

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2015)05-0263-06

栽培生理

HPLC法测定马铃薯块茎中糖苷生物碱的含量

曾凡逵¹, 周添红¹, 康宪学², 刘刚^{1*}

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 环境材料与生态化学研究发展中心, 甘肃 兰州 730000;

2. 甘肃薯界淀粉有限公司, 甘肃 定西 730510)

摘要: 商品马铃薯中主要含有2种糖苷生物碱, α -卡茄碱和 α -茄碱, 是由相同的糖苷配基茄啶组成的三糖。这2种物质占马铃薯块茎中糖苷生物碱的95%, 其水解产物, β -、 γ -形式的糖苷生物碱以及茄啶所占的比例相对很低。采用改正的HPLC法测定了马铃薯块茎中 α -卡茄碱和 α -茄碱的含量, 条件为柱子, Inertsil NH₂(5 μ m, 4.0 mm \times 250 mm); 流动相, 乙腈/20 mmol KH₂PO₄(80:20, v/v); 流速, 1.0 mL/min; 柱温, 室温; 二极管阵列检测器, 210 nm; 进样量, 20 μ L。结果表明, 重量为116.98 g, 1/4表皮发绿长有一个5 mm芽的‘陇薯3号’马铃薯块茎当中 α -卡茄碱的含量为150.07 mg/kg, α -茄碱的含量为57.80 mg/kg, 2种糖苷生物碱的总和为207.87 mg/kg。该改正的HPLC法可用于准确测定马铃薯块茎中糖苷生物碱的含量。

关键词: 糖苷生物碱; α -卡茄碱; α -茄碱; HPLC; 马铃薯

Determination of Glycoalkaloids in Potato Tuber by HPLC

ZENG Fankui¹, ZHOU Tianhong¹, KANG Xianxue², LIU Gang^{1*}

(1. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Environmental Materials and Eco Chemical Research and Development Center, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. Gansu Shujie Starch Limited Company, Dingxi, Gansu 730510, China)

Abstract: There are two major glycoalkaloids, α -chaconine and α -solanine in commercial potatoes, both of them being trisaccharides of the common aglycone solanidine. These two compounds comprise about 95% of the glycoalkaloids in potato tubers. Their hydrolysis products, β - and γ -forms and solanidine, may also be presented in relatively insignificant concentrations. An improved HPLC was used to detect the glycoalkaloids in potato tuber. The conditions are column, Inertsil NH₂ (5 μ m, 4.0 mm \times 250 mm); mobile phase, acetonitrile/20 mmol KH₂PO₄ (80:20, v/v); flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, room temperature; PAD detector, 210 nm; and sample size, 20 μ L. The results indicated that a potato tuber of the cultivar 'Longshu 3' with 1/4 green peel and a 5 mm sprout contained 150.07 mg/kg of α -chaconine and 57.80 mg/kg of α -solanine, with the total glycoalkaloids content being 207.87 mg/kg. This improved HPLC method could be used to detect the total glycoalkaloids accurately.

Key Words: glycoalkaloids; α -chaconine; α -solanine; HPLC; potato

可作为食品应用的茄科植物, 如马铃薯、番茄和茄子都含有糖苷生物碱, 是植物的二级代谢产物, 在有机化学中属于甾族类物质^[1]。尽管达到一定浓度具有毒性, 但糖苷生物碱在医药方面具有潜

在的应用价值, 包括降低血液胆固醇、预防鼠伤寒沙门氏菌的感染^[2]和对癌症的化学预防作用^[3]。

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)中的糖苷生物碱主要由 α -卡茄碱和 α -茄碱组成。这2种糖苷生

收稿日期: 2015-01-14

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系专项(nycytx-15); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31301532); 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目(科发人字[2013]165号)。

作者简介: 曾凡逵(1980-), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为马铃薯加工。

*通信作者(Corresponding author): 刘刚, 研究员, 博士, 研究方向为马铃薯加工, E-mail: gangliu@licp.cas.cn。

物碱含有相同的糖苷配基(茄啶),不同的是 α -卡茄碱由1个D-葡萄糖和2个L-鼠李糖组成,而 α -茄碱由1个D-半乳糖、1个D-葡萄糖和1个L-鼠李糖组成。马铃薯糖苷生物碱发生水解时会逐个脱离糖分子,毒性也相应降低。马铃薯糖苷生物碱的含量受到品种、栽培环境和采后贮藏条件(光照、机械损伤等)的影响^[4]。

马铃薯糖苷生物碱具有中枢神经毒性,能造成肝损伤、破坏细胞膜从而危害消化系统和影响新陈代谢,而且这些毒素能耐受高温,烹饪过程(酸辣土豆丝,甚至高温油炸)仍能保持其结构的稳定性和生物活性,因此会有因食用表皮发绿或发芽马铃薯引起中毒的报道,通常认为糖苷生物碱含量低于200 mg/kg的马铃薯是安全的^[5]。勤俭节约的中国人会将马铃薯芽剜掉,将表皮发绿的马铃薯多削一层皮,但这样还是会存在安全隐患,超市货架上摆放的绿皮马铃薯也应该下架。目前国际学术界认可的关于马铃薯糖苷生物碱的安全性, α -卡茄碱的生物活性比 α -茄碱高3~10倍(意味着 α -卡茄碱的毒性更强),2种毒素同时存在会产生协同效应^[6]。

糖苷生物碱含量的测定方法包括HPLC(High performance liquid chromatography)、LC-MS(Liquid chromatograph-mass spectromete)、ELISA(Enzyme linked immunosorbent assa)和生物传感器法^[7]等,EnviroLogix公司已开发出分析糖苷生物碱的ELISA试剂盒。HPLC法通常采用反向色谱柱,这是基于连接到糖苷配基上不同的糖形成整个分子极性的不同。色谱柱可以采用C18柱(Waters公司的Resolve C18, 5 μ m, 3.9 mm \times 300 mm),流动相为35%乙腈和100 mmol磷酸氢二铵(用磷酸将pH值调至3.5),检测波长为202 nm,流速为1 mL/min,温度为室温^[6]。Friedman等^[8]对4根不同氨基柱进行了对比分析并优化了试验条件,发现Inertsil NH₂柱分离效果最好。肖文军等^[9]报道了HPLC法分析马铃薯龙葵素的含量,采用的是Wondasil C18柱(5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm),但只是检测了 α -茄碱。黄红苹等^[10]同样报道了马铃薯块茎中龙葵素含量的测定,采用的是Gmini C18柱(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm),也只是检测了 α -茄碱的含量。

HPLC分析马铃薯糖苷生物碱含量的关键是样品前处理及HPLC条件,HPLC条件当中最关键的是色谱柱和流动相的选择,马铃薯当中 α -卡茄碱

含量比 α -茄碱高,毒性也更大,两者之和大约占马铃薯总糖苷生物碱的95%(其余为 β -、 γ -型),因此开发一种能同时检测 α -卡茄碱和 α -茄碱含量的HPLC技术具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

待检测的马铃薯样品为‘陇薯3号’,2013年收获,品种来自甘肃省农业科学院马铃薯研究所。将1个马铃薯样品置于室温到1/4表皮发绿,自然长出一个5 mm的芽,检测前重量为116.98 g。 α -卡茄碱和 α -茄碱标准品来自ChromaDex公司。

Waters 600-2998型高效液相色谱仪(600型控制器、600型泵、2998型光电二极管阵列检测器、Empower 2软件)。Eppendorf 5810R高速大容量台式冷冻离心机。

1.2 HPLC条件

色谱柱,Inertsil NH₂(5 μ m, 4.0 mm \times 250 mm);流动相,乙腈/20 mmol KH₂PO₄(80:20, v/v);流速,1.0 mL/min;柱温为室温;检测波长210 nm;上样量20 μ L。

1.3 标准曲线绘制

将 α -卡茄碱和 α -茄碱标准品用吡啶配制成20 μ g/mL的溶液,然后分别取适量用流动相稀释成10,5和1 μ g/mL,分别取不同浓度的 α -卡茄碱和 α -茄碱标准溶液20 μ L进行HPLC分析,以糖苷生物碱的量为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.4 糖苷生物碱的提取

参照Friedman等^[8]的方法,将‘陇薯3号’马铃薯样品洗净,不经去皮直接切成薄片,然后用植物粉碎机按物料比1:40加5%乙酸室温下超声10 min萃取糖苷生物碱(对于大批量的新鲜马铃薯样品,可以切成薄片后冷冻干燥再磨成粉,分析时从干粉里萃取即可)。抽滤,再用40 mL 5%乙酸重悬浮滤渣,抽滤后再重复2遍。将所有滤液合并到1个200 mL的锥形烧瓶中,加10 mL浓氨水调pH成碱性将糖苷生物碱沉淀下来。将碱性溶液置于70 $^{\circ}$ C水浴锅中50 min,然后置于4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜。将碱性溶液18 000 r/min离心10 min,然后用2%氨水将沉淀清洗2遍。将沉淀30 $^{\circ}$ C真空干燥,然后溶于四氢呋喃/乙腈/20 mmol KH₂PO₄溶液,18 000 r/min离心10 min,取20 μ L上清液用于HPLC分析。

2 结果与分析

2.1 标准品分析

图1为 α -卡茄碱和 α -茄碱标准品的HPLC图谱, 图1中显示的 α -卡茄碱保留时间为12 min, α -茄碱的保留时间为21 min。试验用HPLC先分别检测了2种纯的糖苷生物碱, 然后将2种糖苷生物碱标准品混到一起再进行了检测。从图1可以看出, 混合以后的2种糖苷生物碱得到了非常理想的分离效果, 而且保留时间与纯的2种糖苷生物碱保留时间一致, 因此本试验采用的HPLC条件适用于马铃薯糖苷生物碱的分析测定。

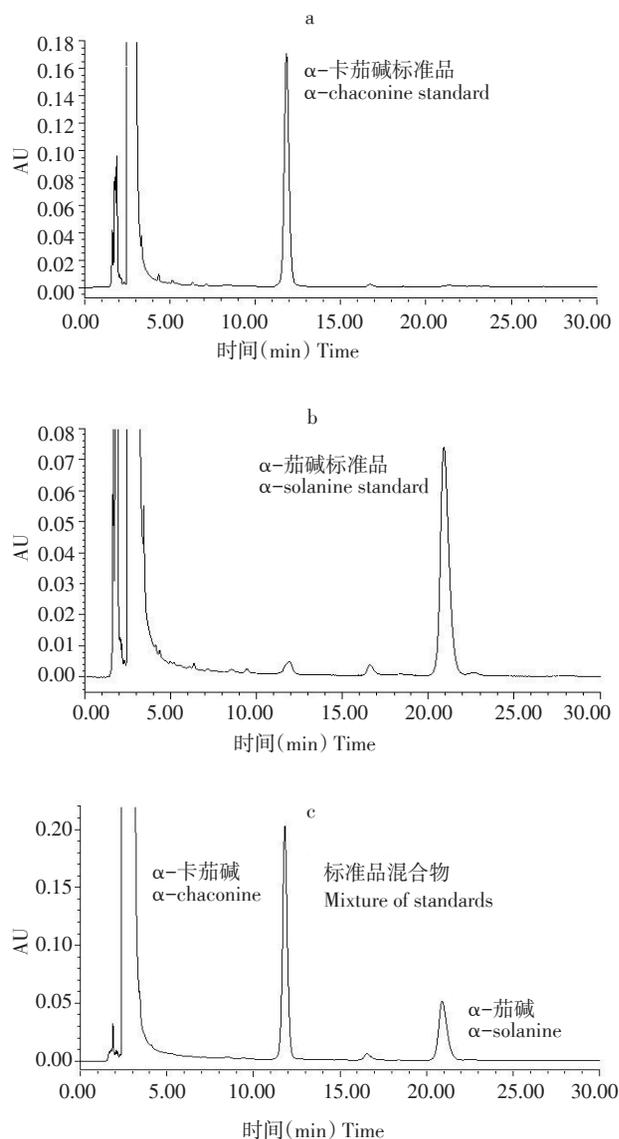


图1 糖苷生物碱标准品的HPLC图谱
Figure 1 HPLC of glycoalkaloids standard

图2为 α -卡茄碱和 α -茄碱测定用的标准曲线, 横坐标为糖苷生物碱的量(μg), 纵坐标为HPLC响应峰的面积积分。经Excel绘图计算, α -卡茄碱标准曲线对应的方程为 $y = 1.8215x + 0.9927$, 决定系数 R^2 为0.9962; α -茄碱标准曲线对应的方程为 $y = 1.5265x + 0.2651$, 决定系数 R^2 为0.9965。2种糖苷生物碱对应的标准曲线相关系数都很理想, 可用于马铃薯块茎中糖苷生物碱含量的测定。

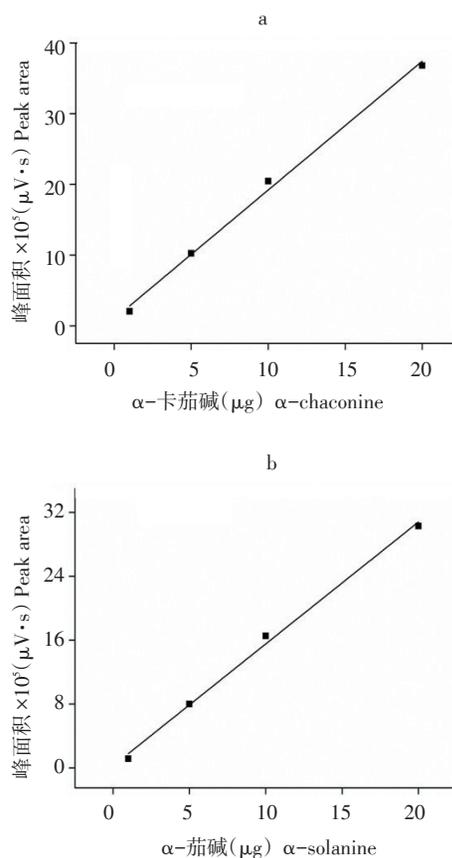


图2 α -卡茄碱(a)和 α -茄碱(b)的标准曲线
Figure 2 Standard curve for α -chaconine (a) and α -solanine (b)

2.2 样品分析

图3为表皮已经发绿的‘陇薯3号’样品中糖苷生物碱的HPLC图谱, 从图3中可以看出 α -卡茄碱和 α -茄碱的保留时间分别为12和21 min, 与标准品的保留时间一一对应。根据标准曲线进行计算得出该马铃薯中 α -卡茄碱和 α -茄碱的含量分别为150.07和57.80 mg/kg, 2种糖苷生物碱的总和为207.87 mg/kg。试验结果表明, 对于一个

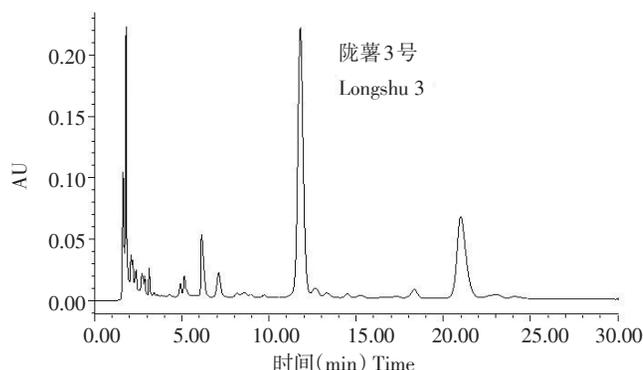


图3 马铃薯‘陇薯3号’块茎中糖苷生物碱HPLC图谱

Figure 3 HPLC of glycoalkaloids from potato tuber of 'Longshu 3'

重量为 116.98 g, 大约有 1/4 表皮发绿的马铃薯(有 1 个 5 mm 的芽)所含的糖苷生物碱量已经超过安全值(200 mg/kg)。

从图 3 还能看出, 在保留时间为 5~8 min 出现了一些杂质峰, 这些峰的响应值比较低, 对待检测的目标糖苷生物碱没有造成干扰, 说明进行高效液相色谱检测前的样品处理比较成功。本试验先采用了 5% 乙酸作为糖苷生物碱萃取液, 随后采用了氨水将糖苷生物碱沉淀下来, 归纳起来可以称为“酸溶碱沉”法, 采用的是弱酸弱碱, 目的是为了保证糖苷生物碱的分子结构完整性。也有文献报道采用其他有机溶剂或者将不同的溶剂进行复配来萃取马铃薯糖苷生物碱, 萃取的原则是将糖苷生物碱尽量萃取出来, 但如果杂质过多对后期的检测会产生不利影响, 本试验采用超声波辅助萃取, 对于缩短萃取时间起到了关键作用。

3 讨论

HPLC 法测定马铃薯糖苷生物碱含量的关键是样品前处理及 HPLC 条件, 从目前的文献分析可以看出, 选择的检测波长多为 210 nm(或 208 nm), 该波长已经为高效液相色谱紫外检测器的最低波长。本试验采用的 Waters 2998 光电二极管阵列检测器能生成三维谱图, 如图 4 所示。

从图 4 中可以看出, 随着检测波长增加(210~230 nm), 2 种糖苷生物碱的响应值均降低, 因此采用 210 nm 是比较理想的检测波长。

目前中国马铃薯研究方面的学者描述马铃薯毒素多采用“龙葵素(Solanine)”这个概念, 而国外常采用“糖苷生物碱(Glycoalkaloids)”。糖苷生物碱包含了卡茄碱(Chaconine)和茄碱(Solanine), 二者之和占马铃薯总糖苷生物碱的 95%。“龙葵素”从

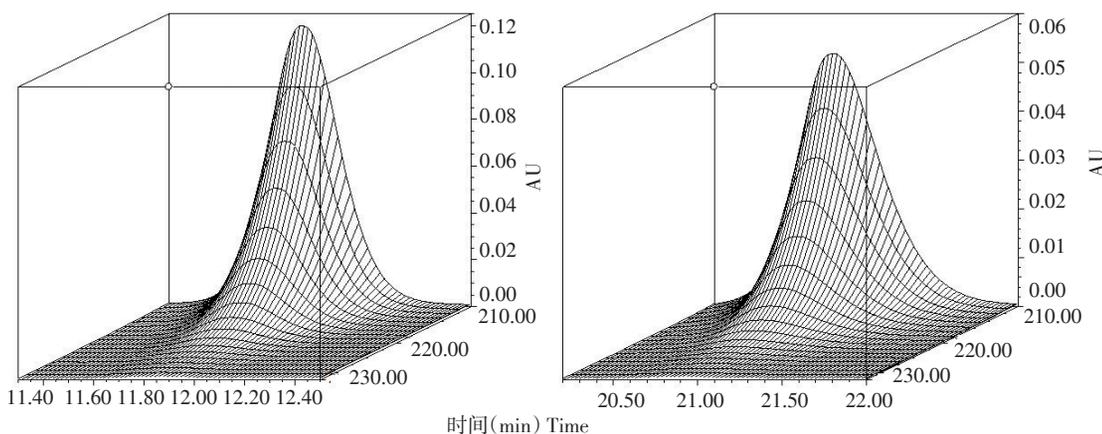


图4 α -卡茄碱(左)和 α -茄碱(右)的三维吸收光谱图

Figure 4 Three-dimensional absorption spectra of α -chaconine (L) and α -solanine (R)

字面上只是指茄碱, 因此使用糖苷生物碱更为准确。 α -卡茄碱比 α -茄碱的含量高2~3倍, 毒性也更强。200 mg/kg是指总糖苷生物碱的含量, 如果只检测了 α -茄碱就套用200 mg/kg的标准, 表面上绿皮马铃薯是安全的, 但总糖苷生物碱已经存在超标的风险。因此, 理想的计算方法是既检测 α -卡茄碱又检测 α -茄碱, 将二者之和除以0.95

所得值看有没有超过200 mg/kg。另外“打碗花精”生物碱(Calystegine alkaloids)也是一种比较重要的马铃薯毒素, 该毒素最先在打碗花(与喇叭花相似, 但不是同一种)中发现, 国外对马铃薯打碗花精报道较多, 通过对国内文献数据库检索, 目前尚无马铃薯打碗花精方面的研究报道。

α -卡茄碱和 α -茄碱在强酸性条件下会发生水

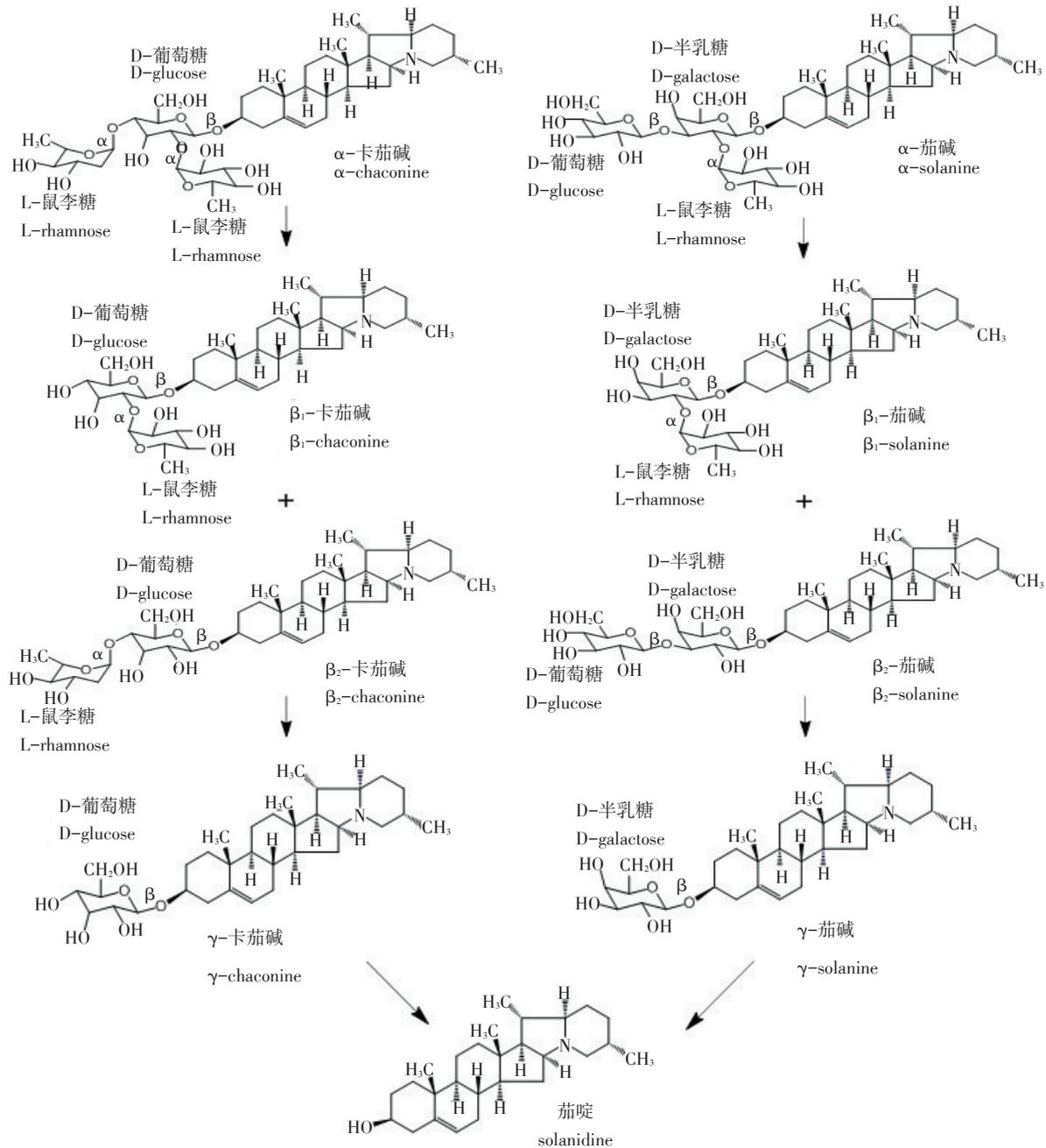


图5 马铃薯糖苷生物碱 α -卡茄碱和 α -茄碱及其水解产物(代谢产物)结构

Figure 5 Structures of potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine, and hydrolysis products (metabolites)

解, Friedman^[1]对酸水解马铃薯 α -卡茄碱和 α -茄碱进行了报道。2种糖苷生物碱在水解过程中逐个脱除糖分子, α -卡茄碱水解过程中先脱除一个L-鼠李糖生成 β_1 -卡茄碱或 β_2 -卡茄碱, 继续水解脱除另一个L-鼠李糖生成 γ -卡茄碱, 最后水解脱除D-葡萄糖分子生成茄啶(图5)。以相同的方式, α -茄碱水解过程中先脱除一个D-葡萄糖生成 β_1 -茄碱或先脱除一个L-鼠李糖生成 β_2 -茄碱(随即), 继续水解脱除一个L-鼠李糖或D-葡萄糖生成 γ -茄碱, 最后水解脱除D-半乳糖分子同样得到茄啶。

Rayburn等^[12]已经报道马铃薯糖苷生物碱的水解产物 β -、 γ -形式的糖苷生物碱及糖苷配基(茄啶)的毒性比 α -卡茄碱和 α -茄碱低, 该发现在马铃薯加工研究方面具有重要用途。马铃薯浓缩蛋白是从马铃薯淀粉厂排放的工艺水中回收的蛋白质, 该蛋白质中有糖苷生物碱残留, 中国马铃薯淀粉厂通常采用不适宜鲜食的马铃薯作为淀粉生产原料, 小薯、烂薯和绿皮薯更增加了马铃薯浓缩蛋白中糖苷生物碱残留的可能性。Tusche等^[13]采用马铃薯浓缩蛋白作为饲料添加剂(补充蛋白)对虹鳟鱼的试验结果表明, 残留的糖苷生物碱会降低虹鳟鱼的日增重量。Refstie和Tiekstra^[14]将马铃薯浓缩蛋白中的糖苷生物碱去除后, 替代40%鱼粉蛋白喂养大西洋鲑鱼, 结果表明应用和消化效果良好。

[参 考 文 献]

- [1] Friedman M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(21): 5751-5780.
- [2] Gubarev M I, Enioutina E Y, Taylor J L, *et al.* Plant-derived glycoalkaloids protect mice against lethal infection with *Salmonella typhimurium* [J]. *Phytotherapy Research*, 1998, 12(2): 79-88.
- [3] Friedman M, McQuistan T, Hendricks J D, *et al.* Protective effect of dietary tomatine against dibenzo[a,l]pyrene (DBP)-induced liver and stomach tumors in rainbow trout [J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2007, 51(12): 1485-1491.
- [4] Machado R M D, Toledo M C F, Garcia L C. Effect of light and temperature on the formation of glycoalkaloids in potato tubers [J]. *Food Control*, 2007, 18(5): 503-508.
- [5] Mensinga T T, Sips A J, Rompelberg C J, *et al.* Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2005, 41(1): 66-72.
- [6] Friedman M, Levin C E. Analysis and biological activities of potato glycoalkaloids, calystegine alkaloids, phenolic compounds, and anthocyanins [M]/Singh J, Kaur L. *Advances in Potato Chemistry and Technology*. Burlington: Academic Press, 2009: 127-162.
- [7] Arkhypova V N, Dzyadevych S V, Jaffrezic-Renault N, *et al.* Biosensors for assay of glycoalkaloids in potato tubers [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2008, 44(3): 314-318.
- [8] Friedman M, Roitman J N, Kozukue N. Glycoalkaloid and calystegine contents of eight potato cultivars [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(10): 2964-2973.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Friedman M. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(23): 8655-8681.
- [12] Rayburn J R, Bantle J A, Friedman M. Role of carbohydrate side chains of potato glycoalkaloids in developmental toxicity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(7): 1511-1515.
- [13] Tusche K, Berends K, Wuertz S, *et al.* Evaluation of feed attractants in potato protein concentrate based diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 2011, 321(1-2): 54-60.
- [14] Refstie S, Tiekstra H A J. Potato protein concentrate with low content of solanidine glycoalkaloids in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 2003, 216(1-4): 283-298.