

乳制品中那他霉素的高效液相色谱 - 串联质谱法快速测定

周莉莉, 祝建华, 张卉, 王骏, 于文江, 范晓明

(山东省产品质量监督检验研究院 国家加工食品质量监督检验中心(山东), 山东 济南 250100)

摘要: 建立了超高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱 (UPLC - MS/MS) 快速检测乳制品中那他霉素的方法。样品用甲醇提取, 以甲醇 - 水为流动相经反相色谱柱分离后, 采用多反应监测 (MRM) 负离子模式检测, 定性离子对为 m/z 663.6/421.1 和 m/z 663.6/439.1, 其中 m/z 663.6/421.1 用于外标法定量。空白样品及其加标实验结果表明: 特征离子相对强度比值稳定, 无基质干扰, 结合保留时间可实现准确的定性定量; 方法定量下限为 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。乳制品加标量为 50 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 平均回收率为 80% ~ 91%, 相对标准偏差 ($n = 6$) 为 2.7% ~ 5.2%。方法简单、灵敏、稳定, 可满足乳制品中那他霉素的快速检测与确证需要。

关键词: 那他霉素; 超高效液相色谱 - 串联质谱; 乳制品

中图分类号: O652.63; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2010)01 - 0077 - 04

doi: 10.3969/j.issn.1004 - 4957.2010.01.018

Rapid Determination of Natamycin in Milk Products by Ultra-performance Liquid Chromatography - Electrospray Negative Ionization Mass Spectrometry

ZHOU Li-li, ZHU Jian-hua, ZHANG Hui, WANG Jun, YU Wen-jiang, FAN Xiao-ming

(National Center for Quality Supervision and Inspection of Processed Food (Shandong), Shandong

Supervision and Inspection Institute for Product Quality, Jinan 250100, China)

Abstract: A rapid ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometric (UPLC - MS/MS) method was developed for the determination of natamycin in milk products. The sample was extracted by methanol, and separated on a reversed-phase UPLC column using a binary eluent under gradient conditions. The analysis of natamycin was performed by tandem mass spectrometry under multiple reaction monitoring (MRM) mode with negative electrospray ionization. Two precursor-product ion pairs of m/z 663.6/421.1 and m/z 663.6/439.1 were selected as qualification ions and m/z 663.6/421.1 was selected as quantitation ion for the external standard method. The result indicated that the relative intensity of natamycin identification ion pairs in samples was stable, and there was no matrix interference with these confirmatory transitions. Combining with retention time, the method could be used for accurate analysis of natamycin. Under the optimal conditions, the limit of quantitation (LOQ) was 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. At the spiking levels of 50 - 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the average recoveries of natamycin from milk samples were in the range of 80% - 91%, and the relative standard deviations ($n = 6$) were in the range of 2.7% - 5.2%. The method show good simplicity, sensitivity and stability, and is suitable for the rapid determination of natamycin in milk products.

Key words: natamycin; UPLC - MS/MS; milk products

那他霉素又称游霉素, 是一种重要的多烯大环内酯抗菌素, 能有效抑制酵母菌和霉菌的生长, 阻止丝状真菌中黄曲霉毒素的生成。其分子式为 $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_{13}$, 相对分子质量 665.73^[1]。根据我国《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760 - 2007)规定, 那他霉素可作为防腐剂在乳酪、肉制品、糕点、果蔬汁(浆)等表面使用^[2], 乳粉、酸奶等乳制品中不允许使用那他霉素。但在实际生产中, 乳制品中添加那他霉素的现象时有发生。世界范围内, 目前只有南非允许在酸奶中使用那他霉素^[3]。FDA/WHO规定人体每日那他霉素最大摄入量 (ADI)为 0.3 mg/kg体重^[1]。

收稿日期: 2009 - 09 - 17; 修回日期: 2009 - 10 - 29

第一作者: 周莉莉 (1981 -), 女, 江苏东台人, 工程师, 博士, Tel: 0531 - 89701895, E-mail: sdqizhoulili@126.com

目前那他霉素的分析方法主要有分光光度法、滴定法、微生物法和色谱法等。分光光度法和滴定法较为简单,但不能排除实际样品中基质干扰的影响,难以精确定量。微生物法适用于溶液、物质浸出物或生物材料中那他霉素的测定^[4]。高效液相色谱法^[5-7]现已成为食品中那他霉素残留检测中使用最多的方法,但该方法灵敏度及确证定性均不理想。乳制品成分复杂,食用人群广泛,有必要建立一种简便快捷且准确的检测方法。目前尚未见文献报道使用液相色谱-串联质谱法检测食品基质中的那他霉素。基于高效液相色谱的分离能力和质谱的高灵敏度、高选择性^[8-13],本文建立了乳制品中的那他霉素的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC-Quattro Premier XETM质谱联用仪,配有电喷雾离子源及 Masslynx 4.1 数据处理系统(美国 Waters 公司);电子天平(瑞士 Sartorius 公司);SR 旋涡混合器(德国 IKA 公司);Signa 3-18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

那他霉素对照品(Sigma-Aldrich 公司);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);其余试剂均为分析纯(北京化工厂);水为超纯水(18.2 M \cdot cm);0.22 μ m 滤膜(美国 Agilent 公司)。

1.2 色谱条件

色谱柱:BEH C₁₈柱,50 mm \times 2.1 mm (i.d.), 1.7 μ m;流动相:A 为甲醇,B 为水;梯度程序:0~3 min,20% A 线性变化至 90% A,3~3.1 min,90% A 线性变化至 100% A,3.1~5 min,维持 100% A,5~5.1 min,100% A 线性变化至 20% A,5.1~7 min,维持 20% A;流速:0.35 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ L。

1.3 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),毛细管电压 2.5 kV,萃取电压 3.0 V,源温 110 $^{\circ}$ C,脱溶剂温度 400 $^{\circ}$ C,脱溶剂气速 600 L/h,锥孔反吹气速 50 L/h,多离子反应监测(MRM)定性离子对 m/z 663.6/421.1 (15 eV)和 m/z 663.6/439.1 (15 eV),定量离子对 m/z 663.6/421.1。采用溶剂延迟技术,0~2 min 和 5~7 min 切入废液收集,2~5 min 切入离子源进行质谱分析。

1.4 标准溶液的制备

精密称取 10 mg 那他霉素对照品,用甲醇定容至 10 mL,配成 1.0 g/L 的标准储备液(4 $^{\circ}$ C 避光保存)。临用时用初始流动相逐级稀释成适当质量浓度的标准工作液。

1.5 样品前处理

精密称取液体样品 5 g(固体样品 2 g)精确至 0.01 g,置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容,充分混匀,转至离心管中,超声提取 10 min,以 10 000 r/min 冷冻离心 10 min,上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤,上机测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱分析

实验中发现负离子模式更适合那他霉素的质谱检测,主要生成 m/z 663.6 的 $[M-H]^{-}$ 准分子离子峰,选择该准分子离子峰进行子离子扫描,生成的主要碎片离子为 m/z 421.1、439.1、602.4、584.1 等,如图 1 所示。为满足欧盟对药物确证需 4 个确证点(IPs)的要求^[14],实验选择二级质谱响应较强的 m/z 421.1、439.1 碎片离子作定性离子, m/z 421.1 作定量离子。

2.2 基质效应考察

乳制品中成分复杂,主要含蛋白质、氨基酸、碳

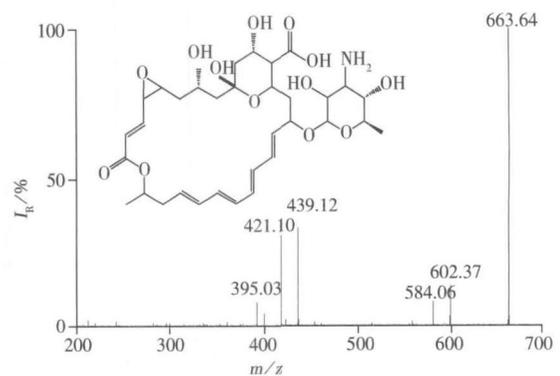


图 1 那他霉素的分子结构示意图及二级质谱图
Fig. 1 Sketch map of molecular structure and MS² spectrum of natamycin

水化合物和脂肪等。那他霉素在水中的溶解度很低 (约 40 mg/L)^[15], 在甲醇中的溶解度较高 (1 200 mg/L)^[16]。且由于蛋白质在甲醇中会变性而沉淀, 氨基酸在甲醇中溶解度较小, 碳水化合物不溶于甲醇, 脂肪在冷冻条件下会析出, 因此实验以甲醇为提取剂, 进行冷冻离心, 能较好地提取那他霉素, 去除干扰组分的影响。以空白样品提取液做质谱全扫描 (m/z 100~1 000), 未发现有较大的基质干扰峰, 说明本方法无明显基质干扰, 通过溶剂延迟技术可有效减少质谱污染干扰, 提高分析的准确度。

2.3 流动相与流速的确定

选用 BEH C₁₈ 色谱柱, 分别以乙腈 - 10 mmol/L 乙酸铵缓冲液、乙腈 - 水、甲醇 - 水、甲醇 - 5 mmol/L 乙酸铵缓冲液进行实验, 通过对峰形、保留时间、响应值、回收率、经济等进行比较后, 确定采用甲醇 - 水流动相。

对 0.3、0.35、0.4 mL/min 流速条件下的分离情况进行了考察, 考虑保留时间适当、响应值较高、柱压较低等条件, 确定流速为 0.35 mL/min。在优化的色谱条件下, 那他霉素的保留时间为 3.3 min, 见图 2。

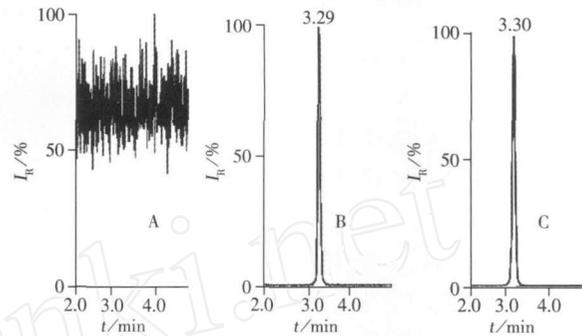


图 2 那他霉素的质量色谱图

Fig. 2 LC - MS/MS chromatograms of natamycin
A. blank yoghurt sample; B. spiked yoghurt; C. commercial yoghurt

2.4 方法的线性范围、检出限、回收率与精密度

取储备液用初始流动相逐级稀释成系列标准溶液 ($n=6$), 取 5 μ L 进行 UPLC - MS/MS 分析, 以对照品质量浓度 (X , μ g/L) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。结果表明, 在 10.0~200.0 μ g/L 范围内具有良好的线性关系, 回归方程为 $Y=3.344X-21.58$, $r=0.9993$ 。通过对空白样品进行添加回收实验, 以 $S/N=10$ 确定本方法对乳制品中那他霉素的定量下限为 50.0 μ g/kg。

以阴性酸奶、液态奶和奶粉为测试样品, 那他霉素的添加水平分别为 50、200、500 μ g/kg, 每个水平做 6 个平行样, 外标法定量, 测得本方法的平均回收率为 80%~91%, 相对标准偏差 ($n=6$) 为 2.7%~5.2% (见表 1)。结果表明, 本方法回收率稳定, 可满足实际样品检测的需要。

表 1 UPLC - MS/MS 检测乳制品中那他霉素的回收率与精密度 ($n=6$)
Table 1 Recovery and precision of the UPLC - MS/MS method for determining natamycin in milk products ($n=6$)

Sample	Added	Found	Recovery	RSD
	$w_A / (\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	$w_F / (\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	$\bar{R} / \%$	$s_r / \%$
Yoghurt	50, 200, 500	40, 166, 440	80, 83, 88	4.6, 3.5, 3.4
Milk	50, 200, 500	41.5, 172, 455	83, 86, 91	4.1, 2.7, 3.6
Milk powder	50, 200, 500	40.5, 168, 445	81, 84, 89	5.2, 4.0, 3.3

2.5 实际样品的测定

应用所建立的方法, 对市售的 8 个酸奶、3 个液体奶和 5 个奶粉产品进行了测定。结果显示, 酸奶样品中检出那他霉素阳性样品 1 个 (4.24 mg/kg), 液态奶样品和奶粉样品中均未检出那他霉素。

参考文献:

- [1] 黄孟基, 郭新东, 王永华, 等. 高效液相色谱法测定月饼中那他霉素残留 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 121 - 123.
- [2] 中华人民共和国卫生部, 中国标准化委员会. GB 2760 - 2007. 食品添加剂使用卫生标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [3] 王贵芳, 赵少华. 那他霉素的特性及其在食品中的应用 [J]. 中国食品添加剂, 2006, (2): 144 - 151.
- [4] 李东, 李颖辉, 陈婕, 等. 那他霉素分析方法的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 1999, (1): 1 - 3.
- [5] 姜金斗, 杨金宝. RP-HPLC 法测定酸牛奶中那他霉素含量 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(10): 216 - 218.
- [6] 陈永艳, 李彩瑞, 杨秀敏, 等. 高效液相色谱法测定果酱中的那他霉素 [J]. 中国食品学报, 2008, 8(1): 115 - 118.
- [7] 刘亚凤, 刘朝晖, 杨冀州. 固相萃取 - 液相色谱法检测肉制品中那他霉素残留量 [J]. 肉品卫生, 2004, (6): 12 - 13.

(下转第 83 页)

(续表 3)

Peak No.	t_R / min	Compound	Molecular formula	Molecular mass	Relative content w / %	Similarity (%)
37	27.967	Phthalic acid, isobutyl 2-pentyl ester(邻苯二甲酸异丁基, 2-戊基二酯)	$C_{17}H_{24}O_4$	292	0.21	90
38	29.559	Phthalic acid, 6-ethyl-3-octyl butyl ester(邻苯二甲酸 6-乙基-3-辛基, 丁基二酯)	$C_{22}H_{34}O_4$	362	0.35	90

参考文献:

- [1] CAIJibao, LU Baizhan, SU Qingde. Comparison of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor components[J]. J Chromatogr. A, 2001, 930(1/2): 1 - 7.
- [2] VICHIS, GUADAYOL J, CAIXACH J, et al. Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by head-space solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry[J]. J Chromatogr. A, 2006, 1125(1): 117 - 123.
- [3] 邓晓军, 郭德华, 李波, 等. 葡萄酒中痕量木塞污染物的顶空固相微萃取 - 气相色谱串联质谱法检测 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(12): 1375 - 1378.
- [4] 彭帮柱, 岳田利, 袁亚宏, 等. SPME/GC - MS在综合评判苹果酒质量中的应用研究 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(4): 92 - 94.
- [5] 朱苏闽, 李军, 林平. 固相微萃取 - 气相色谱 - 质谱法分析云烟浸膏和烟末浸膏的挥发性化学成分 [J]. 质谱学报, 2004, 25(1): 32 - 37.
- [6] 刘百战, 张映, 孙磊, 等. 卷烟烟丝香气成分的固相微萃取 - 气相色谱 - 质谱法分析 [J]. 分析测试学报, 2000, 19(4): 28 - 31.
- [7] 乔宇, 谢笔钧, 张妍, 等. 固相微萃取 - 气相色谱 - 质谱联用结合嗅觉检测法鉴定血橙汁中的香气活性化合物 [J]. 色谱, 2008, 26(4): 509 - 514.
- [8] 汪丽, 蔡依军, 卢献雷, 等. 固相微萃取 / 气相色谱 - 质谱检测纺织品中有机磷农药残留 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(3): 413 - 416.
- [9] 吴继红, 张美莉, 陈芳, 等. 固相微萃取 GC - MS法测定苹果不同品种中主要芳香成分的研究 [J]. 分析测试学报, 2005, 24(4): 101 - 104.
- [10] 刘德仓, 何娟, 高会云, 等. 自制丙烯酸酯类共聚物固相微萃取 / 气相色谱对水中农药残留的分析 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(9): 977 - 979.
- [11] 林平, 廖启斌, 刘加增, 等. 固相微萃取在烟用香精检测上的应用研究 [J]. 中国烟草学报, 2003, 9(2): 6 - 9.
- [12] 廖堃. 固相微萃取 - 气相色谱 - 质谱法分析烟用浸膏挥发性成分 [J]. 质谱学报, 2004, 25(4): 225 - 228.
- [13] GONG Fan, LIANG Yizeng, XIE Peishan, et al. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control[J]. J Chromatogr. A, 2003, 1002(1/2): 25 - 40.
- [14] 俞汝勤. 现代分析化学的信息理论基础 [M]. 长沙: 湖南大学出版社, 1996: 50.
- [15] 郭方道, 钟科军, 黄建国, 等. 烟用香精中风味成分的提取条件的优化与测定 [J]. 分析试验室, 2006, 25(7): 18 - 22.
- [16] LIANG Yizeng, XIE Peishan, CHAU F. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quantity control of traditional Chinese medicines[J]. J Sep Sci, 2010, 33: 1 - 12.

(上接第 79 页)

- [8] 欧阳姗, 庞国芳, 谢丽琪, 等. 动物组织中卡巴氧和喹乙醇以及相关代谢产物的液相色谱 - 串联质谱检测方法 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 590 - 594.
- [9] 周莉莉, 刘志强, 吴国光, 等. 山茱萸炮制过程中环烯醚萜苷类成分的质谱研究 [J]. 化学学报, 2008, 66(24): 2712 - 2716.
- [10] 喻凌寒, 苏流坤. 婴幼儿配方食品中生物素的高效液相色谱 - 质谱联用测定 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(2): 231 - 234.
- [11] 杜志峰, 黄金凤, 郭新东, 等. 动物肌肉组织中己烯雌酚残留量的液相色谱 - 串联质谱法测定 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(6): 823 - 826.
- [12] 周国华, 罗国安, 章杰兵. 电喷雾质谱 (ESD)法测定多组分抗菌素中的成分 [J]. 药物分析杂志, 1998, 18(4): 222 - 225.
- [13] 周莉莉, 刘志强, 闫存玉, 等. 马钱苷的电喷雾串联质谱及傅立叶变换离子回旋共振质谱研究 [J]. 质谱学报, 2008, 29(6): 332 - 334.
- [14] European Commission. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of result[S]. Official Journal, L221, 17 August, 2002: 8 - 36.
- [15] 熊伟, 杨放, 李蔷薇, 等. 2-羟丙基-环糊精对那他霉素的增溶作用 [J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(5): 231 - 234.
- [16] 陈冠群, 季波. 那他霉素的特性及应用 [J]. 乳品工业, 2002, 30(4): 26 - 28.