

实验技术与方法

超高效液相色谱-高分辨质谱法同时测定茶叶中
15 种吡咯里西啶类生物碱许秀丽¹, 许博舟¹, 王茜¹, 齐春艳^{1,2}, 王秀娟¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 2. 广东省食品检验所, 广东 广州 510435)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-高分辨质谱法同时测定茶叶中 15 种吡咯里西啶类生物碱(PAs)的分析方法。方法 以甲醇甲酸水溶液作为提取溶剂,经超声提取,采用阳离子交换(MCX)固相萃取柱净化,以 4.0 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.1%甲酸)和甲醇为流动相梯度洗脱,HSS T3 柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm)分离,在正离子模式下采用高分辨质谱全扫描-数据非依赖性采集模式(Full MS/DIA)。结果 基于数据采集结果,将吡咯里西啶类生物碱分为 3 类,筛选出 3 类不同的特征结构碎片离子。15 种吡咯里西啶类生物碱在 0.5~200 μg/L 的范围内线性关系良好($R^2>0.99$),检出限和定量限分别为 0.35~4.69 μg/kg 和 1.18~11.17 μg/kg。采用该方法对 20 例市售茶叶样品进行分析,1 例菊花茶样品检出千里光碱,其余均低于方法检测下限。结论 本方法灵敏度高、重现性好,可满足茶叶中 15 种吡咯里西啶类生物碱的测定要求。

关键词:茶叶;超高效液相色谱-高分辨质谱;特征结构碎片离子;吡咯里西啶类生物碱;高通量筛查

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)06-0783-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.06.025

Simultaneous determination of pyrrolizidine alkaloids (PAs) in tea by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry

XU Xiuli¹, XU Bozhou¹, WANG Han¹, QI Chunyan^{1,2}, WANG Xiujuan¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;

2. Guangdong Institute of Food Inspection, Guangdong Guangzhou 510435, China)

Abstract: Objective To establish an analysis method for simultaneous determination of 15 kinds of pyrrolizidine alkaloids (PAs) in tea by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Methods** Formic acid aqueous solution and methanol were used as extraction solvent. After the ultrasonic extraction and MCX solid phase extraction purification, the analytes were separated with HSS T3 chromatographic column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) using 4.0 mmol/L ammonium formate solution (0.1% formic acid inclusive) and methanol as mobile phase for gradient elution. Finally, the eluents were determined by full scan/data independent acquisition (Full MS/DIA) of high resolution mass spectrometry in positive mode. **Results** Depending on the comprehensive data, the characteristic structural fragment ions of 3 kinds of PAs were screened out. Good linearities in the range of 0.5-200 μg/L were observed for 15 kinds of PAs ($R^2 > 0.99$), the limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs) were 0.35-4.69 μg/kg and 1.18-11.17 μg/kg, respectively. In this study, 20 commercial tea samples were analyzed using this method, and Jacobine was detected in 1 *camomile tea* sample, all the other measured values were lower than the LODs in the method. **Conclusion** This method has high sensitivity and stability, can meet the simultaneous detection requirements of 15 kinds of PAs in tea.

Key words: Tea; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry; pyrrolizidine alkaloids; high-throughput screening

吡咯里西啶类生物碱(Pyrrolizidine alkaloids, PAs)是一类含氮碱性有机化合物,是有花植物为防御食草性动物而产生的一种次生代谢产物,广泛存在于植物草药中^[1-2]。PAs具有三致毒性,即致癌、致畸和致突变^[3-4],其主要危害的部位是肝脏,食用被其污染的食品可能引起肝窦梗阻综合征,从

收稿日期:2021-10-14

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1602702)

作者简介:许秀丽 女 研究员 研究方向为食品安全

E-mail:xuxiuli_78@163.com

通信作者:王秀娟 女 副研究员 研究方向为分析化学

E-mail:xjwangcaiq@163.com

而导致急性或慢性疾病^[5]。过去的几十年中,全球范围内人或牲畜的 PAs 中毒病例均有报道^[6],各国风险评估机构对 PAs 的每日摄入量也都有限制,其中最严格的是奥地利,规定在最终产品中不得检出 PAs^[7-8]。在瑞士和德国,植物药草中建议成年人每日最大 PAs 摄入量为 1 μg ,如果使用期限超过 6 周,则每日最大摄入量降低至 0.1 μg ^[9]。2013 年,德国联邦风险评估研究所(Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR)开展的茶叶产品中吡咯里西啶类生物碱含量研究,对茶叶、花草茶、药茶当中的吡咯里西啶类生物碱进行了检测,发现部分茶叶、花草茶产品当中的 PAs 含量较高^[10]。虽然 BfR 表示,本次检出的 PAs 含量较高的产品不会对人体造成急性损害,但如果长期食用会危害儿童、孕妇以及哺乳期妇女的健康。且尚没有国家颁布关于茶叶中 PAs 的限量标准及相应检测方法标准。

目前,PAs 的检测方法主要包括薄层色谱法(Thin-layer chromatography, TLC)^[11-12]、免疫分析法^[13-15]、核磁共振法(Nuclear magnetic resonance spectroscopy NMRS)^[16]、气相色谱法(Gas chromatography, GC)^[17]、液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)^[18]和液相色谱串联质谱法(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[19-20]等方法。其中 TLC 对复杂基质中 PAs 的痕量分析的灵敏度和选择性较差;免疫分析法虽具有快速、特异性强等特点,但是大多数的抗体只能用于检测目标物结构类似物,方法的适用范围严重受限;NMRS 可用于 PAs 的结构鉴定,但不能进行定量分析。除此之外,由于生物碱高温易分解,因此需要进行繁琐的衍生化操作才可用于 GC 分析,而且 PAs 没有特征性紫外吸收光谱,简单采用 HPLC 的紫外检测器也具有局限性。LC-MS/MS 因其高选择性和高灵敏度^[19],逐步成为近年来的常用分析方法。

本研究利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS),在正离子模式下采用全扫描-数据非依赖性采集(Full scan/data independent acquisition, Full MS/DIA)模式,根据 PAs 的质谱断裂规律,得到 PAs 特征结构碎片离子,其将特征离子与样品提取液中扫描所得离子进行对比,可筛查出吡咯里西啶类生物碱及其结构类似物。本研究通过保留时间、一级精密质量和特征结构碎片离子进行定性,利用一级精密质量进行定量,以保证测定结果的准确性^[21]。本研究经过便捷的样品前处理过程和高效的净化方式,使得

该方法能够准确、高效同时测定易污染茶叶的 15 种吡咯里西啶类生物碱,可为保障我国茶叶安全提供技术参考。更可依据特征结构碎片,实现 PAs 及其结构类似物的高通量筛查,为我国食品安全的风险预警提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器和试剂

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨率质谱仪(UPLC-Q-Orbitrap HRMS,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),超纯水制备仪(美国 Millipore 公司),分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司),针式氮吹仪(天津恒奥科技有限公司),超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司),多功能旋涡混合仪(德国 IKA 公司)。

15 种吡咯里西啶类生物碱:千里光宁碱(CAS 号:130-01-8)、毛果天芥菜碱(CAS 号:303-34-4)、野百合碱(CAS 号:315-22-0)、野百合碱 N-氧化物(CAS 号:35337-98-5)、倒千里光碱(CAS 号:480-54-6)、千里光菲灵碱(CAS 号:480-81-9)、兰薊定(CAS 号:520-68-3)、兰薊定 N-氧化物(CAS 号:41093-89-4)、芝麻菜叶千里光碱(CAS 号:40158-95-0)、欧天芥菜碱(CAS 号:570-19-4)、欧天芥菜碱 N-氧化物(CAS 号:65582-53-8)、天芥菜碱(CAS 号:303-33-3)、天芥菜碱 N-氧化物(CAS 号:6209-65-0)、千里光碱(CAS 号:6870-67-3)、春千里光碱(CAS 号:72755-25-0)标准品(纯度>97%),分别购自美国 Chroma Dex 公司和德国 PhytoLab 公司;乙腈、甲醇均为色谱纯(美国 Thermo Fisher 公司),甲酸为分析纯(百灵威科技有限公司),甲酸铵为色谱纯(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 试样制备

将茶叶样品干燥后研磨成粗粉后,进行细磨,过 250 目筛,称取分析试样后,其余部分储存于样品瓶中常温避光密封保存并标记(>100 g)。

1.2.2 标准溶液的配制

分别称取 10 mg(精确至 0.01 mg)标准品,用甲醇溶解并定容,混匀,配制成质量浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准储备液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。取混合标准储备液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液,-4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,备用。

1.2.3 样品前处理

称取分析试样 1 g(精确至 0.01 g)置于 10 mL

聚丙烯离心管中,加入 5 mL 甲酸甲醇水溶液(1:79.5:19.5, V/V/V),涡旋振荡 10 min 后超声提取 15 min,离心 10 min(4 °C, 10 000 r/min),将上清液全部取出,转移至 10 mL 聚丙烯离心管。重复提取 1 次,合并上清液,充分混合。以 5 mL 甲醇和 5 mL 超纯水活化 MCX 固相萃取小柱,将全部上清液通过活化后的 MCX 固相萃取小柱,用 5 mL 甲醇和 5 mL 超纯水淋洗后,用 5 mL 氨化甲醇洗脱,收集全部洗脱液,涡旋振荡 1 min,混匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,待测。

1.2.4 仪器条件

色谱:UPLC HSS T3 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),柱温 40 °C。流动相 A 为 4.0 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.1% 甲酸),流动相 B 为甲醇,流速 0.3 mL/min。梯度洗脱程序:0~2 min,95% A;2~5 min,

95%~50% A;5~9 min,50%~0% A;9~13 min,0% A;13~15 min,0%~95% A;进样体积 5.0 μL。

质谱:采用电喷雾离子源(Electron spray ionization, ESI),正离子扫描模式,离子传输管温度 350 °C,鞘气压力 275 kPa,喷雾电压 3.5 kV,离子源温度 350 °C,毛细管温度 320 °C。定性定量采集模式为 Full MS/DIA,分辨率为 70 000 FWHM, DIA 扫描时间为 0~15 min,分辨率为 17 500 FWHM,自动增益控制的目标值设定为 50×10^5 ,最大注入时间为 120 ms;信息列表分为 125.000 00、175.000 00、225.000 00、275.000 00、325.000 00、375.000 00、425.000 00、475.000 00、525.000 00、575.000 00,隔离窗口范围设为 50.0 Da,归一碰撞能(Normalized collision energy, NCE)设为 35、45、60,15 种吡咯里西啶类生物碱的质谱参数见表 1。

表 1 15 种吡咯里西啶类生物碱的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters for 15 PAs

序号	化合物	加和离子	理论值	实际值	质量误差 /ppm	保留时间 /min	碎片离子
1	千里光宁碱	[M+H] ⁺	336.180 54	336.181 15	1.81	5.1	94.065 88, 120.080 47, 138.091 67
2	毛果天芥菜碱	[M+H] ⁺	412.232 97	412.233 76	1.92	6.0	120.080 99, 220.133 13
3	野百合碱	[M+H] ⁺	326.159 81	326.160 49	2.08	2.7	94.065 67, 120.080 47, 138.091 66, 149.023 35
4	野百合碱 N-氧化物	[M+H] ⁺	342.154 72	342.155 40	1.99	4.0	94.065 81, 119.072 355, 137.083 76, 236.127 72
5	倒千里光碱	[M+H] ⁺	352.175 46	352.176 06	1.70	4.6	94.065 18, 120.080 36, 138.091 47
6	千里光菲灵碱	[M+H] ⁺	334.164 89	334.165 53	1.91	4.8	94.065 72, 120.080 39, 138.091 26
7	兰茛定	[M+H] ⁺	398.217 32	398.217 53	0.53	5.4	120.080 35, 220.133 51
8	兰茛定 N-氧化物	[M+H] ⁺	414.212 24	414.212 80	1.36	5.5	120.080 89, 220.133 33, 254.138 604
9	芝麻菜叶千里光碱	[M+H] ⁺	350.159 81	350.160 71	2.57	3.8	94.066 24, 120.080 56, 138.091 90
10	欧天芥菜碱	[M+H] ⁺	330.191 11	330.191 74	1.91	4.2	138.091 67, 156.101 20, 172.096 82, 256.117 98
11	欧天芥菜碱 N-氧化物	[M+H] ⁺	346.186 03	346.186 08	2.22	4.4	138.091 46, 156.102 05, 254.138 61
12	天芥菜碱	[M+H] ⁺	314.196 19	314.196 84	2.07	4.9	120.081 12, 138.091 42, 156.101 96
13	天芥菜碱 N-氧化物	[M+H] ⁺	330.191 11	330.191 77	2.00	5.0	98.984 79, 138.091 46, 156.101 94
14	千里光碱	[M+H] ⁺	352.175 46	352.176 12	1.87	4.1	94.064 99, 120.080 31, 138.090 47
15	春千里光碱	[M+H] ⁺	336.180 54	336.181 43	2.65	5.2	94.065 15, 120.080 57, 138.092 01

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 色谱柱的选择

本研究对比了 BEH C₁₈ 色谱柱和 HSS T3 色谱柱的分离效果。以 15 种 PAs 的色谱峰分离效果为考察指标,结果表明,两种型号色谱柱均可实现不同种类吡咯里西啶类生物碱色谱峰的分离,但对于同分异构体的分离,两种型号色谱柱的分离效果有很大差别。以欧天芥菜碱和天芥菜碱 N-氧化物两个同分异构体为目标物, HSS T3 柱对吡咯里西啶类生物碱的同分异构体的分离表现出更高的分离度,见图 1A~B,而 BEH C₁₈ 色谱柱无法实现,见图 1C。除此之外,较 BEH C₁₈ 色谱柱而言,采用 HSS T3 色谱柱,所有目标化合物均有较高响应强度。由于吡咯里西啶类生物碱的同分异构体的分离对于其在

食品中的研究和结构类似物的筛查具有重要意义,因此采用 HSS T3 色谱柱。15 种 PAs 的提取离子流图见图 2。

2.1.2 流动相的优化

流动相、pH 值、流速等均会影响目标化合物的峰面积响应强度。为保证吡咯里西啶类生物碱定性结果的准确性,本研究考察了甲醇和乙腈作为有机流动相时,目标化合物的峰面积响应强度和峰型,及各目标化合物的分离度。分别以甲醇-水、乙腈-水作为流动相,以千里光宁碱(Senecionine)、毛果天芥菜碱(Lasiocarpine)、欧天芥菜碱(Europine)为目标化合物,比较其峰面积响应值、峰型及分离度。结果显示,当流动相为甲醇-水时,目标化合物有较高的峰面积响应值。因此选取甲醇-水作为流动相。

理论上,酸性环境有利于吡咯里西啶类生物碱

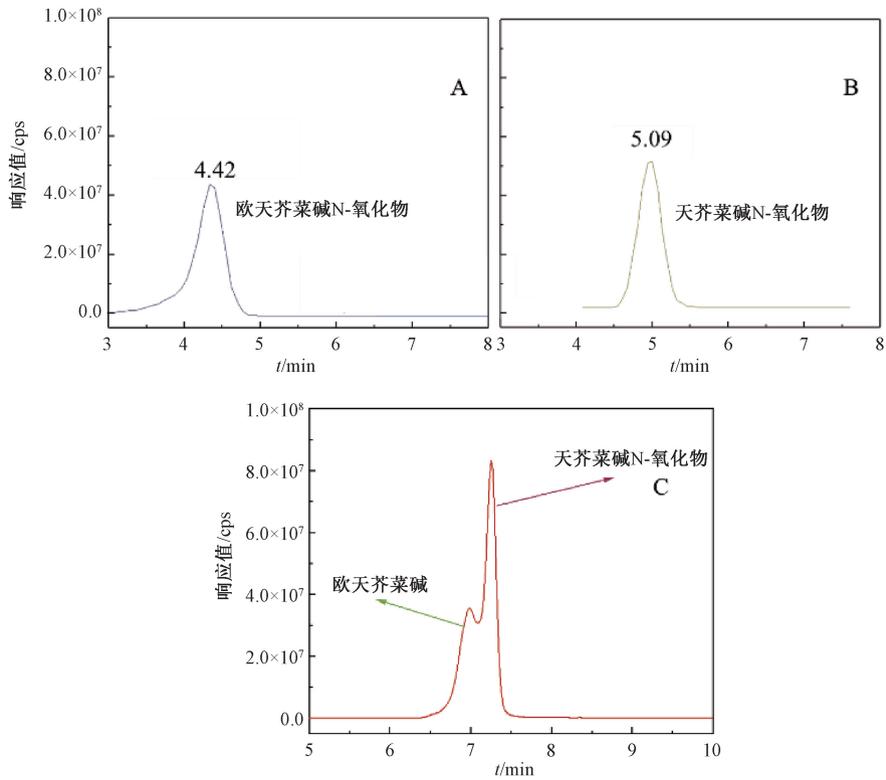


图1 不同型号色谱柱分离效果对比图

Figure 1 The effect on separation by different column

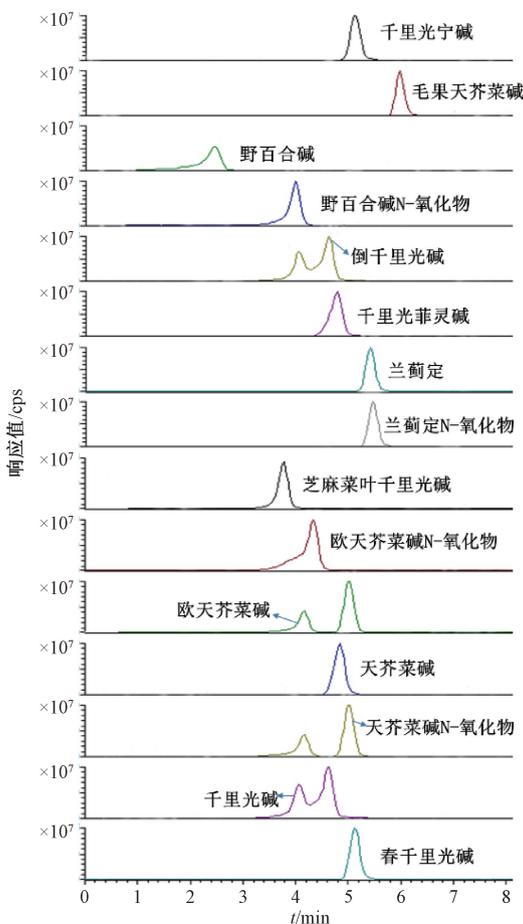


图2 15种生物碱的提取离子色谱图(加标浓度 50 μg/kg)

Figure 2 Extracted ion chromatogram of 15 PAs (adding concentration 50 μg/kg)

生成 $[M+H]^+$ 离子,从而提高离子化的效率^[21]。甲酸-甲酸铵缓冲溶液通常被添加到流动相中,以提高吡咯里西啶生物碱的峰面积响应值。因此,本研究以千里光宁碱、毛果天芥菜碱、欧天芥菜碱为目标化合物,分别以不同浓度甲酸和甲酸铵作为流动相缓冲体系,对比其峰面积响应值。结果显示,当甲酸浓度达到0.1%时,3种目标物均显示出较高的峰面积响应值,之后随甲酸浓度的提高,响应值随之降低,见图3。该结论与DZUMAN等^[22]的结果一致,由于生物碱是碱性物质,适量加入甲酸可帮助其形成分子离子 $[M+H]^+$,随着甲酸浓度的提高,流动相的pH值降低,使生物碱在溶液中倾向于以分子状态存在,而不利于生成 $[M+H]^+$,导致目标物峰面积响应值降低。

除此之外,本研究还考察了流动相中甲酸铵浓度对目标物峰面积响应值的影响。结果发现,甲酸铵浓度为4.0 mmol/L时目标物峰面积响应值最佳,但当浓度进一步升高时响应值逐渐降低,见图4。此结果与KACZYNSKI等^[23]的研究结果一致,由于过高浓度甲酸铵会产生竞争性抑制电离,降低吡咯里西啶类生物碱的离子化效率。为实现15种吡咯里西啶类生物碱的同时检测,均衡目标物的质谱响应值,最终选择4.0 mmol/L甲酸铵溶液(含0.1%甲酸)和甲醇作为流动相。

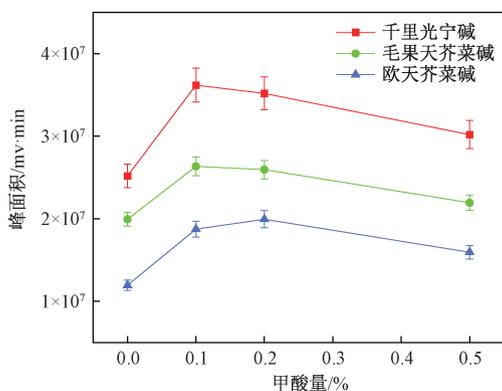


图3 不同甲酸浓度下千里光宁碱、毛果天芥菜碱、欧天芥菜碱的峰面积 ($n=6$)

Figure 3 Peak area of senecionine, lasiocarpine, europine in different formic acid concentration ($n=6$)

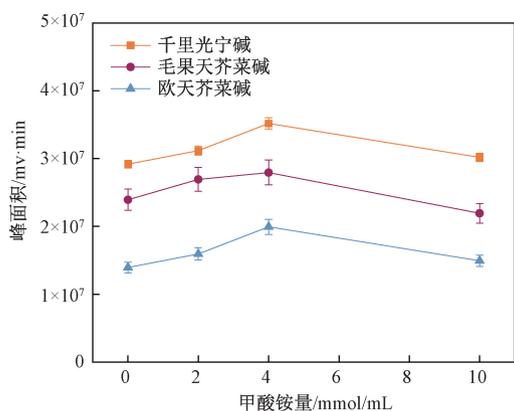


图4 不同甲酸铵浓度下千里光宁碱、毛果天芥菜碱、欧天芥菜碱的峰面积 ($n=6$)

Figure 4 Peak area of senecionine, lasiocarpine, europine in different ammonium formate solvent concentration ($n=6$)

2.2 质谱条件的选择

为了获得准确的化合物碎片离子信息,本研究以千里光宁碱 (m/z 336.180 54) 为研究对象,分别对 Full MS/dd-MS² 和 Full MS/DIA 两种二级扫描模式进行了评估。与 dd-MS² 相比,DIA 采集模式不会预先筛选前体离子,可以获得更丰富的碎片离子信息,特别是响应相对较低的碎片离子的扫描灵敏度和响应强度均可得到显著提高。虽然 DIA 模式扫描范围更广,能够采集到的复杂的质谱裂解碎片,但是为了消除基质干扰,对 Orbitrap 的三个不同分辨率设置 (17 500、35 000 和 70 000 FWHM) 进行了评估。结果表明,高分辨率设置 ($R=70\ 000$ FWHM) 是全扫描模式的最佳参数。因此,在 DIA 模式下使用 17 500 FWHM 分辨率来准确测量碎片离子。为了获得更加丰富的碎片离子,本研究采用 Full MS/DIA 扫描模式,设置低、中、高 3 种 NCE,见表 1。

2.3 样品前处理的优化

2.3.1 提取溶剂的考察

根据国内外的文献报道^[22, 24-25],本研究比较了

乙腈、甲醇、水 3 种不同提取溶剂对 15 种 PAs 的提取效果,进行了 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度加标回收试验,6 组平行,并比较其回收率,分别采用甲醇、乙腈、水为提取溶剂从花茶中提取目标化合物,见图 5。当甲醇为提取溶液时,毛果天芥菜碱、野百合碱 N-氧化物等 9 种生物碱回收率均超过 50%。当乙腈为提取溶液时,除野百合碱以外,其余 14 种目标物回收率均在 40% 以下。当纯水为提取溶液时,千里光宁、兰荊定等 4 种生物碱回收率达到 50% 以上。由于生物碱为碱性物质,提取效果受溶剂极性及其 pH 值环境影响较大^[23, 26],因此,本研究采用甲醇-水溶液作为提取溶剂,并考察了 80%、60%、40% 甲醇-水溶液对 15 种 PAs 的提取效率,见图 6。研究发现,以甲醇和水 (80:20, V/V) 为提取溶液对花茶中的 PAs 提取效率最高,回收率结果均在 60% 以上。考虑到提取效率和同时检测要求,同时为增强离子化效率,在提取溶液中添加 1% 甲酸,采用甲酸甲醇水溶液 (1:79.5:19.5, V/V/V) 作为提取溶剂。

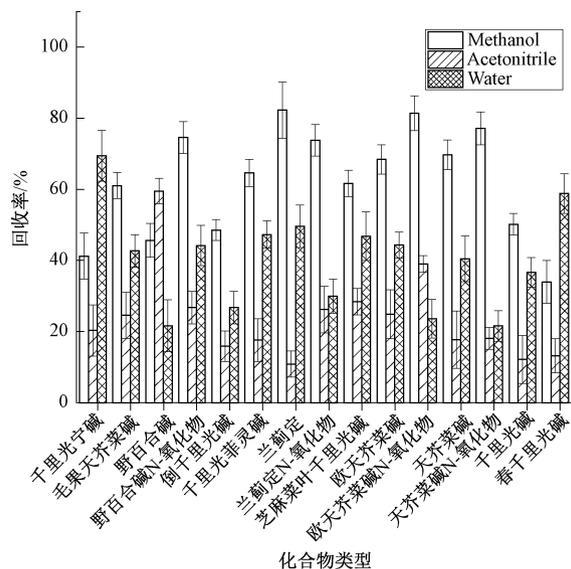


图5 15 种 PAs 在不同种类提取溶剂下的回收率 ($n=6$)

Figure 5 The recovery of 15 PAs in different extract solvent ($n=6$)

2.3.2 提取溶剂体积的考察

本实验分别考察了 2、5、10、20 mL 的甲酸甲醇水溶液 (1/79.5/19.5, V/V/V) 对 15 种 PAs 的提取效率的影响,进行了 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度加标回收试验,6 组平行,并比较其回收率。结果显示,当提取溶剂体积达到 5 mL 时,15 种 PAs 的回收率均在 70% 以上,见图 7。除此之外,实验还考察了提取次数对目标化合物提取效率的影响,发现 2 次提取时,15 种生物碱的回收率最优,提取次数为 3 次时的效果无较大提升,考虑到实验效率与成本,本方法采用 5 mL 提取溶剂,提取 2 次并混合提取液。

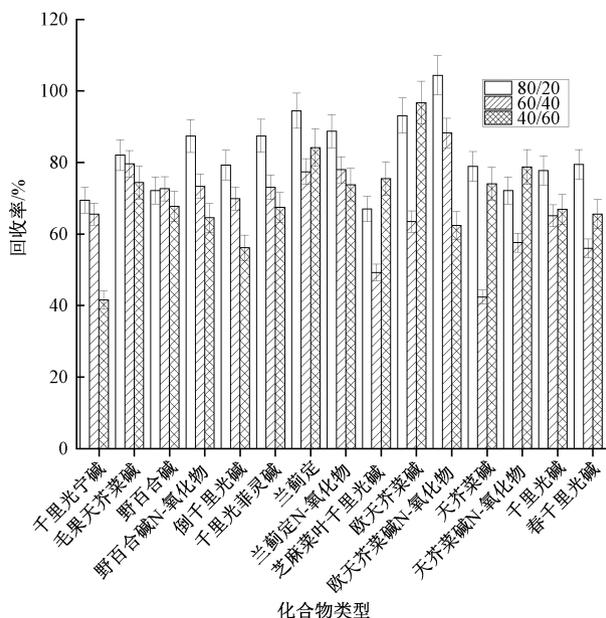


图6 15种PAs在不同甲醇/水比例的提取溶剂下的回收率($n=6$)

Figure 6 Recoveries of 15 PAs in extract solvents with different methanol/water ratios ($n=6$)

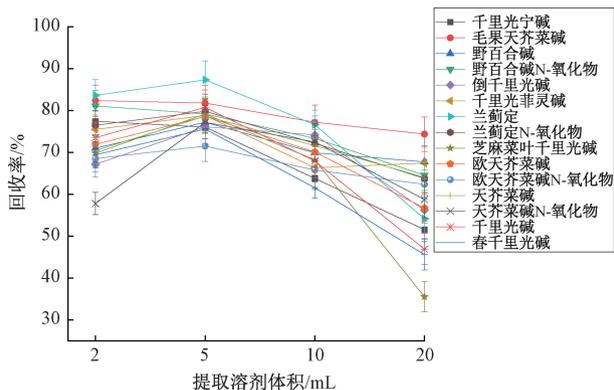


图7 15种PAs在不同体积提取溶剂下的回收率($n=6$)

Figure 7 The recovery of 15 PAs in different volumes of extraction solvent ($n=6$)

2.3.3 净化方式的考察

由于茶叶样品基质复杂,提取液中含有大量干扰物质,若直接进入仪器,会导致仪器污染,因此选择适合的净化方式至关重要。参考文献中的常用前处理方法包括,液液萃取法、固相萃取法、QuEChERS法。液液萃取法,虽无需复杂设备,但试剂消耗量大,且在萃取过程中PAs损失较多,回收率较低^[21];固相萃取法,溶剂使用量较少,操作简单,适用范围广,对生物碱有富集作用,广泛应用于食品及药草中PAs的分析^[23];QuEChERS法,常用于食品中目标化合物的净化,净化效果好,但对于绝大多数目标化合物的回收率影响较大^[27]。为实现15种PAs的同时提取和净化,本研究评估了

采用商品化QuEChERS试剂包和MCX固相萃取柱的净化效果,同时与直接氮吹至干复溶后的各目标物回收率进行了比较分析。MCX固相萃取柱采用5 mL甲醇,5 mL纯水活化,5 mL超纯水和5 mL甲醇淋洗,均抽干,用5 mL氨化甲醇洗脱。结果表明,采用MCX固相萃取柱的净化效果优于商品化QuEChERS试剂包,15种PAs的回收率均在70%以上,见图8。由于采用阳离子交换能够更好地分离碱性化合物,QuEChERS试剂包中N-丙基乙二胺(PSA)和C₁₈去除掉脂肪、有机酸和部分色素,但其去除杂质的效果较弱,且净化后样液颜色仍呈黄黑色。因此,本研究选择采用MCX固相萃取柱对茶叶中15种吡咯里西啶类生物碱进行净化和富集。

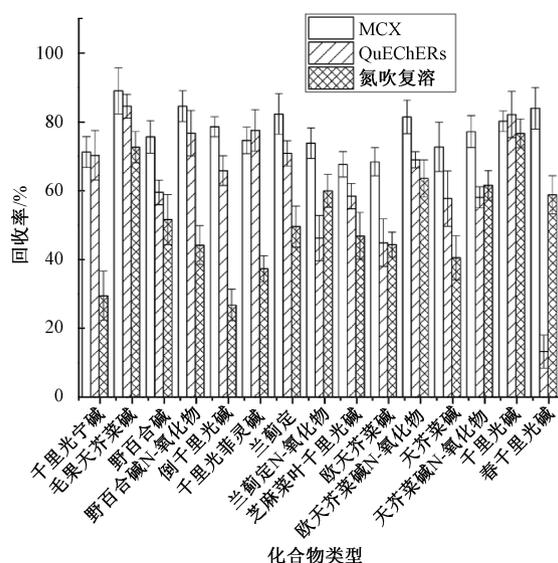


图8 不同净化方式对15种PAs回收率的影响($n=6$)

Figure 8 The effect on recovery of 15 PAs in different purification method ($n=6$)

2.4 标准曲线、线性范围、检出限及定量限

采用本研究方法,15种PAs在0.5~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数 R^2 均 >0.99 。在空白茶叶基质中添加低水平浓度的标准品,经前处理过程后,以信噪比为3($S/N=3$)和信噪比为10($S/N=10$)时分别确认茶叶基质中15种PAs的方法检出限(LOD)及定量限(LOQ)。茶叶中15种PAs的检出限及定量限分别为0.35~4.69 $\mu\text{g/kg}$ 和1.18~11.17 $\mu\text{g/kg}$,见表2。

2.5 实际样品的检测

采用本研究建立的方法对市售20例茶叶产品(4例绿茶、10例花茶、3例红茶、3例白茶)中15种吡咯里西啶类生物碱进行定性筛查和定量分析,结果显示其中1例菊花茶样品检测出千里光碱,其余化合物在样品中测定值均低于方法检测低限。

表 2 15 种 PAs 的线性范围、线性方程、检出限及定量限

Table 2 Linear ranges, calibration curves, LODs and LOQs of 15 PAs

化合物	线性方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	LODs/($\mu\text{g/kg}$)	LOQs/($\mu\text{g/kg}$)
千里光宁碱	$Y = 111\ 703\ 0X - 105544$	0.997 9	0.5~200	1.20	4.50
毛果天芥菜碱	$Y = 573\ 893\ 0X - 617917$	0.993 0	0.5~200	1.92	6.56
野百合碱	$Y = 951\ 610X - 725\ 735$	0.993 3	0.5~200	1.60	3.21
野百合碱 N-氧化物	$Y = 154\ 663\ 0X - 619\ 480$	0.994 6	0.5~200	4.69	11.17
倒千里光碱	$Y = 301\ 088\ 0X - 119\ 082\ 0$	0.992 8	0.5~200	4.00	10.28
千里光菲灵碱	$Y = 483\ 238X + 214\ 268$	0.999 5	0.5~200	2.24	8.96
兰薊定	$Y = 339\ 376\ 0X - 644\ 762$	0.994 3	0.5~200	1.28	4.00
兰薊定 N-氧化物	$Y = 519\ 291\ 0X - 561\ 521$	0.995 2	0.5~200	1.24	4.12
芝麻菜叶千里光碱	$Y = 138\ 537\ 0X - 505\ 466$	0.991 4	0.5~200	0.35	1.18
欧天芥菜碱	$Y = 240\ 445\ 0X - 229\ 575$	0.991 3	0.5~200	2.24	8.96
欧天芥菜碱 N-氧化物	$Y = 201\ 830\ 0X - 338\ 062$	0.999 7	0.5~200	0.43	1.42
天芥菜碱	$Y = 612\ 135\ 0X - 823\ 138$	0.997 5	0.5~200	3.49	11.06
天芥菜碱 N-氧化物	$Y = 563\ 572\ 0X - 656\ 770$	0.994 8	0.5~200	0.64	2.24
千里光碱	$Y = 180\ 106\ 0X - 478\ 134$	0.993 9	0.5~200	2.48	7.60
春千里光碱	$Y = 112\ 555\ 0X - 117\ 361$	0.998 1	0.5~200	1.20	4.50

3 结论

本研究采用甲醇甲酸水溶液提取,经 MCX 固相萃取柱净化,建立茶叶中 15 种吡咯里西啶类生物碱(PAs)的超高效液相色谱-高分辨质谱的定性定量分析方法。本方法基于完整的数据采集结果,将吡咯里西啶类生物碱分为三类,筛选出三类不同的特征结构碎片离子,可用于茶叶中 15 种 PAs 的同时测定,并可筛查未知吡咯里西啶类生物碱及其结构类似物。采用该方法灵敏度更高,且前处理操作简单,方法学评价和实际样品测定结果良好,可满足同时测定茶叶中 15 种吡咯里西啶类生物碱的检测要求,并可依据特征结构碎片,有望实现吡咯里西啶类生物碱类化合物及其结构类似物的高通量筛查。

参考文献

- [1] EDGAR J A, COLEGATE S M, BOPPRÉ M, et al. Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2011, 28(3): 308-324.
- [2] CHUNG S W C, LAM C H. Development of an analytical method for analyzing pyrrolizidine alkaloids in different groups of food by UPLC-MS/MS[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2018, 66(11): 3009-3018.
- [3] LI Y H, TAI C S, KHAN I, et al. Toxicoproteomic assessment of liver responses to acute pyrrolizidine alkaloid intoxication in rats[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 2018, 36(2): 65-83.
- [4] HE X B, XIA Q S, WOODLING K, et al. Pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts are common toxicological biomarkers of pyrrolizidine alkaloid, N-oxides[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(4): 984-991.
- [5] XIONG A Z, YANG L, HE Y Q, et al. Identification of metabolites of adonifoline, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid,

by liquid chromatography/tandem and high-resolution mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23(24): 3907-3916.

- [6] FU P P. Pyrrolizidine alkaloids: Metabolic activation pathways leading to liver tumorinitiation [J]. Chemical Research in Toxicology, 2017, 30(1): 81-93.
- [7] YANG M B, RUAN J Q, FU P P, et al. Cytotoxicity of pyrrolizidine alkaloid in human hepatic parenchymal and sinusoidal endothelial cells: Firm evidence for the reactive metabolites mediated pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity [J]. Chemico-Biological Interactions, 2016, 243: 119-126.
- [8] KOWALCZYK E, KWIA TEK K. Application of the sum parameter method for the determination of pyrrolizidine alkaloids in teas[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2020, 37(4): 622-633.
- [9] FU P P, XIA Q, HE X, et al. Detection of pyrrolizidine DNA adducts in livers of cattle poisoned with *Heliotropium europaeum* [J]. Chemical Research in Toxicology, 2017, 30(3): 851-858.
- [10] BFR. Levels of pyrrolizidine alkaloids in herbal teas and teas are too high [EB/OL]. (2013-07-15) [2020-12-19]. https://www.bfr.bund.de/en/press_information/2013/18/levels_of_pyrrolizidine_alkaloids_in_herbal_teas_and_teas_are_too_high-187319.html.
- [11] DWIVEDY A K, PRAKASH B, CHANOTIYA C S, et al. Chemically characterized, Menthacardiaca, L. essential oil as plant based preservative in view of efficacy against biodeteriorating fungi of dry fruits, aflatoxin secretion, lipid peroxidation and safety profile assessment [J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 106: 175-184.
- [12] CREWS C, BERTHILLER F, KR SKA R. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidinealkaloids [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396(1): 327-338.
- [13] HE X, XIA Q, FU P P. 7-glutathione-pyrrole and 7-cysteine-pyrrole are potential carcinogenic metabolites of pyrrolizidinealkaloids[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 2017, 35: 69-83.
- [14] LI X, YANG X, XU D, et al. Magnetic resonance imaging

- findings in the patients with pyrrolizidine alkaloids-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2017, 15(6): 955-957.
- [15] RATTAPHOL C, ORAWAN H, CHANNARONG S, et al. Multiplex detection of plant pathogens using a microsphere immunoassay technology [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62344.
- [16] MASLENNIKOV I, KLAMMT C, HWANG E, et al. Membrane domain structures of three classes of histidine kinase receptors by cell-free expression and rapid NMR analysis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences Current Issue, 2010, 107(24): 10902-10907.
- [17] BORIS M M, MARINA D V, SNEZANA S T, et al. Optimisation of isolation procedure for pyrrolizidine alkaloids from rinderaumbellatabunge[J]. Natural Product Research, 2015, 29(9): 887-890.
- [18] CARLSSON H, TORNQVIST M. Strategy for identifying unknown hemoglobin adducts using adductome LC-MS/MS data: Identification of adducts corresponding to acrylic acid, glyoxal, methylglyoxal, and 1-octen-3-one [J]. Food and Chemical Toxicology, 2016, 92: 94-103.
- [19] YOON S H, KIM M S, KIM S H, et al. Effective application of freezing lipid precipitation and SCX-SPE for determination of pyrrolizidine alkaloids in high lipid foodstuffs by LC-ESI-MS/MS [J]. Journal of Chromatography B, 2015, 992: 56-66.
- [20] GRIFFIN C T, MITROVIC S M, DANAHER M, et al. Development of a fast isocratic LC-MS/MS method for the high-throughput analysis of pyrrolizidine alkaloids in Australian honey [J]. Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2015, 32(2): 214-228.
- [21] 姜冰, 丁涛, 曹崇江, 等. HPLC-MS/MS法同时测定动物源性食品中9种吡咯里西啶类生物碱的含量[J]. 分析测试学报, 2020, 39(4):473-478.
- [22] DZUMAN Z, JONATOVA P, STRANSKA Z M, et al. Development of a new LC-MS method for accurate and sensitive determination of 33 pyrrolizidine and 21 tropane alkaloids in plant-based food matrices [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(26): 7155-7167.
- [23] KACZYŃSKI P, LOZOWICKA B. A novel approach for fast and simple determination pyrrolizidine alkaloids in herbs by ultrasound-assisted dispersive solid phase extraction method coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 187(2020): 113351-113361.
- [24] 程实, 赵小宁, 孙巍国, 等. 国内外中草药吡咯里西啶类生物碱控制情况浅析[J]. 中医药学报, 2021, 49(3): 87-91.
- [25] 黄旦益, 马军辉, 王羽, 等. 吡咯里西啶生物碱及茶叶中的来源分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(2): 229-236.
- [26] BRUGNEROTTO P, SERAGLIO S K T, SCHULZ M, et al. Pyrrolizidine alkaloids and beehive products: A review[J]. Food Chemistry, 342(2021): 128384.
- [27] 陈丽华, 王钧麓, 乔月, 等. 基于UPLC-MS/MS同时测定番泻叶中吡咯里西啶生物碱的含量[J]. 中国现代中药, 2019, 21(7):931-936.

实验技术与方法

X射线荧光光谱结合基本参数法快速测定食品中砷、镉、铅元素含量

刘通¹, 邢仕歌¹, 刘晓静², 王秀娟¹, 滕飞², 刘小东², 许秀丽¹

(1. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所, 北京 100176;

2. 北京安科慧生科技有限公司, 北京 101102)

摘要:目的 建立一种基于X射线荧光光谱仪(XRF)结合快速基本参数法快速测定不同食品样品中砷、铅、镉元素的分析方法。方法 样品粉碎过筛后, 压片制备, 用XRF结合基本参数法进行定量分析和快速筛查分析。结果 XRF方法的As、Cd、Pb检出限分别为: 0.07、0.06、0.07 mg/kg。在国标GB 2762—2017规定的食品限量浓度水平, As、Cd、Pb的XRF检测结果和电感耦合等离子体质谱法检测结果相比相对相差值均小于25%。针对谷物、豆类、肉制品、水产品样品的XRF快速检测, 除个别食品类别外, As、Cd和Pb元素的假阳性率和假阴性率均小于5%。结论 该方法具有操作简单、检测快速、灵敏度高等特点, 适用于食品中砷、镉和铅的现场、快速筛查分析。

关键词: 食品安全; 重金属; X射线荧光光谱; Fast FP算法

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2021)06-0790-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.06.026

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1603700; 2018YFC1603606)

作者简介: 刘通 男 副研究员 研究方向为食品安全 E-mail: liutongyes@163.com

通信作者: 许秀丽 女 研究员 研究方向为食品安全 E-mail: xuxiuli_78@163.com