

高效液相色谱和液相色谱串联质谱技术在检测苹果制品中展青霉素的研究进展

李金宝*

(胶州市综合检验检测中心, 胶州 266300)

摘要: 展青霉素是一种有害的真菌毒素代谢物, 主要对人类的中枢神经系统造成影响, 且对消化系统和肾脏也造成不同程度的毒害影响。展青霉素在食品中的污染是世界各地普遍存在的问题, 尤其在苹果汁、苹果脯、苹果蜜饯、苹果酱等食物中。考虑到它的毒性和广泛性, 很多管理机构对食品基体中展青霉素的含量做出了严格的限制。因此控制展青霉素污染对于保障食品安全具有重要意义。目前液相色谱技术是苹果制品中展青霉素的主要检测方法。本文系统地总结了检测苹果制品中展青霉素的前处理方法, 并综述了高效液相色谱和液相色谱联用质谱技术在苹果制品中展青霉素检测的最新研究进展。

关键词: 展青霉素; 高效液相色谱法; 液相色谱联用质谱法

Research progress of high performance liquid chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of penicillin in apple products

LI Jin-Bao*

(Comprehensive Inspection and Testing Center of Jiaozhou, Jiaozhou 266300, China)

ABSTRACT: Penicillin is a harmful mycotoxin metabolite, which mainly affects the central nervous system of human beings, and also causes varying degrees of toxic effects on the digestive system and kidneys. The contamination of penicillin in food is a common problem all over the world, especially in apple juice, preserved apples, apple preserves, apple sauce and other foods. Considering its toxicity and extensiveness, many regulatory agencies have imposed strict limits on the content of penicillin in the food matrix. Therefore, controlling penicillin pollution is of great significance to ensure food safety. At present, liquid chromatography is the main detection method for penicillin in apple products. This paper systematically summarized the pretreatment methods for the detection of penicillin in apple products, and reviewed the latest progress in the detection of penicillin in apple products by high performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry.

KEY WORDS: penicillin; high performance liquid chromatography; liquid chromatography mass spectrometry

1 引言

展青霉素(4-羟基-4H-咪唑并[3,2-C]吡喃-2(6H)-酮),

又称棒曲毒素, 被发现于 1940 年左右, 是一种广泛存在于食品中的真菌毒素。据报道, 它是 60 多种真菌的代谢产物^[1], 尤其以青霉菌最为常见^[2]。通常情况, 大家最关注的

*通讯作者: 李金宝, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: jzlijinbao@163.com

*Corresponding author: LI Jin-Bao, Engineer, Comprehensive Inspection and Testing Center of Jiaozhou, Licha Town, Jiaozhou, Qingdao 266300, China. E-mail: jzlijinbao@163.com

是苹果软腐和青霉腐病后展青霉菌滋生导致的展青霉素污染^[3],因此展青霉素的检测主要集中在苹果制品,像苹果汁、苹果脯、苹果蜜饯、苹果酱等。除了苹果,山楂、香蕉、桑葚、樱桃等水果,杏仁、核桃、花生、榛子、奶酪、麦芽、饲料和谷物胚芽等食品中均有报道含有展青霉素。因此,含有上述原料的食品基体均有可能受到霉菌污染,并导致痕量展青霉素的残留。

展青霉素是一种极性不饱和内酯类小分子化合物,摩尔质量为 154.12 g/mol。由于其具有较强的亲电性质,展青霉素可以与亲核的巯基和氨基化合物发生作用形成复合物进而影响生物体的正常机能^[4],例如色氨酸、谷胱甘肽、蛋白质等^[5]。展青霉素可以导致水肿、恶心、胀气、惊厥、充血、溃疡、肠道出血等消化泌尿系统损伤等急性症状,同时也有免疫毒性、神经毒性、遗传毒性、致畸、致癌等慢性症状^[4,5]。

其严重危害性和污染的广泛性,引起了很多国家相关管理机构就展青霉素污染问题高度重视,同时对食品基体中展青霉素的含量做出了严格的限制^[6]。欧盟 EC 1881/2006 文件中也将各种食品基体中展青霉素残留上限做出了严格的限定:果汁和酒精饮料中为 50 μg/L,固态苹果产品中为 25 μg/L,婴儿食品中更加严格为 10 μg/L^[7]。中国是世界上最大的浓缩苹果汁生产商和出口商,因此在 GB 2761-2017《食品中真菌毒素限量》国家标准中规定含有苹果或者山楂组分的果汁或者酒中展青霉素的上限为 50 μg/L^[8]。因此对于苹果制品中展青霉素的检测具有重要意义。

考虑到展青霉素的毒性和广泛存在,可靠的高灵敏检测方法对于展青霉素污染的控制至关重要^[9]。国内外学者针对展青霉素检测做了大量的工作,报道了各种食品基体中展青霉素的准确定量方法,比如薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)^[10]、气相色谱质谱法(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)^[11]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[12]、液相色谱质谱法(liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)^[13]、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)^[14]、常压敞开式质谱法(atmospheric open mass spectrometry, AMS)^[15]等。其中,应用最广泛的是高效液相色谱法和液质联用法,也是我国国标 GB 5009.185-2016《食品中展青霉素的测定》^[16]中采用的方法。因此,本文对近些年液相色谱技术在苹果制品中展青霉素检测中的应用加以总结,包括高效液相色谱法和液相色谱联用质谱法,以期展青霉素的检测技术的进一步发展提供参考。

2 高效液相色谱法

由于展青霉素在 275 nm 紫外波长有很强的吸收,所以非常适合高效液相色谱紫外检测器进行分析检测^[17]。展

青霉素是一个极性小分子化合物,在反相色谱中有一定的保留。因此,高效液相色谱法中流动相通常采用极性有机相混合高比例的水相。

2000 年,美国分析家协会发布了基于液相色谱紫外检测器的苹果汁和苹果酱中展青霉素的官方方法^[18],这个方法影响深远,目前还在使用。在这个方法中,苹果清汁直接用于乙酸乙酯的萃取,而苹果浊汁和果酱则需要经过果胶酶的预处理再进行萃取。萃取后再用碳酸钠溶液处理中和去除酸性物质,无水硫酸钠干燥后氮吹浓缩,最后进样检测。该方法经过 14 个实验室的联合验证,方法的重复性和重现性相对标准偏差分别为 8%~35%和 11%~36%,方法精密性很好。但该方法也有缺陷:如基体中的 5-HMF 分子会干扰展青霉素的准确定量,紫外检测器特异性差难以准确确认展青霉素分子,有机溶剂消耗量大,实验材料需求量大^[19]。因此,在此基础上的改进方法层出不穷。为了简化处理步骤,降低展青霉素在碱性条件下的分解,Iha 等^[20]以乙酸乙酯萃取后直接进样检测,省去了 Na₂CO₃ 中和和 Na₂SO₄ 干燥步骤。液相色谱流动相也由水和乙腈变为无毒的水和乙醇体系,优化后的方法具备简单、快速、经济、实用、灵敏等优点。此外基于分散液液微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)的方法也被用于果汁的前处理过程中^[21],这个方法中萃取溶剂氯仿和分散溶剂乙腈混匀后同时注入苹果汁样品当中,氯仿在乙腈的帮助下会在果汁中分散形成微小的液滴,进而增大萃取表面积,萃取动力学速度增大,展青霉素的分散平衡可以很快完成,经过系统的条件优化,方法的检出限可以低至 4.0 μg/L。

为了进一步拓展萃取溶剂的选择范围,Maham 等^[22]开发了二元萃取溶剂的分散液液微萃取体系。以高密度氯仿和低密度乙酸乙酯混合溶液作为萃取溶液,其密度大于水,经过萃取离心后,取出沉积于底部的萃取剂用于后续的色谱分析,方法的检出限可以达到 2.0 μg/L。与 DLLME 方法的缺点相同,都采用了有毒的高密度萃取溶剂氯仿,还需要的蒸发浓缩过程。Li 等^[23]则开发了单液滴液液微萃取体系,用于多种苹果汁样品中展青霉素的检测,10 mL 苹果汁样品中加入 0.1 g 氯化钠,然后用 1.5 mL 乙酸乙酯进行预富集,5 μL 纯水液滴悬挂于乙酸乙酯中进行微萃取。一步完成了 2 次富集净化,可以极大的降低背景干扰,方法检出限低至 0.5 ng/mL。

离子液体是一种强极性溶剂,它与水和各种有机溶剂都不互溶,是传统有机溶剂的良好替代品。Mohammadi 等^[24]将 [HMIM][PF₆] 离子液体用于 DLLME 中的萃取溶剂,实现了较好的富集效果,方法检出限低至 0.15 μg/kg。在萃取前使用了果胶酶和淀粉酶来降低干扰提高萃取效率,同时采用基于中心复合设计的响应面方法来优化萃取参数。由于离子液体本身就带有电荷,质谱兼容性差,所以只能用于液相色谱方法检测。Abu-Baka 等^[25]则开发了一种快速

简便的盐析涡旋液液微萃取的方法。在果汁中加入的盐可以提高萃取效率, 涡旋震荡形成的乳液可以加快萃取过程, 萃取时间短仅需要 45 s, 同时有机溶剂消耗少仅需要 200 μL , 省去了离心分离的过程。

固相萃取技术具有时间消耗少、有机溶剂用量低而日益引起重视。Li 等^[26,27]采用传统的 C_{18} 萃取柱来检测果汁中的展青霉素, Katerere 等^[28]采用了硅胶作为固相萃取材料检测干苹果圈中的展青霉素, 发现果胶酶的酶促反映会增加溶液的 pH 值, 进而影响方法的回收率。Karakose 等^[29]则用 HLB 萃取柱来纯化乙酸乙酯提取物, 经过液相萃取和固相萃取双重纯化, 方法的灵敏度得到了很大提高, 检出限低至 9.66×10^{-3} ng/g。Maragos 等^[30]则采用 MycoSep[®] 228 AflaPat 萃取柱来纯化果皮丹的乙腈/水提取物。大样本数据筛查显示, 展青霉素污染物检出率高达 39%, 这个结果又经高效色谱串联质谱法进一步验证。这些文章的结果表明, 固相萃取方法相比液相萃取方法样品需求量少, 有机溶剂消耗量低, 回收率高, 可靠性高, 分析时间短, 环境友好。Katerere 等^[31]设计实验进一步验证了这个结论, 他们采用了 3 种固相萃取材料(HLB、硅胶和 MycoSep[®] 228 AflaPat)与液液萃取方法对比, 其中硅胶材料在方法有效性方面表现最佳。Wu 等^[32]设计了一种基质固相萃取的方法来同时分离和富集展青霉素, 通过对比实验发现其效果明显优于乙酸乙酯的液相萃取方法和氨基硅胶的固相萃取方法。Zhou 等^[33]制作了聚乙烯吡咯烷酮材料(polyvinyl pyrrolidone material, PVPP-F)填充的固相萃取柱, 并将其用于中国产苹果和山楂产品的分析, 与商品化的 MycoSep[®] 228 AflaPat 材料相比, 他们的 PVPP-F 材料成本更低。Shirasawa 等^[34]合成了环糊精与 4,4'-亚甲基双(异氰酸苯酯)交联的高分子材料, 并将其用于样品前处理, 该材料很新颖, 但是方法的灵敏度并不是很理想。Giovannoli 等^[35]利用不同配比的 16 种单体、4 种交联剂和 4 种致孔剂制备了 256 种不同的高分子固相萃取材料, 用于展青霉素的富集。经过系统的筛选, 最终发现一种氯仿中制备的甲基丙烯酸-季戊四醇三丙烯酸酯高分子材料富集效果最好, 3 个浓度水平的回收率在 64%~83%。石墨烯是一种二维平面材料, 它巨大的表面积非常适合作为一种前处理固定相。Wang 等^[36]制备了氧化石墨烯和磁性纳米的复合材料用于展青霉素的富集, 因为展青霉素与其表面的 π - π 作用发生而吸附, 其他极性化合物由于亲水作用而保留在溶液中。在萃取之后, 这种纳米复合材料能够在外界磁场作用下与基体分离, 再用乙酸解析附进行检测, 方法的检出限可以达到 2.3 ng/g。Yu 等^[37]制备了一种新型苯并咪唑-2-羧酸修饰的磁性纳米固相萃取材料, 经过系统地优化后 40 mg 材料可以实现 50 mL 果汁的有效富集, 较强的氢键相互作用使富集倍数可以高达 100 倍。

典型的固相萃取过程缺点是没有很好的选择性, 在

复杂基体中这将是一个严重的问题。为了增强固相萃取的选择性, 展青霉素的分子印记材料应运而生。Khorrami 等^[38]用吡啶酮作为模板分子制作了高分子印迹材料。材料采用甲基丙烯酸作为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯作为交联剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 混合均匀后通过自由基引发聚合。聚合后, 洗掉印迹材料中的模板分子, 研碎填充入固相萃取柱供后续使用。该材料对展青霉素表现出很好的选择性, 可以有效的降低干扰。因为研磨过程可能会损害特异性识别位点, Zhao 等^[39]则通过表面接枝聚合的方法在硅胶表面来制备印迹材料, 采用 6-羟基烟酸作为模板分子通过 4 步制备材料, Scatchard 分析表明材料表面有 2 种结合位点, 由于材料较低的接枝效率和亲和力, 这种材料的富集效果不是很理想。Yang 等^[40]同样采用吡啶酮作为模板分子, 通过溶胶-凝胶法在硅胶基地上聚合材料。静态和动态吸附实验表明, 这样制备的分子印记材料有很好的亲和力和选择性, 吸附速率快容量高(2.81 mg/g), 这种印迹材料可以用于食品基体的在线富集和色谱检测。最后建立的分子印迹固相萃取-高效液相色谱法富集倍数达到 125 倍, 检出限低至 0.5 mg/L。这种假模板合成方法以低选择性为代价可以克服分子泄漏问题^[41]。Lhotska 等^[42]则建了 3 种商品化不同分子印迹材料固相萃取方法, 并详细的比较离线和在线萃取的优势和劣势, 如图 1 所示: 在线富集方法具有自动化程度高, 节约时间, 人为误差小, 溶剂消耗少的优势; 离线富集方法具有检出限低, 回收率高, 富集倍数高的优势。Lucci 等^[43]用商品化的分子印迹材料与 QuEChERS、 C_{18} 做了对比实验, 结果表明分子印记材料有更高的回收率, 更好的准确度和更低的基质干扰。Marsol-Vall 等^[44]用 QuEChERS 方法检测了苹果浊汁、苹果酱、苹果酒、苹果酸奶、苹果脯等 24 种样品, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 柱温下用 UPLC 进行分离检测, 建立了快速的分析方法, 灵敏度低至 0.4 ng/g。Sadok 针对草莓样品建立了 QuEChERS 方法, 定量限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 并按照欧盟标准进行了方法验证^[45]。

3 液相色谱质谱方法

高效液相色谱紫外检测器方法具有仪器成本低、重现性好、定量准确度高的优点, 但是其选择性差, 在反相色谱中保留行为相似的物质像 5-HMF 会引起很强的干扰。为了克服这个问题, 一些梯度洗脱的方法可以解决, 但是样品分析时间会延长。质谱在食品分析的诸多领域都有这很广泛的应用, 液质联用仪器可以将液相色谱的分离能力与质谱的鉴定能力很好的结合起来。

Sewram 等^[46]建立了基于 HPLC/APCI-MS/MS 的检测方法, 其检出限可以达到 4 g/L。苹果汁经过美国分析家协会推荐的前处理方法后, 直接进入离子阱进行检测。作者尝试了正负两种模式下的信号相应, 选定负模式用于后续实验。

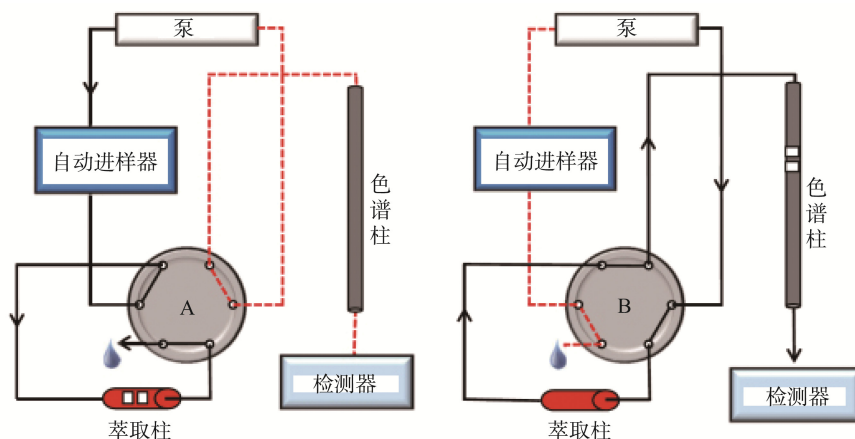
图 1 在线固相萃取示意图^[39]

Fig.1 Schematic diagram of online SPE

后来, Takino 等^[47]对比了 APCI 和 APPI 2 种离子源对于苹果汁样品的检测结果, 因为 APPI 离子源离子化能量低, 可以选择性离子化一些低离子势的分子, 因此质谱背景信号低, 目标物信号相应强, 基质干扰弱。样品经过溶剂萃取后, 通过 C_{18} 柱在线富集, 最后进入质谱检测, 方法的灵敏度得到显著提高。Zhang 等^[48]开发了一种甲苯作为掺杂剂辅助的液相色谱—大气压光离子质谱 (Liquid chromatography-atmospheric pressure light ion mass spectrometry, LC-APPI-MS/MS) 方法, 来提高光离子化效率, 进而提高灵敏度。同时, 同位素内标的使用大大简化了样品制备的步骤。最后, 该方法成功的用于苹果清汁、苹果酱、苹果类婴儿食品, 均得到了较好的灵敏度。

电喷雾离子源是液相色谱质谱联用技术中最常用的离子源, Rosinska 等^[49]开发了一种高效液相色谱-电喷雾串联质谱 (high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, HPLC-ESI-MS/MS) 方法, 用离子 108.7 作为定量离子, 80.8 作为定性离子。与高效液相色谱-紫外检测法相比, 该方法的灵敏度高 10 倍。Christensen 等^[50]建立了 HPLC-ESI-MS/MS 方法, 实现了展青霉素和 33 中农药的同时检测。考虑到展青霉素的化学稳定性, 方法中采用乙酸缓冲溶液进行样品萃取。结果表明在人工注射真菌感染的苹果样品中, 果核感染样品的毒素浓度是果皮感染样品的 2 到 5 倍。传统的硅胶固相萃取也用于苹果和苹果汁乙酸乙酯提取液的净化中^[51], 样品回收率分别为 76%~84% 和 102%~108%。值得注意的是, 处理后样品溶液质谱信号仍然有一定的基质抑制作用。借助固相萃取良好的重复性, Yang 利用 MycoSep[®] 228 AflaPat, HLB 和硅胶 3 种材料建立了针对苹果、山楂和西红柿样品的液相色谱-电喷雾串联质谱 (liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS) 方法^[52]。他们还将管内固相微萃取 (in-tube solid phase microextraction, IT-SPME) 技术用于果汁样品预处理中。在选定了吸附相后

装入 Carboxen 1006 毛细管, 被萃取的展青霉素可以经流动相解吸附后进入仪器检测。由于萃取材料巨大的表面积, 建立的 IT-SPME 方法灵敏度比直接进样高 83 倍^[53]。另外, 这个萃取过程可以实现完全的自动化, 整个流程 30 min 以内就可完成。Yang 等^[54]利用商品化的 96 孔板建立了一种简单快速的前处理方法, 可以有效去除基质干扰, 方法在 4 个浓度水平的回收率高达 91.6%~95.7%。De-Smet 等^[55]分子印迹技术引入到液相色谱质谱方法开发当中。他们选用了 3 种展青霉素的结构类似物 (2-羟基烟酸、5-茛菪醇、3-羟基苯二甲酸酐) 作为印迹模板, 后续交叉反应实验证明其选择性明显优于 C_{18} 吸附填料。Zhao 等^[56]则选择 2-吡啶酮和 6-羟基烟酸作为双模板分子合成了分子印迹固相萃取材料, 实际样品的回收率为 81.3%~106.3%。该方法的基质去除效果要优于 QuEChERS 类方法, 并且材料的重复利用性好, 9 次使用后回收率仍然有 71.2%。

Desmarchelier 等^[57]将改进的 QuEChERS 方法用于液相色谱质谱方法开发, 萃取和分散步骤跟经典方法一样, 最后一步纯化中加入了十八烷基修饰硅胶。这个方法的真实性经过能力验证测试, 可信度为 99%, Z 值为 -0.1。同样 Vaclavikova 等^[58]在样品经过 QuEChERS 方法萃取后进一步通过 MycoSep[®] 228 固相萃取柱纯化来降低基质干扰, 方法的可靠性经过能力验证测试, Z 值为 +0.3。Song 等^[59]利用 HLB 萃取柱建立了基质匹配外标法, 实现了展青霉素、双酚 A、黄曲霉毒素和赭曲霉素的同步检测, 结果发现不同基体中同一物质的标准曲线的斜率不一样, 这说明即便经过固相萃取优化, 基质的抑制作用还是存在的。因此, 实际应用中具体方法的建立需要根据不同基体的情况分别考虑。针对基质问题, Seo 等^[60]采用同位素内标来降低基质效应, 具体实验将乙酸乙酯提取后的样品用 HLB 萃取柱进一步纯化, 纯化效率通过柱后注射测试验证, 还进行了化学计量学不确定性评估, Horwitz 方程结果表明这个方法符合计量学要求。前面所有的报道中, 展青霉素都是

在质谱负模式进行检测, 因为其正模式下信号相应很低。但 Malysheva 等^[61]则设计了新的方法实现了其在正模式下的高灵敏度检测, 主要的改进是采用流动相 H₂O:0.2 mol/L NH₄HCO₃ (Ph=10): methanol (30:5:65, V:V:V)。在碱性的条件下, 高强度的展青霉素甲醇加和物用于后边的定量分析。这个方法的一大优势就是在正模式下实现了展青霉素和其他毒素的同时检测。

液相色谱质谱联用的检测方法提供了很高的选择性和检测灵敏度, 但是不可否认仪器造价高是制约其进一步推广的重要因素。

4 总 结

展青霉素是我国国标中限量的 6 种真菌毒素之一, 受其污染的食物严重威胁人类身体健康。经过多年的探索, 高效液相色谱法和液相色谱质谱联用方法在检测展青霉素方面取得了可喜的进展。高效液相色谱法有很好的重复性和精密度, 但是选择性差; 液质联用法对于复杂体系由有很好的选择性, 很高灵敏度, 不过受制于仪器价格昂贵, 样品分析成本高。除此之外, 一些基于光谱、电化学等等快速筛查技术发展较好。未来快速筛查与准确定量技术的结合, 将会为食品安全提供更有力的保障。

参考文献

- [1] Wright SAI. Patulin in food [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2015, 5: 105–109.
- [2] Moake MM, Padilla-Zakour OI, Worobo RW. Comprehensive review of patulin control methods in foods [J]. *Compr Rev Food Sci F*, 2005, 4(1): 8–21.
- [3] Iha MH, Sabino M. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks [J]. *Food Control*, 2008, 19(4): 417–422.
- [4] Schumacher DM, Müller C, Metzler M, *et al.* DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin [J]. *Toxicol Lett*, 2006, 166(3): 268–275.
- [5] Rychlik M, Kircher F, Schusdziarra V, *et al.* Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42(5): 729–735.
- [6] Sadok I, Stachniuk A, Staniszewska M. Developments in the monitoring of patulin in fruits using liquid chromatography: An overview [J]. *Food Anal Methods*, 2019, 12(1): 76–93.
- [7] Commission E. Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [J]. *Official J Eur Union L* 2006, L364: 1401.
- [8] GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. GB 2761-2017 National food safety standard-Maximum limit of mycotoxins in food [S].
- [9] Li X, Li H, Li X, *et al.* Determination of trace patulin in apple-based food matrices [J]. *Food Chem*, 2017, 233: 290–301.
- [10] Welke JE, Hoeltz M, Dottori HA, *et al.* Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector [J]. *Food Addit Contam A*, 2009, 26(5): 754–758.
- [11] Marsol-Vall A, Balcells M, Eras J, *et al.* A rapid gas chromatographic injection-port derivatization method for the tandem mass spectrometric determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1453: 99–104.
- [12] Sadok I, Szmagara A, Staniszewska MM. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 364–370.
- [13] Bueno D, Istamboulie G, Muñoz R, *et al.* Determination of mycotoxins in food: A review of bioanalytical to analytical methods [J]. *Appl Spectrosc Rev*, 2015, 50(9): 728–774.
- [14] Víctor-Ortega MD, Lara FJ, García-Campaña AM, *et al.* Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of patulin in apple juices using micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 353–358.
- [15] Busman M. Quantitation of mycotoxins using direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS) [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(3): 643–646.
- [16] GB 5009.185-2016 食品安全国家标准 食品中展青霉素的测定[S]. GB 5009.185-2016 National food safety standard-Determination of patulin in food [S].
- [17] Moukas A, Panagiotopoulou V, Markaki P. Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques [J]. *Food Chem*, 2008, 109(4): 860–867.
- [18] Macdonald S, Long M, Gilbert J, *et al.* Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(6): 1387–1394.
- [19] Kharandi N, Babri M, Azad J. A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1619–1623.
- [20] Ha MH, Sabino M. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 2006, 89(1): 139–143.
- [21] Farhadi K, Maleki R. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-DAD as an efficient and sensitive technique for the determination of patulin from apple juice and concentrate samples [J]. *J Chin Chem Soc*, 2011, 58(3): 340–345.
- [22] Maham M, Karami-Osboo R, Kiarostami V, *et al.* Novel binary solvents-dispersive liquid-liquid microextraction (BS-DLLME) method for determination of patulin in apple juice using high-performance liquid chromatography [J]. *Food Anal Method*, 2013, 6(3): 761–766.
- [23] Li X, Li H, Ma W, *et al.* Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2018, 257: 1–6.
- [24] Mohammadi A, Tavakoli R, Kamankesh M, *et al.* Enzyme-assisted extraction and ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of patulin in apple juice and method optimization using central composite design [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 804: 104–110.
- [25] Abu-Bakar NB, Makahleh A, Saad B. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices [J]. *Talanta*, 2014, 120: 47–54.
- [26] Li JK, Wu RN, Hu QH, *et al.* Solid-phase extraction and HPLC

- determination of patulin in apple juice concentrate [J]. *Food Control*, 2007, 18(5): 530–534.
- [27] Wu R-N, Dang Y-L, Niu L, *et al.* Application of matrix solid-phase dispersion-HPLC method to determine patulin in apple and apple juice concentrate [J]. *J Food Compos Anal*, 2008, 21(7): 582–586.
- [28] Katerere DR, Stockenström S, Shephard GS. HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings [J]. *Food Control*, 2008, 19(4): 389–392.
- [29] Karakose A, Sanli S, Sanli N, *et al.* Evaluation of patulin in commercial baby foods by solid phase extraction and liquid chromatography PDA detection [J]. *Czech J Food Sci*, 2015, 33(1): 52–57.
- [30] Maragos CM, Busman M, Ma L, *et al.* Quantification of patulin in fruit leathers by ultra-high-performance liquid chromatography-photodiode array (UHPLC-PDA) [J]. *Food Addit Contam A*, 2015, 32(7): 1164–1174.
- [31] Katerere DR, Stockenström S, Balducci G, *et al.* Determination of patulin in apple juice: Comparative evaluation of four analytical methods [J]. *J AOAC Int*, 2007, 90(1): 162–166.
- [32] Wu RN, Han FL, Shang J, *et al.* Analysis of patulin in apple products by liquid-liquid extraction, solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods: A comparative study [J]. *Eur Food Res Technol*, 2009, 228(6): 1009–1014.
- [33] Zhou YC, Kong WJ, Li Y, *et al.* A new solid-phase extraction and HPLC method for determination of patulin in apple products and hawthorn juice in China [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(5–6): 641–649.
- [34] Shirasawa T, Ueda M, Appell M, *et al.* Use of cyclodextrin-based polymer for patulin analysis in apple juice [J]. *Mycotoxins*, 2013, 63(1): 1–8.
- [35] Giovannoli C, Spano G, Di Nardo F, *et al.* Screening of a combinatorial library of organic polymers for the solid-phase extraction of patulin from apple juice [J]. *Toxins*, 2017, 9(5): 174.
- [36] Wang Y, Wen Y, Ling YC. Graphene oxide-based magnetic solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography for determination of patulin in apple juice [J]. *Food Anal Method*, 2017, 10(1): 210–218.
- [37] Yu Y, Fan Z. Determination of patulin in apple juice using magnetic solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography [J]. *Food Addit Contam A*, 2017, 34(2): 273–281.
- [38] Khorrami AR, Taherkhani M. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for pre-concentration of patulin from apple juice [J]. *Chromatographia*, 2011, 73: 151–156.
- [39] Zhao D, Jia J, Yu X, *et al.* Preparation and characterization of a molecularly imprinted polymer by grafting on silica supports: a selective sorbent for patulin toxin [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(7): 2259–2273.
- [40] Yang Y, Li Q, Fang G, *et al.* Preparation and evaluation of novel surface molecularly imprinted polymers by sol-gel process for online solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography to detect trace patulin in fruit derived products [J]. *Rsc Adv*, 2016, 6(59): 54510–54517.
- [41] Anene A, Hosni K, Chevalier Y, *et al.* Molecularly imprinted polymer for extraction of patulin in apple juice samples [J]. *Food Control*, 2016, 70: 90–95.
- [42] Lhotska I, Holznerova A, Solich P, *et al.* Critical comparison of the on-line and off-line molecularly imprinted solid-phase extraction of patulin coupled with liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(23): 4599–4609.
- [43] Lucci P, Moret S, Bettin S, *et al.* Selective solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer for the analysis of patulin in apple-based foods [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(2): 458–465.
- [44] 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 Anal Method*, 2014, 7(2): 465–471.
- [45] Sadok I, Szmagara A, Staniszevska MM. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 364–370.
- [46] Sewram V, Nair JJ, Nieuwoudt TW, *et al.* Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 897(1–2): 365–374.
- [47] Takino M, Daishima S, Nakahara T. Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(17): 1965–1972.
- [48] Zhang K, Wong JW, Mai H, *et al.* Dopant-assisted atmospheric pressure photoionization of patulin in apple juice and apple-based food with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(18): 4112–4118.
- [49] Rosinska D, Vierikova M, Lehotay J. Determination of patulin in apple products using HPLC with photodiode array detector and ultra performance liquid chromatography with electrospray-tandem mass spectrometry [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2009, 32(4): 500–511.
- [50] Christensen HB, Poulsen ME, Rasmussen PH, *et al.* Development of an LC-MS/MS method for the determination of pesticides and patulin in apples [J]. *Food Addit Contam A*, 2009, 26(7): 1013–1023.
- [51] Dias JV, da-Silva RC, Pizzutti IR, *et al.* Patulin in apple and apple juice: method development, validation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and survey in Brazilian south supermarkets [J]. *J Food Compos Anal*, 2019.
- [52] Yang JZ, Wei W, Zhu WX, *et al.* High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of patulin in apple, hawthorn and tomato products [J]. *Food Sci*, 2009, 30(4): 162–165.
- [53] 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.
- [54] Yang Y, Yang Y, Shao B, *et al.* A simple and rapid method for determination of patulin in juice by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Anal Methods*, 2017, 10(9): 2913–2918.
- [55] De-Smet D, Dubruel P, Van-Peteghem C, *et al.* Development of a molecularly imprinted polymer for patulin in apple juice [J]. *World Mycotoxin J*, 2011, 4(4): 375–383.

- [56] Zhao M, Shao H, He Y, *et al.* The determination of patulin from food samples by using dual-dummy molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with HPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1125: 121714.
- [57] 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]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(14): 7659–7665.
- [58] Vaclavikova M, Dzuman Z, Lacina O, *et al.* Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC-MS/MS analytical procedure [J]. *Food Control*, 2015, 47: 577–584.
- [59] Song W, Li C, Moezzi B. Simultaneous determination of bisphenol A, aflatoxin B1, ochratoxin A, and patulin in food matrices by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2013, 27(6): 671–680.
- [60] Seo M, Kim B, Baek SY. An optimized method for the accurate determination of patulin in apple products by isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(18): 5433–5442.
- [61] Malysheva SV, Di-Mavungu JD, Boonen J, *et al.* Improved positive electrospray ionization of patulin by adduct formation: Usefulness in liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-mycotoxin analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1270: 334–339.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



李金宝, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: jzlijinbao@163.com