

茄科蔬菜中龙葵毒素类化合物的LC-MS/MS定量分析检测

Quantitative Analysis of Solanum Nigrum Toxins in solanaceous vegetables by LC-MS / MS

刘青¹, 傅小红², 杨总¹, 刘冰洁¹, 郭立海¹

Liu Qing¹, Fu Xiaohong², Yang Zong¹, Liu Bingjie¹, Guo Lihai¹

SCIEX应用支持中心, 中国¹

南昌市药品检验检测研究院²

SCIEX Application Support Center, China¹

Drug Inspection and Testing Institute of Nanchang²

Keywords: Nigrum Toxins, LC-MS/MS

引言

龙葵素为糖苷生物碱, 茄科蔬菜中主要存在形式为 α -茄碱和 α -卡茄碱。茄科蔬菜因具有较高的经济价值, 在我国广泛种植, 是群众喜爱的食物和食品加工原料。马铃薯已被我国政府列为继水稻、小麦、玉米之后的第4大粮食作物, 为世界最大的马铃薯生产和消费国。因含有多种糖苷生物碱类物质, 茄科蔬菜在我国也是引起食物中毒的主要植物之一。茄科蔬菜毒素中毒尤其以龙葵素最为多见, 近年来不断有因食用茄科蔬菜而导致龙葵素中毒的事件报道。龙葵素中毒事件频发迫使有关部门加强监管力度, 规范对茄科蔬菜在生产、贮存、加工等环节的管理。龙葵素的检测方法目前主要包括紫外分光光度法、薄层色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等。紫外分光光度法及薄层色谱法不能对龙葵毒素进行准确的定性、定量分析且灵敏度较低。高效液相色谱法在龙葵毒素方法检测中应用较为广泛, 但其方法灵敏度较低, 对于龙葵素含量较低的茄科蔬菜定量数值不准确。近年来采用高效液相色谱-串联质谱法检测 α -茄碱和 α -卡茄碱具有方法灵敏度高, 检测下限低, 定量准确等特点。目前标准主要标准有《土豆中及其制品中 α -茄碱和 α -卡茄碱的测定》(BJS 201806), 该标准的定量限为 10 mg/kg, 限量相对较高, 很难满足日常中毒事件检验要求。

本文采用高效液相色谱串联质谱建立了快速检测茄科蔬菜样品中的 α -茄碱和 α -卡茄碱的方法, 该方法的优势和特点:

- 1、灵敏度高: 该方法检测灵敏度达到皮克级别以下, 茄科蔬菜基质中两个化合物定量限远低于目前标准的要求;
- 2、方法稳定好: 选取茄科蔬菜土豆基质样品分别进行1, 2, 10 ng/mL 浓度加标回收率实验, 回收率在90%~105%之间, 所有化合6平行加标的峰面积重复性RSD<2%;

1 实验方法

1.1 前处理条件

称取试样 1 g (精确至 0.001 g) 于 50 mL 具塞离心管中, 加入 5.0 mL 水涡旋混匀 1 min, 再准确加入 25.0 mL 1% 酸化乙腈 (V/V), 涡旋混匀 3 min。之后, 向离心管中加入 2.0 g 无水硫酸镁, 1.0 g 无水醋酸钠。手动剧烈摇动 30 s 后涡旋混匀 1 min。再将离心管置于离心机中, 在 4 °C 条件下以 10000 r/min 的速度, 离心 8 min。取全部上清液至 25 mL 容量瓶中, 加入 1% 酸化乙腈 (V/V) 至刻度, 再从中取 25 μ L 上清液于 5 mL 容量瓶中, 加入 50% 甲醇水溶液至刻度, 取 1 mL 过微孔滤膜 (0.22 μ m, 聚四氟乙烯) 后上机测定。

1.2 液相色谱条件

液相系统: SCIEX ExionLCTM AD 系统

色谱柱: C18 1.8 μ m 2.1x100 mm

流动相: A 为 0.05% 甲酸 -5 mmol 甲酸铵缓冲溶液, B 为乙腈;

流速 0.4 mL/min

液相洗脱梯度见表 1。

表1. 液相梯度洗脱

时间 (min)	A相(%)	B相(%)
0.0	95	5
3.0	95	90
5.0	10	90
5.1	10	5
7	95	5

1.3 质谱条件

扫描模式：多反应监测 MRM 扫描模式，正离子模式扫描，MRM 离子对参数（表 2）

离子源：电喷雾电离（electrospray ionization, ESI）；

离子源参数：

喷雾电压（IS）：5500 V（+）； 离子源温度：550 °C；

气帘气（CUR）：35 psi； 碰撞气（CAD）：9psi；

雾化气（GS1）：55psi； 辅助雾化气（GS2）：55psi

表2. 离子对信息

母离子(m/z)	子离子(m/z)	离子名称	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
852.3	706.3	α - 卡茄碱 1	150	90
852.3	398.2	α - 卡茄碱 2	150	97
852.3	560.3	α - 卡茄碱 3	150	104
868.4	398.4	α - 茄碱 1	150	97
868.4	722.5	α - 茄碱 2	150	97
868.4	706.5	α - 茄碱 3	150	90

2 实验结果与讨论

2.1 色谱条件优化

实验详细优化了色谱条件，比较不同品牌、不同型号的色谱

柱以及流动相，最终选择的色谱柱是 Phenomenex C18；水相选择了不同浓度的甲酸和甲酸铵进行实验，有机相分别使用甲醇和乙腈，通过对比两种龙葵毒素的峰面积和峰型，最终选择 A 相为 0.05% 甲酸 -5 mmol 甲酸铵缓冲溶液，B 相为乙腈，保证 α - 茄碱、α - 卡茄碱有较好的保留（图 1, 2），并且有效的避开基质干扰，保证定量结果更准确。

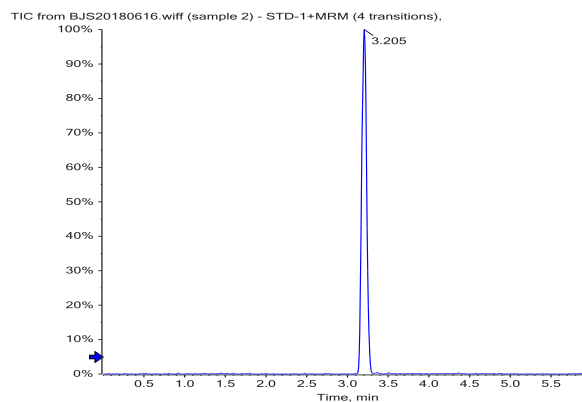


图1. α-卡茄碱

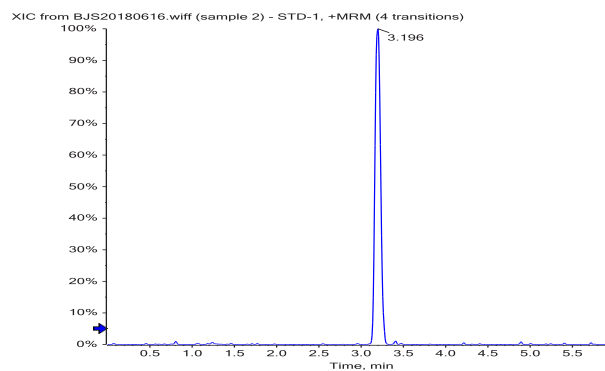


图2. α-茄碱

2.2 方法考察了回收率、重复性、线性等

实验选取茄科蔬菜中的土豆作为空白基质，空白基质样品 α - 茄碱和 α - 卡茄碱两个化合物 1, 2, 10 ng/mL 三个浓度，分别进行 6 平行加标，平均回收率 90%~105% (n=6) (表 3)，相对标准偏差小于 2% (表 3)，基质加标曲线相关系数 $r > 0.998$ (图 3)，表明线性关系良好，该实验方法完全满足标准定量检测的要求。

表3. 空白基质样品 α-茄碱和 α-卡茄碱1, 2, 10 ng/mL的加标重复性

化合物名称	浓度 (ng/mL)	平均回收率 %	相对标准偏差% (n=6)
α-卡茄碱	1	90.4	1.9
	2	102.3	1.7
	10	100.2	1.2
α-茄碱	1	104.3	2.0
	2	98.2	1.7
	10	101.2	1.9

3 小结

本文采用高效液相色谱串联质谱建立了茄科蔬菜样品中 α-茄碱和 α-卡茄碱的快速检测方法, 该方法灵敏度高、稳定性好等优点, 足以满足《土豆及其制品中 α-茄碱和 α-卡茄碱的测定》BJS 201806 检测要求, 在食品、卫生等相关检测单位有重要的参考意义。

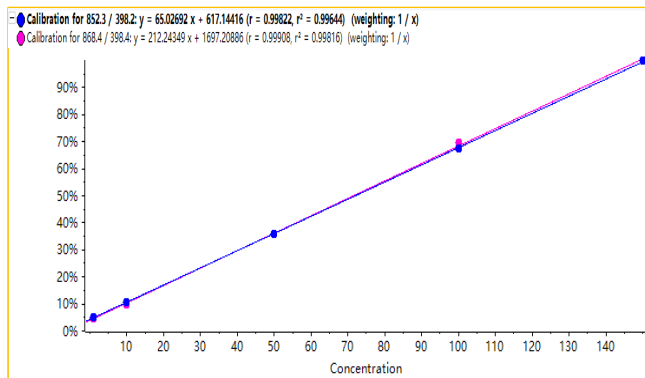


图3. α-茄碱和 α-卡茄碱的线性校正回归曲线

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息, 请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标, 也包括相关的标识、标志的所有权, 归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在和美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14671-ZH-A