

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240827005

# 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定 菊花中 15 种吡咯里西啶生物碱毒素

章 豪<sup>\*</sup>, 杨 挺, 吴银良, 朱 勇

[宁波市农业科学研究院, 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(宁波),  
宁波市特色农产品质量安全检测与控制重点实验室, 宁波 315040]

**摘要:** 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定菊花中 15 种吡咯里西啶生物碱毒素含量的分析方法。方法 样品中吡咯里西啶生物碱毒素采用 0.1 mol/L 硫酸水溶液提取, 通过 Oasis PRiME MCX 固相萃取小柱净化, 采用 UPLC-MS/MS 进行分析。采用 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 以 0.1% 甲酸水-甲醇溶液为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾离子源正离子电离, 多反应离子监测模式监测, 外标法定量。结果 15 种吡咯里西啶生物碱毒素在一定浓度范围内线性关系良好, 相关系数( $r^2$ )均大于 0.999; 定量限为 0.50~10.00 μg/kg, 检出限为 0.15~3.00 μg/kg; 阴性样品的加标回收率为 82.8%~92.4%, 相对标准偏差为 2.1%~4.9% ( $n=5$ )。结论 该方法准确度和精密度高, 耗时短, 能同时测定多种菊花样品中的多种吡咯里西啶生物碱毒素含量。

**关键词:** 吡咯里西啶生物碱毒素; 超高效液相色谱-串联质谱法; Oasis PRiME MCX 固相萃取小柱; 菊花

## Determination of 15 kinds of pyrrolizidine alkaloids in *Chrysanthemum* by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Hao<sup>\*</sup>, YANG Ting, WU Yin-Liang, ZHU Yong

[Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agricultural Products (Ningbo), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Ningbo Key Laboratory of Testing and Control for Characteristic Agro-product Quality and Safety, Ningbo 315040, China]

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of 15 kinds of pyrrolizidine alkaloids in *Chrysanthemum* by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Pyridolizidine alkaloid toxins in the sample were extracted with 0.1 mol/L sulfuric acid aqueous solution and purified by Oasis PRiME MCX solid phase extraction column, detected by UPLC-MS/MS, separated by the Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column, and using the 0.1% formic

**基金项目:** 宁波市农业重大专项(2015C110004)、宁波市科技惠民项目(2017C50014)、宁波市社会发展科技攻关项目(2014C50012)、国家农产品质量安全风险评估重大专项(GJFP2020001、GJFP2019019、GJFP201801101、GJFP201701101、GJFP201701104、GJFP201601101、GJFP201501201、GJFP2014011)

**Fund:** Supported by the Major Project of Programs for Agriculture of Ningbo (2015C110004), the Science and Technology Program of Ningbo (2017C50014), the Key Science and Technology Program of Ningbo (2014C50012), and the Major Project of Chinese National Programs for Quality and Safety Risk Assessment of Agricultural Products (GJFP2020001, GJFP2019019, GJFP201801101, GJFP201701101, GJFP201701104, GJFP201601101, GJFP201501201, GJFP2014011)

\*通信作者: 章豪, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农兽药及有机污染物残留降解分析及风险评估研究。E-mail: xiaopang@zju.edu.cn

\*Corresponding author: ZHANG Hao, Ph.D, Associate Professor, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, No.19, Dehou Street, Yinzou District, Ningbo 315040, China. E-mail: xiaopang@zju.edu.cn

acid-methanol solution as the mobile phase for gradient elution, ionized by electrospray ion source positive ion, monitored by multi-reactive ion monitoring mode, quantified by external standard method. **Results** Good linear relationships were seen for the 15 kinds of pyrrolizidine alkaloids in certain concentration ranges, and the correlation coefficients were more than 0.999. The limits of detection and limits of quantitation for the 15 kinds of pyrrolizidine alkaloids were in the ranges 0.15–3.00 and 0.50–10.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The recoveries of negative samples ranged from 82.8% to 92.4%, and the relative standard deviations were from 2.1% to 4.9% ( $n=5$ ). **Conclusion** The method has high accuracy, high precision and short time consuming, and can simultaneously determine the content of pyrrolizidine alkaloids in a variety of *Chrysanthemum* samples.

**KEY WORDS:** pyrrolizidine alkaloids; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Oasis PRiME MCX solid phase extraction; *Chrysanthemum*

## 0 引言

吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs), 又称双稠吡咯啶生物碱, 广泛存在于多种植物中, 在一定程度上可抵御草食动物、昆虫和植物病原的侵害<sup>[1]</sup>。目前 PAs 已在菊科的植物中检测到<sup>[2]</sup>。联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)认为 PAs 是草药产品与食品中最广泛和最严重的掺杂性与内源性的毒性成分<sup>[3]</sup>。PAs 的毒性与结构密切相关, 可形成烯丙酯结构的 PAs 具有肝脏毒性, 会造成肝硬化、肝细胞坏死等症状<sup>[4]</sup>。欧盟于 2019 年实施以下限量规定: 成人每天摄入量不超过 0.35  $\mu\text{g}$ , 儿童不超过 0.14  $\mu\text{g}$ <sup>[5]</sup>。世界贸易组织(World Trade Organization, WTO)贸易技术壁垒委员会曾因我国出口的某种药材中 PAs 含量过高而发布通告禁令; 欧盟食品和饲料类快速预警系统(Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF)也曾因我国出口至欧盟的草本茶原料中 PAs 含量过高发布警告。我国已把菊花等多种含有 PAs 的药材收载入法定药材标准中。检测菊花中的 PAs 具有重要意义。

但菊花中 PAs 的种类及含量等仍缺乏相关数据。目前由于缺乏高效的检测方法, 菊花中 PAs 的含量水平还未能准确评估, 亟需进行检测方法研究, 对菊花的调查、对其所含 PAs 成分系统的分析、菊花安全性的评价以及菊花的控制和利用等方面都还需要开展大量研究工作。

目前分析 PAs 毒素的方法主要分为气相色谱法(gas chromatography, GC)<sup>[6–8]</sup>、气相色谱-质谱法(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)<sup>[9–14]</sup>、液相色谱法(liquid chromatography, LC)<sup>[15–18]</sup>、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[19–27]</sup>、免疫学方法<sup>[28]</sup>、核磁共振法<sup>[29]</sup>和分光光度法<sup>[30]</sup>。然而采用 GC-MS 及 GC 法存在检出限高, 稳定性差, 耗时长, 过程烦琐等缺点, 目前使用 GC-MS 和 GC 较少。使用免疫学方法、核磁共振法和分光光度法分析 PAs 毒素更多只是用来筛选, 因为存在基体干扰大的问题。当前 PAs 毒素主要分析方法还是 LC 或 LC-MS/MS, 但研究

中多使用目标 MS/MS 设置, 对于检测无对照标准品的 PAs 及其氧化形式(pyrrolizidine alkaloid N-oxides, PANOs)具有较大的局限性和不确定性。超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)具有灵敏度高, 选择性好的特点, 适用于多种 PAs 毒素在食品或农产品中的定性定量分析<sup>[13]</sup>。但目前鲜有应用于菊花中 PAs 的定量检测。

关于 PAs 及其 PANOs 前处理技术主要方法有 QuEChERS 法、固相萃取(solid phase extraction, SPE)法、液液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)法。目前 PAs 及其 PANOs 最常使用的前处理方法是 SPE 法。其中 C<sub>8</sub> 柱和 C<sub>18</sub> 柱是常用的 SPE 小柱<sup>[10–16]</sup>。它们存在共提物多的缺点, 在色谱分析中存在大的背景干扰, 会对定量分析的准确性以及灵敏度产生影响。然而 PAs 属于还原性生物碱, 净化碱性化合物的更有效的方法是采用阳离子交换柱。阳离子交换柱可以有效地去除离子型极性与弱极性干扰化合物, 对 PAs 以及 PANOs 均有良好的净化效果<sup>[8]</sup>。Oasis PRiME MCX 是一款全新混合模式(反相和强阳离子交换)SPE 产品, 将 Oasis PRiME HLB 操作简单、所得萃取物纯净度高的优势与阳离子交换吸附剂对碱性化合物的专属性相结合, 该产品无需活化和平衡即可使用, 操作简单, 能够在选择性地保留并浓缩碱性化合物的同时简化分析操作。然而, 目前鲜有在 PAs 毒素的样品前处理中采用 Oasis PRiME MCX 固相萃取柱进行净化的文献报道。

本研究通过优化样品前处理方法及仪器条件, 建立了采用 Oasis PRiME MCX 固相萃取小柱结合 UPLC-MS/MS 对 15 种 PAs 毒素在 3 种菊花(杭白菊、贡菊和毫菊)中含量进行同时测定的方法。该方法对厘清我国菊花安全风险, 确定关键控制点, 形成管控措施, 应对潜在的国际贸易壁垒风险具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

杭白菊、贡菊和毫菊采购自当地市场。

PAs 毒素标准品(千里光宁碱-N-氧化物、克氏千里光

碱、倒千里光碱-N-氧化物、欧天芥菜碱-N-氧化物、倒千里光碱、欧天芥菜碱、天芥菜碱-N-氧化物、千里光菲灵碱-N-氧化物、千里光菲灵碱、促黑激素-N-氧化物、促黑激素、天芥菜碱、千里光碱-N-氧化物、千里光碱、千里光宁碱)(纯度均大于 95%, 德国 PhytoLab GmbH & Co. KG 公司); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 硫酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

## 1.2 仪器与设备

UPLC Xevo® TQ-XS 超高效液相色谱-串联质谱仪、Oasis PRiME MCX 固相萃取柱(150 mg/6 mL)(美国 Waters 公司); Vortex Genie 3 漩涡振荡器(德国 IKA 公司); 3K15 高速离心机(德国 Sigma 公司); XPE205 十万分之一电子天平(精度 0.01 mg, 瑞士 Mettler Toledo 公司)

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 样品前处理

称取 5.00 g 菊花样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 0.1 mol/L 硫酸水溶液, 10000 r/min 速度均质 1 min, 再以 300 r/min 速度振荡提取 30 min; 然后以 9500 r/min 速度离心 5 min, 收集上清液, 残渣再加入 0.1 mol/L 硫酸水溶液 10 mL 提取 1 次, 提取液合并。将提取液移至 Oasis PRiME MCX 固相萃取小柱, 加入甲醇 5 mL 淋洗,

再加入 5% 氨水甲醇溶液 5 mL 洗脱, 40 °C 下氮气吹干洗脱液; 加入 1 mL 0.1% 甲酸水-甲醇(90:10, V:V)溶液复溶, 过 0.22 μm 滤膜, UPLC-MS/MS 进样分析。

### 1.3.2 标准溶液配制

分别准确称取 15 种 PAs 毒素标准品适量(精确至 0.1 mg), 用甲醇溶解, 配制 1 g/L 的标准储备液, -20 °C 保存; 分别准确量取 1 mL 标准储备液于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配制 10 mg/L 的混合标准储备液, -20 °C 保存;

基质匹配标准溶液: 按 1.3.1 制备菊花空白样品溶液, 基质匹配标准溶液通过稀释混合标准储备液配制。

### 1.3.3 色谱分析条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 进样体积: 10 μL; 流速: 0.30 mL/min; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 90% A; 1.0~7.0 min, 90%~10% A; 7.0~8.0 min, 10% A; 8.0~8.1 min, 10%~90% A; 8.1~10.0 min, 90% A。

### 1.3.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 毛细管电压: 2.0 kV; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气流速: 1000 L/h; 脱溶剂气温度: 500 °C; 锥孔气流速: 150 L/h; 15 种 PAs 毒素的母离子、子离子及其锥孔电压、碰撞能量如表 1 所示。

表 1 15 种 PAs 毒素的母离子、子离子、锥孔电压及其碰撞能量  
Table 1 Parent ions, daughter ions, cone voltages, and collision energies of the 15 kinds of PAs

| PAs 毒素       | 英文全称                   | 母离子( <i>m/z</i> ) | 子离子( <i>m/z</i> ) | 锥孔电压/V | 碰撞能量/eV |
|--------------|------------------------|-------------------|-------------------|--------|---------|
| 克氏千里光碱       | senkirkine             | 366.20            | 168.09*           | 31     | 27      |
|              |                        |                   | 122.16            |        | 31      |
|              |                        |                   | 94.06*            |        | 41      |
| 倒千里光碱-N-氧化物  | retrorsine-N-oxide     | 368.18            | 117.86            | 5      | 31      |
|              |                        |                   | 120.14*           |        | 27      |
| 倒千里光碱        | retrorsine             | 352.18            | 138.09            | 57     | 27      |
|              |                        |                   | 120.08*           |        | 35      |
| 千里光碱-N-氧化物   | jacobine-N-oxide       | 368.18            | 296.18            | 13     | 25      |
|              |                        |                   | 172.12*           |        | 31      |
| 欧天芥菜碱-N-氧化物  | europine N-oxide       | 346.17            | 111.10            | 59     | 41      |
|              |                        |                   | 93.99*            |        | 39      |
| 千里光宁碱-N-氧化物  | senecionine-N-oxide    | 352.20            | 136.08            | 5      | 39      |
|              |                        |                   | 120.14*           |        | 27      |
| 千里光宁碱        | senecionine            | 336.18            | 93.99             | 87     | 31      |
|              |                        |                   | 172.12*           |        | 27      |
| 天芥菜碱-N-氧化物   | heliotrine-N-oxide     | 330.23            | 111.10            | 63     | 37      |
|              |                        |                   | 94.18*            |        | 31      |
| 千里光菲灵碱-N-氧化物 | seneciphylline N-oxide | 350.18            | 119.82            | 39     | 31      |
|              |                        |                   | 120.14*           |        | 27      |
| 千里光菲灵碱       | seneciphylline         | 334.18            | 138.09            | 43     | 27      |
|              |                        |                   | 138.10*           |        | 19      |
| 天芥菜碱         | heliotrine             | 314.23            | 156.11            | 13     | 25      |
|              |                        |                   | 172.11*           |        | 27      |
| 促黑激素-N-氧化物   | intermedine-N-oxide    | 316.18            | 138.10            | 45     | 25      |
|              |                        |                   | 120.07*           |        | 31      |
| 千里光碱         | jacobine               | 352.24            | 155.13            | 17     | 25      |
|              |                        |                   | 138.10*           |        | 17      |
| 欧天芥菜碱        | europine               | 330.23            | 254.16            | 53     | 17      |
|              |                        |                   | 94.12*            |        | 25      |
| 促黑激素         | intermedine            | 300.21            | 138.10            | 35     | 17      |

注: \*为定量离子。

## 1.4 数据处理

UPLC-MS/MS 数据采集使用 Waters TQ-XS MassLynx V4.2 软件，处理数据和绘图采用 OriginPro 9.1 软件。

## 2 结果与分析

## 2.1 仪器条件优化

使用 UPLC-MS/MS 测定 PAs 毒素时多采用电喷雾离子源正离子电离模式<sup>[6-13]</sup>。将 15 种 PAs 毒素分别用甲醇配制成 1.0 mg/L 的标准溶液，通过 UPLC Xevo® TQ-XS 超高效液相色谱-串联质谱仪自带的 Intellistart 软件对 15 种 PAs 毒素的母离子、子离子、锥孔电压及其碰撞能量进行摸索，在电喷雾离子源正离子电离模式下 15 种 PAs 毒素都获得了很好的响应，如表 1 所示。

## 2.2 前处理条件优化

PAs 毒素的提取溶剂通常使用水<sup>[6-9]</sup>或是甲醇<sup>[10-13]</sup>，比如采用稀酸水可提高 PAs 毒素的溶解性<sup>[14-17]</sup>。分别考察了 0.1 mol/L 硫酸水、水和甲醇对 PAs 毒素的提取回收率。发现没有酸时，采用甲醇提取的回收率均高于采用水提取 PAs 毒素的回收率；而加入酸提取时，回收率明显提高，采用甲醇提取的回收率均低于采用 0.1 mol/L 硫酸水提取 PAs 毒素的回收率，所以最终采用 0.1 mol/L 硫酸水溶液提取 PAs 毒素。这可能是因为 PAs 毒素属于还原性生物碱，在酸性环境中以离子形式存在，水溶性明显增强。

### 2.3 固相萃取柱的选择

如图1所示,选择Oasis PRiME MCX和Oasis MCX两款固相萃取柱进行比较。在菊花中选取最为主要的杭白菊、贡菊和毫菊3类基质进行实验,选取阴性样品进行添加回收实验,其中倒千里光碱-N-氧化物、千里光菲灵碱-N-氧化物和千里光碱在菊花中的添加浓度为10、15、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,剩余12种PAs毒素的添加浓度为2、3、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。样品采用Oasis PRiME MCX固相萃取小柱净化后的回收率(83.0%~92.4%)均优于采用Oasis MCX固相萃取小柱净化的结果(71.0%~80.0%)。结果发现,无需活化和平衡等复杂步骤,通过Oasis PRiME MCX固相萃取柱净化,样品在基质干扰或回收率上,均优于Oasis MCX固相萃取柱的净化效果。这可能是因为对于菊花中的色素等杂质,相比Oasis MCX固相萃取柱,Oasis PRiME MCX固相萃取柱可以更好地吸附,且无需活化,将净化时间显著缩短的同时还起到了延长色谱柱使用寿命的作用。基于此在净化柱上本研究选取了Oasis PRiME MCX固相萃取柱。

## 2.4 基质效应、标准曲线、检出限和定量限

在考察菊花基质中 15 种 PAs 毒素的基质效应时采用基质匹配标准曲线的斜率/溶剂标准曲线的斜率

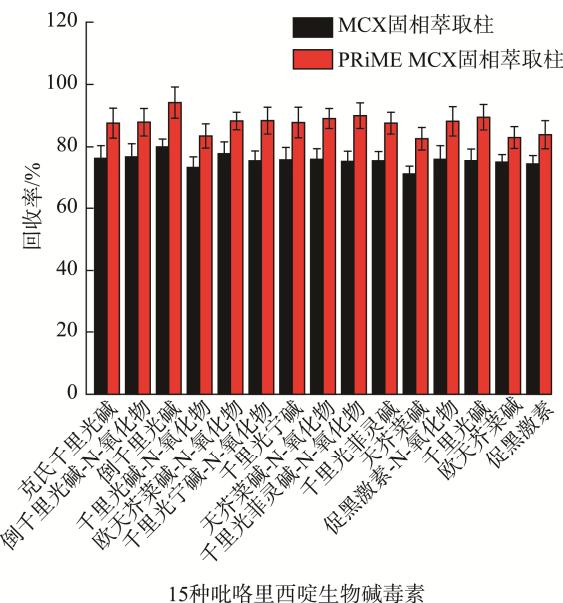


图1 不同固相萃取柱对15种PAs毒素回收率的影响  
 Fig.1 Effects on recoveries of the 15 kinds of PAs in different solid phase extraction columns

$\times 100\%$ 的计算方法。结果越接近 100%，表明基质效应越小。当结果小于 100%时表明存在基质抑制效应，大于 100%时表明存在基质增强效应。15 种 PAs 毒素的基质效应如表 2 所示，为了对目标化合物进行准确测定，采用基质匹配标准曲线来消除基质效应带来的影响。采用菊花空白基质配制了 3 个数量级的基质标准工作溶液(其中倒千里光碱-N-氧化物、千里光菲灵碱-N-氧化物和千里光碱的质量浓度为 5~500  $\mu\text{g}/\text{L}$ ，剩余 12 种 PAs 毒素的质量浓度为 1~100  $\mu\text{g}/\text{L}$ )通过超高效液相色谱-串联质谱仪进行分析，采用峰面积对浓度制作标准曲线，得到相关系数( $r^2$ )及其线性回归方程，如表 2 所示。在相应浓度范围内 15 种 PAs 毒素线性关系良好，相关系数( $r^2$ )均大于 0.999。当采用 10 倍信噪比( $S/N=10$ )进行估算时，15 种 PAs 毒素的定量限为 0.50~10.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；当采用 3 倍信噪比( $S/N=3$ )进行估算时，15 种 PAs 毒素的检出限为 0.15~3.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。考虑到欧盟于 2019 年实施的限量规定：成人每天摄入量不超过 0.35  $\mu\text{g}$ ，儿童不超过 0.14  $\mu\text{g}$ ，定量限和检出限均能满足要求。

## 2.5 回收率与精密度

对杭白菊、贡菊和毫菊 3 类基质进行添加回收试验，并计算相应的相对标准偏差，如表 3 所示。在杭白菊阴性样品中添加 15 种 PAs 毒素的色谱图如图 2 所示。倒千里光碱-N-氧化物、千里光菲灵碱-N-氧化物和千里光碱在杭白菊中的添加浓度为 10、15、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，剩余 12 种 PAs 毒素的添加浓度为 2、3、4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，同一浓度每批次 5 个平行样品，3 次重复测定。

表 2 不同基质中 15 种 PAs 毒素的标准曲线方程、相关系数、检出限、定量限和基质效应

Table 2 Standard curve equations, correlation coefficients, limits of detection, limits of quantification and matrix effects in different matrices of the 15 kinds of PAs

| 基质  | PAs 毒素       | 标准曲线方程            | 相关系数( $r^2$ ) | 检出限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 定量限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 基质效应/% |
|-----|--------------|-------------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|--------|
| 杭白菊 | 克氏千里光碱       | $Y=52540X-3996$   | 0.9992        | 0.30                            | 1.00                            | 97.7   |
|     | 倒千里光碱-N-氧化物  | $Y=2082X-46.10$   | 0.9996        | 3.00                            | 10.00                           | 103.5  |
|     | 倒千里光碱        | $Y=10290X-107.9$  | 0.9998        | 0.60                            | 2.00                            | 105.9  |
|     | 千里光碱-N-氧化物   | $Y=14590X-1434$   | 0.9997        | 0.45                            | 1.50                            | 111.8  |
|     | 欧天芥菜碱-N-氧化物  | $Y=76200X-2028$   | 0.9995        | 0.24                            | 0.80                            | 91.4   |
|     | 千里光宁碱-N-氧化物  | $Y=10080X-314.0$  | 0.9997        | 0.60                            | 2.00                            | 102.1  |
|     | 千里光宁碱        | $Y=19020X-1929$   | 0.9998        | 0.45                            | 1.50                            | 103.8  |
|     | 天芥菜碱-N-氧化物   | $Y=79580X-7300$   | 0.9997        | 0.24                            | 0.80                            | 99.3   |
|     | 千里光菲灵碱-N-氧化物 | $Y=7417X-280.0$   | 0.9994        | 0.75                            | 2.50                            | 103.0  |
|     | 千里光菲灵碱       | $Y=17150X-836.0$  | 0.9993        | 0.45                            | 1.50                            | 103.2  |
| 贡菊  | 天芥菜碱         | $Y=122340X-3192$  | 0.9994        | 0.15                            | 0.50                            | 95.7   |
|     | 促黑激素-N-氧化物   | $Y=31950X-546.2$  | 0.9995        | 0.36                            | 1.20                            | 93.8   |
|     | 千里光碱         | $Y=7370X-341.0$   | 0.9995        | 0.75                            | 2.50                            | 106.4  |
|     | 欧天芥菜碱        | $Y=104800X-6090$  | 0.9997        | 0.18                            | 0.60                            | 93.6   |
|     | 促黑激素         | $Y=98700X-9340$   | 0.9993        | 0.18                            | 0.60                            | 102.8  |
|     | 克氏千里光碱       | $Y=54900X-1010$   | 0.9995        | 0.30                            | 1.00                            | 99.5   |
|     | 倒千里光碱-N-氧化物  | $Y=1689X-74.80$   | 0.9998        | 3.00                            | 10.00                           | 107.0  |
|     | 倒千里光碱        | $Y=9444X-621.0$   | 0.9995        | 0.60                            | 2.00                            | 104.8  |
|     | 千里光碱-N-氧化物   | $Y=15942X-808.0$  | 0.9997        | 0.45                            | 1.50                            | 102.8  |
|     | 欧天芥菜碱-N-氧化物  | $Y=79014X-8972$   | 0.9991        | 0.24                            | 0.80                            | 92.3   |
| 毫菊  | 千里光宁碱-N-氧化物  | $Y=9161X-168.0$   | 0.9996        | 0.60                            | 2.00                            | 101.9  |
|     | 千里光宁碱        | $Y=19866X-1637$   | 0.9993        | 0.45                            | 1.50                            | 103.9  |
|     | 天芥菜碱-N-氧化物   | $Y=79319X-661.3$  | 0.9995        | 0.24                            | 0.80                            | 100.3  |
|     | 千里光菲灵碱-N-氧化物 | $Y=8623X-480.3$   | 0.9994        | 0.75                            | 2.50                            | 104.4  |
|     | 千里光菲灵碱       | $Y=16043X-4274$   | 0.9998        | 0.45                            | 1.50                            | 105.4  |
|     | 天芥菜碱         | $Y=139877X-17486$ | 0.9999        | 0.15                            | 0.50                            | 96.9   |
|     | 促黑激素-N-氧化物   | $Y=41084X-4881$   | 0.9993        | 0.36                            | 1.20                            | 92.4   |
|     | 千里光碱         | $Y=7713X-174.0$   | 0.9999        | 0.75                            | 2.50                            | 110.6  |
|     | 欧天芥菜碱        | $Y=99156X-1108$   | 0.9998        | 0.18                            | 0.60                            | 90.6   |
|     | 促黑激素         | $Y=94836X-1214$   | 0.9996        | 0.18                            | 0.60                            | 102.6  |
| 杭白菊 | 克氏千里光碱       | $Y=63518X-1456$   | 0.9995        | 0.30                            | 1.00                            | 99.5   |
|     | 倒千里光碱-N-氧化物  | $Y=2106X-18.93$   | 0.9992        | 3.00                            | 10.00                           | 104.0  |
|     | 倒千里光碱        | $Y=11322X-332.0$  | 0.9999        | 0.60                            | 2.00                            | 105.0  |
|     | 千里光碱-N-氧化物   | $Y=15661X-1294$   | 0.9992        | 0.45                            | 1.50                            | 107.5  |
|     | 欧天芥菜碱-N-氧化物  | $Y=78072X-2996$   | 0.9997        | 0.24                            | 0.80                            | 94.5   |
|     | 千里光宁碱-N-氧化物  | $Y=10790X-140.2$  | 0.9995        | 0.60                            | 2.00                            | 101.5  |
|     | 千里光宁碱        | $Y=22471X-300.3$  | 0.9993        | 0.45                            | 1.50                            | 104.9  |
|     | 天芥菜碱-N-氧化物   | $Y=81397X-4260$   | 0.9996        | 0.24                            | 0.80                            | 100.1  |
|     | 千里光菲灵碱-N-氧化物 | $Y=8662X-593.2$   | 0.9997        | 0.75                            | 2.50                            | 102.1  |
|     | 千里光菲灵碱       | $Y=17709X-2023$   | 0.9998        | 0.45                            | 1.50                            | 107.0  |
| 贡菊  | 天芥菜碱         | $Y=136391X-2300$  | 0.9993        | 0.15                            | 0.50                            | 98.7   |
|     | 促黑激素-N-氧化物   | $Y=39560X-1513$   | 0.9998        | 0.36                            | 1.20                            | 97.3   |
|     | 千里光碱         | $Y=7593X-141.0$   | 0.9997        | 0.75                            | 2.50                            | 103.6  |
|     | 欧天芥菜碱        | $Y=110899X-9915$  | 0.9998        | 0.18                            | 0.60                            | 94.5   |
|     | 促黑激素         | $Y=94281X-8085$   | 0.9994        | 0.18                            | 0.60                            | 104.7  |

表 3 杭白菊、贡菊和毫菊中 15 种 PAs 毒素的回收率和相对标准偏差( $n=5$ )

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of the 15 kinds of pyrrolizidine alkaloids in *Chrysanthemum morifolium* Ramat, florists *Chrysanthemum* and bo-*Chrysanthemum* ( $n=5$ )

| PAs 毒素       | 杭白菊                 |                   | 贡菊                  |                   | 毫菊                  |                   |
|--------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
|              | 添加浓度<br>/(\mu g/kg) | 回收率(相对<br>标准偏差)/% | 添加浓度<br>/(\mu g/kg) | 回收率(相对标<br>准偏差)/% | 添加浓度<br>/(\mu g/kg) | 回收率(相对<br>标准偏差)/% |
| 克氏千里光碱       | 2                   | 84.8 (3.0)        | 2                   | 91.2 (3.0)        | 2                   | 91.7 (4.5)        |
|              | 3                   | 87.5 (4.3)        | 3                   | 83.7 (4.1)        | 3                   | 92.1 (4.9)        |
|              | 4                   | 88.1 (4.6)        | 4                   | 85.0 (4.7)        | 4                   | 85.2 (4.5)        |
| 倒千里光碱-N-氧化物  | 10                  | 88.0 (3.1)        | 10                  | 87.2 (2.7)        | 10                  | 89.3 (3.2)        |
|              | 15                  | 87.0 (3.1)        | 15                  | 86.0 (4.3)        | 15                  | 83.5 (3.7)        |
|              | 20                  | 87.2 (4.9)        | 20                  | 88.1 (3.1)        | 20                  | 83.2 (4.2)        |
| 倒千里光碱        | 2                   | 85.3 (4.0)        | 2                   | 85.3 (3.3)        | 2                   | 89.3 (2.6)        |
|              | 3                   | 88.8 (4.0)        | 3                   | 86.7 (3.9)        | 3                   | 92.4 (4.0)        |
|              | 4                   | 83.6 (4.1)        | 4                   | 87.5 (3.8)        | 4                   | 84.3 (4.6)        |
| 千里光碱-N-氧化物   | 2                   | 88.0 (4.1)        | 2                   | 92.2 (4.0)        | 20                  | 84.7 (3.5)        |
|              | 3                   | 92.4 (4.0)        | 3                   | 83.1 (3.7)        | 50                  | 84.6 (4.0)        |
|              | 4                   | 84.0 (3.7)        | 4                   | 83.6 (3.9)        | 200                 | 85.7 (3.7)        |
| 欧天芥菜碱-N-氧化物  | 2                   | 91.7 (2.8)        | 2                   | 90.8 (3.3)        | 20                  | 90.3 (3.9)        |
|              | 3                   | 83.0 (4.7)        | 3                   | 82.2 (3.8)        | 50                  | 91.2 (4.4)        |
|              | 4                   | 83.8 (4.6)        | 4                   | 91.6 (3.6)        | 200                 | 82.8 (4.9)        |
| 千里光宁碱-N-氧化物  | 2                   | 88.0 (4.1)        | 2                   | 85.2 (3.5)        | 5                   | 89.2 (4.3)        |
|              | 3                   | 91.6 (4.2)        | 3                   | 87.9 (4.3)        | 50                  | 89.1 (4.5)        |
|              | 4                   | 91.6 (4.3)        | 4                   | 89.5 (3.6)        | 200                 | 89.8 (4.7)        |
| 千里光宁碱        | 2                   | 92.0 (3.1)        | 2                   | 85.0 (3.3)        | 5                   | 89.5 (4.9)        |
|              | 3                   | 92.2 (4.2)        | 3                   | 87.2 (3.4)        | 50                  | 91.4 (4.4)        |
|              | 4                   | 84.2 (4.0)        | 4                   | 89.2 (3.8)        | 200                 | 92.2 (4.9)        |
| 天芥菜碱-N-氧化物   | 2                   | 84.3 (3.9)        | 2                   | 86.0 (3.2)        | 5                   | 84.2 (2.9)        |
|              | 3                   | 84.0 (3.4)        | 3                   | 85.8 (3.0)        | 50                  | 84.7 (4.4)        |
|              | 4                   | 85.3 (3.8)        | 4                   | 90.1 (3.8)        | 200                 | 84.3 (4.8)        |
| 千里光菲灵碱-N-氧化物 | 10                  | 87.0 (4.0)        | 10                  | 85.0 (3.6)        | 10                  | 86.3 (2.8)        |
|              | 15                  | 90.0 (4.1)        | 15                  | 85.6 (3.5)        | 15                  | 87.2 (3.8)        |
|              | 20                  | 89.0 (3.5)        | 20                  | 87.8 (3.7)        | 20                  | 89.0 (4.8)        |
| 千里光菲灵碱       | 2                   | 86.5 (3.3)        | 2                   | 90.7 (3.5)        | 2                   | 84.5 (3.1)        |
|              | 3                   | 85.6 (3.5)        | 3                   | 87.3 (4.8)        | 3                   | 85.6 (4.9)        |
|              | 4                   | 89.6 (4.6)        | 4                   | 92.3 (3.8)        | 4                   | 85.8 (3.6)        |
| 天芥菜碱         | 2                   | 88.2 (3.2)        | 2                   | 83.8 (2.5)        | 2                   | 89.7 (3.6)        |
|              | 3                   | 90.0 (3.6)        | 3                   | 86.7 (4.1)        | 3                   | 85.2 (3.7)        |
|              | 4                   | 88.7 (3.6)        | 4                   | 88.8 (4.4)        | 4                   | 85.0 (4.4)        |
| 促黑激素-N-氧化物   | 2                   | 85.7 (2.7)        | 2                   | 89.2 (3.8)        | 2                   | 91.8 (4.7)        |
|              | 3                   | 88.7 (4.1)        | 3                   | 90.1 (4.1)        | 3                   | 84.0 (4.4)        |
|              | 4                   | 86.7 (4.4)        | 4                   | 91.2 (4.7)        | 4                   | 85.6 (4.4)        |
| 千里光碱         | 10                  | 88.9 (3.1)        | 10                  | 89.0 (2.4)        | 10                  | 85.0 (4.1)        |
|              | 15                  | 90.5 (4.1)        | 15                  | 88.8 (3.1)        | 15                  | 85.0 (4.8)        |
|              | 20                  | 87.3 (4.5)        | 20                  | 90.3 (4.7)        | 20                  | 87.2 (4.0)        |
| 欧天芥菜碱        | 2                   | 89.0 (3.1)        | 2                   | 88.3 (2.8)        | 2                   | 86.0 (3.2)        |
|              | 3                   | 85.2 (2.7)        | 3                   | 86.1 (3.3)        | 3                   | 86.2 (3.4)        |
|              | 4                   | 89.9 (3.5)        | 4                   | 85.8 (3.9)        | 4                   | 88.0 (4.1)        |
| 促黑激素         | 2                   | 90.7 (4.6)        | 2                   | 91.5 (2.1)        | 2                   | 89.2 (2.9)        |
|              | 3                   | 87.9 (4.8)        | 3                   | 91.8 (4.4)        | 3                   | 91.1 (4.0)        |
|              | 4                   | 85.1 (2.9)        | 4                   | 91.9 (4.5)        | 4                   | 84.4 (4.2)        |

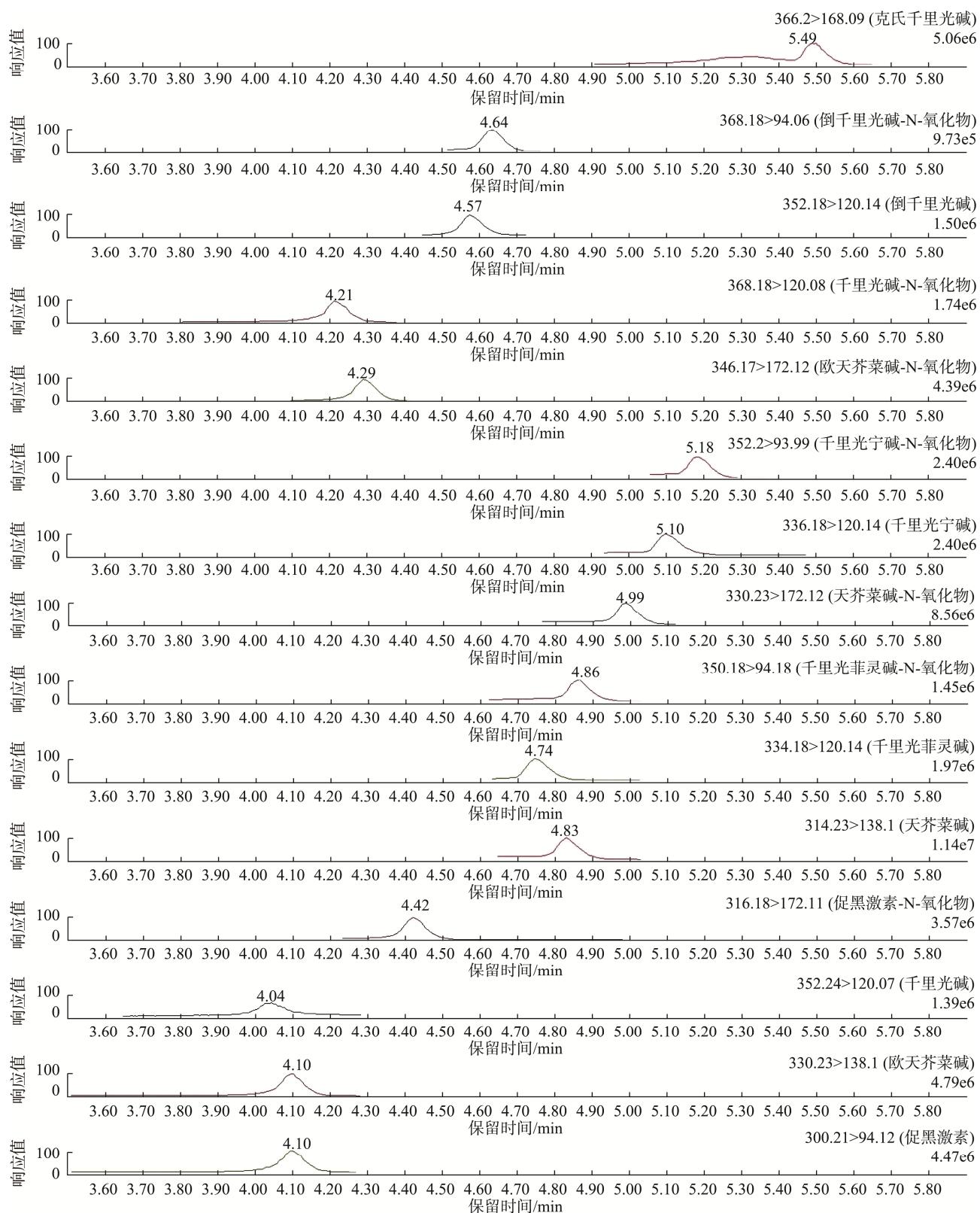


图 2 杭白菊加标样品的 MRM 色谱图  
Fig.2 MRM chromatogram of spiked *Chrysanthemum morifolium* Ramat sample

由表 3 可知, 15 种 PAs 毒素的加标回收率为 82.8%~92.4%, 相对标准偏差为 2.1%~4.9%。结果表明, 对

于杭白菊、贡菊和毫菊中 15 种 PAs 毒素的测定方法具有好的准确度和精密度。

## 2.6 方法应用

采用该方法对采集的 100 个杭白菊、贡菊和毫菊样品进行分析, 15 种 PAs 毒素均未检出。

## 3 结 论

本研究对检测 15 种 PAs 毒素的液相色谱质谱参数和样本前处理技术进行优化, 建立了 SPE 样本前处理技术联合 UPLC-MS/MS 测定菊花中 15 种 PAs 毒素的定量检测方法。所建立的检测 15 种 PAs 毒素的 UPLC-MS/MS 分析方法具有适用性强, 重现性好, 精密度高和分析时间短的特点, 可满足菊花样本的定量分析要求。在 UPLC-MS/MS 定量方法的基础上, 优化样品提取溶液及固相萃取柱对目标化合物实现了较好地提取和净化, 该方法灵敏度高, 使用简便, 对菊花中 15 种 PAs 毒素含量的测定具有重要作用, 可以为菊花的质量安全监管提供技术支持。

## 参考文献

- [1] HUANG Z, CHEN M, ZHANG J, et al. Integrative analysis of hepatic microRNA and mRNA to identify potential biological pathways associated with monocrotaline-induced liver injury in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 333: 35–42.
- [2] 孙潇翔, 向娥, 邱帅凯, 等. 吡咯里西啶生物碱毒性作用研究进展[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(2): 76–80.
- [3] SUN XX, XIANG E, QIU SK, et al. Research progress on toxicity of pyrrolizidine alkaloids [J]. *Chin J Pharma*, 2019, 16(2): 76–80.
- [4] ROEDER E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids [J]. *Pharmazie*, 2000, 55(10): 711–726.
- [5] 吴钟玲, 何仲强, 黄志宁, 等. SPE-UPLC-MS/MS 法同时测定花草茶中的 7 种吡咯里西啶类生物碱及其氮氧化物[J]. 中国酿造, 2024, 43(7): 251–256.
- [6] WU ZL, HE ZQ, HUANG ZN, et al. Advance on pharmacologic actions, toxicity and pharmacokinetics of pyrrolizidine alkaloids [J]. *China J Chin Mater Med*, 2009, 34(5): 506–511.
- [7] 熊芬, 谷丽华, 杨莉, 等. 含吡咯里西啶生物碱中成药潜在风险评估[J]. 中草药, 2021, 52(17): 5389–5400.
- [8] XIONG F, GU LH, YANG L, et al. Risk evaluation of Chinese patent medicine containing pyrrolizidine alkaloids [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2021, 52(17): 5389–5400.
- [9] KOPP T, ABDEL-TAWAB M, MIZAIKOFF B. Extracting and analyzing pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants: A review [J]. *Toxins*, 2020, 12: 320–330.
- [10] WHO. Pyrrolizidine alkaloids. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives series: 71-S2. Prepared by the eightieth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) [Z]. 2020.
- [11] GEBUREK I, PREISS-WEIGERT A, LAHRSSEN-WIEDERHOLT M, et al. *In vitro* metabolism of pyrrolizidine alkaloids-Metabolic degradation and GSH conjugate formation of different structure types [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 135: 110868.
- [12] YANG M, MA J, RUAN J, et al. Intestinal and hepatic biotransformation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to toxic pyrrolizidine alkaloids [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(8): 2197–2209.
- [13] JIA ZJ, TAKAYAMA H, FUTAMURA Y, et al. Catalytic enantioselective synthesis of a pyrrolizidine-alkaloid-inspired compound collection with antiplasmodial activity [J]. *J Org Chem*, 2018, 83(13): 7033–7041.
- [14] 廖仕成, 李荷丽, 刘红河. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测中药材及植物性食品中 23 种有毒生物碱[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 10(23): 141–149.
- [15] LIAO SC, LI HL, LIU HH. Simultaneous determination of 23 kinds of toxic alkaloids in Chinese medicinal materials and plant-derived food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 10(23): 141–149.
- [16] CAROLIN F, THOMAS K, KLAUS W, et al. High abundance of pyrrolizidine alkaloids in bee pollen collected in July 2019 from Southern Germany [J]. *Environ Monit Ass*, 2022, 194: 250–270.
- [17] LUO Z, LI X, WANG L. Development of UPLC-QTOF-MS coupled with cation-exchange solid-phase extraction method for the determination of ten pyrrolizidine alkaloids in herbal medicines [J]. *Anal Sci*, 2019, 35: 1317–1325.
- [18] 钟珂, 李耀磊, 王莹, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 法快速测定蜂蜜中 28 个吡咯里西啶生物碱的含量及风险评估[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(12): 2087–2094.
- [19] ZAN K, LI YL, WANG Y, et al. Risk assessment and fast determination of 28 pyrrolizidine alkaloids in honey by QuEChERS method and UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(12): 2087–2094.
- [20] 刘慧, 穆同娜, 林立, 等. 食物源吡咯里西啶类生物碱污染水平、检测技术及加工影响的研究现状[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 392–403.
- [21] LIU H, MU TN, LIN L, et al. Research progress on contamination levels, analytical methods and processing effects of pyrrolizidine alkaloids in food [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2023, 44(24): 392–403.
- [22] KWON Y, KOO Y, JEONG Y. Determination of pyrrolizidine alkaloids in teas using liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with rapid-easy extraction [J]. *Foods*, 2021, 10: 2250–2255.
- [23] JEONG SH, CHOI EY, KIM J, et al. LC-ESI-MS/MS simultaneous analysis method coupled with cation-exchange solid-phase extraction for determination of pyrrolizidine alkaloids on five kinds of herbal medicines [J]. *J AOAC Int*, 2021, 104(6): 1514–1525.
- [24] 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]. 环境化学, 2014, 33(11): 1971–1977.
- [25] CHENG L, WANG D, ZHOU S, et al. Determination of five pyrrolizidine alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2014, 33(11): 1971–1977.
- [26] TIAN F, LI C, WANG X, et al. Comparative study on pharmacokinetics of a series of anticholinergics, atropine, anisodamine, anisodine, scopolamine and tiotropium in rats [J]. *Eur J Drug Metab Pharm*, 2015, 40: 245–253.
- [27] AVULA B, SAGI S, WANG YH, et al. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2015, 178: 136–148.

- [21] European Commission. Commission Regulation (EU) 2020/2040 of 11 December 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of pyrrolizidine alkaloids in certain foodstuffs [Z]. 2020.
- [22] JANK B, RATH J. The risk of pyrrolizidine alkaloids in human food and animal feed [J]. Trends Plant Sci, 2017, 22: 191–193.
- [23] LEON N, MIRALLES P, YUSA V, et al. A green analytical method for the simultaneous determination of 30 tropane and pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in teas and herbs for infusions by LC-Q-Orbitrap HRMS [J]. J Chromatogr A, 2022, 1666: 462835–462841.
- [24] 宁娱, 祝晨棟, 莫洁丽, 等. HPLC 法测定一点红中克氏千里光碱的含量[J]. 中国药品标准, 2014, 15(4): 269–272.
- NING Y, ZHU CC, MO JL, et al. Determination of senkirine in herba emiliae by HPLC [J]. Drug Stand Chin, 2014, 15(4): 269–272.
- [25] 张新娜, 马丽艳. QuEChERS 结合高效液相色谱-串联质谱法检测甘草中吡咯里西啶生物碱与风险分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(8): 314–321.
- ZHANG XN, MANG LY. Determination of pyrrolizidine alkaloids in licorice by QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and risk analysis [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(8): 314–321.
- [26] 谭春梅, 方翠芬, 王娟娟, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定复方半夏片中吡咯里西啶生物碱和马兜铃酸的含量及风险评估[J]. 中国药学杂志, 2024, 59(17): 1637–1642.
- TANG CM, FANG CF, WANG JJ, et al. Simultaneous determination of pyrrolizidine alkaloids and aristolochic acids in fufang Banxia tablets by UPLC-MS/MS and risk assessment [J]. Chin Pharm J, 2024, 59(17): 1637–1642.
- [27] 陈丽华, 王钧篪, 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.
- CHEN LH, WANG JC, QIAO Y, et al. Simultaneous determination of pyrrolizidine alkaloids in *Sennae folium* by UPLC- MS / MS [J]. Mod Chin Med, 2019, 21(7): 931–936.
- [28] STEGELMEIER BL, COLEGATE SM, BROWN AW. Dehydropyrrolizidine alkaloid toxicity, cytotoxicity, and carcinogenicity [J]. Toxins, 2016, 8: 356–370.
- [29] MOREIRA R, PEREIRA DM, VALENTAO P, et al. Pyrrolizidine alkaloids: Chemistry, pharmacology, toxicology and food safety [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 1668–1689.
- [30] PRELIASCO M, GARDNER D, MORAES J, et al. Senecio grisebachii Baker: Pyrrolizidine alkaloids and experimental poisoning in calves [J]. Toxicol, 2017, 133: 68–73.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)

## 作者简介

章 豪, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农兽药及有机污染物残留降解分析及风险评估研究。

E-mail: xhiaopang@zju.edu.cn