

超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性 食品中游离棉酚

贾丽华, 王建山*, 王一欣, 林芳, 赵俊楠, 李涛

(陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品中游离棉酚的方法。**方法** 样品经高速匀浆后用乙腈提取后, 经乙腈饱和正己烷去脂, 用XSelect HSS T₃柱(2.1 mm×100 mm, 2.5 μm), 以含0.1%(V/V)甲酸溶液和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)和多离子检测模式(multiple reaction monitoring, MRM)进行检测, 基质匹配外标法定量。**结果** 在0.01~0.10 mg/L范围内线性良好($r^2 > 0.999$), 本方法的定量限为10 μg/kg。游离棉酚在10~100 μg/kg添加浓度范围内, 回收率为83.3%~89.2%, 相对标准偏差为3.9%~7.2%。**结论** 该方法准确性强, 重复性好, 灵敏度高, 可用于动物源性食品中游离棉酚的测定和确证。

关键词: 游离棉酚; 超高效液相色谱-串联质谱法; 动物源性食品

Determination of free gossypol in animal-origin food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

JIA Li-Hua, WANG Jian-Shan*, WANG Yi-Xin, LIN Fang, ZHAO Jun-Nan, LI Tao

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of free gossypol in animal-origin food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted with acetonitrile after high-speed homogenization and the supernatant was degreased with n-hexane. The liquid was performed on XSelect HSS T₃ (2.1 mm×100 mm, 2.5 μm) with the gradient elution of 0.1% (V/V) formic acid aqueous solution (A) and acetonitrile solution (B). The sample was detected by electrospray ionization (ESI) with multiple reactions monitoring (MRM), and quantified by matrix matched with external standard method. **Results** Within the range of 0.01~0.10 mg/L, the linearity was good ($r^2 > 0.999$). The quantitative limit of the method was 10 μg/kg. The recoveries rate of free gossypol in the range of 10-100 μg/kg was 83.3%~89.2% and relative standard deviation (RSD) was 3.9%~7.2%. **Conclusion** This method is simple, fast and reliable, which can be used for rapid screening and confirmation of free gossypol in animal-origin foods.

KEY WORDS: free gossypol; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; animal-origin foods

基金项目: 2019年陕西省创新能力支撑计划项目(2019PT-22)

Fund: Supported by Shaanxi Innovation Ability Support Plan Project (2019PT-22)

*通讯作者: 王建山, 主管药师, 主要研究方向为食品药品质量与安全。E-mail: 273650552@qq.com

*Corresponding author: WANG Jian-Shan, Competent Pharmacist, Shaanxi Institute for Food and Drug Control, NO.21, Kejiyu Road, Gaoxin District, Xi'an 710065, China. E-mail: 273650552@qq.com

1 引言

棉酚是棉类植物的种子、根皮及茎秆等色腺体中的一种黄色有毒多酚物质^[1], 分子式为 $C_{30}H_{30}O_8$, 分子量为 518.55, 其主要以游离棉酚(free gossypol, FG)和结合棉酚(bound gossypol, BG) 2 种形式存在^[2]。我国是世界上棉花种植的主要国家之一, 由棉花所产生的副产品资源也极为丰富。棉籽饼粕和棉籽壳是棉花加工业的主要副产品, 由于其蛋白含量很高, 其中棉饼和棉粕中蛋白含量 40%左右, 因此成为饲喂牲畜的重要饲料资源, 广泛用于喂养牛、羊、猪、鸡等动物, 添加量可占动物日粮总重的 10%~30%^[3]。由于棉花源性的饲料中含有棉酚, 在脱毒不完全的情况下, 其中所含的棉酚会在动物体内残留^[4]。结合棉酚无毒性, 而游离棉酚的活性基团羟基和活性醛基由于未被结合, 易发生化学反应, 而且排泄缓慢, 在动物体内组织器官中具有蓄积效应, 毒性较大。目前, 棉酚的检测方法主要有比色法^[5]、薄层色谱法^[6]、分光光度法^[7]、毛细管电泳法^[8]、液相色谱法^[9,10]和高效液相色谱—质谱联用法^[11,12], 检测基质也主要针对饲料^[13]、油^[14]、动物血浆^[12]方面的研究, 针对动物源性食品的研究较少。

液相色谱-质谱联用法具有专一性强、灵敏度高等优点, 因此本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定动物源性食品中游离棉酚, 以期为进一步研究棉酚在动物源性体内食品的残留量, 从而进一步开展风险评估、采取控制措施等工作提供有力的技术支撑, 更好地为监管服务, 保障人民的食品安全。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

QTRAP™ 5500 LC/MS/MS 系统(美国 SCIEX 公司); IKA T25 高速分散机、IKA MS3 basic 型涡旋仪[艾卡(广州)仪器设备有限公司]; LYNX4000 高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BS223S 型电子分析天平(德国塞多利斯公司); Synergy 型超纯水仪(美国密理博公司)。

棉酚对照品(纯度 $\geq 95\%$, 美国 Sigma aldrich 公司)。

乙腈、正己烷、甲酸(色谱纯, 美国 Honeywell 公司); 无水硫酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 0.22 μm 有机系滤膜(天津津膜公司); 实验室用水为超纯水。

样品共 40 批, 包含: 猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝 4 个品种, 购于陕西西安市和新疆乌鲁木齐市各农贸市场。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

称取 5.00 g(精确至 0.01 g)已捣碎样品于 50 mL 离心管

中, 加入 5 g 无水硫酸钠, 加入 10 mL 乙腈溶液, 10000 r/min 匀浆提取 1 min。另取一 50 mL 离心管加入 10 mL 乙腈溶液, 洗涤匀浆刀头 10 s, 洗涤液移入上一离心管中, 涡旋混匀器上震荡 1 min, 超声 15 min, 于 4000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至 25 mL 比色管中, 用乙腈定容至 25 mL, 摇匀, 取 5 mL 上清液于 50 mL 离心管中, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干, 加入 1 mL 初始流动相充分溶解残渣, 加入 5 mL 乙腈饱和正己烷溶液, 涡旋和 2 min, 5000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷层后, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 供测定。

2.2.2 液相色谱-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

沃特世 XSelect HSS T₃ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 2.5 μm), 流动相: 0.1%(V/V, 下文同)甲酸(A)-乙腈(B), 流速: 0.3 mL/min, 进样体积: 5 μL , 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。液相色谱梯度洗脱程序: 0~3.0 min, 40%~80% B; 3.0~6.0 min, 80%~90% B; 6.0~8.5 min, 90% B; 8.5~9.5 min, 90%~40% B; 9.5~14 min, 40%B。

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)($^+$); 离子源接口电压: 5500 V; ESI 离子源参数: 气帘气: 35 psi; 源温度: 550 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气(GAS1): 55 psi; 辅助气(GAS2): 60 psi。扫描模式: 多反应监测模式(multiple reactions monitoring, MRM)。

2.2.3 基质标准溶液的配制

准确量取棉酚标准品, 用乙腈溶解稀释成 1 mg/L 的标准储备液, 于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 备用。分别用不同的空白基质稀释成 0.01、0.02、0.04、0.06 和 0.10 mg/L 的基质匹配标准工作溶液。将所得的标准工作溶液按 2.2.2 节的条件测定, 以进样质量浓度为 X 轴、响应值为 Y 轴绘制标准工作曲线。

3 结果与分析

3.1 仪器条件优化

3.1.1 色谱条件优化

分别以 0.1% (V/V) 甲酸-乙腈, 0.1% (V/V) 甲酸-甲醇, 0.05% (V/V) 氨水-乙腈, 水-乙腈, 5 mmol/L 甲酸铵-乙腈为流动相, 考察了不同色谱条件下棉酚的分离情况, 从实验结果可以发现不含甲酸的流动相条件较含有甲酸的流动相条件棉酚的离子响应更好, 棉酚的保留在含有甲酸的流动相条件下保留更强。这是由于棉酚是在负离子模式下进行检测, 使用含有 0.1%甲酸的流动相可能会抑制棉酚的离子化, 由于棉酚结构中含有多羟基, 在碱性溶液中羟基易电离, 使得化合物在溶液中的极性增强, 在反相色谱柱上保留减弱, 因此在溶液中添加 0.1%甲酸可以抑制棉酚羟基的电离, 增强棉酚在色谱柱上的保留。保留时间的增长有助于棉酚与干扰杂质的分离, 提高检测的灵敏度, 因此本实验选择 0.1%甲酸-乙腈作为流动相。棉酚标准品多

反应监测色谱图如图 1 所示。

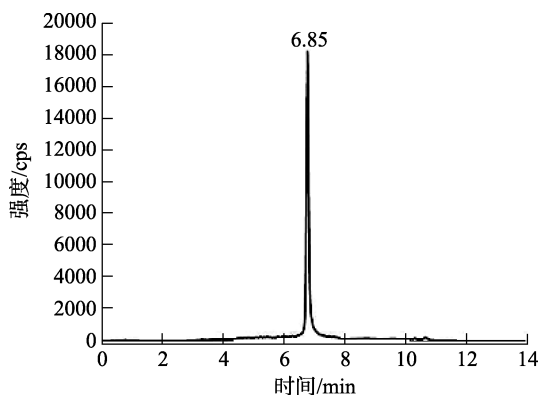


图 1 棉酚标准品 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of gossypol standard

3.1.2 质谱条件优化

根据棉酚的性质, 配制 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准调谐液, 在 ESI 负离子模式下进行质谱条件优化。以分子量-H 作为母离子, 寻找确定母离子, 对此母离子进行子离子扫描。选取丰度最强的子离子作为定量离子, 丰度第二强的作为定性离子, 同时对去簇电压、碰撞能量进行优化。最终确定的质谱条件如表 1 所示。

表 1 棉酚的定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量
Table 1 Qualitative ion pairs, quantitative ion pairs, declustering potential and collision energy of gossypol

组分名称	离子对(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
棉酚	517.2/230.9*	80	43
	517.2/259.0		53

注: *为定量离子。

3.2 前处理条件优化

3.2.1 提取条件优化

本实验选择了实验室和文献报道中常用的丙酮-水、乙腈、水、甲醇作为提取剂提取^[13], 所有的提取操作均在添加标准溶液混合均匀并放置 1 h 后进行, 分别考察代表性基质: 肉(猪肉)、内脏(猪肝)的提取率, 结果表明仅有丙酮-水和乙腈为提取剂时回收率均能达到 80%, 测试其他提取溶剂提取率均不到 70%, 另外由于使用乙腈相较于丙酮水更易于进行后续的净化浓缩操作, 因此本方法选择乙腈作为提取剂。

3.2.2 提取方式的选择

分别比较了超声、涡旋、匀浆 3 种提取方式对 3 种考察基质的提取效率。经实验发现, 匀浆的提取回收率明显优于超声和涡旋 2 种方式, 原因是对于动物源性食品来说, 高速匀浆可破碎动物源性食品中的组织细胞, 有助于提取液充分与棉酚接触, 可以使提取更充分, 因此本实验最终

确定以高速匀浆作为提取方式。

3.3 净化方式的优化

在前期的实验阶段, 选择将提取液经氮吹之后使用流动相定容后直接进样, 发现样品的重复性不好, 保留时间的重复性差, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 35.2%。原因可能是由于动物组织中含有一定量的油脂, 氮吹无法将油脂除去, 油脂的存在导致方法的重复性变差, 由于棉酚具有较强的极性, 在非极性溶剂中的溶解性差, 而油脂为非极性部分, 根据相似相容原理, 选择使用乙腈饱和的正己烷溶液对样品中的油脂进行净化, 实验结果表明经过正己烷去脂的样品的保留时间的仪器精密度良好(RSD=3.2%), 回收率也能达到 80%, 因此本实验选择将氮吹后的样品使用正己烷去脂。

3.4 基质效应

采用相对响应值法考察基质效应的影响, 即通过计算基质标准曲线斜率和标准溶液曲线斜率之比, 来评价基质效应的程度。计算公式如下:

$$ME=(k_2/k_1)\times 100\%$$

式中: ME 为基质效应, %; k_1 为空白溶液标曲斜率; k_2 为基质标曲斜率。

一般来说, 当 ME 在 80%~120% 之间时, 表明基质效应在可接受范围内, 在实际检测中可以忽略基质效应; 反之则应考虑基质效应对实际检测的影响, 在实际检测中应采用基质加标曲线代替原来溶剂配制的标准曲线。分别以纯溶剂、空白肉基质(猪肉)、空白内脏基质(猪肝)为溶剂配制 3 条标准曲线供 UPLC-MS/MS 分析。2 种基质对棉酚的 ME 分别为猪肉(126.3%) 和内脏(131.3%), 表明样品基质溶液对待测物的离子化效率存在着明显的基质增强效应, 因此需使用基质标曲定量, 以降低基质影响。

3.6 线性范围和定量限

棉酚在 0.01~0.10 mg/L 浓度范围内呈现良好的线性关系, 相关系数均大于 0.9998。其中猪肉: $Y=6936.05139X-32.76$, $r^2=0.9998$; 猪肝: $Y=7210.63775X-96.87$, $r^2=0.9999$; 鸡肉: $Y=7956.43185X-107.51$, $r^2=0.9999$; 鸡肝: $Y=8127.39436X-10.38$, $r^2=0.9999$; 在该测定条件下, 棉酚的保留时间约为 6.85 min。在空白基质中添加棉酚的定量限(limit of quantitation, LOQ) 为($S/N\geq 10$) 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.7 回收率及精密度实验

采用标准加入法, 在猪肉、鸡肉、猪肝和鸡肝添加 3 个不同浓度(LOQ、2 倍 LOQ、10 倍 LOQ)添加水平下, 进行棉酚的回收率实验, 各个浓度进行 6 个样品平行试验, 计算结果见表 2。可知本方法在空白基质中平均回收率在 83.3%~89.2% 之间, 精密度在 3.9%~7.2% 之间。结果符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范食品理化检测》^[15]

的要求,可用于动物源性食品中游离棉酚的测定。

表 2 回收率实验结果
Table 2 Resultsofrecovery test

基质	添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	RSD/%
猪肉	10	85.7	6.8
	20	88.6	7.1
	100	87.4	5.1
猪肝	10	83.3	4.9
	20	88.8	6.8
	100	87.9	4.9
鸡肉	10	89.8	5.8
	20	89.1	5.4
	100	89.2	6.8
鸡肝	10	85.8	7.2
	20	83.8	5.4
	100	87.3	3.9

3.8 实际样品测定

用本方法对在新疆与陕西收集的 40 份典型样品进行测试,其中在 2 份猪肉和 3 份猪肝样品中均检出游离棉酚,含量水平在 30~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,检出率为 20%,阳性样品的色谱图如图 2 所示。5 份检出的样品均购买自新疆的农贸市场。分析其原因可能是新疆是我国的棉花的主要产区,当地饲养者使用未脱毒或未脱毒完全的棉籽作为饲料,动物不能完全代谢棉酚,在体内蓄积残留。目前,我国尚未针对动物体内棉酚的残留量制定限量,其危害性有待于进一步评估。

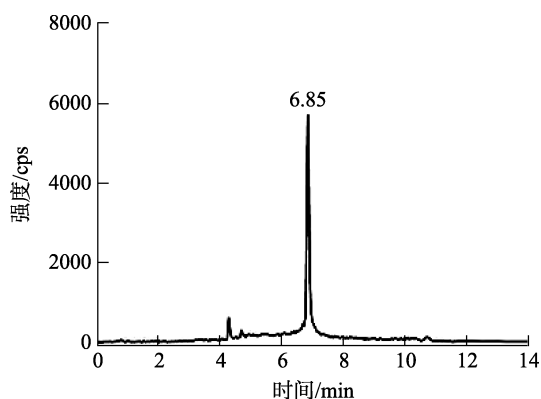


图 2 样品中棉酚的 MRM 色谱图

Fig.2 MRM chromatograms of gossypol in sample

4 结论

本研究采用乙腈对动物源性食品进行匀浆提取,通过正己烷进行脱脂净化,经超高效液相色谱-串联质谱法测定,建立了动物源性食品中游离棉酚的测定方法。该方法准确性强,重复性好,灵敏度高,可为监管部门提供有力技术支撑。

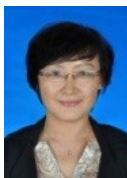
参考文献

- [1] 任丽君, 袁洁, 姚军. 柱前衍生-HPLC-MS 内标法测定动物组织中棉酚旋光异构体的含量[J]. 化学研究与应用, 2017, 29(5): 648-653.
Ren LJ, Yuan J, Yao J. Determination of the gossypol optical isomer in animal tissue by HPLC-MS internal standard method with pre-column derivatization [J]. Chem Res Appl, 2017, 29(5): 648-653.
- [2] 冯婉滢, 罗燕, 张玲, 等. 食品中棉酚的检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5623-5628.
Feng WY, Luo Y, Zhang L, et al. Research progress on the detection methods of gossypol in food [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(21): 5623-5628.
- [3] 王霞, 邹静. 棉酚对仔猪睾丸支持细胞氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(3): 312-315.
Wang X, Wu J. Influence of gossypol on oxidative stress and apoptosis in piglet sertoli cells [J]. J Hunan Agric Univ (Nat Sci Ed), 2019, 45(3): 312-315.
- [4] 曾秋风, 柏鹏. 棉酚在肉禽体内的毒性和残留及其营养对策的研究进展[J]. 动物营养学报, 2013, 25(5): 917-922.
Zeng QF, Bai P. Toxicity, residues and nutrition replenishment strategy of gossypol in table poultry [J]. Chin J Anim Nutr, 2013, 25(5): 917-922.
- [5] Knutsen HK, Lars B, Bignami M, et al. Presence of free gossypol in whole cottonseed [J]. EFSA J, 2017, 15(7): 10.2093..
- [6] 沈静, 阳胜, 于红, 等. 高效薄层色谱法测定棉籽油中游离棉酚含量[J]. 光谱实验室, 2011, 28(1): 235-238.
Shen J, Yang S, Yu H, et al. Determination of free gossypol in cottonseed oil by high performance thin-layer chromatography [J]. Spectrosc Lab, 2011, 28(1): 235-238.
- [7] 朱利民, 林鹏, 张剑. 苯胺法和间苯三酚法测定游离棉酚的比较研究[J]. 饲料工业, 2017, 38(24): 56-59.
Zhu LM, Lin P, Zhang J. Comparative study on spectrophotometric determination of free gossypol with aniline and phloroglucino [J]. Feed Ind, 2017, 38(24): 56-59.
- [8] 郭玉娟, 迪里木拉提·毛里明, 任丽君, 等. 高效毛细管电泳法检测棉籽油中游离棉酚的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(8): 1074-1076, 1080.
Guo YJ, Dilimurat M, Ren LJ, et al. Determination of free gossypol in cotton seed oil by high efficiency capillary Electrophoresis [J]. J Xinjiang Med Univ, 2017, 40(8): 1074-1076, 1080.
- [9] 周梦宇, 古丽斯坦·阿不来提, 姚军, 等. 高效液相色谱法同时测定棉籽油中游离棉酚及其降解产物四甲氧基棉酚含量[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 261-266.
Zhou MY, Gulisitan A, Yao J, et al. Simultaneous determination of free gossypol and its degradation product tetramethoxy gossypol in commercially available cottonseed oil by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2019, 40(16): 261-266.
- [10] 阳腾, 赵懿琛, 黄小贞, 等. 超高效液相测定棉酚含量方法的建立[J]. 种子, 2019, 38(11): 34-38.
Yang T, Zhao YC, Huang XZ, et al. Establishment of ultra high performance liquid chromatography method for determining gossypol content [J]. Seed, 2019, 38(11): 34-38.
- [11] 王雅朦, 郭咪咪, 魏征, 等. 食用植物油中痕量游离棉酚的超高效液相色谱-串联质谱测定[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(4): 126-132.
Wang YM, Guo MM, Wei Z, et al. Determination of free gossypol in

- edible vegetable oil by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. J China Cere Oils Assoc, 2019, 34(4): 126-132.
- [12] 袁洁, 任丽君, 李东雨, 等. UPLC-MS/MS法测定游离棉酚及其代谢产物棉酚酮在大鼠体内的组织分布[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(11): 1458-1461.
- Yuan J, Ren LJ, Li DY, *et al.* Tissue distribution of free gossypol and its metabolite gossypolone in rat determined by UPLC-MS/MS [J]. J Xinjiang Med Univ, 2017, 40(11): 1458-1461.
- [13] 张文华, 谢文, 陈树兵, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中的游离棉酚[J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 602-605.
- Zhang WH, Xie W, Chen SB, *et al.* Determination of free gossypol in feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(5): 602-605.
- [14] 刘扬, 徐晓枫, 李伟, 等. 高效液相色谱法测定食用植物油中游离棉酚含量方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20): 2924-2925, 2931.
- Liu Y, Xu XF, Li W, *et al.* Establishment of method for determination of free gossypol content in edible vegetable oil by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(20): 2924-2925, 2931.
- [15] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Laboratory quality control specifications-Food physical and chemical testing [S].

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



贾丽华, 主管药师, 主要研究方向为食品、保健食品、药品检测方法研究。
E-mail: 425664993@qq.com



王建山, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品药品质量与安全。
E-mail: 273650552@qq.com