

# 分散固相萃取-同位素稀释-HPLC-MS/MS 测定保健食品中的展青霉素

林伟杰, 励炯\*, 贾彦博, 王红青, 孙岚(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310017)

**摘要:** 目的 建立保健食品中展青霉素的分散固相萃取净化-同位素稀释高效液相色谱-串联质谱检测方法。方法 样品经酶解后, 经乙腈提取, 加无水硫酸镁、C<sub>18</sub>-N 以及 NH<sub>2</sub>-PSA 组成的净化剂后旋涡振荡, 对样品进行净化, 以 Waters Atlantis-T3(3.0 mm×50 mm, 5 μm)色谱柱分离, 流动相为乙腈-水(20:80), 负离子模式电喷雾电离, 配合多反应离子扫描(MRM)定性定量分析目标化合物。考察净化剂中无水硫酸镁、C<sub>18</sub>-N、NH<sub>2</sub>-PSA 的用量对加标回收率的影响, 优化主要的影响因素和实验条件。结果 展青霉素浓度在 5~500 μg·L<sup>-1</sup> 内线性关系良好,  $r^2 \geq 0.998 5$ ; 回收率为 85.7%~93.4%, RSD( $n=6$ ) 为 3.2%~7.0%; 定量限为 5.0 μg·kg<sup>-1</sup>。结论 该方法适用于保健食品中展青霉素残留的检测分析。

**关键词:** 高效液相色谱法; 串联质谱; 分散固相萃取; 同位素稀释; 展青霉素; 保健食品

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)19-2426-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.19.012

引用本文: 林伟杰, 励炯, 贾彦博, 等. 分散固相萃取-同位素稀释-HPLC-MS/MS 测定保健食品中的展青霉素[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(19): 2426-2430.

## Determination of Patulin in Health Products by HPLC-MS/MS with Isotope Dilution and Dispersive Solid Phase Extraction

LIN Weijie, LI Jiong\*, JIA Yanbo, WANG Hongqing, SUN Lan(*Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310017, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop an HPLC-MS/MS with isotope dilution and dispersive solid phase extraction method to determine patulin in health products. **METHODS** Enzymolysis samples were extracted with acetonitrile, and then purified by a mixture of anhydrous sodium sulfate, C<sub>18</sub>-N and NH<sub>2</sub>-PSA. The analysis was performed by a HPLC-MS/MS system with Waters Atlantis-T3(3.0 mm × 50 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile and water(20 : 80), and multiple reaction monitoring(MRM) mode with negative electrospray ionization was used. The effect of the dosages of anhydrous magnesium sulfate, C<sub>18</sub>-N and NH<sub>2</sub>-PSA in cleaning-up agent was studied. The main influence factors and analytical conditions were modified. **RESULTS** The linear calibration curve was obtained with  $r^2 \geq 0.998 5$ . The recoveries were ranged from 85.7% to 93.4%. RSD( $n=6$ ) ranged from 3.2% to 7.0%. The LOQ was 5.0 μg·kg<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** It is suitable for the determination of patulin in health products.

**KEYWORDS:** HPLC; tandem mass spectrometry; dispersive solid phase extraction; isotope dilution; patulin; health product

展青霉素又称棒曲霉素, 是一种有毒的真菌代谢产物, 是由部分曲霉、青霉产生的代谢产物。展青霉素主要污染水果及其制品, 尤其存在于变质的苹果、梨、山楂、苹果汁和山楂片中<sup>[1-2]</sup>。展青霉素是真菌的次生代谢产物, 对人及动物具有广泛而强烈的毒性作用。毒理学试验表明, 展青霉素具有影响生育、免疫和致癌等毒理作用, 同时也是一种神经毒素, 具有广泛的生物学活性<sup>[3-5]</sup>。因此许多国家均制订了水果及其制品中展青霉素的最高限量标准<sup>[6-7]</sup>。WHO 推荐展青霉素在苹果

汁中的最高限量标准为 50 μg·kg<sup>-1</sup>。我国食品安全国家标准 GB 2761-2011《食品中真菌毒素限量》已明确规定食品中水果制品(果丹皮除外)、果蔬汁类及酒类(仅限苹果和山楂)中展青霉素的限量值为 50 μg·kg<sup>-1</sup>。

目前文献报道较多的展青霉素检测方法主要有薄层色谱法<sup>[8]</sup>、气相色谱法<sup>[9]</sup>、液相色谱法<sup>[10-11]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[12-13]</sup>以及液相色谱-质谱法<sup>[14-16]</sup>等, 液相色谱法是目前普遍使用的方法之一, 但在实际样品的检测中仍存在假阳性和杂峰干扰的

基金项目: 浙江省食品药品监管系统科技计划项目(SP2018004)

作者简介: 林伟杰, 男, 硕士, 工程师 Tel: (0571)85460533  
Tel: (0571)85460529 E-mail: jokelee2@126.com

E-mail: 418407913@qq.com \*通信作者: 励炯, 男, 硕士, 副主任技

问题<sup>[17]</sup>。而液相色谱-质谱法兼具灵敏度高及抗干扰性强的优势,近年来广泛用于展青霉素的检测<sup>[18]</sup>。

近年来随着人们对健康的日益重视,健康产业越来越受到关注,市面上各种保健消费品层出不穷、琳琅满目,人们对保健品的安全问题也日益重视。通常在许多具有开胃和减肥作用的保健食品中常常会加入一味山楂,还有一些保健食品配方中会加入苹果原料等,一些不法商家常会以变质的山楂、苹果等作为原料,所以此类保健食品中展青霉素的污染也日益引起人们的重视。本研究采用分散固相萃取和净化技术来优化前处理方法,省去浓缩、固相小柱萃取或者净化柱等步骤,建立分散固相萃取净化-HPLC-MS/MS法检测保健食品中展青霉素的方法。

## 1 仪器与试剂

高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪(配 Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 6410 串联四级杆质谱仪,美国 Agilent 公司); Mili-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); N-EVP-111 氮吹浓缩仪(美国 Organomation Associates 公司); 4-16K 高速离心机(Sigma 公司); MS3 漩涡混合器(IKA 公司)。

展青霉素标准品(FERMENTEK 公司,批号: PAT009A; 纯度: 98.0%); <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标储备液(Biopure, 批号: 117083p; 25 mg·L<sup>-1</sup>); 甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司); 氯化钠、无水硫酸镁、乙酸均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司; 乙酸溶液(取 10 mL 乙酸加入 250 mL 水,混匀)、十八烷基键合硅胶吸附剂(C<sub>18</sub>-N)、NH<sub>2</sub>-丙基乙二胺吸附剂(NH<sub>2</sub>-PSA)均购自岛津技术公司; 果胶酶(美国 Sigma 公司,批号: SLBH8994V; 16 U·mg<sup>-1</sup>)。

## 2 方法

### 2.1 色谱和质谱条件

色谱柱: Waters Atlantis-T3(3.0 mm×50 mm, 5 μm); 流动相: 水-乙腈(80:20)。柱温 30 °C; 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 1 μL; 运行时间 3 min。

离子源: 电喷雾离子源(ESI), 负离子检测方式(ESI<sup>-</sup>); 多反应检测(MRM 模式); 干燥气温度 350 °C; 干燥气流速 10 L·min<sup>-1</sup>; 喷雾器压力 200 kPa; 毛细管电压 4 kV; 校准方法: 质量轴自

动调谐校正; 其他质谱分析参数见表 1。

表 1 展青霉素质谱分析参数

Tab. 1 MS parameters for patulin

| 化合物                                | 监测离子对( <i>m/z</i> ) | 裂解电压/V | 碰撞能量/eV |
|------------------------------------|---------------------|--------|---------|
| 展青霉素                               | 153>109*            | 70     | 3       |
|                                    | 153>81              |        | 5       |
| <sup>13</sup> C <sub>7</sub> -展青霉素 | 160>115*            | 70     | 3       |
|                                    | 160>86              |        | 5       |

注: \*为定量离子对。

Note: \* was the ion pair for quantitation.

## 2.2 样品制备

**2.2.1 提取** 准确称取 1.0 g(碧生源牌减肥茶,北京澳特舒尔保健品开发有限公司,批号: 04160406)样品于 50 mL 聚丙烯离心管中,精密加入 50 μL <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标工作液,加入 10 mL 去离子水与 75 μL 果胶酶混匀,酶解过夜。精密加入乙腈 20 mL,加入 2 g 氯化钠和 5 g 无水硫酸镁,旋涡混合 1 min,以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 的速度离心 5 min,取上清液于 10 mL 聚丙烯离心管中,待净化。

**2.2.2 净化** 在待净化样液中加入净化剂(内含 1 500 mg 无水硫酸镁,400 mg C<sub>18</sub>-N 和 400 mg NH<sub>2</sub>-PSA),旋涡 1 min 混匀,以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 的速度离心 5 min,精密取 5 mL 上清液转移至试管中,加入 20 μL 乙酸,40 °C 水浴下氮吹至干,精密加入 1 mL 乙酸溶液,旋涡混匀 1 min 溶解残渣,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

## 2.3 标准溶液的制备

精密取展青霉素标准品约 1.0 mg,分别用甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶,用乙酸溶液定容,作为标准品储备溶液(浓度约为 100 mg·L<sup>-1</sup>)。精密吸取上述标准储备溶液适当体积于 10 mL 量瓶中,用乙酸溶液稀释成浓度为 1 000 μg·L<sup>-1</sup> 的标准品中间溶液。精密吸取适当体积的标准品中间溶液,配置成 5, 10, 50, 100, 200, 500 μg·L<sup>-1</sup> 的标准品系列溶液。同时精密吸取 <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标储备液一定体积,用乙酸溶液稀释成浓度为 1 000 μg·L<sup>-1</sup> 的内标工作液。

## 3 结果与讨论

### 3.1 质谱条件优化

分别取展青霉素和 <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标浓度为 1 mg·L<sup>-1</sup> 的标液用于质谱条件优化。采用 ESI 进行离子化,分别用 ESI<sup>+</sup>模式和 ESI<sup>-</sup>模式进

行全扫描, 结果均在 ESI<sup>-</sup>模式下响应最好, 故本方法采用负离子模式进行检测。

在负离子模式下对展青霉素和 <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标进行母离子扫描, 扫描范围为 *m/z* 120~200, 得到[M-H]<sup>-</sup>峰。确定母离子之后, 调节适当的裂解电压, 使得各母离子一级扫描时相应最高。确定母离子及其裂解电压, 继续进行子离子扫描, 以得到最佳的二级质谱条件, 经优化得到展青霉素和 <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标的二级质谱优化参数(表 1)。最终将优化后得到的定量定性离子对、碰撞能量作为展青霉素和 <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标的 MRM 扫描参数。

### 3.2 色谱条件的优化

先后考察了 Waters CORTECS-C<sub>18</sub>(3.0 mm×50 mm, 2.7 μm)、Waters XBridge-C<sub>18</sub>(3.0 mm×50 mm, 3.5 μm) 和 Waters Atlantis-T3(3.0 mm×50 mm, 5 μm) 3 种色谱柱的分离效果。普通的 C<sub>18</sub> 柱(如性能比较卓越的 CORTECS-C<sub>18</sub> 和 XBridge-C<sub>18</sub>) 在分析展青霉素时容易发生拖尾, 容易造成目标峰前倾。而 T3 采用三官能团 C<sub>18</sub> 烷基键合相, 保证键合密度能提升极性化合物的保留, 并且 100% 水相流动相兼容。专有的端基封尾技术比传统的 TMS 封尾方法能够将更多的游离硅羟基反应完全。因此, 键合和端基封尾技术的完美结合保证色谱柱的卓越性能, 在低 pH 下具有较好的色谱柱柱效。用 Waters Atlantis-T3 分析展青霉素和 <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标效果良好, 峰型符合实验要求。结果见图 1。

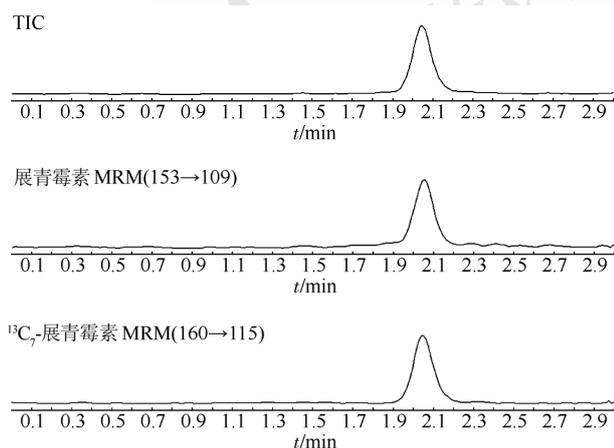


图 1 展青霉素标准和 <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-展青霉素同位素内标总离子图和 MRM 定量离子图

Fig. 1 TIC and MRM of patulin and <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-patulin reference standards

选择合适的流动相能直接影响目标化合物的灵敏度等。在水相中加入一定比例的乙酸铵、甲酸铵以及甲酸能促进离子化, 但是会对展青霉素有抑制作用, 造成展青霉素离子化效率低, 响应较低, 而有机相采用甲醇时, 目标峰会出现拖尾现象, 本研究选用极性相对较高的乙腈, 采用水相-乙腈体系作为流动相, 结果表明展青霉素离子化效率较高, 峰型较好, 保留时间为 2.1 min。

### 3.3 净化方式的优化

样品经乙腈提取剂提取后, 提取液经由含一定比例的无水硫酸镁、C<sub>18</sub>-N 以及 NH<sub>2</sub>-PSA 组成的净化剂进行处理来减少样品基质效应。无水硫酸镁、C<sub>18</sub>-N、NH<sub>2</sub>-PSA 是常用的分散固相萃取净化吸附剂, 其中无水硫酸镁(一般用量为 1 000~2 000 mg)主要用于除去样液中的水分, 以保证其他吸附剂的吸附能力, C<sub>18</sub>-N(一般用量为 200~500 mg)用于除去脂肪类杂质, NH<sub>2</sub>-PSA(一般用量为 200~500 mg)主要吸附色素、金属离子、有机酸等。本研究通过对 3 种净化机组分的用量配比进行正交试验优化, 按照 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交试验设计, 比较 50 μg·L<sup>-1</sup> 加标浓度水平下各因素组合的回收率和净化效果选择最佳配比组合。正交试验因素见表 2。正交试验结果表明, 使用 1 500 mg 无水硫酸镁、400 mg C<sub>18</sub>-N 以及 400 mg NH<sub>2</sub>-PSA 组成的净化剂可以获得良好的净化效果, 回收率为 90.7%, 其余的配比均<86%。

表 2 无水硫酸镁、C<sub>18</sub>-N 及 NH<sub>2</sub>-PSA 用量配比的正交试验因素水平

Tab. 2 Orthogonal test factors and levels of the dosages of MgSO<sub>4</sub>, C<sub>18</sub>-N and NH<sub>2</sub>-PSA

| 水平 | 因素                          |                              |                                |
|----|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
|    | MgSO <sub>4</sub><br>(A)/mg | C <sub>18</sub> -N<br>(B)/mg | NH <sub>2</sub> -PSA<br>(C)/mg |
| 1  | 1 000                       | 200                          | 200                            |
| 2  | 1 500                       | 400                          | 400                            |
| 3  | 2 000                       | 500                          | 500                            |

### 3.4 基质效应评价

采用基质匹配校准曲线的斜率与溶剂标准校准曲线的斜率两者之比来考察, 比值越接近 1, 则基质效应越小。结果表明, 样品(碧生源牌减肥茶)基质效应为 0.65, 基质效应明显。由于保健食品的基质多样复杂, 产生的基质效应也不尽相同,

所以本研究采用同位素稀释内标法定量以消除或降低基质效应,有效保证了定性、定量结果的准确、可靠性。

### 3.5 线性关系、定量限

取“2.3”项下已配置的标准品系列溶液,分别进样 1  $\mu\text{L}$ ,以展青霉素与其同位素浓度比值( $X$ ,  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对展青霉素与其同位素定量离子的峰面积比值( $Y$ )建立标准曲线,进行线性关系考察,线性方程为  $Y=9.116 3X-0.005 1$ ,  $5\sim 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  内线性关系较好( $r^2$  为 0.998 5)。

取空白样品(碧生源牌减肥茶,北京澳特舒尔保健品开发有限公司,批号: 04160406)1 g,加入适当稀释的标准品溶液和  $50 \mu\text{L}^{13}\text{C}_7$ -展青霉素同位素内标工作液,按法制备供试品溶液,得信噪比为 3 和 10 时展青霉素的检测限(limits of detection, LOD)与定量限(limits of quantification, LOQ)分别为 1.5,  $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

### 3.6 方法回收率、精密度及稳定性试验

取空白样品(碧生源牌减肥茶,北京澳特舒尔保健品开发有限公司,批号: 04160406),每份称取样品 1 g,分别加入适量的标准品溶液和  $50 \mu\text{L}^{13}\text{C}_7$ -展青霉素同位素内标工作液,使供试品溶液最终加样浓度分别为 25, 50,  $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,平行 6 份,按样品制备方法制备供试品溶液,检测含量,计算回收率,结果显示 3 个浓度水平的平均回收率为 85.7%~93.4%,RSD 为 3.2%~7.0%。结果见表 3。

表 3 回收率试验结果

Tab. 3 Result of recoveries test

| 添加浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 平均回收率( $n=6$ )/% | RSD( $n=6$ )/% |
|----------------------------------------|------------------|----------------|
| 25                                     | 85.7             | 5.9            |
| 50                                     | 93.4             | 3.2            |
| 100                                    | 92.1             | 7.0            |

取  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的标准品溶液,1 d 内 5 次重复进样,计算日内精密度为 0.7%;每天重复进样 3 次,连续进样 3 d,计算日间精密度为 1.2%。

### 3.7 实际样品检测

利用本研究建立的前处理方法和色谱质谱条件完成了 10 批次含有苹果和山楂的保健食品的检测,对杭州市市售的 10 批次保健食品中的展青霉素进行检测。检测结果发现,10 批次保健食品中

均未检出展青霉素残留,其中样品(碧生源牌减肥茶,北京澳特舒尔保健品开发有限公司,批号: 04160406)图谱见图 2。

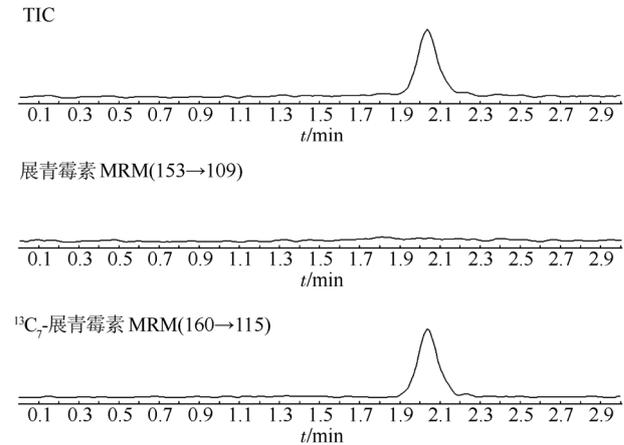


图 2 样品总离子图和 MRM 定量离子图

Fig. 2 TIC and MRM of samples

## 4 结论

本研究建立了分散固相萃取净化-同位素稀释 HPLC-MA/MS 测定保健食品中展青霉素的分析方法,同时优化了色谱质谱条件以及提取和净化条件。该方法无需太复杂的样品前处理条件,酶解后经乙腈提取,使用 1 500 mg 无水硫酸镁、400 mg  $\text{C}_{18}$ -N 以及 400 mg  $\text{NH}_2$ -PSA 组成的净化剂进行净化吸附,提高了分析效率,同时提高了分析方法的选择性和灵敏度。

## REFERENCES

- [1] COLE R L. Handbook of toxic fungal metabolites [M]. New York: Academic Press, 1981.
- [2] 周玉春, 杨美华, 许军. 展青霉素的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(2): 112-116.
- [3] LLEWELLYN G C, MCCAY J A, BROWN R D, et al. Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F1 mice [J]. Food Chem Toxicol, 1998, 36(12): 1107-1115.
- [4] GÜLDENIZ S. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(12): 2019-2024.
- [5] BARKAI-GOLAN R, PASTER N. Mycotoxins in Fruits and Vegetables [M]. San Diego, CA: Elsevier, 2008.
- [6] Food and Agricultural Organization, Worldwide regulations for mycotoxins, a compendium [R]. FAO Food and Nutrition Paper, 1996.
- [7] ZHANG X Y, WANG W H, DENG L L, et al. Research progress in patulin of fruits and its products [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2017, 38(11): 379-384.
- [8] Association of Official Analytical Chemists Official Method

974. 18 Patulin in Apple Juice: Thin-Layer Chromatographic Method [S]. AOAC.
- [9] COLLIN S, BODART E, BADOT C, et al. Identification of the main degradation products of patulin generated through heat detoxication treatments [J]. J Institute Brewing, 2008, 114(2): 167-169.
- [10] QIU N X, NIU P F, SU X J. Simultaneous determination of lactic acid fumaric acid, 5-HMF and pamlin in apple juice by RP-HPLC [J]. Food Sci(食品科学), 2008, 29(6): 312-317.
- [11] 牛华, 冯雷, 牛之瑞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定果汁中的展青霉素[J]. 色谱, 2012, 30(9): 957-961.
- [12] AL-HAZMI N A. Determination of patulin and ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia [J]. Saudi J Biol Sci, 2010, 17(4): 353-359.
- [13] 李锋格, 姚伟琴, 田延河, 等. 特丁基二甲基硅烷衍生化气相色谱-质谱联用法快速测定苹果汁中的棒曲霉素[J]. 色谱, 2010, 28(7): 720-723.
- [14] GONG X M, REN Y P, DONG J, et al. Determination of 18 mycotoxin contaminants in peanuts and oils by gel permeation chromatography and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal (分析测试学报), 2011, 30(1): 6-12.
- [15] XIANG Y Z, XU J J, CAI Z X, et al. Determination of patulin in fruit products by isotope dilution combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2016, 35(1): 54-60.
- [16] VACLAVIKOVA M, DZUMAN Z, LACINA O, et al. Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC-MS/MS analytical procedure [J]. Food Control, 2015(47): 577-584.
- [17] WANG S M, ZHANG S, CHEN J, et al. Determination of 4 aflatoxins in Chinese herbs by UHPLC-MS/MS [J]. Chin J Heal Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2014, 24(2): 190-193.
- [18] VACLAVIKOVA M, DZUMAN Z, LACINA O, et al. Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC-MS/MS analytical procedure [J]. Food Control, 2015(47): 577-584.

收稿日期: 2018-11-08

(本文责编: 蔡珊珊)