

QuEChERS-UPLC-MS/MS 法测定苹果及苹果脯中的展青霉素

林孟毅, 张国卿, 朱雨辰, 陈芳*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 国家果蔬加工工程技术研究中心 北京 100083)

摘要 本研究旨在开发一种快速、准确且环境友好的检测方法,用于测定苹果及苹果脯中的展青霉素(PAT)。PAT是由扩展青霉产生的真菌毒素,具有致畸、致癌、免疫毒性、神经毒性和遗传毒性等危害。果脯加工过程中可能存在PAT污染的问题,建立高效检测方法对保障食品安全至关重要。传统检测方法操作复杂、耗时长且有机溶剂消耗量大。本研究采用QuEChERS提取技术结合超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术,优化提取溶剂(乙腈)、盐析剂(无水硫酸镁和氯化钠)和复溶溶剂(1%乙腈水溶液)的选择,以提高检测效率和灵敏度。通过优化质谱和液相条件,确定了最佳色谱柱(BEH C18)和梯度洗脱程序。方法学验证显示,检出限为0.4 μg/kg,定量限为0.8 μg/kg,线性范围0.1~12.5 μg/L和3.2~400 μg/L,相关系数 R^2 均大于0.999。日内和日间精密度的相对标准偏差均小于5.5%,加标回收率在98%以上,表明该方法准确性和精密度良好。结果表明,QuEChERS-UPLC-MS/MS方法可有效检测苹果及苹果脯中的PAT,灵敏度和准确性高,并可为其它水果制品的PAT污染控制提供技术支持。此外,研究发现苹果脯加工中的糖煮步骤显著降低了PAT含量,表明高温处理对PAT降解有重要作用。未来可进一步探讨不同加工条件对PAT含量的影响及其在其它食品基质中的应用。

关键词 展青霉素; 苹果脯; QuEChERS; 高效液相色谱; 质谱

文章编号 1009-7848(2026)01-0292-13 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2026.01.026

展青霉素(Patulin, PAT)的产生与扩展青霉(*Penicillium expansum*)有关,这种真菌通常在水果表面或内部生长。当水果受到昆虫取食、机械损伤、表皮伤痕或形状缺陷等不良影响时,更容易受到扩展青霉的侵染,从而形成PAT。PAT的毒性主要源于其分子中的内酯和半缩醛结构,可能导致多种急性、亚急性和慢性毒副作用,如恶心、呕吐、抽搐、呼吸困难等,且对肝脏、肾脏和肠道屏障造成损伤^[1-2]。1987年,国际癌症研究机构(International agency for research on cancer, IARC)将PAT归类为3类致癌物^[3]。基于PAT的生殖毒性和致癌性,联合国粮食及农业组织和世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(Joint FAO/WHO expert committee on food additives, JECFA),对PAT的暂定每日最大耐受摄入量设定为0.4 μg/kg bw/d^[4]。

果脯在中国有着悠久的历史 and 独特的风味,备受消费者青睐。目前,果脯的加工技术仍以传统

加工方式为主,加工技术的落后和层次配套技术缺乏,导致果脯产品仍存在较高的食品安全风险^[5-7]。某葡萄脯、无花果脯、龙眼脯、李脯中被检测出PAT污染高达415,49,277,194,40 μg/kg,且在苹果制品中污染尤其严重,PAT可达19 622 μg/kg^[8],远超过食品法典委员会(Codex alimentarius commission, CAC)规定的限量(<50 μg/kg)^[9]。果脯中的PAT污染问题可能造成潜在的健康风险。

传统PAT检测方法主要依赖液-液萃取法和固相萃取法(Liquid-liquid extraction and solid phase extraction),然后通过色谱和质谱技术检测^[10]。虽然这些方法在灵敏度和准确性方面取得一定进展,但是仍存在操作复杂、耗时长和有机溶剂消耗量大的局限性。QuEChERS(Quick, easy, cheap, effective, rugged, safe)方法是一种基于盐析分配和分散固相萃取的快速样品前处理技术,因操作简便、成本低廉、效率高和安全性好而被广泛应用于农药残留、兽药残留、食品添加剂和真菌毒素等检测^[3,11-14]。然而,针对苹果和苹果脯中PAT的QuEChERS检测方法尚未得到充分优化和验证。

本研究通过优化提取溶剂、盐析剂和复溶溶剂的选择以及质谱和液相条件,建立一种适用于

收稿日期: 2025-02-21

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目(2023YFF1105303);
北京市科技计划项目(Z201100008920003)

第一作者: 林孟毅,女,博士生

通信作者: 陈芳 E-mail: chenfangch@sina.com

苹果和苹果脯中 PAT 的快速、准确、灵敏且环境友好的检测方法,进一步提高检测效率和灵敏度,以期为水果和水果制品中 PAT 的有效监控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

富士苹果(产地:山东烟台)购买于物美超市(学清路店)。PAT 和 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 同位素内标(>99%),青岛普瑞邦生物工程有限公司;无水硫酸镁(MgSO_4)、氯化钠(NaCl)、乙酸钠(CH_3COONa)、柠檬酸钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)、柠檬酸氢二钠($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$)、乙酸乙酯(Ethyl acetate, EA)均为分析纯级,国药集团化学试剂有限公司;乙腈(Acetonitrile, ACN)(分析纯级),上海泰坦科技股份有限公司;乙腈(色谱纯级),美国赛默飞世尔科技有限公司;乙酸(Acetic acid, AA)(色谱纯级),上海麦克林生化科技有限公司;焦亚硫酸钠(食品级),潍坊成阳化工有限公司;柠檬酸(食品级),日照金禾博源生化有限公司;白砂糖(食品级),南京甘汁园股份有限公司;MycosepTM 228 展青霉素固相净化柱(5 mL),上海泰坦科技股份有限公司;超纯水(实验室一级水)由 Milli-Q 超纯水机制备。

1.2 仪器与设备

ACQUITY I-CLASS 超高效液相色谱仪-Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪【配有电喷雾离子源(ESI)及 Masslynx 4.1 数据处理系统】,美国沃特世公司;ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm)、ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm),美国沃特世公司;NM32LA 氮气发生器,英国 Peak Scientific 公司;VORTEX-5 旋涡混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;KQ-500E 超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;UGC-12WF 水浴氮吹仪,北京优晟联合科技有限公司;CR21GIII 高速冷冻离心机,日本日立公司;JYL-C010 料理机,九阳股份有限公司;DHG-9240A 鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;0-35 玻璃浮计,河北省武强县同辉仪表厂。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC[®]

BEH C18 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm);进样量 1 μL ;柱温 40 $^\circ\text{C}$;流动:A 相为水,B 相为乙腈;流速 0.40 mL/min;洗脱梯度为:0~2 min(1%~15% B 相),2~4 min(15%~20% B 相),4~6 min(1% B 相)。

1.3.2 质谱条件 离子源:电喷雾电离源(Electron spray ionization, ESI);扫描模式:负离子模式;采集模式:多反应监测(Multiple reaction monitoring, MRM);毛细管电压:-2.4 kV;脱溶剂气温度:550 $^\circ\text{C}$;脱溶剂气流速:900 L/h;锥孔气流速:150 L/h;质谱检测条件见表 1。

表 1 PAT 检测的质谱条件

化合物	离子化方式	母离子(m/z)	子离子(m/z)
PAT	ESI ⁻	153	109*/81
$^{13}\text{C}_7$ -PAT	ESI ⁻	160	115*/86

注:* 为定量离子。

1.3.3 PAT 标准曲线的绘制 采用内标法进行定量分析。准确称取 0.0010 g PAT 标准品用乙腈定容至 10 mL,配制质量浓度为 100 mg/L 的 PAT 标准储备溶液,采用逐级稀释的方法,配制不同质量浓度的标准溶液分别为 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 $\mu\text{g/L}$, 现用现配。准确移取 0.2 mL $^{13}\text{C}_7$ -PAT 同位素内标(25 mg/L)用乙腈定容至 1 mL,配制质量浓度为 5 mg/L 的 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 同位素内标工作液,分别加入 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 同位素内标工作液至标准溶液中,使标准溶液中 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 同位素内标质量浓度均为 100 $\mu\text{g/L}$ 。标准溶液过 0.22 μm 尼龙滤膜后,注入棕色样品瓶中进行 UPLC-MS/MS 检测。以标准工作曲线的浓度为自变量(x),以 PAT 的峰面积比(PAT 的峰面积/ $^{13}\text{C}_7$ -PAT 内标的峰面积)为因变量(y),计算标准工作曲线的线性相关系数 R^2 评价线性关系,标准曲线为 $y = 0.8744x + 4.0970, R^2 = 0.9992$ 。

1.3.4 样品的前处理及检测 将苹果样品洗净、去皮、去核,切成约 3 cm \times 3 cm 小块,用料理机粉碎。

苹果脯样品:将苹果去皮,去除腐烂部位,去核,切成 4 瓣。称取水 1 200 g,边加热边缓缓加入白砂糖 1 000 g,并不断搅拌使白砂糖完全溶解,使初始糖液浓度达到 27 $^\circ\text{B}\acute{\text{e}}$ 。加入 4 g 焦亚硫酸钠

(食品级),7.5 g 柠檬酸(食品级),搅拌使其溶解。加入 1 000 g 苹果块,小火煮制 1 h,至苹果块呈半透明状,糖液浓度达到 24 °Bé。将煮制完成的果块置于糖煮液中浸泡 24 h,捞出苹果块沥干糖液。将苹果块置于鼓风干燥箱网架上,在 70 °C 的热风下,干燥 24 h,冷却至室温。将苹果脯切成 1 cm×1 cm 的小块,置于料理杯中,加入液氮浸没苹果脯块,使其全部冻结,轻轻振荡,待液氮挥发干后,用料理机粉碎。

准确称取 1.00 g 粉碎后的样品于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 40 μL 5 mg/L PAT 标准工作液和 20 μL 5 mg/L 的 ¹³C₇-PAT 同位素内标标准工作液。然后在样品中加入 10 mL 超纯水,涡旋 1 min,再加入 10 mL 乙腈,涡旋 1 min。随后,在溶液中加入 4 g MgSO₄,1 g NaCl,涡旋 2 min,于 4 °C,10 000×g 下离心 10 min,收集全部上清液,将上清液过 228 多功能净化柱,弃去初始 1 mL 净化液,收集后续部分。移取 5 mL 净化液,在 40 °C 下氮吹吹干,用 0.5 mL 初始流动相复溶,涡旋 2 min 充分溶解。通过 0.22 μm 尼龙滤膜,装入棕色液相小瓶,待 UPLC-MS/MS 检测。

按式(1)计算样品中 PAT 的含量,计算结果保留 3 位有效数字。

$$X = \frac{\rho \times V}{m} \times f \quad (1)$$

式中: X 为样品中 PAT 的含量,μg/kg; ρ 为由标准曲线计算所得的样品提取液中 PAT 的含量,μg/L; V 为最终定容体积,mL; m 为样品的称样量,g; f 为稀释倍数。

1.3.5 方法学评价 方法验证所采用的分析方法根据欧盟委员会 SANTE/11312/2021 指南进行验证,包括检出限(Limit of detection,LOD)、定量限(Limit of quantification,LOQ)、精密度、准确度和线性范围^[15]。

1.3.5.1 灵敏度 方法的灵敏度以 LOD 和 LOQ 进行衡量。LOD 是指在适当的置信水平下,分析方法能够从样品中检测到被测组分的最小量或最小浓度,即能够断定样品中被测组分的量或浓度确实高于空白中的最低量。LOQ 则指样品中被测物能被定量测定的最低量。本研究采用 UHPLC-MS/MS 方法,通过信噪比(Signal to noise ratio,S/N)

来确定 LOD 和 LOQ,具体以 3 倍 S/N 对应的浓度为 LOD,以 10 倍 S/N 对应的浓度为 LOQ^[16]。

稀释一系列低浓度的 PAT 基质匹配标准溶液,分别添加适量 ¹³C₇-PAT 标准工作液使其浓度为 100 μg/L,注入 UHPLC-MS/MS 系统,采用内标法进行定量。通过 MassLynx 4.1 软件,获得 S/N 比值,并找到对应 3 倍和 10 倍 S/N 比值的 PAT 浓度,平行测定 3 次,最终取平均值作为 LOD 和 LOQ 的确定依据。

1.3.5.2 精密度 精密度是衡量分析方法在特定条件下,对同一被测物进行多次测定的结果与平均值之间偏离程度的关键指标^[17]。在本研究中,为了全面评估所建立方法的精密度,选取了低、中、高 3 个不同浓度点的样品,并分别进行日内精密度和日间精密度试验,采用相对标准偏差(Relative standard deviation,RSD)作为精密度的度量。日内精密度是通过在 1 d 内不同时间点进行重复测定来完成的,每个浓度点每隔 3 h 进样 1 次,共进行 6 次测定($n=6$)。日间精密度试验则是通过在连续 6 d 内的相同时间段进行 1 次进样测定,同样每个浓度点重复 6 次($n=6$)。此试验旨在评估不同日期、可能变化的试验条件下,方法的稳定性和重复性。

1.3.5.3 准确度 准确度是指在一定条件下,多次测定的平均值与真实值之间相符的程度,通常通过回收率来表示方法的准确性^[18]。经测定不含 PAT 的苹果和苹果脯为空白基质,分别加入适量 PAT 标准溶液,使样品中 PAT 的理论终浓度达到 10,50,250 μg/kg。这一浓度范围的选择旨在覆盖实际样品中可能出现的 PAT 浓度,以便全面评估方法的准确性。每个样品进行 3 次重复测定,以确保结果的可靠性。采用内标法进行定量分析,通过实测浓度除以理论浓度来计算回收率。

1.3.5.4 线性范围 线性范围是评估分析方法定量能力的关键指标,指方法能够准确定量的浓度区间,在这个区间内,方法需同时满足准确度、精密度和线性的要求^[19]。以目标样品中预期的浓度范围选择工作曲线浓度范围。配制 1 000 mg/L PAT 水溶液作为母液,采用逐级稀释的方法配制 400,200,100,50,25,12.5,6.4,3.2,1.6,0.8,0.4,0.2,0.1 μg/L 的系列标准溶液。每个浓度点进行 3

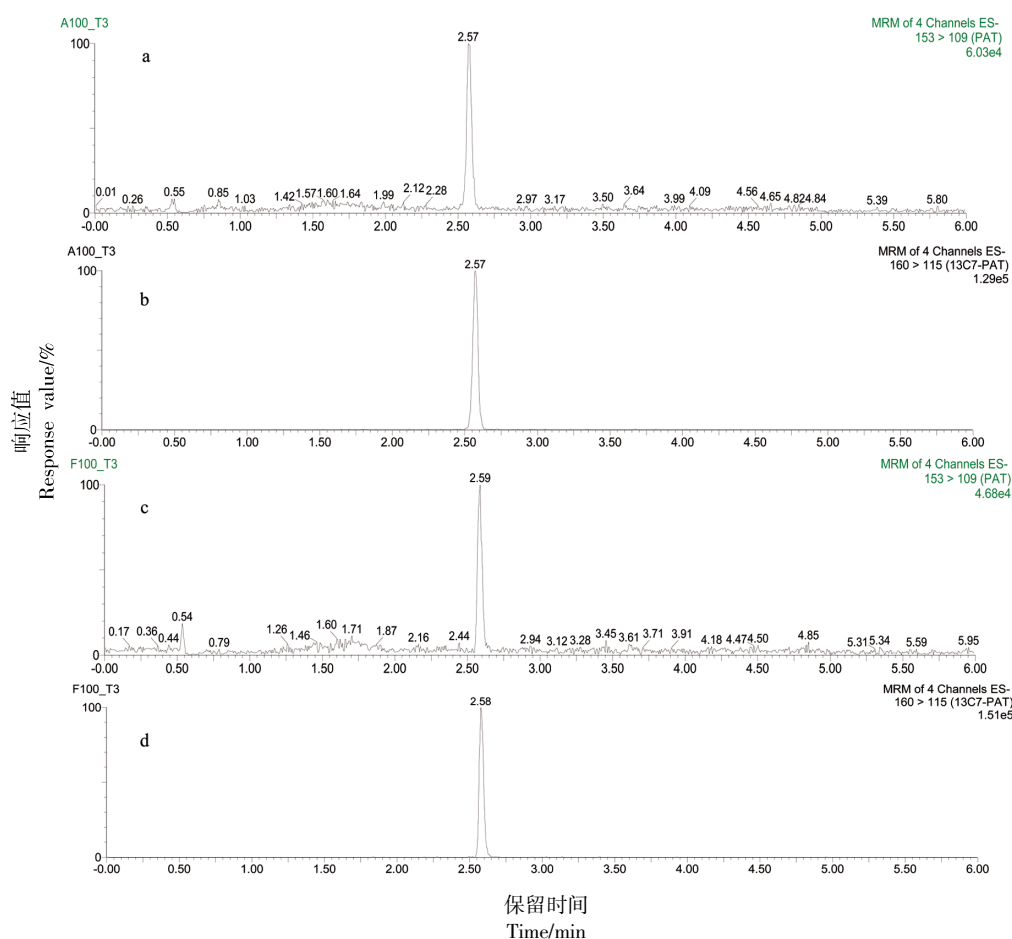
($^{13}\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$), 其精确分子质量为 161.0501 u, m/z 160 同样对应 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 失去 1 个氢原子(H^+)形成的 $[\text{M}-\text{H}]$ 分子离子峰。因此, m/z 153 和 m/z 160 被确定为 PAT 和 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 的母离子。

进一步, 采用子离子扫描模式 (Daughter-scan) 来确定用于定量和定性的离子碎片。如图 1 所示, m/z 153 和 m/z 160 的母离子在碰撞室内产生的离子碎片中, m/z 153 的主要碎片离子为 m/z 109 和 m/z 81, m/z 160 的主要碎片离子为 m/z 115 和 m/z 86, 与 Desmarchelier 等^[21]报道的 PAT 和 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 的主要碎片离子一致。PAT 的离子碎片主要是由于其结构中的六元内酯环和五元呋喃环发生断裂所致, 具体包括 PAT 内酯环的断裂形成 m/z 109 碎片, 以及内酯环和呋喃环的共同断裂产生 m/z 86 碎片(图 1a)。相似的, $^{13}\text{C}_7$ -PAT 断

裂规则与 PAT 一致(图 1b)。具体 PAT 和 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 的质谱检测参数如表 1 所示。

2.1.2 液相条件优化 为消除基质效应和样品中杂质的干扰, 采用内标法对苹果和苹果脯样品进行前处理, PAT 加标浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。PAT 易溶于水是一种中等极性化合物, 故选择了 2 种反相色谱柱对分离效果进行探究, 分别为 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱和 Acquity UPLC BEH C18 色谱柱。HSS T3 色谱柱因其高强度硅胶颗粒 (High strength silica, HSS), 在低 pH 值条件下稳定性更好, 对水溶性和极性较大的小分子化合物有较强的保留性。而 BEH C18 色谱柱则适用于各种分子质量的化合物, 且在 pH 1~12 之间均保持了优异的柱稳定性^[18,22]。

图 2 和图 3 分别显示了 HSS T3 和 BEH C18



注: a 和 b 为苹果样品; c 和 d 为苹果脯样品。

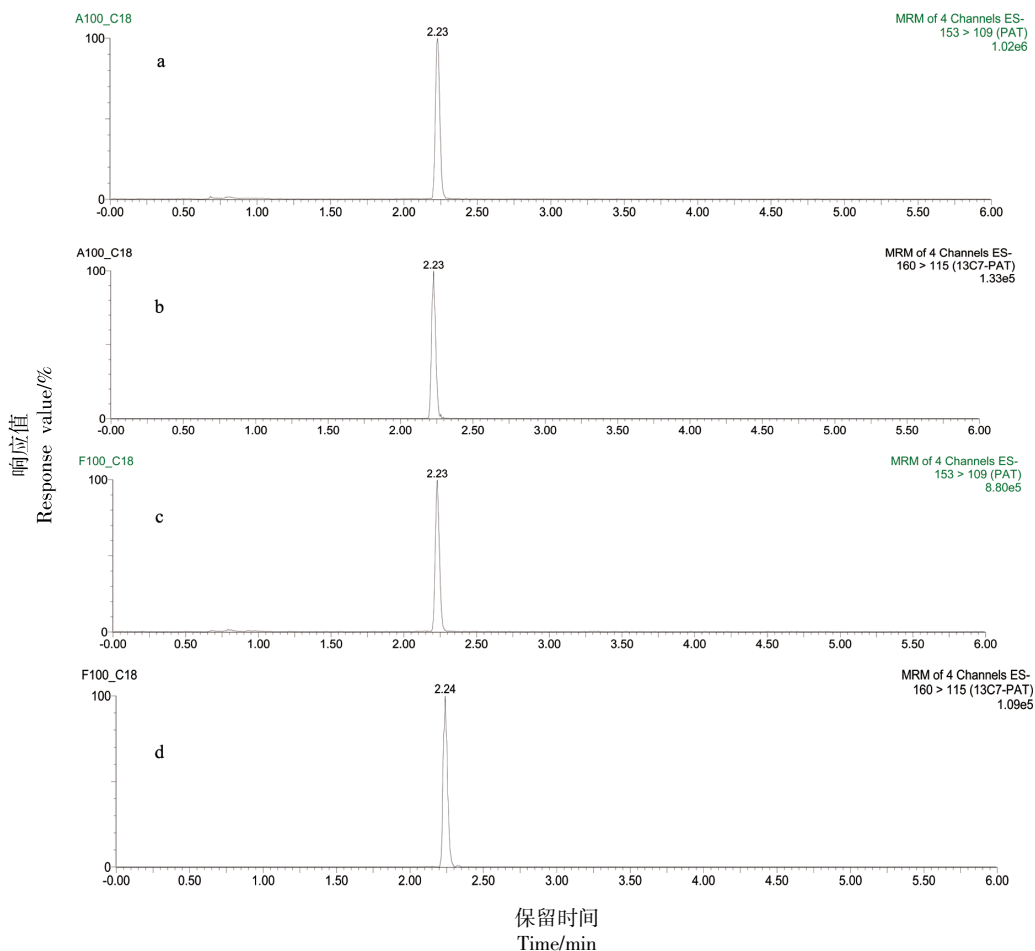
图 2 HSS T3 色谱柱对苹果和苹果脯样品中 PAT 和 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 的分离情况

Fig.2 Separation of PAT and $^{13}\text{C}_7$ -PAT in apple and dried apple samples by HSS T3 column

对苹果和苹果脯样品中 PAT 和 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 的色谱分离情况。结果表明, HSS T3 色谱柱中 PAT 和 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 的保留时间较长, 为 2.5 min, 而 BEH C18 色谱柱为 2.2 min。这可能是因为 HSS T3 色谱柱在处理高比例水相时, 对极性化合物有更好的保留能力。虽然 HSS T3 和 BEH C18 色谱柱均能实现色谱峰峰形对称、尖锐, 但 HSS T3 色谱柱在苹果和苹果脯样品中对 PAT 的分离效果不佳, 存在较多杂质峰。相比之下, BEH C18 色谱柱能更好地分离 PAT 和其它杂质, 显著减少了色谱图中的杂质干扰(图 3)。因此选择 BEH C18 色谱柱进行后续的定量研究。

进一步在 BEH C18 色谱柱中对梯度洗脱条

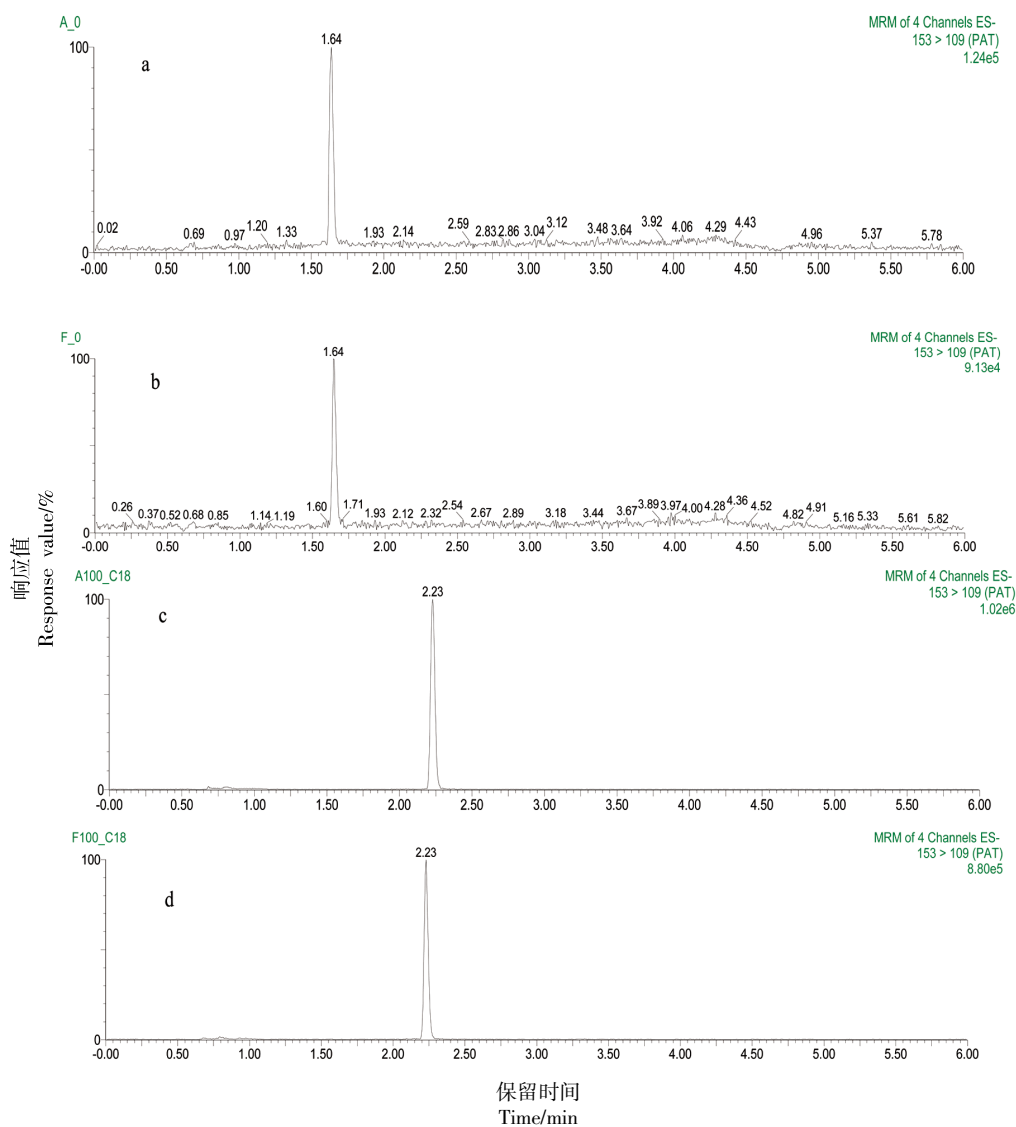
件进行优化, 首先使用 1%~100% 乙腈(B 相)梯度洗脱程序^[20], 该梯度不能有效分离 PAT 和杂质, 导致 PAT 峰形周围杂质峰较多, 并且 PAT 出峰时间为 1.64 min, 出峰时间较快, 表明流动相洗脱强度过强。因此减缓了乙腈比例的升高速率, 减少了流动相洗脱强度, 从而增强了 PAT 在色谱柱中的保留以及与杂质的分离效果。优化后的液相条件见 1.3.2 节, 在此流动相条件下 PAT 的出峰时间延后至 2.23 min(图 4), 实现了基线分离和较大的信噪比。与国标《食品安全国家标准 食品中展青霉素的测定》(GB 5009.185—2016)方法相比, 该方法更适用于苹果和苹果脯样品, 分析时间大幅减少, 梯度洗脱时间减少了 53.4%^[23]。



注: a 和 b 为苹果样品; c 和 d 为苹果脯样品。

图 3 BEH C18 色谱柱对苹果和苹果脯样品中 PAT 和 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 的分离情况

Fig.3 Separation of PAT and $^{13}\text{C}_7$ -PAT in apple and dried apple samples on BEH C18 column



注:a和b分别为优化前PAT检测的苹果样品和苹果脯样品;c和d分别为优化后PAT检测苹果样品和苹果脯样品。

图4 梯度洗脱条件对苹果和苹果脯样品中PAT分离的影响

Fig.4 Effect of gradient elution conditions on PAT separation in apple and dried apple samples

2.2 提取方法优化

本研究采用 QuEChERS 提取技术,旨在优化苹果和苹果脯中 PAT 的提取过程。相较于传统提取技术,QuEChERS 以其操作简便、成本低廉、效率高及环境友好性脱颖而出,显著减少了样品和有机溶剂的使用量,并缩短了样品制备时间^[12]。多项研究已证实,QuEChERS 技术在提高目标化合物的回收率和分离效果方面具有显著优势^[13]。QuEChERS 方法的核心步骤包括 2 个主要环节:首先,通过盐析提取实现水层与有机层(如乙腈)

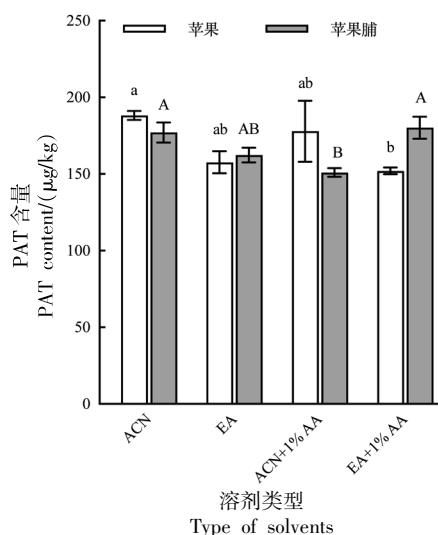
的有效分离,促进水层和有机层之间的平衡;其次,通过固相萃取步骤,利用多孔吸附剂清除样品中的基质干扰物,以提高分析的特异性和灵敏度。基于原始的 QuEChERS 方法进行了改进,以适应苹果和苹果脯中 PAT 的提取需求。在苹果、苹果脯加标 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的水平下,以 PAT 的回收率(%)作为评价指标,对提取溶剂、盐析剂以及复溶剂进行提取方法的优化。

2.2.1 提取溶剂的选择 PAT 的结构中含有不稳定的不饱和内酯环,其在碱性环境下易被破坏,而

在酸性环境下则相对稳定。因此,在不使用缓冲溶液的情况下,通过添加 1% 乙酸来调节提取溶剂的 pH 值,以增强 PAT 的结构稳定性。首先,选择乙腈作为提取溶剂,乙腈是 QuEChERS 方法中最常用的提取剂,并且在使用乙腈作为提取剂时,产生的亲脂性干扰物相对较少^[24-27]。此外,为了增加 PAT 的靶向提取效率,选择比乙腈极性更低的乙酸乙酯作为提取溶剂^[9,28]。

如图 5 所示,为乙腈、乙酸乙酯和含 1% 乙酸的乙腈、乙酸乙酯提取溶剂的 PAT 回收率。在苹果样品中,使用乙酸乙酯、含 1% 乙酸的乙腈和含 1% 乙酸的乙酸乙酯作为提取溶剂时,PAT 的回收率分别为 78.84%,88.96%,76.02%,其中乙腈的提取效率最高,达到 94.09%。而在苹果脯样品中,使用乙腈、乙酸乙酯和含 1% 乙酸的乙酸乙酯作为提取溶剂时,PAT 的回收率没有显著差异,分别为 88.55%,81.20%,90.12%。然而,含 1% 乙酸的乙腈提取效率最低,仅为 75.49%。总体来说,加入 1% 乙酸有助于保持 PAT 的结构稳定性,而本研究采用负离子模式检测 PAT,乙酸的加入可能会影响 PAT 失去 H⁺ 的离子化效率,从而降低质谱响应的灵敏度,影响回收率^[28]。综合以上结果,选择乙腈作为 PAT 提取溶剂。

2.2.2 盐析剂的选择 在 QuEChERS 提取过程中,提取液中残留的水分会降低净化柱的除杂效能。因此为了促进有机相与水相的分离以及待测物向有机相的转移,需要通过添加盐析剂来降低有机溶剂在水中的溶解度。无水 MgSO₄ 和 NaCl 是 QuEChERS 方法中常用的盐析剂。无水 MgSO₄ 具有较强的结合水能力,能够显著降低混合提取液中水的含量,并且无水 MgSO₄ 与水混合时会发热,这个过程中可以吸收样品中的水分,减少样品中残留的水分,从而提高提取效率。而 NaCl 能够降低有机相的溶解度,加速有机相和水相的分层。无水 MgSO₄ 与 NaCl 的质量比通常为 4:1^[13]。另外其它盐析剂也被考虑在内,例如:MgSO₄、NaCl 与乙酸钠(CH₃COONa)和柠檬酸钠(C₆H₅Na₃O₇)、柠檬酸氢二钠(C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O)的组合^[12,21]。CH₃COONa、C₆H₅Na₃O₇ 和 C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O 的应用有助于维持样品基质的 pH 值在 5~5.5,以更好的保护碱不稳定样品^[13]。



注:ACN. 乙腈;EA. 乙酸乙酯;AA. 乙酸;不同字母表示组间具有显著性差异($P<0.05$)。

图 5 不同提取溶剂对 PAT 提取的影响

Fig.5 Effect of different solvents on the extraction of PAT

因此,本研究比较了 3 种盐析剂组合对苹果和苹果脯中 PAT 回收率的影响,分别为盐析剂 1:4 g MgSO₄+1 g NaCl,盐析剂 2:4 g MgSO₄+1 g CH₃COONa,盐析剂 3:4 g MgSO₄+1 g NaCl+1.0 g C₆H₅Na₃O₇+0.5 g C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O,以苹果、苹果脯加标 200 µg/kg 后以 PAT 的回收率(%)作为评价指标对盐析剂进行选择。如图 6 所示,苹果样品中使用盐析剂 1 的 PAT 回收率最高,达到 92.67%。在苹果脯样品中,盐析剂 1 和盐析剂 2 的 PAT 回收率相近,分别为 88.55%和 81.4%,而盐析剂 3 的回收率最低,为 76.59%。表明乙酸盐和柠檬酸盐的加入可能增强了基质效应,降低了 PAT 的离子化效率和质谱响应。而 MgSO₄ 作为脱水剂与 NaCl 协同作用可以更好的增加水相的离子强度,提高 PAT 的回收率^[29]。因此,本研究选择 4 g MgSO₄ 和 1 g NaCl 的组合作为最优盐析剂,以确保 PAT 提取的高效性和准确性。

2.2.3 复溶剂的选择 在样品浓缩后,复溶剂用于溶解所得残渣。复溶剂的选择应与 PAT 具有良好的相容性,以便有效溶解目标化合物。PAT 作为一种中等极性化合物,根据“相似相溶”原理,高、中等极性的溶剂对 PAT 的溶解能力较强,其

中水、乙腈和乙酸溶液是 PAT 的常用溶剂^[27,29]。因此本研究使用初始流动相(体积分数 1%的乙腈水溶液)、乙酸和水作为复溶溶剂,以苹果、苹果脯加标 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PAT 的回收率(%)为评价指,以确定最佳的复溶溶剂。

如图 7 所示,在苹果样品中,使用初始流动相、乙酸和水作为复溶溶剂,对 PAT 的回收率无显著影响($P>0.05$),回收率分别为 95.82%, 92.67%, 87.83%。然而,在苹果脯样品中,以水作为复溶溶剂时,PAT 的回收率显著下降,与使用初始流动相作为复溶溶剂相比下降了 17.40%。这可能是因为使用初始流动相作为溶剂能够减少样品基质对分析物的干扰,减少色谱峰的拖尾现象,从而提高分离效率。因此选择初始流动相作为 PAT 复溶剂。

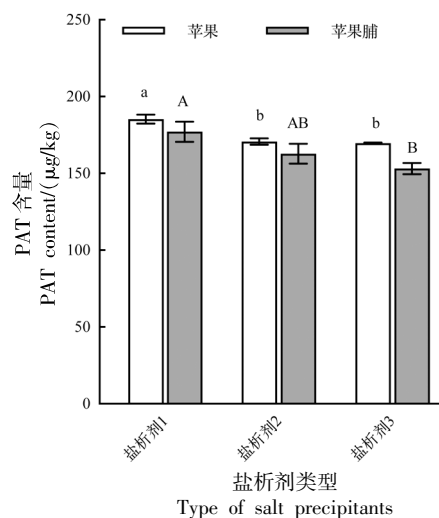
2.3 方法学评价

2.3.1 线性关系、检测限和定量限分析

在食品样品中,成分的多样性可能会影响 PAT 的分配效率。为了校正这种基质效应并补偿潜在的变异性,本研究采用稳定的同位素内标($^{13}\text{C}_7$ -PAT)来增强检测的准确性。因此,本研究采用稳定同位素稀释和 UPLC-MS/MS 对 PAT 检测方法的线性关系、检测限、定量限进行验证。

以 1 000 mg/L PAT 水溶液作为母液,采用逐级稀释的方法制备系列标准溶液(0.1~400 $\mu\text{g}/\text{L}$)。以 PAT 标准质量浓度为横坐标,PAT 峰面积与 $^{13}\text{C}_7$ -PAT 内标的峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线并进行线性回归计算。结果显示,PAT 在 0.1~12.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 3.2~400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的质量浓度范围内具有良好的线性关系,标准曲线方程分别为 $y = 1.2423x + 0.0506$ ($R^2=0.9990$) 和 $y = 0.9767x + 2.0432$ ($R^2=0.9995$)。该线性范围覆盖了大多数水果制品中 PAT 的检出含量,可满足多种果脯制品分析的要求^[8,30]。

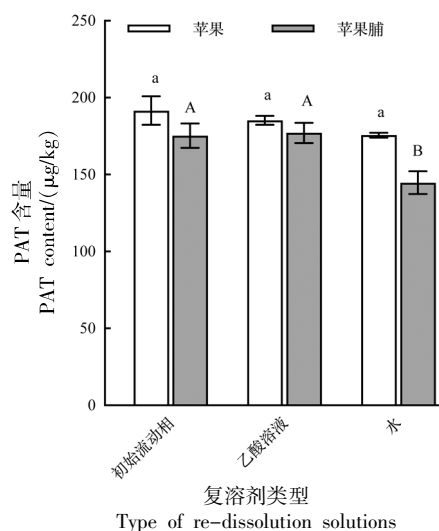
方法的灵敏度通过 LOD 和 LOQ 来评估。本方法的 LOD 为 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ 为 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 满足一般食品中 PAT 含量的检测需求 (10~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[8,30]。与 Sadok 等^[28]利用 UPLC-ESI-MS/MS 对蜂蜜中 PAT 的检测方法相比,其中 PAT 的 LOD 和 LOQ 分别为 1.49 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 4.95 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 本方法的 LOD 和 LOQ 更低,显示出更高的灵敏度。同时,本方法也优于《食品安全国家标准 食品中展



注: 盐析剂 1: 4 g $\text{MgSO}_4 + 1$ g NaCl , 盐析剂 2: 4 g $\text{MgSO}_4 + 1$ g CH_3COONa , 盐析剂 3: 4 g $\text{MgSO}_4 + 1$ g $\text{NaCl} + 1$ g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 0.5$ g $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$; 不同字母表示组间具有显著性差异 ($P<0.05$)。

图 6 不同盐析剂对 PAT 提取的影响

Fig.6 Effect of different salt precipitants on the extraction of PAT



注: 不同字母表示组间具有显著性差异 ($P<0.05$)。

图 7 不同复溶剂对 PAT 提取的影响

Fig.7 Effect of different re-dissolution solutions on the extraction of PAT

青霉素的测定》(GB 5009.186—2016)中使用的同位素稀释-液相色谱-串联质谱法,其中 LOD 和 LOQ 分别为 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[23],进一步证明了本方法在灵敏度方面的优势。

2.3.2 准确度分析

通过标准品加入法来验证方

法的准确性,以经测定不含 PAT 的苹果和苹果脯为空白基质,分别加入了高、中、低 3 个浓度水平的 PAT 标准品,即 250, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,以模拟实际样品中可能遇到的 PAT 浓度范围^[30],从而评估方法在实际应用中的有效性。加标试验中以实测浓度除以理论浓度得到回收率,加标量、回收率及 RSD 值总结于表 2 中。结果显示,在 3 个浓度水平下,PAT 的回收率范围为 98.41%~110.60%,RSD 值范围为 1.12%~6.62%。与 Duncan 等^[9]的研究相比,该研究使用 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ PAT 进行加标试验,回收率范围为 66%~100%,RSD 值范围为 2%~5%,本方法显示出更高的准确性。此外,Fan 等^[31]使用 QuEChERS 法结合超高效液相色谱-串联质谱对多种水果(枣子、西瓜、葡萄、葡萄干、枸杞子)中 PAT 进行加标回收率试验,结果显示回收率范围为 88.3%~97.4%,RSD 范围为 5.4%~6.8%。与 Sadok 等^[3]在红色水果(草莓、覆盆子、红醋栗、酸樱桃)中测定 PAT 的加标回收率 96.73%~109.29%和 RSD 值范围 5.8%~10.4%相比,本方法同样展现出优越性。总体而言,本方法的回收率处于可接受的范围内(一般为 80.0%~120.0%),符合方法学验证中对准确度的要求^[15,32],证明了本方法的准确性和可靠性。

2.3.3 精密度分析 为了评估方法的精密度,对低、中、高 3 个浓度水平的 PAT 标准品进行了 6 次重复测定。结果如表 3 所示,本方法测得日内精密度 RSD 范围为 0.29%~2.97%,日间精密度 RSD 范围为 1.66%~5.33%。精密度的评估对于复杂基质或含量较低的样品更加重要,因为这些样品结果更容易受到操作和仪器变异性的影响。一般认为 RSD 值小于 10%通常是可接受的^[19],表明分析结果具有较好的一致性和可靠性。本方法的 RSD 值均低于 5.33%,满足了方法验证中对精密度的要求,也证明本方法在不同试验条件下都能保持较高的稳定性和重复性。

2.4 加工过程中苹果脯 PAT 含量变化检测

利用所开发的方法对苹果脯在加工过程中 PAT 含量的变化进行分析。如图 8 所示,糖煮过程对 PAT 含量影响显著,糖煮后的苹果块中 PAT 含量相比糖煮前下降了 93%,由 39.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 降至 2.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。进一步糖渍处理 24 h 后,PAT 的浓度

表 2 PAT 的加标回收率和相对标准偏差

Table 2 The recovery rate and standard deviation of PAT

样品	PAT 添加量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	相对标准 偏差/%
苹果	10	98.41	5.58
苹果	50	100.11	2.17
苹果	250	105.37	2.05
苹果脯	10	110.60	6.62
苹果脯	50	103.10	3.57
苹果脯	250	99.84	1.12

表 3 方法的精密度

Table 3 Precision of method

质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	日内精密 度 RSD/%	质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	日间精密 度 RSD/%
6.39 \pm 0.17	2.43	6.38 \pm 0.34	5.33
48.59 \pm 0.14	0.29	49.53 \pm 0.82	1.66
401.42 \pm 11.91	2.97	403.97 \pm 9.48	2.35
6.39 \pm 0.17	2.43	6.38 \pm 0.34	5.33

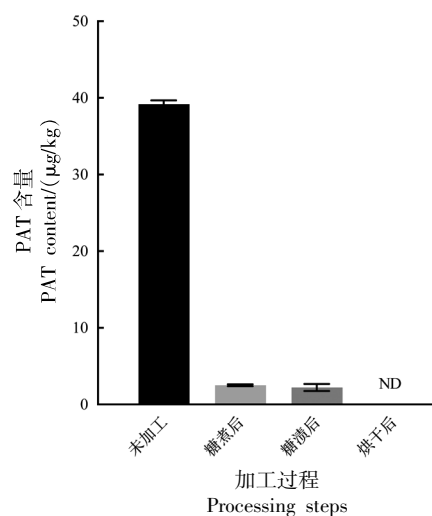


图 8 苹果脯加工过程 PAT 含量变化

Fig.8 Changes in PAT content during processing of dried apple

降至最初样品的 5.70%,而糖渍前、后 PAT 的浓度变化不显著($P>0.05$)。在糖煮过程中,温度达到 103 $^{\circ}\text{C}$,而在干燥过程中温度为 70 $^{\circ}\text{C}$,表明在加热条件下,PAT 含量的下降更为明显,尤其是糖煮步骤,是 PAT 含量减少的关键环节。这可能是因为在高温环境下,焦亚硫酸钠对 PAT 的降解作用。在水溶液中,亚硫酸氢根与 PAT 的内酯环发生不

可逆的加成反应,伴随着开环,最终导致 β -磺酸的产生^[3]。

3 结论与讨论

本研究建立了一种苹果和苹果脯中 PAT 的提取和检测方法。通过对不同有机提取溶剂、盐析剂和复溶溶剂的比较,确立了乙腈为最佳有机提取溶剂,4 g MgSO₄+1 g NaCl 为最佳盐析剂,初始流动相(1%乙腈水溶液)为最佳复溶溶剂。通过对质谱条件和液相条件的优化,获得了 ESI 模式下 PAT 最优的质谱检测条件和 BEH C18 色谱柱上最佳的液相分离效果,实现准确的定性和定量。经过方法学评价,在质量浓度范围 0.2~12.5 $\mu\text{g/L}$ 和 3.2~400 $\mu\text{g/L}$ 内 PAT 线性良好,相关系数均可达到 0.999。该方法的 LOD 和 LOQ 分别为 0.4 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.8 $\mu\text{g/kg}$,能够满足实际样品中 PAT 的检测需求。日内和日间精密度的 RSD 均小于 5.33%,且 PAT 加标回收率在 98% 以上。该方法可快速、便捷、稳定、灵敏的检测苹果和苹果脯中 PAT 含量,为水果及其产品中 PAT 的形成控制提供参考。

参 考 文 献

- [1] GUERRA -MORENO A, HANNA J. Induction of proteotoxic stress by the mycotoxin patulin[J]. Toxicology Letters, 2017, 276: 85-91.
- [2] NAVALE V, VAMKUDOTH K R, AJMERA S, et al. *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity[J]. Toxicology Reports, 2021, 8: 1008-1030.
- [3] SADOK I, SZMAGARA A, KRZYSZCZAK A. Validated QuEChERS-based UHPLC-ESI-MS/MS method for the postharvest control of patulin (mycotoxin) contamination in red -pigmented fruits [J]. Food Chemistry, 2023, 400: 134066.
- [4] PALLARÉS N, CARBALLO D, FERRER E, et al. Mycotoxin dietary exposure assessment through fruit juices consumption in children and adult population [J]. Toxins, 2019, 11(12): 684.
- [5] OZER H, BASGMEZ H O, OZAY G. Mycotoxin risks and toxigenic fungi in date, prune and dried apricot among Mediterranean crops[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2012, 51(1): 148-157.
- [6] FERNÁNDEZ -CRUZ M L, MANSILLA M L, TADEO J L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications[J]. Journal of Advanced Research, 2010, 1(2): 113-122.
- [7] TRUCKSESS M W, SCOTT P M. Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review[J]. Food Additives & Contaminants Part A, 2008, 25 (2): 181-192.
- [8] 张国卿, 朱雨辰, 罗颖华, 等. 水果制品中真菌毒素污染及控制研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(18): 5992-5999.
- [8] ZHANG G Q, ZHU Y C, LUO Y H, et al. Research progress on mycotoxin contamination and control in fruit products[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(18): 5992-5999.
- [9] DUNCAN H, JUAN C, MAÑES J, et al. Green derivatization strategy coupled to high -resolution mass spectrometry (QTOF-MS) for patulin monitoring in fruit products[J]. Talanta, 2022, 253: 124061.
- [10] MONTEAGUDO A A, TORRES A, CHAMORRO F, et al. Rapid identification of the mycotoxin patulin by gas chromatography -mass spectrometry [J]. Biology & Life Sciences Forum, 2023, 24: 6.
- [11] SADHASIVAM S, BARDA O, ZAKIN V, et al. Rapid detection and quantification of patulin and citrinin contamination in fruits[J]. Molecules, 2021, 26(15): 4545.
- [12] 赵英莲, 张梓琪, 赵鑫, 等. QuEChERS 技术在食品真菌毒素检测中的研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(1): 1-5.
- [12] ZHAO Y L, ZHANG Z Q, ZHAO X, et al. Research progress of QuEChERS technology in mycotoxin detection of food[J]. China Brewing, 2020, 39 (1): 1-5.
- [13] PERESTRELO R, SILVA P, PORTO-FIGUEIRA P, et al. QuEChERS -Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends[J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1070: 1-28.
- [14] MARSOL -VALL A, DELPINO -RIUS A, ERAS J, et al. A fast and reliable UHPLC -PDA method for determination of patulin in apple food products using QuEChERS extraction [J]. Food Analytical Methods, 2013, 7(2): 465-471.
- [15] European Commission. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues

- analysis in food and feed: SANTE/11312/2021[S/OL]. European Union, 2021. (2021-02) [2026-1-28]. https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf.
- [16] SUN G Y, WANG P P, CHEN W N, et al. Simultaneous quantitation of acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural, and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine using UPLC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131726.
- [17] WALRAVENS J, MIKULA H, RYCHLIK M, et al. Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1372: 91-101.
- [18] WEI S Y, YANG X, LIN M Y, et al. Development of a two-step pretreatment and UPLC-MS/MS-based method for simultaneous determination of acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural, advanced glycation end products and heterocyclic amines in thermally processed foods[J]. Food Chemistry, 2024, 430: 136726.
- [19] 孙国玉. 热加工危害物丙烯酰胺、5-羟甲基糠醛和 PhIP 同步形成的多响应动力学及抑制调控[D]. 北京: 中国农业大学, 2023.
- SUN G Y. Multi-response kinetics and inhibitory control of the synchronous formation of acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural and PhIP in thermal processing[D]. Beijing: China Agricultural University, 2023.
- [20] WANG M, JIANG N, XIAN H, et al. A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1429: 22-29.
- [21] DESMARCHELIER A, MUJAHID C, RACAULT L, et al. Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(14): 7659-7665.
- [22] NEW L S, CHAN E C Y. Evaluation of BEH C-18, BEH HILIC, and HSS T3 (C-18) column chemistries for the UPLC-MS-MS analysis of glutathione, glutathione disulfide, and ophthalmic acid in mouse liver and human plasma[J]. Journal of Chromatographic Science, 2008, 46(3): 209-214.
- [23] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中展青霉素的测定: GB 5009.185—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-16.
- National Health and Family Planning Commission, China Food and Drug Administration. Determination of patulin in food: GB 5009.185—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1-16.
- [24] TAŞPINAR H, ELIK A, KAYA S, et al. Optimization of green and rapid analytical procedure for the extraction of patulin in fruit juice and dried fruit samples by air-assisted natural deep eutectic solvent-based solidified homogeneous liquid phase microextraction using experimental design and computational chemistry approach[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129817.
- [25] JI X F, LI R, YANG H, et al. Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China[J]. Food Control, 2017, 78: 100-107.
- [26] 邓健康, 吴瞳, 扈婧, 等. 食品中展青霉素的前处理及检测方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(21): 184-191.
- DENG J K, WU T, HU J, et al. Research progress on sample preparation and detection methods of patulin in food[J]. Food Research and Development, 2021, 42(21): 184-191.
- [27] 齐春艳, 许秀丽, 国伟, 等. QuEChERS 结合 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 法测定小麦粉中 9 种真菌毒素[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 315-320.
- QI C Y, XU X L, GUO W, et al. Determination of nine mycotoxins in wheat flour by QuEChERS combined with UPLC-Q/Orbitrap HRMS[J]. Food Science, 2022, 43(4): 315-320.
- [28] SADOK I, KRZYSZCZAK-TURCZYN A, SZMAGARA A, et al. Honey analysis in terms of nicotine, patulin and other mycotoxins contamination by UHPLC-ESI-MSMS-method development and validation[J]. Food Research International, 2023, 172: 113184.
- [29] KHARANDI N, BABRI M, AZAD J. A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 1619-1623.

- [30] European Commission. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs; Commission Regulation (EC) No 1881/2006[S/OL]. Official Journal of the European Union, 2006 (L 364, 20 Dec 2006): 5–24. (2006–12–20) [2025–02–20]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=OJ%3AL%3A2006%3A364%3AFULL>.
- [31] FAN Y Y, LIU F J, HE W Z, et al. Screening of multi-mycotoxins in fruits by ultra-performance liquid chromatography coupled to ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130858.
- [32] European Commission. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs; Commission Regulation (EC) No 401/2006[S/OL]. Official Journal of the European Union; 12–34. (2006–03–09) [2025–02–20]. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/401/oj/eng>.
- [33] BURROUGHS L F. Stability of patulin to sulfur dioxide and yeast fermentation[J]. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 1977, 60(1): 100–103.

Determination of Patulin in Apples and Dried Apple by QuEChERS Combined with Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LIN Mengyi, ZHANG Guoqing, ZHU Yuchen, CHEN Fang*

(National Engineering Research Center for Fruit and Vegetable Processing, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract This study aims to develop a rapid, accurate, and environmentally friendly detection method for patulin (PAT) in apples and apple products. PAT, a mycotoxin produced by *Penicillium expansum*, poses significant health risks, including teratogenicity, carcinogenicity, immunotoxicity, neurotoxicity, and genotoxicity. Given the potential for PAT contamination during apple product processing, establishing an efficient detection method is crucial for food safety. Traditional methods are complex, time-consuming, and involve high consumption of organic solvents. In this study, the QuEChERS extraction combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was adopted, to optimise the selection of extraction solvent (acetonitrile), salting-out agents (anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride), and reconstitution solvent (1% acetonitrile in water), thereby enhancing detection efficiency and sensitivity. The optimal chromatographic conditions were determined using a BEH C18 column with gradient elution. Method validation revealed a limit of detection of 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a limit of quantification of 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and linear ranges of 0.1–12.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ and 3.2–400 $\mu\text{g}/\text{L}$, with correlation coefficients (R^2) exceeding 0.999. The intraday and interday precision, expressed as relative standard deviation, was less than 5.5%, and the recovery rates were above 98%, indicating good accuracy and precision. The results demonstrate that the QuEChERS-UPLC-MS/MS method effectively detects PAT in apples and apple products with high sensitivity and accuracy, and it can be applied to control PAT contamination in other fruit products. Additionally, the study found that the sugar-boiling step in apple product processing significantly reduced PAT levels, suggesting that high-temperature treatment plays an important role in PAT degradation. Future research could further explore the impact of different processing conditions on PAT levels and the application of this method in other food matrices.

Keywords patulin; dried apple; QuEChERS; high-performance liquid chromatography; mass spectrometry