

超高效液相色谱-串联质谱法测定马铃薯中 α -茄碱和 α -卡茄碱

任丹丹¹, 刘洋¹, 史晓梅¹, 孙大江², 王书雅¹, 谢云峰^{*}

(1. 中粮营养健康研究院, 营养健康与食品安全北京市重点实验室, 北京 102209;

2. 国贸食品科技(北京)有限公司, 北京 102209)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定马铃薯中 α -茄碱和 α -卡茄碱的含量。**方法** 样品经80%甲醇水($V:V$, 含0.1%甲酸)溶液提取、稀释后在正离子模式下以电喷雾电离串联质谱进行测定, 外标法定量。**结果** α -茄碱和 α -卡茄碱在50~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好, 相关系数>0.99, 方法检出限为20 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为50 $\mu\text{g/kg}$ 。在3、5、10 mg/kg 的添加水平下, α -茄碱和 α -卡茄碱平均回收率在83.5%~96.0%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), ($n=6$)在2.97%~5.41%之间。**结论** 本方法快速、准确、灵敏, 可应用于马铃薯中 α -茄碱和 α -卡茄碱的同时检测。

关键词: α -茄碱; α -卡茄碱; 超高效液相色谱-串联质谱法; 马铃薯

Determination of α -solanine and α -chaconine in potato by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

REN Dan-Dan¹, LIU Yang¹, SHI Xiao-Mei¹, SUN Da-Jiang², WANG Shu-Ya¹, XIE Yun-Feng^{1*}

(1. COFCO Nutrition and Health Research Institute, Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety, Beijing 102209, China; 2. International Trade Food Science and Technology (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102209, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for determination of α -solanine and α -chaconine in potato by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by 80% methanol ($V:V$, contain 0.1% formic) and determined by multiple reaction monitoring (MRM) mode with electrospray ionization source and were quantified by external standard method. **Results** All of the analytes showed good linearity in the range of 50–1000 $\mu\text{g/kg}$ and the correlation coefficients (r^2) were all above 0.99. The limits of detection (LODs) for α -solanine and α -chaconine were 20 $\mu\text{g/kg}$ and the limits of quantification (LOQs) were 50 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries for the potato samples at 3 spiked levels (3, 5, 10 mg/kg) ranged from 83.5% to 96.0%, with the relative standard deviations (RSDs, $n=6$) of 2.97%–5.41%. **Conclusion** The proposed method is rapid, accurate and sensitive, which can be applied for the simultaneous detection of α -solanine and α -chaconine in potato.

KEY WORDS: α -solanine; α -chaconine; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; potato

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600404)

Fund: Supported by the National Key R&D Program of China (2017YFC1600404)

*通讯作者: 谢云峰, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: xieyunfeng@cofc.com

*Corresponding author: XIE Yun-Feng, Senior Engineer, COFCO Nutrition & Health Research Institute, Rm 403, COFCO Fortune Plaza No. 8, Chaoyangmen South Ave, Beijing 100020, China. E-mail: xieyunfeng@cofc.com

1 引言

龙葵素(solanine), 又称茄碱, 是一种甾系糖苷生物碱。龙葵素在马铃薯植株和块茎中普遍存在, 其主要成分是茄碱(solanine)和卡茄碱(chaconine)^[1]。目前已知的龙葵素有 α -、 β -、 γ -茄碱、 α -、 β -、 γ -卡茄碱, α -茄碱和 α -卡茄碱是马铃薯糖苷生物碱的主要形式。茄碱和卡茄碱不溶于水、乙醚和石油醚, 而溶于甲醇、乙醇、戊醇、丙酮等。pH 大于 8 时沉淀, 酸性条件下, 加热会水解, 生成糖苷配基(茄啶)和相应的糖。

龙葵碱糖苷有较强的毒性, 糖苷生物碱的制毒机理主要是通过抑制胆碱酯酶的活性引起中毒反应。病理变化主要为急性脑水肿, 其次是胃肠炎, 肺、肝、心肌和肾脏皮质水肿^[2]。摄食极少量的龙葵素对人体不一定会有明显的损害, 当误食龙葵素达到 0.4~0.6 mg/kg, 人就会感到头晕和腹泻。通过食用马铃薯而中毒的数据分析, 估计龙葵素对人的中毒剂量为 2~5 mg/kg, 致死剂量为 3~6 mg/kg^[3]。美国食品和药物管理局(US Food and Drug Administration, FDA)规定马铃薯中的总糖苷生物碱含量应小于 20 mg/kg。据文献报道市售的马铃薯中总糖苷生物碱含量一般不超过 10 mg/kg^[4]。但同时, 糖苷生物碱也具有广泛的生物活性和潜在的药物价值^[5]。

目前, 对于马铃薯中龙葵素的检测方法主要有紫外分光光度法^[6]、薄层色谱法^[7]、高效液相色谱法^[8,9]、液相色谱-串联质谱法^[10]及基质辅助激光解析电离质谱分子成像技术(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging, MALDI-MSI)等^[11]。其中, 紫外分光光度法和薄层色谱法灵敏度较差。液相色谱法是目前被广泛采用的方法, 但前处理时间长、过程繁琐。超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)具有样品前处理时间短, 灵敏度和选择性高, 定性定量能力强等优势, 适合测定龙葵素含量比较低的样品, 例如马铃薯块茎^[12]。

目前, 液相色谱法较多采用固相萃取柱净化的前处理方法。为了实现茄碱检测的快速高灵敏检测, 本研究采用 80% 甲醇水($V:V$, 含 0.1% 甲酸)溶液直接提取, 节约前处理时间和成本。同时结合 UPLC-MS/MS 技术, 外标法定量, 建立一种成本低廉、稳定性好、快速方便、灵敏度高, 适用于马铃薯中 α -茄碱和 α -卡茄碱检测的分析方法, 以期实现茄碱的低浓度检测, 为日常监测提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

QTRAP 5500 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 AB Sciex 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

标准品: α -茄碱, α -卡茄碱(纯度 $\geq 98\%$, 法国

EXTRASYNTHÈSE 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 乙酸、氨水(分析纯, 国药集团化学试剂北京有限公司); 甲酸(色谱纯, 美国 Sigma 公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

分别准确称取 α -茄碱标准品和 α -卡茄碱标准品 10 mg(精准到 0.1 mg)于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至刻度, 配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 置于-20 °C 冰箱内避光保存。分别吸取适量上述储备液, 置于容量瓶中, 用乙腈逐步稀释成浓度均为 10 μg/mL 的混合标准工作液。置于 4 °C 冰箱中保存。

2.2.2 样品前处理

马铃薯需先经均质机绞碎并使之均匀化, 称取 0.5 g 试样(准确至 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中, 加入 50 mL 80% 的甲醇水溶液(含 0.1% 甲酸), 样液涡旋混匀后超声提取 30 min, 8000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜后, 用液相色谱-串联质谱仪测定。如样品浓度超出线性范围, 上清液需进行适当稀释。

由于茄碱不溶于水、乙醚和石油醚, 可溶于甲醇、乙醇、戊醇、丙酮等。相关文献结果对不同提取溶剂进行了对比, 结果显示对于马铃薯中的茄碱, 选用甲醇作为提取溶剂明显优于乙腈或乙醇^[13]。茄碱具有弱酸性, 酸性条件可增加其溶解性, 因此本研究中选用 80% 的甲醇水溶液(含 0.1% 甲酸)作为提取溶剂。

2.2.3 仪器条件

(1) 色谱分析条件

Waters Acquity BEH HILIC 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: A 相为乙腈, B 相为含 10 mmol/L 乙酸铵的水溶液; 流速: 0.3 mL/min; 进样体积: 10 μL; 柱温: 30 °C; 梯度洗脱程序: 0~6.0 min, 82%; 6.0~6.5 min, 82%~60%; 6.5~8.0 min, 60%; 8.0~8.5 min, 60%~82%; 10 min, 82%。

(2) 质谱分析条件

离子源: 电喷雾电离 ESI(+); 离子源接口电压: 5.0 kV; 雾化气: 50 L/min; 辅助气流速: 50 L/min; 离子源温度: 550 °C; 气帘气压力: 15.0 kPa; 扫描模式: 多反应监测模式。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的确定

将浓度为 100 μg/L 的 α -茄碱和 α -卡茄碱以流动注射的方式, 在正离子模式下进行质谱参数调谐优化。首先对每种化合物进行母离子扫描, 确定其分子离子, 通过手动调节锥孔电压, 得到各目标物最大响应值对应的锥孔电压值。在此基础上优化子离子碰撞能量, 通过调节子离子质谱信号的丰度得到子离子最佳碰撞电压, 选取丰度较强、干扰较小的子离子为定性及定量离子。 α -茄碱和 α -卡茄碱

多反应监测质谱参数优化结果见表 1。

表 1 α -茄碱和 α -卡茄碱多反应监测参数

Table 1 Mass spectrometry parameters for multiple reaction monitoring ion pairs of α -solanine and α -chaconine

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
α -茄碱	868	398*	120	92
		722	120	92
α -卡茄碱	852	398*	120	94
		98	120	133

注: *定量离子。

3.2 色谱条件的优化

文献报道中对 α -茄碱的检测多选用 C₁₈ 柱, 经试验验证 C₁₈ 柱无法有效分离 α -茄碱和 α -卡茄碱, 考虑原因是二者分子结构相似, 具有相同的苷元, 均含有 3 个单糖^[14]。考虑到 α -茄碱和 α -卡茄碱的定量离子对均含有相同的子离子(m/z 398), 可能会存在质谱通道间的交叉干扰。因此本方法中, 选用 HILIC 柱, 2 种物质可达到有效分离。

本实验考察流动相为乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-1 mmol/L 乙酸铵、乙腈-10 mmol/L 乙酸铵条件下, α -茄碱和 α -卡茄碱的响应情况。结果表明, 流动相添加了 0.1% 甲酸后, 信号相应明显增强, 但出现较严重拖尾现象。相对于 1 mmol/L 乙酸铵作为流动相, 选用 10 mmol/L 乙酸铵 2 种龙葵碱的分离度更好。进一步优化流动相的 pH 值, 最终确定 pH 为 8.0 时, 2 种龙葵素的保留时间、响应强度和分离度最优, 马铃薯样品中目标物图谱见图 1。

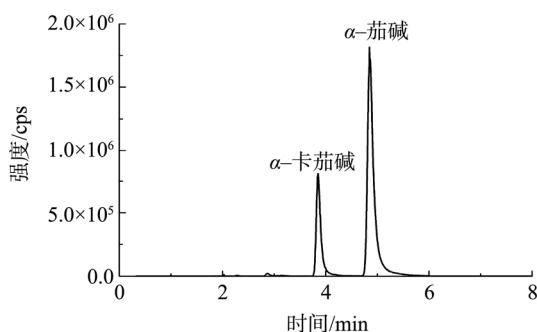


图 1 马铃薯样品中 α -茄碱和 α -卡茄碱的总离子流

Fig.1 Total ionic currents (TIC) of α -solanine and α -chaconine in potato samples

3.3 方法的线性范围及检出限

分别配制成浓度为 50、100、200、500、1000 ng/mL

的混合标准溶液, 进行 UPLC-MS/MS 测定, 建立标准工作曲线。以 α -茄碱或 α -卡茄碱浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性回归方程, 结果见表 2。结果表明该方法在 50~1000 ng/mL 范围内线性关系良好。选取龙葵素含量较低的马铃薯的肉质部分进行稀释测定, 得到该方法中目标物的定量限(limit of quantitation, LOQ)均为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检出限(limit of detection, LOD, S/N=3)均为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 2 α -茄碱和 α -卡茄碱检测方法的线性范围、检出限、定量限

Table 2 Linear relationships, limits of detection and limits of quantification of α -solanine and α -chaconine

化合物	线性方程	相关系数 (r^2)	线性范围 (ng/mL)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
α -茄碱	$Y=8590X+506000$	0.9986	50~1000	50	20
α -卡茄碱	$Y=4220X+37300$	0.9988	50~1000	50	20

3.4 方法的回收率与精密度

选择含 α -茄碱和 α -卡茄碱较少的马铃薯中肉质部分样品分别添加混合标准溶液, 按 2.2.2 样品前处理方法进行添加回收率和精密度实验, 计算平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), ($n=6$), 结果见表 3。在 3.0、5.0、10.0 mg/kg 的添加水平下, 2 种化合物的平均回收率在 83.5%~96.0% 之间, 相对标准偏差为 2.97%~5.41%。表明使用溶剂标准曲线进行校正, 可获得重复性良好的结果。

表 3 马铃薯基质中 α -茄碱和 α -卡茄碱添加回收率及精密度($n=6$)

Table 3 Recoveries and the relative standard deviations of α -solanine and α -chaconine in potato ($n=6$)

化合物	加标量 (mg/kg)	本底值 (mg/kg)	测得值 (mg/kg)	回收率 /%	相对标准偏差 /%
α -茄碱	3	1.22	4.08	95.3	4.84
	5	1.22	5.98	95.2	5.11
	10	1.22	10.48	92.6	2.97
	3	2.33	5.21	96.0	4.88
α -卡茄碱	5	2.33	6.73	88.0	3.66
	10	2.33	10.43	83.5	5.41

3.5 实际样品的测定

为了验证方法的适用性, 选取 4 种不同品种马铃薯, 对其肉质部分进行 α -茄碱和 α -卡茄碱的含量测定, 结果见表 4。测定结果显示, 部分抽检市售马铃薯去皮部分 α -茄碱和 α -卡茄碱含量均小于 10 mg/kg, 可安全食用^[15,16]。

表4 马铃薯基质中 α -茄碱和 α -卡茄碱含量测定Table 4 Determination of α -solanine and α -chaconine in potato

化合物	样品1 /(mg/kg)	样品2 /(mg/kg)	样品3 /(mg/kg)	样品4 /(mg/kg)
α -茄碱	4.76	1.32	3.44	1.26
α -卡茄碱	3.63	2.93	6.10	2.34

4 结 论

本研究采用80%甲醇水溶液(含0.1%甲酸)直接提取,利用超高效液相色谱-串联质谱对马铃薯中 α -茄碱和 α -卡茄碱同时进行定性,外标法定量分析。本方法前处理简单、重复性好、检出限低,满足实际工作和日常监测需求。

参考文献

- [1] 段光明, 冯彩萍. 马铃薯糖苷生物碱[J]. 植物生理学报, 1992, 28(6): 457-461.
- Duan GM, Feng CP. Glycoalkaloids of potato [J]. Plant Physiol Commun, 1992, 28(6): 457-461.
- [2] 巩江, 倪士峰, 邱莉惠, 等. 龙葵素的药理、毒理及药用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 9(9): 4108-4109.
- Gong J, Ni SF, Qiu LH, et al. Research on the pharmacology and toxicity of solanine [J]. J Anhui Agric Sci, 2009, 9(9): 4108-4109.
- [3] 周国亮, 宋翼升, 辛艳飞, 等. 龙葵素的生殖毒性研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(11): 1291-1300.
- Zhou GL, Song YS, Xin YF, et al. Progress in studies of reproductive toxicity of solanine [J]. Chin J Clin Pharmacol Therapeutics, 2013, 18(11): 1291-1300.
- [4] Barceloux DG. Potatoes, tomatoes, and solanine toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L) [J]. Dis Mon, 2009, 55(6): 391-402.
- [5] 赵雪淞, 李盛钰, 何大俊, 等. 马铃薯糖苷生物碱抗真菌活性构效关系研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(6): 159-163.
- Zhao XS, Li SY, He DJ, et al. Structure-antifungal activity relationships of potato glycoalkaloids [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(6): 159-163.
- [6] 霍权恭, 朱之光, 周展明. 马铃薯中配糖生物碱总量测定方法研究[J]. 分析试验室, 1996, (6): 39-41.
- Huo QG, Zhu ZG, Zhou ZM. Studies on the determination method for total glycoalkaloid in potato [J]. Chin J Anal Lab, 1996, (6): 39-41.
- [7] 段光明, 冯育林, 叶葱. 马铃薯糖苷生物碱的薄层层析及扫描测定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1995, (3): 368-369.
- Duan GM, Feng YL, Ye J. Thin layer chromatography and scanning determination of potato glycoalkaloids [J]. Chin Biochem J, 1995, (3): 368-369.
- [8] 肖文军, 李勤, 熊兴耀, 等. 高效液相色谱法分析马铃薯中 α -茄碱[J]. 分析化学, 2011, 39(9): 1459-1460.
- Xiao WJ, Li Q, Xiong XY, et al. Detetion of α -solanine in potato by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2011, 39(9): 1459-1460.
- [9] 邵慧凯, 丘汾, 何佳平, 等. 异丁醇萃取-高效液相色谱法测定马铃薯中 α -茄碱[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(5): 517-520.
- Shao HK, Qiu F, He JP, et al. A new method for the extraction and determination of alpha solanine in potatos [J]. Chin J Food Hyg, 2015, 27(5): 517-520.
- [10] 刘红河, 康莉, 廖仕成, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定食物中毒样品中 α -茄碱和 α -卡茄碱[J]. 华南预防医学, 2016, (5): 435-442.
- Liu HH, Kang L, Liao SC, et al. Determination of α -solanine and α -chaconine in food poisoning samples by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. South China J Prev Med, 2016, (5): 435-442.
- [11] Ha M, Kwak JH, Kim Y, et al. Direct analysis for the distribution of toxic glycoalkaloids in potato tuber tissue using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging [J]. Food Chem, 2012, 133(4): 1155-1162.
- [12] 李美, 熊兴耀, 胡新喜, 等. 马铃薯龙葵素的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2012, (23): 84-88.
- Li M, Xiong XY, Hu XX, et al. Progresses of research on steroidal glycoalkaloids in potato [J]. Hunan Agric Sci, 2012, (23): 84-88.
- [13] 王建凤, 范筱京, 贾丽, 等. 超高液相色谱串联质谱法检测土豆及土豆制品中 α -茄碱[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2756-2761.
- Wang JF, Fan XJ, Jia L, et al. Determination of α -solanine in potato and its products by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spetrpmtry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(7): 2756-2761.
- [14] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用方法测定血浆和尿液中的 α -龙葵碱、 α -卡茄碱和茄啶[J]. 色谱, 2014, (6): 586-590.
- Zhang XY, Cai XX, Zhang XY. Determination of α -solanine, α -chaconine and solanidine in plasma and urine by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, (6): 586-590.
- [15] 黄红苹, 郭华春, 王琼, 等. 云南马铃薯品种(系)块茎中的龙葵素含量

测定[J]. 中国农业科学, 2011, 44(7): 1512–1518.

Huang HP, Guo HC, Wang Q, et al. Determination of the content of solanine in potato tube [J]. Sci Agric Sin, 2011, 44(7): 1512–1518.

[16] 伍慧敏, 曾静, 李美, 等. 液相色谱-质谱联用法检测马铃薯中 α -茄碱含量[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 121–124.

Wu HM, Zeng J, Li M, et al. Determination of α -solanine in potato using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2013, 34(24): 121–124.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



任丹丹, 研究专员, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: rendd@cofco.com



谢云峰, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: xieyunfeng@cofco.com