

毛细管电泳法测定甘蔗中3-硝基丙酸

解娜^{1,2}, 丁晓静^{1,3*}, 张晶¹, 赵珊¹, 王志^{2*}

(1. 北京市疾病预防控制中心, 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013;
2. 河北农业大学理学院, 保定 071001; 3. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069)

摘要: **目的** 建立甘蔗中3-硝基丙酸的毛细管电泳分析方法。**方法** 粉碎后的甘蔗经样品提取液提取, 离心除杂后, 在228 nm波长处用毛细管电泳法检测。**结果** 在优化的实验条件下, 3-硝基丙酸的质量浓度在1.0~100.0 mg/L范围内与其对应的校正峰面积呈良好线性关系($r=0.9997$)。方法检出限($S/N=3$)为0.3 mg/L, 定量限($S/N=10$)为1.0 mg/L。在10.0、50.0 mg/L两个添加水平下, 方法的回收率分别为95.2%和103.9%, 相对标准偏差($n=5$)分别为2.2%和1.3%。**结论** 本方法简便、灵敏、准确, 可用于甘蔗中3-硝基丙酸的测定。

关键词: 3-硝基丙酸; 甘蔗; 毛细管电泳

Determination of 3-nitropropionic acid in sugarcane by capillary electrophoresis

XIE Na^{1,2}, DING Xiao-Jing^{1,3*}, ZHANG Jing¹, ZHAO Shan¹, WANG Zhi^{2*}

(1. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China; 2. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 3. Department of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the determination of 3-nitropropionic acid (3-NPA) in sugarcane by capillary electrophoresis. **Methods** After grinding, the sugarcane was extracted by sample buffer, centrifugated to remove impurity, analysed by capillary electrophoresis under the wavelength of 228 nm. **Results** Under the optimized conditions, a good linear relationship between values of corrected peak area and mass concentration of 3-NPA was obtained in the range of 1.0~100.0 mg/L with a correlation coefficient of 0.9997. The detection limit of the method was 0.3 mg/L ($S/N=3$) and the limit of quantification was 1.0 mg/L ($S/N=10$). The average recoveries at the spiked levels of 10.0 mg/L and 50.0 mg/L were 95.2% and 103.9% with relative standard derivations 2.2% and 1.3%, respectively. **Conclusion** This method is simple, sensitive and accurate, and it can be applied to the analysis of 3-NPA in sugarcane

KEY WORDS: 3-nitropropionic acid(3-NPA); sugarcane; capillary electrophoresis

3-硝基丙酸(3-NPA)是甘蔗霉变后产毒霉菌节菱孢的代谢产物^[1], 可对中枢神经系统产生严重

损伤^[2]。它是导致我国北方某些地区相继发生变质甘蔗食物中毒事件的主要毒性物质。它毒性强且毒力稳

*通讯作者: 丁晓静, 主任技师, 主要研究方向为色谱技术在卫生检验中的应用。E-mail: dingxiaojing@gmail.com

王志, 教授, 主要研究方向为色谱分析。E-mail: wangzhi@hebau.edu.cn

*Corresponding author: DING Xiao-Jing, Professor, Beijing Center for Disease Control and Prevention, No. 16, Hepingli Middle Street, Dongcheng District, Beijing 100013, China. E-mail: dingxiaojing@gmail.com
WANG Zhi, Professor, College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, No.289, Ling Yu-Si Street, Baoding 071001, China; E-mail: wangzhi@hebau.edu.cn

定, 加热或用消毒剂处理后毒力不减。中毒症状表现为呕吐、眩晕、抽搐、昏迷甚至死亡, 幸存者也往往留下严重后遗症^[3,4], 其中重症病人多为儿童及青年。卫生部明确规定了从变质甘蔗中分离出节菱孢和 3-NPA 为诊断变质甘蔗食物中毒标准^[5], 因此建立简单、快速准确的测定甘蔗中 3-NPA 的分析方法, 对甘蔗中毒事件的处理具有重要意义。

目前关于甘蔗中 3-NPA 的检测方法主要有薄层色谱法、气相色谱、气相色谱-质谱法、液相色谱、液相色谱-质谱法及免试剂离子色谱法^[6-10], 这些方法的样品前处理因甘蔗中含糖量高, 基质复杂, 需净化后才能上机检测, 繁琐费时。此外薄层色谱法灵敏度不高, 是半定量方法。液相色谱法, 需使用大量有机溶剂, 而气相色谱法需衍生, 难以达到快速检测目的。

毛细管电泳法(CE)非常适合极性小分子分析且因其极高的分离效率, 对样品前处理要求不高, 甚至可将悬浮液不经滤膜过滤而直接进样^[11]。然而, 用 CE 测定甘蔗中的 3-NPA 还未见国内外文献报道。故本研究建立了甘蔗中 3-NPA 测定的毛细管电泳法新方法, 具有样品前处理简便、快速, 无需使用有机溶剂, 环境友好等特点。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

Beckman P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪, 配二极管阵列检测器(美国 Beckman 公司); 酸度计(F-50A, 北京屹源电子仪器科技公司); 涡旋振荡器(英国 Bibby Sterilin 有限公司); 高速离心机(Universal 32, 德国 Hettich 公司); Milli-Elix/RiOs 超纯水仪(美国 Millipore 公司); 均质仪(A 11B S25, IKA)。

3-NPA 标准品(购于 Sigma 公司, 纯度 97%); 磷酸钠、磷酸及十六烷基三甲基溴化铵为分析纯; 硼酸及氢氧化钠为优级纯; 实验用水为超纯水。

3-NPA 标准储备液: 称取 3-NPA 标准品 10 mg 于 1.5 mL 塑料离心管中, 加入 1 mL 水溶解, 配成 10.0 mg/mL 储备溶液, 于 4 °C 冰箱保存。

3-NPA 工作溶液: 取 10.0 mg/mL 标准储备液, 用样品提取液稀释成所需浓度的标准工作溶液, 该工作液需每天配制。

甘蔗购自当地菜市场。

1.2 电泳条件

熔融石英毛细管(50 μm ×60.2 cm, 有效长度 50 cm); 分离电压-7 kV; 进样时间 20 s; 检测波长为 228 nm; 负极端进样, 进样压力 3.448 kPa; 工作电流 -80 μA ; 操作温度为 25 °C; 分离缓冲溶液: 100 mmol/L 磷酸钠(pH 12.39)和 0.5 mmol/L 十六烷基三甲基溴化铵; 样品提取液: 将分离缓冲液稀释 10 倍, 即 10 mmol/L 磷酸钠和 0.05 mmol/L 十六烷基三甲基溴化铵。校正峰面积单点定量^[12]。

1.3 实验方法

1.3.1 毛细管的预处理

新的石英毛细管在使用前用 1 mol/L 氢氧化钠溶液洗 20 min、水洗 5 min、分离缓冲溶液洗 5 min。每次进样前, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液、水及分离缓冲溶液分别冲洗 2 min, 以保证迁移时间和校正峰面积的重现性。

1.3.2 样品前处理

称取 0.5 g 试样, 置于 10 mL 离心管中, 加入 2 mL 样品提取液, 涡旋, 使样品充分分散在样品提取液中, 9000 r/min 离心 3 min, 取上清液直接进行测定。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

通过二极管阵列检测器扫描 3-NPA 在磷酸盐分离缓冲溶液中的紫外吸收光谱图可知, 3-NPA 在 228 nm 有最大吸收值, 如图 1 所示。在此波长下对实际样品进行分析时无干扰, 因此实验选择 228 nm 为测定波长。

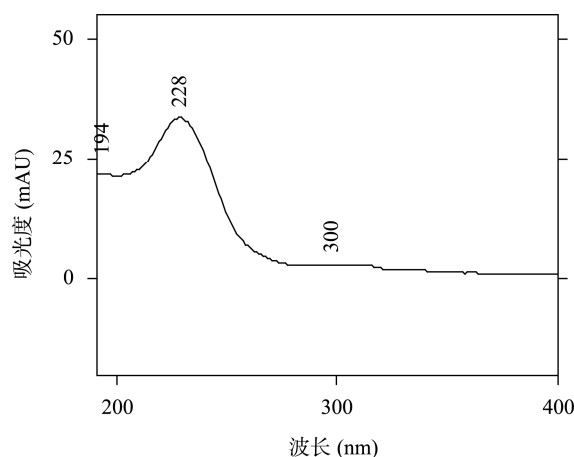


图 1 3-NPA 在分离缓冲液中扫描的紫外吸收光谱图
Fig. 1 The ultraviolet absorption spectra of 3-NPA in the separation buffer through on-line scan by diode array detector

2.2 实验条件的选择

2.2.1 分离缓冲体系的选择

3-NPA 是一种小分子有机酸, 其 pK_a 为 3.66^[8]。分离缓冲溶液的 pH 至少应低于或高于其 pK_a 两个 pH 单位, 才能保证 3-NPA 完全带正电或负电而在高压电场中迁移。磷酸盐缓冲体系是 CE 中最常用的缓冲体系之一, 它不仅紫外吸收低而且缓冲范围宽($pK_{a1}=2.12$, $pK_{a2}=7.20$ 和 $pK_{a3}=12.36$), 因此本实验选用磷酸盐缓冲体系, 并在 pH 12.39 条件下进行分离, 此时 3-NPA 以阴离子形式存在。在施加反向电压的前提下, 加入电渗流反向剂十六烷基三甲基溴化铵, 保证带负电的 3-NPA 与电渗流方向一致并能够迁移到检测窗口而被检测, 从而缩短了分析时间。

2.2.2 缓冲溶液浓度的选择

缓冲溶液的浓度对溶液的粘度、分析物的扩散系数和 ζ 电位均有影响, 不仅影响迁移时间和分离度, 而且影响工作电流。本实验优化了磷酸钠浓度 (50、100、150、200 mmol/L) 对分离的影响, 结果如图 2 所示, 当浓度为 100 mmol/L 时, 3-NPA 不受样品基质的干扰。因此最终选择 100 mmol/L 磷酸钠为最佳浓度。

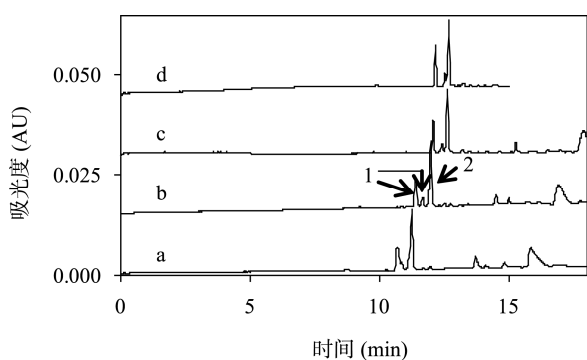


图2 磷酸钠浓度对分离的影响

Fig. 2 Effect of Na_3PO_4 concentration on separation

注: 分离缓冲溶液为 x mmol/L 磷酸钠和 0.5 mmol/L 十六烷基三甲基溴化铵; a. 50 mmol/L; b. 100 mmol/L; c. 150 mmol/L; d. 200 mmol/L; 1. unknown; 2. 3-NPA

2.2.3 缓冲溶液 pH 的选择

缓冲溶液的 pH 影响 ζ 电位、电渗流和待分析物的荷电情况, 从而影响待分析物的迁移时间和分离度。本实验考察了用硼酸和氢氧化钠调 pH 为 12.00、

12.39(未调)和 12.80 时对分离的影响。结果表明, pH 为 12.00 时迁移时间增加, 而 pH 为 12.80 时, 3-NPA 峰高降低, 因此最终选择 pH 12.39, 无需使用硼酸或氢氧化钠调节 pH。

2.3 工作曲线及检出限

在最佳电泳条件下, 将 1.0、3.0、10.0、20.0、50.0、100.0 mg/L 3-NPA 标准系列依次注入电泳仪, 外标法定量。校正峰面积(A_c)与 3-NPA 质量浓度(ρ , mg/L)在 1.0~100.0 mg/L 范围内呈线性关系, 线性回归方程为 $A_c = 155.9\rho + 8.5678$, 相关系数为 0.9997。方法检出限($S/N = 3$)为 0.3 mg/L, 定量限($S/N = 10$)为 1.0 mg/L。

2.4 方法的回收率及精密度

从当地菜市场随机购买一根甘蔗, 按实验方法测得该新鲜甘蔗中不含 3-NPA, 以此样品为空白样品, 进行加标回收实验。加入 3-NPA 的质量浓度为 10.0、50.0 mg/L 时, 平均回收率分别为 95.2%和 103.9%, 相对标准偏差($n=5$)分别为 2.2%和 1.3%。

为评价方法的精密度, 平行处理 7 份霉变甘蔗样品 1[#], 按实验方法处理后进行测定, 此样品中 3-NPA 平均含量为 11.0 mg/kg, 相对标准偏差($n=7$)为 4.2%。

2.5 样品分析

将购买的甘蔗去皮, 个别呈红棕色(1[#]), 大部分呈正常的淡黄色(2[#]), 剔出红棕色的甘蔗, 分别将这两种颜色的甘蔗切成丁, 均质仪粉碎后, 分别分成两部分, 一部分置于塑料自封袋中室温封存过夜, 另一部分直接取样分析后, 置于 4 °C 冰箱保存。无论是淡黄色还是红棕色的甘蔗中均未检测到 3-NPA, 说明甘蔗颜色并不是判断甘蔗霉变的特异性指标, 这与文献报道相一致^[13]。图 3 显示了 1[#]样品、加标 20.0 mg/L 3-NPA 的 1[#]样品和 20.0 mg/L 3-NPA 标准溶液的电泳图。

室温封存过夜的样品第 2 天便可闻到酸味, 经 CE 分析, 1[#]样品中 3-NPA 含量为 63.0 mg/kg, 2[#]样品中 3-NPA 含量为 18.0 mg/kg。第 3 天便可闻到酸臭味, 经 CE 对 1[#]样品进行分析, 3-NPA 含量有所下降, 经方法精密度实验测定结果为 11.0 mg/kg。第 7 天再对 1[#]样品进行分析时, 未检测到 3-NPA, 说明 3-NPA 在常温放置的碎化的甘蔗中不稳定。

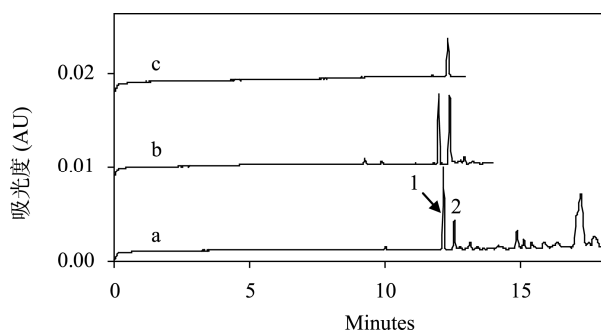


图3 样品1[#](a)、样品1[#]加标20 mg/L(b)及20 mg/L 3-NPA标准溶液(c)的电泳图

Fig. 3 Electropherogram of sample 1[#] (a), sample 1[#] spiked with 20 mg/L 3-NPA (b) and 20 mg/L 3-NPA standard solution (c)
注: 1. unknown; 2. 3-NPA

3 结论

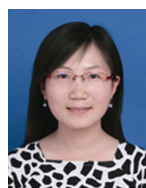
本方法的样品前处理简单, 无需有机溶剂, 目标分析物 3-NPA 不受样品介质的干扰, 能够准确定量, 有利于常规分析中大量实际样品的测定。

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, 1988, 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, 1988, 17(3): 158-161.
- [2] 王湘涛, 朱少兵, 刘树平, 等. 一起霉变甘蔗中毒的报告[J]. 中国食品卫生杂志, 1993, 5(4): 63.
Wang XT, Zhu SB, Liu SP, *et al.* A report of moldy sugarcane poisoning [J]. Chin J Food Hyg, 1993, 5(4): 63.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] WS/T 10-1996 变质甘蔗食物中毒诊断标准及处理原则[S].
WS/T 10-1996 Diagnostic criteria and principles of management for food poisoning of mildew sugarcane [S].
- [6] 胡文娟, 王玉华, 陈晓明, 等. 甘蔗及甘蔗汁中 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.
- [7] 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-质谱研究[J]. 草地学报, 1992, 9(2): 34.
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 Sinica, 1992, 9(2): 34.
- [8] 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.
- [9] 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.
Jiang T, Zhang QL, Luo XY, *et al.* Quantitative determination of 3-nitropropionic acid by HPLC [J]. J Hyg Res, 1999, 28(5): 300.
- [10] 邵国健, 韩建康, 吴丹青. 免试剂离子色谱法测定变质甘蔗中 3-硝基丙酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(4): 711-712.
Shao GJ, Han JK, Wu DQ. Determination of 3-nitropropionic acid in mildew sugarcane by free reagent ion chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(4): 711-712.
- [11] Baalbaki B, Blanchin MD, Fabre H. Validation of a micellar electrokinetic capillary chromatography method for the determination of imidurea, methyl and propylparabens in a pharmaceutical ointment [J]. Anal Chim Acta, 2002, 463:15-20.
- [12] Li J, Ding X, Chen Y, *et al.* Determination of bovine lactoferrin in infant formula by capillary electrophoresis with ultraviolet detection [J]. J Chromatogr A, 2012, 1244: 178-183.
- [13] 刘勇, 王玉华, 刘兴玠, 等. 我国部分地区甘蔗中 3-硝基丙酸含量的调查[J]. 卫生研究, 1989, 5: 38-40.
Liu Y, Wang YH, Liu XJ, *et al.* Investigation of 3-nitropropionic acid content in sugarcane in some regions [J]. J Hyg Res, 1989, 5: 38-40.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



解娜, 硕士研究生, 主要研究方向为色谱分析。
E-mail: xiena1219@163.com



丁晓静, 主任技师, 主要研究方向为
色谱技术在卫生检验中的应用。
E-mail: dingxiaojing@gmail.com



王志, 教授, 主要研究方向为色谱分析。
E-mail: wangzhi@hebau.edu.cn

“食品检测实验室质量控制与标准物质”专题约稿函

近年来, 食品安全得到了国家越来越多的重视, 但我国的食品安全问题仍较严重, 特别是食品病原微生物引起的食品安全事件仍时有发生。本刊特别策划了“**食品病原微生物的检测和溯源**”专题, 由军事医学科学院杨瑞麟研究员担任专题主编, 围绕**食品病原微生物分离培养、核酸、免疫、现场快速等检测技术、食品病原微生物的溯源**等问题展开讨论, 计划在 2013 年 8 月出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2013 年 7 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。在国际贸易日益活跃的今天, 食品安全问题越来越引起世界公众的关注, 科学的、客观的检测结果将会越来越得到法律和社会的认可, 特别是检测限量越来越痕量化、超痕量化的情况下, 如何按照国际通行计量溯源的规则保证食品检测质量的一致性和真实性是食品安全检测领域备受关注和需要解决的问题。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品检测实验室质量控制与标准物质”专题, 由中国计量科学研究院张庆合教授担任专题主编, 围绕**化学检验计量溯源和实验室质量控制(人员、仪器和设备、环境、测量方法)、实验室认可、能力验证、在标物研制、国际比对、统计学方法**等多方面展开讨论, 计划在 2013 年 8 月出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2013 年 7 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部