

LC-MS/MS 法测定甘蔗及甘蔗汁中 3- 硝基丙酸残留量

LCMSMS-690

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用系统建立了一种测定甘蔗及甘蔗汁中 3- 硝基丙酸残留量的方法。该方法可以在 5 min 内完成样品的分析检测，3- 硝基丙酸在 5~500 ng/mL 浓度范围内均具有较好的线性关系，线性相关系数大于 0.997，各校准点准确度为 90.9~107.6%，所有组分保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.176~0.246% 和 0.649~1.360% 之间，加标回收率在 82.0%~85.7% 之间。3- 硝基丙酸残留物的 LOD 为 0.58 ng/mL，LOQ 为 1.77 ng/mL。该方法操作简捷、灵敏度高、分析速度快，满足甘蔗及甘蔗汁中 3- 硝基丙酸残留物的定性定量分析。

关键词： 三重四极杆串联质谱 甘蔗 3- 硝基丙酸

3- 硝基丙酸 (3-nitropropionic acid, 3-NPA) 是由病原菌节菱孢菌和米曲霉菌等所产生的毒性代谢产物，主要来源于霉变的甘蔗。3-NPA 是白色结晶化合物，溶于甲醇、水、乙腈及丙酮等溶剂。3-NPA 是一种强烈的嗜神经毒素，会损害中枢神经系统，干扰细胞内酶的代谢。食用变质的甘蔗会引起呕吐、腹泻甚至抽搐、昏迷，重症患者往往留有后遗症。我国历年均有因误食霉变甘蔗导致中毒的报道。

中国是甘蔗生产大国，广泛种植于福建、广东等南方地区。甘蔗中毒容易发生在我国北方各省冬春季节，2、3 月份为发病高峰期。春天的甘蔗多为冬季的存货，由于储存不当甘蔗极易变质，食用后会导致中毒。3-NPA 对小鼠的半致死量 (half lethal

dose, LD50) 为 50 mg/kg，但国家标准还未确定 3-NPA 对人的致死量。

目前，3-NPA 检测方法主要包括薄层色谱法、气相色谱法、气相色谱串联质谱法及高效液相色谱法等。但薄层色谱法灵敏度不高，只能半定量；气相色谱法需要衍生，操作较为繁琐；甘蔗基质复杂、干扰成分多，若 3-NPA 与干扰成分不能有效分离，则会影响回收率，且对仪器造成污染。在 WST 10-1996《变质甘蔗食物中毒诊断及处理原则》附件中有薄层色谱法，但还没限值规定。本文参考食品补充检验方法 BJS 202205《甘蔗及甘蔗汁中 3- 硝基丙酸的测定》，以期对甘蔗中的 3- 硝基丙酸 (3-NPA) 的定性定量检测提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

输液泵：LC-30AD×2

脱气机：DGU-20A_{5R}

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

系统控制器：CBM-20A

检测器：LCMS-8050 三重四极杆质谱仪

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST-HP C18-AQ 2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm,
(P/N: 227-30807-02, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸 / 水, B 相 - 甲醇

进样体积：5 μL

流速：0.2 mL/min

柱温：30℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1

表 1 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	5
4.00	Pumps	Pump B Conc.	40
4.10	Pumps	Pump B Conc.	5
5.00	Controller	Stop	

质谱条件：

离子源：ESI (-)

接口温度：300°C

接口电压：-2.0 kV

DL 温度：250°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热块温度：400°C

干燥气：氮气 10.0 L/min

扫描模式：MRM

加热气：空气 10.0 L/min

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

中文名	英文名	CAS. No.	离子对	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
3-硝基丙酸	3-nitropropionic acid	504-88-1	118.15>45.95	14	22	19

1.3 样品前处理

1.3.1 甘蔗制备

取不少于 20 g 的去皮甘蔗样品，将其切成若干段，再切成小于 0.5 cm 的块后放入组织搅碎机中搅碎，混匀后置于洁净的容器中密封备用，备样于 -20°C 贮存。样品应及时测定，临用现配。

1.3.2 甘蔗汁制备

充分混匀，直接取用；若不能及时测定，应于 -20°C 贮存。

1.3.3 提取

称取试样 2 g（精确至 0.001 g）于 50 mL 离心管中，加水 10 mL，超声提取 10 min，用磷酸溶液调 pH 至 2.0±0.1，加入 10 mL 乙酸乙酯，涡旋 1 min，10000 r/min 离心 5 min，将上清液转移到另一 50 mL 离心管中，用 10 mL 乙酸乙酯重复提取一次，合并上清液。在乙酸乙酯萃取液中加入磷酸水溶液（pH 2.0）10 mL，涡旋 1 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液。于 45°C 氮气吹至近干，加入水 1.0 mL 溶解残渣，过 0.22 μm 滤膜，取续滤液，上机测定。

1.4 标准品与试剂

标准储备溶液：液标（1000 μg/mL）购于上海安谱，于 -20°C 冰箱保存，备用；

磷酸溶液：量取 10 mL 磷酸，加水 90 mL，混匀；

磷酸水溶液（pH 2.0）：取 100 mL 水，用磷酸溶液调 pH 为 2.0±0.1，混匀。

1.5 标准溶液配制

标准中间溶液：将标准储备溶液用纯化水溶解稀释成 10 μg/mL；

标准工作溶液：将标准中间溶液用纯化水溶解稀释成 1 μg/mL；

标准系列溶液：取适量标准工作溶液，以纯化水稀释，配制成质量浓度分别为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 标准系列溶液，待测，临用现配。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液 MRM 色谱图

按照 1.2 分析条件，分析浓度为 10 ng/mL 的标准溶液，色谱图如图 1 所示。

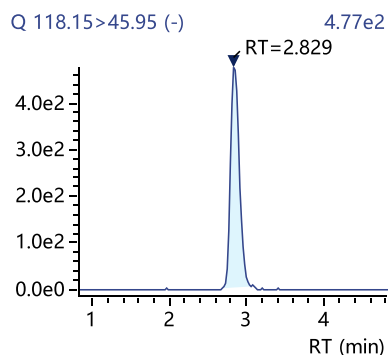


图 1 3-硝基丙酸标准溶液色谱图

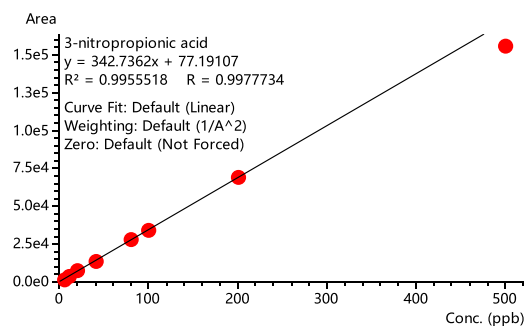


图 2 3-硝基丙酸校准曲线

2.2 线性范围和灵敏度

将不同浓度的标准系列溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，所有化合物均采用外标法定量，以标准系列溶液中 3-硝基丙酸的质量浓度 (ng/mL) 为横坐标，以其对应的峰面积为纵坐标，绘制校准曲线。结果如图 2 所示，3-硝基丙酸在 5~500 ng/mL 浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数大于 0.997，具体结果见表 3。

表 3 校准曲线参数

化合物	标准曲线	相关系数 r	准确度 (%)	线性范围 (ng/mL)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
3-硝基丙酸	$Y=342.7362X+77.19107$	0.997	90.9~107.6	5~500	0.58	1.77

2.3 精密度实验

将浓度分别为 10 ng/mL、80 ng/mL 和 500 ng/mL 的标准溶液参照分析条件连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果见表 4。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.176~0.246% 和 0.649~1.360% 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物	RSD% (10 ng/mL)		RSD% (80 ng/mL)		RSD% (500 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
3-硝基丙酸	0.215	1.360	0.176	0.764	0.246	0.649

2.4 样品测试和加标回收实验

按照 1.3 中样品前处理方法对新鲜甘蔗和甘蔗汁样品进行处理，上机分析，2 份样品中未检测到 3-硝基丙酸残留。对空白样品进行加标回收实验，加标量为 5、25、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，按照 1.2 分析条件进行测试，重复实验 3 次，计算平均回收率。空白溶液和基质前加标色谱图如下图 3 所示。计算结果显示，3-硝基丙酸的平均回收率在 82.0%~85.7% 之间，具体结果见表 5。

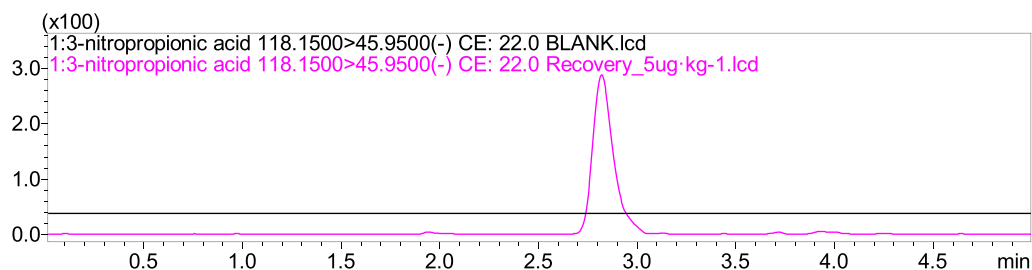


图3 空白溶液和基质前加标色谱图 (5 µg/kg)

表5 回收率结果 (n=3)

化合物	甘蔗样品浓度 (mg/kg)	甘蔗汁样品浓度 (mg/kg)	加标量 (µg/kg)	平均加标回收率 (%)
3- 硝基丙酸	N.D.	N.D.	5	82.0
			25	83.4
			200	85.7

N.D. 表示未检出

■ 结论

本文参照食品补充检验方法 BJS 202205, 采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪建立了甘蔗及甘蔗汁中 3- 硝基丙酸的定量分析方法。结果表明, 3- 硝基丙酸在 5~500 ng/mL 浓度范围内均具有较好的线性关系, 线性相关系数大于 0.997, 准确度在 90.9~107.6%。选 10、80 和 500 ng/mL 三个浓度水平, 连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.176~0.246% 和 0.649~1.360% 之间, 系统精密度良好。同时考察了空白基质加标, 回收率在 82.0%~85.7% 之间。该方法准确可靠, 灵敏度高, 重现性强, 满足食品补充检验方法 BJS 202205 的检测需求, 可供相关人员参考。

岛津应用云

