

茶葉中過氯酸鹽之檢驗研究

洪瑋靖 張嫻楨 張美華 廖家鼎 高雅敏 王德原 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

過氯酸鹽為一新型環境污染物，攝入後會引起甲狀腺功能失調，影響胎兒及嬰幼兒大腦發育，對孕婦及胎兒健康影響最為顯著。茶葉種植過程中接觸灌溉用水、肥料及土壤等均可能造成過氯酸鹽殘留，為歐盟關切的議題之一，105年2月亦有相關外媒與情報導，故建立茶葉中過氯酸鹽之檢驗方法有迫切需要。本研究於茶葉樣品加入過氯酸鹽同位素內部標準品後，先以去離子水混勻，再以含1%甲酸之甲醇溶液萃取，經離心後取濾液稀釋，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph-tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)配合多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式進行分析，並以綠茶空白檢體添加標準品製作之檢量線進行定量。確效試驗係於綠茶樣品中添加過氯酸鹽0.2及0.4 mg/kg，執行5重複添加回收試驗，平均回收率分別為78.0及99.0%，變異係數分別為5.8及6.6%，定量極限(limit of quantification, LOQ)為0.1 mg/kg，低於歐盟暫定之限量標準(0.75 mg/kg)。以建立之方法針對20件東南亞進口茶葉及5件台灣本土茶葉進行檢測，檢驗結果：進口茶葉部分，1件越南綠茶檢出0.2 ppm，1件越南紅茶檢出4.77 ppm，其餘18件未檢出；本土茶葉部分，1件烏龍茶及1件綠茶粉分別檢出0.68及0.83 ppm，其餘3件未檢出。本研究方法具良好的準確度及重複性，已公開為建議檢驗方法供各界參考使用。

關鍵詞：過氯酸鹽、茶葉、液相層析串聯質譜儀

前 言

105年2月初，香港媒體報導，德國發現產自中國的茉莉花茶樣本含有過氯酸鹽0.4 mg/kg⁽¹⁾。雖然目前國內除普洱茶外禁止中國茶葉輸入台灣，但擔心中國茶葉可能經由東南亞國家進口至國內，而台灣每年亦自東南亞國家大量進口茶葉，故市售茶葉中過氯酸鹽的含量引起關注。

過氯酸鹽易溶於水，在水中會解離為過氯酸根離子(ClO_4^-)，其為結構穩定的強氧化劑，常見有過氯酸銨(NH_4ClO_4)、過氯酸鉀(KClO_4)

及過氯酸鈉(NaClO_4)等。過氯酸鹽的來源可分為自然及人為兩種，微量的過氯酸鹽自然存在於大氣及特定土壤環境中；過氯酸鹽在人造產品上的應用即為主要來源，其廣泛應用於航太工業、軍火工業及煙火製造等，作為火箭、飛彈、煙火、炸藥的推進劑，發射衛星、施放煙火時也會在大氣中產生，使過氯酸鹽污染至空氣，甚至進一步到水源中。此外，安全氣囊、肥料、自來水消毒用次氯酸會進一步生成過氯酸，而造成土壤和水受到過氯酸鹽污染。過氯酸鹽為一種新型的環境污染物，人暴露過氯酸鹽最常見的方式即為飲食與水⁽²⁾。由於過氯酸

鹽極易溶於水，並隨著水源遷移造成污染範圍不斷擴大，因此其對於飲用水的水源污染問題也很值得重視。過氯酸鹽的危害主要是針對甲狀腺⁽²⁾，人若攝取過量的過氯酸鹽，其進入體內後會抑制碘而降低甲狀腺素的合成，引起甲狀腺功能失調，亦會影響胎兒及嬰幼兒大腦發育，對孕婦及胎兒的影響最為顯著。

聯合國糧農組織/世界衛生組織聯合食品添加物專家委員會(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)提出過氯酸鹽每日暫定最大容許攝取量(provisional maximum tolerable daily intake, PMTDI)為10 $\mu\text{g/kg b.w./day}$ ⁽³⁾。歐洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)訂定過氯酸鹽的每日容許攝取量(tolerable daily intake, TDI)為0.3 $\mu\text{g/kg b.w./day}$ ⁽⁴⁾。美國環境保護署訂定過氯酸鹽之口服暴露參考劑量(reference dose, RfD)為0.7 $\mu\text{g/kg b.w./day}$ ⁽⁵⁾。目前各國均尚未針對茶葉訂有過氯酸鹽的限量標準，歐盟正在研究茶葉中過氯酸鹽的合理含量，並提出茶葉中過氯酸鹽之參考建議值為0.75 mg/kg ⁽⁶⁾。

在分析技術方面，目前國際間針對過氯酸鹽的檢驗方法係以離子層析串聯質譜法(ion chromatography-tandem mass spectrometry, IC/MS/MS)⁽⁷⁾及液相層析串聯質譜法(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)⁽⁸⁻¹⁰⁾為主，樣品經萃取及固相萃取管柱淨化後分析。文獻以IC/MS/MS進行分析，瓶裝茶飲料中過氯酸鹽之平均含量為0.15 $\mu\text{g/L}$ ，其中最高者為0.62 $\mu\text{g/L}$ ⁽¹¹⁾；罐裝茶中過氯酸鹽含量為0.785 $\mu\text{g/L}$ ，罐裝麥茶則低於5 ng/L ⁽¹²⁾。另文獻以LC/MS/MS搭配線上固相萃取裝置(online SPE)進行分析，瓶裝茶飲料中過氯酸鹽之含量介於1.55 - 4.83 $\mu\text{g/L}$ ⁽⁹⁾。考量儀器使用之普遍性，本研究選擇LC/MS/MS進行茶葉中過氯酸鹽檢驗方法之開發，並據以進行市售茶葉中過氯酸鹽之背景值調查。

材料與方法

一、材料與試藥

(一)檢體來源

本研究之茶葉檢體係105年由食藥署區管中心提供(20件東南亞進口茶葉)及購自台北地區超市(5件台灣本土茶葉)，共計25件。東南亞進口茶葉依產地來源分為斯里蘭卡1件、越南14件及印尼5件。

(二)溶劑與標準品

甲醇採用液相層析級，購自德國Merck公司(Darmstadt, Germany)；甲酸為試藥特級，購自日本Wako公司(Osaka, Japan)。過氯酸鹽對照用標準品(1000 $\mu\text{g/mL}$)購自美國Sigma-Aldrich公司(Saint Louis, MO, USA)；過氯酸鹽-¹⁸O₄同位素內部標準品(100 $\mu\text{g/mL}$)購自美國Cambridge Isotope Laboratories公司(Tewksbury, MA, USA)。

(三)器材

離心管(15 mL, PP材質)、容量瓶(2 mL、5 mL及20 mL)、濾膜(孔徑0.22 μm ，PVDF材質)。

(四)內部標準溶液之配製

精確量取過氯酸鹽-¹⁸O₄同位素內部標準品1 mL，以去離子水定容至10 mL，供作內部標準溶液。

(五)標準溶液之配製

精確量取過氯酸鹽對照用標準品0.5 mL，以去離子水定容至20 mL，作為標準原液，冷藏貯存備用。臨用時，取適量標準原液以去離子水稀釋至0.5 - 25 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

二、儀器設備

(一)高效液相層析串聯質譜儀：包括液相層析儀(Acquity UPLC[®] System, Waters, USA)和串聯式質譜儀(Xevo TQ-S micro, Waters,

USA)

(二)液相層析管柱：1.7 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm (Acquity UPLC[®] BEH HILIC, Waters, USA)

(三)離心機(Allegra 25R centrifuge, Beckman Coulter, USA)

(四)旋渦混合器(Vortex Genie-2, Scientific Industries, USA)

(五)高速組織研磨振盪均質機(2010 GenoGrinder[®], SPEX SamplePrep, USA)

(六)吹氮濃縮裝置(MG-220, EYELA, Japan)

(七)快速粉碎機(DM-6, 佑崎機械有限公司, 台灣)

(八)去離子水製造機(Millipore milli-Q, Millipore, USA)

三、檢液之調製

將檢體磨碎混勻後，取約0.5 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液0.1 mL及去離子水4.9 mL，混合均勻，再以含1%甲酸之甲醇溶液定容至10 mL，以高速組織研磨振盪均質機於1000 rpm振盪1分鐘，於5000 $\times$ g離心10分鐘。取上清液0.5 mL (a)以去離子水定容至5 mL (b)，經濾膜過濾後，供作檢液。

四、檢量線之製作

精確量取標準溶液0.1 mL及內部標準溶液0.1 mL，添加於空白檢體中，加入去離子水4.8 mL，混合均勻，再以含1%甲酸之甲醇溶液定容至10 mL，後續依檢液之調製步驟配製檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜儀分析，就過氯酸鹽與內部標準品之波峰面積比，與對應之過氯酸鹽添加濃度，製作0.5 - 25 ng/mL之檢量線。

五、儀器參數之設定

(一)UPLC分析條件

移動相溶液：取0.1%甲酸溶液與甲醇以4 : 6 (v/v)之比例混勻。

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：5 μL 。

(二)質譜條件

離子化模式：電灑離子化負離子(negative ion electrospray ionization, ESI)。

毛細管電壓(capillary voltage)：3.0 kV。

離子源溫度(ion source temperature)：150 $^{\circ}\text{C}$ 。

溶媒揮散溫度(desolvation temperature)：400 $^{\circ}\text{C}$ 。

進樣錐氣體流速(cone gas flow rate)：10 L/hr。

溶媒揮散流速(desolvation flow rate)：900 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision energy)如表一。

表一、過氯酸鹽及內部標準品之多重反應偵測模式參數

分析物	離子對		進樣錐電壓(V)	碰撞電壓(eV)
	前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)		
過氯酸鹽	99	> 83 ^a	40	18
	101	> 85	38	18
過氯酸鹽- ¹⁸ O ₄ (I.S.)	107	> 89	40	18

a. 定量離子對

六、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各5 μL ，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依第八節儀器參數條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度鑑別之，並依下列計算式求出檢體中過氯酸鹽之含

量(mg/kg)：

檢體中過氯酸鹽之含量(mg/kg) =

$$\frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由檢量線求得檢液中過氯酸鹽之濃度
(ng/mL)

V：萃取檢體之溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得($\leq 100\%$)，容許範圍如表二。

表二、相對離子強度容許範圍

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20 - 50	± 25
> 10 - 20	± 30
≤ 10	± 50

七、添加回收試驗

取磨碎混勻後的綠茶空白檢體約0.5 g，置於離心管中，加入1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 標準溶液0.1 mL及10 $\mu\text{g/mL}$ 內部標準溶液0.1 mL，使標準品添加濃度為0.2及0.4 mg/kg。依檢液之調製步驟進行五重複試驗，同時操作空白試驗(sample blank)，計算五重複試驗間之平均回收率(%)及變異係數(coefficient of variation, CV)，以評估本方法之準確度及精密度。

八、定量極限之評估

取標準溶液分別進行空白樣品之一系列添加回收試驗，依前述方法進行分析，就所得波峰之訊號強度計算其訊噪比(S/N ratio)，就分析物之定量離子訊噪比 ≥ 10 且回收率及變異係數符合食藥署食品化學確效規範⁽¹³⁾之最低濃度為檢驗方法之定量極限(limit of quantification,

LOQ)。

結果與討論

一、儀器分析條件

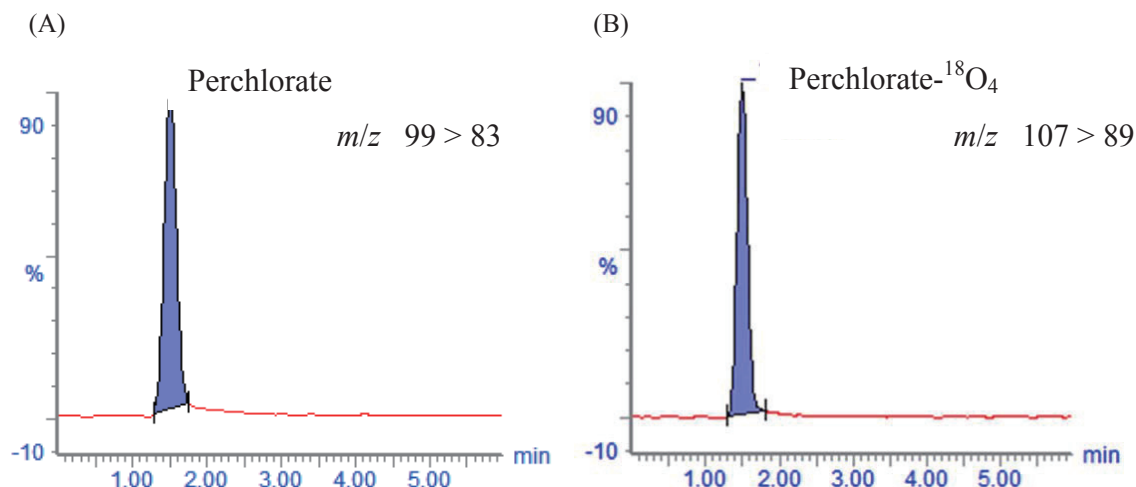
首先，為建立液相層析及質譜儀之最適參數，參考歐盟極性農藥快速檢驗方法(QuPPe method)⁽⁸⁾中針對過氯酸鹽之分析方法(Method 1.4)，結果發現以Hypercarb管柱進行分析時，化合物之滯留時間無法達到穩定，故改以文獻⁽¹⁰⁾使用之HILIC管柱進行測試，該管柱適用於極性化合物之分析，結果可達到穩定的滯留時間。經評估後，本實驗之層析及質譜條件分別參考Chen等人⁽¹⁰⁾及歐盟參考實驗室⁽⁸⁾之研究。過氯酸鹽及過氯酸鹽-¹⁸O₄同位素內部標準品之MRM層析圖譜如圖一，結果顯示此分析方法可於5分鐘內完成分析，層析峰形理想。

二、方法確效

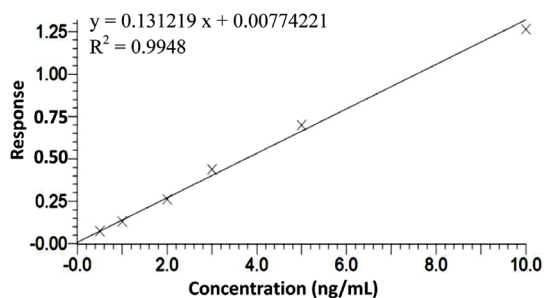
(一)定量方式評估

分別建立標準曲線(calibration curve in solvent)及基質匹配檢量線(matrix-matched calibration curve)，並依基質效應計算公式評估之：基質效應(%) = (基質匹配檢量線之斜率 - 標準曲線之斜率)/標準曲線之斜率 $\times 100\%$ ，求得之基質效應絕對值大於15%，故視為有基質效應，顯示茶葉基質對過氯酸鹽具有明顯的基質干擾，且後添加基質匹配檢量線無法校正回收率，故以空白綠茶製備檢量線，以添加濃度為x軸，過氯酸鹽與內部標準品之波峰面積比為y軸，進行線性回歸分析，結果顯示於0.5 - 25 ng/mL範圍之線性相關性良好(圖二)。

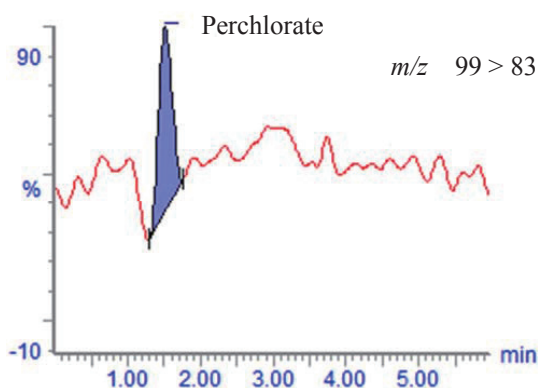
含0.1 mg/kg過氯酸鹽之綠茶檢液層析圖如圖三所示，過氯酸鹽波峰之訊號/雜訊比(S/N ratio)為20，此待測物波峰之S/N ratio



圖一、以LC/MS/MS分析0.02 $\mu\text{g/mL}$ 過氯酸鹽標準品(A)及0.01 $\mu\text{g/mL}$ 內部標準品(B)之MRM層析圖譜



圖二、茶葉中過氯酸鹽之基質匹配檢量線



圖三、綠茶中添加0.1 mg/kg過氯酸鹽之MRM層析圖譜

大於10，符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範⁽¹³⁾。評估結果設定本方法之LOQ

為0.1 mg/kg。

(二)添加回收試驗

取綠茶空白檢體進行添加回收試驗，以評估本方法之適用性。表三之結果顯示0.2及0.4 mg/kg添加濃度之回收率分別為78.0及99.0%，CV值分別為6.6及5.8%。回收率介於70 - 120%，CV值均小於15%，評估結果符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範⁽¹³⁾。

表三、綠茶中添加過氯酸鹽之回收率及變異係數

Compound	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^a (%)	Coefficient of variation (CV, %)
Sodium perchlorate	0.2	78.0	6.6
	0.4	99.0	5.8

a. n=5

三、茶葉中過氯酸鹽含量調查

以本研究開發之檢驗方法分析不同來源之茶葉中過氯酸鹽含量，結果顯示：20件東南亞進口茶葉有1件綠茶及1件紅茶之過氯酸鹽含量分別為0.2及4.77 mg/kg，兩者之產地皆為越南，其餘18件均未檢出；5件台灣本土茶葉有1

件烏龍茶及1件綠茶粉分別檢出0.68及0.83 mg/kg，其餘3件均未檢出。

然而目前國際間皆主要針對茶飲料等液態樣品檢測其中之過氯酸鹽含量，文獻中並未以茶葉進行背景調查，故茶葉檢體中檢出過氯酸鹽之可能來源尚待進一步探討。

結 論

本研究已完成茶葉中過氯酸鹽檢驗方法之開發，此方法操作簡單、快速，方法之LOQ (0.1 mg/kg)低於歐盟針對茶葉中過氯酸鹽暫定之限量標準(0.75 mg/kg)。本研究調查20件東南亞進口及5件台灣本土茶葉，可供未來建立背景資料之參考。已研擬「茶葉中過氯酸鹽之檢驗方法」，並於105年10月13日公開為建議檢驗方法⁽¹⁴⁾供各界參考使用。如未來我國訂定相關標準，本方法即可因應法規需求，落實執法。

參考文獻

1. Chemischen und Veterinäruntersuchungsämter (CVUA) Stuttgart. 2015. Perchlorate residues in plant-based food - an update. [http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=5&ID=2094&lang=EN&Pdf=No].
2. US Department of Health and Human Services Public Health Services - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2008. The toxguide: perchlorate, perchlorate salts. [<https://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-162.pdf>].
3. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2010. Summary of toxicological evaluations - perchlorate. Seventy-second meeting. Summary and Conclusions. [www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf].
4. European Food Safety Authority (EFSA) CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2014. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of perchlorate in food, in particular fruits and vegetables. EFSA J. 12: 3869. [<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3869>].
5. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2005. Integrated Risk Information System (IRIS) Chemical Assessment Summary - Perchlorate (ClO₄⁻) and perchlorate salts. [http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/1007_summary.pdf#nameddest=rfd].
6. European Commission Directorate General Health and Food Safety. 2015. Statement as regards the presence of perchlorate in food. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_perchlorate_statement_food_update_en.pdf].
7. United States Food and Drug Administration (US FDA). 2005. Rapid determination of perchlorate anion in foods by ion chromatography-tandem mass spectrometry. [<https://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm077793.htm>].
8. EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM). 2015. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPE-Method)-version 8.1. [http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPPE.pdf].

9. Lin, S.L., Lo, C.Y. and Fuh, M.R. 2012. Quantitative determination of perchlorate in bottled water and tea with online solid phase extraction high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1246: 40-47.
10. Chen, L., Chen, H., Shen, M. and et al. 2010. Analysis of perchlorate in milk powder and milk by hydrophilic interaction chromatography combined with tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 58: 3736-3740.
11. Asami, M., Kosaka, K. and Yoshida, N. 2009. Occurrence of chlorate and perchlorate in bottled beverages in Japan. *J. Health Sci.* 55: 549-553.
12. El Aribi, H., Le Blanc, Y.J.C., Antonsen, S. and Sakuma, T. 2006. Analysis of perchlorate in foods and beverages by ion chromatography coupled with tandem mass spectrometry (IC-ESI-MS/MS). *Anal. Chim. Acta* 567: 39-47.
13. 食品藥物管理署。2012。食品化學檢驗方法之確效規範。[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?mid=133&id=10975&t=s>]。
14. 食品藥物管理署。2016。茶葉中過氯酸鹽之檢驗方法。[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?mid=133&id=21891&t=s>]。

Investigation on the Test Method for Perchlorate in Tea

WEI-CHING HUNG, HSIEN-CHEN CHANG, MEI-HUA CHANG,
CHIA-DING LIAO, YA-MIN KAO, DER-YUAN WANG
AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Perchlorate is a new environmental pollutant and can cause thyroid dysfunction. It occurs as a contaminant arising from the irrigation water, fertilizers and soil during tea tree cultivation. Recently, residue perchlorate in tea reported by foreign media in Feb 2016 led to great concern to the European Union and caught our attention to develop a test method of perchlorate in tea. In this study, the tea sample was added with an internal standard and then dissolved in deionized water. The sample solution was extracted with methanol containing 1% formic acid and centrifuged. The filtrate was further diluted before analysis by a liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC/MS/MS) in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The calibration curve was established by adding standard to the blank green tea sample. The green tea samples spiked with 0.2 and 0.4 mg/kg perchlorate standards were used for the recovery tests. The average recoveries were 78.0 and 99.0%, respectively. The coefficients of variation were 5.8 and 6.6%, respectively. The limit of quantification (LOQ) of this method was 0.1 mg/kg, which was lower than the EU limit of perchlorate (0.75 mg/kg) as a reference for intra-union trade. Twenty imported tea samples from Southeast Asia and 5 Taiwan local tea samples were evaluated by the developed method. The results showed that the concentrations of perchlorate in one Vietnamese green tea and one Vietnamese black tea were 0.2 and 4.77 ppm, respectively; and those in the remaining 18 samples from Southeast Asia perchlorate was not detected. One oolong tea and one green tea powder were found to contain 0.68 and 0.83 ppm of perchlorate, respectively; and those in the remaining 3 Taiwanese samples perchlorate was not detected. The method showed good accuracy and reproducibility. A full version of the method was published and made available to the public.

Key words: perchlorate, tea, LC/MS/MS