

固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法快速测定乳粉及液体乳中26种吡咯里西啶生物碱的含量

陈言凯

(福建省产品质量检验研究院, 国家加工食品质量检验检测中心, 福建 福州 350002)

摘要:以固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱技术, 建立同时测定乳粉及液体乳中26种吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)含量的方法。样品采用5%三氯乙酸溶液进行提取、阳离子交换固相萃取柱净化后, 经ACQUITY HSS T3色谱柱分离, 以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 在电喷雾正离子源多反应监测模式下进行测定, 采用外标法定量。在最优条件下进行方法验证, 26种PAs化合物在1.0~40 ng/mL范围内线性关系良好, 决定系数(R^2)均大于0.992, 方法检出限(信噪比为3)为0.01~0.33 $\mu\text{g/kg}$, 定量限(信噪比为10)为0.03~1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。以空白乳粉和牛乳基质进行1、2、10倍定量限的加标回收实验($n=6$), 26种PAs化合物回收率在73.1%~111.6%之间, 相对标准偏差为0.6%~9.8%。综上, 该方法简单高效、灵敏度高、准确度高, 适用于乳粉及液体乳中26种PAs的测定。

关键词:固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱; 乳粉和液体乳; 吡咯里西啶生物碱

Rapid Determination of 26 Pyrrolizidine Alkaloids in Milk Powder and Liquid Milk by Solid Phase Extraction Combined with Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

CHEN Yankai

(National Quality Supervision and Testing Center for Processed Food,
Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of 26 pyrrolizidine alkaloids (PAs) in milk powder and liquid milk by solid phase extraction (SPE) combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The samples were extracted with 5% trichloroacetic acid solution, cleaned up on a polymer cation exchange-solid phase extraction (PCX-SPE) column, separated on an ACQUITY HSS T3 column with gradient elution using a mobile phase consisting of methanol and 0.1% formic acid in water, detected using an electrospray ionization (ESI) in the positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM), and finally quantified by the external standard method. The method validation was performed under optimal conditions. The calibration curves for the 26 PA compounds showed good linearity in the range of 1.0–40 ng/mL with determination coefficients (R^2) greater than 0.992. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the developed method were in the range of 0.01–0.33 $\mu\text{g/kg}$ ($R_{S/N} = 3$) and 0.03–1.0 $\mu\text{g/kg}$ ($R_{S/N} = 10$), respectively. Recoveries for blank milk powder and liquid milk spiked at 1 \times , 2 \times , and 10 \times LOQ levels ranged from 73.1% to 111.6% with relative standard deviations (RSDs, $n = 6$) of 0.6%–9.8%. In conclusion, this method is simple, efficient, sensitive, accurate, and suitable for the determination of the 26 PAs in milk powder and liquid milk.

Keywords: solid phase extraction; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; milk powder and liquid milk; pyrrolizidine alkaloids

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240804-026

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)24-0266-07

引文格式:

陈言凯. 固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法快速测定乳粉及液体乳中26种吡咯里西啶生物碱的含量[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 266-272. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240804-026. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2024-08-04

基金项目: 福建省产品质量检验研究院科研项目(KY202220A); 市场监管总局科技计划资助项目(2021MK054)

第一作者简介: 陈言凯(1987—)(ORCID: 0009-0004-6016-8507), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品安全检测。

E-mail: 122361400@qq.com

CHEN Yankai. Rapid determination of 26 pyrrolizidine alkaloids in milk powder and liquid milk by solid phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2024, 45(24): 266-272. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240804-026. <http://www.spkx.net.cn>

乳粉及液体乳中含有丰富的优质蛋白、维生素和矿物质,对预防心血管疾病、促进骨骼健康以及改善人体免疫系统具有积极作用,已成为人们膳食生活中不可或缺的重要组成部分^[1-3]。但一直以来,乳粉及液体乳质量安全事件却屡见不鲜。近年来,随着人们生活水平的不断提高,对于乳粉及液体乳的质量安全也提出了更高的要求。目前,对于乳粉及液体乳质量安全的研究主要针对农兽药残留、重金属、营养元素以及微生物致病菌检测,但最新的报道发现乳粉及液体乳中存在另一类新型毒性污染物——吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)^[4]。

PAs是一类普遍存在于植物中的生物碱,本身没有毒性,但经过动物肝功能代谢形成的不饱和PAs及其氮氧化物(PANOs)具有较强的毒性,其主要毒性靶器官为肝脏,还会引发肺、肾毒性,并具有致突变、致癌和发育毒性^[5],每年因此引发的中毒事件层出不穷^[6-8],威胁人们的身体健康。现有文献已经报道了多起关于蜂蜜、花粉、鸡蛋等食品中含有PAs的案例^[9-10],国际上多个国家也纷纷出台了一系列关于PAs的监控措施,世界卫生组织率先发布了针对PAs的健康风险评估指导原则^[11];德国卫生部门对于含PAs的草药产品设定了严格的每日容许摄入量(内用0.1 μg,外用为10 μg),并明确禁止孕妇及哺乳期妇女食用^[12];荷兰则明确规定每100 g食品中PAs的含量不得超过0.1 μg;而澳大利亚和新西兰同样规定了每人每日对PAs的最大摄入量不得超过1 μg/kg m_b ^[6]。而我国《药典》对于PAs的限量规定仅针对“千里光”药材^[13],对于食品则未见相关的法律法规,更无相关的国家标准。因此,建立一种乳粉及液体乳中多种PAs的快速测定方法对于研究乳粉及液体乳生产过程中是否会导致PAs毒性代谢产物的累积具有重要的现实意义。

目前,对于PAs的测定主要针对的是茶叶、蜂蜜和草药^[14-21],而对于乳粉及液体乳中PAs的研究却鲜有报道。现阶段对PAs的测定主要采用液相色谱-串联质谱法^[19-27]、气相色谱^[28-29]和气相色谱-质谱联用^[14,30]法。相对于气相色谱和气相色谱-质谱联用技术,液相色谱-串联质谱技术具有更高的选择性、更高的灵敏度以及更简单的前处理方式,尤其是针对复杂基质以及多种化合物的同时测定,已成为食品检测的主流检测方法。因此,本研究以固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱技术,开创性地建立乳粉及液体乳中同时测定26种PAs的分析方法,旨在为相关部门对于乳粉及液体乳中PAs类物质的监控提供技术支持,促进乳粉及液体乳市场的健康发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

26种吡咯里西啶标准溶液(质量浓度均为100 μg/mL)常州坛墨质检科技股份有限公司;甲酸、乙腈、甲醇(色谱纯)德国Merck公司;三氯乙酸(分析纯)国药集团化学试剂有限公司;盐酸(分析纯)西陇科学股份有限公司;实验用水为超纯水机制备(电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$);Cleanert PCX固相萃取小柱(200 mg/3 mL)天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-MS 8050超高效液相色谱仪-串联三重四极杆质谱仪日本岛津公司;Aanti J-E高速冷冻离心机美国赛默飞公司;Milli-Q超纯水纯化系统美国Millipore公司;DS-8510 DTH超声波振荡器上海生析超声有限公司;BSA224S电子天平德国Sartorius公司;MS 3 basic旋涡混匀器德国IKA公司;ACQUITY HSS T3色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μm)美国沃特世公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

超高效液相色谱柱:ACQUITY HSS T3(2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μm);流动相A为体积分数0.1%甲酸溶液,流动相B为甲醇;流速:0.3 mL/min;柱温:35℃;进样量:2 μL;梯度洗脱程序:0~10 min, 90%~5% A、10%~95% B;10.1~13 min, 5% A、95% B;13~13.1 min, 5%~90% A、95%~10% B;13.1~15 min, 90% A、10% B。

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源(正离子模式);多反应监测模式;接口温度300℃;脱溶剂温度526℃;DL管温度250℃;加热块温度400℃;雾化气流量3 L/min;干燥气流量10 L/min。

1.3.3 标准溶液的配制

分别准确吸取26种PAs标准溶液,以50%甲醇溶液将其稀释成质量浓度均为1.00 μg/mL的混合标准中间液,保存于-18℃冰箱。再移取适量混合标准中间液以10%甲醇溶液分别稀释成质量浓度为1.0、2.0、4.0、10、20、40 ng/mL的标准系列工作曲线溶液,临用时现配。

1.3.4 样品前处理

准确称取1 g样品于15 mL塑料离心管中,加入10 mL 5%三氯乙酸溶液,涡旋混匀后超声提取30 min,10 000 r/min离心5 min,转移上层溶液至活化后的PCX固相萃取小柱净化(3 mL甲醇、3 mL水活化),以

3 mL 5%三氯乙酸溶液淋洗, 5 mL 5%氨水-甲醇溶液洗脱。洗脱液在45 ℃水浴条件下进行氮吹至近干, 准确加入10%甲醇溶液1.00 mL复溶, 过0.22 μm聚四氟乙烯滤膜后上机测定。

1.3.5 基质效应分析

基质效应(E)按下式计算:

$$E/\% = \left(\frac{\text{基质匹配标准溶液峰面积}}{\text{溶剂标准溶液峰面积}} - 1 \right) \times 100$$

1.4 数据处理

条件优化实验均重复3次, 以Labsolution 5.1软件进行数据采集, 利用Excel软件进行数据处理, 使用Origin Pro 9.0软件绘图。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

根据化合物的结构以及参考文献[19], 在电喷雾离子源正离子模式下, 以50%乙腈溶液为流动相, 不接色谱柱模式下将质量浓度均为1.0 μg/mL的混合标准使用液进行母离子扫描(Q3 Scan), 分别获得26种化合物的母离子[M+H]⁺, 再进行产物离子扫描获得每个化合物的碎片离子, 根据欧盟2002/657/EC规定中4分制原则, 选取最大及次大的碎片离子作为定量离子和定性离子, 最后在多反应监测模式下, 将26种化合物的母离子和2个碎片离子输入软件, 利用软件的自动优化功能分别获得每个化合物的最优Q1电压、碰撞能以及Q3电压, 优化后的质谱参数见表1。

表1 26种PAs的质谱参数

Table 1 MS parameters for the analysis of 26 PAs

序号	PAs	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	Q1 电压/V	碰撞 能/eV	Q3 电压/V
1	蓝萵定	398.2	120.1* 220.1	-13 -13	-24 -17	-24 -16
2	蓝萵定 N-氧化物	414.2	254.1* 352.2	-18 -14	-29 -24	-27 -26
3	毛果天芥菜碱	412.2	120.1* 336.2	-13 -10	-28 -33	-24 -23
4	N-氧化 毛果天芥菜碱	428.2	136.1 254.2*	-14 -14	-32 -28	-27 -18
5	欧天芥菜碱	330.2	118.1 156.0*	-23 -17	-50 -29	-22 -30
6	N-氧化欧 天芥菜碱	346.2	111.0 172.0*	-15 -18	-35 -30	-15 -18
7	春千里光碱	336.3	120.1* 138.1	-15 -11	-29 -27	-24 -27
8	N-氧化春 千里光碱	352.2	118.1* 136.1	-12 -16	-33 -33	-23 -27
9	天芥菜碱	314.2	138.1* 156.1	-18 -18	-21 -27	-27 -30
10	N-氧化 天芥菜碱	330.2	138.1* 172.1	-19 -19	-22 -27	-27 -18

续表1

序号	PAs	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	Q1 电压/V	碰撞 能/eV	Q3 电压/V
11	印美定碱	300.2	138.1* 156.1	-19 -14	-20 -28	-26 -17
12	N-氧化印 美定碱	316.2	138.1 172.1*	-11 -11	-28 -27	-28 -18
13	石松胺	300.2	138.2* 156.1	-18 -18	-21 -29	-26 -18
14	石松胺 N-氧化物	316.2	138.1 172.1*	-11 -11	-28 -27	-28 -18
15	倒千里光碱	352.2	120.1* 138.1	-11 -11	-33 -29	-23 -27
16	倒千里光碱 N-氧化物	368.2	118.1* 136.1	-21 -12	-30 -34	-24 -27
17	千里光非灵	334.2	120.1* 138.1	-19 -11	-27 -27	-23 -27
18	N-氧化 千里光非灵碱	350.1	120.1* 138.1	-20 -20	-30 -32	-23 -26
19	千里光宁碱	336.2	120.1* 138.1	-15 -15	-28 -29	-23 -27
20	千里光宁碱 N-氧化物	352.2	118.1* 136.1	-12 -12	-29 -34	-23 -26
21	芝麻菜叶 千里光碱	350.2	120.0* 138.0	-25 -25	-29 -27	-23 -27
22	芝麻菜叶千里光 碱N-氧化物	366.2	120.1* 136.1	-20 -20	-32 -33	-24 -27
23	野百合碱	326.2	120.0* 237.2	-22 -22	-34 -24	-23 -26
24	野百合碱 氮氧化物	342.2	118.1 137.0*	-25 -24	-46 -29	-23 -27
25	毛束草碱	354.2	120.1 222.1*	-19 -15	-36 -28	-24 -24
26	克氏千里光碱	366.2	168.2* 122.1	-17 -10	-29 -33	-18 -23

注: *.定量离子。

2.2 色谱条件的优化

对于PAs类化合物, 参考文献[19]主要采用C₁₈色谱柱进行分析, 但前期实验发现一些极性较强的化合物(野百合碱、芝麻菜叶千里光碱、芝麻菜叶千里光碱N-氧化物)在普通C₁₈色谱柱上的保留较差, 出峰时间均在1 min附近, 易造成共流出现象, 影响结果的准确性。因此最终选用在普通C₁₈色谱柱基础上加入极性修饰基团的ACQUITY HSS T3(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)色谱柱进行分析, 显著增强了野百合碱、芝麻菜叶千里光碱、芝麻菜叶千里光碱N-氧化物等极性化合物的保留(保留时间大于2.5 min)。进一步对比了甲醇和乙腈作为有机流动相对26种目标物峰形和响应情况的影响, 结果表明使用甲醇作为有机相时, 4对同分异构体的分离度均优于乙腈。此外, 对比了10 mmol/L乙酸铵(含0.1%甲酸)、0.1%甲酸和0.05%甲酸溶液作水相流动相的效果。结果发现, 乙酸铵的加入对峰形修饰并不明显, 而使用0.1%甲酸溶液作为水相时, 26种化合物的响应更好。因

此最终选择0.1%甲酸-甲醇体系作为流动相。优化后的26种PAs类化合物总离子流色谱图见图1, 4对同分异构体提取离子色谱图见图2。

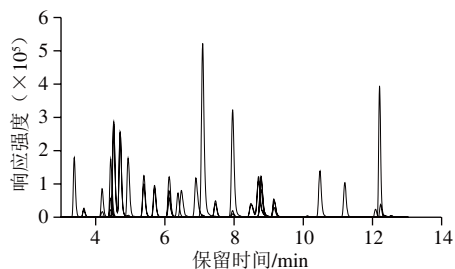
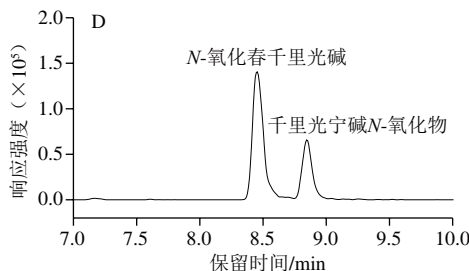
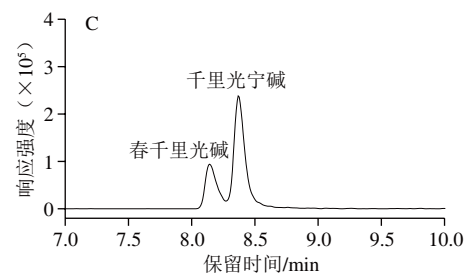
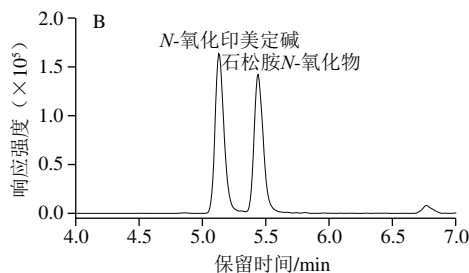
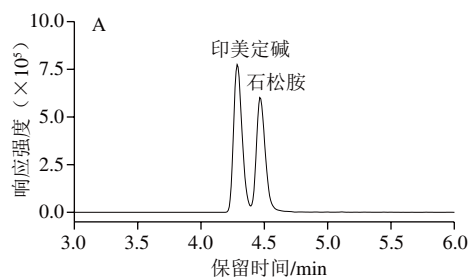


图1 26种PAs的总离子流色谱图(10 ng/mL)

Fig. 1 Total ion current chromatograms of 26 PAs (10 ng/mL)



A.印美定碱与石松胺; B. N-氧化印美定碱与石松胺N-氧化物; C.千里光宁碱与春千里光碱; D. N-氧化春千里光碱与千里光宁碱N-氧化物。

图2 4对同分异构体的提取离子色谱图(10 ng/mL)

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of 4 pairs of isomers (10 ng/mL)

2.3 前处理条件的优化

2.3.1 提取溶剂的选择

由于PAs化合物均易溶于水, 而酸性环境有助于PAs从蛋白中释放。实验采用阴性配方乳粉为基质进行5 $\mu\text{g/kg}$ 加标回收实验, 对比了5%盐酸、5%甲酸和5%三氯乙酸溶液作为提取溶剂对目标物回收率的影响。结果见图3, 3种提取溶剂下, 26种PAs化合物回收率并无明显差异, 回收率均在70.7%~116.4%之间, 但相对于5%盐酸和5%甲酸, 5%三氯乙酸得到的溶液更澄清, 更有助于后续的固相萃取柱净化处理, 这是由于盐酸和甲酸偏向于蛋白质酸水解, 而三氯乙酸则具有较好的蛋白质沉淀能力, 因此选择5%三氯乙酸溶液作为提取溶剂。

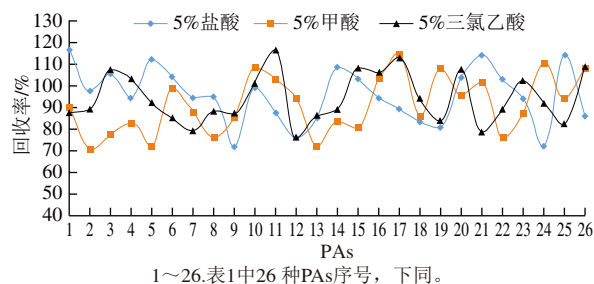


图3 不同提取溶剂对26种PAs回收率的影响

Fig. 3 Effect of different extraction solvents on the recovery of 26 PAs

2.3.2 净化方式的选择

乳粉及液体乳中所含的大量蛋白质、油脂和糖类杂质会对色谱柱、离子源造成严重的污染, 同时还会产生较强的基质效应影响结果的准确性, 需进行净化处理。由于提取液为5%三氯乙酸, 适用于采用保留目标物机理的固相萃取柱进行净化。继续以配方乳粉为基质, 对比了实验室常用的HLB、PCX两种固相萃取柱净化方式。如图4所示, 采用HLB柱净化时, N-氧化欧天芥菜碱、N-氧化千里光非灵碱、千里光宁碱N-氧化物、芝麻菜叶千里光碱N-氧化物的回收率均超过120%, 而毛束草碱和克氏千里光碱的回收率却低于60%, 说明仍存在较强的基质效应; 而采用PCX柱净化时26种目标物回收率为86.1%~109.2%, 这是由于PCX柱可以对目标物进行靶向保留, 选择性更强, 可以更有效除去油脂等非极性杂质, 因此选择PCX作为净化柱。

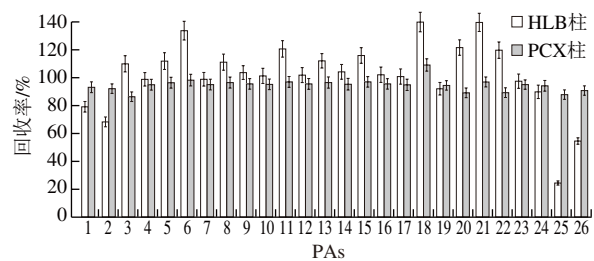


图4 净化方式的选择

Fig. 4 Selection of optimal SPE sorbent

2.4 基质效应

基质效应是质谱分析中普遍存在的现象，是由样品中非挥发性杂质组分在离子源中与目标化合物竞争离子化导致响应增强或减弱的效应。 $E>0$ 时，表示基质效应增强，相反则表示基质效应抑制；当 E 在 $-20\%\sim 20\%$ 之间时，认为基质效应较弱。以阴性配方乳粉和牛乳作为空白基质配制进行实验。如图5所示，两种基质中26种PAs化合物均表现出的不同程度基质效应， E 在 $-13.6\%\sim 10.6\%$ 之间，由此可见，通过PCX柱净化后的样品表现出较小的基质效应，符合分析要求。

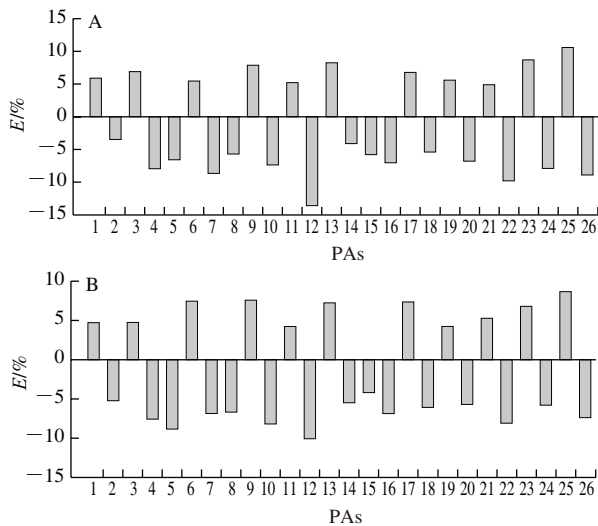


图5 26种PAs在乳粉(A)和牛乳(B)中的基质效应

Fig. 5 Matrix effects of 26 PAs in milk powder (A) and liquid milk (B)

2.5 方法学评价

2.5.1 线性范围、检出限和定量限

将1.3.3节配制的标准系列工作曲线溶液上机测试，分别以26种PAs化合物的峰面积为纵坐标，对应的质量浓度为横坐标，进行线性拟合，26种PAs化合物在 $1\sim 40\text{ ng/mL}$ 范围内线性关系较好，决定系数 $R^2>0.992$ 。并以空白配方乳粉和牛乳为基质进行 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的加标实验，计算信噪比为3对应的浓度为检出限，信噪比为10对应的浓度为定量限，结果如表2所示，26种目标物在配方乳粉以及牛乳基质中的检出限为 $0.01\sim 0.33\text{ }\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $0.03\sim 1.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

表2 乳粉和牛乳中26种PAs的线性方程、检出限和定量限

Table 2 Linear equations, LODs and LODs of 26 PAs in milk powder and liquid milk

PAs	回归方程	R^2	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$		定量限/ $(\mu\text{g/kg})$	
			乳粉	牛乳	乳粉	牛乳
野百合碱	$y=94\ 318.3x+39\ 145.0$	0.996	0.06	0.04	0.17	0.13
芝麻菜叶千里光碱	$y=27\ 516.0x-484.157$	0.998	0.06	0.06	0.18	0.18
野百合碱氮氧化物	$y=51\ 122.8x+14\ 723.9$	0.993	0.08	0.08	0.24	0.24
欧天芥菜碱	$y=50\ 425.0x-879.778$	0.995	0.03	0.09	0.10	0.28
印美定碱	$y=183\ 198x+18\ 735.7$	0.998	0.02	0.02	0.07	0.06
石松胺	$y=172\ 822x+23\ 881.5$	0.995	0.02	0.02	0.07	0.06

续表2

PAs	回归方程	R^2	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$		定量限/ $(\mu\text{g/kg})$	
			乳粉	牛乳	乳粉	牛乳
N-氧化欧天芥菜碱	$y=152\ 181x+7\ 540.12$	0.994	0.01	0.03	0.04	0.10
芝麻菜叶千里光碱 N-氧化物	$y=13\ 336.8x+753.329$	0.993	0.10	0.10	0.30	0.30
N-氧化印美定碱	$y=84\ 973.4x-9\ 859.12$	0.998	0.14	0.08	0.41	0.23
石松胺N-氧化物	$y=71\ 892.9x+1\ 804.20$	0.995	0.05	0.08	0.15	0.24
倒千里光碱	$y=42\ 802.6x+166\ 461$	0.994	0.28	0.11	0.84	0.32
毛束草碱	$y=38\ 305.1x-4\ 887.72$	0.995	0.06	0.14	0.17	0.42
倒千里光碱N-氧化物	$y=43\ 594.9x+26\ 094.3$	0.992	0.05	0.09	0.14	0.27
天芥菜碱	$y=487\ 469x+106\ 348$	0.995	0.01	0.01	0.04	0.04
N-氧化天芥菜碱	$y=385\ 950x+43\ 543.2$	0.997	0.01	0.05	0.03	0.15
千里光非灵	$y=105\ 042x+13\ 952.5$	0.995	0.06	0.10	0.19	0.30
N-氧化千里光非灵碱	$y=45\ 005.9x+12\ 331.7$	0.994	0.29	0.10	0.88	0.30
千里光宁碱	$y=42\ 150.3x-6\ 906.52$	0.999	0.08	0.06	0.25	0.18
蓝菊定N-氧化物	$y=24\ 327.7x-814.214$	0.995	0.04	0.04	0.12	0.14
春千里光碱	$y=84\ 098.3x+9\ 200.21$	0.997	0.23	0.25	0.69	0.75
N-氧化春千里光碱	$y=29\ 845.9x-3\ 342.94$	0.995	0.05	0.05	0.16	0.15
千里光宁碱N-氧化物	$y=58\ 310.5x+13\ 530.5$	0.995	0.05	0.06	0.16	0.18
蓝菊定	$y=192\ 990x+19\ 693.3$	0.998	0.02	0.03	0.06	0.08
克氏千里光碱	$y=86\ 960.7x-9\ 811.26$	0.997	0.33	0.22	1.00	0.67
毛果天芥菜碱	$y=276\ 444x-23\ 730.9$	0.995	0.02	0.02	0.06	0.05
N-氧化毛果天芥菜碱	$y=26\ 565.1x-6\ 836.30$	0.994	0.08	0.20	0.23	0.61

2.5.2 准确度和精密度

为了验证方法的准确度和精密度，以空白配方乳粉和牛乳为基质，进行1、2、 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的加标回收实验($n=6$)。结果显示，26种PAs化合物在两种不同基质中的平均回收率在 $73.1\%\sim 111.6\%$ 之间，相对标准偏差在 $0.6\%\sim 9.8\%$ 之间(表3)，说明该方法具有较好的准确度和精密度，能够满足分析要求。

表3 乳粉及牛乳中26种PAs的回收率和精密度

Table 3 Recovery rates and precision RSDs of 26 PAs in spiked milk powder and liquid milk

PAs	加标水平/ $(\mu\text{g/kg})$	回收率/%		相对标准偏差/%	
		乳粉	牛乳	乳粉	牛乳
野百合碱	1	99.5	100.5	4.9	2.8
	2	98.5	102.9	4.9	5.0
	10	87.2	102.6	4.6	2.5
芝麻菜叶 千里光碱	1	87.9	75.5	3.6	5.7
	2	82.5	87.4	6.4	2.7
	10	79.9	83.6	4.9	3.5
野百合 碱氮氧化物	1	97.8	91.9	5.4	7.2
	2	103.9	101.7	3.1	5.3
	10	98.0	101.7	1.4	1.5
欧天芥菜碱	1	98.2	99.2	4.8	4.4
	2	94.4	105.6	6.7	3.4
	10	90.3	102.1	1.7	3.7
印美定碱	1	99.6	91.7	3.6	5.2
	2	97.5	96.0	1.1	4.0
	10	93.4	96.4	1.5	2.8
石松胺	1	102.2	92.6	4.2	7.6
	2	103.8	100.1	1.3	3.7
	10	99.8	100.9	4.1	2.0
N-氧化欧 天芥菜碱	1	95.3	86.8	5.0	4.1
	2	97.7	98.4	1.1	2.1
	10	96.1	97.6	0.7	2.7

续表3

PAs	加标水平/ ($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%		相对标准偏差/%	
		乳粉	牛乳	乳粉	牛乳
芝麻菜叶千里 光碱N-氧化物	1	93.5	92.2	7.8	4.4
	2	87.8	97.3	8.2	4.5
	10	90.4	96.0	5.6	2.5
N-氧化印 美定碱	1	82.9	96.5	1.7	2.4
	2	90.9	104.1	1.7	2.1
	10	90.8	99.6	1.0	2.5
石松胺 N-氧化物	1	88.0	92.9	1.3	7.0
	2	89.8	104.3	2.3	3.6
	10	90.7	103.7	1.5	1.7
倒千里光碱	1	92.0	85.6	1.8	7.9
	2	98.0	99.7	5.4	5.0
	10	102.1	102.6	1.5	3.5
毛束草碱	1	86.4	73.1	8.0	8.3
	2	96.1	89.6	2.4	5.5
	10	95.6	99.0	2.7	5.7
倒千里光碱 N-氧化物	1	106.0	92.1	2.7	3.2
	2	111.6	92.0	6.1	5.6
	10	100.9	96.3	4.0	5.2
天芥菜碱	1	102.3	94.4	2.2	7.2
	2	103.4	103.8	3.3	5.7
	10	102.7	104.5	2.8	1.0
N-氧化 天芥菜碱	1	97.3	87.4	1.4	7.9
	2	102.1	101.0	2.0	3.2
	10	96.4	95.8	1.0	1.1
千里光非灵	1	102.7	84.2	6.1	2.9
	2	102.1	98.0	7.0	6.2
	10	102.8	98.3	2.1	1.5
N-氧化 千里光非灵碱	1	98.3	82.9	2.3	7.2
	2	101.1	102.9	4.1	2.1
	10	103.7	94.0	3.5	3.7
千里光宁碱	1	90.7	82.9	4.6	5.2
	2	98.8	101.4	5.4	5.6
	10	98.3	97.7	3.2	0.6
蓝薊定 N-氧化物	1	83.7	85.1	7.8	5.0
	2	94.0	109.3	2.5	5.6
	10	93.3	95.7	1.0	2.7
春千里光碱	1	92.1	83.0	3.4	7.2
	2	94.4	88.9	3.4	4.6
	10	89.5	92.7	3.8	4.6
N-氧化春千里 光碱	1	92.2	87.0	7.6	7.6
	2	106.1	97.4	7.0	4.6
	10	98.6	98.5	3.0	3.3
千里光宁碱 N-氧化物	1	88.4	82.4	5.6	5.5
	2	92.5	91.2	4.8	1.0
	10	84.6	95.9	5.6	0.7
蓝薊定	1	89.5	94.8	3.9	1.3
	2	102.8	94.4	3.8	1.0
	10	93.7	99.7	2.0	1.5
克氏千里光碱	1	89.4	87.9	3.3	8.0
	2	101.9	94.6	5.1	7.0
	10	95.3	101.3	2.5	5.2
毛果天芥菜碱	1	101.5	93.4	2.5	2.5
	2	108.8	111.6	3.8	6.0
	10	101.2	111.4	4.1	1.3
N-氧化毛果 天芥菜碱	1	84.2	76.9	9.8	6.0
	2	91.4	101.5	7.1	2.3
	10	98.9	105.0	2.2	4.5

2.6 实际样品检测结果

采用新建立的方法，对福州市售60份常见乳粉及液体乳中26种PAs化合物进行测定，均未检出PAs生物碱成

分，后续可扩大乳粉及液体乳种类以及样本数量进行分析，尽管未检出阳性样品，但方法学验证结果足以说明本方法的可靠性。

3 结 论

本实验采用阳离子交换固相萃取，结合超高效液相色谱-串联质谱技术，成功构建了一种同时测定乳粉及液体乳中26种吡咯里西啶类化合物的分析方法，并对仪器条件以及前处理条件进行系统优化，获得了最佳条件。该方法简单快速、灵敏度高、准确度高、重现性高，可应用于乳粉及液体乳中26种PAs含量的分析，后续可考察该方法对于其他基质的适用性，并进行适当推广，为今后相关标准的制定提供技术支持。

参考文献：

- [1] 巩立书, 张明凤. 乳制品营养价值与健康效益的研究进展[J]. 中国乳业, 2023(11): 13-17; 22. DOI:10.12377/1671-4393.23.11.03.
- [2] 赵俊鑫, 李亚辉, 祁翰蒙, 等. 基于多种检测技术分析乳制品成分和质量的研究[J]. 中国乳品工业, 2023, 51(1): 41-46. DOI:10.19827/j.issn1001-2230.2023.01.008.
- [3] 尹红力, 刘慧, 佟丽丽, 等. 乳制品与人类健康[J]. 中国乳业, 2023(11): 18-22. DOI:10.12377/1671-4393.23.11.04.
- [4] 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. DOI:10.3969/j.issn.1672-8629.2019.02.003.
- [5] YANG M B, RUAN J Q, GAO H, et al. First evidence of pyrrolizidine alkaloid N-oxide-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in humans[J]. Archives of Toxicology, 2017, 91(12): 3913-3925. DOI:10.1007/s00204-017-2013-y.
- [6] 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. DOI:10.16333/j.1001-6880.2006.06.042.
- [7] LIN G, WANG J Y, LI N, et al. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome associated with consumption of *Gynura segetum*[J]. Journal of Hepatology, 2011, 54(4): 666-673. DOI:10.1016/j.jhep.2010.07.031.
- [8] ROEDER E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids[J]. ChemInform, 1995, 50(2): 83-98. DOI:10.1002/chin.199528310.
- [9] TANG J, AKAO T, NAKAMURA N, et al. *In vitro* metabolism of isoline, a pyrrolizidine alkaloid from *Ligularia duciformis*, by rodent liver microsomal esterase and enhanced hepatotoxicity by esterase inhibitors[J]. Drug Metabolism and Disposition, 2007, 35(10): 1832-1839. DOI:10.1124/dmd.107.016311.
- [10] PELOSO M, SONFACK G M, PADUANO S, et al. Pyrrolizidine alkaloids in food on the Italian market[J]. Molecules, 2023, 28(14): 5346. DOI:10.3390/molecules28145346.
- [11] KEMPF M, REINHARD A, BEUERLE T. Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54(1): 158-168. DOI:10.1002/mnfr.200900529.
- [12] ROEDER E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids[J]. Die Pharmazie, 2000, 55(10): 711-726.

- [13] XIONG A Z, LI Y, YANG L, et al. Simultaneous determination of senecionine, adonifoline and their metabolites in rat serum by UPLC-ESIMS and its application in pharmacokinetic studies[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 50(5): 1070-1074. DOI:10.1016/j.jpba.2009.06.037.
- [14] 韩浩蕾, 姜长岭, 王晨, 等. 茶叶中吡咯里西啶生物碱检测技术、污染水平及健康风险研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 255-266. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200708-106.
- [15] 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. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2023020287.
- [16] SURI A, BHARDWAJ P, SHARMA T. Cultivating nature's pharmacy: strategies for medicinal plants improvement[J]. South African Journal of Botany, 2024, 169: 219-230. DOI:10.1016/j.sajb.2024.03.047.
- [17] 焦艳娜, 彭梦香, 梁香, 等. 茶叶中吡咯里西啶生物碱残留量检测方法 & 研究现状[J]. 中国茶叶, 2024, 46(3): 12-20. DOI:10.3969/j.issn.1000-3150.2024.03.003.
- [18] BERZINA Z, PAVLENKO R, BARTKIENE E, et al. Mycotoxins and pyrrolizidine alkaloids in herbal dietary supplements[J]. Food Additives & Contaminants: Part B Surveillance, 2024, 17(2): 180-192. DOI:10.1080/19393210.2024.2332516.
- [19] 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. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2020.04.007.
- [20] 刘先军, 冯家力, 曾栋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中16种生物碱[J]. 实用预防医学, 2023, 30(8): 922-926.
- [21] 咎珂, 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. DOI:10.16155/j.0254-1793.2021.12.06.
- [22] 佟晓波, 刘广福, 周政秀. 吡咯里西啶类生物碱的提取与定量分析研究[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(4): 158-162. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2024.04.033.
- [23] 兰钧, 旺杰次仁, 德白啦, 等. UPLC-MS/MS法测定千柏鼻炎片和千柏鼻炎胶囊中阿多尼弗林碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(11): 2036-2042. DOI:10.16155/j.0254-1793.2022.11.21.
- [24] JIAO W T, ZHU L, SHEN T T, et al. Simultaneous determination of 15 pyrrolizidine alkaloids and their *N*-oxides in weeds, soil, fresh tea leaves, and tea: exploring the pollution source of pyrrolizidine alkaloids in tea[J]. Food Chemistry, 2024, 434: 137305. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.137305.
- [25] CHENG S, SUN W, ZHAO X N, et al. Simultaneous determination of 32 pyrrolizidine alkaloids in two traditional Chinese medicine preparations by UPLC-MS/MS[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2022, 2022: 7611501. DOI:10.1155/2022/7611501.
- [26] 章豪, 吴银良, 朱勇, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定菊花15种吡咯里西啶生物碱毒素[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(11): 2286-2290; 2294. DOI:10.16178/j.issn.0528-9017.20211151.
- [27] RIZZO S, CELANO R, PICCINELLI A L, et al. Target screening method for the quantitative determination of 118 pyrrolizidine alkaloids in food supplements, herbal infusions, honey and teas by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2023, 423: 136306. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.136306.
- [28] KEMPF M, HEIL S, HASSLAUER I, et al. Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54(2): 292-300. DOI:10.1002/mnfr.200900289.
- [29] 朱雷, 花日茂, 王路瑶, 等. 植物中吡咯里西啶生物碱的检测分析方法研究进展[J]. 农产品质量与安全, 2021(4): 36-42; 46. DOI:10.3969/j.issn.1674-8255.2021.04.006.
- [30] BENAMAR H, TOMASSINI L, FREZZA C, et al. First study on the pyrrolizidine alkaloids of *Pardoglossum cheirifolium* (L.) E.Barbier & Mathez.: GC-MS analysis of their volatile components in the whole plant[J]. Natural Product Research, 2021, 35(21): 4098-4103. DOI:10.1080/14786419.2020.1721491.