

高效液相色谱-串联质谱法测定甘蔗中的 3-硝基丙酸含量

岳亚军*, 黄婷

(深圳市罗湖区疾病预防控制中心, 深圳 518020)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法(high liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)检测甘蔗中的 3-硝基丙酸含量。**方法** 样品经乙腈提取, 经 Sep-pak 氨基柱固相萃取净化, 再经 Merck seQuant™ Zic-Hilic(150 mm×2.1 mm, 5 μm)色谱柱分离, 以 10 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾负离子(electrospray ionization, ESI-)模式进行 HPLC-MS/MS 测定。**结果** 3-硝基丙酸在 0.005~0.1 mg/L 浓度范围内呈良好的线性关系, 工作曲线的回归方程为 $Y=4.48X+46.72$, 相关系数为 0.9994, 该方法的检出限为 0.0036 mg/kg, 定量限为 0.0119 mg/kg。在 0.02、0.08 和 0.1 mg/kg 加标水平下, 3-硝基丙酸的平均回收率为 80.0%~96.8%, 相对标准偏差为 1.90%~8.69%($n=6$)。**结论** 本方法快捷、灵敏度高、结果准确, 可适用于甘蔗中的 3-硝基丙酸的检测。

关键词: 3-硝基丙酸; 固相萃取; 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 3-nitropropionic acid in sugarcane by high liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YUE Ya-Jun*, HUANG Ting

(Luohu Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 3-nitropropionic acid (3-NPA) in sugarcane by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted with acetonitrile, cleaned by solid phase extraction column of Sep-pakan NH₂, separated by the column of Merck seQuant™ Zic-Hilic (150 mm×2.1 mm, 5 μm) with 10 mmol/L ammonium formate-0.1% formic acid and acetonitrile as mobile phase for gradient elution, and detected by HPLC-MS/MS with the mode of electrospray ionization (ESI-). **Results** 3-NPA had a good linear relationship in the range of 0.005~0.1 mg/L with the correlation coefficient of 0.9994, and the regression equation was $Y=4.48X+46.72$. The limit of detection was 0.0036 mg/kg, and the limit of quantification was 0.0119 mg/kg. The average recoveries spiked at 3 levels of 0.02, 0.08 and 0.1 mg/kg were 80.0%~96.8% with relative standard deviations of 1.90%~8.69% ($n=6$). **Conclusion** The established method is rapid, sensitive and accurate, which is suitable for the determination of 3-nitropropionic acid in sugarcane.

KEY WORDS: 3-nitropropionic acid; solid phase extraction; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*通讯作者: 岳亚军, 副主任技师, 主要研究方向为食品卫生和生物毒素的检测。E-mail: yueyajun1978@126.com

*Corresponding author: YUE Ya-Jun, Associate Chief Technician, Luohu Center for Disease Control and Prevention, No.25, Beili South Road, Shenzhen 518020, China. E-mail: yueyajun1978@126.com

1 引言

3-硝基丙酸(3-nitropropionic acid, 3-NPA)是由病原菌节菱孢菌和米曲霉菌等所产生的毒性代谢产物,主要来源于霉变的甘蔗。3-NPA 是白色结晶化合物,溶于甲醇、水、乙腈及丙酮等溶剂。3-NPA 是一种强烈的嗜神经毒素^[1-4],会损害中枢神经系统^[5-7]。食用变质的甘蔗会引起呕吐、腹泻甚至抽搐、昏迷,重症患者往往留有后遗症^[8,9]。

中国是甘蔗生产大国,广泛种植于福建、广东和海南等南方热带地区。甘蔗中毒容易发生在我国北方各省冬春季节,2、3月份为发病高峰期。春天的甘蔗多为冬季的存货,由于储存不当甘蔗极易变质,食用后会导致中毒。3-NPA 对小鼠的半致死量(half lethal dose, LD₅₀)为 50 mg/kg^[10,11],但国家标准还未确定 3-NPA 对人的致死量。

目前 3-NPA 检测方法主要包括薄层色谱法^[12]、气相色谱法、气相色谱-串联质谱法及高效液相色谱法^[13-15]等。薄层色谱法灵敏度不高,只能半定量;气相色谱法需要衍生,操作较为繁琐;甘蔗基质复杂、干扰成分多,若 3-NPA 与干扰成分不能有效分离,则会影响回收率,且对仪器造成污染。在 WST 10-1996《变质甘蔗食物中毒诊断标准及处理原则》^[16]的附件中有薄层色谱法,但还没限值规定。本研究旨在优化固相萃取技术和前处理条件以提取和富集甘蔗中的 3-NPA,采用高效液相色谱-串联质谱仪对 3-NPA 进行测定,以期为甘蔗中的 3-硝基丙酸(3-NPA)的定性定量检测提供参考。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1200 series LC-MS/MS Triple Quad (QQQ) 6410B 型液质联用仪(美国安捷伦公司),3K30 型高速低温离心机(美国 Sigma 公司),Turbo Vap II 定量浓缩仪(美国 Biotage 公司),Sep-pak 氨基柱(500 mg/3 mL, Waters 公司)。

甲醇、甲酸(Merck, 色谱纯)、乙腈(TEDIA, 色谱纯)、甲酸铵(Alfa Aesar, 色谱纯)、氨水(分析纯, 广东光华化学)。3-NPA(纯度 97.0%, Sigma 公司)。

新鲜甘蔗(购于海南)、盒装甘蔗汁(购自杨协成(上海)有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

3-NPA 标准储备液的配制:称取标准品 10.0 mg,用甲醇溶解后转移至 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容,配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液,于 4 °C 条件下保存。

3-NPA 标准使用液的配制:取上述标准储备液 10 μL 置于 10 mL 容量瓶中。用 95%乙腈定容,配制成 1000

ng/mL 的标准使用液。

2.2.2 仪器条件

(1) 色谱条件

Merck seQuant™ Zic-Hilic 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 5 μm)。流速为 0.4 mL/min,流动相 A: 10 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水,流动相 B: 95%乙腈;柱温 40 °C;进样体积 5 μL;梯度洗脱见程序表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0.00	5.00	95.00
4.00	95.00	5.00
4.1	5.00	95.00
7.00	5.00	95.00

(2) 质谱条件

多重态反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)。干燥气温度 350 °C,干燥气流量 10 L/min,雾化器压力 38.0 psi;3-NPA 的母离子、子离子及其他参数如表 2;3-NPA 的一级质谱图和二级质谱图见图 1~2。

表 2 3-NPA 的 MRM 质谱参数

Table 2 MRM parameters of mass spectrometry of 3-NPA

物质	离子模式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)	碎片电压 (V)
3-NPA	(ESI-)	118.0	46.0	5.0	70.0

2.2.3 样品前处理

(1) 提取

取 2 g 甘蔗汁于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 乙腈溶液,振摇 30 min 后离心 10 min。取上清液,过滤。

(2) 净化

氨基固相萃取柱用 3 mL 95%乙腈活化后,取 5 mL 试样溶液过柱,4 mL 10%甲醇水溶液淋洗,再用 3 mL 10%氨水甲醇洗脱,收集洗脱液,用氮气吹扫仪将洗脱液于 55 °C 水温中吹干,用 95%乙腈水溶液定容至 1 mL。待上机检测。

(3) 定性及定量

在 2.2.2 仪器条件下测定基质加标溶液及样品溶液。目标化合物以保留时间和特征离子定性。要求被测样品溶液中的目标化合物与标准溶液中目标化合物的保留时间及相对离子丰度保持一致(偏差小于±20%)。以标准溶液浓度对特征离子峰面积绘制标准曲线,外标法定量。样品中待测 3-NPA 的含量按下述公式计算:

$$X = \frac{C \times V}{1000 \times m} \times f$$

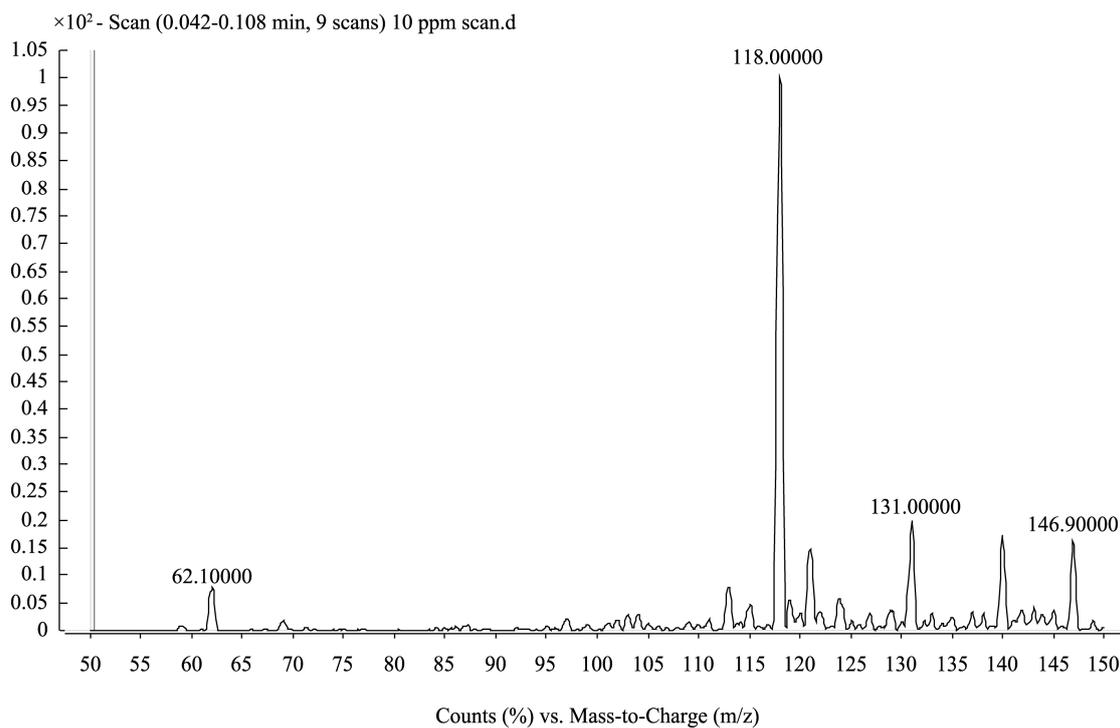


图 1 3-NPA 的一级质谱图

Fig. 1 Primary mass spectrogram of 3-NPA

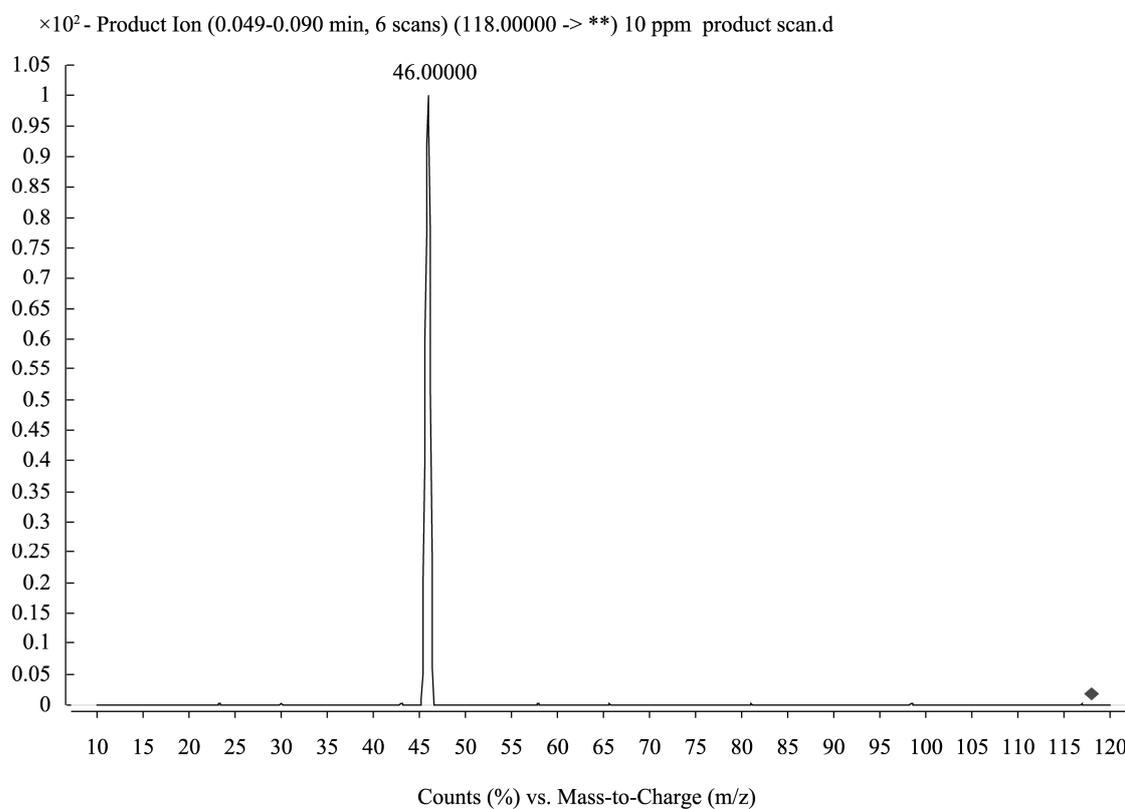


图 2 3-NPA 的二级质谱图

Fig. 2 Secondary mass spectrogram of 3-NPA

式中: X —样品中 3-NPA 的含量(mg/kg); C —测定液中 3-NPA 的浓度(ng/mL); V —待测样品定容体积(mL), f —样品提取液浓缩倍数($f=2$)。

2.2.4 基质加标工作曲线的配制

(1)甘蔗

取 6 份 2 g 捣碎后的甘蔗于 50 mL 的离心管中, 加入 10 mL 乙腈提取。分别加入 1000 ng/mL 标准工作液 0、10、20、40、80 和 100 μ L, 加入 1 g NaCl, 振荡 30 min, 于 10000 r/min 离心机中离心 10 min, 取 5 mL 上清液, 过柱后上机测定, 制成浓度为 0、10、20、40、80、100 μ g/L 的工作曲线。另取 2 g 氧化后红色的甘蔗作为样品, 仪器测定。

(2)甘蔗汁

另取甘蔗饮料作为样品, 重复上述实验。

2.3 实际霉变样品的检测

对 5 份新鲜甘蔗、5 份氧化后质地是红色的甘蔗和 5 份盒装甘蔗饮料分别进行检测。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

选择不同的色谱柱(BEH C_{18} 柱和 HILIC 柱), BEH C_{18} 柱对极性较弱物保留较强, 不适合分离极性物质。甘蔗中其他非极性杂质会在 C_{18} 中保留。3-NPA 具有较强的酸性和极性, 在 BEH C_{18} 柱上保留较弱, 因此不选择 BEH C_{18} 柱。Merck seQuantTM Zic-Hilic (150 mm \times 2.1 mm, 5 μ m) 可以直接分离极性和亲水型化合物, 其多价硅胶上共价键合着两性离子官能团, 因此会选择性地保留目标物, 具有很好的选择性和稳定性。

3.2 样品洗脱溶剂的选择

标准工作液经 Sep-pak 氨基柱提取后 3-NPA 的回收率为 21%。这个值偏低, 原因可能是流出液中携带有 3-NPA, 洗脱液中的氨水可能破坏 3-NPA 的结构, 导致回收率偏低。针对以上可能原因, 可以设计以下实验。

3.2.1 分步截留收集液中 3-硝基丙酸的回收率

收集上样流出液、淋洗流出液和前 5 mL 洗脱液、后 5 mL 洗脱液和 1 μ g/mL 的标准工作液上机测定。测定结果是上柱液和清洗液都不出峰, 可认为是目标物固定在氨基柱上, 没有流失, 即回收率是 100%。而前 5 mL 洗脱液、后 5 mL 洗脱液中有目标物的峰型, 但回收率不高, 分别是 20%、19.5%。则认为可能是氨水破坏了 3-NPA。

3.2.2 不同浓度的氨水-甲醇溶液洗脱后对 3-硝基丙酸回收率的影响

取 0、5%、10%、15%、20%的氨水-甲醇溶液分别作为洗脱液, 按照 3.2.1 的步骤处理后得出结果。

通过每个浓度液的峰型, 计算出相对回收率, 并用其来表示不同浓度的氨水-甲醇对 3-NPA 的洗脱效率。经计算,

每个浓度的氨水-甲醇溶液对应的相对回收率分别为 0、44.8%、69.5%、60.3%和 17.1%。氨水-甲醇溶液的浓度为 10%时对 3-NPA 的洗脱效率最高, 损失最少, 相对回收率是 69.5%。当氨水-甲醇溶液浓度大于 10%时, 3-NPA 的相对回收率呈逐渐下降趋势。

3.2.3 不同浓度的氨水-甲醇溶液浸泡标准工作液后对 3-硝基丙酸的损耗

取 3 mL 的 5%、10%、15%、20%和 25%的氨水-甲醇溶液分别浸泡 1 mL 的标准工作液 5 min 后, 氮吹至干, 用 1 mL 的 95%乙腈定容, 上机检测。根据 1 mL 标准液的峰面积, 可计算出相应的回收率。

氨水-甲醇含量为 5%和 10%时对 3-NPA 的浸泡损失最少, 损耗量为 42.9%、45.1%。随着氨水浓度的升高, 3-NPA 的损失越高。结合 3.2.2 的实验结果, 10%的氨水-甲醇溶液对目标物的洗脱效率最高, 所以最终选择 10%的氨水-甲醇溶液作为洗脱液。

3.3 方法回收率和精密度

由于 3-NPA 是难以提取且易分解的物质, 因此选择低温高速离心法来净化提取液并且采用 10%的氨水-甲醇溶液作为洗脱液使其损失最少。按照 2.2.3 进行提取、净化和浓缩, 获得不同浓度下的色谱峰面积, 以质量浓度(X , μ g/L)对峰面积(Y)进行线性拟合。线性范围是 0.005~0.1 mg/L, 线性方程为 $Y=4.48X+46.72$, 线性相关系数 r 为 0.9994。以信噪比 $S/N=3$ 计算检出限(limit of detection, LOD), 以 $S/N=10$ 计算定量限(limit of quantification, LOQ)。该方法的 LOD、LOQ 为 0.0036 mg/kg 和 0.0119 mg/kg。

取 6 支 50 mL 离心管, 其中 3 支离心管分别加入 2 g 甘蔗残渣, 另外 3 支离心管分别加入 2 g 甘蔗汁, 分别加入 1000 ng/mL 3-NPA 标准溶液 20、80、100 μ L, 进行提取、净化、浓缩等操作, 上机检测, 每个加标样品重复进样 6 次。计算平均回收率及相对标准偏差($n=6$), 结果见表 3。

3.4 实际样品检测

实验结果表明, 3 种甘蔗样品中 3-NPA 的含量由高到低为: 霉变甘蔗 > 甘蔗汁 > 新鲜甘蔗(见表 4)。盒装甘蔗饮料样品中 3-NPA 含量较低, 可能是因为饮料中甘蔗汁浓度被稀释不高的原因; 新鲜甘蔗中 3-NPA 的含量在 0.005 mg/kg 左右, 可能是 3-NPA 在新鲜甘蔗中的本底水平; 霉变甘蔗的 3-NPA 含量最高, 是新鲜甘蔗的几十倍。

4 结论

本研究应用高效液相色谱-串联质谱法对甘蔗中 3-NPA 进行测定, 在 5 份氧化甘蔗中检出有 3-NPA, 判断其为 3-NPA 且含量超出定量限, 食用会引起中毒。3-NPA 具有酸性, 洗脱液中的氨水可能会与其发生酸碱反应, 导致工作液过固相萃取小柱后损耗较多。通过对色谱柱、洗脱

表 3 方法回收率及精密度($n=6$)
Table 3 Recoveries and RSD ($n=6$)

样品	加标水平(mg/kg)	平均测定值(mg/kg)	平均回收率(%)	RSD(%)
甘蔗	0.02	0.01601	80.0	6.96
	0.08	0.07204	90.0	8.69
	0.1	0.08961	89.60	4.0
甘蔗汁	0.02	0.01666	83.31	4.89
	0.08	0.07316	91.45	3.70
	0.1	193.67	96.83	1.90

表 4 样品分析结果
Table 4 Results of samples

新鲜甘蔗 3-NPA 含量(mg/kg)	盒装甘蔗饮料 3-NPA 含量(mg/kg)	霉变甘蔗 3-NPA 含量(mg/kg)
0.0054	0.0050	0.091
0.0032	0.0081	0.010
0.0044	0.0080	0.12
0.0044	0.0079	0.13
0.0050	0.0087	0.12

溶剂的优化, 最终确定用 10%的氨水-甲醇溶液作为洗脱液, 以 ZIC-HILIC 色谱柱分离样品。另外, 甘蔗含糖量高, 基质复杂, 可采用基质匹配工作曲线来消除基质效应。

3-NPA 来源于霉变的甘蔗, 过量食用会引起食物中毒。本研究所建方法准确可靠、灵敏度高, 能为甘蔗食品中 3-NPA 的检测及有关食物中毒和临床救治提供技术参考。

参考文献

- [1] 陈晓明, 胡文娟, 陈君石, 等. 天然毒素 3-硝基丙酸的研究现状[J]. 国外医学卫生学分册, 1998, 17(3): 158-161.
Chen XM, Hu WJ, Chen JS, *et al.* Research status of natural toxins 3-nitropropionic acid [J]. Foreign Med Sci Sect Hyg, 1998, 17(3): 158-161.
- [2] 刘勇, 王玉华, 李秀芳, 等. 我国部分地区甘蔗中 3-硝基丙酸的调查[J]. 卫生研究, 1989, 5: 38-40.
Liu Y, Wang YH, Li XJ, *et al.* Investigation of 3-nitropropionic acid content in sugarcane in some regions [J]. J Hyg Res, 1989, 5: 38-40.
- [3] 兴玠, 李秀芳, 孙艳洁, 等. 变质甘蔗中毒的预防研究-流行病学的调查分析[J]. 卫生研究, 1993, 1(1): 31-33
Xing J, Li XF, Sun YJ, *et al.* Study on prevention of deteriorated sugarcane poisoning-analysis of epidemiological survey [J]. J Hyg Res, 1993, 1(1): 31-33.
- [4] 汪傲, 雷祖玉, 冯学勤, 等. 我国某些豆科植物中 3-硝基丙酸的气相色谱和气相色谱-质谱的研究[J]. 草地学报, 1992, 9(2): 34-36
Wang J, Lei ZY, Feng XQ, *et al.* Gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry of 3-nitropropionic acid in some leguminous plants in China [J]. Acta Agrestia Sin, 1992, 9(2): 34-36.
- [5] 华文凤, 周亮. 霉变甘蔗致中毒性脑病 1 例报告[J]. 中风与神经疾病杂志, 2002, 19(2): 117-117.
Hua WF, Zhou L. A report of 1 cases of toxic encephalopathy caused by moldy sugarcane [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2002, 19(2): 117-117.
- [6] 原爱中, 孙成都, 姚小军, 等. 霉变甘蔗致中毒性脑病二例[J]. 临床荟萃, 2008, 23(12): 851-851.
Yuan AZ, Sun CD, Yao XJ, *et al.* 2 cases of toxic encephalopathy caused by moldy sugarcane [J]. Clin Focus, 2008, 23(12): 851-851.
- [7] 汪军, 胡必富, 李文艳, 等. 霉变甘蔗中毒性脑病二例[J]. 放射学实践, 2003, 20(9): 626-627
Wang J, HU BF, Li WY, *et al.* 2 cases of toxic encephalopathy caused by moldy sugarcane [J]. Radiol Prac, 2003, 20(9): 626-627.
- [8] 张永秋, 朱艳清, 张福琛. 霉变甘蔗致迟发性中毒性脑病两例[J]. 罕见疾病杂志, 2011, 18(4): 50-51.
Zhang YQ, Zhu YQ, Zhang FC. Two cases of tardive toxic encephalopathy induced by moldy sugarcane [J]. J Rare Uncommon Dis, 2011, 18(4): 50-51.
- [9] 陆彬如, 周秦生, 王明明. 霉变甘蔗中毒性脑病 10 例报告[J]. 中风与神经疾病杂志, 1995, 12(4): 229-230.
Lu BR, Zhou QS, Wang MM. Ten cases of toxic encephalopathy induced by moldy sugarcane [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 1995, 12(4): 229-230.
- [10] 刘兴玠, 罗雪云, 胡霞, 等. 产毒节菱孢培养物对动物的毒性研究[J]. 卫生研究, 1987, 20(5): 328-330
Liu XJ, Luo XY, Hu X, *et al.* Study on toxicity of toxigenic ecology culture on animal [J]. J Hyg Res, 1987, 20(5): 328-330.
- [11] 刘焕光, 马羽, 杨岸超, 等. 3-硝基丙酸诱发肌张力障碍大鼠的相关脑区细胞外神经递质变化[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2012, 17(7): 319-321.
Liu HG, Ma Y, Yang AC, *et al.* Changes of extracellular neurotransmitter

- in the related brain areas of rats induced by 3-NPA [J]. *Chin J Minim Invas Neurosurg*; 2012, 17(7): 319–321.
- [12] 胡文娟, 王玉华, 陈晓明, 等. 甘蔗和甘蔗汁中的 3-硝基丙酸的薄层色谱测定法[J]. *卫生研究*, 1988, 17(5): 39–42
Hu WJ, Wang YH, Chen XM, *et al.* Determination of 3-nitropropionic acid in sugarcane and sugarcane juice by thin layer chromatography [J]. *J Hyg Res*, 1988, 17(5): 39–42.
- [13] 江涛, 张庆林, 罗雪云, 等. 3-硝基丙酸的高效液相色谱分析[J]. *卫生研究*, 1999, 28(5): 300–302.
Jiang T, Zhang QL, Luo XY, *et al.* Quantitative determination of 3-nitropropionic acid by HPLC [J]. *J Hyg Res*, 1999, 28(5): 300.
- [14] 张璐, 乐爱山, 郑玲, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法检测酶制剂中 3-硝基丙酸[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(6): 747–752.
Zhang L, Le AS, Zheng L, *et al.* Determination of 3-NPA in enzyme preparation by solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2013, 32(6): 747–752.
- [15] 李兵, 吴国华, 刘伟, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法检测甘蔗中 3-硝基丙酸的方法研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2012, 24(2): 127–132.
Li B, Wu GH, Liu W, *et al.* Detection of 3-nitropropionic acid in sugarcane by solid-phase extraction coupled with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2012, 24(2): 127–132.
- [16] WST 10-1996 变质甘蔗食物中毒诊断标准及处理原则[S].
WST 10-1996 Diagnostic criteria and principles of food poisoning management of metamorphic sugar cane [S].

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



岳亚军, 副主任技师, 主要研究方向为食品卫生、生物毒素检测。
E-mail: yueyajun1978@126.com