

超高效液相色谱-串联质谱法测定铁皮石斛中的吡咯里西啶生物碱

贾宁^{1,2}, 曾绍东^{2*}, 陈吴海², 郭宏斌², 叶剑芝², 林玲², 杨春亮^{2*}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070)(2. 中国热带农业科学院农产品加工研究所, 广东湛江 524001)

摘要: 为了测定铁皮石斛中的吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 的含量, 该研究建立了固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定铁皮石斛中16种不饱和PAs的分析方法。样品经0.05 mol/L硫酸甲醇提取、MCX固相萃取小柱纯化富集, 以甲醇和0.005 mol/L甲酸铵-0.1%甲酸水溶液为流动相, Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱梯度洗脱分离, 采用电喷雾正离子、多反应监测模式进行采集, 基质匹配外标法定量。结果表明, 该方法中16种PAs在0.5~20 µg/L范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.99; 检出限为0.06~0.11 µg/kg, 定量限为0.23~0.35 µg/kg; 在0.5、1.0、10 µg/kg加标水平下, 平均回收率范围在75.38%~110.27%之间, 相对标准偏差为2.61%~7.43%。采用此方法对20份市售铁皮石斛中的PAs进行测定, 结果显示, 12份样品中检出7-乙酰石松胺, 含量为1.02~6.54 µg/kg。该方法操作简便且具有良好的灵敏度和准确性, 适合铁皮石斛中PAs的快速确证和定量分析。

关键词: 铁皮石斛; 吡咯里西啶生物碱; 超高效液相色谱-串联质谱法; 含量测定

文章编号: 1673-9078(2022)02-295-304

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0600

Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in *Dendrobium officinale*

Kimura et Migo by UPLC-MS/MS

JIA Ning^{1,2}, ZENG Shaodong^{2*}, CHEN Wuhai², GUO Hongbin², YE Jianzhi², LIN Ling², YANG Chunliang^{2*}

(1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China) (2.Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: In order to determine the content of pyrrolizidine alkaloids (PAs) in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, an analytical method for the simultaneous determination of 16 kinds of unsaturated PAs in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo by solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was established in this study. Samples were extracted with 0.05 mol/L sulfuric acid methanol, purified and enriched by MCX solid-phase extraction cartridge. The mobile phases were methanol and 0.005 mol/L of ammonium formate - 0.1% of formic acid solution. The separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with gradient elution. The electrospray positive ion and multi-reaction monitoring mode were used for acquisition, and matrix matching external standard method was used for quantification. The results showed that the linear range of 16 kinds of PAs in this method was 0.5~20 µg/L, and the correlation coefficients were all greater than 0.99. The limits of detection were 0.06~0.11 µg/kg, and the limits of quantification were 0.23~0.35 µg/kg. At the spiked levels of 0.5, 1.0 and 10 µg/kg, the average recoveries ranged from 75.38% to 110.27%, with the relative standard deviations ranging from 2.61% to 7.43%. This method was used to determine the PAs in 20 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

引文格式:

贾宁,曾绍东,陈吴海,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定铁皮石斛中的吡咯里西啶生物碱[J].现代食品科技,2022,38(2):295-304

JIA Ning, ZENG Shaodong, CHEN Wuhai, et al. Determination of pyrrolizidine alkaloids in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo by UPLC-MS/MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 295-304

收稿日期: 2021-06-07

基金项目: 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金 (1630122017020); 农业农村部农产品质量安全监管 (风险评估) 专项 (GJFP20210502; GJFP20210503; GJFP2020003); 海南省自然科学基金项目 (219QN290)

作者简介: 贾宁(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品质量安全; E-mail: 2484241367@qq.com

通讯作者: 曾绍东(1983-), 男, 副研究员, 研究方向: 农产品质量安全; E-mail: shaodongzeng@163.com; 杨春亮(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 农产品质量安全; E-mail: zjyangcl@126.com

samples commercially available. The results showed that 7-acetyllycopsamine was detected in 12 samples with the content ranging from 1.02~6.54 $\mu\text{g/kg}$. The method is simple, sensitive and accurate, and is suitable for rapid confirmation and quantitative analysis of PAS in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; pyrrolizidine alkaloids; UPLC-MS/MS; content determination

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 为兰科石斛属草本植物, 是一种名贵中药材, 具有滋阴清热、益胃生津等功效^[1,2], 在我国云南、浙江以及安徽等地均有分布。铁皮石斛中含有丰富的多糖、生物碱、氨基酸以及微量元素, 具有抗肿瘤、抗衰老、降血糖以及增强免疫力等作用^[3]。2018 年铁皮石斛被正式批准为“既是食品又是药品的物质”, 随着药食同源理论在铁皮石斛中的应用, 其被开发为多种功能性食品^[4], 因此对铁皮石斛中风险因子的监测值得关注。

吡咯里西啶生物碱 (Pyrrolizidine alkaloids, PAs) 是植物为抵御食草性动物等的侵害而合成的一种天然毒素, 也是典型的植物次生代谢物^[5]。据统计, 全球约 3% 的有花植物中含有该类生物碱, PAs 主要分布于兰科、菊科、豆科和紫草科等 13 个科^[6]。目前已在 6000 余种植物中分离鉴定出多达 660 种 PAs 及其氮氧化物 (PANOs)^[7,8], 大约 50% 以上都具有毒性, 尤其不饱和 PAs 对人体具有显著的毒性 (包括肝毒性、肺毒性、致突变、致癌性以及遗传毒性等)^[9-12]。近年来, 在澳大利亚、俄罗斯、阿富汗、印度和美国等国家均有报道, 因食用含 PAs 的中草药、茶或被 PAs 污染的食物 (如牛奶、蜂蜜、谷物或肉类等), 从而导致人畜中毒的事件时有发生, 此现象已经引起各国食品药品监管机构以及研究学者的高度关注^[13]。

目前对铁皮石斛中风险因子的研究主要集中于重金属、农药残留等外源性因素^[14], 而对其内源性风险因子的研究极少, 对铁皮石斛中 PAs 的研究尚属空白。关于 PAs 的检测方法并不多, 一般都是针对蜂蜜^[15-18]和传统中草药^[19-22]。常见的 PAs 检测分析方法包括分光光度法^[7,8]、酶联免疫法 (ELISA)^[23]、核磁共振法 (NMR)^[24]、高效液相色谱法 (HPLC)^[25]、气相色谱-串联质谱法 (GC-MS) 以及液相色谱-串联质谱法 (LC-MS)^[26]等。其中基于显色反应的分光光度法仅可检测 PAs 总量, 无法对单个 PAs 定量^[8]; ELISA 可对结构上相关的 PAs 进行检测分析, 但无法对多种 PAs 进行定量^[23]; NMR 和 HPLC 灵敏度较低, 不适用于复杂基质中 PAs 的痕量分析^[24,25]。GC-MS 可用于 PAs 的定性定量分析, 但 PANOs 无挥发性, 不能直接用 GC 分析, 需经前处理将 PANO 还原为相应的 PAs, 从而进一步分析^[25]。LC-MS 可同时检测 PAs 和 PANOs, 且具有灵敏度高、选择性好、检出限低和适用范围广等

优点, 而成为目前 PAs 检测方法中最主要的方法^[26]。

本研究建立了固相萃取 (SPE) 结合超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 检测铁皮石斛中蓝薊定 (Echimidine, Em)、蓝薊定-氮氧化物 (Echimidine-N-oxide, EmN)、芝麻菜叶千里光碱 (Erucifoline, Er)、芝麻菜叶千里光碱-氮氧化物 (Erucifoline-N-oxide, ErN)、欧天芥菜碱 (Europine, Eu)、欧天芥菜碱-氮氧化物 (Europine-N-oxide, EuN)、天芥菜碱 (Heliotrine, He)、天芥菜碱-氮氧化物 (Heliotrine-N-oxide, HeN)、毛果天芥菜碱 (Lasiocarpine, Lc)、毛果天芥菜碱-氮氧化物 (Lasiocarpine-N-oxide, LcN)、野百合碱 (Monocrotaline, Mc)、千里光菲灵碱 (Seneciphylline, Sp)、千里光菲灵碱-氮氧化物 (Seneciphylline-N-oxide, SpN)、克氏千里光碱 (Senkirkine, Sk)、毛束草碱 (Trichodesmine, Td) 和 7-乙酰石松胺 (7-Acetyllycopsamine, 7-Ly) 等 16 种不饱和 PAs 及 PANOs (如图 1 所示) 含量的方法, 以期能为铁皮石斛质量监管提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

标准品: 蓝薊定 (批号 12430)、蓝薊定-氮氧化物 (批号 12431)、芝麻菜叶千里光碱 (批号 12640)、芝麻菜叶千里光碱-氮氧化物 (批号 12642)、欧天芥菜碱 (批号 12456)、欧天芥菜碱-氮氧化物 (批号 12636)、天芥菜碱 (批号 13386)、天芥菜碱-氮氧化物 (批号 13485)、毛果天芥菜碱 (批号 13865)、毛果天芥菜碱-氮氧化物 (批号 12395)、野百合碱 (批号 13347)、千里光菲灵碱 (批号 11783)、千里光菲灵碱-氮氧化物 (批号 13878)、克氏千里光碱 (批号 11964)、毛束草碱 (批号 10722)、7-乙酰石松胺 (批号 12176) 均购自德国 phytolab 公司, 色谱纯, 纯度均 $\geq 95\%$; 甲醇、乙腈 (色谱纯), 德国 Merck 公司; 甲酸 (色谱纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 甲酸铵 (色谱纯), 上海安谱实验科技股份有限公司; 硫酸 (98%), 邹平化工有限公司; 氨水 (25%~28%), 广东光华科技股份有限公司; 实验用水为超纯水。

铁皮石斛样品 20 份, 分别购买自广东省湛江市超市、农贸市场和药店。

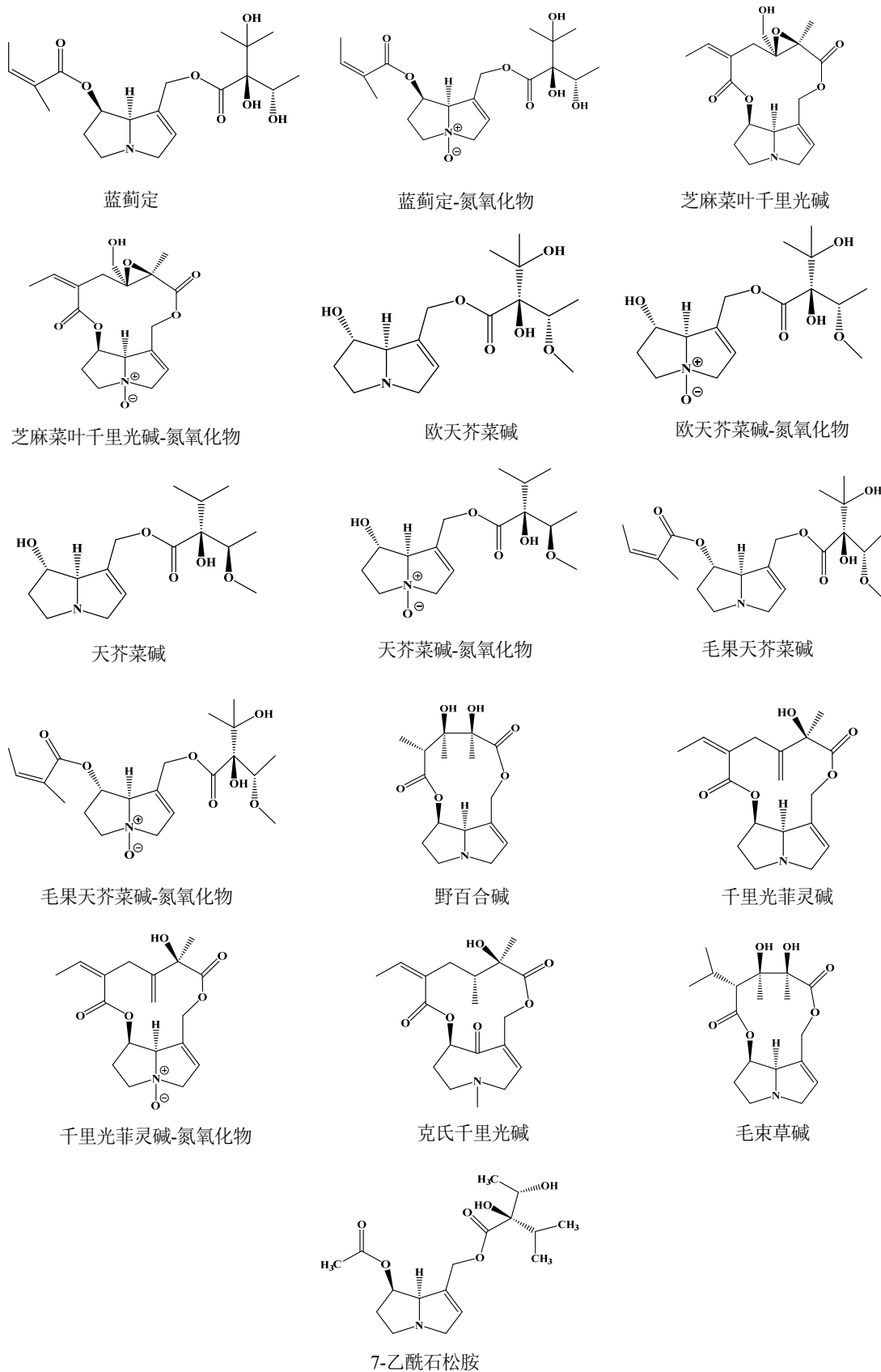


图 1 16 种 PAs 的结构式

Fig.1 The chemical structure of 16 kinds of PAs

1.2 仪器与设备

UPLC-TQS 超高效液相色谱-串联质谱仪, 美国 Waters 公司; ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) ZORBAX LC column (p/n 186002350), 美国 Waters 公司; BJ-750A 型粉碎机, 上海拜杰实业有限公司; E120H 超声仪, 德国 ELMA 公司; 正压型固相萃取装置, 美国 Supelco 公司; Poly-Sery MCX 固相萃取柱 500 mg/6 mL, 上海安谱实验科技股份有限公司; CR22GIII 离心机, 日本 HITACHI 公司; Milli Q 型超纯水器, 美国 Millipore 公司; AUY220 型电子分析天平, 日本岛津公司; N-Evap112 型氮吹仪, 美国 Organomation Associates 公司; MS3 型涡旋混合器, 德国 IKA 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

标准储备液的配制: 分别称取适量的标准物质, 用甲醇溶解, 配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液, 于 -18℃ 保存。

混合标准溶液的配制: 分别量取适量的标准储备液, 用甲醇配制成 1 μg/mL 的混合标准溶液, 于 -18℃ 保存。

基质标准工作溶液的配制: 量取一定体积的混合标准溶液, 用空白样品提取液, 将溶液稀释成适用浓度的基质标准工作溶液。

1.3.2 提取溶剂及流动相的配制

0.05 mol/L 硫酸-甲醇溶液: 量取 2.72 mL 浓硫酸, 加甲醇稀释至 1000 mL, 混匀。

0.005 mol/L 甲酸铵-0.1% 甲酸水溶液: 量取 1 mL 甲酸, 加超纯水至 1000 mL, 加入 315 mg 甲酸铵, 混匀。

1.3.3 样品前处理

称取 2 g 样品粉末于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 0.05 mol/L 硫酸-甲醇溶液润湿, 在常温下超声提取 15 min, 于 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 残渣重复提取, 合并上清液; 将合并后的上清液氮吹浓缩至 10 mL 左右, 备用。

MCX (500 mg/6 mL) 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 0.05 mol/L 硫酸-甲醇溶液活化, 取上述 10 mL 样品提取液上柱, 5 mL 甲醇淋洗除杂, 10 mL 2.5% 氨水-甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液并氮吹浓缩至近干, 用 1 mL 5% 甲醇水复溶, 经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后供超高效液相色谱-串联质谱仪分析测定。

1.3.4 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40℃;

进样量: 3 μL; 采用梯度洗脱程序分别考察甲醇/乙腈-水体系以及在流动相中添加甲酸、甲酸铵对化合物峰形及响应信号的影响, 确定最佳的流动相及洗脱条件。

1.3.5 质谱条件

在电喷雾离子源正离子模式下 (ESI+) 进行多反应监测 (MRM), 毛细管电压: 1.25 kV, 离子源温度: 150℃, 脱溶剂气温度: 500℃, 脱溶剂气流量: 800 L/h。将 0.05 μg/mL 的混合标准溶液注入质谱仪中, 对锥孔电压、碰撞能量等质谱参数进行优化, 确定最佳测定条件。以待测物的准分子离子峰为母离子, 通过优化最佳碰撞能, 找出信号较强的 2 个特征子离子作为定性离子和定量离子, 以确定每种化合物的定性和定量离子对。

1.3.6 方法学考察

1.3.6.1 空白样品的选择

将购买的市售铁皮石斛样品按 1.3.3 方法处理, 在最佳 UPLC-MS/MS 条件下进行测定, 选择无 16 种 PAs 特征峰且对目标物干扰较小的空白样品作为空白基质。

1.3.6.2 基质效应的考察

基质效应 (matrix effect, ME) 根据对目标物响应信号的升高或降低, 可分为基质增强效应和减弱效应。本实验采用提取净化后添加标液法考察基质效应, 基质效应计算公式为:

$$ME = \frac{B-A}{A} \times 100\%$$

式中:

A——溶剂标准曲线的斜率;

B——基质标准曲线的斜率。

当 $ME < \pm 10\%$ 时, 表明基质效应可忽略, 可用溶剂标准曲线定量; 当 $\pm 10\% \leq ME \leq \pm 50\%$ 时, 表明存在基质增强或减弱效应, 需用基质标准曲线定量; 当 $ME > \pm 50\%$ 时, 表明基质效应很强, 需优化前处理方法^[27]。

1.3.6.3 线性范围、检出限和定量限的测定

空白铁皮石斛样品经 1.3.3 方法处理后, 用提取液将 16 种 PAs 的混合标准溶液稀释, 配制成 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μg/L 系列基质标准工作溶液。分别以 16 种 PAs 定量离子的峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制基质标准曲线。以样品峰响应值为 3 倍噪音时的添加浓度为方法检出限 (LOD), 以 10 倍噪音时的添加浓度为方法定量限 (LOQ)。

1.3.6.4 回收率和精密度的测定

在空白铁皮石斛样品中分别添加 0.5、1.0、10 μg/kg 三个水平的标准溶液, 做加标回收实验, 每个添加水平做 6 次平行, 计算回收率和相对标准偏差 (RSD)。

1.3.7 数据处理

表 1 16 种 PAs 的质谱参数

Table 1 MS parameters of 16 kinds of PAs

化合物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V
蓝蓟定	7.20	398.2	119.8*,82.7	44	26,30
蓝蓟定-氮氧化物	7.44	414.2	253.9*,54.6	56	32,64
芝麻菜叶千里光碱	2.32	350.1	119.8*,66.8	32	30,46
芝麻菜叶千里光碱-氮氧化物	2.60	366.1	93.6*,118.8	46	46,30
欧天芥菜碱	2.64	330.2	137.8*,155.9	38	20,30
欧天芥菜碱-氮氧化物	2.94	346.1	171.9*,79.7	62	24,58
天芥菜碱	4.05	314.1	137.8*,155.9	22	18,28
天芥菜碱-氮氧化物	4.73	330.2	171.9*,79.7	64	30,62
毛果天芥菜碱	10.38	412.2	119.8*,219.9	20	28,18
毛果天芥菜碱-氮氧化物	12.36	428.1	136.9*,54.7	44	30,56
野百合碱	2.17	326.1	120.6*,93.9	38	26,42
千里光菲灵碱	4.01	334.2	119.8*,66.8	48	28,48
千里光菲灵碱-氮氧化物	4.56	350.2	93.7*,135.9	60	44,32
克氏千里光碱	8.02	366.2	167.9*,69.7	24	32,46
毛束草碱	3.74	354.2	120.0*,222.1	68	38,30
7-乙酰石松胺	4.11	342.2	119.8*,93.6	30	24,42

注：*为定量离子。

数据采集和处理使用仪器所配置的 Masslynx 软件，图表采用 Microsoft Excel 2016 软件进行绘制。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的确定

在最佳优化条件下，16 种 PAs 均获得了特征离子对，具体参数见表 1。

2.2 色谱条件的确定

鉴于 PAs 为碱性物质，在质谱中以电喷雾正离子电离源（ESI⁺）检测。通常 ESI⁺检测时，流动相中加入酸可促进化合物电离以增强质谱响应，从而提高仪器灵敏度。

多组分分析方法的建立需要兼顾化合物的极性差异，本实验考查了使用不同的色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）和 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）、不同的流动相组合：甲醇-水和乙腈-水体系，以及在流动相中添加甲酸、甲酸铵对化合物峰形及响应信号的影响。实验表明：使用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）对 16 种 PAs 有较好的分离效果，采用甲醇（A）和 0.005 mol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水溶液（B）为流动相，在最佳梯度洗脱条件（见表 2）下，大多数 PAs 有良好的峰形且目标化合物区分度良好，各化合物在出峰位置基本不存在干扰。16 种 PAs 的总离子流图，如图 2 所示。16 种 PAs 的提取离子流图，如图 3 所示。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Mobile phase gradient elution procedure

时间/min	流动相体积比例/%	
	A	B
0.00	5	95
0.50	5	95
1.00	20	80
11.00	37	63
13.00	95	5
15.50	95	5
15.60	5	95

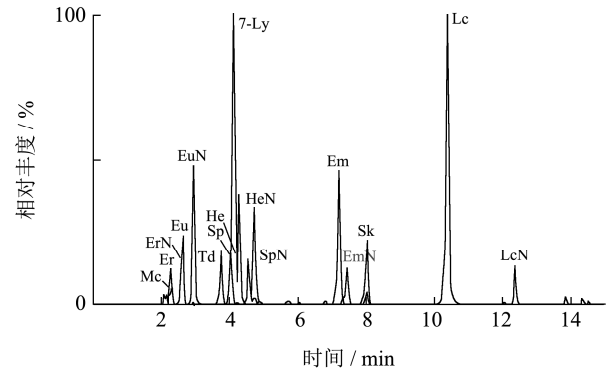


图 2 16 种 PAs 的总离子流图

Fig.2 Total ion chromatograms of 16 kinds of PAs

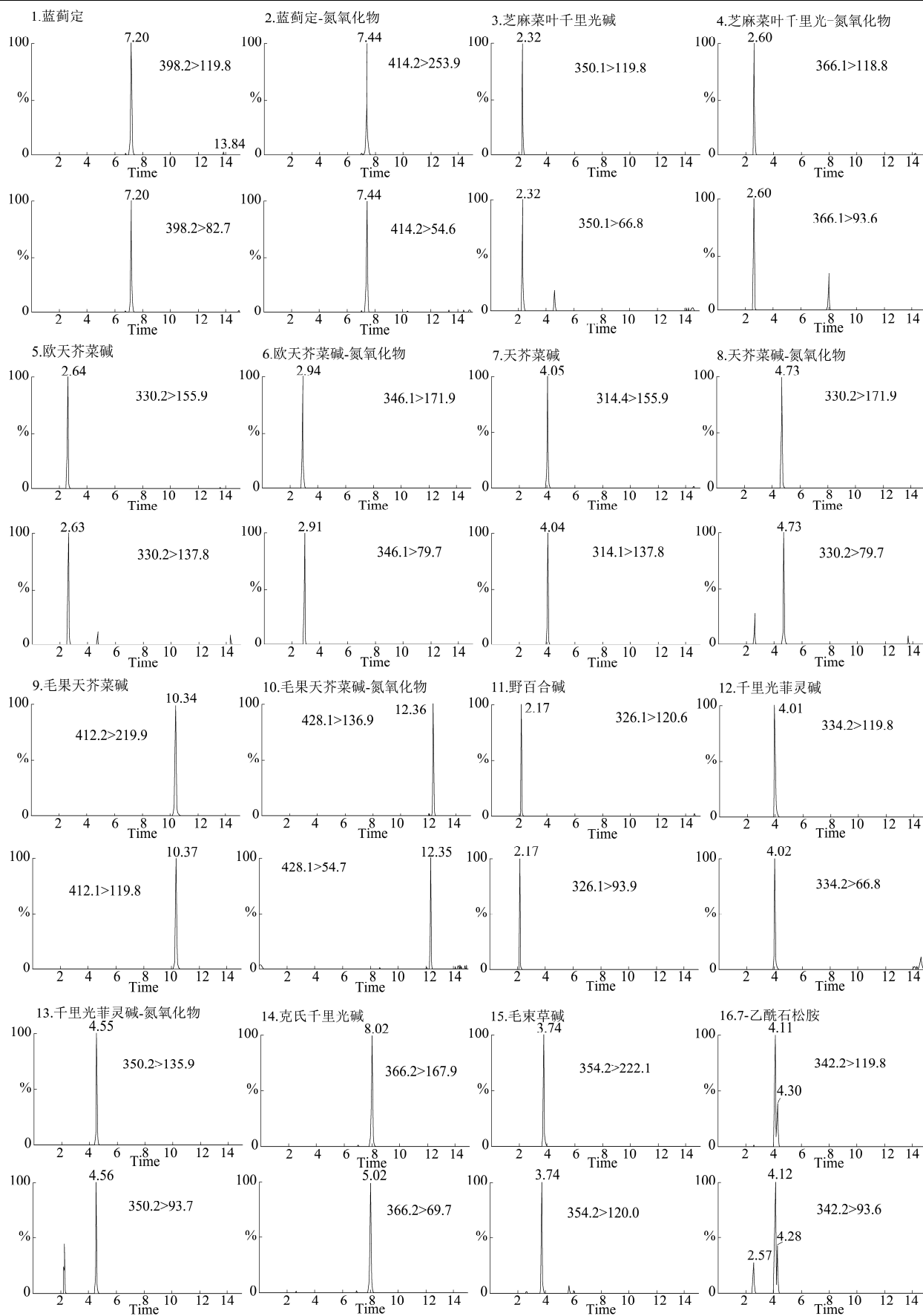


图3 16种PAs的提取离子流图

Fig.3 Extraction of ion chromatograms of 16 kinds of PAs

2.3 提取溶剂的选择

PAAs 及 PANOs 通常共存于植物体内, 关于 PAAs 的提取方法需确保两者均可被提取^[25]。通常使用极性有机溶剂或稀酸溶液萃取 PAAs^[28,29]。本实验考察了甲醇、0.05 mol/L 硫酸甲醇溶液和 0.1 mol/L 硫酸甲醇溶液作为提取溶剂时, 对铁皮石斛中 PAAs 回收率的影响 (见图 4)。结果表明, 使用甲醇做提取溶剂时, 16 种 PAAs 的回收率均较低, 范围为 41.23%~54.67%; 0.05 mol/L 硫酸甲醇溶液和 0.1 mol/L 硫酸甲醇溶液对 PAAs 的回收率范围分别为 79.46%~108.25%、80.52%~106.83%, 回收率较高, 提取效果较好, 且无明显差异。

主要是由于 PAAs 为碱性化合物, 在酸性条件下易电离, 且易溶于甲醇等有机溶剂。因 PAAs 在 0.05 mol/L 硫酸甲醇溶液中可充分离子化, 与使用 0.1 mol/L 硫酸甲醇溶液的提取效果相当, 因此, 采用 0.05 mol/L 硫酸甲醇溶液提取铁皮石斛中的 PAAs。

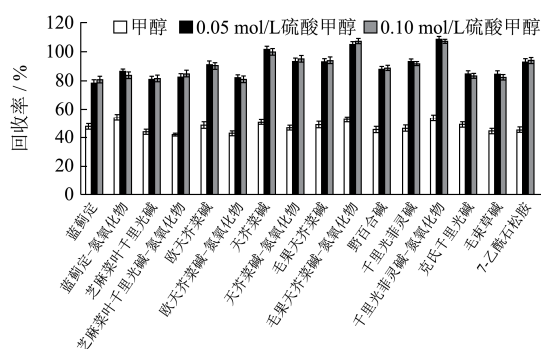


图 4 不同的提取溶剂对铁皮石斛中 PAAs 回收率的影响

Fig.4 Effects of different extraction solvents on the recovery rate of PAAs in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

2.4 净化方式的选择

采用 LC-MS/MS 法对 PAAs 定量测定时, 通常采取 SPE 等净化方式降低背景干扰, 减少基质效应, 提高检测结果的准确性^[30]。本实验比较了 C₁₈-SPE 柱和 MCX-SPE 柱对 PAAs 的净化效果 (见图 5)。结果表明, 使用 C₁₈ 柱对 PAAs 净化时, 16 种 PAAs 的回收率在 57.53%~68.47%之间, 未达到理想的净化效果; 使用 MCX 柱对 PAAs 净化时, 16 种 PAAs 的回收率在 78.36%~110.48%之间, 净化效果较好。

这主要是由于 MCX 小柱是一种混合型阳离子交换固相萃取柱, 可提供反相和阳离子交换的双重保留模式^[31]; 酸性提取液流经小柱, 其中键合有苯磺酸基的共聚物填料由于离子电荷作用, 将目标物吸附于填

料中, 而后在碱性条件下将目标物洗脱收集, 从而达到较好的净化富集效果。本研究结果也进一步证实了 chen 等人^[22]指出的阳离子固相萃取小柱对 PAAs 的纯化富集有良好的效果这一观点。因此, 采用 MCX 固相萃取小柱对铁皮石斛中的 PAAs 富集纯化。

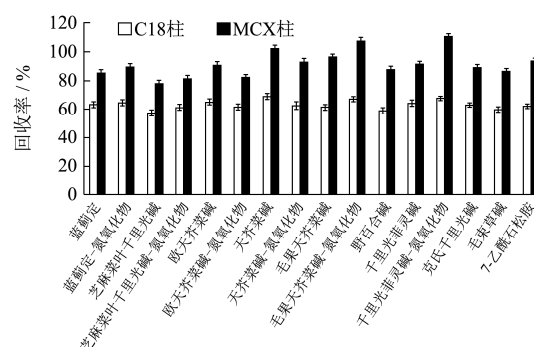


图 5 不同的固相萃取柱对铁皮石斛中 PAAs 的净化效果

Fig.5 Purification effect of different solid phase extraction columns on PAAs in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

2.5 方法学评价

2.5.1 空白样品的确定

经测定, 选择的空白铁皮石斛样品作为空白基质, 如图 6 所示。

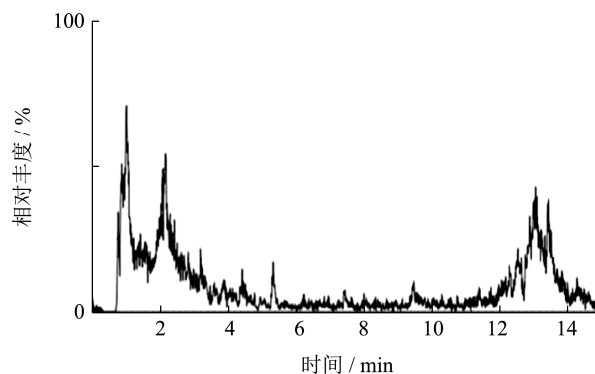


图 6 空白铁皮石斛样品谱图

Fig.6 The spectrum of blank *Dendrobium officinale* Kimura et Migo sample

2.5.2 基质效应

本研究考察了 PAAs 在铁皮石斛中的基质效应, 结果表明, 16 种 PAAs 的 ME 为 -13.65%~34.80% (见表 3)。为消除基质效应的影响, 本实验采用基质匹配外标法进行定量。

2.5.3 线性范围、检出限和定量限

在优化的分析条件下, 16 种 PAAs 在 0.5~20 µg/L 范围内呈良好的线性关系, 相关系数均大于 0.99, 检出限为 0.06~0.11 µg/kg, 定量限为 0.23~0.35 µg/kg。具体数值见表 3。

表 3 16 种 PAs 的基质效应、线性方程、相关系数、检出限及定量限

Table 3 Matrix effect, linear equation, correlation coefficient (r ²), LOD and LOQ of 16 kinds of PAs					
化合物	基质效应/%	线性方程	相关系数(r ²)	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
蓝薊定	-19.38	Y=158454X-1034.04	0.9996	0.09	0.30
蓝薊定-氮氧化物	-27.93	Y=105907X-1237.6	0.9988	0.08	0.28
芝麻菜叶千里光碱	-23.76	Y=44392.9X-1729.84	0.9970	0.11	0.35
芝麻菜叶千里光碱-氮氧化物	-25.90	Y=34549.8X+250.4	0.9992	0.11	0.35
欧天芥菜碱	-31.55	Y=224880X+3980.5	0.9991	0.10	0.32
欧天芥菜碱-氮氧化物	-18.63	Y=123426X+3260.52	0.9995	0.10	0.34
天芥菜碱	-17.48	Y=283860X+6514.48	0.9991	0.08	0.27
天芥菜碱-氮氧化物	-21.54	Y=268771X+3199.56	0.9993	0.09	0.29
毛果天芥菜碱	-14.75	Y=268590X-1346.92	0.9988	0.08	0.25
毛果天芥菜碱-氮氧化物	-34.80	Y=32739.4X-412.821	0.9991	0.08	0.28
野百合碱	-26.33	Y=47758.1X+1961.36	0.9957	0.09	0.31
千里光菲灵碱	-29.45	Y=32937.2X+681.758	0.9978	0.08	0.28
千里光菲灵碱-氮氧化物	-18.90	Y=38602.8X+941.841	0.9990	0.06	0.23
克氏千里光碱	-20.68	Y=129449X-1778.34	0.9985	0.10	0.33
毛束草碱	-24.96	Y=68953.7X+889.598	0.9993	0.07	0.26
7-乙酰石松胺	-13.65	Y=385812X+12316	0.9985	0.07	0.24

表 4 铁皮石斛中 16 种 PAs 加标回收率及相对标准偏差 (RSD) (n=6)

Table 4 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of 16 kinds of PAs in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo samples (n=6)

化合物	加标水平 0.5 μg/kg		加标水平 1.0 μg/kg		加标水平 10 μg/kg	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
蓝薊定	83.74	2.81	86.43	5.32	89.21	3.87
蓝薊定-氮氧化物	91.23	4.34	87.56	6.75	90.64	5.73
芝麻菜叶千里光碱	75.38	6.22	80.97	3.64	77.45	4.62
芝麻菜叶千里光碱-氮氧化物	81.36	5.91	84.72	4.96	79.34	3.78
欧天芥菜碱	90.35	3.53	88.47	2.61	91.90	6.12
欧天芥菜碱-氮氧化物	83.24	4.72	81.53	6.84	78.72	5.39
天芥菜碱	101.33	2.85	96.97	5.43	98.46	4.72
天芥菜碱-氮氧化物	87.43	5.72	90.84	4.25	91.36	5.93
毛果天芥菜碱	93.82	3.54	97.45	2.98	94.23	5.17
毛果天芥菜碱-氮氧化物	98.16	6.83	102.74	7.36	99.04	4.62
野百合碱	80.47	4.91	83.23	3.64	85.72	5.76
千里光菲灵碱	91.73	5.87	88.62	7.43	92.44	3.45
千里光菲灵碱-氮氧化物	104.52	6.34	107.34	5.46	110.27	4.52
克氏千里光碱	87.35	3.92	84.58	4.23	89.64	6.37
毛束草碱	81.44	5.16	84.32	3.74	86.75	5.68
7-乙酰石松胺	93.46	4.73	90.12	6.83	95.94	5.42

2.5.4 回收率和精密度

铁皮石斛中加标回收实验结果显示,在 0.5、1.0、10 μg/kg 加标水平下,16 种 PAs 的回收率为 75.38%~110.27%,RSD 为 2.61%~7.43% (见表 4)。表明,该方法准确度较好,可以满足检测要求。

2.5.5 实际样品的测定

采用本方法对 20 份铁皮石斛中的 16 种 PAs 进行检测。结果表明,其中 12 份样品中检出 7-乙酰石松胺,含量为 1.02~6.54 μg/kg。

3 结论

国内外对 PAs 的研究较少,我国至今没有 PAs 相

关的检测标准。本研究通过优化质谱条件和色谱条件,考察提取和净化方法,建立了 SPE-UPLC-MS/MS 法同时测定铁皮石斛中 16 种 PAs 的分析方法。样品经 0.05 mol/L 硫酸甲醇溶液超声提取,阳离子固相萃取小柱纯化富集,超高效液相色谱-串联质谱仪检测分析,在优化的质谱及色谱条件下,可在 16 min 内有效分离 16 种 PAs,完成仪器检测分析过程。与已有研究相比,本方法操作简便,无需使用锌粉将 PANOs 还原为游离 PAs 后进行检测;结果准确可靠,方法学考察结果较好,在实际检测中具有较强的可操作性,可为制定 PAs 含量检测的标准提供一定的依据。本研究关注铁皮石斛中 PAs 成分,可为铁皮石斛质量安全监管提供参考。

参考文献

- [1] 陈振兴,王万军.药用植物铁皮石斛的研究进展[J].生物学教学,2020,45(9):2-3
CHEN Zhenxing, WANG Wanjun. Research progress on the medicinal plant *Dendrobium officinale* [J]. Biology Teaching, 2020, 45(9): 2-3
- [2] 刘婷,苏洁,王娅君,等.复方铁皮石斛叶超微粉改善高脂血症小鼠的脂质代谢作用[J].现代食品科技,2020,36(4):18-24
LIU Ting, SU Jie, WANG Yajun, et al. Compound *Dendrobium candidum* leaf superfine powder improves lipid metabolism in hyperlipidemia mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 18-24
- [3] 孙恒,胡强,金航,等.铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):225-234
SUN Heng, HU Qiang, JIN Hang, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Dendrobium candidum* [J]. Chinese Journal of Experimental Formulas, 2017, 23(11): 225-234
- [4] 郑秋平,邱道寿,刘晓津,等.铁皮石斛抗肿瘤活性成分的探究[J].现代食品科技,2014,30(5):12-17
ZHENG Qiuping, QIU Daoshou, LIU Xiaojin, et al. Research on anti-tumor active components of *Dendrobium candidum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 12-17
- [5] Gluck J, Ebmeyer J, Waizenegger J, et al. Hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids in human hepatocytes and endothelial cells [J]. Toxicology Letters, 2018, 295(1): 142-142
- [6] Martinello M, Borin A, Stella R, et al. Development and validation of a QuEChERS method coupled to liquid chromatography and high resolution mass spectrometry to determine pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey [J]. Food Chemistry, 2017, 234(1): 295-302
- [7] Keuth O, Humpf H U, Furst P. Pyrrolizidine alkaloids: analytical challenges [J]. Encyclopedia of Food Chemistry, 2019, 1(1): 348-355
- [8] Ma C H, Liu Y, Zhu L, et al. Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: a critical review of recent research [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 119(1): 50-60
- [9] 韩佳寅,梁爱华,高双荣.含吡咯里西啶生物碱植物的特殊毒性及致毒机制研究进展[J].中国中药杂志,2011,36(10): 1397-1401
HAN Jiayin, LIANG Aihua, GAO Shuangrong. Research progress on the specific toxicity and toxic mechanism of plants containing pyrrolizidine alkaloids [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 36(10): 1397-1401
- [10] Dusemund B, Nowak N, Sommerfeld C, et al. Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 115(1): 63-72
- [11] 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
SUN Xiaoxiang, XIANG e, QIU Shuaikai, et al. Research progress on the toxicity of pyrrolizidine alkaloids [J]. Chinese Pharmacovigilance, 2019, 16(2): 76-80
- [12] Chen Z, Huo J R. Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations [J]. The Netherlands Journal of Medicine, 2010, 68(6): 252-260
- [13] 乔月.《中国药典》收录的药材中吡咯里西啶生物碱及其氮氧化物的分析检测研究[D].北京:北京协和医学院,2019
QIAO Yue. Analysis and detection of pyrrolizidine alkaloids and nitrogen oxides in medicinal materials included in "Chinese Pharmacopoeia" [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2019
- [14] 马婧妤,吾建祥,刘莉,等.金华市铁皮石斛农药残留和重金属污染风险评估[J].农技服务,2021,38(2):47-48
MA Jingshu, WU Jianxiang, LIU Li, et al. Risk assessment of pesticide residues and heavy metal pollution in *Dendrobium officinale* in Jinhua city [J]. Agricultural Technology Service, 2021, 38(2): 47-48
- [15] He Y S, Zhu L, Ma J, et al. Comprehensive investigation and risk study on pyrrolizidine alkaloid contamination in Chinese retail honey [J]. Environmental Pollution, 2020, 267(1): 115542-115542
- [16] Rita C, Lisa P A, Luca C, et al. Determination of selected

- pyrrolizidine alkaloids in honey by dispersive liquid-liquid microextraction and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(31): 8689-8699
- [17] Kowalczyk E, Kwiatek K. Pyrrolizidine alkaloids in honey: determination with liquid chromatography-mass spectrometry method [J]. *Journal of Veterinary Research*, 2018, 62(2): 173-181
- [18] 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
- CHENG Li, WANG Dan, ZHOU Shuang, et al. Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(11): 1971-1977
- [19] Griffin C T, Gosetto F, Danaher M, et al. Investigation of targeted pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese medicines and selected herbal teas sourced in Ireland using LC-ESI-MS/MS [J]. *Food Additives & Contaminants*, 2014, 31(5): 940-961
- [20] Letsyo E, Jerz G, Winterhalter P, et al. Incidence of pyrrolizidine alkaloids in herbal medicines from German retail markets: risk assessments and implications to consumers [J]. *Phytotherapy Research*, 2017, 31(12): 1903-1909
- [21] Ji Y B, Wang Y S, Fu T T, et al. Quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids in *Gynura procumbens* by liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry after enrichment by PCX solid-phase extraction [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2019, 99(11): 1090-1102
- [22] Chen L H, Wang J C, Guo Q L, et al. Simultaneous determination and risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in *Artemisia capillaris* Thunb. by UPLC-MS/MS together with chemometrics [J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1-17
- [23] Li Y H, Kan W L T, Li N, et al. Assessment of pyrrolizidine alkaloid-induced toxicity in an *in vitro* screening model [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 150(2): 560-567
- [24] Medina J C M, Gauze G F, Vidotti G J, et al. Structural characterization of saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell by NMR spectroscopy and theoretical calculations [J]. *Tetrahedron Letters*, 2009, 50(22): 2640-2642
- [25] 张燕,马思琪,杨飞飞,等.食品和草药中吡咯里西啶类生物碱的含量分析现状[J].*中国中药杂志*,2020,45(22):5421-5428
- ZHANG Yan, MA Siqi, YANG Feifei, et al. The analysis status of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicine [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 45(22): 5421-5428
- [26] 张芳,王长虹,王峥涛.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*,2006,6:1057-1063
- ZHANG Fang, WANG Changhong, WANG Zhengtao. Detection and analysis of pyrrolizidine alkaloids in plants [J]. *Natural Product Research and Development*, 2006, 6: 1057-1063
- [27] 秦富,邓全道,李湧,等.液相色谱-串联质谱法测定月柿中187种农药残留[J].*分析测试学报*,2018,37(8):879-886
- QIN Fu, DENG Quandao, LI Yong, et al. Determination of 187 pesticide residues in dried persimmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2018, 37(8): 879-886
- [28] Schulz M, Meins J, Diemert S, et al. Detection of pyrrolizidine alkaloids in German licensed herbal medicinal teas [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(6): 648-656
- [29] 李宁,姚令文,刘丽娜,等.UPLC-MS/MS法测定款冬花炮制前后3个吡咯里西啶生物碱的含量[J].*药物分析杂志*,2020,40(7):1262-1267
- LI Ning, YAO Lingwen, LIU Lina, et al. UPLC-MS/MS method to determine the content of three pyrrolizidine alkaloids before and after processing of butterbur flower [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020, 40(7): 1262-1267
- [30] 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
- JIANG Bing, DING Tao, CAO Chongjiang, et al. Simultaneous determination of 9 pyrrolizidine alkaloids in animal-derived foods by HPLC-MS/MS [J]. *Journal of Analysis and Testing*, 2020, 39(4): 473-478
- [31] Crews C, Berthiller F, Krska R. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(1): 327-338