

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

李锋格^{1*}, 姚伟琴¹, 田延河¹, 李学文², 张洪霞², 窦辉¹, 朱慧萍¹

(1. 新疆出入境检验检疫局技术中心, 新疆 乌鲁木齐 830063;

2. 新疆农业大学食品科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830063)

摘要 :运用特丁基二甲基硅烷(TBDMS)衍生化气相色谱-质谱(GC-MS)联用法快速、高灵敏地测定了苹果汁中的棒曲霉素(PAT)。样品用乙酸乙酯-正己烷提取, Carb/C₁₈混合型固相萃取柱净化, TBDMS衍生, GC-MS测定, 选择离子监测(SIM)模式, 外标法定量。在0.01~1 mg/L的范围内线性良好($r > 0.98$), 在2~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加水平范围内, 平均回收率为88%~98%, 相对标准偏差(RSD)为5.3%~13.6%, PAT的检出限为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 测定下限为2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法快速、高灵敏、准确、专一、耐用, 适合对苹果汁中PAT进行确证和定量测定。

关键词 :气相色谱-质谱; 特丁基二甲基硅烷; 棒曲霉素; 苹果汁

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)07-0720-04

Rapid determination of patulin in apple juice by *tert*-butyldimethylsilyl derivatization-gas chromatography-mass spectrometry

LI Fengge^{1*}, YAO Weiqin¹, TIAN Yanhe¹, LI Xuewen²,

ZHANG Hongxia², DOU Hui¹, ZHU Huiping¹

(1. Technical Center of Xinjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi 830063, China;

2. Food Science Institute, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830063, China)

Abstract : A gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the quantitative determination and confirmation of patulin in apple juice by *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) derivatization was established. The sample was extracted with ethyl acetate-hexane and an aliquot of the supernatant was cleaned up using mixed-mode solid phase extraction (SPE) cartridge containing C₁₈ and graphitized carbon black (GCB), evaporated to dryness under nitrogen gas and the residue was converted to *tert*-butyldimethylsilyl derivative which was determined with GC-MS in selected ion monitoring (SIM) mode and external standard method was used for quantitative determination. The linear range was from 0.01 to 1 mg/L. The average recoveries were 88%–98% and relative standard deviations were 5.3%–13.6% in the spiked range of 2–50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The limit of detection was 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limit of quantification and confirmation was 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method is rapid, highly sensitive, accurate, specific, rugged and suitable for the quantitative determination and confirmation of patulin in apple juice.

Key words : gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS); patulin; apple juice

棒曲霉素(patulin, PAT)又叫展青霉素, 化学名称为4-羟基-4*H*-呋喃(3,2-*c*)并吡喃-2(6*H*)酮(4-hydroxy-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-2(6*H*)-one), 结构式见图1。PAT属于真菌毒素类化合物, 主要是

青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和丝衣霉属(*Byssosclamyces*)等多种真菌的次生代谢产物, 有强烈的抗菌活性, 对动物的细胞和组织有很强的毒性, 具有潜在的致癌、致畸和致突变性。欧盟规

* 通讯联系人: 李锋格, 硕士, 高级工程师, 主要从事农产品和动物源性食品中农药兽药残留检测研究。E-mail: cqlfg@163.com.

收稿日期: 2010-02-18

定果汁、特别是苹果汁及含苹果汁的饮料中, PAT 最大残留限量(MRL)为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 固体苹果产品中, PAT 的 MRL 为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 儿童用苹果汁和婴儿食品中, PAT 的 MRL 为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1]。

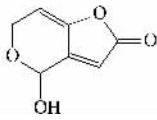


图 1 棒曲霉素的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of patulin

测定 PAT 的检测方法有高效液相色谱法(HPLC)^[1-3]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[3-6]、高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)^[7-8]。目前尚未出台国家标准方法, 仅行业标准^[9-10]中规定了测定 PAT 的 HPLC 法、GC-MS 法和 HPLC-MS 法。GC-MS 法采用 *N*, *O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)为衍生剂^[3-6, 10], 存在检测过程冗长, 操作步骤繁琐费时, 试剂用量大等不足, 因此寻找一种快速、简便、高灵敏、准确和稳定的 GC-MS 方法检测苹果汁中的 PAT 十分必要。*N*-(特丁基二甲基硅烷基)-*N*-甲基三氟乙酰胺(MTBSTFA)是效果较好的衍生剂, 其特丁基二甲基硅烷(TBDMS)衍生物更稳定和易于制备, 且在质谱分析中容易失去特丁基而形成 $[M-57]^+$ 特征离子, 具有降低检出限, 提高灵敏度, 适于定量分析等优点^[11]。因此本文采用 MTBSTFA 为衍生剂, 建立了 TBDMS 衍生化 GC-MS 法测定苹果汁中 PAT 的快速、高灵敏度方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Agilent 7890A/5975C 气相色谱-质谱仪(美国 Agilent 公司) ; 配备 7683 自动进样器、增强型化学工作站; 氮吹仪(美国 Organomation 公司) ; 微波炉(格兰仕公司) ; 小型离心机; 1.5 mL 螺纹口高回收率样品瓶(美国 Agilent 公司) ; 聚四氟乙烯(PTFE)/硅橡胶/PTFE 隔垫(美国 Agilent 公司)。

PAT 标准品(纯度为 99.5%, Chemservice 公司提供) ; BESEP[®] Carb/C₁₈ 固相萃取(SPE)柱(500 mg/500 mg, 6 mL, 北京振翔公司) ; 衍生化试剂: MTBSTFA + 1% 特丁基二甲基硅基氯硅烷(TBDMCS)(1 mL \times 10, 美国 Sepax-UCT 公司) ; 乙腈、乙酸乙酯、正己烷(色谱纯) ; 水为超纯水。

1.2 标准工作液的配制

将 PAT 用乙腈配制成 200 mg/L 的标准储备液, 并根据需要稀释成适当质量浓度的标准工作液,

于棕色储存瓶 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。有效期 3 个月。

1.3 色谱条件

DB-35MS 毛细管色谱柱, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm ; 分流/不分流进样口, 进样口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 脉冲不分流进样, 脉冲压力: 2.758×10^5 Pa; 载气: 高纯氦气(纯度 99.999%), 流速: 1 mL/min; 程序升温: 100 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 270 $^{\circ}\text{C}$, 全部程序时间: 15 min; 后运行温度: 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min; 后运行期间载气流速: 0.5 mL/min; 进样量: 1 μL 。

1.4 质谱条件

电子轰击离子(EI)源; 电子能量: 70 eV; 离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$; 四极杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 接口温度: 280 $^{\circ}\text{C}$; 扫描模式: 选择离子监测(SIM)模式; 溶剂延迟时间为 5 min。定量离子: m/z 183, 定性离子: m/z 184、 m/z 211、 m/z 212, 驻留时间: 75 ms。

1.5 样品处理

称取 5.00 g 苹果汁于 15 mL 具螺旋塞聚丙烯刻度离心管, 加入 5 mL 乙酸乙酯-正己烷溶液(95:5, v/v), 振摇, 加入 0.5 g 碳酸氢钠, 剧烈振摇 2 min, 在 4 500 r/min 转速条件下离心 3 min。

用 5 mL 乙酸乙酯活化 Carb/C₁₈ 混合型 SPE 柱, 将加有 30 μL 冰乙酸的 10 mL 刻度试管置于 SPE 柱下接受溶液, 立即移取 3.2 mL 上清液至 SPE 柱, 用 5 mL 乙酸乙酯洗脱。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下通氮气缓缓吹干, 加 240 μL 乙腈溶解, 准确移取 150 μL 溶解液至 1.5 mL 螺纹口高回收率样品瓶中, 加入 50 μL 衍生化试剂, 用 PTFE/硅橡胶/PTFE 隔垫密封, 微波高挡条件(800 W)下反应 3 min, 冷却, 供 GC-MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

PAT 在水溶液中易分解, 在有机溶剂中相对稳定。因此本文在文献报道^[1-5, 9, 10]的基础上经过比较和选择, 发现用乙酸乙酯-正己烷溶液(95:5, v/v)提取, 杂质干扰少, 回收率高, 最终选择乙酸乙酯-正己烷溶液(95:5, v/v)为提取溶剂。

2.2 色谱柱的选择

本文比较了 PAT 的 TBDMS 衍生物在 DB-1、DB-5、DB-1701P、DB-35MS 4 种色谱柱的分离效果, 发现 PAT 的 TBDMS 衍生物在 DB-1、DB-5、DB-1701P 色谱柱上出现拖尾, 灵敏度低; 在 DB-35MS 色谱柱上峰形尖锐、对称, 灵敏度最高, 在 PAT 的 TBDMS 衍生物出峰的时间窗口无干扰, 半峰宽为

0.025 min,这对 PAT 的确认和定量测定有利,故最终选定 DB-35MS 色谱柱。

2.3 净化方法的选择和优化

由于苹果汁中含有大量的酚类物质、色素和脂类物质,它们的存在将影响衍生化反应,对测定有干扰,降低灵敏度,因此必须除去。加入碳酸氢钠可有效除去酚类和酸类物质,起初步净化的作用。但由于碳酸氢钠为弱碱性物质,而 PAT 在碱性条件下不稳定^[2],为避免损失,提取过程需尽快进行。本文所用的提取方法可在 10 min 内完成,回收率试验结果满意。活性炭对色素的吸附作用很强,C₁₈可除去脂类物质,因而选择 Carb/C₁₈混合型 SPE 柱为净化柱,结果表明该 SPE 柱去除干扰的效果最好,洗脱物比较干净,基质背景和基线噪声低,在 PAT 的 TBDMS 衍生物出峰的时间窗口无干扰,可获得稳定、满意的回收率和较好的重现性。选择乙酸乙酯为洗脱溶剂,比较了 1、2、3、4、5、6、7 mL 乙酸乙酯洗脱效果。实验结果表明,5 mL 乙酸乙酯可将 PAT 完全洗脱,回收率 95% 以上,故最终选择 5 mL 乙酸乙酯为洗脱液。

2.4 衍生化条件的选择和优化

PAT 为极性化合物,挥发性低,为增加挥发性,提高分离的柱效,降低检出限,需要衍生后才能进行 GC-MS 分析。实验中发现,采用 MTBSTFA 为衍生剂,PAT 的 TBDMS 衍生物较为稳定,不易分解,比 PAT 的三甲基硅烷衍生物(TMS)具有更高的灵敏度和专一性,因此最终选择 MTBSTFA 为衍生剂。

由于 MTBSTFA 衍生化反应一般为 80 °C 下加热 60 min,本文采取了微波加热衍生化反应,其他条件不变,改变微波加热时间,分别衍生 1、2、3、4、5、6、7 min,结果表明,微波加热时间对衍生化反应影响不大,故最终选定衍生时间 3 min。

2.5 SIM 模式下特征离子的确定

图 2 为 PAT 的 TBDMS 衍生物的质谱图,PAT 的 TBDMS 衍生物的特征离子为 m/z 155、167、183、184、211、212 和 255,未出现分子离子峰 m/z 268,说明该分子结构并不稳定。 m/z 212 是由分子离子峰失去丁烯分子后的碎片, m/z 211 是由分子离子峰失去特丁基自由基后的正离子碎片,继而失去 CO 分子得到 m/z 183 的正离子碎片, m/z 184 的碎片可能为 m/z 183 的正离子接受一个氢自由基而生成的自由基正离子^[5],PAT 的 TBDMS 衍生物的裂解途径见图 3。

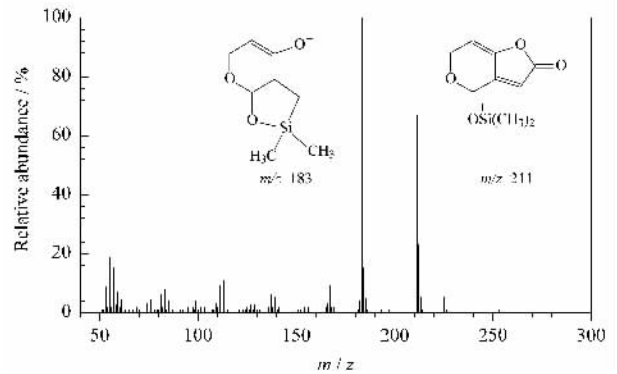


图 2 PAT 的 TBDMS 衍生物的质谱图
Fig. 2 MS spectrum of TBDMS derivative of PAT

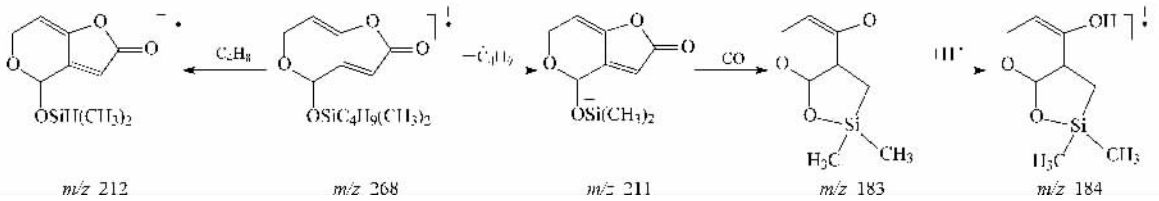


图 3 PAT 的 TBDMS 衍生物的质谱裂解图
Fig. 3 Proposed MS fragmentation pathway for TBDMS derivative of PAT

经对苹果汁空白样品分析,发现样品基质中含 m/z 155、167 和 255 离子碎片,这些离子碎片对 PAT 定性和定量测定干扰大。结合 PAT 的 TBDMS 衍生物的裂解途径,最终选定 m/z 183 为定量离子, m/z 184、211 和 212 为定性离子。采用上述离子组合定性和确证,专一性强,灵敏度高,结果准确。图 4 为添加 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PAT 的苹果汁样品的选择离子色谱图。

2.6 定性依据及定量方法

PAT 的定量离子、定性离子及标准相对离子丰

度见表 1。进行样品测定时,如果试样中的质量色谱峰保留时间与标准工作溶液一致(变化范围在 $\pm 0.5\%$ 之内),并且在扣除背景后的样品质谱图中所选择的离子均出现,所选择的离子相对丰度与浓度相当标准溶液的相对丰度相差符合表 1 的有关规定,则可判断样品中存在 PAT。本文采用外标法定量。

2.7 线性关系与检出限

配制 PAT 系列质量浓度(0.01 ~ 1 mg/L)的标准工作溶液,衍生后进行测试。以 PAT 的质量浓度 X (mg/L)为横坐标,定量离子(m/z 183)的质谱峰

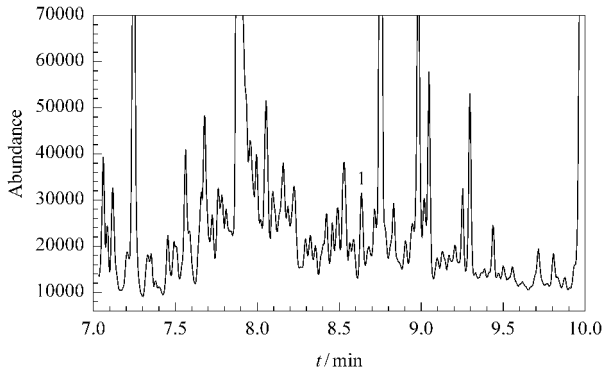


图 4 添加 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PAT 的苹果汁样品的选择离子 (SIM) 色谱图

Fig. 4 SIM chromatogram of apple juice spiked with 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PAT
peak 1: TBDMS derivative of PAT.

表 1 PAT 的定量离子、定性离子和定性确证时标准相对离子丰度及最大容许偏差

Table 1 Quantitative ions, qualitative ions and standard relative abundances of PAT and maximum permitted tolerances for confirmation

Quantitative/qualitative ion (m/z)	Standard relative abundance/%	Maximum permitted tolerance/%
183*	100	-
211	58	± 10
212	20	± 20
184	16	± 20

* quantitative ion.

面积 Y 为纵坐标进行线性回归。PAT 在 0.01 ~ 1 mg/L 范围内线性良好,线性方程为 $Y = 1.030 \times 10^6 X - 1.288 \times 10^4$, $r = 0.9946$ 。

检出限 (LOD) 是指 4 个特征离子的信噪比 (S/N) 均大于 3 时的最低检测浓度,定量限 (LOQ) 是指 S/N 均大于 10 时的最低检测浓度。本方法的 LOD 和 LOQ 分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.8 回收率与精密度

以汇源 100% 苹果汁 (市售,经检测不含 PAT) 为样品,做 5 个水平 (2、5、10、25、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的添加试验,每个添加水平重复 6 次,按 1.5 节所述进行回收试验,方法的回收率和相对标准偏差 (RSD) 均符合国内外有关标准和法规的要求 (见表 2)。

表 2 苹果汁样品中 PAT 添加回收率测定结果 ($n = 6$)

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/%	RSD/%
2	92	13.6
5	88	10.8
10	93	7.8
25	90	7.0
50	98	5.3

2.9 实际样品的测定

运用本文建立方法对 26 份苹果汁样品进行了检测,在所检的苹果汁样品中均未检出 PAT。

3 结语

本文建立了 TBDMS 衍生化-GC-MS 法测定苹果汁中 PAT 的方法,结果表明具有样品前处理简单、快速,检测灵敏度高,特异性强,重复性好等特点。通过 SIM 模式选择离子的优化,消除苹果汁基质影响,增强抗干扰能力,降低 LOD,定量重现性好。方法快速、简便、高灵敏、准确、专一、耐用,适合苹果汁中 PAT 的确证和定量测定。

参考文献:

- [1] Katerere D R, Stockenström S, Shephard G S. Food Control, 2008, 19: 389
- [2] Arranz I, Derbyshire M, Kroeær K, et al. J AOAC Int, 2005, 88(2): 518
- [3] Moukas A, Panagiotopoulou V, Markaki P. Food Chem, 2008, 109: 860
- [4] Tabata S, Iida K, Svzuki J, et al. J Food Hyg Soc Japan, 2004, 45(5): 245
- [5] Rupp H S, Turnipseed S B. J AOAC Int, 2000, 83(3): 612
- [6] Marks H S. J AOAC Int, 2007, 90(3): 879
- [7] Ito R, Yamazaki H, Inoue K, et al. J Agric Food Chem, 2004, 52: 7464
- [8] Wang Y F, Chang C Y, Ge B K, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (王云凤, 常春艳, 葛宝坤, 等. 中国卫生检验杂志), 2007, 17(5): 841
- [9] SN/T2008-2007
- [10] SN/T1859-2007
- [11] Zhao M P, Li Y Z, Chang W B. Chinese Journal of Analytical Chemistry (赵美萍, 李元宗, 常文保. 分析化学), 2003, 31(1): 103