

液相色谱串联质谱法测定混合果酱中展青霉素含量

刘丽丽*, 胡欢欢

(保定海关, 保定 071051)

摘要: 目的 建立混合果酱中展青霉素含量测定的液相色谱串联质谱方法。**方法** 样品用乙腈提取, MAX 固相萃取柱净化, 用液相色谱串联质谱进行检测。**结果** 展青霉素在 0.5~100.0 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 回收率为 95.2%~105.8%, 相对标准偏差为 3.14%~4.98%, 检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 该方法准确、可靠, 快速、灵敏度高, 可为混合果酱的质量控制提供检测依据, 同时满足我国 GB 2761-2011 对水果制品中展青霉素残留量的检测要求。

关键词: 展青霉素; 液相色谱串联质谱; 混合果酱

Determination of patulin in mixed jam by liquid chromatography tandem mass spectrometry

LIU Li-Li*, HU Huan-Huan

(Baoding Customs, Baoding 071051, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of patulin in mixed jam by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted with acetonitrile, purified with MAX solid phase extraction column and detected by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Results** Patulin had good linear relationships in the range of 0.5~100.0 ng/mL, and the correlation coefficient was greater than 0.999. The recoveries were in the range of 95.2%~105.8%, with the relative standard deviation were 3.14%~4.98%, the limit of detection was 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limit of quantitation was 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** This method is accurate, reliable, rapid and sensitive, which provides the basis for the quality control of mixed jam, at the same time, it meets the requirements of GB 2761-2011 for the detection of residual penicillin in fruit products.

KEY WORDS: patulin; liquid chromatography tandem mass spectrometry; mixed jam

1 引言

展青霉素(patulin)又称棒曲霉素, 是曲霉属、青霉属、丝衣霉属等菌种的次级代谢产物, 是一种神经毒素, 具有潜在的致癌、致畸和致突变性, 且可以稳定存在^[1]。其广泛存在于霉变水果中, 在酸性环境下非常稳定, 在碱性条

件下活性降低, 易分解^[2]。国家标准 GB 2761-2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中规定水果制品中展青霉素最高允许量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3]。

近 5 年, 测定展青霉素的方法主要有液相色谱串联质谱法^[4-8]、高效液相色谱法^[9-11]。液相色谱虽然精密度高, 但是在检测过程中受糠醛影响, 易出现假阳性^[12]; 液相色谱

*通讯作者: 刘丽丽, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 13931697750@163.com

*Corresponding author: LIU Li-Li, Engineer, Baoding Branch of Shijiazhuang Customs Technology Center, Shijiazhuang, No.788 Chaoyang North Street of Baoding, Shijiazhuang 071051, China. E-mail: 13931697750@163.com

谱串联质谱法灵敏度高、可以测定子离子, 能够准确定性, 被国内外广大学者用于水果制品展青霉素的测定。但是研究对象多为苹果、苹果汁、山楂及果酒, 对混合果酱的报道甚少, 混合果酱由多种水果组成, 基质相对比较复杂。建立一种适合混合果酱的准确快速的检测方法, 为混合果酱的质量控制提供依据则为当下之需^[13-15]。

本文建立了混合果酱中展青霉素含量测定的液相色谱串联质谱法, 对前处理方法进行了优化, 该方法灵敏度高, 准确性好, 以期混合果酱中展青霉素的检测提供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

6500+ 超高效液相色谱-三重四级杆质谱仪(美国 SICEX 公司); Agilent 12 管固相萃取装置(美国 Agilent 公司); Sigma 3-30K 高速离心机(德国 Sigma 公司); Turbopak 氮吹仪(美国 Biotage 公司); CLXXUVFM2 超纯水机(英国 ELGA 公司)。

展青霉素标准物质 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 上海安谱公司); 展青霉素同位素标准物质 $^{13}\text{C}_3$ -patulin (0.25 mg, 加拿大 TRC 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 天津光复公司); 乙酸乙酯(色谱纯, 西陇科学); 乙酸(色谱纯, 天津光复公司); 乙酸铵(分析纯, 天津光复公司); 果胶酶(30000 U/g, 阿拉丁试剂上海有限公司); 实验用水为超纯水。

MAX 固相萃取柱(150 mg, 6 mL, 美国 Waters 公司), 使用前用 6 mL 甲醇, 6 mL 水活化。

混合果酱: 保定某食品公司提供。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 展青霉素标准溶液 10 μL 至 10 mL 容量瓶中, 用 4% 乙酸水定容至刻度得到 100 ng/mL 的标准工作液。准确移取 10 μL 展青霉素同位素内标溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 至 10 mL 容量瓶中, 用 4% 乙酸水定容至刻度, 得到浓度为 100 ng/mL 的同位素内标工作液($^{13}\text{C}_3$ -patulin)。

2.2.2 试样提取

称取 1 g 混合果酱样品于 50 mL 离心管中, 加入 5 μL C_3 -展青霉素工作液, 再加入 5 mL 水涡旋混匀, 加入 5 mL 乙酸乙酯, 涡旋提取 3 min, 于 4000 r/min 离心 5 min, 上层清液于鸡心瓶中, 5 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并上层提取液, 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至干, 5 mL 14% 乙酸水溶液溶解, 待净化。

2.2.3 净化

待净化液转移至活化好的 MAX 固相萃取小柱, 控制流速 1 s/滴, 样液接近液面时, 用 3 mL 5 mmol/L 乙酸铵溶液淋洗, 再用 3 mL 水淋洗, 弃去淋洗液, 真空泵抽干 MAX 小柱, 5 mL 乙酸乙酯洗脱, 控制洗脱速度 1 s/d, 收集洗脱液, 洗脱液中加入 20 μL 冰乙酸, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹至近干, 用 1 mL 4% 乙酸水溶液定容, 涡旋溶解 30 s, 过 0.22 μm 针式再生纤维素滤膜, 供液相色谱串联质谱检测。

2.3 仪器条件

2.3.1 液相色谱条件

液相色谱柱: kinetex F5(50 mm \times 30 mm, 2.6 μm), 流动相: 乙腈:水=10:90(V:V), 等度洗脱, 流速 0.25 mL/min, 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.2 质谱条件

离子源: ESI-; 离子源温度: 500 $^{\circ}\text{C}$, 检测方式: 多反应监测模式(multiple response monitoring, MRM); 电喷雾电压: -4500 V; 气帘气: 30 psi, 雾化气: 60 psi, 辅助加热气: 55 psi, 具体参数见表 1。

3 结果与分析

3.1 前处理条件的优化

3.1.1 提取液的选择

实验分别用乙腈、乙酸乙酯提取混合果酱中的展青霉素, 实验过程证明: 用乙腈做提取液, 需要增加盐析分离水分的过程, 并且提取液中色素含量较多, 展青霉素回收率 76.5%, 结果不理想。而乙酸乙酯做提取液, 杂质少, 操作过程简单, 展青霉素回收率 95.2% 以上, 因此选用乙酸乙酯作为混合果酱中展青霉素的提取液。

表 1 展青霉素及其同位素的 MRM 参数
Table 1 Detection parameters of patulin and its isotope

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/ms	去簇电压/V	碰撞能量/eV
展青霉素	153.1	109.0*	100	-12	-13
		81.2	100	-12	-18
C3-展青霉素	156.1	111.0	100	-21	-13

注: *代表定量离子。

3.1.2 果胶酶对样品中展青霉素结果的影响

果胶酶的作用主要是将果胶酶解成小分子半乳糖醛酸,降低样品提取液粘度。王立亚等^[4]研究山楂制品中展青霉素采取了室温酶解过夜的方法,王少敏等^[5]研究山楂、乌梅中展青霉素采取了 40 °C 酶解 2 h 的方法,杨庆懿等^[11]研究山楂中展青霉素采用不酶解直接提取的方法,各方法均得到了较好的回收效果。实验针对混合果酱中展青

霉素是否需要酶解做了数据分析。

分别取 15 份均匀阳性混合果酱样品,展青霉素含量 100 μg/kg。3 份不加果胶酶直接提取,3 份加 50 μL 果胶酶 40 °C 超声酶解 2 h,3 份加 100 μL 果胶酶 40 °C 超声酶解 2 h,3 份加 50 μL 果胶酶室温酶解过夜,3 份加 100 μL 果胶酶室温酶解过夜,按照 2.2 的实验方法进行分析,结果见表 2。

表 2 果胶酶对展青霉素结果的影响($n=3$)
Table 2 The influence of pectinase on patulin results ($n=3$)

果胶酶的量/ μL	条件	展青霉素峰面积	C3-展青霉素峰面积	结果/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
0	直接提取	2118092	1924645	112
50	40 °C 超声 2 h	874427	683742	108
100		2097496	1632489	108
50	室温过夜	1427363	1156156	105
100		1976231	1500085	112

从表 2 的结果可以看出,果胶酶的添加量和提取条件并未对展青霉素的结果产生影响,因此混合果酱中展青霉素的含量检测不使用果胶酶,无需酶解过程,这样大大缩短了检测周期,节约检测成本。

3.1.3 洗脱液中加入乙酸的必要性

分别取 6 份 5 mL 乙酸乙酯于 10 mL 离心管中,各加入 100 ng 展青霉素标准溶液和 50 ng C3-展青霉素溶液,其中 3 份加入 20 μL 乙酸混匀,3 份不加乙酸,于 40 °C 氮气吹干,1 mL 定溶液溶解,上机检测,结果显示未加乙酸的展青霉素及其内标峰面积均小于加乙酸的展青霉素及内标峰面积。表明展青霉素在非酸性环境下发生了降解,因此该实验洗脱液中需要加入乙酸,防止展青霉素降解。

3.2 方法学验证

3.2.1 线性关系

将 100 ng/mL 的展青霉素标准溶液用 4% 的乙酸水溶液稀释成 7 个不同浓度的溶液,浓度为: 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0、100.0 ng/mL,各加入 10 μL 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 C3-展青霉素溶液,按优化好的条件进行测定,以浓度为横坐标,展青霉素和其内标峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线,在 0.5~100.0 ng/mL 浓度范围内,回归方程 $Y=0.5930X-4.53245e^{-4}$,相关系数 r^2 大于 0.999,线性关系良好。

3.2.2 检出限和定量限

取 6 份阴性混合果酱样品各 1 g,加入展青霉素标准溶液 0.5 ng,按照本方法进行前处理,进行检测,得出实际

样品中展青霉素在 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平的信噪比为: $S/N=16.5$ 。按 $S/N=3$ 为检出限计算,该方法的检出限为: 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.2.3 准确度和精密度

取混合果酱阴性样品 1.0 g,共 18 份,平均分 3 组进行加标实验,分别添加 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度水平。回收率结果见表 3。

表 3 展青霉素回收率和精密度结果($n=6$)
Table 3 Recovery and precision results of patulin ($n=6$)

加标值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	平均回收率%	RSD%
25	98.4	4.56
50	95.2	3.14
100	105.8	4.98

展青霉素不同水平下的回收率在 95.2%~105.8% 之间,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为在 3.14%~4.98% 之间,说明该方法检测混合果酱中展青霉素有较好的准确度和精密度。混合果酱中添加 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 展青霉素的定量离子色谱图见图 1。

3.2.4 实际样品的检测

将食品公司送检的 6 批混合果酱按照该方法进行检测,其中一批检出展青霉素含量为 110 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (图 2),其余为未检出(图 3)。

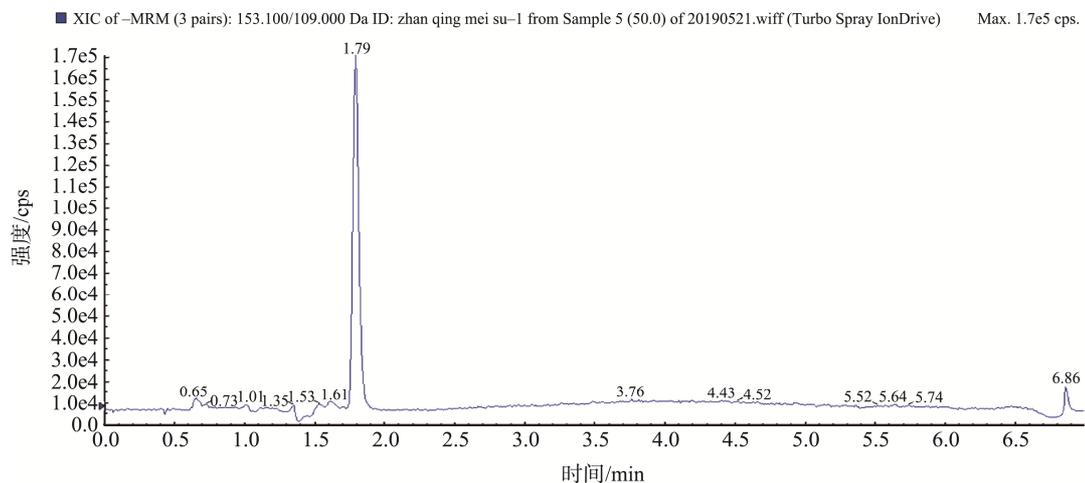


图 1 混合果酱中展青霉素(50 µg/kg)的定量离子色谱图
Fig.1 Quantitative ion chromatography of patulin at mixed jam of 50 µg/kg

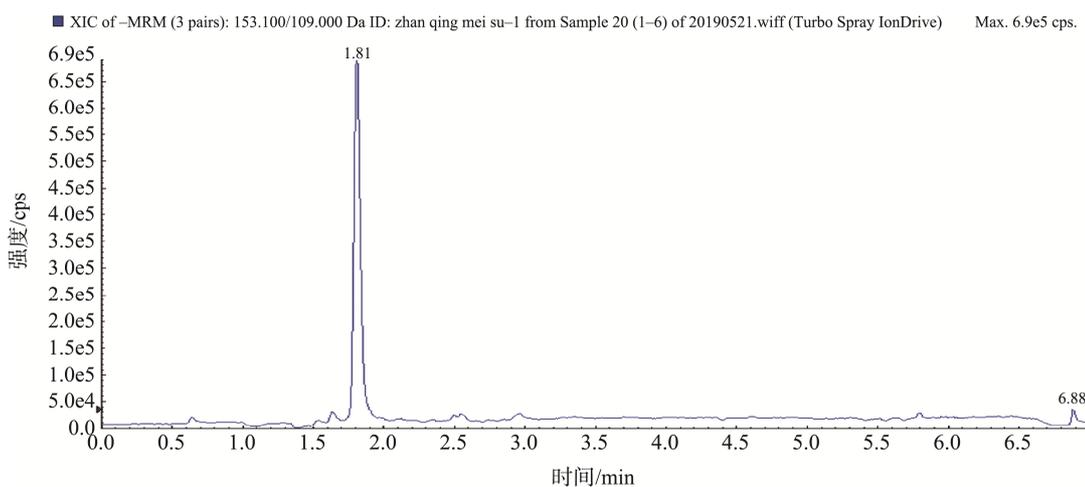


图 2 阳性混合果酱样品中展青霉素定量离子色谱图
Fig.2 Quantitative ion chromatography of patulin in positive mixed jam samples

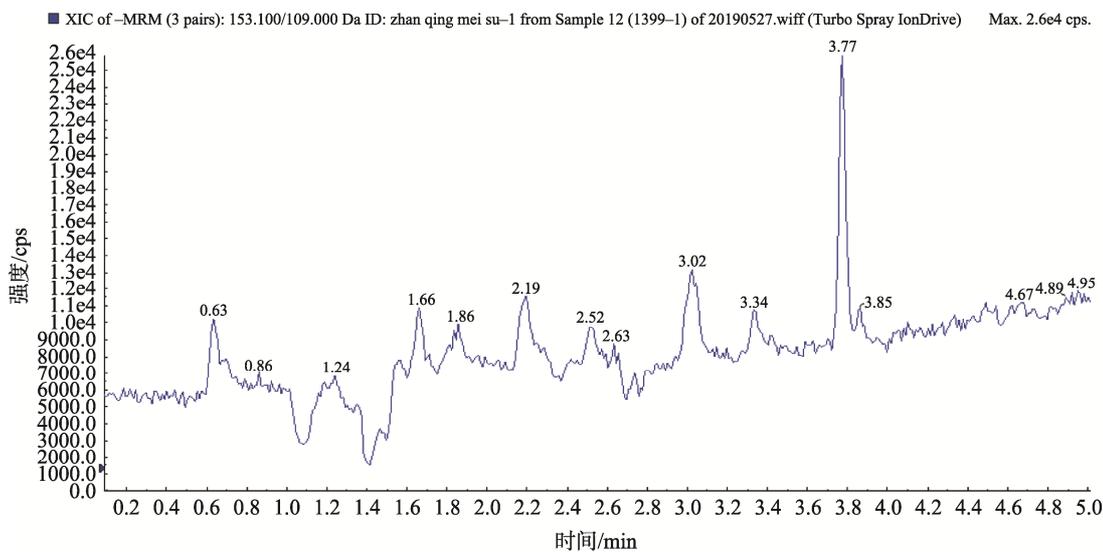


图 3 空白样品中展青霉素定量离子色谱图
Fig.3 Quantitative ion chromatography of patulin in the blank sample

4 结论与讨论

本文建立了混合果酱中展青霉素含量检测的液相色谱-串联质谱法。该方法采用乙酸乙酯提取, MAX小柱净化, 实验证明混合果酱中展青霉素的检测无需酶解过程, 缩短了检测时间, 提高了检测效率; 洗脱液浓缩前需要加乙酸以保护展青霉素不被分解, C3-展青霉素内标法定量, 克服基质效应。该方法定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率为 95.2%~105.8%, 灵敏度高和准确度较高, 阳性样品测试结果企业满意, 可为果酱食品公司中展青霉素检测的质量控制工作提供参考检测依据。

参考文献

- 王美琴, 陈俊美. 番茄内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 山西农业科学, 2007, 35(2): 55-58.
Wang MQ, Cheng JM. Isolation of endophytic bacteria and screening of antagonistic bacteria in tomato [J]. Shanxi Agric Sci, 2007, 35(2): 55-58.
- 王莹, 岳田利, 王丽. 棒曲霉素控制技术及其检测方法研究进展[J]. 农产品加工学刊, 2007, (3): 48.
Wang Y, Yu TL, Wang L. Research progress on control technology and detection methods of patulamyacin [J]. Acad Period Farm Prod Proc, 2007, (3): 48.
- GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
GB 2761-2017 National food safety standards-Limit of fungal toxins in food [S].
- 王立亚, 刘嘉飞, 李星星, 等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定固体山楂制品中的展青霉素[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 2975-2979.
Wang LY, Liu JF, Li XX, et al. Determination of patulin in hawthorn products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(12): 2975-2979.
- 王少敏, 张魁, 毛丹, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-三重四级杆液质法测定中药材中展青霉素[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(3): 337-340.
Wang SM, Zhang S, Mao D, et al. Determination of patulin in Chinese herbs by UHPLC-triple quadrupole MS with dispersive solid phase extraction [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(3): 337-340.
- 项瑜芝, 许娇娇, 蔡增轩, 等. 同位素稀释高效液相色谱-串联质谱法测定水果及其制品中的展青霉素[J]. 分析测试学报, 2016, 35(1): 54-60.
Xiang YZ, Xu JJ, Cai ZX, et al. Determination of patulin in fruit products by isotope dilution combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2016, 35(1): 54-60.
- 曾丽花. 高效液相色谱-质谱联用仪器检测果酒中的展青霉素[J]. 工程技术, 2017, 15(34): 105-107.
Zeng LH. Determination of penicillin in wine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Eng Technol, 2017, 15(34): 105-107.
- 芦智远, 王妍, 彭辉, 等. SPE-UPLC-MS/MS测定苹果汁中展青霉素的含量[J]. 中国食品添加剂, 2017, (4): 189-192.
Lu ZY, Wang Y, Peng H, et al. Determination of patulin in apple juice by SPE-UPLC-MS/MS [J]. Chin Food Addit, 2017, (4): 189-192.
- 吕伟超, 申书昌, 王超. 固相萃取-超高效液相色谱联用测定水果及果酱中的展青霉素[J]. 色谱, 2017, 35(11): 1160-1164.
Lv WC, Shen SC, Wang C. Determination of patulin in fruits and jam by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2017, 35(11): 1160-1164.
- 邓鸣, 朱斌, 宾春燕. 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法测定中成药中展青霉素[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2224-2226.
Deng M, Zhu B, Bin CY. Determination of patulin in Chinese patent medicine by molecular imprinting solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Chin Tradit Patent Med, 2014, 36(10): 2224-2226.
- 杨庆懿, 罗艳, 龙凌云, 等. HPLC法测定含山楂类保健食品中展青霉素的含量[J]. 中国药师, 2014, 17(11): 1984-1986.
Yang QY, Luo Y, Long LY, et al. HPLC method for determination of *Penicillium vulgare* in health food containing hawthorn [J]. Chin Med, 2014, 17(11): 1984-1986.
- 吴仲, 张勋. HPLC法同时测定山楂中展青霉素和5-羟甲基糠醛的含量[J]. 山西农业科学, 2018, 46(11): 1804-1807.
Wu Z, Zhang X. Simultaneous determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in hawthorn by HPLC [J]. J Shanxi Agric Sci, 2018, 46(11): 1804-1807.
- GB 5009.185-2016 食品安全国家标准 食品中展青霉素的测定[S].
GB 5009.185-2016 National food safety standard-Determination of patulin in food [S].
- 张仁松, 孙迪, 岳阳, 等. 食品中展青霉素检测方法研究新进展[J]. 食品安全导刊, 2019, (6): 115.
Zhang RS, Sun D, Yue Y, et al. New progress in the detection of patulin in food [J]. Chin Food Saf Magaz, 2019, (6): 115.
- 蔡艳, 陈川, 卢海青, 等. 苹果汁中展青霉素的超声降解效果研究[J]. 浙江万里学院学报, 2018, 31(6): 74-81.
Cai Y, Cheng C, Lu HQ, et al. Study on ultrasonic degradation of patulin in apple juice [J]. J Zhejiang Wanli Univ, 2018, 31(6): 74-81.

(责任编辑: 武英华)

作者简介

刘丽丽, 工程师, 主要研究食品质量与安全。

E-mail: 13931697750@163.com