

# 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

文章编号: 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<sup>[1-3]</sup>、紫外分光光度法<sup>[4]</sup>等。但液相色谱法和分光光度法的检出限一般为0.1~1  $\mu\text{g/mL}$ , 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<sup>[5-6]</sup>, 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  $\mu\text{m}$  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<sup>TM</sup>C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ); 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ ; 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  $^{\circ}\text{C}$ ; 脱溶剂气温度: 350  $^{\circ}\text{C}$ ; 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 °C 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<sup>[7]</sup>, 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。

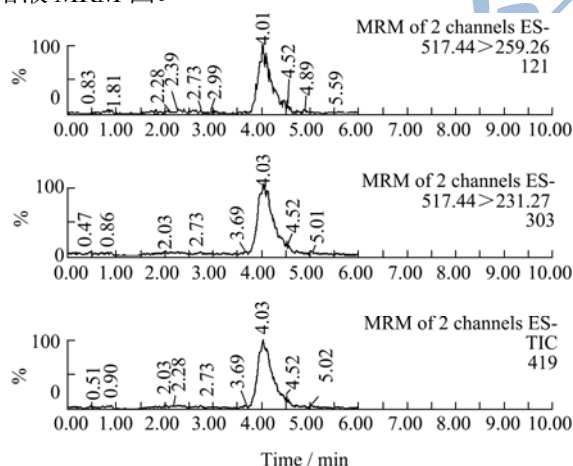


图1 10 ng/mL棉酚的MRM图

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。

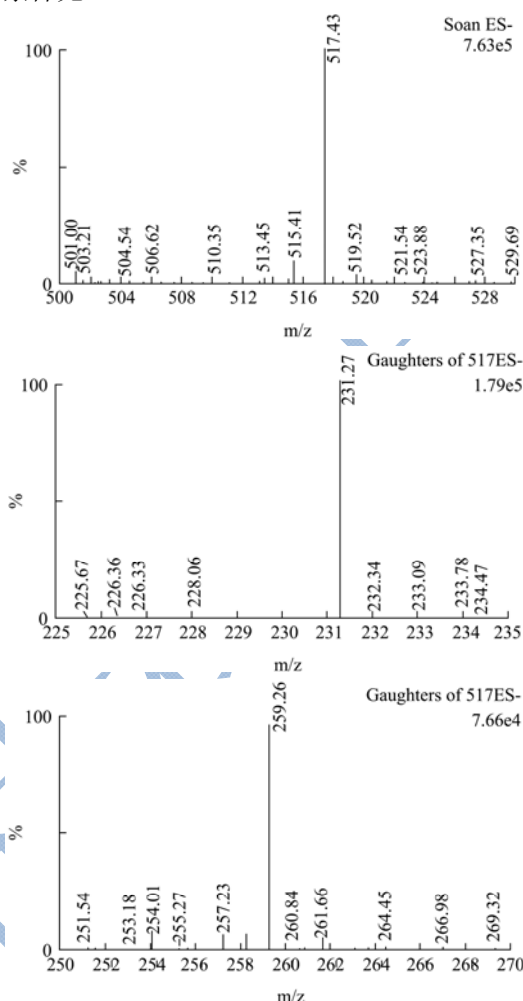


图2 棉酚的离子扫描图

Fig.2 Ion scanning spectrum of gossypol

### 2.4 标准曲线与检出限

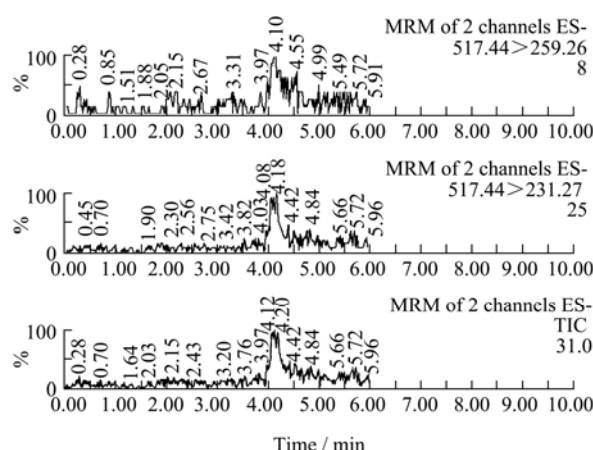


图3 1 ng/mL棉酚的MRM图

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%
	0	1	0.85	85	9.6
鲜蛋黄	0	5	4.5	90	6.5
	0	10	9.6	96	6.0

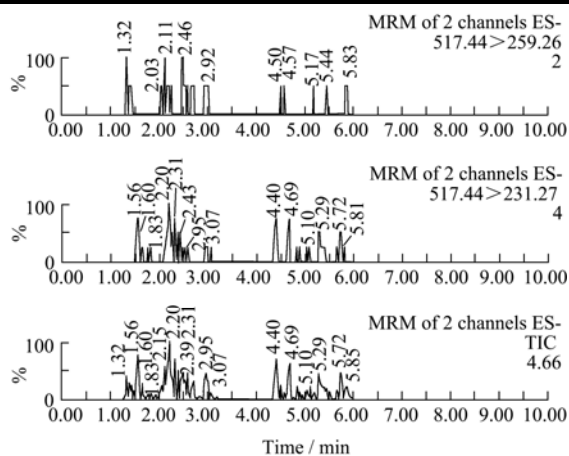


图 4 阴性样品的 MRM 图

Fig.4 MRM spectrum of negative sample

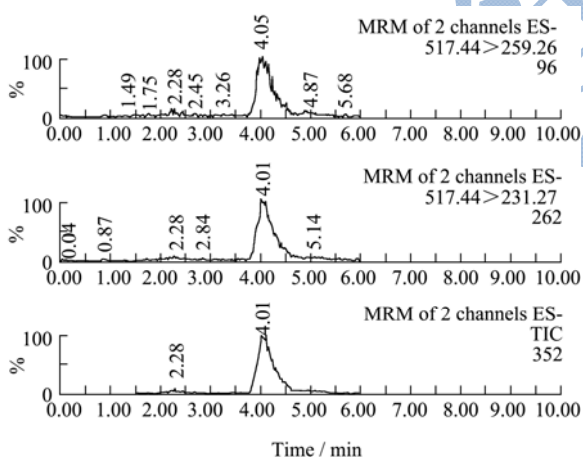


图 5 加标浓度 10ng/mL 的 MRM 图

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、氟苯尼考和甲砒氯霉素的残留量[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]