

检测和评估蜂蜜中的大米糖浆特异性标志物 (SMR)

应用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统与 Ultivo 三重四极杆液质联用系统



作者

Saikat Bhattacharya,
Vikrant Goel,
Saikat Banerjee, Nitin Vig
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱与 Agilent Ultivo 三重四极杆 LC/MS (LC/TQ) 的联用系统定量分析蜂蜜样品中的低纳克级 2-AFGP。此方法采用 Ultivo LC/TQ 开发，该系统体积小巧，但结果毫不逊色。此方法是食品行业在蜂蜜生产、加工和商业检测中进行常规分析的理想选择，也十分适用于学术研究目的。采用简单的液液萃取 (LLE) 样品前处理方法，能够成功实现基质中 2-AFGP 的 0.005 mg/kg 定量限 (LOQ)。

前言

蜂蜜是由蜜蜂生产的一种口味鲜美、营养丰富的食物，因具有抗氧化、抗菌和抗炎等特性而被广泛食用。然而，由于蜂蜜价格相对较高、产量有限、成分复杂，经常成为掺假的对象，损害了消费者的权益和生厂商的利益。最常见的蜂蜜掺假行为是在纯蜂蜜中添加糖浆，包括大米糖浆。此外，给蜜蜂喂食糖浆以提高产量和利润也是一种间接的掺假行为。



图 1. 蜂蜜产品

AFGP (2-乙酰基呋喃-3-吡喃葡萄糖苷，也称 SMR) 是大米糖浆的特异性标志物，可以像其他糖类标志物一样使用稳定碳同位素比值法、脉冲安培检测法、LC-IRMS (液相色谱-同位素比值质谱法)、红外光谱法 (IR)、TLC、GC/MS 和 NMR 进行检测。然而，这些传统方法费时费力，有时还会出现矛盾或假阴性结果。

三重四极杆 LC/MS 系统是美国、欧盟、FSSAI 和其他国家/地区用于确认蜂蜜中污染物和掺假物的金标准。本应用采用最新款三重四极杆 LC/MS 系统 Ultivo LC/TQ，获得的灵敏度高于食品药品监督管理局规定的安全限值要求。

实验条件

本实验使用乙腈 (Honeywell, LC/MS, 34967)、甲醇 (Honeywell, LC/MS 34966)、水 (Millipore)、甲酸 (Honeywell, LC/MS 56302)、2-乙酰基呋喃-3-吡喃葡萄糖苷 (TRC Canada, 部件号 G596874) 和安捷伦 0.2 μm PVDF 针头过滤器 (部件号 5191-5924)。储备液采用甲醇配制，2-AFGP 工作稀释液采用水配制。

萃取

取 1 g 蜂蜜进行样品前处理。步骤如下：用水稀释，离心，将上清液过滤后进样至 LC/MS (萃取成本更低)。详细流程如图 2 所示。

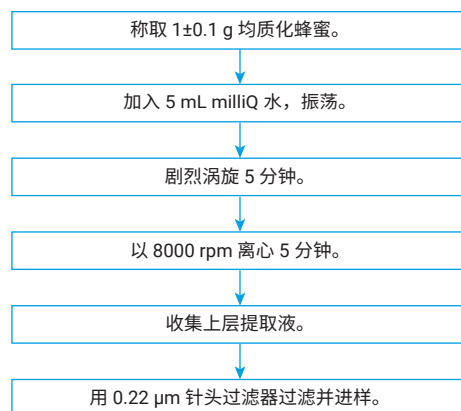


图 2. 基于 LLE 的样品前处理

仪器

本实验使用的仪器包括 Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G7104C)、Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129C)、Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)、配备 AJS 离子源的 Ultivo LC/TQ (G6465B)。LC 和 MS 参数如表 1 和表 2 所示。

表 1. HPLC 梯度方法

参数	值		
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 150 mm, 4 μm		
流动相	水 (0.1% FA):乙腈 (0.1% FA); 500 $\mu\text{L}/\text{min}$		
进样量	2 μL		
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$		
梯度	时间 (min)	水 (0.1% FA)	乙腈 (0.1% FA)
	0.0	98	2
	5.0	98	2
	8.0	90	10
	10.0	5	95
	12.0	5	95
12.1	98	2	

表 2. Ultivo LC/TQ 条件

参数	设置	
电离模式	AJS (+ve)	
雾化器气体	50 psi	
干燥气	10 L/min, 300 °C	
鞘气	11 L/min, 300 °C	
毛细管电压	4000 V	
喷嘴电压	1500 V	
碎裂电压	80 V	
驻留时间	100 ms	
分辨率	Unit/unit	
分析物	MRM 离子对	CE (V)
2-AFGP	311.1/185	9
2-AFGP	311.1/148.9	13

结果与讨论

从预加标 0.05 mg/kg (50 ppb) SMR 的蜂蜜样品和空白蜂蜜萃取物的 MRM 图中可以看出, SMR 很容易检出 (图 3)。印度食品安全指南 (FSSAI) 规定的最低检测浓度为 1 mg/kg, 而使用 Ultivo LC/TQ 的方法 LOQ 为 0.005 mg/kg。此外, 通过进样各种 SMR 浓度下的蜂蜜样品, 获得了可重现的洗脱曲线, 如图 4 所示。

校准、RSD 和回收率

使用 148.9 作为定量离子, 185.0 作为定性离子, 在 0.005–0.25 mg/kg 浓度范围内绘制预萃取的蜂蜜 SMR 的校准曲线。在低、高 QC 浓度下各进行 6 次重复实验, 以评估方法可靠性。如图 5 所示, 两种 QC 浓度下的 RSD (%CV) 均 < 10%, 回收率在 70%–120% 之间。图 6 所示为校准表截图, 其中包含定量离子、定性离子以及离子比, 符合 SANTE 2019 法规要求。

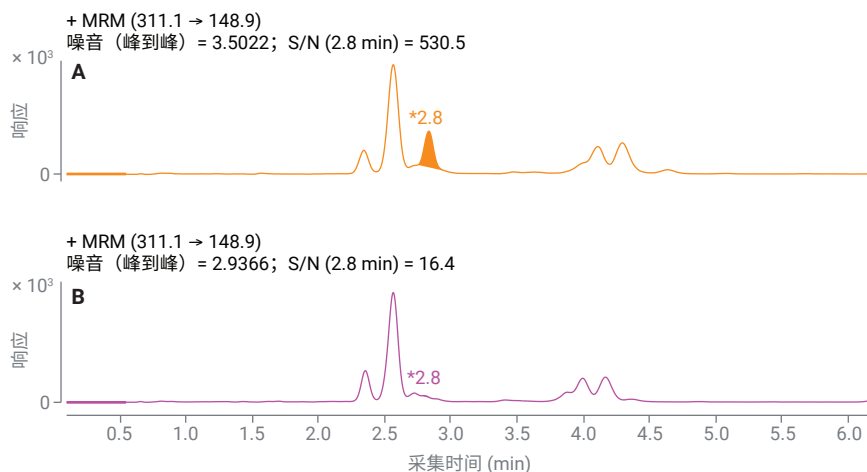


图 3. Agilent Ultivo LC/TQ 上的 SMR 响应 (空白与 0.05 mg/kg)

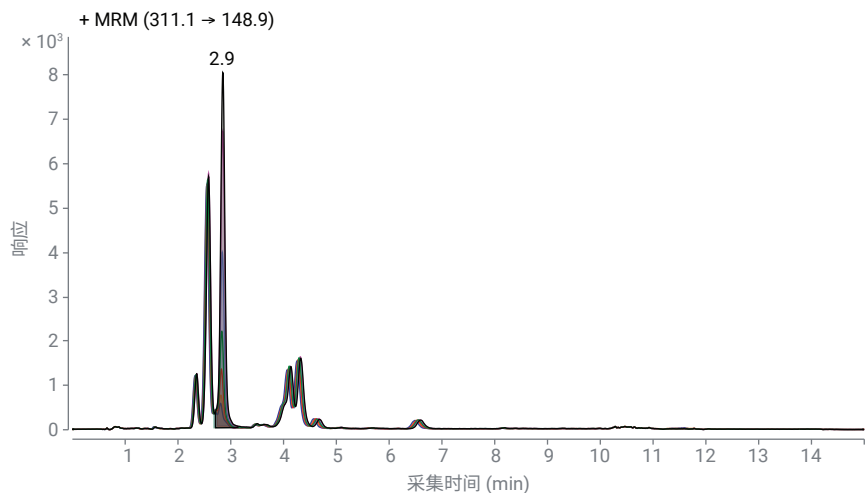


图 4. 2.9 分钟处不同浓度 SMR 的叠加谱图

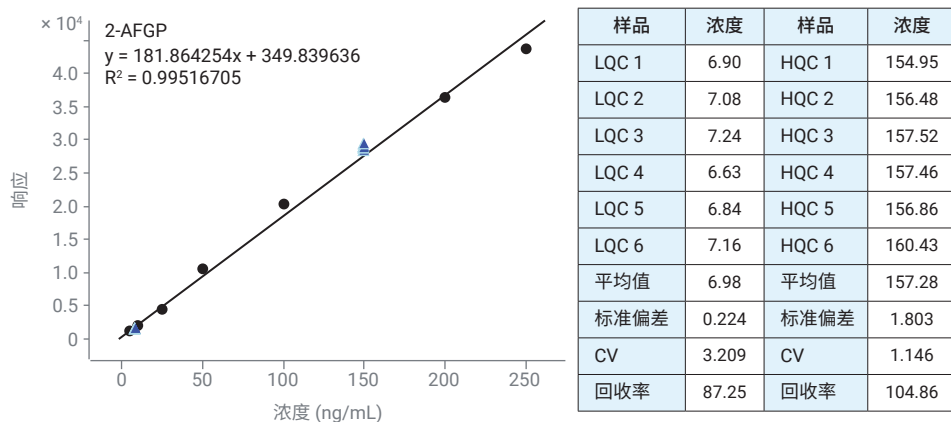


图 5. 5–250 ppb 范围内的线性图 ($R^2 = 0.9952$) 和 QC 浓度下的回收率计算值

不同蜂蜜样品中 SMR 的定量分析

将该方法扩展到不同蜂蜜样品。采用开发出的方法萃取并分析所有样品。将初始样品用水稀释 5 倍（稀释倍数为 5），报告获得的结果。总共 10 份样品中有 3 份检出 SMR，其中有两份的 SMR 高于校准范围。其余样品或未检出 SMR，或 SMR 浓度低于校准范围。所有 10 份样品的定量数据如图 6 所示。图 7 为空白蜂蜜、SMR 加标蜂蜜、SMR 阴性样品和 SMR 阳性样品的定性和定量离子 MRM 色谱图。

Sample				2-AFGP_...	2-AFGP Results					Qualifier...	
Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Accuracy	Ratio	MI
MATRIX_BLANK_3.d	MatrixBlank		5/17/2021 6:10 PM		2.85	77.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0.00		238.0	<input checked="" type="checkbox"/>
MATRIX_5PPB.d	Cal	1	5/17/2021 6:26 PM	5	2.81	1205.0	<input type="checkbox"/>	4.70	94.0	58.6	<input type="checkbox"/>
MATRIX_10PPB.d	Cal	2	5/17/2021 6:42 PM	10	2.82	2102.0	<input type="checkbox"/>	9.63	96.3	89.0	<input type="checkbox"/>
MATRIX_25PPB.d	Cal	3	5/17/2021 6:57 PM	25	2.82	4570.0	<input type="checkbox"/>	23.21	92.8	77.8	<input type="checkbox"/>
MATRIX_50PPB.d	Cal	4	5/17/2021 7:13 PM	50	2.83	10595.0	<input type="checkbox"/>	56.33	112.7	73.6	<input type="checkbox"/>
MATRIX_100PPB.d	Cal	5	5/17/2021 7:29 PM	100	2.84	20323.0	<input type="checkbox"/>	109.82	109.8	68.4	<input type="checkbox"/>
MATRIX_200PPB.d	Cal	6	5/17/2021 7:44 PM	200	2.85	36321.0	<input type="checkbox"/>	197.79	98.9	66.7	<input type="checkbox"/>
MATRIX_250PPB.d	Cal	7	5/17/2021 8:00 PM	250	2.85	43726.0	<input type="checkbox"/>	238.51	95.4	66.4	<input type="checkbox"/>
LQC_1.d	QC	8	5/17/2021 8:16 PM	8	2.86	1604.0	<input type="checkbox"/>	6.90	86.2	106.7	<input type="checkbox"/>
LQC_2.d	QC	8	5/17/2021 8:31 PM	8	2.86	1637.0	<input type="checkbox"/>	7.08	88.5	104.3	<input type="checkbox"/>
LQC_3.d	QC	8	5/17/2021 8:47 PM	8	2.86	1667.0	<input type="checkbox"/>	7.24	90.5	96.8	<input type="checkbox"/>
LQC_4.d	QC	8	5/17/2021 9:03 PM	8	2.87	1556.0	<input type="checkbox"/>	6.63	82.9	105.7	<input type="checkbox"/>
LQC_5.d	QC	8	5/17/2021 9:18 PM	8	2.87	1599.0	<input type="checkbox"/>	6.87	85.9	102.2	<input type="checkbox"/>
LQC_6.d	QC	8	5/17/2021 9:34 PM	8	2.87	1652.0	<input type="checkbox"/>	7.16	89.5	98.5	<input type="checkbox"/>
HQC_1.d	QC	9	5/17/2021 9:50 PM	150	2.87	28529.0	<input type="checkbox"/>	154.95	103.3	67.8	<input type="checkbox"/>
HQC_2.d	QC	9	5/17/2021 10:05 P...	150	2.88	28808.0	<input type="checkbox"/>	156.48	104.3	67.4	<input type="checkbox"/>
HQC_3.d	QC	9	5/17/2021 10:21 P...	150	2.87	28998.0	<input type="checkbox"/>	157.52	105.0	68.2	<input type="checkbox"/>
HQC_4.d	QC	9	5/17/2021 10:37 P...	150	2.88	28986.0	<input type="checkbox"/>	157.46	105.0	67.8	<input type="checkbox"/>
HQC_5.d	QC	9	5/17/2021 10:52 P...	150	2.87	28877.0	<input type="checkbox"/>	156.86	104.6	67.7	<input type="checkbox"/>
HQC_6.d	QC	9	5/17/2021 11:08 P...	150	2.88	29527.0	<input type="checkbox"/>	160.43	107.0	67.3	<input type="checkbox"/>
▶ MATRIX_BLANK_4.d	MatrixBlank		5/17/2021 11:24 P...		2.77	355.0	<input type="checkbox"/>	0.03		90.1	<input type="checkbox"/>
Sample_V_13.d	Sample		5/17/2021 11:40 P...		2.78	746.0	<input type="checkbox"/>	2.18		84.2	<input type="checkbox"/>
Sample_V_14.d	Sample		5/17/2021 11:55 P...		2.77	616.0	<input type="checkbox"/>	1.46		95.1	<input type="checkbox"/>
Sample_V_15.d	Sample		5/18/2021 12:11 A...		2.77	429.0	<input type="checkbox"/>	0.44		89.5	<input type="checkbox"/>
Sample_V_16.d	Sample		5/18/2021 12:27 A...		2.78	481.0	<input type="checkbox"/>	0.72		80.0	<input type="checkbox"/>
Sample_V_245.d	Sample		5/18/2021 12:42 A...		2.77	152.0	<input type="checkbox"/>	0.00		119.7	<input type="checkbox"/>
Sample_K_231.d	Sample		5/18/2021 12:58 A...		2.76	202.0	<input type="checkbox"/>	0.00		55.9	<input type="checkbox"/>
Sample_K_198.d	Sample		5/18/2021 1:14 AM		2.86	79206.0	<input type="checkbox"/>	433.60		62.2	<input type="checkbox"/>
Sample_J_215.d	Sample		5/18/2021 1:29 AM		2.86	13160.0	<input type="checkbox"/>	70.44		68.3	<input type="checkbox"/>
Sample_J_221.d	Sample		5/18/2021 1:45 AM		2.87	49042.0	<input type="checkbox"/>	267.74		63.7	<input type="checkbox"/>
Sample_N_5390.d	Sample		5/18/2021 2:01 AM		2.76	228.0	<input type="checkbox"/>	0.00		81.6	<input type="checkbox"/>
MATRIX_BLANK_5.d	Sample		5/18/2021 2:16 AM		2.78	335.0	<input type="checkbox"/>	0.00		91.9	<input type="checkbox"/>

图 6. 蜂蜜中 SMR 在 5–250 ppb (0.005–0.25 mg/kg) 范围内的校准表

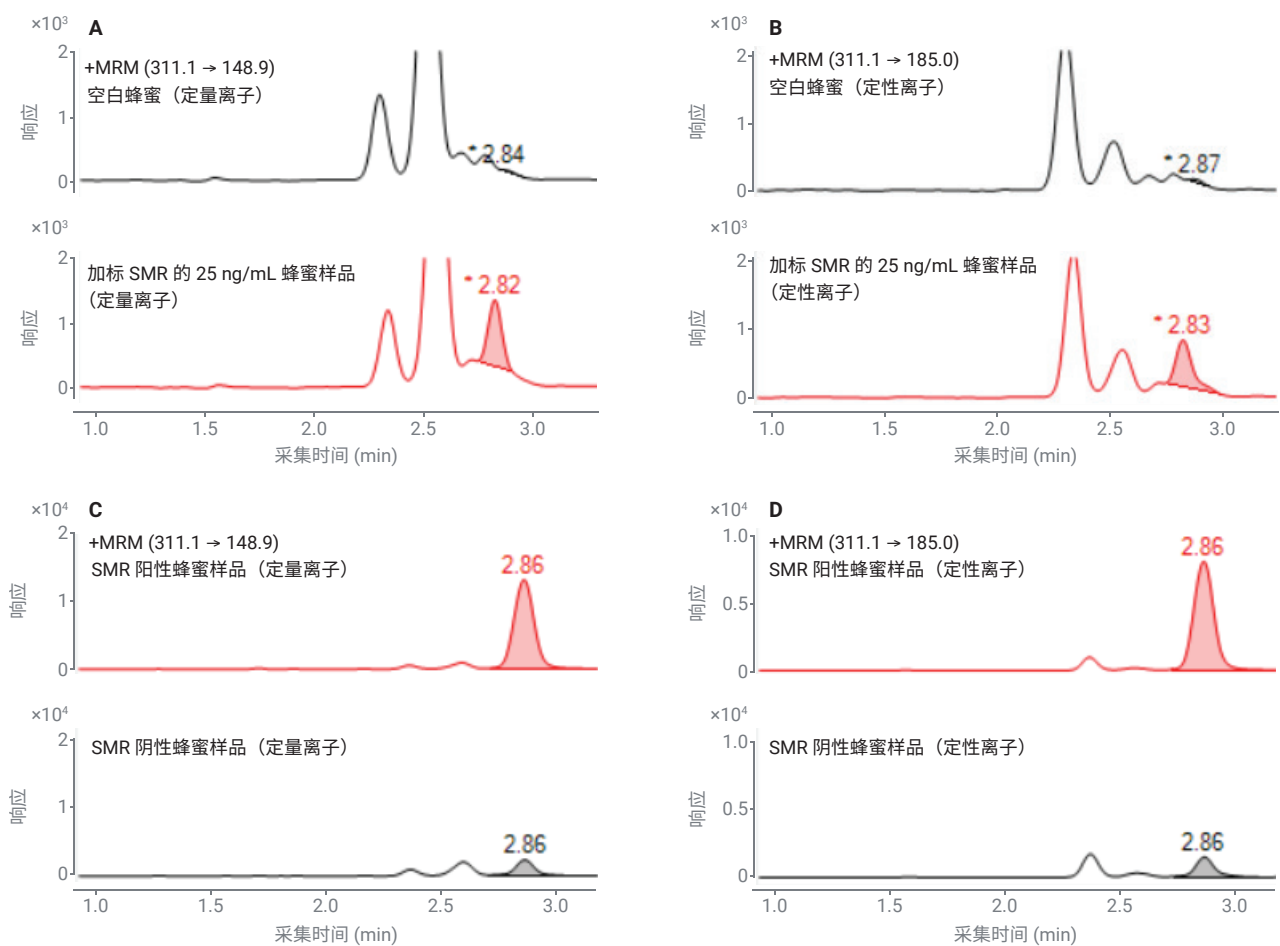


图 7. (A) 空白基质和 25 ng/mL 蜂蜜样品中 SMR 的定量离子 MRM; (B) 空白基质和 25 ng/mL 蜂蜜样品中 SMR 的定性离子 MRM; (C) 阳性蜂蜜样品和阴性蜂蜜样品中 SMR 的定量离子 MRM; (D) 阳性蜂蜜样品和阴性蜂蜜样品中 SMR 的定性离子 MRM

结论

经严格的方法验证，本应用简报所述方法的 LOQ 仅为 FSSAI 规定的蜂蜜 SMR 限值的 1/200。根据两种 QC 浓度下的六次重复实验可知，%CV 低于 5%，QC 浓度下的回收率在 70%–120% 之间。

综上所述，使用 Ultivo LC/TQ 和 1260 Infinity II 的联用系统，可根据欧盟标准要求成功分析实际蜂蜜样品中的 SMR。本文所述的样品前处理方法是一种稀释后即可进样的 LLE 流程，步骤简单、快速且成本低。

参考文献

1. Bing, D. *et al.* Rapid Screening of Multiclass Syrup Adulterants in Honey by Ultrahigh-performance Liquid Chromatography/Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 6614–6623. DOI: [10.1021/acs.jafc.5b01410](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01410)
2. SeKW, Wahab R. A., Syed Yaacob S. N., Ghoshal S. K. Detection Techniques for Adulterants in Honey: Challenges and Recent Trends. *Journal of Food Composition and Analysis* **2019**, *80*, 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.001>
3. Food Safety and Standards Authority of India File no. 11023/53/2018-QA. Method of detection of 2-Acetylfuran-3-Glucopyranoside (2-AFGP)/3-O- α -D-Glucosyl Isomaltol, the Specific Marker for Rice Syrup (SMR) by LC-MS/MS
4. SANTE/12682/2019; EURL | Residues of Pesticides | Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (eurl-pesticides.eu)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE44419.4764583333

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 10 月 1 日，中国出版
5994-4155ZHCN