

实验技术与方法

超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定
土豆中 α -茄碱与 α -卡茄碱含量

王丹¹,丁颢¹,程莉²,周爽¹,赵云峰¹

(1. 国家食品安全风险评估中心,北京 100021; 2. 山西医科大学公共卫生学院,山西 太原 030001)

摘要:**目的** 建立了超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定土豆以及薯片中 α -茄碱与 α -卡茄碱含量的方法。**方法** 样品经 5% 乙酸溶液提取, Waters Oasis C₁₈ SPE 柱 (600 cc) 净化后, 采用 Waters BEH HILIC 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m) 分离。流动相为乙腈: 水 (含 10 mmol/L 乙酸铵) = 88: 12 (V/V), 流速 0.3 ml/min。以 waters Xevo TQ-S 三重四级杆质谱仪在电喷雾正离子化 (ESI+) 及 MRM 模式下定量。**结果** α -茄碱在 0.5 ~ 500 ng/ml 范围内呈线性相关。方法精密度良好 ($RSD < 10\%$, $n = 6$), 回收率 $> 80\%$, α -茄碱和 α -卡茄碱定量限分别为 0.7 和 0.35 μ g/kg ($S/N = 10$)。**结论** 本方法快速简单, 重现性好, 灵敏度高, 适合于土豆和薯片中 α -茄碱和 α -卡茄碱的检测。

关键词:超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法; α -茄碱; α -卡茄碱; 土豆; 植物毒素; 食品安全
中图分类号:R155; TS215 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456 (2014)03-0233-05
DOI:10.13590/j.cjfh.2014.03.007

Determination of α -solanine and α -chaconine in potato by ultra high performance
liquid chromatography-tandem triple quadruple mass spectrometry
WANG Dan, DING Hao, CHENG Li, ZHOU Shuang, ZHAO Yun-feng
(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective An ultra high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed for the determination of α -solanine and α -chaconine in potato tuber. **Methods** The sample was extracted with 5% acetic acid and purified with C₁₈ SPE column (600 cc). The extraction was separated on a waters BEH HILIC column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m) using 88% acetonitrile with 10 mmol/L ammonium acetate as mobile phase at 0.3 ml/min. The detection was performed with waters Xevo TQ-S using positive electrospray ionization (ESI+) mode and multiple-reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The results showed that the linear range for α -solanine was 0.5-500 ng/ml. The LOQ for α -solanine was 0.7 and 0.35 μ g/kg for α -chaconine. The method showed good accuracy with $RSD < 10\%$ ($n = 6$) and recovery $> 80\%$. **Conclusion** This method is fast, simple and has good reproducibility. It is suitable for α -solanine and α -chaconine determination in potato tuber and crisps.
Key words: Ultra high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry; α -solanine; α -chaconine; potato; phytotoxin; food safety

糖苷类生物碱由一个甾体生物碱与一个或一个以上的单糖结合形成。土豆中主要存在的糖苷类生物碱为 α -茄碱和 α -卡茄碱,其含量占土豆中糖苷类生物碱总量的 90% 以上^[1-2]。如图 1 所示, α -茄碱和 α -卡茄碱具有相同的甾体生物碱结构,但糖基不同。 α -茄碱和 α -卡茄碱在土豆皮、芽内含量较高,在土豆块茎中含量较低。土豆受到损伤、发

芽、高温储藏等均有可能造成土豆中 α -茄碱和 α -卡茄碱含量的升高^[3-4]。 α -茄碱具有抗肿瘤、平喘、降压、镇痛等药理作用,但是过量摄入可能造成急性中毒,引起麻痹、腹泻、呕吐等,严重者甚至引起死亡。其毒理作用包括破坏胃肠道黏膜功能以及抑制乙酰胆碱酯酶活性引起中毒^[3]。联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会尚未确定 α -茄碱的每日允许摄入量,根据经验认为只要马铃薯妥善种植和处理,块茎的糖苷类生物碱含量正常 (20 ~ 100 mg/kg) 则不会引起中毒^[5],但儿童比成人更易受到毒性影响。

目前对 α -茄碱和 α -卡茄碱含量的检测方法包括紫外法^[4]、化学发光法^[6]、高效液相色谱-紫外吸

收稿日期:2014-01-20
基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB720804)
作者简介:王丹 男 助理研究员 研究方向为食品卫生
E-mail: wangdan@cfssa.net.cn
通讯作者:赵云峰 男 研究员 研究方向为食品卫生
E-mail: zhaoyf703@126.com

收法(HPLC-UV)^[7]、高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)^[8]等方法。以上检测方法中,紫外光谱法与化学发光法易受到杂质干扰,难以用于较复杂样品的检测中;液相色谱法主要使用C₁₈柱进行分离, α -茄碱和 α -卡茄碱的分离效果不够理想。同时,由于 α -茄碱和 α -卡茄碱的最大紫外吸收波长在210 nm附近且吸收较弱,使用紫外吸收检测的灵敏度较差,

定量限仅有0.1 mg/ml左右。由于检测灵敏度差,导致取样量大,易受到杂质干扰,需要复杂的前处理,如结晶、SPE纯化等方法才能进行检测。为提高方法的检测能力,本文建立了超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测 α -茄碱和 α -卡茄碱,并对土豆及薯片中的 α -茄碱和 α -卡茄碱含量进行了检测。

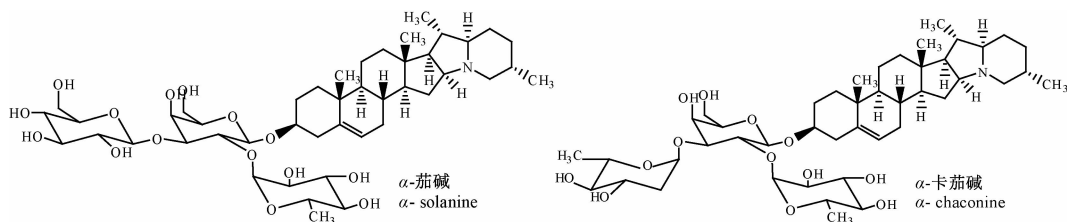


图1 α -茄碱和 α -卡茄碱的结构图

Figure 1 Structure of α -solanine and α -chaconine

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

土豆及薯片样品为市售。沿表皮垂直向下约2 cm深处削去部分为土豆皮样品,其余部分为土豆茎块样品,二者分开处理,所有样品切成小块后均匀研碎,−30 ℃冰箱保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

Xevo TQ-S 型超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪,配备 Mass Lynx 色谱工作站(美国 Waters)、Vortex 漩涡混合器(美国 Scientific)、离心机、高速万能粉碎机、Sep-pak C₁₈ SPE 柱(6 ml,美国 Waters)。

α -茄碱标准品(CAS:20562-02-1)、 α -卡茄碱标准品(CAS:20562-03-2),纯度均>95%,均购自美国 Sigma,乙酸铵、乙腈、乙酸(均为色谱纯,美国 Fluka),实验室用水为超纯水,电阻率>18 M Ω ·cm。

1.2 方法

1.2.1 标准储备溶液和工作溶液的配制

分别精确称取 α -茄碱和 α -卡茄碱标准品5 mg(精确到0.1 mg)置于10 ml容量瓶中,用乙腈配制 α -茄碱和 α -卡茄碱标准储备液,两者质量浓度均为0.5 mg/ml。分别吸取 α -茄碱和 α -卡茄碱标准储备液各1 ml标准储备液,用乙腈稀释至100 ml,得到 α -茄碱和 α -卡茄碱质量浓度为5 μ g/ml的中间液。分别吸取不同体积的标准中间液,用液相色谱流动相逐级稀释成质量浓度为2、5、10、20、50、100 ng/ml的系列标准溶液,进样检测后绘制标准曲线。

1.2.2 样品制备与净化

土豆样品:取10 kg土豆样品,洗净、擦干后按

照1.1.1方法分成土豆皮样品和土豆茎块样品,二者分开处理。土豆茎块采用四分位法,从对角取样共100 g粉碎;土豆皮直接粉碎处理。分别准确称取5 g土豆茎块和土豆皮样品均质,之后分别取茎块和表皮0.5 g加入4 ml含5%乙酸的水溶液中,涡旋混合均匀后振摇提取2 h。所得溶液于4 ℃,8 000 r/min离心10 min,取上清液经0.22 μ m滤膜过滤后质谱检测。使用流动相稀释50倍后进样。

薯片样品:取1 kg同品牌、同批次的薯片样品,采用四分位法,从对角取样共100 g,充分打碎研磨后备用。准确称取5 g样品均质,之后取0.5 g样品,加入4 ml含5%乙酸的水溶液中,涡旋混合均匀后振摇提取2 h。所得溶液于4 ℃,8 000 r/min离心10 min,离心后取上层清液经过SPE净化。净化方法:先用5 ml乙腈活化SPE柱,5 ml 5%乙酸平衡,10 ml提取液上样,之后使用10 ml 15%乙腈洗涤,4 ml流动相洗脱后定容至5 ml。所得溶液于4 ℃,8 000 r/min离心10 min,取上清液经0.22 μ m滤膜过滤后质谱检测。使用流动相稀释50倍后进样。

1.2.3 仪器条件

液相色谱条件:Waters BEH HILIC 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.8 μ m);流动相为乙腈-水=88:12(V/V),其中乙腈和水均含有10 mmol/L乙酸铵,流速0.3 ml/min,进样量2 μ l。

质谱条件:正离子模式,毛细管电压2.4 kV,解离温度400 ℃,解离气流速600 L/h,锥孔气流速150 L/h,碰撞气流速0.3 ml/min。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

采用ESI源,正离子模式进行检测。所采用的

最终参数如表 1 所示,在此条件下所得的子离子如图 2 所示。由于 α -茄碱和 α -卡茄碱含有相同的甾体生物碱结构,仅有糖基不同,因此均能找到 $m/z = 398$ 的子离子峰。

2.2 液相色谱条件的优化

考察了流动相乙腈-水 (V/V) 分别为 85%、88%、

表 1 优化条件下的质谱参数

Table1 Parameters of MS/MS for α -solanine and α -chaconine

化合物	母离子/ (<i>m/z</i>)	锥孔电 压/ <i>kV</i>	子离子/ (<i>m/z</i>)	碰撞能/ <i>eV</i>	子离子/ (<i>m/z</i>)	碰撞能/ <i>eV</i>
α -茄碱	868.2	30	398.1	60	706.1 *	60
α -卡茄碱	852.1	30	398.1 *	60	722.1	60

注: * 为定量离子

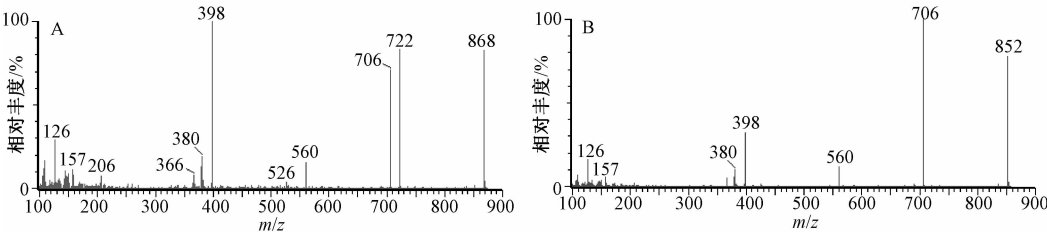


图 2 α -茄碱(A)和 α -卡茄碱(B)的一级质谱图

Figure 2 Daughter spectrum of α -solanine(A) and α -chaconine(B)

90%、95%,水相中乙酸铵浓度分别为 0、5、10、20 mmol/L、水相 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7 以及柱温

分别为 25、30、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 等参数对 α -茄碱与 α -卡茄碱保留时间的影响。结果如图 3 所示。

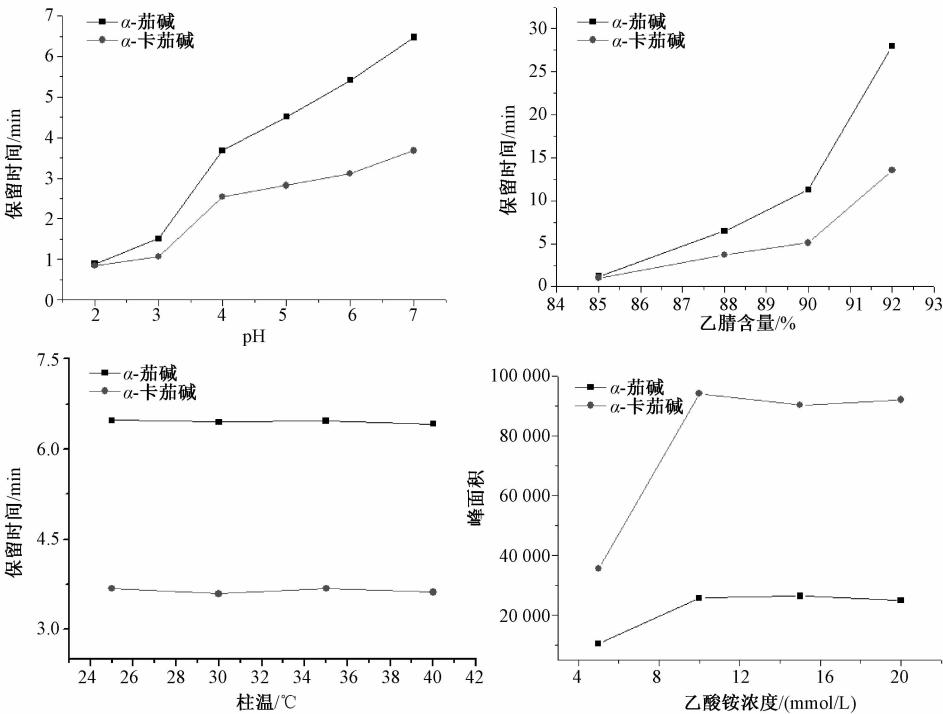


图 3 溶液 pH 值、流动相比例、柱温、乙酸铵浓度等参数的优化

Figure 3 Optimization of chromatography conditions: pH, mobile phase, column temperature and amino acetate concentration

本试验考察了 α -茄碱和 α -卡茄碱在乙酸铵浓度分别为 0、5、10、20 mmol/L 的条件下的响应情况。结果表明,不加入乙酸铵时,没有信号响应;乙酸铵浓度在 10 mmol/L 以上时, α -茄碱和 α -卡茄碱的响应值较高且稳定。故本试验色谱条件选取 10 mmol/L 的乙酸铵浓度。

优化了流动相比比例和温度对分离的影响。结

果发现流动相比比例对保留时间影响较大。乙腈-水 = 90: 10 (V/V) 时, α -茄碱和 α -卡茄碱在色谱柱上有保留,但出峰较早;为将 α -茄碱和 α -卡茄碱与基质分开,避免基质干扰效应的影响,调节流动相比比例为乙腈-水 = 92: 8 (V/V)。柱温对分离影响不大。其色谱图如图 4 所示。

Friedman 等^[9]报道了使用氨基柱分离 α -茄碱

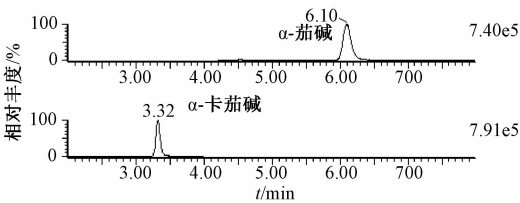


图 4 α-茄碱和 α-卡茄碱的提取离子流色谱图
Figure 4 Extracted ion chromatograms of α-solanine and α-chaconine standard

和 α-卡茄碱的方法。本方法中,采用的 HILIC 柱填料为经过表面处理但未连接其他侧链的硅胶填料,α-茄碱和 α-碱卡茄碱在色谱柱上的出峰顺序、保留性能与氨基柱相似。硅胶柱对生物碱的保留机理可能是柱填料与化合物的氢键相互作用。由于卡茄碱的糖基上羟基个数比茄碱少,因此保留能力较弱,出峰较早。水可以与生物碱产生氢键作用,从而实现洗脱,提高水相的比例可以增加流动相的洗馒头脱强度。pH 值减小,容易破坏氢键相互作用,因而分离应在 pH>4 的条件下进行。

2.3 样品前处理的优化

参考文献^[10-12],比较了以下样品提取方式对同一份土豆样品的提取结果:

(1)超声提取:取土豆和皮各 4 g,加 70% 甲醇 40 ml,50 ℃ 超声提取 1 h,8 000 r/min 离心 10 min,取清液过 0.22 μm 滤膜,流动相稀释 100 倍上样。

(2)水浴回流提取:取土豆和皮各 2 g,加乙醇-乙酸(10:3,V/V)40 ml 85 ℃ 水浴 4 h,8 000 r/min 离心 10 min,取清液过 0.22 μm 膜,流动相稀释 100 倍上样。

(3)乙酸提取:取土豆和皮各 2 g,加不同配比的乙酸混合液 40 ml,漩涡振荡 2 min,振摇提取 1 h,8 000 r/min 离心 10 min,取清液过 0.22 μm 膜,流动相稀释 100 倍上样。

根据提取结果的绝对值高低对提取效果进行评价,结果见表 2。使用甲醇回流提取、超声提取等方式,所需时间较长,步骤繁琐;乙酸提取方式在乙酸浓度为 5%~10% 内提取值最高,且提取简单,因此采用含 5% 乙酸的水溶液提取。

在使用 HPLC-UV 检测时,由于茄碱没有特征紫外吸收,为去除杂质的影响,AOAC 推荐为使用 C₁₈ SPE 柱净化样品^[11]。而 UPLC-MS/MS 检测需要考虑基质对质谱响应的干扰。故本试验研究了提取物的基质干扰情况以及使用 SPE 柱净化去除杂质的效果,样品中加入 30 mg/kg 标准品检测回收率,结果见表 3。土豆茎块和土豆皮提取物不经过 SPE 的回收率已达到 80% 左右,满足检测要求,说

表 2 不同提取方式提取结果比较 (mg/kg)

Table 2 Comparison of different extract methods		
提取方式	α-茄碱含量	α-卡茄碱含量
80% 甲醇回流	5.6	5.2
超声提取	6.4	6.4
乙腈	4.2	3.8
5% 乙酸水溶液	8.7	9.7
10% 乙酸水溶液	9.1	9.4
15% 乙酸水溶液	5.6	5.2

表 3 提取物 SPE 净化前后基质干扰情况 (%)

Table 3 The matrix effect before and after SPE purification				
提取物	SPE 前回收率		SPE 后回收率	
	α-茄碱	α-卡茄碱	α-茄碱	α-卡茄碱
土豆茎块	85.2	89.0	88.7	92.5
土豆皮	78.4	94.2	82.3	90.1
薯片	57.3	92.4	90.1	81.5

明土豆、土豆皮的基质干扰本身不严重,可以不经过 SPE 净化;而薯片中含有油脂基质、盐、食品添加剂等,存在基质干扰,在不经 SPE 前,α-茄碱的加标回收率为 57.3%,当 SPE 净化后,α-茄碱回收率提高。

2.4 定量方法的验证

2.4.1 线性范围与定量限

利用 UPLC-MS/MS 方法,α-茄碱的线性范围为 0.5~500 ng/ml,线性方程为 $y = 895.6x - 465.9$, $r = 0.9993$;α-卡茄碱的线性范围为 0.2~200 ng/ml,线性方程为 $y = 719.6x - 291.9$, $r = 0.9986$,通过对薯片样品提取后逐级稀释,确定薯片中 α-茄碱和 α-卡茄碱定量限分别为 0.7 和 0.35 μg/kg ($S/N = 10$)。

2.4.2 方法的准确度与精密度

由于土豆和薯片中一定含有 α-茄碱和 α-卡茄碱,无法得到不含茄碱的空白基质,因此在基质中添加接近基基本底值的 α-茄碱和 α-卡茄碱的方法对测定准确度进行评价。薯片和土豆加标水平见表 4,每个组分平行测定 6 次。每个样品连续 3 d 进行日间重现性的检测,结果见表 4。

检测中发现薯片样品的均匀性对检测结果影响很大。未经良好混匀的薯片样品,6 份平行样品的检测结果为 20~80 mg/kg,在 30 mg/kg 的加标水平下 RSD 达到 35% 以上,经混匀并加大取样量至 5 g 后在此加标水平下 RSD<10%。在市售薯片样品中,存在茄碱和卡茄碱的分布不均匀问题,检测 α-茄碱和 α-卡茄碱时有必要将样品充分混匀后取样。

2.5 稳定性试验

对标准品的稳定性进行了考察。取 10 ppb 的标准品,分别在避光下于 4 ℃ 和 -20 ℃ 保存。结果表明,4 ℃ 保存,α-茄碱含量于 3、7、14、60 d 内分别为原始值的 95%、83%、64%、35%,α-卡茄碱含量分别为原值的 98%、93%、90%、85%。-20 ℃ 保存,α-茄碱含量于 3、7、14、60 d 内分别为原始值的 98%、

表 4 方法的加标回收率、重现性($n=6$)与日间精密度($n=3$)

Table 4 Spike recovery, reproducibility and intra-day accuracy of the method

食品基质	加标水平 /(mg/kg)	α-茄碱				α-卡茄碱			
		背景值 /(mg/kg)	回收率 /%	日内 RSD /%	日间 RSD /%	背景值 /(mg/kg)	回收率 /%	日内 RSD /%	日间 RSD /%
薯片	30	24.2	85	7.0	8.8	51.7	99	2.8	6.7
	60	24.2	82	6.2	7.9	51.7	94	3.0	5.2
	150	24.2	87	7.9	8.2	51.7	92	4.9	3.3
土豆	10	7.6	85	9.4	8.5	18.3	94	5.1	5.1
	20	7.6	83	8.2	7.9	18.3	92	4.6	5.0
	50	7.6	89	8.1	5.5	18.3	95	3.8	4.5

95%、92%、80%，α-卡茄碱含量分别为原值的98%、95%、93%、90%。故推荐标准品现用现配，-20℃保存。

2.6 市售土豆、土豆皮以及薯片的检测

采用本方法对市售2批次的土豆样品与4种薯片样品进行检测,结果见表5。土豆中茎块部位与薯片中α-茄碱和α-卡茄碱的含量在20~100 mg/kg范围内,摄入市售产品不会引起中毒;但土豆皮中α-茄碱和α-卡茄碱的含量较高,在食用土豆时应去皮以免中毒。

表 5 市售土豆和薯片中α-茄碱和α-卡茄碱的检测
结果(mg/kg)

Table 5 concentration of α-solanine and α-chaconine
in retailed potato and potato chips

食品基质	α-茄碱	α-卡茄碱	总量
土豆茎块 1	9.4	22.1	31.5
土豆茎块 2	13.2	20.4	33.6
土豆皮 1	206.0	505.0	711.0
土豆皮 2	257.0	546.0	803.0
薯片 1	8.2	16.1	24.3
薯片 2	7.6	18.3	25.9
薯片 3	24.2	51.7	75.9
薯片 4	27.3	55.1	82.4

尽管近年来有关土豆中毒的现象并不常见,但土豆中α-茄碱和α-卡茄碱的污染问题不可忽视。美国分析化学家协会(AOAC)早在1997年就建立了土豆中α-茄碱的检测方法,但灵敏度差,取样量大,试剂消耗量大,此外紫外分析易受到杂质干扰。本文在优化试验条件的基础上,采用ULPC-MS/MS建立了土豆、薯片样品中α-茄碱和α-卡茄碱可靠检测方法,提高了检测灵敏度、减小采样量、减少溶剂消耗、减少试验步骤、缩短检测时间。使α-茄碱和α-卡茄碱检测能力提升,为评价土豆中α-茄碱和α-卡茄碱形成、含量变化及加工制品中含量相关性分析提供有力技术手段。

3 小结

本文建立了采用5%乙酸提取,超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱快速检测土豆及薯片中α-

茄碱和α-卡茄碱的方法。结果表明,该方法具有分离效果好、简便、灵敏、准确度高、精密性好的特点,可以应用于土豆中α-茄碱和α-卡茄碱的产生和变化机理研究,为防范食物中毒提供可靠的检测方法。

参考文献

[1] Friedman M, DAO L. Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products [J]. J. Agric. Food Chem, 1992, 40 (3) : 419-423.

[2] Jadhav S J, Sharma R P, Salunkhe D K. Naturally occurring toxic alkaloids in foods [J]. Crit Rev Toxicol, 1981, 9 (1) : 21-104.

[3] Grunenfelder L A, Knowles L O, Hiller L K, et al. Glycoalkaloid development during greening of fresh market potatoes (*Solanum tuberosum* L.) [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54 (16) : 5847-5852.

[4] 杨亮, 高荣, 陈朗, 等. 储藏条件对马铃薯块茎肉质部分 α-茄碱含量的影响 [J]. 作物研究, 2012, 26 (5) : 487.

[5] WHO Food Additives Series 30. Solanine and chaconine [OL/DB]. (2001-03-24) [2013-10-10] Available from URL: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je19.htm>.

[6] 朱定波, 马强, 燕廷, 等. 鲁米诺-铁氰化钾流动注射化学发光体系测定饮用水中 α-茄碱 [J]. 食品工业科技, 2012, 33 (22) : 84-87.

[7] Friedman M, Morino K, Miyazawa H, et al. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds [J]. J Chromatogr A, 2004, 1054 (1) : 143-155.

[8] Matsuda F, Morino K, Miyazawa H. Determination of potato glycoalkaloids using high-pressure liquid chromatography-electrospray ionisation/mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2004, 15 (2) : 121.

[9] Friedman M, Roitman J N, Kozukue N. Glycoalkaloid and calystegine contents of eight potato cultivars [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51 (10) : 2964-2973.

[10] 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.

[11] AOAC. Glycoalkaloids (α-solanine and α-chaconine) in potato tubers, liquid chromatographic method, First Action 1997. [OL/DB]. (1997-10-03) [2013-10-10], <http://down.foodmate.net/standard/sort/10/1243.html>.

[12] 周宝利, 李志文, 丁昱文, 等. 茄子体内 α-茄碱的含量检测及分布特点 [J]. 植物研究, 2009, 29 (3) : 380.