

# 高效液相色谱-串联质谱联用法测定果汁中的展青霉素、乐果和多菌灵

许欣欣, 毛丽莎, 陈慧玲, 刘红河

广东省深圳市疾病预防控制中心, 广东深圳 518055

**摘要:****目的:** 建立高效液相色谱-串联质谱法同时测定果汁中展青霉素、乐果和多菌灵的方法。**方法:** 果汁采用 QuEChERS 前处理方法, 以 C<sub>18</sub> 色谱柱为分离柱, 以水-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 用高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS), 电喷雾电离 (ESI), 多反应监测 (MRM) 模式检测, 外标法同时定量测定展青霉素、乐果和多菌灵。**结果:** 方法的线性范围展青霉素为 5-500 µg/L、乐果为 0.1-10 µg/L、多菌灵为 0.1-10 µg/L, 线性相关系数在 0.9991-0.9999 之间, 展青霉素检出限为 5.0 µg/L、乐果检出限为 0.01 µg/L、多菌灵检出限为 0.01 µg/L; 本方法平均加标回收率 82.2%-90.0% 之间; 相对标准偏差 (RSD) 均小于 5.3%。**结论:** 该方法可应用于同时定量检测果汁中展青霉素、乐果和多菌灵, 操作简单、快速、准确可靠。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 展青霉素; 乐果; 多菌灵; QuEChERS

**Determination of patulin, dimethoate and carbendazim in juice by liquid chromatography-tandem mass spectrometric**

Xu xinxin, Mao lisha, Chen hailing, Liu honghe

Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China

**Abstract:****Objective:** A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method was established for determination of patulin, dimethoate and carbendazim in juice. **Methods:** Using QuEChERS pretreatment method, the separation was performed on a C<sub>18</sub> column with the gradient elution of water and acetonitrile. The patulin, dimethoate and carbendazim in juice were detected by HPLC-MS/MS with electrospray ionization (ESI) in mode of multiple reaction monitoring. Quantification was performed by external standard calibration. **Results:** The calibration curves of three compounds showed good linearity in range of 5-500 µg/L for patulin, 0.1-10 µg/L for dimethoate, 0.1-10 µg/L for carbendazim, with correlation coefficient in range of 0.9991-0.9999. The detection limit of the method was 5.0 µg/L for patulin, 0.01 µg/L for dimethoate, 0.01 µg/L for carbendazim. The recoveries of two spiking levels from 82.2% to 90.0%, and RSDs of the three compounds were all less than 5.3%. **Conclusion:** The method for determination of patulin, dimethoate and carbendazim in juice by HPLC-MS/MS had the advantages of simple operation, rapidity and accuracy.

**Key words:** LC-MS/MS; patulin; dimethoate; carbendazim; QuEChERS

展青霉素是由青霉属、曲霉属和根霉等 10 多种真菌代谢产生的真菌毒素, 主要存在于霉烂的水果及制品中, 是影响水果及果汁饮料质量的主要因素之一<sup>[1]</sup>, 乐果 (dimethoate) 和多菌灵 (carbendazim) 是常用农药我国食品标准中规定<sup>[2]</sup>, 苹果、山楂及其制品中展青霉素限量指标为 50 µg/kg 和国际上的建议相一致。同时, 我国和国际组织对苹果中乐果和多菌灵的残留都有严格的要求<sup>[3]</sup>, 也是我国果汁出口的必检项目之一。

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、液相色谱法<sup>[4-5]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[6-7]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[8-10]</sup>、免疫化学法<sup>[11]</sup>和毛细管微乳液电动色谱法<sup>[12]</sup>。我国国家标准方法<sup>[13]</sup>为改进的薄层色谱法、出入境检验检疫行业标准<sup>[14]</sup>为液相色谱法和液相色谱-质谱法、美国分析化学家协会 (AOAC) 规定的展青霉素分析方法为液相色谱法<sup>[15]</sup>。上述方法中薄层色谱法操作繁琐且灵敏度低; 免疫化学法虽可快速检测, 但抗体制备较难, 且存在大量假阳性检测结果; 气相色谱-质谱法需要衍生化; 液相色谱法存在灵敏度不高的问题, 因此液相色谱-质谱法越来越受到重视并广泛推广。另外, 乐果和多菌灵的主要检测方法有液相色谱法<sup>[16-17]</sup>、气相色谱法<sup>[18-19]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[20-21]</sup>和液相色谱-质谱法<sup>[22]</sup>。建立同时测定展青霉素、乐果和多菌灵的方法, 可以简化果汁检测项目, 满足大批量样品的检验要求。然而, 同时检测展青霉素、乐果和多菌灵的报道较少, 仅有牛鹏飞等建立的高效液相色谱法<sup>[23]</sup>, 但是该方法前处理需酶解-有机溶剂萃取-净化等较多步骤, 且进样分析时间长。本文采用更加快捷、简便的 QuEChERS 前处理方法, 并建立高效液相色谱-串联质谱联用法同时对展青霉素、乐果和多菌灵检测, 处理方法简单、灵敏度高、分析时间短, 可以更有效的保障食品安全。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

作者简介: 许欣欣 (1984—), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事卫生理化检验研究, E-mail: xxx210@qq.com

API QTRAP 5500 串联三重四极杆质谱仪（美国 AB Sciex 公司），配有 Turbo-V 源、蠕动泵以及 Analyst 1.5.1 数据处理系统，气源为高纯氮气；LC-20A 超快速液相色谱仪（日本岛津公司）；色谱柱：Agilent ZORBAX SB-C18，2.1mm×150mm ×3.5μm（美国 Agilent 公司）；Allegra X-22R 高速冷冻离心机（美国 Beckman Coulter 公司）；Turbo Vap II 型吹氮浓缩仪（美国 Caliper 公司）；MS3 型漩涡振荡器（德国 IKA 公司）；0.22μm 有机系针筒式微孔滤膜过滤器。

展青霉素标准溶液（美国 SIGMA 公司，乙腈配制，100μg/mL），多菌灵标准溶液（农业部环境保护科研监测所，乙醇配制，100μg/mL），乐果标准溶液（国家标准物质中心，丙酮配制，100μg/mL），乙腈为色谱纯（德国 Merck 公司），无水硫酸镁，氯化钠，C<sub>18</sub> 粉，PSA 吸附剂（primary-secondary amine，美国 Supelco 公司），试剂除注明外均为分析纯。水为二次蒸馏超纯水。

1.2 HPLC-MS/MS 分析条件

- ①液相色谱条件：流动相为 A：水，B：乙腈，梯度洗脱：0~2.5min，5%流动相 B，2.6~4.0min，70%流动相 B，4.1~10.0min，5%流动相 B，流速：0.40mL/min；柱温 30℃；进样体积：5μL。
- ②质谱条件：离子源为 ESI，检测方式：多反应离子监测（MRM），利用保留时间和碎片信号比值判断定性结果。正模式喷雾电压 5500V，负模式喷雾电压：-4500V，离子源温度 600℃，气帘气压力 30 psi，碰撞气流速中等，源内气 50L/min，辅助气 50L/min，驻留时间 100ms；其它 MRM 参数见表 1。

表 1 展青霉素、多菌灵和乐果的 MRM 部分参数表

化合物	母离子 /amu	子离子 /amu	检测模式	去簇电压 DP/V	入口电压 EP/V	碰撞气能量 CE/V	碰撞池电压 CXP/V
展青霉素	152.9	109.0*	负模式	-20	-10	-10	-10
	152.9	81.0	负模式	-20	-10	-20	-10
乐果	191.7	199.0*	正模式	80	10	13	10
	191.7	125.0	正模式	80	10	30	10
多菌灵	230.1	160.2*	正模式	80	10	26	15
	230.1	132.1	正模式	80	10	43	15

1.3 样品前处理

取果汁 10g，置 50mL 塑料离心管中，加入乙腈 10mL，漩涡振荡 1min。加入无水硫酸镁 4g 和氯化钠 1g，再振荡 1min，离心 10min（5000r/min）。将上清液转入另一个 50mL 塑料离心管中，加入无水硫酸镁 1200mg，PSA 吸附剂 400mg，C<sub>18</sub> 粉 400mg，漩涡振荡 1min，离心 10min（5000r/min），取上清液于玻璃离心管中，用氮吹仪吹干（35℃），加 1mL 乙腈-水（5:95）溶解，涡旋 1min，过 0.22μm 微孔滤膜，供 HPLC-MS/MS 测定。

1.4 标准储备液的配制

准确吸取 1.0mL 展青霉素标准溶液到 100mL 容量瓶中，用乙腈溶液稀释并定容，得浓度为 1000μg/L 的展青霉素储备溶液；同样方法配制浓度为 1000μg/L 的乐果储备溶液和浓度为 1000μg/L 的多菌灵储备溶液，储存于-20℃冰箱中。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱条件的优化

取展青霉素、乐果和多菌灵标准储备液，配制成浓度 10μg/L 的混合溶液，采用 Agilent 公司的 ZORBAX SB-C18 柱时，经色谱条件优化，能很好地将三种物质分离，在 10 分钟内获得了满意的分离结果，灵敏度满足定量检测要求。

采用 Agilent 公司的 ZORBAX SB-C18 柱，比较 2mmol/L 的乙酸铵水溶液-乙腈、水-乙腈和 0.1%甲酸水溶液-乙腈三种流动相。实验结果表明：添加乙酸铵和甲酸的水相会对展青霉素有抑制作用，离子化效率较低。选择水-乙腈为流动相，三种待测物质进入质谱前的离子化效率最高，故选择水-乙腈为流动相，梯度洗脱，流速 0.4mL/min，MRM 图见图 1。

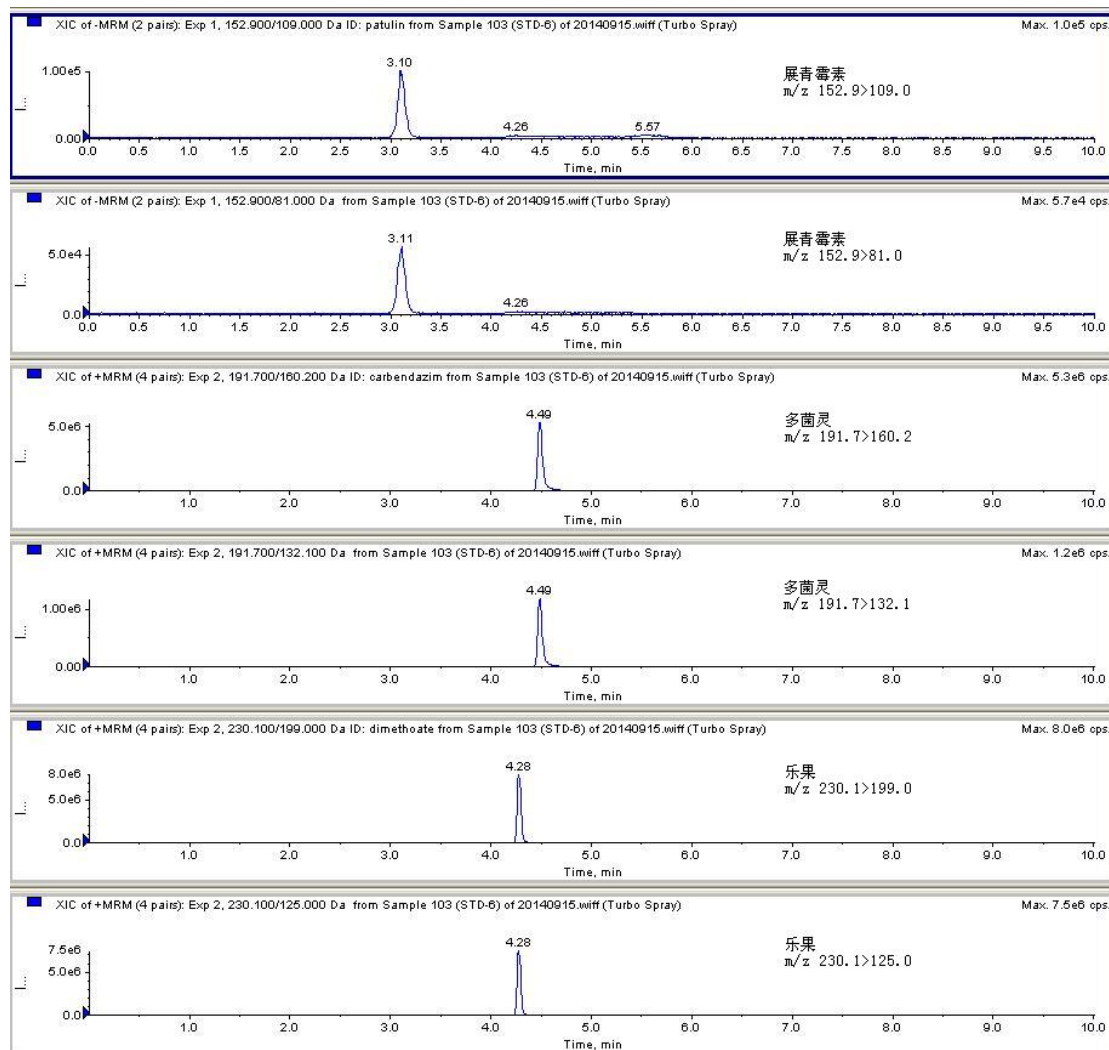


图 1 展青霉素、乐果和多菌灵的 MRM 图

## 2.2

## 2.3

## 2.4 标准曲线的绘制

由于果汁中多菌灵和乐果的残留含量远低于展青霉素，且展青霉素的响应稍低于多菌灵和乐果，我们参考三种物质最高限量设计标准曲线的范围。配制浓度为 500 $\mu\text{g/L}$  的展青霉素和 10 $\mu\text{g/L}$  的多菌灵与 10 $\mu\text{g/L}$  的乐果标准混合溶液。吸取标准混合溶液定容 10 $\mu\text{L}$ 、20 $\mu\text{L}$ 、40 $\mu\text{L}$ 、100 $\mu\text{L}$ 、200 $\mu\text{L}$  至 10 ml。得到混合标准曲线溶液浓度为：展青霉素 5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$ ；乐果 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.2 $\mu\text{g/L}$ 、0.4 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ ；多菌灵 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.2 $\mu\text{g/L}$ 、0.4 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 。各取 5 $\mu\text{L}$  进样，以样品峰面积为纵坐标，样品浓度为横坐标，得标准曲线(见表 3)。三种化合物的相关系数(r)均>0.999。由此可见，本方法对于测定展青霉素、乐果和多菌灵，在适当的浓度范围呈良好线性关系，该方法符合实际分析的要求。

表 3 展青霉素、乐果和多菌灵的标准曲线

化合物	标准曲线	线性范围	相关系数
展青霉素	$y=1.03 \cdot 10^3 x + 684$	5-500 $\mu\text{g/L}$	0.9999
乐果	$y=2.19 \cdot 10^6 x + 8.08 \cdot 10^5$	0.1-10 $\mu\text{g/L}$	0.9991
多菌灵	$y=1.66 \cdot 10^6 x + 1.01 \cdot 10^6$	0.1-10 $\mu\text{g/L}$	0.9994

## 2.5 方法的检出限、精密度、回收率

以三倍信噪比在标准曲线查得结果作为检出限 (LOD)，按取样量 10g，最后定容体积为 1.0mL，计算得检出限分别为展青霉素 0.15 $\mu\text{g/kg}$ 、多菌灵 0.003 $\mu\text{g/kg}$ ，乐果 0.003 $\mu\text{g/kg}$ 。

取空白果汁 10g，加入含量为 50 $\mu\text{g/L}$  的展青霉素、1.0 $\mu\text{g/L}$  的乐果和 1.0 $\mu\text{g/L}$  的多菌灵混合标准，前处理后作为试

验样品，同一天内将样品重复进样 6 次，计算日内重复取样测定的 RSD 均在 3.8%以下，结果见表 3；另取空白果汁 10g，加入含量为 50μg/L 的展青霉素、1.0μg/L 的乐果和 1.0μg/L 的多菌灵混合标准，前处理后作为试验样品，每天取样测定一次，共 5 天，计算日间重复取样测定的 RSD 均在 5.3%以下，结果见表 4，满足分析要求。取 12 份空白果汁 10g，分别配制两个加标水平的样品，按上述方法测定，结果见表 5。实际样品平均加标回收率范围为82.2-90.0%，相对标准偏差均小于 4.8% (n=6)。

表 4 展青霉素、乐果和多菌灵的日内精密度和日间精密度

日内精密度 (n=6)			
化合物	展青霉素	乐果	多菌灵
加入浓度 (μg/L)	50	1.0	1.0
测得均值 (μg/L)	41.0	0.84	0.85
RSD (%)	3.8	3.2	2.9
日间精密度 (n=5)			
化合物	展青霉素	乐果	多菌灵
加入浓度 (μg/L)	50	1.0	1.0
测得均值 (μg/L)	40.0	0.84	0.83
RSD (%)	4.5	5.3	3.7

表 4 .....

		展青霉素	乐果	多菌灵
加入浓度				
日内精密度	测得均值			
n=6	RSD			
日间精密度	测得均值			
n=5	RSD			

表 5 展青霉素、乐果和多菌灵的回收率

	加入浓度 (μg/L)	测的均 值	平均回收 率 (%)	RSD (%)	加入浓度 (μg/L)	测得浓度 (μg/L)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
展青霉 素	10	8.22	82.2	3.8	100	83.6	83.6	4.0
乐果	0.20	0.180	90.0	4.6	2.0	1.76	88.0	4.8
多菌灵	0.20	0.177	88.5	4.5	2.0	1.79	89.5	4.7

2.6 实际样品检测

我们采用本方法对市场上 8 品牌的果汁进行了检测，在其中一份苹果汁中检出多菌灵，检测值为 0.11μg /L，其它样品中均未检出展青霉素、乐果和多菌灵。阳性样品的 TIC 图，见图 2。

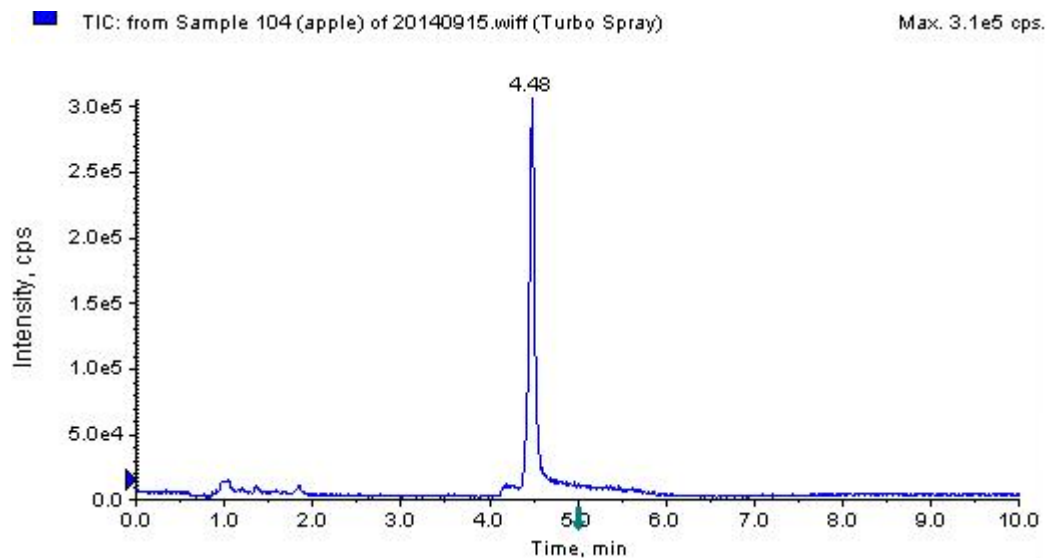


图 2 阳性样品的 TIC 图（多菌灵  $t_R=4.48\text{min}$ ）

### 3 结论

本次建立的果汁中的展青霉素、乐果和多菌灵的高效液相色谱-串联质谱联用分析方法操作简便、重现性好，测试组分多，回收率和将密度良好，能够满足果汁中展青霉素、乐果和多菌灵痕量测定的要求。

## 参考文献

- [1]吴永宁.现代食品安全科学[M].北京:化学工业出版社,2003:225.
- [2]中华人民共和国卫生部.GB2761-2005.食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 人民卫生出版社,2005.
- [3]继云,李静,李海飞,等.中国和国际组织规定的苹果中农药最大残留限量[J].落叶果树,2006,38(1):16-17.
- [4] Baert K, De Meulenaer B, Kasase C, et al.Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders[J].Food Chem,2007,100:1278.
- [5]殷居易,倪梅林,谢东华.高效液相色谱测定浓缩苹果汁展青霉素的残留量[J].分析科学学报,2007,23(1):119-121.
- [6]周继恩,吴平谷.GC-MS 法测定苹果汁和山楂制品中展青霉素[J].中国卫生检验杂志,2010,20(12):175-176.
- [7]李锋格,姚伟琴,田延河,等.特丁基二甲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):91-94.
- [8]宫小明,任一平,董静,等.超高效液相色谱串联质谱法测定花生、粮油中 18 种真菌毒素[J].分析测试学报, 2011,30(1):12-18.
- [9]杨冀州,魏蔚,祝伟霞,等.高效液相色谱-电喷雾三级四级杆质谱测定苹果、山楂、番茄制品中棒曲霉素的研究[J].食品科学,2009,30(4):133-136.
- [10]Kataoka H, Itano M, Ishizaki A, et al. Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A,2009,1216(18):3746-3750.
- [11]De Champdore M, Bazzicalupo P, De Napoli L, et al. A new competitive fluorescence assay for the detection of patulin toxin[J]. Anal Chem,2007,79(2):751-757.
- [12]Murillo-Arbizu M, Gonzalez-Penas E, Hansen S H, et al. Development and validation of a microemulsion electrokinetic chromatography method for patulin quantification in commercial apple juice[J]. Food Chem Toxicol, 2008,46(6):2251-2257.
- [13] 中华人民共和国卫生部.GB/T5009.185-2003.苹果和山楂制品中展青霉素的测定[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [14]中华人民共和国 国家质量监督检验检疫总局.SN/T2534-2010.进出口水果和蔬菜制品中展青霉素含量检测方法液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法[S]. 北京: 人民卫生出版社,2010.
- [15] AOAC official Method 2000.02.
- [16]陈若虹,凌东辉,段夏菲.高效液相色谱法同时测定果汁饮料中的 10 种有机磷农药[J].中国卫生检验杂志 2011,21(4):854-856.
- [17]孔祥虹,海云,仇农学. 固相萃取-高效液相色谱法测定浓缩苹果汁中的多菌灵残留量[J].分析实验室,2007,28(5):65-67.
- [18]李贝妮,王亚林,贾金平.水果中多菌灵衍生炭纤维固相微萃取气相色谱测定法[J].环境与健康杂志,2008,25(03):255-257.
- [19]郑玉国,郭晴晴,薛伟.茶饮料中乐果的气相色谱分析[J].湖北农业科学,2012,51(11):2331-2333.
- [20]杜晓婷,周敏,张剑.蔬菜中甲胺磷等 5 种有机磷农药残留量的分散液-液微萃取/气质联用技术检测[J].分析测试学报,2012,29(07):751-754.
- [21]朱宝平,叶雅文,冷建荣.气质联用仪在鼠药、有机磷及氨基甲酸酯类农药中毒事件中的检测应用[J].实用预防医学, 2008,15(5):1579-1581.
- [22]刘春华,乐渊,阳辛凤.超高效液相色谱-串联质谱法快速测定生咖啡豆中多菌灵等农药残留[J].广东农业科学, 2012,39(24):108-110.
- [23]牛鹏飞,仇农学,苏肖洁.RP-HPLC 法同时检测苹果汁中 5-HMF、展青霉素、乐果和多菌灵[J].食品工业科技, 2008,29(9):262-265.