPAL B, SERPEN A, et al. Flavor characteristics of seven grades of black tea produced in turkey[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60 (25): 6 323-6 332.

[2] WANG Jian-wu, HANG Yuan-xin, YAN Ting-ting, et al. Qualitative analysis of flavors and fragrances added to tea by using GC-MS[J]. Journal of Separation Science, 2018, 41 (3): 648-656.

[3] HSIEH C J, SUN Meng, OSBORNE G, et al. Cancer hazard identification integrating human variability: The case of coumarin[J]. International Journal of Toxicology, 2019, 38(6): 501-552.

[4] 招云芳, 缪明明. 气相色谱—质谱法测定茶叶中香豆素的含量[J]. 质谱学报, 2009, 30(增刊): 214-215.

[5] KUMAZAWA K, MASUDA H. Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution

- technique[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(20): 5 660-5 663.
- [6] BABA R, KUMAZAWA K. Characterization of the potent odorants contributing to the characteristic aroma of chinese green tea infusions by aroma extract dilution analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(33): 8 308-8 313.
- [7] 罗静, 钟永科, 李明明, 等. 小茴香储存过程中挥发性成分的变化[J]. *中国调味品*, 2016, 41(3): 49-52.
- [8] European Commission Health & Consumer Protection Directorate-general. Opinion of the scientific committee on food on estragole (1-allyl-4-methoxybenzene)[R]. Brussel: Scientific Committee on Food, 2001.
- [9] 甘秀海, 梁志远, 王道平, 等. 3种山茶属花香气成分的 HS-SPME/GC-MS 分析[J]. *食品科学*, 2013, 34(6): 204-207.
- [10] NEWBERNE P, SMITH R L, DOULL J, et al. The fema gras assessment of trans-anethole used as a flavouring substance[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1999, 37(7): 789-811.
- [11] European Food Safety Authority. Scientific opinion on the safety and efficacy of allylhydroxybenzenes (chemical group 18) when used as flavourings for all animal species[R]. Parma: EFSA, 2011.
- [12] LUO Tao, WANG Fang, WENG Shi-qi, et al. Anethole compromises human sperm function by affecting the sperm intracellular calcium concentration and tyrosine phosphorylation[J]. *Reproductive Toxicology*, 2020, 93: 99-105.
- [13] NAKAGAWA Y, SUZUKI T. Cytotoxic and xenoestrogenic effects via biotransformation of trans-anethole on isolated rat hepatocytes and cultured MCF-7 human breast cancer cells[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 66(1): 63-73.
- [14] 刘涵, 高增平, 石钺. HPLC 法测定海娜染发粉中的指甲花醌[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(2): 153-155.
- [15] MUNDAY R, SMITH B L, FOWKE E A. Haemolytic activity and nephrotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone in rats[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 1991, 11(2): 85-90.
- [16] OSMAN A M, VAN NOORT P C M. Evidence for redox cycling of lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) in the presence of the hypoxanthine/xanthine oxidase system[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2003, 23(4): 209-212.
- [17] BELSITO D, BICKERS D, BRUZE M, et al. A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(1): 1-23.
- [18] Food and Drug Administration. Electronic code of federal regulations in Title 21 CFR 189.180[EB/OL]. (1977-05-15)[2020-07-13]. https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=6fc169b49f8b11068efc673db41d8b3b&mc=true&node=pt21.3.189&rgn=div5#se21.3.189_1180.
- [19] The European parliament. Regulation (EC) No. 1334/2008 of 16 december 2008 on flavorings and certain food ingredients with flavoring properties for use in and on foods and amending council regulation (EEC) No. 1601/91, regulations (EC) No. 2232/96, and (EC) No. 110/2008 and directive 2000/13/EC[EB/OL]. (2008-12-16)[2020-07-13]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1597651424355&uri=CELEX:32008R1334>.
- [20] ZHAO Jing, LV Guang-ping, CHEN Yi-wen, et al. Advanced development in analysis of phytochemicals from medicine and food dual purposes plants used in China[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1 218(42): 7 453-7 475.
- [21] LOPEZ P, VAN SISSEREN M, DE MARCO S, et al. A straightforward method to determine flavouring substances in food by GC-MS[J]. *Food Chemistry*, 2015, 174: 407-416.
- [22] 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.
- [23] 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, 303.
- [24] 陈立坚, 何敏恒, 李秀英, 等. 高效液相色谱—串联质谱法测定水产品中7种微囊藻毒素[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(9): 1 243-1 248.
- [25] MOREDAPINEIRO J, MOREDAPINEIRO A. Recent advances in combining microextraction techniques for sample pre-treatment[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71: 265-274.
- [26] BOUSOVA K, MITTENDORF K, SENYUVA H. A solid-phase microextraction GC/MS/MS method for rapid quantitative analysis of food and beverages for the presence of legally restricted biologically active flavorings[J]. *Journal of AOAC International*, 2011, 94(4): 1 189-1 199.