

核磁共振波谱法结合氧弹燃烧测定茶叶中的总氟

Determination of total fluorine in tea by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with oxygen bomb combustion

周 密^{1,2} 韩 智^{1,2} 朱正伟^{1,2} 朱松松^{1,2}ZHOU Mi^{1,2} HAN Zhi^{1,2} ZHU Zheng-wei^{1,2} ZHU Song-song^{1,2}王会霞^{1,2} 江 丰^{1,2} 朱 芊^{1,2}WANG Hui-xia^{1,2} JIANG Feng^{1,2} ZHU Qian^{1,2}

(1. 湖北省食品质量监督检验研究院, 湖北 武汉 430075;

2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北 武汉 430075)

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan, Hubei 430075, China; 2. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan, Hubei 430075, China)

摘要: 采用核磁共振氟谱 (¹⁹F quantitative nuclear magnetic resonance, ¹⁹F qNMR) 结合氧弹燃烧的前处理方法对茶叶中总氟进行定量分析。¹⁹F qNMR 法以氟离子 $\delta = -119$ 处信号特征为定性峰, 以三氟乙酸 $\delta = -75$ 处信号特征为内标峰, 采用氧弹燃烧的方式将茶叶样品中含氟物质转化为无机态氟, 加入柠檬酸钠—乙二胺四乙酸二钠混合金属螯合剂以消除干扰, 测定茶叶中氟离子的绝对含量。方法的最低检测浓度为 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 。质控样品测定结果满意, 实际样品加标回收率为 $96.3\% \sim 107.0\%$, 方法重复性、精密度良好。利用氧弹燃烧 ¹⁹F qNMR 法测定茶叶中总氟含量, 30 min 内能完成样品测试, 有效减少样品分析时间, 测定结果准确可靠。

关键词: 定量核磁共振; 内标法; 茶叶; 氟; 氧弹燃烧; 螯合剂

Abstract: Quantitative analysis of total fluorine in tea was established by using ¹⁹F quantitative nuclear magnetic resonance combined with the pretreatment method of oxygen bomb combustion. The ¹⁹F qNMR method used the signal characteristic of fluoride ion at $\delta = -119$ as the qualitative peak and the signal characteristic of trifluoroacetic acid at $\delta = -75$ as the internal standard peak. The fluorine-containing substances in tea sample was burned by oxygen bomb and converted into inorganic fluorine. Mixed metal

chelating agent which included sodium citrate and disodium EDTA was added to eliminate interference and then the absolute content of fluoride ion in tea was determined. The minimum detection concentration of the method is $2.0 \mu\text{g/mL}$. The results of the quality control samples were satisfactory. The recovery rate of the actual samples were $96.3\% \sim 107.0\%$ and the method repeatability and precision were good. The sample test can be completed within 30 minutes which effectively reduces the analysis time and the measurement result is accurate and reliable by using the method to determine the total fluorine content in tea.

Keywords: quantitative nuclear magnetic resonance; internal standard method; tea; fluorine; oxygen bomb combustion; chelating agent

氟是人体重要的微量元素之一, 参与人体的许多生命活动^[1]。氟适量摄入有益于人体骨骼和牙齿的钙化, 增加骨骼的强度并维持口腔健康^[2-3], 但摄入过量则会导致全身慢性蓄积性中毒, 形成“地氟病”, 轻者形成氟斑牙, 重者造成氟骨病, 严重影响生长发育, 危害身体健康^[4-5]。茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 有较强富集氟的能力^[6-8], 叶片是茶树富集氟的主要器官, 尽管不同质量、不同产地、不同品牌的茶含氟量不同^[9], 但随着茶叶叶龄的增加, 叶片中氟含量也逐渐升高^[10-14], 老叶含氟量更是高出嫩叶近 10 倍^[15]。随着近年来消费提档升级, 有学者^[16]将超微茶粉直接开发成固体饮料, 提高茶叶中有效成分的利用率, 以满足市场多元化需求, 但缺少对该类产品中总氟含量的关注, 如若生产商使用老叶或劣质茶叶为原料加工生产, 必定增加食用人群对于氟

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (编号: 2018YFC1602304)

作者简介: 周密, 男, 湖北省食品质量监督检验研究院工程师, 硕士。

通信作者: 江丰 (1985—), 男, 湖北省食品质量监督检验研究院高级工程师, 硕士。E-mail: 349136833@qq.com

收稿日期: 2020-10-26

的摄入量,对身体健康构成威胁。

茶叶中氟的测定前处理方法主要有浸泡法^[17]、灰化碱熔法^[18]和氧弹燃烧法^[19-20]。现行国标^[17]中茶叶氟的测定方法主要是针对水溶性氟,但植物细胞内的氟难以被完全提取,无法准确反映产品中总氟含量;灰化碱熔法在高温、开放的体系中进行,处理时间长达3~5 h,氟易损失^[20];氧弹燃烧使茶叶(粉)样品在密闭富氧的条件下反应,将氟元素全部转化为无机态氟^[20],样品损失小,适合茶叶总氟含量测定^[19]。

定量核磁共振技术(quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR)已被广泛用于天然产物表征^[21-22]、参考物质质量控制^[23-24]和药物分析^[25-26]中,其中,核磁共振氟谱(¹⁹F quantitative nuclear magnetic resonance, ¹⁹F qNMR)具备化学位移范围大、灵敏度高、结构近似的化合物不易出现峰重叠^[27]等优势,在定量分析中应用广泛。研究拟选择¹⁹F qNMR技术,以三氟乙酸为内标,测定茶叶中氟含量,可为茶叶及其制品中总氟的数据监控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要仪器设备

全数字化超导核磁共振谱仪:AVANCE III 600 MHz型,德国 Bruker 公司;

超纯水系统:Purelab Chorus 型,英国 ELGA 公司;

刀式捣磨仪:GM 300 型,德国 Retsch GmbH 公司;

强制对流通用烘箱:UF 110 PLUS 型,德国 Memmert 公司;

电子天平:ME 204 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

粉末压片机:FW-5 型,天津市拓普仪器有限公司;

卤素分析前装置:WBL5-1 型,含充氧装置、点火装置,万邦仪表科技有限公司;

恒温振荡水浴锅:WNB 29 型,德国 Memmert 公司;

超声波双频清洗机:SB25-12DTS 型,宁波新芝生物科技有限公司。

1.1.2 材料与试剂

重水:纯度 99.9%,Cambridge Isotope Laboratories, Inc;

高纯氧:纯度 99.999%,四川天一科技股份有限公司武汉供气分公司;

氟化钠、碳酸铵、柠檬酸钠、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)、三氟乙酸:分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

测试茶叶样品:湖北省食品质量监督检验研究院;

茶叶(绿茶粉)中氟质控样品(P24307):广州谱恩科

学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 谱仪测定条件 在前人^[28]的基础上,根据仪器硬件条件,对谱仪测定条件适当修改。脉冲序列为 zgfhgqn,采样点数 64 000,采样时间 0.961 2 s,扫描次数 32 次,谱宽 34 091 Hz,观察道中心频率偏置 -56 468 Hz,去耦道中心频率偏置 4 801 Hz,脉冲宽度 12.0 μs,测定温度 298 K。采用 t1irpg 脉冲序列,确定谱仪的测定参数延迟时间 d_1 。

1.2.2 内标物选择及氟标准曲线 称取 0.200 0 g 三氟乙酸于 100 mL 容量瓶中配制含氟当量为 1.0 mg/mL 的三氟乙酸溶液,将氟化钠于 120 °C 烘干 2 h,准确称取 0.221 0 g,加水溶解,定容至 100 mL,摇匀,浓度为 1.0 mg/mL,进一步配制质量浓度为 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 20.0 μg/mL 溶液,均含氟当量为 10.0 μg/mL 的三氟乙酸溶液。精密移取 540 μL 标准溶液,60 μL 重水于核磁管中,混匀。按 1.2.1 所述方法采集¹⁹F NMR 谱图,考察标物三氟乙酸与目标物氟标准溶液的分离情况,确定内标物;以目标物、内标物峰面积之比为纵坐标,目标物、内标物质量浓度之比为横坐标,考察线性关系。

1.2.3 样品前处理 参照文献^[19-20],试样经捣磨仪粉碎、过 40 目筛,于 80 °C 烘干至恒重,称取约 0.50 g 茶叶试样,压片后放入氧弹坩埚中,于氧弹反应釜内加入 15 mL 20 mmol/L 碳酸铵溶液作为吸收液,拧紧氧弹盖,缓慢充入 3.0 MPa 纯氧,将氧弹置于振荡水浴中,点火燃烧灰化,充分反应后开启放气阀,加入金属螯合剂,用温水少量多次润洗、超声,定容至 50 mL,过 0.45 μm 滤膜,待测。按 1.2.1 所述方法采集核磁氟谱,比较加入不同金属螯合剂(柠檬酸钠溶液、EDTA-2Na 溶液、柠檬酸钠—EDTA-2Na 混合溶液,均含氟当量为 10.0 μg/mL 的三氟乙酸)对氟谱信号的影响。

1.2.4 数据处理及计算公式 使用 Bruker Topspin 3.5 软件对谱图进行相位和基线校正,对内标及目标峰进行峰面积积分,按式(1)计算积分结果。

$$X = \frac{m_{\text{std}} \times M_x \times (A_x/n_x)}{m \times M_{\text{std}} \times (A_{\text{std}}/n_{\text{std}})}, \quad (1)$$

式中:

X ——待测物含量,mg/kg;

m ——称样量,g;

m_{std} ——每 50.0 mL 含有内标物的质量,μg;

M_x ——待测物分子量;

M_{std} ——内标分子量;

A_x ——待测物定量峰信号面积;

A_{std} ——内标物定量峰信号面积;

n_x ——待测样品包含的氟原子数,按 F^- 计为 1;

n_{std} ——内标物包含的氟原子数,按 CF_3COOH 计为 3。

2 结果与分析

2.1 延迟时间 d_1 的选择

使用 NMR 定量分析时,一定要保证选择足够长的延迟时间 $d_1 (\geq 5 \times T_1)$,否则对结果影响很大^[28]。试验通过 t1irpg 脉冲序列,测定三氟乙酸和氟化钠的延迟时间 d_1 ,分别为 3.0 s 和 1.6 s,故使用三氟乙酸为内标测定样品中氟离子时,选择 d_1 为 15.0 s。

2.2 内标物及定量峰的选择

使用内标进行定量分析过程中,需要保证内标物质峰与待测物质峰良好分离。加入一定量的内标溶液及氟化钠标准溶液,加入 10% D_2O ,于 1.2.1 所述条件进行 ^{19}F NMR 测试,测试谱图见图 1。

图 1 中 $\delta = -120$ 的尖锐单峰为氟化钠信号峰, $\delta = -75$ 的尖锐单峰为三氟乙酸信号峰,与文献^[28]相符,被测定物质的定量峰与内标物的定量峰完全分离,说明使用三氟乙酸作为内标具有可行性。

2.3 线性关系的确定

取质量浓度为 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 20.0 $\mu g/mL$ 溶液(均含氟当量为 10.0 $\mu g/mL$ 的三氟乙酸溶液)进行线性关系考察。以样品积分面积与内标物的积分面积比(S_1/S_2)为纵坐标,以样品的浓度与内标物的质量浓度比(C_1/C_2)为横坐标,结果见图 2。

由图 2 可知,当样品质量浓度为 2.0~20.0 $\mu g/mL$ 时, S_1/S_2 与 C_1/C_2 呈良好的线性关系,回归方程为 $y = 1.0271x + 0.0378$,回归系数 $R^2 = 0.9995$,进一步说明使用三氟乙酸作为内标对样品中氟进行定量分析是可行的。

2.4 金属螯合剂的选择

氟离子作为性质活泼的阴离子之一,易与 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 等金属阳离子形成络合物从而会影响测定,GB 19965—2005 通过添加柠檬酸钠屏蔽金属离子,也有学者^[29]通过添加 EDTA-2Na 络合金属 Al 元素。试验选取 2.50% 柠檬酸钠溶液和 1.25% EDTA-2Na 溶液作

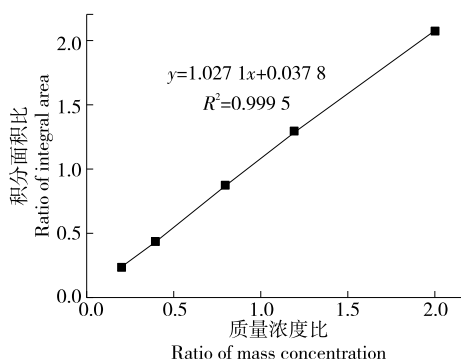


图 2 积分面积与质量浓度线性关系

Figure 2 Linear relationship between integral area and concentration

为金属螯合剂,考察金属螯合剂添加与否、不同金属螯合剂添加量对测定结果的影响。

结果表明,在不添加金属螯合剂和只添加 1.25% EDTA-2Na 溶液 5 mL 时,经过氧弹燃烧后的样品在 $\delta = -119$ 处无目标峰出现,如图 3(c)和图 3(d)所示;图 3(b)中,在添加 2.50% 柠檬酸钠溶液 5 mL 时,样品在 $\delta = -119$ 处出现目标峰,但峰型较差,定量困难;而在添加金属混合螯合剂(1.25% EDTA-2Na 溶液、2.50% 柠檬酸钠溶液)5 mL 时,样品在 $\delta = -119$ 处目标峰峰型良好,如图 3(a)所示,通过增加扫描时间,即可对目标物质进行定量分析。这可能是由于不同螯合剂对不同价态金属螯合作用不同,进一步将性质活泼的络合态氟元素,从与金属络合的状态下释放出来。另外,增加金属螯合剂至 10 mL 时结论一致,但不同金属混合螯合剂添加量对峰响应强度有一定影响。

进一步添加 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mL 不同水平的金属混合螯合剂,比较目标峰响应强度,见图 4。结果表明,未添加金属混合螯合剂时无目标峰响应,金属混合螯合剂添加至 5.0 mL 后响应强度趋于稳定,继续添加 7.5, 10.0 mL 金属混合螯合剂,信号响应强度无明显变化,说明在试样称样量为 0.5 g 水平下,金属混合螯合剂与溶液中的金属离子充分络合。故氧弹反应完全,添加 5.0 mL 金属混合螯合溶液为宜。

2.5 方法学考察

2.5.1 最低检测浓度 依据《中国药典》(2015 版)第 4 部通则,以 $S/N \geq 3$ 时确定最低检测浓度,在 1.2.1 所述条件下,当 δ 为 $-70 \sim -130$,测定时间为 8 min 31 s 时,最低检测浓度为 2.0 $\mu g/mL$ 。

2.5.2 重复性试验 选取茶叶(绿茶粉)中氟质控样品(P24307)、砖茶样品,按 1.2.3 所述方法,重复测定 6 次,氟质控样品典型测试谱图如图 5 所示,定义三氟乙酸峰面积为 1.000 0(原始积分数据 3 568 081.9),目标峰氟离子面积为 0.293 7(原始积分数据 1 047 966.5)。测试结果如表 1 所示,其相对偏差为 6.04%~6.98%,方法重复性

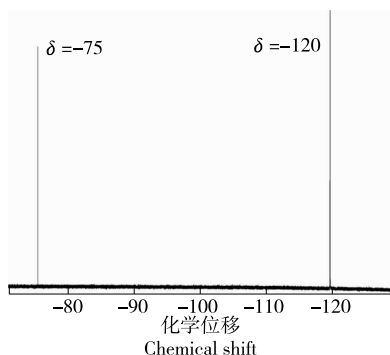


图 1 内标物与目标物的 ^{19}F qNMR 谱图

Figure 1 ^{19}F qNMR spectra of internal standard and target

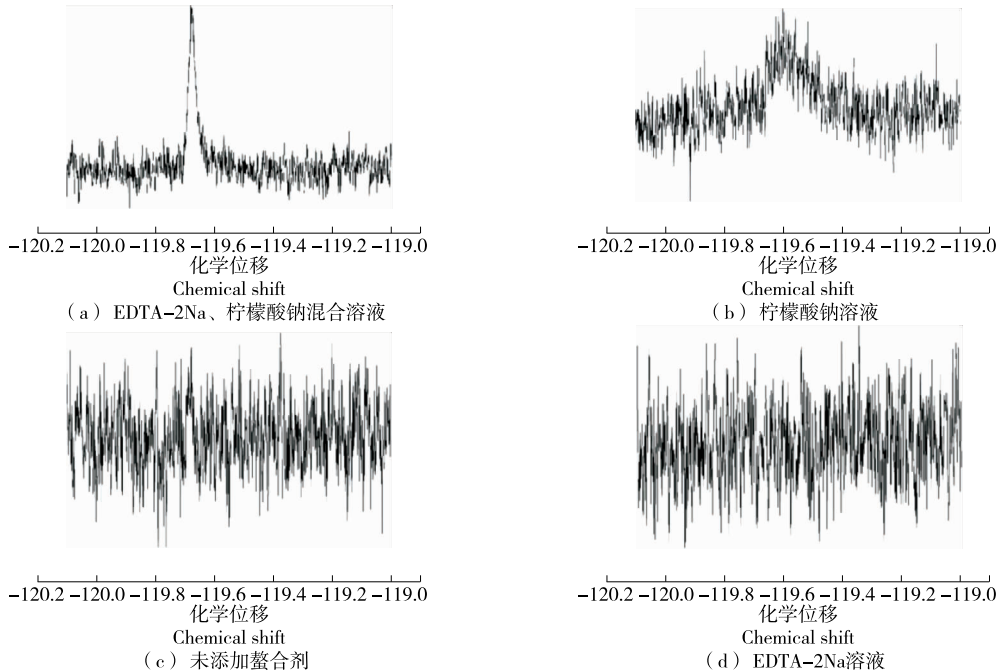


图 3 螯合剂对响应强度的影响
Figure 3 The effect of different chelating agent on response intensity

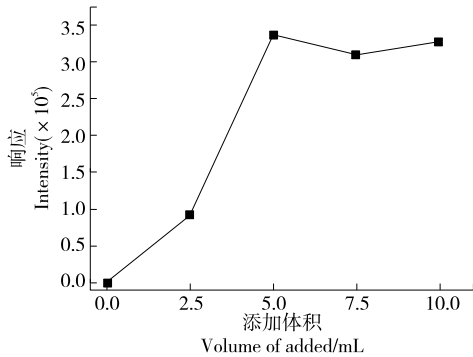


图 4 不同体积螯合剂对响应响度的影响
Figure 4 The effect of different volumes of chelating agent on response intensity

良好。另外,茶叶(绿茶粉)中氟质控样品(P24307)中位值为 319 mg/kg, $|Z| \leq 2.0$ 时测试值范围为 258 ~ 380 mg/kg,测试值为 301 mg/kg,测试结果满意。

2.5.3 精密度试验 随机选取茶叶样品,通过 ^{19}F qNMR 平行测定总氟含量 6 次,定义三氟乙酸峰面积为 1.000 0,对目标峰积分,计算相对峰面积,6 次积分面积结果相对偏差为 2.50%,表明使用 ^{19}F qNMR 测定总氟含量具有较

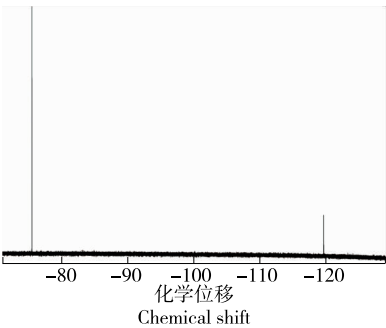


图 5 典型样品测试谱图
Figure 5 The typical spectrum of test sample

高的精密度。

2.5.4 回收率试验 茶叶样品基质(1 226 mg/kg)中添加氟含量分别为 200,400,2 000 mg/kg 三水平的标准溶液,每个水平平行测定 3 次,计算回收率和相对偏差,结果如表 2 所示,加标回收率为 96.3%~107.0%,相对偏差为 4.20%~6.07%。

3 结论

采用氧弹燃烧对样品进行前处理,以三氟乙酸为内

表 1 重复性试验

Table 1 Repetitive experiment of the method

样品	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次	6 次	平均值	相对偏差/%
绿茶	303	289	301	294	307	310	301	6.98
砖茶	1 218	1 191	1 205	1 265	1 225	1 251	1 226	6.04

表 2 回收率试验

Table 2 Average spiked recoveries and relative standard deviations of the method

添加水平/ (mg · kg ⁻¹)	实测含量/ (mg · kg ⁻¹)	回收率/%	相对偏差/%
200	1 440	107.0	6.07
400	1 617	97.7	4.20
2 000	3 153	96.3	4.32

标,在无外部校准曲线的情况下,结合¹⁹F qNMR 对茶叶中的总氟进行快速定量分析,填补中国使用¹⁹F qNMR 测定茶叶样品总氟含量的技术空白,30 min 内可完成单个样品分析,检测效率高,方法准确、稳定性良好,具有一定的实用性。在对茶叶样品总氟含量的分析测定中,可以考虑添加混合螯合剂,进一步释放与金属离子络合的氟元素。该方法在灵敏度上存在一定的局限,后续研究中可考虑优化谱仪脉冲条件、采用变温试验等方式来提高检测灵敏度。

参考文献

- [1] 高慧敏. 茶多糖对氟离子的吸附特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016: i.
- [2] 郭艳芬. 灰化—离子色谱法测定食品中的氟化物[J]. 微量元素与健康研究, 2016, 33(4): 58-59.
- [3] ANA L G M, MARIELE S N, ROCHELE S P, et al. A sample preparation method for fluoride detection by potentiometry with ion-selective electrode in medicinal plants[J]. Journal of Fluorine Chemistry, 2020, 231: 109459.
- [4] 汤晓佳, 格桑卓嘎, 西洛, 等. 拉萨市儿童饮茶型地氟病流行现状[J]. 中国学校卫生, 2020, 41(4): 573-575.
- [5] 刘淑娟, 钟兴刚, 覃事永, 等. 茶叶氟含量现状及控氟措施研究进展[J]. 茶叶通讯, 2016, 43(3): 41-45.
- [6] 黄鑫, 宋晓维, 陈玉琼. 茶树吸收富集氟的机制研究进展[J]. 茶叶科学, 2016, 36(6): 551-556.
- [7] FUNG K F, ZHANG Z Q, WONG J W C, et al. Fluoride contents in tea and soil from tea plantations and the release of fluoride into tea liquor during infusion [J]. Environmental Pollution, 1999, 104: 197-205.
- [8] 蔡芸梅, 彭传燧, 李成林, 等. 三个品种茶树氟富集特性及其在亚细胞中的分布[J]. 中国农业科学, 2013, 46(8): 1 668-1 675.
- [9] 孙殿军, 孙玉富. 砖茶含氟综述[J]. 中国地方病学杂志, 2002, 21(6): 515-518.
- [10] 阮建云, 杨亚军, 马立峰. 茶叶氟研究进展: 累积特性、含量及安全性评价[J]. 茶叶科学, 2007, 27(1): 1-7.
- [11] 马立峰, 石元值, 阮建云, 等. 我国茶叶氟含量状况研究[J]. 农业环境保护, 2002, 21(6): 537-539.
- [12] 白学信. 砖茶高氟的原因调查[J]. 茶叶科学, 2000, 20(1): 77-79.
- [13] 刘超, 吴方正, 傅柳松, 等. 茶叶中的氟含量及测定方法研究[J]. 农业环境保护, 1998, 17(3): 132-135.
- [14] SHU W S, ZHANG Z Q, LAN C Y, et al. Fluoride and aluminium concentrations of tea plants and tea products from Sichuan province, PR China[J]. Chemosphere, 2003, 52: 1 475-1 482.
- [15] 刘晓静. 茶园土壤—茶树—茶汤系统中氟和铝的迁移、转化特征及饮茶型氟中毒的防治探索[D]. 贵阳: 中国科学院地球化学研究所, 2006: 41.
- [16] 陈小强, 黄奕, 祈勇刚, 等. 一种利用超微青砖茶粉制作的奶茶固体饮料及其制备方法: 11187477.0[P]. 2017-05-24.
- [17] 中华人民共和国卫生部. 砖茶含氟量: GB 19965—2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 1-3.
- [18] 朱晓静, 房峰祥, 张月华, 等. 茶叶及茶多糖中氟测定前处理方法的比较研究[J]. 茶叶科学, 2015, 35(2): 145-150.
- [19] 章骅, 陈旭艳, 彭杨思. 氧弹燃烧—离子色谱法测定茶叶中的氟[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(2): 172-176.
- [20] 蔡芸梅, 侯如燕, 郜红建, 等. 氧弹燃烧—离子色谱法测定茶叶中氟的含量[J]. 茶叶科学, 2009, 29(3): 225-230.
- [21] LÚCIA P S P, MENNO S, ROBERT V, et al. Quantitative analysis of amygdalin and prunasin in *Prunus serotina* Ehrh. using ¹H-NMR spectroscopy[J]. Phytochem Anal, 2014, 25: 122-126.
- [22] CHARLOTTE S, JOSE G N, JAMES B M, et al. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 25: 51-59.
- [23] SHEN Shi, YANG Xing, SHI Ya-qin. Application of quantitative NMR for purity determination of standard ACE inhibitors[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 114: 190-199.
- [24] 张伟, 黄挺, 徐蓓, 等. 苏丹红 I、II 标准物质纯度的核磁共振法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(2): 194-198.
- [25] GREGORY K W, SHAILENDRA K. Expanding the analytical toolbox: Pharmaceutical application of quantitative NMR[J]. Anal Chem, 2014, 86: 11 474-11 480.
- [26] 王强, 汪茂田, 张志权. 核磁共振法定量测定替米考星含量[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6): 101-103.
- [27] 李临生, 李燕, 兰云军, 等. ¹⁹F NMR 的特点[J]. 波谱学杂志, 2007, 24(3): 353-364.
- [28] 华俊杰, 朱海菲, 李育. ¹⁹F 核磁共振定量法测定含氟漱口液中氟化钠的含量[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(6): 518-520.
- [29] 宋政, 周陶鸿, 胡家勇, 等. 面制品及糕点中含铝食品添加剂的测定[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(4): 142-147.