

分散固相萃取—超高效液相色谱—四极杆/飞行时间质谱法测定禽肉中松香酸类物质

Determination of abietic acid compounds in poultry by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled with dispersive solid phase extraction

林晓君 严婉盈 何敏恒 黄嘉乐

LIN Xiaojun YAN Wanying HE Minheng HUANG Jiale

伍依琪 叶玲 张瑞瑞

WU Yiqi YE Ling ZHANG Ruirui

(广州检验检测认证集团有限公司国家加工食品质量监督检验中心〔广东〕, 广东 广州 511447)

(Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Co., Ltd., National Quality Testing Center for Processed Food [Guangdong], Guangzhou, Guangdong 511447, China)

摘要:目的:建立超高效液相色谱—四极杆/飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS)测定禽肉中松香酸类物质。方法:样品使用乙腈提取,盐析分层后,上清液由 C₁₈ 固相萃取剂净化,UPLC-Q-TOF/MS 电喷雾负离子模式测定。结果:3 种松香酸类物质在 10~500 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好,相关系数 $R^2 > 0.998$,平均回收率为 87.8%~98.5%,相对标准偏差(RSDs)为 1.99%~6.71% ($n=6$);方法检出限(LODs)为 10 μg/kg,方法定量限(LOQs)为 20 μg/kg。结论:试验方法操作简便,快捷,回收率和灵敏度高,精密度好,能够满足禽肉中 3 种松香酸类物质的检测需求。

关键词:分散固相萃取;超高效液相色谱—四极杆/飞行时间质谱;禽肉;松香酸

Abstract: **Objective:** An ultra performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) method was established for the determination of abietic acids in poultry. **Methods:** The samples were extracted with acetonitrile, then salted out and stratified. The supernatant was purified by C₁₈ solid phase extractant and finally determined by UPLC-Q-TOF/MS in ESI negative mode.

基金项目:广州市市场监督管理局科技项目(编号:2022kj49);广州检验检测认证集团有限公司科技项目(编号:2022kj02GZ)

作者简介:林晓君(1995—),女,广州检验检测认证集团有限公司助理工程师。E-mail: 1611691126@qq.com

收稿日期:2022-12-30 **改回日期:**2023-05-17

Results: Abietic acid compounds exhibited a good linear relationship in the concentration range of 10~500 μg/L with good correlation coefficient $R^2 > 0.998$. The average recoveries of three abietic acid compounds were experiments, the average recovery rate was 87.8%~98.5% with relative standard deviations (RSDs, $n=6$) of 1.99%~6.71%, at the spiked level of 20, 40, 200 μg/kg. The limits of detection (LODs) were 10 μg/kg and the method limits of quantification (LOQs) were 20 μg/kg. **Conclusion:** This method was convenient operation, rapid, high recovery and sensitivity and good precision that could meet the determination requirements of three abietic acids in poultry.

Keywords: dispersive solid phase extraction; UPLC-Q-TOF/MS; poultry; abietic acid

松香是一种天然树脂,由松树的含油树脂加工制得,通过进一步分离纯化可以得到松香酸类化合物,主要为松香酸、脱氢松香酸和海松酸,被应用于药品、包装材料、油墨和涂料等工业领域^[1]。同时,松香酸也可以被应用于皮肤病治疗中,对治疗不同类型的银屑病有一定的成效^[2]。松香还具有较好的黏附性,可用于畜禽脱毛,但畜禽表皮和肌肉中可能残留。有研究显示,松香酸能抑制水蚤和虹鳟鱼等生物的生长发育^[3],对人体肺泡细胞、上皮细胞、成纤维细胞、红细胞和多核白细胞具有毒性作用^[4-5]。GB 2760—2014 规定,松香酸甘油酯可作为添加剂使用,但松香不允许使用,因此建立对松香酸类物质的

相关检测方法,对保障消费者的健康安全尤其重要。

目前,有关禽肉中违法添加物的检测方法主要集中于液相色谱法^[6-8]、气相色谱法^[9]、液相色谱—串联质谱法^[10-14]、气相色谱—质谱法^[15]和酶联免疫法^[16]等。其中色谱法选择性低,检出限高,对于基质复杂的样品,分离难度大,容易影响分析结果;酶联免疫法灵敏度高、且有较强的特异性^[17-18],但操作过程繁琐,对于多组分化合物的检测存在一定的局限性;质谱法具有高通量、选择性高、灵敏度高的特点。研究拟以分散固相萃取技术为基础,建立高分辨四极杆/飞行时间质谱法测定禽肉中的松香酸类物质,利用基质曲线校正结果,准确定性定量,以为禽肉中违法添加物的分析筛查技术研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

禽肉:市售;

松香酸、脱氢松香酸、海松酸标准品:纯度 $\geq 96.0\%$,上海安谱实验科技股份有限公司;

氨水、甲酸铵、甲酸、乙腈、乙酸乙酯、甲醇:HPLC级,美国赛默飞公司;

十八烷基键合硅胶(C_{18})、N-丙基乙二胺(PSA)、石墨化碳黑(GCB)、氨丙基键合硅胶(NH_2)固相萃取剂、中性氧化铝(CNW)、氯化钠、无水硫酸镁:分析纯,上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

高分辨质量飞行时间质谱仪:API5600+型,美国 AB SCIEX 公司;

液相色谱系统:LC-30AD 型,日本岛津公司;

超纯水系统:Milli-Q Advantage A10 型,法国默克密理博公司;

高速离心机:4k-15 型,德国西格玛公司;

多管漩涡振荡器:Multi Reax 型,德国海道夫公司;

色谱柱:Xbridge BEH C_{18} (100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.5 μm),沃特世科技(上海)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制 准确称取松香酸、脱氢松香酸和海松酸标准品,用乙腈溶解并定容,单标储备液质量浓度为 1 000 mg/L,混合标准液质量浓度为 10 mg/L。用空白基质液稀释成各级质量浓度为 10, 20, 50, 100, 200, 500 $\mu g/L$ 的标准曲线。

1.3.2 前处理条件优化 称取 5.0 g 搅碎后的样品,分别加入 10 mL 水和 10 mL 乙腈,涡旋振荡 30 s,分别加入无水硫酸镁 4 g 和氯化钠 1 g,涡旋震荡 20 min,于高速离心机中以 8 000 r/min 的速度离心 10 min。移取 1 mL 上层乙腈相于 2 mL 离心管中,分别加入 100 mg C_{18} 固相萃取

剂,涡旋振荡 2 min,再以 12 000 r/min 速度离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 有机滤膜,待测。

1.3.3 检测条件

(1) 色谱条件:流动相 A 相为乙腈,B 相为 0.1% 氨水,流速 0.5 mL/min;进样体积 10 μL ;柱温 40 $^{\circ}C$;梯度洗脱程序:0~2 min, 5% A;2~11 min, 5%~95% A;11~16 min, 95% A;16~16.5 min, 95%~5% A;16.5~20 min, 5% A。

(2) 质谱条件:采用电喷雾电离(电离源)和大气压化学电离(校正源)复合源测定,负离子模式;一级(TOF)扫描质量范围 50~1 000 Da;二级扫描质量范围 50~1 000 Da;校正液流速 0.5 mL/min;气帘气 241.3 kPa;雾化气 310.3 kPa;加热辅助气 344.7 kPa;脱溶剂气温度 500 $^{\circ}C$;离子源喷射电压-4 500 V;去簇电压-90 V;碰撞能量(-60 $\pm$ 15) eV;TOF-IDA-MS 监测模式;每 10 个样品进行一次自动校正,以确保系统在批内的精准质量数稳定。

1.3.4 基质效应 对试验所选样品进行批量测定,选择空白样品,处理后制得基质液,分别用空白基质液和乙腈配制等浓度标准溶液,以丰度比例为评判依据,考察基质效应。

1.3.5 加标回收试验 通过低浓度加标,以 10 倍信噪比为基准,测得方法的定量限。向阴性样品中加入混合标准溶液,使样品质量分数为定量限的 1, 2, 10 倍,做 6 组平行试验,进行测定后,统计结果,计算回收率和相对标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

负模式条件下,流动相使用乙腈-0.1% 氨水、乙腈-水、乙腈-5 mmol/L 甲酸铵和乙腈-0.1% 甲酸 4 种不同的体系,考察松香酸、脱氢松香酸和海松酸 3 种化合物的母离子丰度。结果发现,乙腈-0.1% 氨水作为流动相时,3 种化合物的母离子丰度最高,是其他 3 种流动相的 3 倍以上,这是由于海松酸、松香酸和脱氢松香酸均含有羧基结构,因此在离子化过程中,容易失去质子,形成稳定的 $[M-H]^{-}$ 负离子。负模式下乙腈-0.1% 氨水体系所得的丰度仍为正模式下的 3 倍左右。因此,最终选择乙腈-0.1% 氨水体系为流动相,负模式条件下测定,通过调节梯度洗脱程序,使同分异构体松香酸和海松酸达到基线分离(见图 1)。

2.2 质谱条件及参数

ESI 负模式下,扫描海松酸、松香酸和脱氢松香酸的一级母离子 $[M-H]^{-}$,获得 m/z 299.201 7 和 m/z 301.217 3(松香酸、海松酸互为同分异构体)。调节去簇电压(DP)和碰撞电压(CE)优化母离子及二级碎片离子

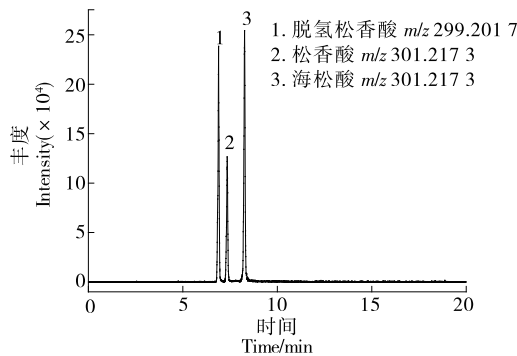


图 1 3 种目标物的提取离子流色谱图

Figure 1 Extraction ion chromatogram of three compounds

的丰度以达到最佳。由于离子的精确质量分数即可用于定性,因此使用母离子定性定量,丰度较高的二级碎片辅助参考定性。具体质谱参数见表 1。

表 1 脱氢松香酸、松香酸和海松酸的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of dehydroabietic acid, abietic acid and pimaric acid

化合物	母离子理论 值(m/z)	母离子实测 值(m/z)	主要二级碎 片(m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)
脱氢松香酸	299.201 7	299.201 0	115.945 5 61.955 2	-2.3
松香酸	301.217 3	301.217 2	76.973 4 178.904 1	-0.5
海松酸	301.217 3	301.217 2	85.033 1 178.904 2	-0.5

2.3 提取溶剂的选择

试验初期对比了甲醇、乙腈和乙酸乙酯的提取效果,以 100 $\mu\text{g/L}$ 的加标水平的回收率为判定依据。由图 2 可知,甲醇对脱氢松香酸、松香酸和海松酸 3 种化合物的提取率较低,只有 50% 左右,可能是由于甲醇与水混溶后,在加入盐的情况下未析出,导致提取液杂质较多,且基质效应严重,而乙酸乙酯回收率与甲醇的相当,可能是由于乙酸乙酯极性较低,目标化合物具有羧基结构,可与水形成氢键,因此与乙酸乙酯具有一定的极性差异,导致提取不充分。乙腈对 3 种化合物均有较好的回收率,提取分层后,杂质也较少,因此最终选择乙腈为提取溶剂。

2.4 固相萃取剂的选择

为了选择合适的固相萃取剂进行净化,选择 100 mg 的 C_{18} 、GCB、 NH_2 、PSA 和中性氧化铝 5 种不同类型的固相萃取剂进行对比,探究其对脱氢松香酸、松香酸和海松酸 3 种化合物回收率的影响。由图 3 可知,由于目标物含有羧基极性基团, NH_2 、PSA 中的 N 能对极性基团产

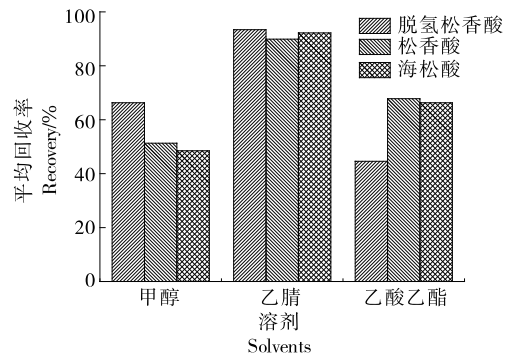


图 2 不同溶剂的回收率结果

Figure 2 Recovery results for different solvents ($n=6$)

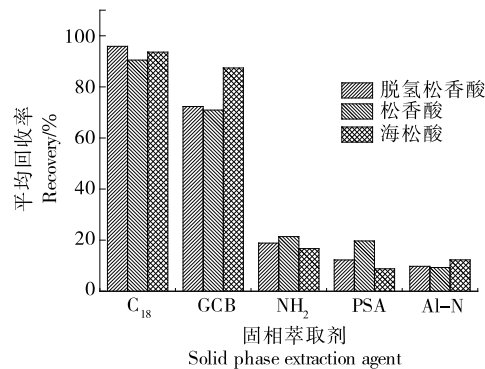


图 3 不同固相萃取剂的回收率结果

Figure 3 Recovery results for different solid phase extractants ($n=6$)

生较强的吸附,而中性氧化铝则具有较高的活性,对极性基团也有较强的吸附,回收率均低于 20%,因此不能使用此 3 种固相萃取剂进行净化。而 GCB 的回收率可以达到 70% 以上, C_{18} 的能达到 90% 以上,由于 GCB 对含有平面结构的化合物也有一定的吸附,因此回收率仍不够理想, C_{18} 为烷基结构,与目标物之间的极性作用力不强,因此吸附也较少。最终选择 C_{18} 为固相萃取剂。

2.5 提取时间的选择

对比 10, 15, 20, 25, 30 min 下不同提取时间对目标物回收率的影响。一般在目标物受热不分解的情况下,提取时间越长,回收率越高,当提取时间为 20 min 时,脱氢松香酸、松香酸和海松酸的回收率均在 90% 以上。当涡旋时间 > 20 min 时,回收率的上升趋势减小,为了节省时间,提高效率,选择 20 min 为最适提取时间。

2.6 基质效应

由于禽肉搅碎后,组织中大量的蛋白质、脂肪、氨基酸等杂质会被释放,可能会产生严重的基质效应。分别使用鸡、鸭、鹅 3 种空白基质液和乙腈,配制 100 $\mu\text{g/L}$ 脱氢松香酸、松香酸和海松酸的混合标准溶液,通过仪器测定丰度,计算出基质标准丰度值与纯溶剂标准的丰度比值,以评判基质效应。由表 2 可知,不同基质中,脱氢

表 2 基质效应试验结果

化合物	鸡	鸭	鹅
脱氢松香酸	80.9	69.1	67.6
松香酸	82.1	72.6	70.7
海松酸	83.0	72.1	71.1

松香酸、松香酸和海松酸的丰度均为抑制,且抑制程度小于纯溶剂标准的 90%,说明基质负效应明显,因此使用基

质曲线进行定量计算。

2.7 线性参数及方法灵敏度

使用不同禽类的空白基质液配制混合标准曲线,用仪器测得丰度。以质量浓度为横坐标,母离子丰度为纵坐标进行方程拟合,曲线方程及拟合的相关系数见表 3。由表 3 可知,曲线方程的相关系数较大,说明方程线性良好,通过信噪比的 3,10 倍,测得方法检出限和定量限分别为 10,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。方法的定量能力和灵敏度可满足一般样品的测定要求。

表 3 基质曲线方程及灵敏度数据

化合物	基质	曲线方程	R^2	检出限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
脱氢松香酸	鸡	$Y=1\ 695.3X+9\ 987.3$	0.999 4	10	20
	鸭	$Y=1\ 318.3X+7\ 112.3$	0.999 4	10	20
	鹅	$Y=829.96X+1\ 889.4$	0.999 9	10	20
松香酸	鸡	$Y=1\ 671.84X+6\ 674.1$	0.999 3	10	20
	鸭	$Y=1\ 289.7X+5\ 632.9$	0.999 0	10	20
	鹅	$Y=808.24X+989.33$	0.998 3	10	20
海松酸	鸡	$Y=1\ 951.6X+12\ 098$	0.999 6	10	20
	鸭	$Y=1\ 543.5X+7\ 892.1$	0.998 9	10	20
	鹅	$Y=937.42X+2\ 645$	0.999 1	10	20

2.8 方法回收率及精密度

选择基质影响最严重的鹅肉进行加标回收试验,选取阴性样品,以方法定量限的 1,2,10 倍浓度进行加标。由表 4 可知,不同水平的平均回收率为 87.8%~98.5%,相对标准偏差(RSD)为 1.99%~6.71%,说明方法回收率及精密度适用于一般禽肉中脱氢松香酸、松香酸和海松酸的测定。

表 4 回收率及相对标准偏差结果

化合物	添加水平/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	平均回收率/ %	相对标准偏差/ %
脱氢松香酸	20	87.8	6.71
	40	81.2	3.69
	200	92.8	2.41
松香酸	20	88.1	3.72
	40	91.1	2.23
	200	97.3	2.04
海松酸	20	98.5	1.99
	40	94.8	4.30
	200	98.1	2.94

2.9 方法的实际应用

随机选择市售的 30 个禽肉样品进行测定,每个样品 6 次平行,鸡、鸭、鹅各 10 个,所有基质均未检出海松酸。1 个鹅肉检出松香酸,含量为 0.58 mg/kg ,对阳性样品再次检测后,含量与此检测相比,偏差均小于 5%,说明其可能是由松香酸甘油酯分解产生,根据含量可排除非法使用松香的风险。

3 结论

采用乙腈对禽肉中的脱氢松香酸、松香酸和海松酸进行了提取,使用 C_{18} 固相萃取剂进行净化,同时使用基质曲线对定量结果进行校正,回收率达到 90%以上;在优化的梯度洗脱条件下,3 种化合物在 10 min 内完全出峰,同分异构体松香酸和海松酸完全基线分离,且峰型良好;结合高分辨飞行时间质谱测得所有离子的相对分子质量,对目标物准确定性定量;方法学数据表明,回收率、检出限、精密度均适用于一般禽肉样品的测定。

试验针对不同的禽肉基质,分别配制基质曲线进行定量,虽然能准确定量,但处理过程仍较繁琐,且不同禽肉的部位,基质组成不一样,造成的基质效应程度也可能不一样。后续建议通过前处理衍生、同位素稀释或微萃取等处理手段来降低基质效应的影响。

参考文献

- [1] 马晓霖, 胡琳莉, 李水清, 等. 松香及其衍生物的应用研究进展[J]. 广州化工, 2019, 47(24): 37-40.
MA X L, HU L L, LI S Q, et al. Research progress on application of rosin and its derivatives[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2019, 47(24): 37-40.
- [2] 刘满军, 石会丽, 牛安琦, 等. 松香酸钠化学合成及毒性研究[J]. 广东化工, 2021, 48(19): 34-35.
LIU M J, SHI H L, NIU A Q, et al. Study on rosin acid sodium chemical synthesis and toxicity[J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(19): 34-35.
- [3] KAMAYA Y, TOKITA N, SUZUKI K, et al. Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 61(1): 83-88.
- [4] PENG G M, ROBERTS J C. Solubility and toxicity of resin acids[J]. Water Research, 2000, 34(10): 2 779-2 785.
- [5] AYARS G H, ALTMAN L C, FRAZIER C E, et al. The toxicity of constituents of cedar and pine woods to pulmonary epithelium[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1989, 83(3): 610-618.
- [6] LIU J J, LIU M G, LI X, et al. Development of ultrasonic-assisted closed in-syringe extraction and derivatization for the determination of labile abietic acid and dehydroabietic acid in cosmetics [J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1 371(12): 20-29.
- [7] ZHU Y, ZHANG S, GENG Z, et al. Simultaneous determination of abietic acid and dehydroabietic acid residues in duck meat by HPLC-PAD-FLD[J]. Food Anal Meth, 2014(7): 1 627-1 633.
- [8] 司丽丽, 张威, 王丰收. 高效液相色谱法测定妥尔油脂脂肪酸中松香酸含量[J]. 日用化学品科学, 2020, 43(4): 46-48.
SI L L, ZHANG W, WANG F S. Determination of abietic acid in tall oil fatty acid by high performance liquid chromatography[J]. Detergent & Cosmetics, 2020, 43(4): 46-48.
- [9] EKEBERG D, FLÄTE P O, EIKENES M, et al. Qualitative and quantitative determination of extractives in heartwood of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by gas chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1 109(2): 267-272.
- [10] PAVEL C, RICHARD C, KAMIL K, et al. Determination of short-term changes in levoglucosan and dehydroabietic acid in aerosols with condensation growth unit-aerosol counterflow two-jets unit-LC-MS[J]. Chemosphere, 2018, 210(11): 279-286.
- [11] 刘益庆, 钱明明, 卢洋, 等. 消肿片中松香酸的 HPLC 和 UPLC-MS/MS 检测方法研究[J]. 中国药师, 2020, 23(12): 2 502-2 505.
LIU Y Q, QIAN M M, LU Y, et al. Detection of abietic acid in Xiaozhong tablets by HPLC and UPLC-MS/MS [J]. China Pharmacist, 2020, 23(12): 2 502-2 505.
- [12] 张毅, 罗耀, 温景岚. 液相色谱—串联质谱法测定畜禽肌肉和表皮组织中松香酸、脱氢松香酸和胡椒酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(18): 6 424-6 430.
ZHANG Y, LUO Y, WEN J L. Simultaneous determination of abietic acid, dehydroabietic acid and piperic acid in muscle and skin tissue of livestock and poultry by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Food Saf and Qual, 2020, 11(18): 6 424-6 430.
- [13] 沈金灿, 黄昌雄, 肖陈贵, 等. 液相色谱—串联质谱法测定畜禽表皮中松香酸和脱氢松香酸[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 275-280.
SHEN J C, HUANG C X, XIAO C G, et al. Simultaneous determination of abietic acid and dehydrogenated abietic acid in livestock and poultry skin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Sci, 2021, 42(12): 275-280.
- [14] 向俊, 唐万里, 刘慧, 等. 湖南省各地区畜禽肉中磺胺类药物残留情况分析[J]. 食品与机械, 2020, 36(9): 82-86, 107.
XIANG J, TANG W L, LIU H, et al. Detection and analysis of sulfonamides residues in meat poultry in Hunan province[J]. Food & Machinery, 2020, 36(9): 82-86, 107.
- [15] GELMINI F, BERETTA G, ANSELMINI C, et al. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary *in vivo* evaluation of its psoriatic effect[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 440(2): 170-178.
- [16] 仇新媛, 姚忠, 耿志明, 等. 酶联免疫吸附测定法检测白条鸭表皮组织中的脱氢松香酸[J]. 肉类研究, 2019, 33(12): 45-49.
CHOU X Y, YAO Z, GENG Z M, et al. Determination of dehydroabietic acid in duck skin by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Meat Res, 2019, 33(12): 45-49.
- [17] YANG F, WANG H, YANG J, et al. An indirect competitive immunoassay for analysis of carminic acid in meat products[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(11): 3 687-3 693.
- [18] LIN L, JIANG W, XU L G, et al. Development of IC-ELISA and immunochromatographic strip assay for the detection of flunixin meglumine in milk[J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 193-203.