

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250414003

引用格式: 张艳红, 易倩, 李德祥, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中乳酸链球菌素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 287-294.

ZHANG YH, YI Q, LI DX, *et al.* Determination of lactostreptococcin residues in food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 287-294. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 乳酸链球菌素残留量

张艳红¹, 易倩¹, 李德祥¹, 张婷¹, 杨洁¹, 李红梅¹, 杨欣怡¹,
卢加文^{1*}, 张凤枰^{1,2}

(1. 四川威尔检测技术股份有限公司, 成都 610041; 2. 宜宾学院质量管理与检验检测学部, 宜宾 644007)

摘要: **目的** 建立一种超高效液相色谱-串联质谱法测定多种食品中乳酸链球菌素残留量的方法。**方法** 样品用0.1%甲酸溶液+乙腈(80:20, V:V)提取、正己烷去脂, 以0.1%甲酸溶液和乙腈为流动相梯度洗脱, 经ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)分离, 采用电喷雾离子源、正离子多反应监测模式检测, 基质匹配标准曲线外标法定量。**结果** 乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 在0.5~50.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数大于0.995, 检出限和定量限分别为0.05~0.30 mg/kg 和0.15~1.00 mg/kg, 在1.0、5.0、200.0 mg/kg 3个加标水平下, 回收率为88.8%~106.2%, 相对标准偏差为1.32%~8.85%。**结论** 所建立的方法快速高效、重复性好、灵敏度高、定性定量准确, 可用于批量食品样品中乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 的测定。

关键词: 乳酸链球菌素; 残留量; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of lactostreptococcin residues in food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Yan-Hong¹, YI Qian¹, LI De-Xiang¹, ZHANG Ting¹, YANG Jie¹,
LI Hong-Mei¹, YANG Xin-Yi¹, LU Jia-Wen^{1*}, ZHANG Feng-Ping^{1,2}

(1. Sichuan Willtest Technology Co., Ltd., Chengdu 610041, China;
2. Faculty of Quality Management and Inspection Quarantine, Yibin University, Yibin 644007, China)

ABSTRACT: Objective To develop an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of Nisin residues in various foods. **Methods** The samples were extracted with 0.1% formic acid solution+acetonitrile (80:20, V:V), delipid with n-hexane, eluted with 0.1% formic acid solution and acetonitrile as mobile phase gradient, and separated by ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm). Electrospray ion source and positive ion multi-reaction monitoring mode were used for detection, and matrix

收稿日期: 2025-04-14

基金项目: 四川省2023年“天府菜油”支持建立科技创新团队奖补项目(2023TFR004)

第一作者: 张艳红(1993—), 女, 工程师, 硕士, 主要研究方向为食品和农产品质量安全检测。E-mail: zhangyh@willtest.cn

*通信作者: 卢加文(1980—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为食品和农产品安全分析与检测。E-mail: 1756211563@qq.com

matching standard curve external standard method was used for quantification. **Results** The linear relationship between Nisin A and Nisin Z was good in the range of 0.5 to 50.0 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficient was greater than 0.995. The limits of detection and quantitation were 0.05 to 0.30 mg/kg and 0.15 to 1.00 mg/kg, respectively. The recoveries ranged from 88.8% to 106.2% and the relative standard deviations were 1.32% to 8.85% at the 3 added levels of 1.0, 5.0 and 200.0 mg/kg. **Conclusion** The established method is fast, efficient, repeatable, sensitive and accurate, and can be used for the determination of Nisin A and Nisin Z in batch food samples.

KEY WORDS: lactistreptococin; residual amount; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

乳酸链球菌素(Nisin)是由部分乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)或乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)菌株产生的一种多肽物质,属于I型羊毛硫菌素,由5个硫醚环状结构和34个氨基酸组成,分子量约为3500 Da^[1-2]。目前共发现14种乳酸链球菌素的天然变体(乳酸链球菌素A、Z、F、Q、S、U、U2、H、P、G、E、J、O1、2、3和O4),乳酸链球菌素A和乳酸链球菌素Z是发现最早、研究最多的两个类型^[3-6]。乳酸链球菌素对革兰氏阳性菌表现出广泛的抑制作用,如单增李斯特菌、葡萄球菌属、链球菌属、肠球菌属、芽孢杆菌属等^[7-12]。单独使用对革兰氏阴性菌无效,但在高压、冷冻、降低pH、螯合剂处理等条件下,对革兰氏阴性菌抑菌作用显著增强,如沙门氏菌、大肠杆菌、假单胞杆菌等^[13-14]。乳酸链球菌素在胰凝乳蛋白酶的作用下迅速水解为氨基酸,对人体安全无毒副作用^[2,15]。1969年被联合国粮食及农业组织/世界卫生组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, FAO/WHO)批准作为食品防腐剂,是世界上唯一被允许用作食品添加剂的细菌素,广泛运用于乳及乳制品、肉及肉制品、水产制品、复合调味料等食品保鲜^[16]。欧盟、美国、英国和中国等80多个国家和地区针对乳酸链球菌素的使用制定了法律法规^[5,17]。GB 2760—2024《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定了乳酸链球菌素的使用范围和最大使用量,但乳酸链球菌素尚未纳入国家食品安全监督抽检检验项目。鉴于脱氢乙酸及其钠盐禁止在淀粉制品、面包、糕点、预制肉制品等食品中使用,食品生产企业将增加乳酸链球菌素的使用量,为保证食品安全,亟需建立食品中乳酸链球菌素残留检测方法,规范食品生产企业合规使用乳酸链球菌素。

目前,国内外有关食品中乳酸链球菌素测定方法主要有琼脂扩散法^[18]、比浊法^[19]、酶联免疫吸附法^[20]和生物荧光法^[21]等,这些传统方法操作烦琐、检测时间长、抗基质干扰能力弱、灵敏度低、准确性和重复性差、不能定量乳酸链球菌素异构体;近年来,也有采用液相色谱法测定乳制品、酱制品和熟肉制品等食品中乳酸链球菌素^[22-23]、液相色谱-串联质谱法检测果汁饮料、鲜湿米粉、牛奶和奶

酪等食品中乳酸链球菌素^[24-27],这些文献多聚焦于基于单一基质开展方法研究,未见多基质方法考察研究报道。鉴于食品种类多、基质复杂,液相色谱-质谱串联技术灵敏度和选择性更高、抗干扰能力强、更适用于复杂基质^[28]等特点,本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS),系统考察优化样品前处理方法和色谱质谱条件,研究建立超高效液相色谱-串联质谱法测定多种食品基质中乳酸链球菌素A和乳酸链球菌素Z残留量,旨在为食品中乳酸链球菌素安全监管提供检测方法依据,引导食品生产企业乳酸链球菌素合规使用,从源头保障我国食品质量安全。

1 材料与方法

1.1 仪器、材料与试剂

1290-6470B 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(配电喷雾离子源)、ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)(美国 Agilent 公司); KS-5200E 超声波清洗器(昆山洁力美超声仪器有限公司); BSA224S-CW 万分之一天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; SDC-2500 多功能涡旋混合振荡器(深圳逗点生物技术有限公司); SF-TGL-18R 冷冻离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司); Milli-Q 超纯水发生器(美国 Millipore 公司)。

牛奶、面包、醋、调味汁、牛肉干、肉罐肠、酱腌菜、饮料等食品样品均为市售。

乳酸链球菌素 A (CAS:1414-45-5)、乳酸链球菌素 Z (CAS:137061-46-2)(纯度 99.5%, 上海源叶生物科技有限公司); 乙腈、正己烷(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸(色谱纯, 成都市科隆化学品有限公司); 微孔滤膜(有机系, 0.22 μm , 天津市津腾实验设备有限公司); 实验用水为 Milli-Q 制备的超纯水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: A 相为 0.1%甲酸溶液, B 相为乙腈, 流速: 0.25 mL/min, 梯度洗脱程序: 0~3.0 min,

80%~10% A; 3.0~6.0 min, 10% A; 6.0~6.1 min, 10%~80% A; 6.1~7.0 min, 80% A; 进样量: 5 μ L。

1.2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 离子源温度: 350 $^{\circ}$ C; 干燥气压力: 45 psi; 鞘气温度: 400 $^{\circ}$ C; 鞘气流速: 12 L/min; 碰撞气流速: 7 L/min; 喷雾电压: 5000 V; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测; 其他 MS 参数详见表 1。

表 1 乳酸链球菌素的 MS 参数
Table 1 MS parameters of Nisin

| 组分 | 母离子 (<i>m/z</i>) | 子离子 (<i>m/z</i>) | 锥孔电压 /V | 碰撞能量 /eV |
|----------|-----------------------|-----------------------|------------|-------------|
| 乳酸链球菌素 A | 671.6 | 810.9* | 70 | 5 |
| | | 790.3 | | 8 |
| | | 744.5 | | 10 |
| 乳酸链球菌素 Z | 667.0 | 805.0* | 70 | 5 |
| | | 739.0 | | 10 |
| | | 644.0 | | 15 |

注: *为定量离子。

1.2.3 标准溶液配制

称取适量乳酸链球菌素 A、乳酸链球菌素 Z 标准品, 分别用 0.1% 甲酸溶液+乙腈(80:20, V:V, 下同)配制成 1000 μ g/mL 标准储备溶液; 准确移取 10 mL 乳酸链球菌素 A、乳酸链球菌素 Z 标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中, 用 0.1% 甲酸溶液+乙腈(80:20)稀释配制成 100 μ g/mL 混合标准中间溶液。准确移取适量混合标准中间溶液, 用空白基质溶液稀释成质量浓度分别为 0.01、0.05、0.20、1.00、2.00、5.00、10.00 μ g/mL 基质匹配混合标准系列溶液。临用现配。

1.2.4 样品前处理

高油脂试样: 准确称取试样 5 g 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 0.1% 甲酸溶液+乙腈, 超声提取 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至 50 mL 容量瓶中, 残渣再用 20 mL 0.1% 甲酸溶液+乙腈重复提取一次, 合并两次提取液, 用 0.1% 甲酸溶液+乙腈定容、混匀, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 待上机测定。高油脂样品在提取步骤中加入 20 mL 正己烷去脂, 高蛋白样品加入 2 mL 0.25 mol/L 亚铁氰化钾和 2 mL 1 mol/L 乙酸锌溶液沉淀蛋白。

1.2.5 基质效应计算

基质效应(matrix effect, ME)计算公式为: $ME = \frac{\text{基质匹配标准溶液峰面积}}{\text{溶剂标准溶液峰面积}}$ 。

当 $ME > 1$ 时, 表示基质增强效应, 当 $ME < 1$ 时, 表示基质抑制效应。当在 $0.8 \leq ME \leq 1.2$ 之间时, 表示 ME 不明显; 当 $0.5 \leq ME < 0.8$ 或 $1.2 < ME \leq 1.5$ 时, 表现为中等 ME; 当 $ME < 0.5$ 或者 $ME > 1.5$ 时, 表现为强 ME^[29-30]。

1.3 数据处理

采用 MassHunter 10.0 软件进行数据采集及定性定量分析; 用 Excel 2019 软件进行数据处理分析和图形绘制。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

乳酸链球菌素是一种天然活性抗菌肽, 属于大分子化合物^[1-2], 其分离度受色谱柱影响很大, 在参考已报道文献资料^[22-24]基础上, 在相同参数条件下, 比较 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)、InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm \times 3.0 mm, 2.7 μ m)和 ZORBAX Hilic Plus (50 mm \times 2.1 mm, 3.5 μ m)乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 的分离度、峰型和响应情况。结果表明, 3 种色谱柱均能实现乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 的良好分离, 但 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱峰型尖锐、分离度更好、分析速度快, 因此本研究选用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱。

乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 在正离子模式下采集, 流动相加酸提供 H⁺, 促进其电离、提高目标化合物响应。分别考察甲醇、乙腈作为有机相, 0.05% 甲酸溶液、0.1% 甲酸溶液和 2 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸)溶液作为水相的分离效果。结果表明, 乙腈作为有机相时洗脱效果更好、色谱峰更尖锐, 0.1% 甲酸溶液响应明显高于 0.05% 甲酸溶液, 2 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸)溶液与 0.1% 甲酸溶液峰型、响应和分离度均无明显区别, 较低的盐浓度有助于延长色谱柱的使用寿命, 因此选用乙腈-0.1% 甲酸溶液作为流动相。乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 混合标准溶液的总离子流图见图 1。

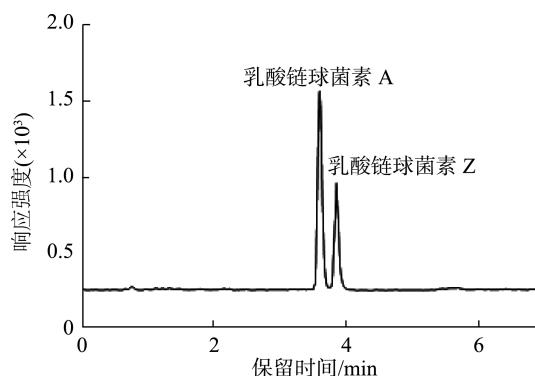


图 1 乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 混合标准溶液 (10.0 μ g/mL) 总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of Nisin A and Nisin Z mixed standard solution (10.0 μ g/mL)

2.2 质谱条件的优化

分别配制 20 μ g/mL 乳酸链球菌素 A、乳酸链球菌素 Z 标准溶液, 在不接色谱柱模式下, 采用正离子和负离子两种模式扫描, 两种化合物在正离子模式下有较高的稳定性和响应值, 因此选择正离子模式, 与文献^[24]的报道一

致。母离子扫描后,获得各化合物母离子 $[M+nH]n^+$,并将最大以及次大的碎片离子分别选作定量离子和定性离子。在多反应监测模式下,将化合物的母离子和2个碎片离子录入方法优化软件中,获得各化合物的最佳碰撞能量、锥孔电压和雾化气流速等质谱参数,详见表1。

2.3 提取溶剂的考察

乳酸链球菌素在中性和碱性条件下溶解性差,在酸性条件下的溶解度随着pH的降低而升高。选择0.02%、0.05%、0.10%和0.20%甲酸溶液作为提取溶液,考察牛奶、面包、醋、调味汁、牛肉干5种基质的提取效率。分别称取5g试样,加入适量乳酸链球菌素A和乳酸链球菌素Z混合标准溶液后按照1.2完成样品前处理和UPLC-MS/MS测定,结果如图2所示。结果表明,使用0.02%和0.05%甲酸作为提取溶剂的提取效果低于0.1%甲酸,0.1%和0.2%甲酸提取效果基本一致,为匹配流动相,选用0.1%甲酸溶液+乙腈(80+20)作为提取溶剂。

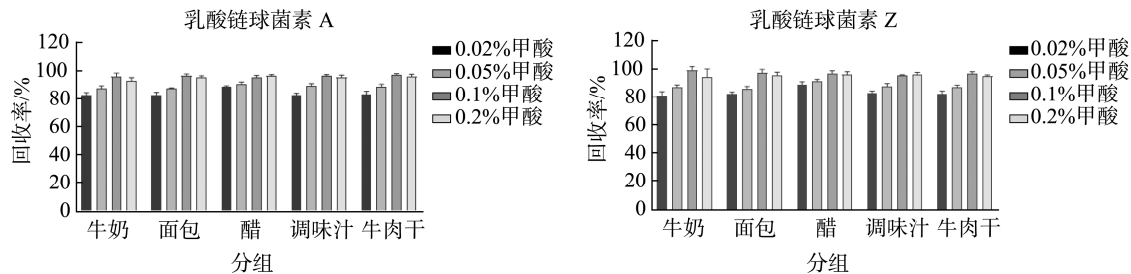


图2 不同提取溶剂考察结果(n=6)

Fig.2 Investigation results of different extraction solvents (n=6)

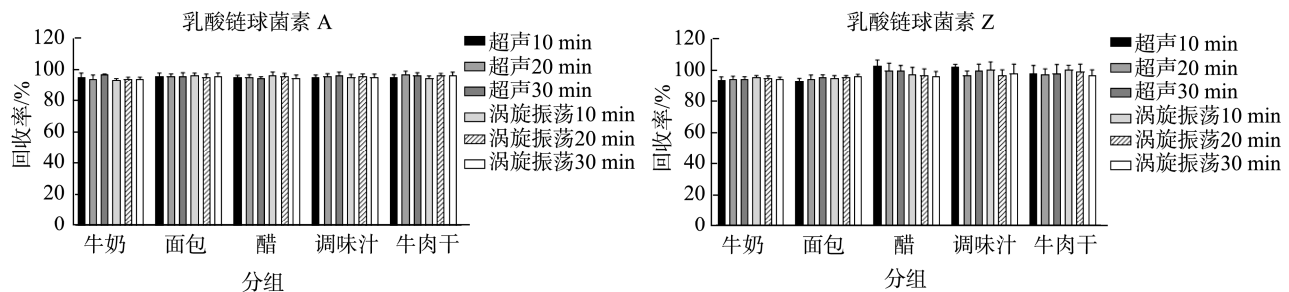


图3 不同提取方式考察结果(n=6)

Fig.3 Investigation results of different extraction methods (n=6)

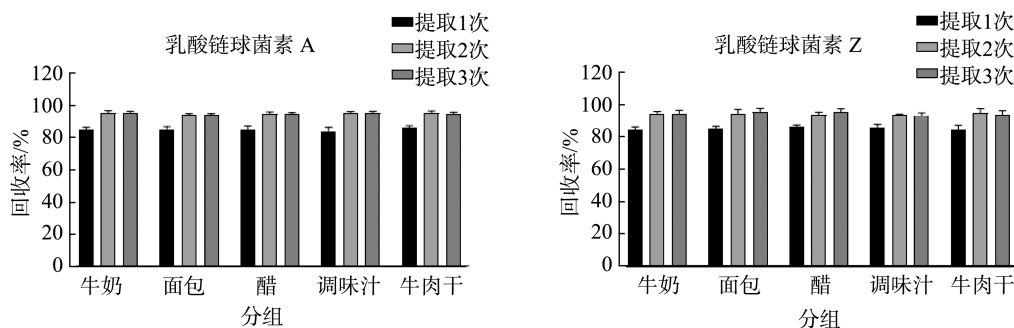


图4 不同提取次数考察结果(n=6)

Fig.4 Investigation results of different extraction times (n=6)

2.4 提取方式的考察

选取牛奶、面包、醋、调味汁、牛肉干5种基质,分别考察超声10、20、30 min,涡旋振荡10、20、30 min不同提取方式的提取效率。称取5g试样,加入适量乳酸链球菌素A和乳酸链球菌素Z混合标准溶液后按照1.2完成样品前处理和UPLC-MS/MS测定,结果见图3。结果表明,6种提取方式的提取效果无明显差异,考虑提取效率及操作简便性,确定提取方式为超声10 min。

2.5 提取次数的考察

选取牛奶、面包、醋、调味汁、牛肉干5种基质,分别考察提取1、2、3次的提取效率。称取5g试样,加入适量乳酸链球菌素A和乳酸链球菌素Z混合标准溶液后按照1.2完成样品前处理和UPLC-MS/MS测定,结果见图4。结果表明,不同样品基质提取2次结果明显高于提取1次,且提取2次与3次结果基本一致,因此确定提取次数为2次。

2.6 方法学评价

2.6.1 基质效应

由于食品样品基质复杂, 样品中非挥发性杂质组分对目标化合物的离子化效率产生影响, 导致响应增强或减弱。选取牛奶、面包、醋、调味汁和牛肉干基质, 按 1.2 进行样品前处理, 得到空白基质溶液, 配制得到标准工作溶液, 上机分析后, 按 1.2.5 计算 MEs, 如图 5 所示。结果表明, 乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 的 ME 在 0.43~0.88 之间, 在 5 种食品基质中表现为基质抑制效应, 在调味汁基质中 ME<0.5 表现为强 ME。已报道文献研究表明, 乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 吸附于 C₁₈、HLB 和 PRIME HLB 固相萃取柱上难以洗脱^[23], 无有效净化处理方式, 且目前尚无乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 同位素内标, 为减弱 ME, 克服样品基质差异对目标化合物造成的影响, 本方法采用基质匹配标准曲线法开展定量分析工作。

2.6.2 线性范围、检出限和定量限

将 1.2.3 配制的基质混合标准系列溶液, 在 1.2.1 和 1.2.2 分析条件下, 浓度从低到高进样检测, 以乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 定量离子对的峰面积为纵坐标(Y),

以质量浓度为横坐标(X, $\mu\text{g/mL}$), 得到线性回归方程。以 3 倍信噪比确定方法的检出限, 10 倍信噪比确定方法的定量限。结果如表 2 所示, 乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 在 0.5~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 决定系数 R^2 均大于 0.995。在不同食品基质中, 乳酸链球菌素 A 的检出限和定量限分别在 0.05~0.20 mg/kg 和 0.15~0.60 mg/kg 之间, 乳酸链球菌素 Z 的检出限和定量限分别在 0.10~0.30 mg/kg 和 0.30~1.00 mg/kg 之间, 均满足检测需要。

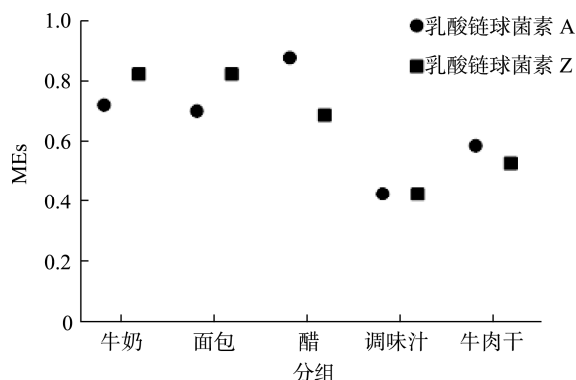


图 5 乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 的 MEs
Fig.5 MEs for Nisin A and Nisin Z

表 2 乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 的线性方程、检出限和定量限

Table 2 Linear equations, limits of detection and limits of quantitation for Nisin A and Nisin Z

| 基质 | 乳酸链球菌素 A | | | | 乳酸链球菌素 Z | | | |
|-----|---------------------|-------|-----------------|-----------------|-------------------|-------|-----------------|-----------------|
| | 回归方程 | r^2 | 检出限 /(mg/kg) | 定量限 /(mg/kg) | 回归方程 | r^2 | 检出限 /(mg/kg) | 定量限 /(mg/kg) |
| 牛奶 | $Y=1937.02X-207.74$ | 0.995 | 0.05 | 0.15 | $Y=315.03X-64.76$ | 0.995 | 0.10 | 0.30 |
| 面包 | $Y=1371.31X-113.64$ | 0.995 | 0.05 | 0.15 | $Y=258.68X-89.57$ | 0.998 | 0.10 | 0.30 |
| 醋 | $Y=2150.78X-1373.5$ | 0.995 | 0.20 | 0.60 | $Y=227.22X-81.84$ | 0.995 | 0.30 | 1.00 |
| 调味汁 | $Y=859.83X-207.81$ | 0.995 | 0.20 | 0.60 | $Y=136.05X-47.60$ | 0.999 | 0.30 | 1.00 |
| 牛肉干 | $Y=1122.07X-70.64$ | 0.997 | 0.10 | 0.30 | $Y=169.00X-87.05$ | 1.000 | 0.20 | 0.60 |

2.6.3 回收率和精密度

本研究采用标准添加法验证方法的准确性和精密度, 分别取牛奶、面包、醋、调味汁和牛肉干样品, 按照 1.0 mg/kg (定量限)、5.0 mg/kg (5 倍定量限)、200.0 mg/kg (GB 2760—2024 限量值) 添加水平进行加标实验, 每个添加水平平行测定 6 次, 计算加标回收率和相对标准偏差。由表 3 可知, 使用所建立的方法定量测定乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z, 在 5 种基质中回收率在 88.8%~106.2% 之间, 相对标准偏差在 1.32%~8.85%, 表明该方法定量准确、重复性好, 满足不同食品基质中乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 的定性定量分析要求。

2.7 实际样品检测

随机抽取 24 批市售配料表中标识添加了乳酸链球菌素的食品 and 26 批次未标识添加乳酸链球菌素的食品, 按照上述优化的条件和方法, 测定样品中的乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 残留量, 样品总离子流图见图 6, 测定结果见表 4。

表 3 加标回收实验结果

Table 3 Experimental results of labeling recovery

| 基质 | 添加浓度 /(mg/kg) | 乳酸链球菌素 A | | 乳酸链球菌素 Z | |
|-----|------------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | 平均 回收率/% | RSDs /% | 平均 回收率/% | RSDs /% |
| 牛奶 | 1.0 | 100.8 | 6.99 | 100.8 | 8.64 |
| | 5.0 | 97.4 | 6.13 | 102.1 | 5.39 |
| | 200.0 | 105.8 | 2.64 | 101.1 | 3.40 |
| 面包 | 1.0 | 94.9 | 7.59 | 98.3 | 8.85 |
| | 5.0 | 87.1 | 2.92 | 90.5 | 3.47 |
| | 200.0 | 107.9 | 3.37 | 91.8 | 1.54 |
| 醋 | 1.0 | 101.1 | 8.62 | 91.6 | 3.26 |
| | 5.0 | 91.8 | 4.36 | 91.3 | 2.92 |
| | 200.0 | 94.8 | 7.80 | 88.8 | 5.45 |
| 调味汁 | 1.0 | 99.6 | 4.92 | 98.4 | 8.45 |
| | 5.0 | 105.8 | 4.66 | 106.2 | 2.55 |
| | 200.0 | 106.2 | 3.41 | 101.7 | 1.45 |
| 牛肉干 | 1.0 | 99.1 | 8.63 | 98.4 | 6.24 |
| | 5.0 | 96.8 | 2.42 | 104.5 | 3.40 |
| | 200.0 | 98.5 | 1.27 | 94.2 | 1.32 |

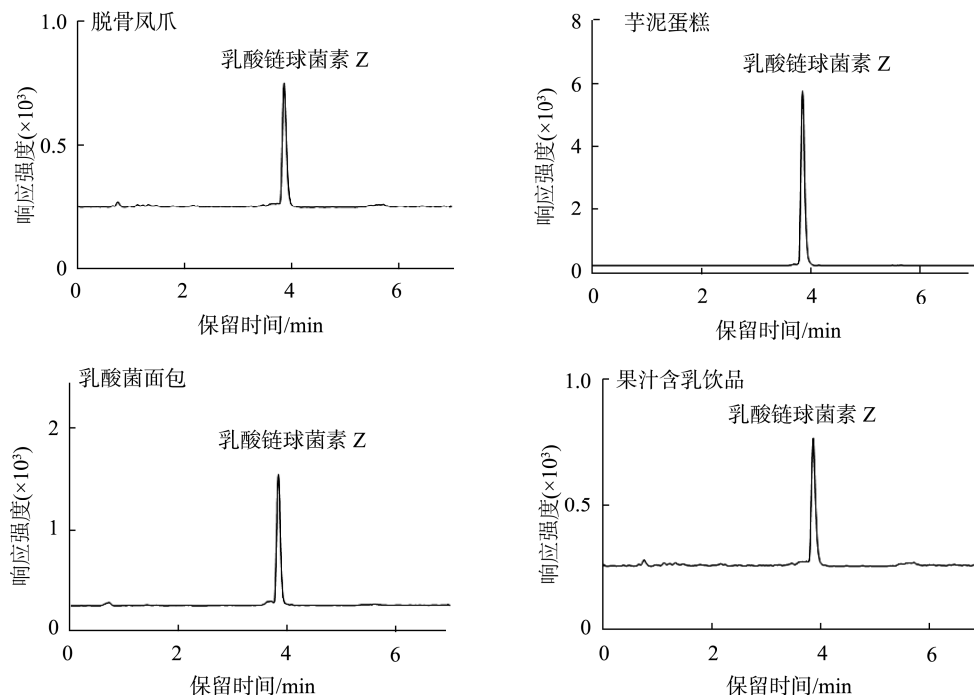


图6 实际样品的总离子流图

Fig.6 Total ion flow diagram of actual samples

表4 实际样品检测结果(mg/kg, n=3)

Table 4 Test results of actual samples (mg/kg, n=3)

| | 食品名称 | 乳酸链球菌素 A | 乳酸链球菌素 Z | 食品名称 | 乳酸链球菌素 A | 乳酸链球菌素 Z | |
|---------------|----------------|----------|----------|--------|----------|----------|---|
| 标识添加乳酸链球菌素的食品 | 爆汁肉肠 | — | 15.9 | 调理面包 | — | 21.3 | |
| | 肉罐肠 | — | 27.7 | 乳酸菌面包 | — | 70.8 | |
| | 黑猪午餐肉 | — | 18.3 | 全麦面包 | — | 4.03 | |
| | 卤鸭胗 | — | 16.4 | 腌辣椒 | — | 17.8 | |
| | 脱骨凤爪 | — | 33.8 | 腌黄瓜 | — | 9.67 | |
| | 碳烤猪肉脯 | — | 25.4 | 即食酸菜 | 3.77 | 205 | |
| | 酱卤牛肉 | — | 15.4 | 乳酸菌饮料 | — | 14.7 | |
| | 水晶肘花 | — | 9.36 | 酸奶饮品 | — | 17.1 | |
| | 肘花火腿 | — | 18.9 | 果汁含乳饮品 | — | 23.8 | |
| | 五香肥肠 | — | 9.14 | 酱汁味小鱼 | — | 15.0 | |
| | 火腿肠 | — | 16.2 | 手撕鱼排 | — | 23.8 | |
| | 芋泥蛋糕 | — | 266 | 奶酪棒 | — | 10.7 | |
| | 未标识添加乳酸链球菌素的食品 | 酱油 | — | — | 梅菜扣肉 | — | — |
| | | 豆瓣 | — | — | 香辣榨菜 | — | — |
| 牛油火锅底料 | | — | — | 甜面酱 | — | — | |
| 鸡蛋干 | | — | — | 柠檬茶饮料 | — | — | |
| 卤鹌鹑蛋 | | — | — | 优酸乳 | — | — | |
| 乳粉 | | — | — | 醪糟 | — | — | |
| 老酸奶 | | — | — | 乌梅干 | — | — | |
| 鲜牛奶芝士酪 | | — | — | 香辣豆皮卷 | — | — | |
| 香辣金针菇 | | — | — | 藤椒辣条 | — | — | |
| 麻辣海带丝 | | — | — | 虎皮凤爪 | — | — | |
| 手撕豆干 | | — | — | 麻辣卤藕 | — | — | |
| 湿米粉 | | — | — | 自热火锅 | — | — | |
| 泡椒鱼皮 | | — | — | 烟熏五花肉 | — | — | |

注: —表示未检出。

结果表明,在上述实验条件下,不同食品基质的色谱峰均峰型对称,分离良好,无杂质峰干扰。通过对 50 批实际样品的测定,验证了该方法在高脂肪、高蛋白、高糖、高盐等复杂基质中的适用性;24 批次标注添加乳酸链球菌素的食品中,乳酸链球菌素 A 检出 1 批次,含量为 3.77 mg/kg,乳酸链球菌素 Z 检出 24 批次,含量为 4.03~266 mg/kg,使用量均符合 GB 2760—2024 限量规定。此外,26 批未标注添加乳酸链球菌素的食品均未检出乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z,不存在配料表与实际添加不符的情况。表明食品生产企业对乳酸链球菌素的使用符合相关法规要求,未发现违规添加或标签标识不实的问题,所建立的方法能够准确、高效测定不同食品基质中乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 的含量,展现出良好的基质适应性和稳定性。

3 结论

本研究建立了食品中乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 残留量的 UPLC-MS/MS 定性定量测定方法。与现有研究相比,本方法通过考察多种食品基质,对提取溶剂、提取方式和提取次数等样品前处理方法和条件、色谱质谱条件进行系统考察优化,得到一种前处理简单、高效、灵敏度高的食品中乳酸链球菌素残留量定性定量检测方法。经验证,该方法线性范围、检出限、定量限、回收率和精密度等方面均符合 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》规定要求。采用该法对市售 50 批食品样品进行测定,结果表明,不同食品基质的色谱峰峰型对称,分离良好,且无显著杂质峰干扰,证明所建立的方法适用于多种食品基质中乳酸链球菌素 A 和乳酸链球菌素 Z 残留量的测定;市售 50 批次样品检验结果表明,当前乳酸链球菌素在允许使用的食品类别中有添加且使用量满足要求,未发现超范围应用及标签信息虚假标注等情况。食品安全主管部门仍需进一步加强食品中乳酸链球菌素残留量的安全监管,引导生产企业合规使用,从源头保障食品安全,守护人民群众的身体健

参考文献

- [1] NINA I, MATTI K. Bioluminescence-based bioassays for rapid detection of Nisin in food [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(9): 1982–1987.
- [2] GHARSALLAOUI A, OULAHAL N, JOLY C, *et al.* Nisin as a food preservative: Part 1: Physicochemical properties, anti-microbial activity and main uses [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016(56): 1262–1274.
- [3] ESTER S, IRENE L, NURIA P, *et al.* Evaluation of safety and probiotic traits from a comprehensive genome-based in silico analysis of *Ligilactobacillus salivarius* P1CEA3, isolated from pigs and producer of Nisin S [J]. *Foods*, 2024, 13(1): 107.
- [4] DICKMAN R, DANELIUS E, MITCHELL SA, *et al.* A chemical biology approach to understanding molecular recognition of lipid II by Nisin(1–12): Synthesis and NMR ensemble analysis of Nisin (1–12) and analogues [J]. *Chemistry-A European Journal*, 2019, 25(64): 14572–14582.
- [5] 顾晟琳, 刘璐, 徐琼. 乳酸链球菌素种类、国内外限量标准及在食品中的应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(21): 263–270. GU SL, LIU L, XU Q. Research progress of lactostreptococci species, domestic and foreign limit standard and application in food [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(21): 263–270.
- [6] CHIKINDAS ML, WEEKS R, DRIDER D, *et al.* Functions and emerging applications of bacteriocins [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 49: 23–28.
- [7] 范祥昊, 李金兰, 房帅虎, 等. 乳酸链球菌素对单增李斯特菌生物膜的杀灭效果研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2023, 40(10): 725–732. FAN XH, LI JL, FANG SH, *et al.* Bactericidal effect of lactostreptococci on *Listeria monocytogenes* biofilm [J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2023, 40(10): 725–732.
- [8] RENDUELES C, CATARINA DA, ESCOBEDO S, *et al.* Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives: A review [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 368: 368–377.
- [9] SOLOMAKOS N, GOVARIS A, KOIDIS P, *et al.* The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(1): 120–127.
- [10] POURYOUSEF N, AHMADY M, SHARIATIFAR N, *et al.* The effects of essential oil *Mentha pulegium* L. and nisin (free and nanoliposome forms) on inoculated bacterial in minced silver carp fish (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 2022, 16(5): 3934–3945.
- [11] NORHANA M, POOLE S, DEETH H, *et al.* Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 °C [J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(1): 43–50.
- [12] 王佳宇, 胡文忠, 管玉格, 等. 乳酸链球菌素抑菌机理及在食品保鲜中的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(3): 346–350. WANG JY, HU WZ, GUAN YG, *et al.* Antimicrobial mechanism of *Streptococcus latissimus* and research progress in food preservation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(3): 346–350.
- [13] WANG T, LIN L, OU J, *et al.* The inhibitory effects of varying water activity, pH, and Nisin content on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin a production in whipping cream [J]. *Journal of Food Safety*, 2017, 37(1): 75–84.
- [14] NIKOLAOS S, ALEXANDROS G, KOIDIS P, *et al.* The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157: H7 in minced beef during refrigerated storage [J]. *Meat Sciences*, 2008, 25(1): 120–127.
- [15] LUCIANAJUNCIONIDE A, ANGELAFAUSTINO J, PRISCILAGAVA M, *et al.* Nisin biotechnological production and application: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20(3/4): 146–154.
- [16] 姚文俊, 杨勇, 刘希, 等. 微生物源乳酸链球菌素(Nisin)及在食品中应用研究进展[J]. *中国调味品*, 2023, 48(1): 215–220. YAO WJ, YANG Y, LIU X, *et al.* Research progress of microbial-derived Nisin and its application in food [J]. *Chinese Journal of Condiments*, 2023,

- 48(1): 215–220.
- [17] YOUNES M, AGGETT P, AGUILAR F, *et al.* Safety of Nisin (E234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use [J]. *EFSA Journal*, 2017, 15(12). DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5063
- [18] WOLF CE, GIBBONS WR. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1996, 80(4): 453–457.
- [19] EATHAROPOULOS E, TOULOUPI K, TOURAKL M. Monitoring of multiple bacteriocins through a developed dual extraction protocol and comparison of HPLC-DAD with turbidometry as their quantification system [J]. *Microbiological Methods*, 2016, 127(6): 123–131.
- [20] 孟茹, 赵贵明, 贾瑜, 等. 酶联免疫法检测食品中乳酸链球菌素[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(5): 509–515.
MENG R, ZHAO GM, JIA Y, *et al.* Detection of lactococci in food by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2013, 32(5): 509–515.
- [21] VIROLAINEN N, GUGLIELMETTI S, ARIOLI S, *et al.* Bioluminescence-based identification of nisin producers a rapid and simple screening method for nisinogenic bacteria in food samples [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 158(2): 126–132.
- [22] 陈延伟, 何龙凉, 李小琴, 等. 液相色谱法测定乳制品中乳酸链球菌素[J]. *中国口岸科学技术*, 2022, 4(4): 56–60.
CHEN YW, HE LQ, LI XQ, *et al.* Determination of *Lactostreptococcus* in dairy products by liquid chromatography [J]. *China Port Science and Technology*, 2022, 4(4): 56–60.
- [23] 朱明扬, 余莲芳, 黄谦, 等. 高效液相色谱法检测食品中 Nisin 的方法研究[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(6): 230–236.
ZHU MY, YU LF, HUANG Q, *et al.* Determination of Nisin in food by high performance liquid chromatography [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(6): 230–236.
- [24] 陈召桂, 杨晋青, 朱玲琳. LC-MS/MS 测定果汁饮料中乳酸链球菌素[J]. *食品工业*, 2021, 42(1): 288–291.
CHEN ZI, YANG JQ, ZHU LL. Determination of *Lactostreptococcus* in fruit juice beverages by LC-MS/MS [J]. *Food Industry*, 2021, 42(1): 288–291.
- [25] 刘珈伶, 廖强, 蒋定之, 等. 鲜湿米粉中两种乳酸链球菌素的 HPLC-MS/MS 检测方法[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(7): 820–824.
LIU JL, LIAO Q, JIANG DZ, *et al.* Determination of two kinds of *Lactostreptococcus* in fresh and wet rice flour by HPLC-MS/MS [J]. *Journal of Analysis and Measurement*, 2018, 37(7): 820–824.
- [26] ROCCHETTI G, BELLASSI P, MORELLI L. Combining UHPLC-HRMS targeted and suspect screening for a comprehensive analysis of nisin A and its variants in cow milk [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2024(2): 610–614.
- [27] KO KY, PARK SR, LIM HS, *et al.* Improved pretreatment method for determination of nisins A and Z and monitoring in cheese using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(1): 122–130.
- [28] 林彬彬, 杨志金, 黄旭良, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中 9 种新烟碱类杀虫剂及 5 种代谢物残留量[J]. *食品科学*, 2024, 45(24): 273–281.
LIN BB, YANG ZJ, HUANG XL, *et al.* Simultaneous determination of 9 kinds of neonicotinoid insecticides and 5 kinds of metabolites in livestock and poultry meat by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Science*, 2024, 45(24): 273–281.
- [29] 王艳红, 吴雨桐, 曹虹芳, 等. 分散固相萃取结合 UPLC-MS/MS 测定不同人参加工品中 46 种皂苷类化合物[J]. *食品科学*, 2023, 44(28): 305–315.
WANG YH, WU YT, CAO HF, *et al.* Determination of 46 saponins in different ginseng products by dispersed solid phase extraction combined with UPLC-MS/MS [J]. *Food Science*, 2023, 44(28): 305–315.
- [30] 陈言凯. 固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法快速测定乳粉及液体乳中 26 种吡咯里西啶生物碱的含量[J]. *食品科学*, 2024, 45(24): 266–272.
CHEN YK. Rapid determination of 26 pyrrolizidine alkaloids in milk powder and liquid milk by solid phase extraction combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2024, 45(24): 266–272.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)