液质联用法测定鲜蛋黄中的棉酚

施琦贻

（上海市食品研究所，上海 200235）

摘要：采用 HPLC-ESI-MS/MS 联用技术，检测鲜蛋黄中的棉酚残留。样品经丙酮提取后，以 C18 柱为液相分离柱，以甲醇和1%甲酸为流动相，多反应监测模式测定棉酚，定性定量离子对分别为 517.4/259.3、517.4/231.3。棉酚含量在 1 ng/mL~100 ng/mL 范围内具有良好的线性关系，测定下限（10 S/N）为 1 ng/mL。以鲜蛋黄为基体，加入 3 种不同浓度水平的棉酚做加标回收试验，回收率在 85%~100%之间，相对标准偏差（n=6）小于 10%。该方法操作简单，结果准确，重现性好。

关键词：液质联用；蛋黄；棉酚

文章篇号：1673-9078(2012)5-598-600

Determination of Gossypol in Egg Yolk by HPLC-MS

SHI Qi-yi

(Shanghai Food Research Institute, Shanghai 200235, China)

Abstract: Determination of gossypol in egg yolk samples was studied by using HPLC-ESI-MS/MS. The sample was extracted with acetone and analyzed on a C18 column using methanol and 1% formic acid as mobile phase. The monitoring ions of gossypol were 517.4/259.3 and 517.4/231.3 in the multiple reaction monitoring mode (MRM). Linear relationship between values of peak area and mass concentration of gossypol was obtained in the range of 1 ng/mL~100 ng/mL, with lower limit detection (10 S/N) of 1 ng/mL. Recovery test was made by addition of standard gossypol with different concentrations. The recovery was found in the range of 85%-100%. RSD was found to be less than 10% (n=6). The method was simple, sensitive, accurate and repeatable.

Key words: HPLC-ESI-MS/MS; yolk; gossypol

棉酚(gossypol)，是锦葵科植物草棉、树棉或陆地棉成熟种子、根皮中提取的一种多元酚类物质，经提纯精制后的棉酚呈嫩黄色，是含有六个羟基的多环醛，分子式为$C_{30}H_{30}O_8$，相对分子质量为518.56。棉酚是棉籽油，棉籽饼中的主要有毒物质，在加工生产棉籽油和棉籽饼时，棉酚是必须被去除的有毒物质。如果农民使用了未彻底去除棉酚的棉籽饼的劣质饲料，鸡蛋中可能有棉酚的残留，长期食用会危害到人体健康。

目前对棉酚的检测，主要是采用高效液相色谱法[1-3]、紫外分光光度法[4]等。但液相色谱法和分光光度法的检出限一般为0.1~1 μg/mL，而本文采用的液质联用法在检测痕量残留时具有很大的优势[5~6]，该法的检出限为1 ng/mL，能更加灵敏的检测出蛋黄中的棉酚残留。

1 实验部分

1.1 仪器试剂

分析天平；超声器；离心机；氮吹仪；涡旋振荡器；液相色谱串联四级杆质谱仪（Waters- Quattro Micro）；0.22 μm 滤膜。甲醇（色谱纯）；甲酸（色谱纯）；丙酮（优级纯）；棉酚（Dr.Ehrenstorfer，纯度 98%）；超纯水（美国 Millipore）。

1.2 仪器条件

色谱柱：Sunfire^{Tm}C$_{18}$ (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)；柱温：30 ℃；进样量：10 μL；流动相：甲醇-1%甲酸水溶液(90:10)；流速：0.2 mL/min。

电喷雾离子源(ESI)负离子扫描模式；毛细管电压：2.5 kV；二级锥孔电压：3.0 V；离子源温度：120 ℃；脱溶剂气温度：350 ℃；脱溶剂气流量：500 L/h；锥孔反吹气流量：50 L/h。定性、定量离子对、滞留时间、锥孔电压、碰撞能量见表1。

1.3 样品制备和测定

表1 棉酚的监测离子对

Table 1 Monitoring ions of gossypol

母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	滞留时间/s Dwell	锥孔电压/V Cone	碰撞电压/V Col. Energy
517.4	231.3	0.5	50	40
	259.3	0.5	50	35

注：517.4/231.3 为定量离子对。

称取搅拌均匀的鲜蛋黄样品 1 g 于离心管中，加

收稿日期：2012-02-23

作者简介：施琦贻（1984-），从事食品质量安全工作

入丙酮 5 mL，超声提取 10 min，以 4000 r/min 离心 5 min，收集上清液，重复 3 次，将上清液于 40 ℃氮吹吹干，用 2 mL 流动相定容，过 0.22 μm 微孔滤膜待测。同时配置棉酚标准溶液工作曲线，外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

棉酚能溶于大多数有机溶剂，如丙酮、乙醚、氯仿、甲醇等，较难溶于甘油、环己烷和苯，不溶于石油醚和水。实验比较了甲醇、乙腈、丙酮等不同溶剂对蛋黄中棉酚的提取效果，3种溶剂提取回收率均大于90%，但甲醇和乙腈的极性均大于丙酮，提取液的杂质较多，较浑浊，故采用丙酮作为提取溶剂。

2.2 流动相的选择

棉酚是一种多酚羟基联萘醛类化合物，该结构中较多的氢键基团使其与C18柱上的残余硅羟基相互作用，产生吸附，不易洗脱。在流动相中加入 1%甲酸，降低了 pH 值，抑制了棉酚上的酚羟基的解离，使棉酚色谱峰峰形良好。负离子模式下一般较少使用酸性流动相，可能是为了避免产生离子抑制降低灵敏度，但也有国标法使用甲酸(FA)的案例[7]，因此甲酸对电离影响较小，而容易产生离子抑制的主要有离子对试剂三氟乙酸(TFA)。图 1 是浓度 10 ng/mL 的棉酚标准溶液 MRM 图。

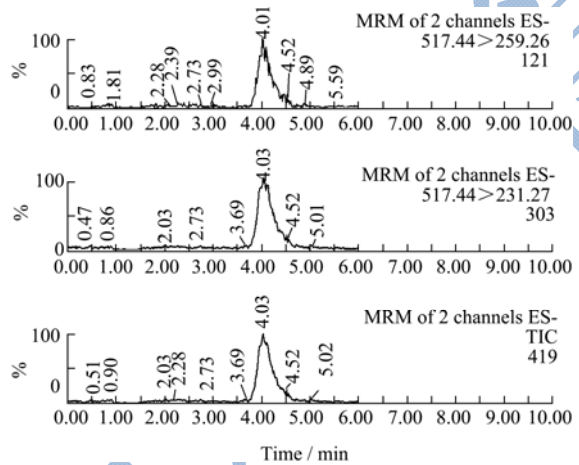


图1 10 ng/mL棉酚的MRM图

Fig.1 MRM spectrum of gossypol (10 ng/mL)

2.3 质谱条件的优化

棉酚的结构中含有较多的酚羟基，有一定的极性，适合采用电喷雾ESI离子源。酚羟基呈弱酸性，容易先失去H，故采用负离子模式，并且负离子模式下背景干扰低。实验将1 μg/mL的棉酚以20 μL/min的速度直接引入质谱仪，选择棉酚的准分子离子(m/z)517 [M-H]进行质谱参数扫描，离子对517.4/231.3响应比较高，为定量离子对；517.4/259.3为定性离子对，见图2，优化后的质谱条件见1.2。

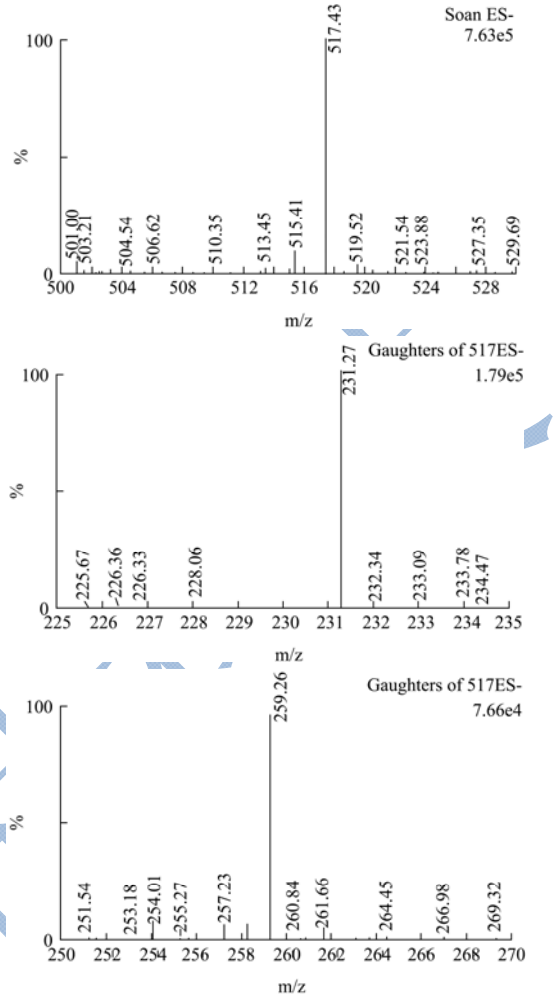


图2 棉酚的离子扫描图

Fig.2 Ion scanning spectrum of gossypol

2.4 标准曲线与检出限

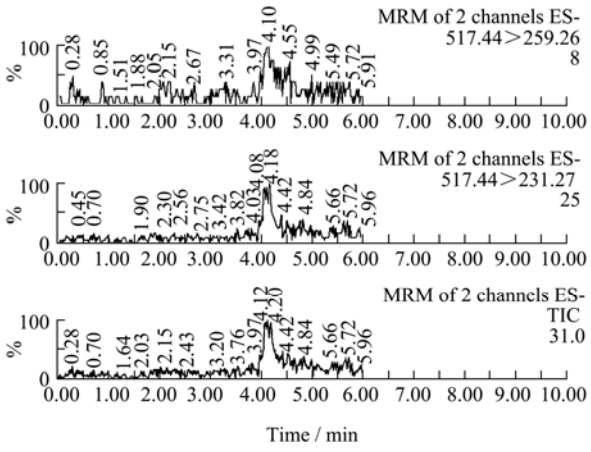


图3 1 ng/mL棉酚的MRM图

Fig.3 MRM spectrum of gossypol (1 ng/mL)

吸取一定量的棉酚标准工作液，加入空白基质溶液，配制成浓度为 1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 的棉酚标准工作曲线。以棉酚质量浓度(X)对相应棉酚峰面积(Y)进行线性回归，得到线性回归方程

Y=3.23X+0.0472，相关系数 0.9992，图 3 是 1 ng/mL 棉酚标准溶液的MRM图，其信噪比(S/N)＞10，可将检出限定为 1 ng/mL。

2.5 精密度与回收率

表2 回收率与精密度测定结果(n=6)

Table 2 Results of precision and recovery tests(n=6)

棉酚	基质含量/(ng/mL)	标准加入量/(ng/mL)	平均测定值/(ng/mL)	平均回收率/%	精密度RSD%
鲜蛋黄	0	1	0.85	85	9.6
	0	5	4.5	90	6.5
	0	10	9.6	96	6.0

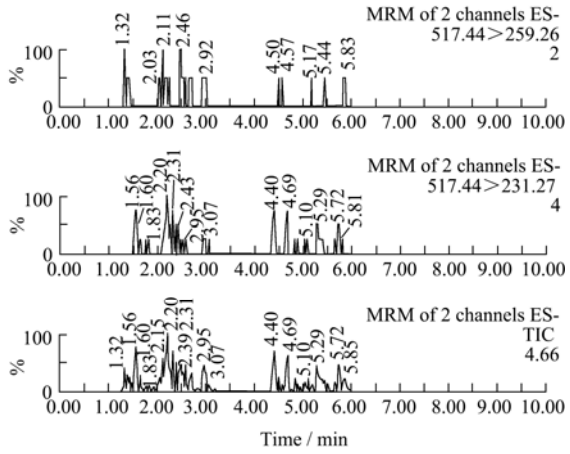


图 4 阴性样品的 MRM 图

Fig.4 MRM spectrum of negative sample

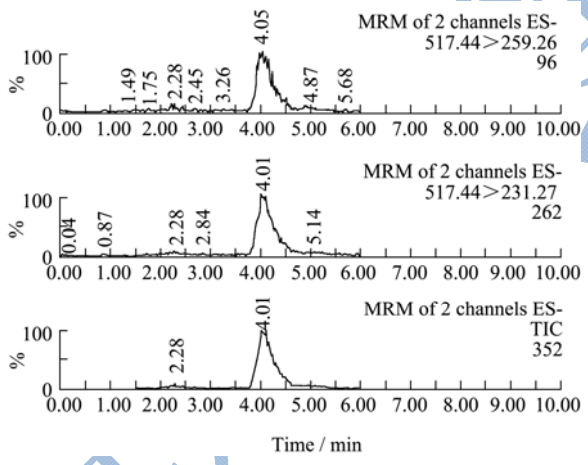


图 5 加标浓度 10ng/mL 的 MRM 图

Fig.5 MRM spectrum of sample addition (10 ng/mL)

分别在 1 g 空白鲜蛋黄样品中加入棉酚标准工作液，使其含量分别为 1、5、10 ng/mL，按 1.3 节处理样品并进行检测。所得峰面积和对应浓度的标准品峰面积之比，即为回收率。按上述方法每个浓度各平行分析 6 次，计算精密度 RSD%，结果见表 2。图 4 为阴性样品 MRM 图，图 5 为加标浓度 10 ng/mL 的 MRM 图。

3 结论

本文建立了应用液质联用法测定鲜蛋黄中的棉酚残留。根据研究结果，采用电喷雾负离子模式离子化、多反应监测模式测定棉酚，定性定量离子对分别为 517.4/259.3、517.4/231.3 外标法定量。棉酚含量在 1 ng/mL~100 ng/L 范围内具有良好的线性关系，测定下限（10 S/N）为 1 ng/mL。以鲜蛋黄为基体，加入 3 种不同浓度水平的棉酚做加标回收试验，回收率在 85%~100%之间，相对标准偏差（n=6）小于 10%。该方法快速简单，结果准确，重现性好。

参考文献

[1] 文君,缪红,王鲜俊,等.HPLC法测植物油中游离棉酚[J].中国卫生检验杂志,2006,16(8):1017

[2] 崔晓明,解成喜,张丽静,等.反相高效液相色谱法测定肉样中游离棉酚的含量[J].色谱,2004,22(5):559

[3] 光红,陈家春,蔡大勇.高效液相色谱法测定棉根皮中棉酚含量[J].中国中药杂志,2002,27(3):173-175

[4] 黄永林,阮俊,杨雄辉,等.棉籽中游离棉酚的含量测定[J].广西植物,2001,21(4):371-373

[5] 殷平,陈舜胜,邓晓军,等.液质联用检测水产品中氯霉素、氟苯尼考和甲砜氯霉素的残留量[J].现代食品科技,2007,23(10):83-87

[6] 洪武兴,孙良娟,刘益锋,等.液质联用法检测水产品中四环素类残留[J].现代食品科技,2010,26(7):756-758

[7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 22957-2008.河豚鱼、鳗鱼及烤鳗中九种糖皮质激素残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S]