

实验技术与方法

加速溶剂萃取-亲水作用色谱-串联质谱法检测马铃薯中 α -茄碱王炼¹,程佳莹²,陈达炜³,李晓辉¹,曾红燕²

(1. 成都市疾病预防控制中心,四川 成都 610041; 2. 四川大学华西公共卫生学院,四川 成都 610041; 3. 国家食品安全风险评估中心,北京 100021)

摘要:目的 研究马铃薯中 α -茄碱的液相色谱-串联质谱检测方法。方法 样品经酸性水溶液与有机溶剂的混合溶液加速溶剂萃取,中等极性阳离子交换固相萃取小柱净化,氮气吹扫至干,以含0.1%甲酸的乙腈-水(80:20, V/V)溶液溶解,稀释10倍,过滤后以亲水作用的液相色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.6 μ m)进行分离,多反应离子监测定性和定量分析。对前处理和液相分离条件、质谱检测基质效应进行考察。结果 此方法检出限为0.5 μ g/kg,定量限为1.6 μ g/kg,标准曲线的线性范围为0.1~100 μ g/L,相对标准偏差为3.41%~7.56%($n=6$),样品加标回收率范围为82.8%~99.0%。结论 本方法提取简便、效率高,检测灵敏且定性准确,能够满足风险监测需求和中毒分析要求。

关键词:液相色谱-串联质谱; α -茄碱; 加速溶剂萃取; 亲水作用

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)06-0636-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.06.009

Determination of alpha-solanine in potato by accelerated solvent extraction-hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Lian¹, CHENG Jiaying², CHEN Dawei³, LI Xiaohui¹, ZENG Hongyan²

(1. Chengdu Center for Disease Control and Prevention, Sichuan Chengdu 610041, China; 2. West China School of Public Health, Sichuan University, Sichuan Chengdu 610041, China; 3. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination alpha-solanine in potatoes by liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. **Methods** The potato samples were extracted using the mixed solution of acidity water and organic solvent by accelerated solvent extraction. After the purification by MCX solid phase extraction, the eluent was dried-up with nitrogen. The analytes were dissolved by the mobile phase (acetonitrile-water containing 0.1% formic acid, 80:20, V/V) and separated by hydrophilic interaction chromatography (2.1 mm×50 mm, 1.6 μ m) and determined using multi-reaction monitoring mode. The conditions of the pretreatment solution, liquid chromatography and matrix effect were optimized. **Results** The limits of detection and quantification were 0.5 and 1.6 μ g/kg. The linear range of standard curve were from 0.1 to 100 μ g/L. The relative standard deviations of detection were at 3.41%-7.56% ($n=6$), and the spiked sample recoveries were at 82.8%-99.0%. **Conclusion** The simplicity, efficiency, sensitivity and accuracy of this method can meet the needs of risk monitoring and poisoning analysis.

Key words: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; α -solanine; accelerated solvent extraction; hydrophilic interaction

龙葵素(solanen)是一种广泛存在于马铃薯及其他茄科植物中的有毒糖苷生物碱,主要以 α -茄碱(α -solanine)和 α -卡茄碱(α -chaconine)的形式存在,两种形式约占总龙葵素的95%^[1-2]。 α -茄碱作为龙葵素的一种主要形式,常用来反映样品中龙葵

素的含量,化学性质为弱碱性,可溶于稀酸和乙腈、丙酮等有机溶剂,不溶于水。

世界各地每年均有因误食发芽变绿的马铃薯、山药及青番茄等农产品导致人、畜龙葵素中毒的病例报道^[3-4]。龙葵素的安全含量限值为200 mg/100 g,日常食用的马铃薯中含有微量的龙葵素,通常为7~15 mg/100 g,不足以危害人体健康;而发芽的马铃薯、山药或未成熟的青番茄中,龙葵素的含量可增至50倍以上^[5],可能对人畜产生毒性危害。

收稿日期:2020-09-22

基金项目:中国博士后面上项目(2012M521703)

作者简介:王炼 男 主任技师 研究方向为有机污染物残留分析

E-mail:septwolvesnjwl@163.com

建立龙葵素含量的检测方法对于食品安全意义重大。

目前,国内外对于 α -茄碱检测的研究主要包括紫外分光光度 (UV) 法^[6]、高效液相色谱 (HPLC) 法^[7]、基质辅助激光解析电离质谱分子成像技术 (MALDI-MSI)^[8]、液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法^[9-12]等。UV 法只能测定类似 α -茄碱共轭结构的糖苷类化合物总量,因此不能准确地进行 α -茄碱定量;HPLC 中待测物富集过程操作繁琐,由于样品基质复杂,仅通过保留时间定性易产生假阳性的结果;MALDI-MSI 能准确性及定位(不同部位待测物含量),但仪器设备不普及,限制了该方法的推广应用。相对来说,LC-MS/MS 法在 α -茄碱检测中具有灵敏度高、定性定量准确的优势,因此应用广泛;但从报道的文献看,方法中尚存在对基质效应分析不足^[11]、样品稀释倍数过高(为降低基质效应影响)^[5]以及前处理效率不高^[12]等问题。

加速溶剂萃取 (ASE) 是一项新兴的前处理技术,利用较高压力和温度,一定配比的有机溶剂作为萃取液进行萃取,具有自动化程度高、溶剂用量少、耗时短的特点^[13]。亲水作用色谱 (HILIC) 与 C_{18} 性质的色谱比较,在极性化合物分离时,具有更好的保留,且使用有机流动相的比例高,与质谱联用更匹配,提高了灵敏度^[14]。本试验将 ASE 与 HILIC 技术相结合,建立了 LC-MS/MS 测定复杂基质中 α -茄碱的方法,相比于已报道的同类方法,具有基质干扰少、灵敏度高等特点,可应用于实际样品的检测。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

Thermo Ultimate DGP-3600 高效液相色谱、ASE 350 加速溶剂萃取仪(配 5 mL 萃取池)均购自美国赛默飞,AB Sciex QTrap3200 串联质谱仪(美国 AB Sciex), VisiprepTM-DL 固相萃取系统(美国 Sepulco),氮吹仪,CORTECSTM UPLC HILIC 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.6 μ m)、MCX 固相萃取小柱(3 mL/60 mg, 30 μ m)均购自美国 Waters。

α -茄碱标准品(CAS: 20562-02-1, 加拿大 TRC), ASE® Prep DE 硅藻土(CAS: 68855-54-9, 美国赛默飞),氧化铝(层析用),无水硫酸钠(分析纯),甲酸(色谱纯),甲醇、乙腈、氨水均为 HPLC 级,试验用水均为超纯水。

1.2 方 法

1.2.1 标准溶液的制备

称量 5.0 mg α -茄碱,以含 0.1%甲酸的乙腈超

声溶解,转移至 10 mL 容量瓶定容,配制成浓度为 0.5 mg/mL 的标准储备液,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。取该标准储备液,以含 0.1%甲酸的乙腈-水(80:20, V/V)溶液作为溶剂配制成 0.1 μ g/mL 的标准使用液,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。分别取一定体积的标准使用液,以含 0.1%甲酸的乙腈-水(80:20, V/V)溶液配制成 6 个浓度水平(0.2、0.5、2.0、10.0、50.0、100.0 ng/mL)的标准系列溶液,-4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 样品前处理

分别称取 1.00 g 样品、0.70 g 硅藻土,混匀;称取 0.40 g 无水硫酸钠、0.40 g 氧化铝,依次装入 5 mL 的 ASE 萃取池中,再加入与硅藻土混匀后的样品,盖好萃取池盖,采用 1%甲酸-甲醇(1:2, V/V)作为提取溶液,进行提取。提取所得收集液约 15 mL,40 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹扫至约 5 mL(有机相完全挥发),加超纯水稀释定容至 10 mL,待固相萃取净化。净化前 MCX 小柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 超纯水活化,样液以约 1 滴/s 流速通过 MCX 小柱,待样液完全通过小柱后,用 4 mL 超纯水分两次淋洗小柱,待液体抽干后,以 3 mL 氨水-甲醇(4:96, V/V)溶液洗脱,控制流速约为 1 滴/s,收集洗脱液,40 $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹扫至干,1.0 mL 甲醇溶解,取少量溶解液,液相色谱分析流动相稀释 10 倍后待测。

1.2.3 仪器条件

ASE:萃取温度为 110 $^{\circ}$ C,升温 6 min;静态萃取 5 min;循环次 2 次;冲洗 100 s;冲洗体积为 60%;萃取溶剂为 1.0%甲酸-甲醇(1:2, V/V)溶液。

色谱:HILIC 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.6 μ m);柱温为 40 $^{\circ}$ C;流速为 400 μ L/min;进样体积为 10 μ L;流动相为乙腈-1.0%甲酸(含 2 mmol/L 乙酸铵,80:20, V/V)。

质谱:正离子源(ESI⁺);检测方式为多反应离子监测(MRM);离子源温度为 550 $^{\circ}$ C;喷雾电压为 5 500 V;气帘气压力为 172 kPa;碰撞气压力为 34.5 kPa;雾化气压力为 172 kPa;辅助加热气压力为 172 kPa;检测离子对分别为 m/z 868.6/398.5、 m/z 868.6/98.1、 m/z 868.6/380.4,去簇电压均为 133 V,入口电压均为 11 V,碰撞池入口电压分别为 40、70、45 V,碰撞能量分别为 97、120、100 V,碰撞池出口电压分别为 5.0、3.0、4.5 V;定量离子对为 m/z 868.6/98.1。

2 结果与分析

2.1 ASE 条件优化

2.1.1 溶剂优化

α -茄碱为碱性极性物质,可选择一定水溶性的

弱酸性溶液进行提取。考虑到 ASE 萃取池耐受 pH 值 ≥ 2.0 , 试验对比了 1% 甲酸水溶液与乙醇、丙酮、乙腈和甲醇组成 1:1 (V/V) 混合溶液对等质量的同一样品进行提取, 结果表明 1% 甲酸-甲醇组成混合溶液提取时效率最高, 1% 甲酸-乙醇混合溶液和 1% 甲酸-丙酮混合溶液提取效率接近, 约为 1% 甲酸-甲醇混合溶液的 80%, 1% 甲酸-乙腈混合溶液提取效率约为 1% 甲酸-甲醇混合溶液的 65%。进一步优化了 1% 甲酸-甲醇的混合比例, 发现在 1% 甲酸-甲醇 (1:2, V/V) 时, 提取出的 α -茄碱在 LC-MS/MS 测定时峰面积最大, 故本试验选择 1% 甲酸-甲醇 (1:2, V/V) 作为 ASE 提取溶液。

2.1.2 温度优化

温度是影响 ASE 提取过程的主要因素, 对等质量的同一样品进行样品提取, 选择 1% 甲酸-甲醇 (1:2, V/V) 作为 ASE 提取溶液, 分别考察 90、100、110、120 $^{\circ}\text{C}$ 四个温度下的提取效果。结果表明在 90~110 $^{\circ}\text{C}$, 提取效率呈明显上升趋势 (90 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 提取效率分别为 110 $^{\circ}\text{C}$ 的 35% 和 80%), 120 $^{\circ}\text{C}$ 时, 由于温度过高待测物的挥发增加, 提取效率下降 (约为 110 $^{\circ}\text{C}$ 的 75%), 本试验最终选择 ASE 提取温度为 110 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.3 循环次数及冲洗体积

ASE 萃取中循环提取次数及提取后用于冲洗的体积也对提取效率有一定的影响。对等质量的同一样品进行样品提取, 分别考察了三种条件下

(循环 1 次, 冲洗体积 100%; 循环 2 次, 冲洗体积 60%; 循环 3 次, 冲洗体积 30%) α -茄碱的提取效果。三种提取条件提取后检测的 α -茄碱分别为 171 370、180 010 和 180 150 cps。结果表明, 循环 2 次与 3 次时, 提取效率已无明显差异, 考虑到有机试剂使用量和前处理时间, 选择循环 2 次、冲洗体积 60% 为最终试验条件。

2.2 固相萃取条件优化

α -茄碱为碱性极性物质, 阳离子性质的固相萃取小柱对其有吸附作用。本试验比较了亲水亲脂平衡 (HLB)、弱阳离子 (WCX)、阳离子与 C18 混合 (MCX)、强阳离子 (SCX)、C8 与 SCX 串联 (C8-SCX) 四种固相萃取方案。结果显示使用 HLB 和 MCX 进行萃取后, 得到的峰面积相当, 使用 C8-SCX 串联方式时, 略低于 HLB 和 MCX 两种类型, SCX 对 α -茄碱保留效果不佳。进一步结合色谱图 (见图 1) 发现, 采用 HLB 和 SCX 萃取时, 峰拖尾较严重, 使用 MCX 和 C8-SCX 方式, 峰形对称, 最终试验选择 MCX 作为固相萃取的小柱类型。

同时对 MCX 小柱固相萃取后的洗脱液进行了优化, 分别使用 3 mL 四种不同氨水-甲醇比例 (2:98, 4:96, 6:94, 8:92, V/V) 的溶液对小柱进行洗脱, 洗脱后检测 α -茄碱的峰面积分别为 89 000、180 200、180 030 和 180 410 cps, 当氨水-甲醇比例达到 4:96 (V/V) 后, α -茄碱峰面积基本趋于稳定, 可认为 MCX 柱上保留的目标待测物 α -茄碱完全被洗脱。

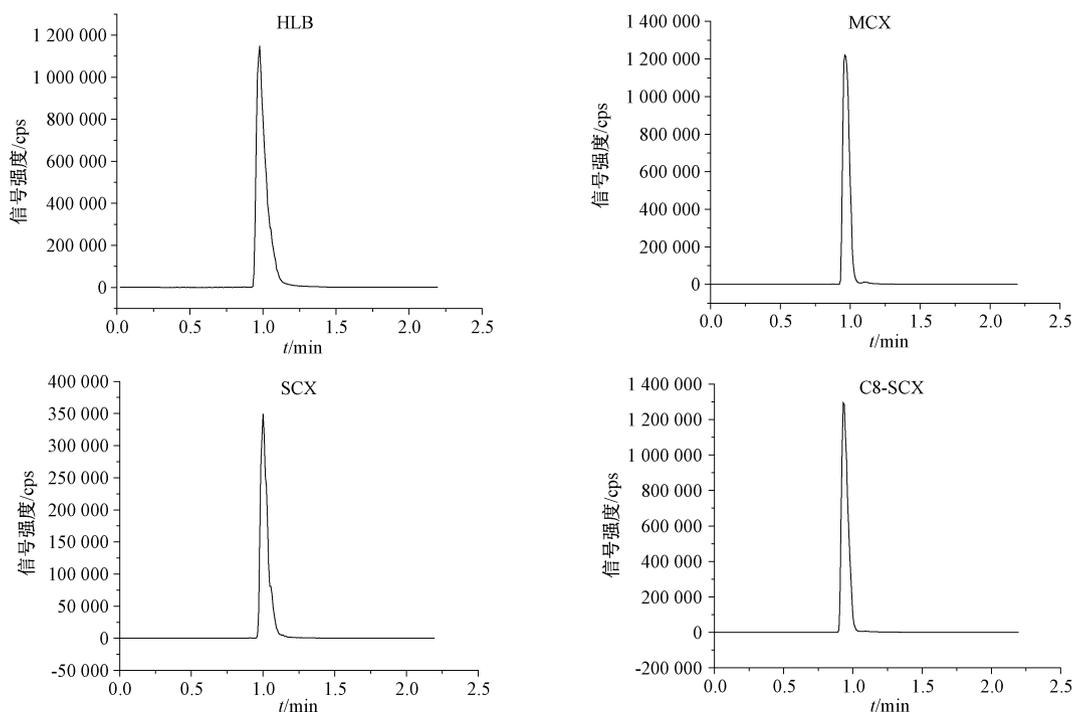
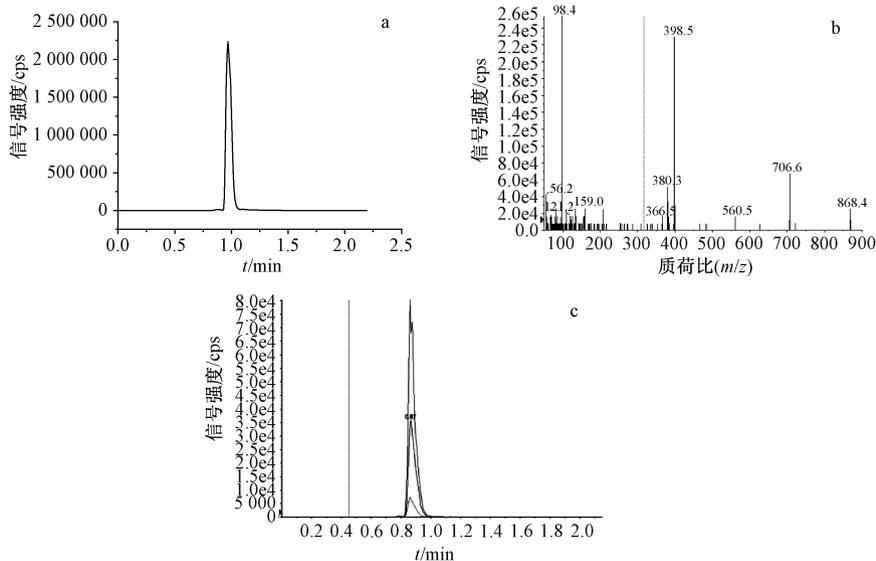


图 1 不同固相萃取小柱处理后的色谱图

Figure 1 Chromatogram of various SPE cartridges after processing

2.3 LC 流动相优化

流动相中加入甲酸提供质子,有利于提高 α -茄碱的响应度。本试验考察了甲酸浓度(0.05%、0.1%、0.4%、1.0%)对目标化合物响应度的影响。结果发现,随着甲酸浓度的增大,目标化合物的响应度增强,且峰形拖尾现象有所改善。考虑到色谱柱耐受的 pH 值范围为 1~9,最终选择添加甲酸浓度为 1.0%。



注:a 为标准溶液色谱图;b 为标准溶液质谱图;c 为样品色谱图

图 2 优化后的 α -茄碱标准溶液色谱图、质谱图和样品色谱图

Figure 2 Optimized chromatogram and mass spectrogram of standard and sample

2.4 基质效应的影响

马铃薯基质复杂,试验中发现基质效应 (ME) 对 LC-MS/MS 分析影响较大。通过基质校准曲线和溶剂校准曲线斜率之比的百分率评估基质效应是一种较好的方法^[15],计算公式为 $ME(\%) = (SAm - SAs) / SAs \times 100\%$,其中 SAm 为基质校准曲线的斜率, SAs 为溶剂校准曲线的斜率。当 $ME \leq \pm 20\%$ 时,基质干扰较低;当 ME 介于 $\pm 50\% \sim \pm 20\%$ 之间时,存在中等的基质效应;当 $ME < -50\%$ 或 $> +50\%$ 时,认为是存在较强的基质干扰。

本试验中,标准曲线线性方程为 $y = 3437.9x + 5158.9$,线性范围为 0.1~100 $\mu\text{g/L}$;ASE 处理后的基质溶液配制基质曲线,线性方程为 $y = 983x + 38655$ ($ME = 71.4\%$);以稀释 5 倍后的基质溶液作为溶剂配制基质曲线,线性方程为 $y = 2575.2x + 27619$ ($ME = 25.1\%$);以稀释 10 倍后的基质溶液作为溶剂配制基质曲线,线性方程为 $y = 3186.8x + 7665$,相关系数 (r) = 0.998 5 ($ME = 7.3\%$)。从结果可以看出,当样品稀释 10 倍后,马铃薯样品带来的基质效应影响已经很小。根据试验得到的基质效应结果,本方法采用标准溶液曲线定量,样品处理

试验中发现,流动相中使用乙酸铵对改善 α -茄碱的峰形有利。进一步考察了 4 个浓度(2、4、6、8 mmol/L)的乙酸铵对色谱行为的影响,结果表明随着乙酸铵的浓度增大,待测物的响应度及峰形无明显变化。本试验采用 2 mmol/L 乙酸铵作为添加浓度,优化后的标准溶液色谱图和质谱图及样品的色谱图见图 2。

后稀释 10 倍进样检测的方式,可以得到理想的定量结果。

2.5 方法有效性评价

选取 2 份 α -茄碱含量较低的样品,分为三个加标浓度(1.0、8.0、50.0 mg/kg),每个加标水平 6 份平行样品,样品前处理后流动相稀释 10 倍分析,标准曲线定量,测定结果的相对标准偏差 (RSD) 为 3.41%~7.56%。每份样品测定 3 次取均值作为该加标样的测定值,同时测定 2 个相同稀释水平的样品,均值作为本底值,计算加标回收率,见表 2。

表 2 标准曲线定量精密度和加标回收率 ($n=6$)

Table 2 Spiked recovery and precision for standard curve					
待测物	本底值 /(mg/kg)	加标量 /(mg/kg)	实测值 /(mg/kg)	回收率 /%	RSD /%
α -茄碱		1.00	1.58	86.3	6.48
	0.717	8.00	8.36	95.5	5.37
		50.0	50.20	99.0	3.41
		1.00	1.05	82.8	7.56
	0.222	8.00	7.62	92.5	4.42
		50.0	46.30	92.2	4.31

根据信噪比为 3 和 10 计算对应的标准溶液浓度为仪器的检出限和定量限,分别为 0.0 和 0.16 $\mu\text{g/L}$ 。按 1.0 g 样品 10 倍稀释可得出方法检出限

和定量限分别为 0.5 和 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。同时对样品添加 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ α -茄碱时的加标回收率和 6 次检测的 RSD 进行了考察,得到的加标回收率为 85.10%, RSD 为 9.87%。

2.6 实际样品测定

将本方法应用于 20 份市售马铃薯样品的检测,结果显示样品中 α -茄碱的含量在 8.04 ~ 17.6 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

3 小结

本试验利用加速溶剂萃取,对马铃薯中的 α -茄碱进行充分提取,检测时采用亲水作用色谱,使强碱性的 α -茄碱与基质干扰得以良好分离,结合串联质谱技术获得了高灵敏度,方法定性定量能力强,适合于食品风险监测和中毒事件中马铃薯中 α -茄碱的分析。

参考文献

- [1] 余永霞,蒋雅楠,刘清亮,等.龙葵素检测技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2020,11(12):3930-3936.
- [2] 戴超,郑鹭飞,刘佳萌,等.液质联用法分析储藏因素对马铃薯中 α -茄碱含量的影响[J].核农学报,2017,31(11):2200-2205.
- [3] 张海华.食用马铃薯引起的龙葵素中毒 20 例分析[J].右江医学,2012,40(2):250-252.
- [4] 李天星,蔡婷婷,薛秋平.龙葵素中毒误诊误治分析[J].临床误诊误治,2019,32(9):8-10.
- [5] 王建凤,范筱京,贾丽,等.超高效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.

- [6] 张薇,熊兴耀,李霞.马铃薯中龙葵素的提取方法[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2006,32(6):1007-1032.
- [7] 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(6):1459-1460.
- [8] HA M, KWAK J H, 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 Chemistry,2012,133(4):1155-1162.
- [9] JENSEN P H, JACOBSEN O S, HENRIKSEN T, et al. Degradation of the potato glycoalkaloids- α -solanine and α -chaconine in groundwater [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,2009,82(6):668-672.
- [10] 王丹,丁颖,程莉,等.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[J].中国食品卫生杂志,2016,26(3):233-237.
- [11] 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,2016,42(5):435-442.
- [12] 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.
- [13] 曾静,曲粟,古淑青,等.加速溶剂萃取-QuEChERS/超高效液相色谱-串联质谱法同时测定药食同源性食品中双酚类化合物[J].分析测试学报,2020,39(6):736-742.
- [14] 朱婧,任建委,杨明岐,等.亲水作用液相色谱串联质谱法测定头发中尼古丁和可替丁[J].四川大学学报(医学版),2019,50(5):731-736.
- [15] DE OLIVEIRA A J L, SCHNEIDER A, BATISTA-ANDRADE J A, et al. Chitosan from shrimp shells: a renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk[J]. Food Chemistry,2018,240:1243-1253.

· 公告 ·

市场监管总局关于发布《凉拌菜中 1,2-丙二醇和 1,3-丙二醇的测定》等 6 项食品补充检验方法的公告

2020 年第 50 号

根据《中华人民共和国食品安全法实施条例》和《食品补充检验方法工作规定》有关规定要求,《凉拌菜中 1,2-丙二醇和 1,3-丙二醇的测定》、《畜肉及内脏中异丙嗪的测定》、《水果、蔬菜中丁醚脲的测定 液相色谱-质谱法》、《婴幼儿配方食品中消毒剂残留检测》、《蘑菇中 α -鹅膏毒肽等 6 种蘑菇毒素的测定》、《小麦粉中间苯二酚的测定 高效液相色谱法》6 项食品补充检验方法已经市场监管总局批准,现予发布。

方法文本可在市场监管总局食品补充检验方法数据库(<http://www.samr.gov.cn/spcjs/bc/jyff/>)中查询或下载。

特此公告。

市场监管总局

二〇二〇年十一月十九日

(相关链接:http://gkml.samr.gov.cn/nsjg/spcjs/202011/t20201120_323739.html)