

土豆中配糖碱的测定 (综述)

刘昭清综述 徐晋康审校

(卫生部食品卫生监督检验所)

在土豆中存在的主要配糖碱(glyco-alkaloid)有 α -茄碱(α -solanine)和 α -卡茄碱(α -chaconine)及其代谢物(图1), 其中前二者占95~99%。配糖碱具有特殊的苦味, 其含量与土豆品种, 栽培条件及收获后处理与贮存有关, 而且, 物理或化学的代谢抑制、光照射等都可能产生配糖碱^[1-3]。这些配糖碱具有急性毒性和可能的慢性毒性, 现普遍认为, 人食用的土

豆中, 其含量不得超过 20 mg/100g^[3-5]

Coxon 对配糖碱的分析方法作过综述^[6], 其中包括滴定法、比色法、气相色谱法, 薄层色谱法、高压液相色谱法, 放射免疫法和酶连接免疫吸附分析法。这些方法都可用于测定土豆中的配糖碱总量(TGA)和(或)单个配糖碱的量。配糖碱的定量测定可分为两步: (一)初级提取, (二)提取液进行澄清、富集等再处理后, 用不同方

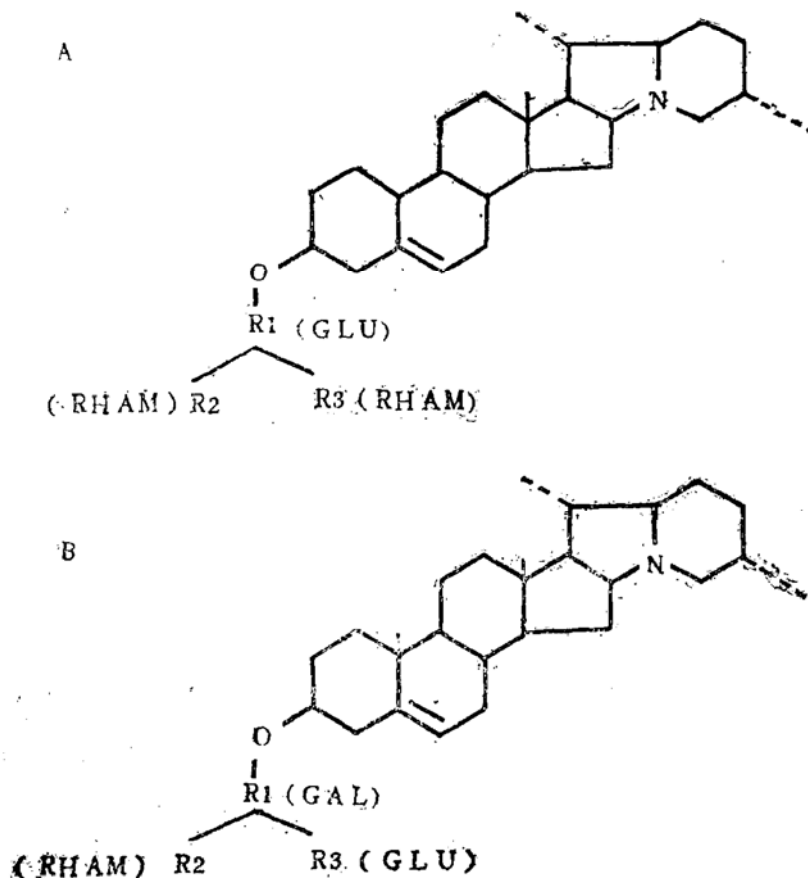


图 1. 土豆中配糖碱的结构。A: α -卡茄碱 ($R_1 + R_2 + R_3$), B1-卡茄碱 ($R_1 + R_2$), B2-卡茄碱 ($R_1 + R_3$), α -茄碱 (R_1); B: α -茄碱 ($R_1 + R_2 + R_3$), B1-茄碱 ($R_1 + R_2$), B2-茄碱 ($R_1 + R_3$), α -茄碱 (R_1)。

法进行定量测定。

1. 初级提取

将配糖碱从土豆中提取出来,所使用的萃取剂见表1,主要是利用它们的盐溶于水或极性溶剂这一性质。氯仿/乙醇双溶剂法比3%乙醇索氏提取法能获得更多的配糖碱^[7],但其回收率仍不高,变化较大^[15]

Bushway等人^[14]用HPLC分析测定表明,Carman等人^[13]的酸性萃取剂不如甲醇/氯仿/乙酸抽提效率高,前者易水解被提取的分析物。对干的土豆产品,Bushway等人采用THF/水/乙腈/乙酸提取,该法也十分有效。

表1 提取土豆中配糖碱所用萃取剂

萃 取 剂 组 成	体 积 比 (或 百 分 数)	提 取 方 法 [*]	参 考 文 献
甲醇	—	回流或匀浆	[11]
95%乙醇/乙酸	100:3	索氏抽提	[10]
氯仿/甲醇	2:1	匀浆	[7]
醋酸溶液	1—3%	超声匀浆	[12]
戊烷醇/乙醇/水	4g/1000/10	匀浆	[13]
THF/H ₂ O/乙腈	50:30:20	匀浆	[8]
甲醇/水/乙酸	92:5:3	匀浆	[9]
甲醇/氯仿/冰醋酸	67:33:1	匀浆	[14]
THF/水/乙腈/冰醋酸	50:30:20:1	匀浆	[14]

* 匀浆在韦林氏混合器中进行

2 定量测定方法

2.1 滴定或比色法测定配糖碱总量(TGA)

Fitzpatrick和Osman^[16]在1974年报道了一个非水滴定配糖碱基(aglycone)的测定方法,他们利用Wang等人^[7]的双溶剂萃取法,分离得到的TGA溶液经干燥、再溶于2NH₂SO₄,水解得到配糖碱基,用苯在碱性溶液中反萃,最后在水甲醇溶液中,以溴酚氯作指示剂,用10%酚滴定。该法测定的是碱基部分的碱性氮,它能定量所有的配糖碱基,速度快,无需特殊设备,但精度和可靠性差,标准回收率低,变化大,需作回收因子校正^[15, 17]。Bushway改进了上述方法,用氨沉淀法代替水解和反萃,使加入土豆中的 α -茄碱得到了定量的回收^[18]。对上述方法的另一种改进是用

5%的乙酸提取,氨沉淀配糖碱,再水解得配糖碱基,进行滴定测量^[23]。

比色法已被广泛使用,该法需将配糖碱从土豆中提取出来。所用显色剂有:浓硫酸—甲醛(Marquis试剂),85%磷酸—1%多聚甲醛,SbCl₃—浓盐酸和溴百里酚兰。早在1931年,浓硫酸—甲醛法就被使用^[21]随后又进行了多次改进^[19, 20],该法是将浓硫酸加到待测溶液中,在3min后加入甲醛,过2min后进行比色,即可获得重复性好的结果。Clarke随后发现由85%磷酸和1%多聚甲醛组成的试剂,能同配糖碱形成有色产物^[22]。sanford和Sinden的SbCl₃—浓HCl法是使用最广的方法^[24],但它只能定量 Δ -5-不饱和配糖碱,可测定茄啶类衍生物(占土豆中配糖碱的95~99%),对TGA测定可靠。然

而, 该法耗时间, 比色用试剂有毒。Blincow和Davies等人^[25]在Coxon等人^[17]方法的基础上, 找到了一个快速测定土豆中TGA方法^[25], 他们用稀硫酸提取并水解配糖碱, 得到的配糖碱基被萃入二氯乙烷中, 为防止乳化, 萃取前用Carrez试剂A或B沉淀除去蛋白质, 加溴百里酚兰染料进行比色定量。

2.2 薄层色谱法 (TLC)

TLC法多使用硅胶板对配糖碱或其

碱基部分进行分离, 用碘或 $SbCl_3$ 等显色, 它作为定性鉴定十分有用, 但定量较困难。尽管如此, 利用TLC和光密度计对土豆中TGA或(和)单个配糖碱定量分析仍有不少报道(表2), 其中使用荧光增亮剂(如芪二磺酸型)显色, 荧光检测分析 α -茄碱和 α -卡茄碱的方法十分有用^[29], 此法快速、简便, 制备和定量分析误差范围为2.5~5.5%, 是一个很有前途的方法。

表2 硅胶TLC定量分析土豆中配糖碱的方法

展 开 剂 (体 积 比)		显 色 剂	参考文献
氯仿/乙醇/1%氨水	2:2:1	$SbCl_3$	[26]
氯仿/乙醇/1%氨水	2:2:1	Dragendorff试剂	[27]
乙醇/水/乙酸	9:9:1	Clarke试剂	[28]
氯仿/甲醇/1%氨水	70:30:5	荧光增白剂	[11]

2.3 气相色谱法 (GC)

气相色谱法可定性定量分析配糖碱及其降解产物, 对完整的配糖碱, 常采用衍生物法。Herb等人^[30]使用Fitzpatrick和Osman双溶剂提取配糖碱, 得到的甲醇溶液经干燥、在DMSO中甲基化后, 萃入苯中, 330℃, 在3%OV1柱上进行定性和相对定量测定, 由于温度高, 柱使用寿命短。Roosen—Runge和Schneider^[31]采用吡啶索氏提取冻干土豆中的配糖碱, 除去吡啶, 残渣溶于柠檬酸, 用氨再沉淀配糖碱, 干燥后转变成三甲基硅烷衍生物, 在3%SE30, 280℃进行GC测定。Rodrick^[32]报道了一个测定土豆中配糖碱的奇特方法, 该法根据这些配糖碱在乙醇中同豆甾醇形成复合物的性质, 间接测定 α -茄碱和 α -卡茄碱。配糖碱分子量大, 对热不稳定, 气相色谱法过程繁琐, 测定温度高, 现在很少使用, 而更多地采用高压液相色谱法。

2.4 高压液相色谱法 (HPLC)

近年来, 高压液相色谱法越来越多地用于测量土豆中的配糖碱, 它分析速度快, 准确度高, 能分析TGA以及单个配糖碱。自从Bushway^[8]最先报道用HPLC分析土豆中配糖碱后, 已进行了广泛的研究(表3)。测定时, 常用UV检测器, 为保持高灵敏度和各配糖碱灵敏度一致, 最适检测波长为195~210nm, 溶剂选择很受限制只能选择水、乙腈、THF、低分子量醇和饱和烃及其混合物。Morris^[34]比较了不同方法的检测灵敏度, 认为UV—检测器比折光指数检测器灵敏度高得多。各溶剂对灵敏度影响也很大, 在200nm, 使用乙腈/水流动相比, 在215nm使用THF/水/乙腈灵敏约10倍^[8], 也比甲醇/水灵敏。乙腈/水作流动相的检测限为0.1 μg 。

配糖碱一般用表1中的方法提取, 为防止提取液中物质的氧化而影响检测灵敏度, 常加入1%亚硫酸钠。粗提取液需经清除或澄清后才能进行HPLC测量。氨沉淀是一

一个很经典的方法,但很费时间,Bushway早期就使用这种澄清方法[8、9、33]。现在均采用C₁₈柱预分离,富集和澄清,该法方便、快速,已被Bushway[14]、Carman[13]、Hellenas[17]等人使用,得到了满意的结果。

表3列出的HPLC法中,都能分离和定量土豆中的 α -茄碱和 α -卡茄碱,分析时间在6min之内完成[14、13、12、33]。

Morris[34]报道,使用反相的C₈或C₁₈柱,在乙腈/水流动相中加入少量乙醇胺能加快分析速度3~6min,同时发现,该方法可分离出某些 α -茄碱或 α -卡茄碱的代谢物。Bushway等人[8、9、33]对分离分析 α -茄碱与 α -卡茄碱及其代谢物作过许多研究,他们采用Radial-PakNH₂柱和糖分析柱分离或分析了这些中间代谢物。

表3 HPLC分析土豆中配糖碱的方法

澄清方法	层析柱类型	流动相(V/V)	检测波长(nm)	参考文献
C ₁₈ Sep—PaK 柱富集法	反相u—BondapaK NH ₂ (30cm×4mm)	THF/0.32%KH ₂ PO ₄ /乙腈(50:25:25)	208	[14]
C ₁₈ Sep—PaK 柱富集法	5 μ m 辛基(C ₈)球形硅胶 25cm×4.6mm	0.116%(NH ₄) ₃ PO ₄ /乙腈(1:1)	202	[13]
C ₁₈ Sep—PaK 柱富集法	5 μ m Shandon ODS— hgperasil(25cm×4.6mm)	乙腈/水/乙醇胺 (PH4.5—4.6)36:65:0.05	202	[12]
氨沉淀再溶解 于淋洗液中	u—BondapaK C ₁₈	THF/乙腈/水 (50:30:20)	208	[8]
	反相u—BondapaK NH ₂ 柱	THF/0.34%KH ₂ PO ₄ /乙腈(50:25:25)	208	
	糖分析柱	THF/水/乙腈 (56:14:30)	208	
氨沉淀再溶解 于淋洗液中	糖分析柱	THF/乙腈/水 (55:37:8)	215	[9]
	Radial—PaK NH ₂ 柱 (10cm×8mm)	THF/乙腈/水/甲醇 (55:25:155:95)	215	[33]
—	C ₈ Radial—PaK	乙腈/乙醇胺/水 (45:0.1:55)	200	[34]
	C ₁₈ Radial—PaK (10cm×8mm)	乙腈/水/乙醇胺 (55:45:0.1)		

2.5 免疫分析法:

配糖碱的免疫分析法是一个灵敏、特异、快速、价廉的方法,很适合于常规的大量样品的分析。该法包括放射免疫法(RIA)和酶联免疫吸附分析法(ELISA)。1979年,Vallejo和Ercegovich[38]发表了RIA分析茄碱的方法,但该方法并不很理想。他们用茄碱—半琥珀酸—牛血清白蛋白连接体免疫兔子,产生抗血清,以纯茄碱

为标准,以5、6—(3H—二氢)—茄碱为放射标记半抗原,进行测定,所得抗血清滴定度低,分析时只能稀释到1/25,而且结合配糖碱相当少,必须在分析前进行水解,才能得到满意的结果,从而增加了分析时间。

Morgan[36、37、40]发展了ELISA法测定配糖碱,用于食品分析,它简单、灵活、便宜,不存在放射性废物处理问题。同

传统化学分析法比较, 所得结果一致。该法测定土豆中的配糖碱, 不需要对初提液处理就能分析, 相信会得到广泛应用。

3 结论

各种不同方法各有其特点。比色与滴定法要求设备简单, 易推广应用。ELISA法虽也不需要大型设备, 但它必须首先制备出抗体, 该法在大批量样品检测时能显示其优点, 能分析小至 $2\mu\text{g}/100\text{g}$ 浓度TGA并且首次被Matthew^[39]测定人血清中茄啉的量, 这将会促进配糖碱的代谢研究。荧光增亮显色测定的TLC法, 在测定TGA和单个配糖碱也很有实用价值, 现在应用更多的是HPLC法, 它不仅能快速定性定量分析TGA和单个配糖碱, 还可用于分离提纯。

参 考 文 献

- [1] Jadhav S J, Sharma R P, and Salunkhe DK, CRC Crit. Rev. Toxicol. 9, 21 1981
- [2] Sinden SL, Sanford LL, and webb RE, Am. Potato J. 61, 115, 1984
- [3] Nair PM, Behere AG, and Ramaswamy NK, J. Scient. Ind. Res. 40, 529, 1981
- [4] Osman SF, Food Chem. 11-235, 1983
- [5] Morris SC, Lee TH, Food Technol. Aust. 36, 118, 1984
- [6] Coxon DT, Am. Potato J. 61, 169, 1984
- [7] Wang SL, Bedford CL, and Thompson NR, Am. Potato J. 49, 302, 1972
- [8] Bushway RJ, Baden ES, Bushway AW, and Bushway A, J. Chromatogr. 178, 533, 1979
- [9] Bushway RJ, J. Liq. Chromatogr. 5, 1313, 1982
- [10] Morgan MRA, Coxon DT, Bramham SC, Henry WS, Van Gelder WMJ, Allison MJ, J. Sci. Food Agric. 36, 282, 1985
- [11] Jellema R, Elema ET, and Maligre TM, Potato Res. 25, 247, 1982
- [12] Hellenas KE, J. Sci. Food Agric. 37, 776, 1986
- [13] Carman AS Jr., Kuan SS, Ware GM, Francis DJ Jr., and Kirchenheuter GD, J. Agric. Food Chem. 34, 279, 1986
- [14] Bushway RJ, Bureall JL, and King J, J. Agric. Food Chem. 34, 277, 1986
- [15] Mackenzie JD, and Gregory P, Am. Potato J. 56, 27, 1979
- [16] Fitzpatrick TJ, and Osman SF, Am. Potato J. 51, 318, 1974
- [17] Coxon DT, Price KR, and Jones FG, J. Sci. Food Agric. 30, 1043, 1979
- [18] Bushway RJ, Wilson AM, and Bushway AA, Am. Potato J. 57, 561 1980
- [19] Baker LC, Lampitt LH, and Meredith OB, J. Sci. Food Agric. 6, 197, 1955
- [20] Gull DD, and Isenberg FM, Proc. Am. Soc. Horticult. S.

- ci. 75, 545, 1960
- [21] Alberti B, Z. Lebensm. Unters. Forsch, 64, 260, 1932
- [22] Clarke E G C, Nature (London) 181, 1152, 1958
- [23] Spornio, JJ, Pell EJ, Am. Potato J. 57, 537, 1980
- [24] Sanford L L, and Sinden S-L, Am. Potato J. 49, 209, 1972
- [25] Blincow PJ, Davies A M C, Bintcliffe E J B, Clydesdale A, Draper S R, and Allison M J, J. Natn. Agric. Bot 16, 92, 1982
- [26] Cadle L S, Stelzig D, Harper K L, and Young R J, J. Agric. Food Chem. 26, 1453 1978
- [27] Ahmed S S, and Muller K, Lebensm-Wiss-Technol. 11, 144, 1978
- [28] Coxon D T, and Jones P G, J Sci Food Agric 32, 366, 1981
- [29] Jellema R, Elema E T, and Malingre T M, J. Chromatogr. 210, 121, 1981
- [30] Herb S F, Fitzpatrick T J, and Osman S F, J. Agric. Food Chem. 23, 520, 1975
- [31] Roosen-Runge C, and Schneider E, Z. Lebensm. Unters-Forsch 164, 96, 1977
- [32] Roddick J C, Phytochemistry, 19, 2455, 1980
- [33] Bushway R J, Chrom. 15, 108, 1982
- [34] Morris S C, J. Chromatogr. 219, 403, 1981
- [35] Morgan M R A, Mc Nerney R-M, Jennifer A, Coxon D T, and Chan H W S, J. Sci. Food Agric. 34, 593, 1983
- [36] Morgan M R A, Mc Nerney R, Coxon D T, and Chan H W S, Immunoassays Food Anal. (Proc. Symp.) 1983 (Pub., 1985), 187
- [37] Morgan M R A, Coxon D T, Brambam S, Chan H W S, Van Gelder W M J, and Allison M J, J. Sci. Food Agric. 36, 282, 1985
- [38] Vallejo R P, and Ercegovich C D, NBS spec. publ. (U.S.) 519, (Trace Org. Anal. New Front Anal. Chem.) 333, 1979
- [39] Matthew J A, Morgan M R A, Mc Nerney R, Chan H W S, and Coxon D T, Food and Chemical Toxicology 21, 637, 1983
- [40] Ward C M, Franklin J G, and Morgan M R A, Food Additives and Contaminants 5, 621 1988