

液相色谱-三重四极杆质谱法测定花茶中 5种吡咯里西啶类生物碱

张 兰¹, 高广慧^{2*}, 蒋晓彤¹, 陈国松¹

(1. 鞍山市食品药品检验所, 鞍山 114001; 2. 辽宁省食品检验检测院, 沈阳 110001)

摘要: **目的** 建立液相色谱-三重四极杆质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)同时测定花茶中5种吡咯里西啶类生物碱含量的分析方法。**方法** 将花茶样品均质粉碎后,经0.1%甲酸水溶液浸泡,涡旋,超声提取,高速离心后取上清液过固相萃取柱,洗脱液氮吹干后用流动相复溶,经ZORBAX Eclipse PLUS C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)分离,以0.1%甲酸溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱,流速为0.30 mL/min,柱温为30 °C,多反应监测模式测定,外标法定量。**结果** 该方法线性关系良好,相关系数为0.997~0.998;方法的检出限($S/N=3$)为3~5 μg/kg、定量限($S/N=10$)为10~15 μg/kg;在15、30、150 μg/kg添加水平下的平均回收率为89.69%~102.12%,相对标准偏差为0.3%~5.4%。**结论** 该方法样品前处理简单快速、萃取效果好、灵敏度和选择性高,适用于常规检测。

关键词: 液相色谱-三重四极杆质谱法;花茶;吡咯里西啶类生物碱

Determination of 5 kinds of pyrrolizidine alkaloids in scented tea by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

ZHANG-Lan¹, GAO Guang-Hui^{2*}, JIANG Xiao-Tong¹, CHEN Guo-Song¹

(1. Anshan Institute for Food and Drug Control, Anshan 114001, China;
2. Liaoning Institute for Food Control, Shenyang 110000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 5 kinds of pyrrolizidine alkaloids in scented tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** The sample was comminuted, and soaked in the aqueous solution of 0.1% formic acid, after vortex, ultrasonic extraction and high-speed centrifugation, and the supernatant was taken through the solid phase extraction column. After the eluting liquid nitrogen was blown and dried, the flow solution was re-dissolved. The samples were separated with a ZORBAX Eclipse PLUS C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) at the flow rate of 0.30 mL/min by gradient elution using 0.1% formic acid solution and acetonitrile as the mobile phase, and the column temperature was 30 °C. The content of 5 kinds of pyrrolizidine alkaloids was detected by multiple response monitoring model and quantitatively analyzed by external standard method. **Results** The linear relationship was good and the correlation coefficient was 0.997~0.998. The limit of detection of the method ($S/N=3$) was 3~5 μg/kg, the limit of quantitative ($S/N=10$) was 10~15 μg/kg, the average recovery rates at the addition levels of 15, 30, and 150 μg/kg were 89.69% to 102.12%, and the relative standard deviations were 0.3% to 5.4%. **Conclusion** This method is simple, rapid, effective, sensitive

*通讯作者: 高广慧, 主任药师, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: gghggh2000@163.com

*Corresponding author: GAO Guang-Hui, Chief Pharmacist, Liaoning Institute for Food Control, Shenyang 110015, China. E-mail: gghggh2000@163.com

and selective, and suitable for conventional test.

KEY WORDS: liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry; scented tea; pyrrolizidine alkaloids

1 引言

吡咯里西啶类生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PA)在自然界中广泛存在,约 6000 多种高等植物都含有该物质,其主要分布在紫草科、菊科、豆科和兰科植物中,其他的比如玄参科、夹竹桃科、毛茛苣科、百合科等也有分布^[1-3]。自然界约 3%的开花植物都含 PA,所以花茶中也可能含有 PA。很多吡咯里西啶生物碱对动物和人类有严重的毒性作用,包括肝脏毒性、肺脏毒性、致癌作用、致突变作用和神经毒性等,严重时具有致死作用^[4-8]。

目前国家对食品中吡咯里西啶类生物碱的检测标准方法并不多,一般都是针对蜂蜜^[9-11]和特殊中药材^[12-15],没有专门针对检测花茶中生物碱的标准方法。本研究建立了固相萃取结合高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测花茶中倒千里光碱(retrorsine)、克氏千里光碱(senkirkine)、千里光菲林(seneciphylline)、千里光宁(senecionine)、野百合碱(crotaline)含量的方法,以期能为食品安全监管提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

倒千里光碱(retrorsine)、克氏千里光碱(senkirkine)、千里光菲林(seneciphylline)、千里光宁(senecionine)、野百合碱(crotaline)(纯度均为 99%,德国 Dr.Ehrenstorfer 公司);乙腈、甲醇、甲酸、乙酸铵,(色谱级,德国 Merck 公司);试验用水为屈臣氏蒸馏水;强阳离子固相萃取柱(SCX 3 mL/60 mg,美国 Waters 公司);0.22 μm 有机相针式过滤器,(美国 Troody 公司);花茶:购于鞍山大商新玛特茶城。

2.2 仪器与设备

1260 型高效液相色谱-6460 型三重四级杆四极杆质谱仪(美国 Agilent 公司);AS10200BD 型超声波清洗器、DG-12D 固相萃取装置(天津奥特塞恩斯公司);BP121S 型电子天平(北京赛多利斯公司);VXMNFS 旋涡混合器(美国奥斯豪公司);Allera64R 型低温高速离心机(美国贝克曼公司);MS-10 氮吹仪、FK-5 粉碎机(上海屹尧仪器公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液配制

精密称取各标准品 10 mg(精确至 0.1 mg),用甲醇溶解,并转移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,于 -18 °C 条件下保存,有效期 3 个月。用 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液混合溶液(90:10,

V:V)稀释,摇匀,作为系列标准工作溶液,浓度为 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 和 200.0 ng/mL,现用现配。

2.3.2 样品制备

取代表性花茶样品约 200 g,用中药粉碎机充分粉碎,混匀,装入洁净容器中密封并做好标识,于阴凉干燥处常温保存。

称取 1.0 g 上述样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 0.1% 甲酸水溶液,于涡旋混合器上混合提取 5 min,再超声 5 min 后,于 8000 r/min 离心 5 min,取上清液,作待净化液。

2.3.3 样品净化

SCX 固相萃取柱依次用 4 mL 甲醇、3 mL 蒸馏水活化,保持柱体湿润。取待净化液 1 mL 过柱,依次用 3 mL 蒸馏水、3 mL 甲醇淋洗,抽干,用 6 mL 5% 氯化甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,将洗脱液在氮气流下吹干,用 1 mL 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸乙腈溶液混合溶液(90:10, V:V)溶解残渣,经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后供液相色谱-三重四极杆质谱仪分析测定。

2.3.4 液相条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse PLUS C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流速: 0.30 mL/min;柱温: 30 °C;进样量: 5 μL;梯度洗脱见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Flow phase gradient elution procedure

时间/min	A: 0.1% 甲酸乙腈溶液/%	B: 0.1% 甲酸水溶液/%
0	10	90
2.00	10	90
6.00	50	50
10.00	10	90
12.00	10	90

2.3.5 质谱条件

离子源:电喷雾正离子源(electron spray ionization+, ESI+);检测方式:多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM);毛细管电压: +4000 V;源温度: 300 °C;碰撞气:氮气 0.5 mL/min;雾化气: 15 psi;锥孔气: 20 L/h;其他条件见表 2。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

这 5 种生物碱是由具有双稠吡咯啶环的氨基醇和不同的有机酸 2 部分组成,研究过程中尝试了 ZORBAX Eclipse

XDB 色谱柱、ZORBAX RRHD 色谱柱、ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)的保留效果, 结果显示 ZORBAX Eclipse PLUS C₁₈ 色谱柱能较好的保留 5 种生物碱。在流动相的选择上, 选择最常用的 0.1%甲酸水和 0.1%甲酸乙腈溶液进行梯度洗脱程序优化, 分离效果较好。见图 1。

3.2 质谱条件的优化

为了保证定性和定量结果的准确性, 必须对化合物的监测离子对、扫描时间、碰撞能量、驻留时间等一系列质谱条件和参数进行优化, 以期达到最佳的检测效果。本研究在待测物不经色谱柱直接进质谱仪的情况下, 先采用全扫描(MS2 Full Scan)模式获取待测物的母离子; 接下来采用单离子监测扫描(MS2 Sim)模式优化毛细管出口电压, 保证母离子传输效率; 再采用子离子扫描(product ion scan)模式优化碰撞能; 最后采用多重反应监测(MRM)模式, 优化每个子离子的碰撞能, 具体参数见表 2。

3.3 方法线性范围、检出限和定量限

将标准工作溶液在优化的色谱及质谱条件下进行分析检测。以标准溶液的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 建立标准曲线。结果表明, 5 种 PA 均呈现良好线性关系。采用空白样品添加目标物的方法, 根据特征离子质量色谱峰信噪比 $S/N=3$ 计算方法检出限, $S/N=10$ 计算方法定量限, 结果见表 3, 该方法的检出限为 3~5 μg/kg, 定量限为 10~15 μg/kg。

3.4 回收率和精密度

选取阴性花茶样品, 分别添加 3 个不同浓度水平(15、30 和 150 μg/kg)的标准溶液, 按上述前处理方法进行加标回收和精密度实验, 每个添加浓度重复测定 6 次, 其回收率和精密度结果见表 4。结果表明, 5 种 PA 的添加回收率为 89.69%~102.12%, 相对标准偏差为 0.3%~5.4%。说明该方法适用于花茶中 5 种 PA 的检测。

表 2 多重反应监测条件参数
Table 2 Multiple reaction monitoring conditions

化合物	倒千里光碱	克氏千里光碱	千里光菲林	千里光宁	野百合碱
母离子(<i>m/z</i>)	352.1	366.0	334.1	336.1	326.1
子离子(<i>m/z</i>)	138.0*/120.0	168.0/122.0*	138.0*/119.9	137.8*/119.9	138.0*/120.0
碰撞能/V	33/35	34/34	34/34	33/37	33/38
毛细管出口电压/V	120/100	130/110	120/110	120/110	110/100

注: *为定量离子。

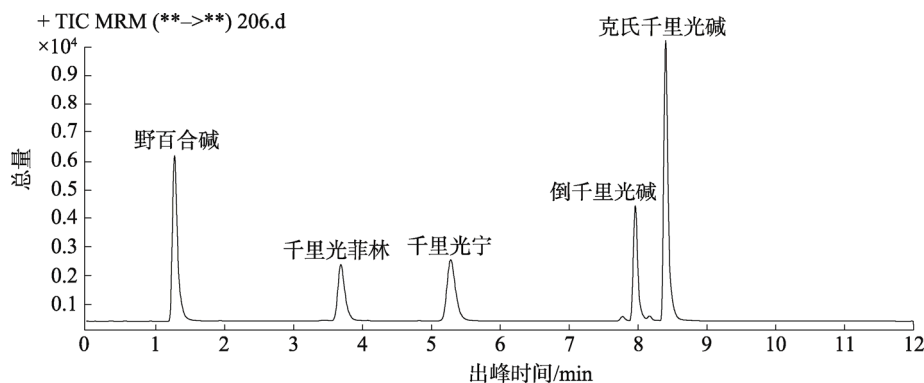


图 1 混合 5 种生物碱标准溶液的总离子流图
Fig.1 Total ion flow diagram of 5 kinds standard alkaloid solutions

表 3 几种吡咯里西啶生物碱的保留时间、线性范围、线性方程、相关系数、检出限及定量限
Table 3 Retention time, linear ranges, linear equation, correlation coefficients, limits of detections and limits of quantifications of pyrrolizidine alkaloids

化合物 PA	保留时间/min	线性范围/(ng/mL)	回归方程	相关系数/ <i>r</i> ²	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
倒千里光碱	3.8	20~200	$Y=40.5110412X+8.753109$	0.998	5	15
克氏千里光碱	8.6	20~200	$Y=154.085722X+411.438733$	0.997	3	10
千里光菲林	5.3	20~200	$Y=55.556195X+36.754490$	0.998	5	15
千里光宁	8.0	20~200	$Y=56.750674X+126.940932$	0.998	3	10
野百合碱	1.3	20~200	$Y=133.246744X+483.278562$	0.997	3	10

表 4 几种生物碱加标回收率和精密度($n=6$)
Table 4 Recoveries and precisions of 5 kinds of alkaloids ($n=6$)

化合物 加标含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	倒千里光碱/%		克氏千里光碱/%		千里光菲林/%		千里光宁/%		野百合碱/%	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
15	102.12	3.5	94.68	1.5	89.69	5.4	90.17	4.9	90.71	4.8
30	94.26	3.0	95.08	1.5	93.16	1.7	94.28	2.0	92.22	1.8
150	93.56	1.4	98.88	0.3	96.27	1.4	97.57	0.6	97.59	1.0

3.5 实际样品的检测

随机抽取 10 种不同品种的花茶样本, 在一例雏菊花茶样本中检出千里光宁, 含量为 $12 \mu\text{g}/\text{kg}$, 其余 9 份样本均为阴性。

4 结 论

本研究对花茶中 5 种吡咯里西啶类生物碱的检测技术进行了深入研究, 确定了最优的前处理方案和检测条件, 5 种吡咯里西啶类生物碱在 $20\sim 200 \text{ ng}/\text{mL}$ 范围内具有较好的线性关系, 相关系数均大于 0.997。加标水平为 15、30、150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 5 种吡咯里西啶类生物碱的回收率在 $89.69\%\sim 102.12\%$, 相对标准偏差为 $0.3\%\sim 5.4\%$, 检出限为 $3\sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $10\sim 15 \mu\text{g}/\text{kg}$, 可以满足日常花茶样品中 5 种常见生物碱的检测要求。实验证明, 该方法具有高通量、基体干扰少、萃取效率高、分析快、操作简便、溶剂用量少、成本低廉等优点, 满足当今发展对食品中有害物质残留检测的高通量、高效率的要求。对保护人民群众饮食安全、市场监管执法提供依据具有重要的意义。

参考文献

- 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.
Huang DY, Ma JH, Wang Y, *et al.* Analysis of sources in alkaloids and tea [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(2): 229-236.
- 张芳, 王长虹, 王峰涛. 植物中吡咯里西啶生物碱的检测与分析[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 1057-1063.
Zhang F, Wang CH, Wang ZT. Detection and analysis of pyrrolidine alkaloids in plants [J]. *Food Res Dev*, 2006, 18(6): 1057-1063.
- 郭伟华, 周金慧, 黄京平, 等. 蜂产品中吡咯里西啶生物碱分析方法研究进展[J]. 中国蜂业, 2013, 64(12): 38-41.
Guo WH, Zhou JH, Huang JP, *et al.* Research progress in the analysis of pyrrolidine alkaloids in bee products [J]. *China Bee Ind*, 2013, 64(12): 38-41.
- 刘珂, Roeder E. 大花千里光中吡咯里西啶生物碱的分离与鉴定[J]. 中草药, 1996, 27(4): 203-205.
Liu K, Roeder E. Solation and identification of pyrrolidine alkaloids in large flower clairvoyance [J]. *Chin Herb Med*, 1996, 27(4): 203-205.
- 汤俊, 服部征雄. 《中国药典》含吡咯里西啶生物碱的中药品种与用药安全[J]. 药学报, 2011, 46(7): 762-772.
Tang J, Hattori. Chinese medicine varieties and drug safety containing pyrrolidine alkaloids in the Chinese pharmacopoeia [J]. *J Pharm*, 2011, 46(7): 762-772.
- 马鸿雁, 杨莉, 王长虹, 等. 单麻叶千里光中肝毒吡咯里西啶生物碱的分离与鉴定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 166-168.
Ma HY, Yang L, Wang CH, *et al.* Isolation and identification of liver venom pyrrolidine alkaloids in single hemp leaf clairvoyance [J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2011, 36(2): 166-168.
- 赵显国, 林鸽. 肝毒吡咯里西啶生物碱与中草药[J]. 中草药, 1998, 29(5): 341-346.
Zhao XG, Lin G. Liver venom pyrrolidine alkaloid and Chinese herbal medicine [J]. *Herb Med*, 1998, 29(5): 341-346.
- 梁威, 宋志钊, 文志云. 比色法测定广西产千里光药材中吡咯里西啶生物碱的含量[J]. 药学研究, 2016, 35(9): 517-519.
Liang W, Song ZC, Wen ZY. Determination of pyrrolidine alkaloids in radix senecio from Guangxi by colorimetry [J]. *Pharm Res*, 2016, 35(9): 517-519.
- 程莉, 王丹, 周爽, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法测定蜂蜜中吡咯里西啶类生物碱[J]. 环境科学, 2014, 33(11): 1971-1977.
Cheng L, Wang D, Zhou S, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry determination of pyrrolidine alkaloids in honey [J]. *Environ Sci*, 2014, 33(11): 1971-1977.
- 吕辰, 丁涛, 马昕, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中的 5 种双稠吡咯里西啶类生物碱[J]. 色谱, 2013, 31(11): 1046-1050.
Lv C, Ding T, Ma X, *et al.* High performance liquid chromatography-series mass spectrometry determination of five double thick pyrrole alkaloids in honey [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(11): 1046-1050.
- 郭伟华, 周金慧, 黄京平, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中生物碱[J]. 分析化学, 2014, 42(10): 1453-1458.
Guo WH, Zhou JH, Huang JP, *et al.* Decentralized solid phase extraction-high performance liquid chromatography-series mass spectrometry determination of alkaloids in honey [J]. *Anal Chem*, 2014, 42(10): 1453-1458.
- 李丽梅, 张涵庆, 吕寒, 等. 白背三七叶中吡咯里西啶生物碱的 LC-MSn 检测[J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(2): 79-80.
Li LM, Zhang HQ, Lv H, *et al.* LC-MS n detection of pyrrolidine alkaloids in white abaxial leaves [J]. *J Plant Res Environ*, 2008, 17(2): 79-80.
- 濮社班, 徐德然, 张勉, 等. 中药款冬中肝毒吡咯里西啶生物碱的 LC/MSn 检测[J]. 中国天然药物, 2004, 2(5): 293-297.
Pu SB, Xu DR, Zhang M, *et al.* LC/MSn detection of liver venom

pyrrolidine alkaloids in winter of Chinese medicine [J]. Chin Nat Drug, 2004, 2(5): 293-297

[14] 濮社班, 徐德然, 张勉, 等. 橐吾属植物中肝毒吡咯里西啶生物碱的 LC-MSn 检测[J]. 药学学报, 2004, 39(10): 831-835.

Pu SB, Xu DR, Zhang M, et al. LC-MSn detection of hepatic pyrrolidine alkaloids in Ligularia plants [J]. J Pharm, 2004, 39(10): 831-835.

[15] 熊爱珍, 杨莉, 杨雪晶, 等. UPLC-MS 同时测定千里光和欧洲千里光中阿多尼弗林碱和千里光碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 702-705.

Xiong AZ, Yang L, Yang XJ, et al. Simultaneous quantitation of adonifoline and senecionine in Senecio herbs by UPLC-MS [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2011, 36(6): 702-705.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



张 兰, 工程师, 主要研究方向为食品理化分析。

E-mail: 18941210412@163.com



高广慧, 女, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: gghggh2000@163.com



“功能食品研究” 专题征稿函

食用农产品中农药、兽药残留问题是国内外广泛关注的课题。本刊特组织“功能食品研究”专题, 征集的稿件主要围绕天然活性物质的分离、纯化、提取及综合利用; 活性物质的功能研究; 天然活性物质结构及功能活性分析; 功能食品(多糖、酚类、黄酮类、葡聚糖、蛋白质肽类)等或者您认为与本专题相关有意义的领域。该专题计划在 2020 年 4 月出版。

本刊主编吴永宁研究员与编辑部全体成员特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 2020 年 2 月 28 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题功能食品研究):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿选择“专题: 功能食品研究”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsqa@126.com(备注: 功能食品研究专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部