

超高效液相色谱-串联质谱法测定 食用植物油中的游离棉酚

吴敏¹, 连英杰¹, 林立毅¹, 徐敦明¹, 黄志强^{2*}

(1. 厦门出入境检验检疫局, 厦门 361026; 2. 湖南省检验检疫科学技术研究院, 长沙 410004)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-电喷雾串联质谱测定食用植物油中游离棉酚的方法。 **方法** 样品采用无水乙醇溶液提取, C₁₈ 色谱柱分离, 电喷雾串联四极杆质谱仪进行检测。 **结果** 棉酚的质量浓度在 0.001~1.0 µg/mL 范围内具有良好的线性关系。食用植物油中的棉酚在 5、50、250 µg/kg 3 个添加水平下, 平均回收率为 70.6%~94.4%, 相对标准偏差小于 12.0%; 方法检出限 LOD($S/N \geq 3$) 为 1 µg/kg, 定量限 LOQ($S/N \geq 10$) 为 5 µg/kg。 **结论** 该方法快速简单, 结果准确, 重现性好, 适用于食用植物油中的游离棉酚含量的测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 游离棉酚; 食用植物油

Determination of free gossypol in edible vegetable oil using ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry

WU Min¹, LIAN Ying-Jie¹, LIN Li-Yi¹, XU Dun-Ming¹, HUANG Zhi-Qiang^{2*}

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China; 2. Hunan Inspection and Quarantine Technology Academy, Changsha 410004, China)

ABSTRACT: Objective A method for the free gossypol in edible vegetable oil was developed using ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization triple-quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS-MS). **Methods** The free gossypol residue in the test samples was extracted with ethanol solution. The gradient chromatographic separation was performed using a C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 2.6 µm), and analyzed by UPLC-ESI-MS-MS. The mass spectrometer was operated in the negative ion mode using multiple reaction monitoring (MRM) for qualitative and quantitative analysis. **Results** The linear range was from 0.001~1.0 µg/mL. The average recoveries of the gossypol ranged from 70.6% to 94.4% ($n=6$) at the spiking levels of 5~250 µg/kg with the relative standard deviation less than 12.0%. The limit of detection (LOD, $S/N \geq 3$) was 1 µg/kg and the limit of quantification (LOQ, $S/N \geq 10$) were 5 µg/kg. **Conclusion** The method is suitable for the determination of gossypol in edible vegetable oil.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS); free gossypol; edible vegetable oil

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAK08B01)

Fund: Supported by the 12th Five Years Key Programs(2012BAK08B01)

*通讯作者: 黄志强, 研究员, 主要研究方向食品安全。E-mail: shimianhe74@sina.com

*Corresponding author: HUANG Zhi-Qiang, Professor, Hunan Inspection and Quarantine Technology Academe, Changsha 410004, China. E-mail: huangzq@163.com

1 引言

2013年10月,台湾爆发了“黑心油”掺假事件,所谓的“大统”100%橄榄油几乎是用棉籽油、葵花油调制而成,其中的棉酚含量过高,继大统长基与富味乡两家台湾油品大厂被发现食用油产品掺假后,台湾知名的福懋油品也被发现同类问题。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醚,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^[1]。棉籽油含有脂溶性色素棉酚,棉籽油作为食用调和油中的组成成分,被食用后,可引起中毒。游离棉酚不仅可使男性睾丸损伤,精子减少,又可使女性发生闭经及子宫萎缩。国家标准 GB 2716-2005《食用植物油卫生标准》^[2]规定食用棉籽油中棉酚的限量标准为0.02%,其他种类食用油不得检出。而据台湾“中央社”消息,台湾“卫生福利部”将预告食用油棉酚浓度规范,合格产品应低于1 mg/kg。另外,棉酚的含量过高也可以作为不法厂家以廉价棉籽油冒充高价橄榄油的佐证,因此建立快速、高效测定食用调和油中游离棉酚含量的方法具有重要意义。

目前对棉酚的检测,主要是采用高效液相色谱法^[3-5]、紫外分光光度法^[6]等,食用油中低于1 mg/kg的游离棉酚已超出方法的灵敏度极限。液质联用法在检测痕量残留时具有很大的优势^[7-9],随着色谱柱填料技术的发展,基于1.7 μm 小颗粒填料技术的超高效液相色谱(UPLC)比传统的HPLC具有更高的分离能力^[10-13],与质谱联用能够进行相对分子质量的精确测定。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。

2 材料与方法

2.1 仪器试剂

分析天平;超声器;离心机;涡旋振荡器;液相色谱串联四级杆质谱仪(API6500,美国AB公司),配Agilent 1290 HPLC超高效液相色谱仪(美国Agilent公司);0.22 μm 滤膜。甲醇(色谱纯);甲酸(色谱纯);无水乙醇(优级纯);棉酚(纯度98%,美国

Dr. Ehrenstorfer);超纯水(美国Millipore公司)。

2.2 液相色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件

Thermo C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)。流动相:1%甲酸水溶液(A),甲醇(B);梯度洗脱程序:0~2 min,流动相B保持50%;2~4 min,流动相B由0线性增至90%;4~6 min,流动相B保持90%,6~7 min降至50%并保持至3 min。流速为0.3 mL/min;柱温35 $^{\circ}\text{C}$;进样量:1 μL 。

2.2.2 质谱条件

电喷雾电离源(ESI);负离子扫描;喷雾电压-4 kV;离子源温度400 $^{\circ}\text{C}$;辅助加热气流量50 L/min。多反应监测扫描模式(MRM):入口电压-10 V;出口电压-20 V;停滞时间200 ms;其他质谱参数见表1。

表1 棉酚的监测离子对
Table 1 Monitoring ions of gossypol

母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	滞留时 间/s	去簇电压 /V	碰撞电压 /V
517.1	230.8*	100		-52.4
	417.1	100	-175	-45.0

注: *为定量离子

2.3 实验方法

2.3.1 标准系列的配制

准确称取适量的棉酚标准品,用丙酮溶解并定容,配成质量浓度为1 g/L的标准储备液;根据需要将其逐级稀释,配成质量浓度为0.001~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的无水乙醇标准工作液,于5 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2.3.2 样品处理与分析

准确称取食用植物油样1.000 g,加入5 mL无水乙醇,涡旋振荡仪剧烈震荡2 min,静置分层(2 h),再涡旋,离心,吸取上层清液过0.22 μm 微孔滤膜待测,外标法定量。

3 结果与讨论

3.1 标准溶液稳定性的考察

将配制好的10 $\mu\text{g/mL}$ 棉酚甲醇溶液和10 $\mu\text{g/mL}$ 棉酚乙醇溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 棉酚丙酮溶液放置在5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行考察,结果棉酚含量在丙酮溶液中最稳定,甲醇中降解加快,见图1。而且温度越低稳定性越好,这与文献报道的5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下棉酚甲醇溶液、棉

酚乙醇溶液和棉酚丙酮溶液半衰期分别为 16.5 d、27.5 d、203 d 相符^[14,15]。文章还考察了 10 $\mu\text{g/mL}$ 棉酚无水乙醇溶液在室温(15 $^{\circ}\text{C}$)和 5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的稳定性,分别将配制好的 10 $\mu\text{g/mL}$ 棉酚无水乙醇溶液放置在室温(15 $^{\circ}\text{C}$)和 5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行考察,结果棉酚在无水乙醇溶液中还是比较稳定的,棉酚含量在一周内变化不大,见图 2;因此标准储备液使用丙酮溶液,而工作液使用乙醇溶液,工作液 5 $^{\circ}\text{C}$ 保存一周有效。

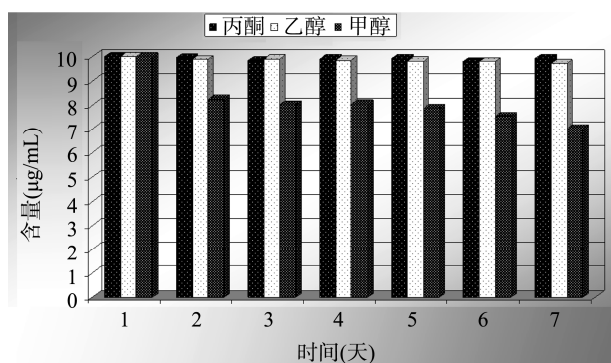


图 1 5 $^{\circ}\text{C}$ 不同溶剂标准溶液稳定性

Fig. 1 Stability of different solvent standard solution in 5 $^{\circ}\text{C}$

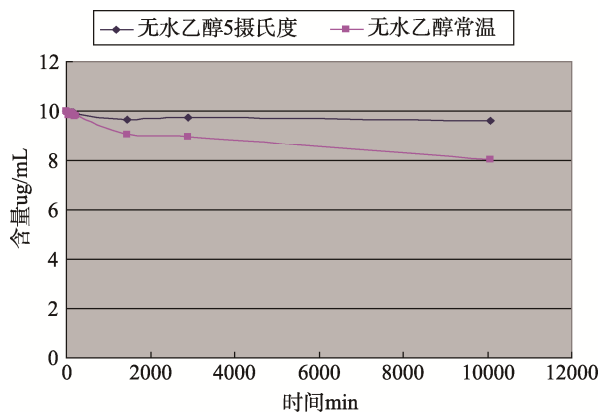


图 2 无水乙醇标准溶液稳定性

Fig. 2 Stability of standard ethanol solution

3.2 提取剂的选择

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,文献使用丙酮作为提取剂^[2-4]。实验比较了无水乙醇、丙酮、甲醇不同溶剂对食用植物油中棉酚的提取效果,3种溶剂提取回收率均大于70%,但

是丙酮溶解油脂的能力很强,提取液没有分层,提取液的杂质和油脂含量过高,甲醇稳定性不好,游离棉酚降解快,故采用无水乙醇作为提取溶剂。

3.3 提取时间的优化

提取静置时间对回收率的影响很大,本文考察了添加水平为 1 $\mu\text{g/kg}$ 的茶油样品剧烈震荡提取 2 min 后,静置 0~150 min 的回收率情况,发现在室温条件下,静置 2 h,回收率水平达到比较高的范围,见图 3。

3.4 色谱和质谱条件的优化

棉酚结构中有较多的氢键基团,与 C_{18} 柱上的硅羟基相互作用,产生吸附,不易洗脱。需要降低流动相的 pH 值,抑制酚羟基的解离,因此采用 1% 甲酸作为流动相。样品油脂含量比较高,采用梯度洗脱能有效排除干扰。

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。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^[16],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)^[1]。

实验将 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的棉酚以 20 $\mu\text{L/min}$ 的速度直接引入质谱仪,选择棉酚的准分子离子(m/z)517 进行质谱参数扫描,离子对 517.4/230.8 响应比较高,为定量离子对;517.4/471.1 为定性离子对。本研究还对喷雾电压、离子源温度、碰撞气、入口电压、出口电压、去簇电压及碰撞能量等参数进行了优化,以获得分子离子与特征碎片离子最大的灵敏度。图 4 显示了在优化条件下棉酚无水乙醇溶液(0.1 $\mu\text{g/mL}$)的色谱图。从图 4 中可以看出,棉酚在所使用的流动相条件下,在 C_{18} 色谱柱上具有较强的保留,能够与干扰杂质充分分离,有效地减轻了基质效应的影响,使定量结果更加准确可靠。

3.5 标准曲线与检出限

取一系列棉酚标准工作溶液(0.001、0.005、0.01、0.1、0.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$),以峰面积 Y 和对应的质量浓度 $C(\text{mg/L})$ 绘制标准曲线。结果表明,棉酚在 0.001~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,其质量浓度与对应的峰面积呈现良

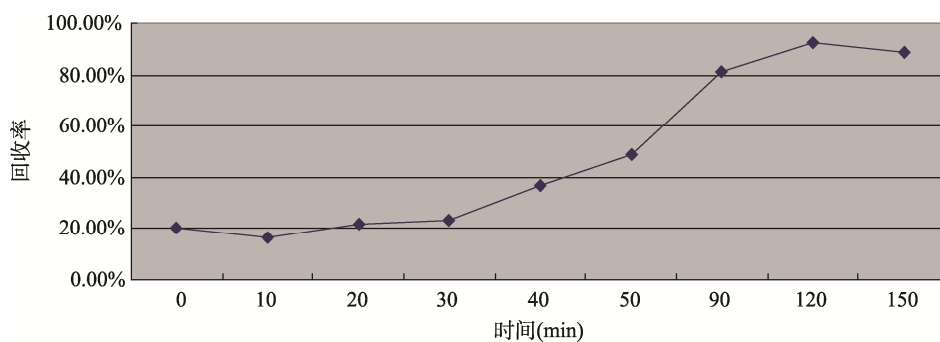


图 3 提取时间的回收率曲线

Fig. 3 Curve of recovery rate-extraction time

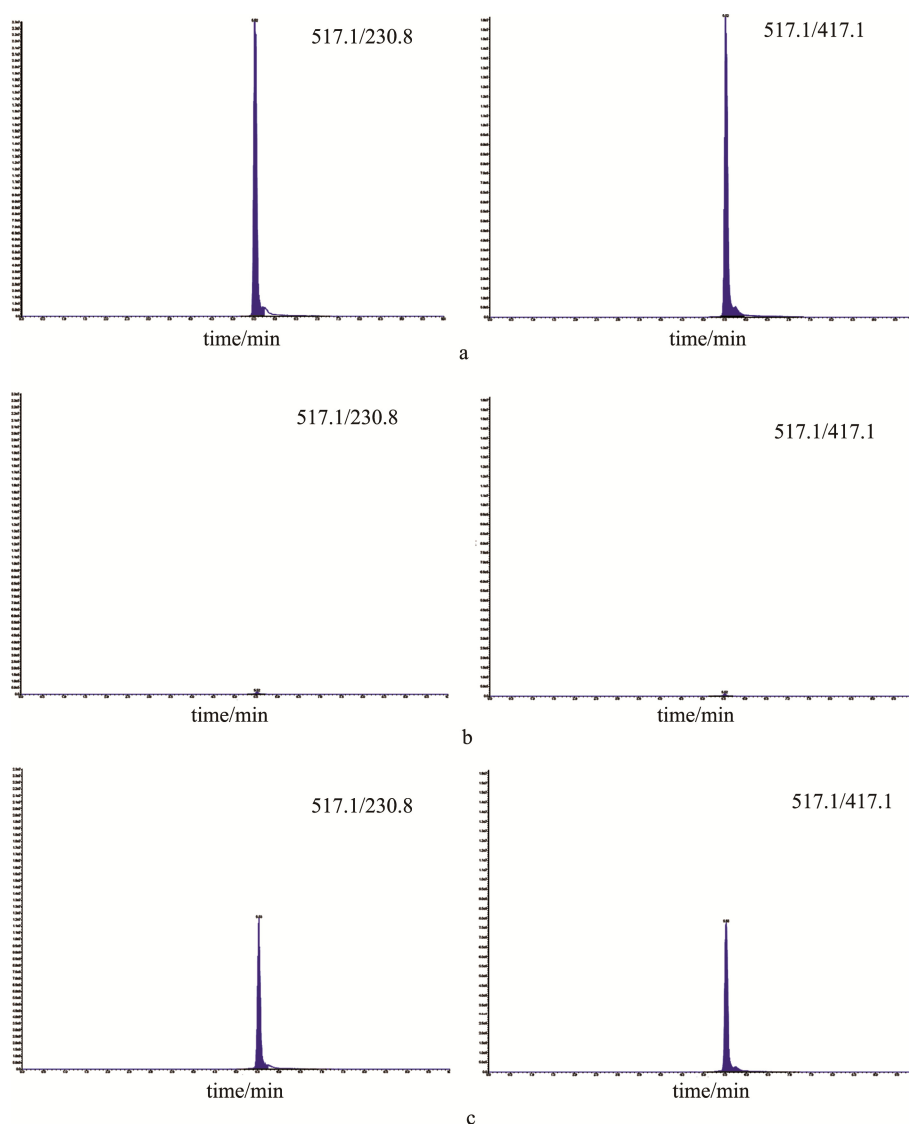


图 4 (a)棉酚标准溶液(0.1 $\mu\text{g/mL}$)、(b)橄榄油样品和(c)橄榄油中添加 0.25 mg/kg 棉酚的多反应监测(MRM)提取离子流色谱图

Fig. 4 (a)MRM chromatograms of gossypol standard(0.1 $\mu\text{g/mL}$)、(b)olive oil sample, and (c)olive oil sample spiked with 0.25 mg/kg standard

好的线性关系, 相关系数 $r=0.9994$, 在空白橄榄油中添加棉酚标准溶液, 按信噪比(S/N)大于 3 计算, 本方法的检出限(LOD)为 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$, 按信噪比(S/N)大于 10 计算, 本方法的定量限(LOQ)为 $5\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

3.6 精密度与回收率

取橄榄油、茶油、花生油、大豆油样品, 分别向样品中添加 5.0、50.0、250.0 $\mu\text{g/kg}$ 的棉酚标准溶液, 每一添加水平重复测定 6 次, 按上述实验方法测定, 各个添加水平的回收率和精密度数据见表 2。由表 2 可以看出, 在 5.0、50.0、250.0 $\mu\text{g/kg}$ 3 个添加水平下, 所有样品的回收率在 68.9%~94.4%之间, 相对标准偏差在 3.7%~12.0%之间, 表明该方法具有较好的准确度和精密度。

表 2 不同样品基体中棉酚的回收率和
相对标准偏差($n=6$)
Table 2 The recovery and relative standard deviation from
differen matrixes of gossypol ($n=6$)

样品	添加水平 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率(%)	平均回收 率(%)	相对标准 偏差(%)
橄榄 油	5.0	70.6~94.4	76.4	12.0
	50.0	71.6~89.2	80.6	7.5
	250.0	76.9~87.3	81.4	4.3
茶油	5.0	68.9~85.3	73.4	11.7
	50.0	74.6~90.7	78.9	6.7
	250.0	78.5~90.2	80.1	5.7
花生 油	5.0	72.2~88.6	76.8	11.0
	50.0	70.9~89.4	85.0	7.2
	250.0	78.1~90.8	82.6	4.6
大豆 油	5.0	71.1~88.9	73.2	8.9
	50.0	78.9~85.4	80.8	3.7
	250.0	75.1~83.1	78.9	4.2

4 结 论

本文建立了超高效液相色谱串联质谱法测定食用植物油中的游离棉酚。采用电喷雾负离子多反应监测模式, 该方法快速简单, 结果准确, 重现性好, 适用于食用植物油中的游离棉酚含量的测定。克服了传统分析方法的缺点。提高了分析灵敏度和准确度, 方法技术指标满足残留分析和国家限量要求。

参考文献

[1] 施琦贻. 液质联用法测定鲜蛋黄中的棉酚[J]. 现代食品科技, 2012, 28(5): 598–600.
Shi QY. Determination Of Gossypol in Egg Yolk by HPLC-MS[J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(5): 598–600.

[2] GB 2716-2005 食用植物油卫生标准[S].
GB 2716-2005 Hygien icstandard for edible vegetable oil[S].

[3] GB/T 5009.148-2003 植物性食品中游离棉酚的测定[S].
GB/T 5009.148-2003 Determination of gossypol in vegetable foods[S] .

[4] 于加乾. 高效液相色谱法测定食用调和油中的游离棉酚粮食[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(4): 78–79.
Yu GQ. Determination of free gossypol in vegetable Oil byHPLC [J]. Grain and Oil Food Sci Technol, 2013, 21(4): 78–79.

[5] 沈媛, 薛雅琳, 金青哲, 等. 棉籽油中游离棉酚的反相高效液相色谱测定[J]. 中国油脂, 2012, 37(10): 71–74
Shen Y, Xue YL, Jin QZ, *et al.* Determination of free gossypol in cottonseed Oil by RP-HPLC[J]. China Oils Fats, 2012, 37(10): 71–74.

[6] 王开丽, 张石蕊. 棉粕中游离棉酚含量的测定方法[J]. 饲料博览, 2012, 10: 36–38.
Wang KL, Zhang SR. Determination of free gossypol content in Cotton Bossard[J]. Feed Review, 2012, 10: 36–38.

[7] 孙雷, 刘琪, 王树槐. 液相色谱-串联质谱技术进展及在兽药行业上的应用[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(9): 34–37.
Sun L, Liu Q, Wang SH. The Progress of Liquid Chromatography-Tandem M ass Spectrometer Technology and Applications in Veterinary Drug Industry[J]. China Vet Drug Mag, 2007, 41(9): 34–37.

[8] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进[J]. 质谱学报, 2011, 32(6): 322–332.
Wang LQ, He LM, Zeng ZL, *et al.* Progress in Matrix Effect of Veterinary Drug Residues Analysis by High—Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry[J]. J Chin Mass Spectry Soc, 2011, 32(6): 322–332.

[9] 严丽娟, 吴敏, 张志刚, 等. 亲水作用色谱-电喷雾串联质谱检测原料奶及奶制品中三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(6): 759–762.
Yan LJ, Wu M, Zhang ZG, *et al.* determination of melamine residue in raw milk and dairy products using hydrophilic interaction chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2008, 26(6): 759–762.

[10] 周贻兵, 吴坤, 刘利亚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量[J]. 质谱学报, 2013, 34(5): 294–299.

- Zhou YB, Wu K, Liu LY, *et al.* Determination of M alachite Green, Crystal Violet and Their Metabolites Contents in Fishes by UPLC-MS/MS[J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2013, 34(5): 294–299.
- [11] 解鸿蕾, 李春, 刘宁. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法分析婴儿乳粉中的唾液酸[J]. 色谱, 2013, 31(8): 781–785.
- Xie HL, Li Chun, Liu N. Analysis of sialic acid in infant formulas using ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2013, 31(8): 781–785.
- [12] 邓立刚, 李增梅, 赵善仓, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定玉米中硝磺草酮及其代谢物残留量[J]. 分析化学, 2013, 41(8): 1269–1273.
- Deng LG, Li ZM, Zhao SC, *et al.* Determination of M esotrione and Its Metabolite Residues in Maize by Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry[J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(8): 1269–1273.
- [13] 冯月超, 贾丽, 何亚荟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定粮食及肉制品中的 24 种工业染料[J]. 色谱, 2013, 31(10): 1021–1027.
- Peng YC, Jia L, He YH, *et al.* Simutaneous determination of 24 industrial dyes in grain and meat products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2013, 31(10): 1021–1027.
- [14] Nomeir AA, Abou-Donia MB, Gossypol: High-performance Liquid Chromatographic Analysis and stability in various solvents[J]. J American Oil Chem Soc, 1982, 59(12): 546–549.
- [15] 吴伟伟, 许競荣. HPLC 法测定棉籽饼粕饲料中的游离棉酚[J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(5): 105–107.
- Wu WW, Xu GR. Determination of free gossypol in cottonseed cake feed by HPLC[J]. J Agric Univ Hebei, 2009, 32(5): 105–107.
- [16] GB/T 22958-2008 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].
- GB/T 22958-2008 Determination of canthaxanthin residues in fugu, eel and baked eel HPLC-UV method[S].

(责任编辑:邓伟)

作者简介



吴敏, 高级工程师, 主要研究方向为食品有毒有害物质分析。
E-mail: shimianhe74@sina.com



黄志强, 研究员, 主要研究方向为食品有毒有害物质分析。
E-mail: huangzq@163.com