

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240222001

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

张新娜¹, 马丽艳^{1,2*}

[1. 农业农村部农产品质量检验检测中心(北京), 北京 100083;

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083]

摘要: **目的** 建立 QuEChERS 和高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定甘草中吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)的方法。**方法** 甘草样品经 0.05 mol/L 硫酸水 QuEChERS 自动样品制备系统振荡提取后, 用混合型阳离子交换固相萃取小柱(PCX SPE)进行净化, 以 5 mmol/L 甲酸铵水(含 0.1%甲酸)-5 mmol/L 甲酸铵甲醇为流动相, Agilent Proshell 120 EC-C₁₈ 柱进行分离, 利用三重四极杆检测器在多反应监测模式下进行检测。**结果** 利用建立的前处理方法对甘草中 34 种 PAs 做添加回收实验, 在 10、20 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度下的回收率为 71.3%~112.0%, 相对标准偏差为 0.29%~8.18%, 满足检测要求。利用建立的提取和检测方法对 172 个甘草样品中 34 种 PAs 进行监测, 阳性样品检出率为 22.1%, PAs 总含量在 9.5~118.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。其中石松胺、石松胺 N-氧化物、天芥菜碱和大尾摇碱 N-氧化物的检出率最高。**结论** 本研究开发的甘草中 PAs 的提取和检测方法快速、准确, 可同时测定甘草中 34 种 PAs 阳性。所有监测的甘草样品中 PAs 总量低于欧盟限量标准。

关键词: 甘草; 吡咯里西啶生物碱; 高效液相色谱-串联质谱法; QuEChERS

Determination of pyrrolizidine alkaloids in licorice by QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and risk analysis

ZHANG Xin-Na¹, MA Li-Yan^{1,2*}

[1. *Inspection and Testing Center of Agricultural Products Quality (Beijing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100083, China*; 2. *College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China*]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of pyrrolizidine alkaloids (PAs) in licorice by QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Licorice samples were extracted using 0.05 mol/L sulfuric acid by QuEChERS automatic machine and purified by mixed cation exchange solid phase extraction (PCX SPE). The mobile phase consisted of 5 mmol/L ammonium formate water (containing 0.1% formic acid) and 5 mmol/L ammonium formate methanol. The samples were separated on a Proshell 120 EC-C₁₈ column, and analyzed by triple quadrupole tandem mass spectrometry under the multiple reaction monitoring

*通信作者: 马丽艳, 博士, 教授级实验师, 主要研究方向为食品安全技术。E-mail: lyma1203@cau.edu.cn

*Corresponding author: MA Li-Yan, Ph.D., Professor, Inspection and Testing Center of Agricultural Products Quality, (Beijing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs. No.17 Qinghua East Road, Haidian District, Beijing 100083, China. E-mail: lyma1203@cau.edu.cn

mode. **Results** The average recoveries of 34 kinds of PAs in spiked samples ranged from 71.3% to 112.0% at 3 different levels of 10, 20 and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with the relative standard deviations ranging from 0.29% to 8.18%, meeting the analysis requirements. The 172 licorice samples were analyzed by this method, and 22.1% positive samples were found in those samples with total content in the range of 9.5–118.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Among all the PAs, lycopsamine, lycopsamine-N-oxide, heliotrine and indicine-N-oxide were the top 4 most frequently found PAs. **Conclusion** The extraction and detection method for PAs in licorice developed in this study is fast and accurate, and can simultaneously detect 34 kinds of PAs positive in licorice. The total amount of PAs in all monitored licorice samples is below the EU limit standard.

KEY WORDS: licorice; pyrrolizidine alkaloids; high liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS

0 引言

甘草, 别名国老、甜草、甜根子, 其根与根状茎粗壮, 是多年生草本植物, 属于吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)检出率较高的豆科植物。甘草作为我国重要的药食同源植物, 广泛应用于医药、食品、畜牧业等^[1-2]领域。但国内外对甘草中 PAs 的种类、含量和检测技术鲜有报道^[3]。

PAs 是植物的次生代谢产物, 对植物自身具有化学防卫功能^[4], 在一定程度上可抵御草食动物、昆虫和植物病原体的侵害^[5]。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)认为 PAs 是食品与草药产品中最严重和最广泛的内源性毒性与掺杂性的毒性成分^[6]。据统计, 世界上约有 3% 的有花植物(即 6000 余种植物)含有 PAs^[7]。

PAs 的化学结构见图 1。PAs 最基础的结构是由千里光次碱(necine)和千里光次酸(necic acid)两部分组成, 其中千里光次碱主要由一个四氢吡咯环和一个羟甲基取代的四氢吡咯环, 经氮原子和其邻位碳原子耦合构成双环结构。根据其结构的不同, 可分为饱和型 PAs 和不饱和型 PAs 两大类, 前者无毒, 后者因其毒性成为关注的热点^[8]。目前已分离的 PAs 及其氮氧化物衍生物有 660 多种, 其中一半以上为有毒生物碱^[9]。

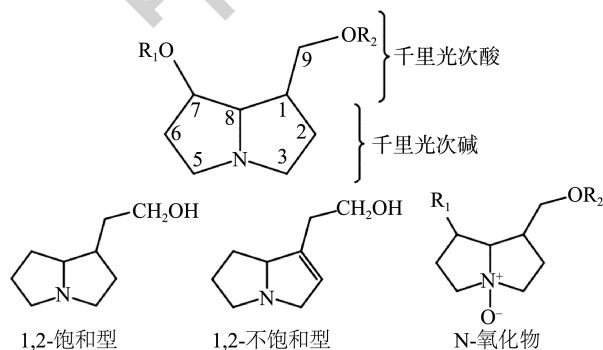


图 1 PAs 的化学结构式

Fig.1 Chemical structural formula of PAs

不饱和型 PAs 原型化合物毒性很小。双稠吡咯环含有 1,2 位双键, 经肝脏代谢可形成烯丙醇酯结构的吡咯代谢物(结构如图 2 所示), 它与组织中各种亲核性的酶、蛋白质、DNA、RNA 结合, 引起肝细胞代谢紊乱、脂肪变性和坏死性损伤, 最后发展成肝硬化^[10]。

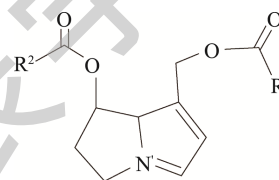


图 2 PAs 代谢物结构图

Fig.2 Structure of PAs metabolites

PAs 的检测方法主要有分光光度法^[11]、核磁共振法^[12]、薄层色谱法^[13]和气相色谱法及联用方法^[14]。因气相色谱法在检测 PAs 时, 存在衍生化烦琐、化合物不稳定等问题, 研究人员探索开发了适合于 PAs 分析的高效液相色谱技术。至今, 反相高效液相色谱-串联质谱法已广泛应用于植物中 PAs 的分离及含量测定^[15-17]。QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)是近年来国际上发展起来的一种用于农产品检测的快速样品前处理技术, 目前已有相关报道利用 QuEChERS 方法对样品中 PAs 的进行提取^[18]。

本研究利用 QuEChERS 结合高效液相色谱-串联质谱法(high liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)提取和检测甘草中的 PAs, 并对 172 个甘草样品中 PAs 的含量情况进行监测, 以期了解甘草中 PAs 的污染水平并进行风险分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇、甲酸(色谱纯)、硫酸、甲酸铵、氨水(分析纯)(北京百灵威科技有限公司); PCX 固相萃取柱(500 mg, 6 mL)、PCX (60 mg, 3 mL)[安捷伦科技(中国)有限公司]; MCX 3cc [60 mg, 3 mL, 沃特世科技(上海)有限公司]; 标准物质[天芥菜碱氮氧化物(heliotrine-N-oxide, HeNO, CAS 号:

6209-65-0, 纯度 100%)、春千里光碱(senecivernine, Sv, CAS 号: 72755-25-0, 纯度 99.7%)、千里光碱氮氧化物(senecionine-N-oxide, SnNO, CAS 号: 13268-67-2, 纯度 99%)、千里光碱(senecionine, Sn, CAS 号: 130-01-8, 纯度 99.57%)(成都德思特生物技术有限公司); 34 种 PAs 混和标准溶液[农业农村部农产品加工质量安全风险评估实验室(北京)]; 超纯水(Millipore 纯水仪); 陶瓷均质子(粒径 5 mm, 北京市本立科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

6460 高效液相色谱-串联质谱仪(美国安捷伦科技有限公司); Supelco 固相萃取装置(默克投资中国有限公司); QuEChERS 自动样品制备系统(北京市本立科技有限公司); VORTEX-5 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); YP5002 电子天平(感量 0.01 g, 上海越平科学仪器有限公司); HC-3018 离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); KQ-600DA 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Proshell 120 EC-C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm)(美国安捷伦科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品的制备

甘草样品从市场上购买, 样品经过烘干和磨碎后过 60 目筛, 做好标识备用。

1.3.2 样品的提取

取 2.00 g 的甘草样品粉末至 50 mL 离心管中, 加入 20.0 mL 0.05 mol/L 硫酸水溶液, 再加入 16 颗陶瓷均质子, 在 QuEChERS 自动样品制备系统中振荡提取 15 min, 移上清液待净化。

1.3.3 样品的净化

利用 5 mL 甲醇对 SPE 小柱(6 mL)进行活化, 然后

用 5 mL 0.05 mol/L 硫酸水溶液平衡 SPE 柱; 取 10 mL 样品上清液上样; 然后用 5 mL 甲醇过柱除去杂质, 后用 10 mL 含 2.5% 氨水的甲醇溶液过柱洗脱样品, 浓缩洗脱液至浸干, 先用 1 mL 甲醇复溶, 再加 1 mL 水, 混匀后过有机相 0.22 μm 微孔滤膜至液相小瓶以供 HPLC-MS/MS 分析。

1.3.4 色谱条件

色谱柱 Proshell 120 EC-C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm); 柱温 25°C; 流速 0.3 mL/min; 进样量 2 μL; 流动相 A 为 5 mmol/L 甲酸铵水(含 0.1% 甲酸); 流动相 B 为 5 mmol/L 甲酸铵甲醇; 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 色谱梯度洗脱程序
Table 1 Chromatography gradient elution procedure

| | 时间/min | A 相/% | B 相/% |
|---|--------|-------|-------|
| 1 | 2.00 | 85.00 | 15.00 |
| 2 | 6.00 | 83.00 | 17.00 |
| 3 | 12.00 | 80.00 | 20.00 |
| 4 | 16.00 | 50.00 | 50.00 |
| 5 | 19.00 | 50.00 | 50.00 |
| 6 | 22.00 | 20.00 | 80.00 |
| 7 | 24.00 | 20.00 | 80.00 |
| 8 | 24.10 | 85.00 | 15.00 |

1.3.5 质谱条件

离子化模式: 电喷雾离子源, 正离子模式; 毛细管电压 3500 V; 干燥气流速 10 L/min; 干燥气温度 350°C; 雾化器压力 35 psi; 鞘气温度 300°C; 鞘气流速 11 L/min。34 种 PAs 多反应监测质谱参数见表 2, 总离子流图见图 3。

表 2 34 种 PAs 多反应监测质谱参数
Table 2 Multiple reaction monitoring parameters of 34 kinds of PAs

| 名称 | 保留时间/min | 母离子(<i>m/z</i>) | 子离子(<i>m/z</i>) | 碰撞电压/V | 碰撞能量/eV |
|-----------------------|----------|-------------------|-------------------|--------|---------|
| 毛果天芥菜碱 N-氧化物(LcNO) | 19.538 | 428.2 | 254.1*/136.1 | 162 | 33 |
| 蓝薊定 N-氧化物(EmNO) | 17.214 | 414.2 | 352.1/254.1* | 152 | 33 |
| 毛果天芥菜碱(Lc) | 18.508 | 412.2 | 336.2/120* | 134 | 17 |
| 蓝薊定(Em) | 17.209 | 398.2 | 220/120* | 151 | 17/20 |
| 千里光碱 N-氧化物(JbNO) | 6.886 | 368.2 | 296.1*/120.0 | 157 | 25/41 |
| 倒千里光碱 N-氧化物(ReNO) | 6.900 | 368.2 | 136.0/118.1* | 172 | 41/33 |
| 克氏千里光碱(Sk) | 12.235 | 366.2 | 168*/150 | 157 | 33/29 |
| 芥菜甙 N-氧化物(ErNO) | 17.622 | 366.2 | 136.0*/120.1 | 159 | 37 |
| 7-乙酰基介质 N-氧化物(7-ImNO) | 12.959 | 358.2 | 214*/137 | 157 | 29/33 |
| 毛束草碱(Td) | 10.555 | 354.2 | 222.1*/120.1 | 162 | 33/45 |
| 夹可宾千里光碱(Jb) | 5.583 | 352.2 | 155.0/120.1* | 167 | 35/45 |
| 倒千里光碱(Re) | 5.658 | 352.2 | 138.0/120.1* | 177 | 40/33 |
| 春千里光碱 N-氧化物(SvNO) | 16.305 | 352.2 | 136.0/118.1* | 167 | 30/35 |
| SnNO | 16.582 | 352.2 | 324/118* | 180 | 20/35 |

表 2(续)

| 名称 | 保留时间/min | 母离子(m/z) | 子离子(m/z) | 碰撞电压/V | 碰撞能量/eV |
|--------------------|----------|--------------|--------------|--------|---------|
| 芝麻菜叶千里光碱(Er) | 3.856 | 350.2 | 138/120* | 167 | 30/35 |
| 千里光菲灵碱 N-氧化物(SpNO) | 14.059 | 350.2 | 136.0*/120.1 | 157 | 35 |
| 欧天芥菜碱 N-氧化物(EuNO) | 7.413 | 346.2 | 172*/111 | 144 | 30/35 |
| 7-乙酰中间丁(7-Im) | 12.959 | 342.2 | 180/120* | 144 | 30/35 |
| 7-乙酰基印美定(7-Ly) | 12.977 | 342.2 | 180.0/120.1* | 146 | 30/35 |
| 野百合碱 N-氧化物(McNO) | 5.365 | 342.2 | 137.0*/118.1 | 167 | 30/35 |
| Sv | 15.976 | 336.2 | 308/120* | 135 | 20/25 |
| Sn | 9.049 | 336.2 | 138.0/120.1* | 165 | 28/25 |
| 千里光菲灵碱(Sp) | 16.242 | 334.2 | 138/120* | 185 | 30/35 |
| HeNO | 5.670 | 330.2 | 172/138* | 155 | 16/25 |
| 欧天芥菜碱(Eu) | 5.662 | 330.2 | 156/138* | 131 | 35/38 |
| 野百合碱(Mc) | 3.117 | 326.2 | 237.2/120.0* | 157 | 30/38 |
| 大尾摇碱 N-氧化物(IcNO) | 8.597 | 316.2 | 172*/138 | 154 | 32/38 |
| 石松胺 N-氧化物(LyNO) | 9.389 | 316.2 | 172*/138 | 149 | 32/38 |
| 促黑激素 N-氧化物(ImNO) | 8.598 | 316.2 | 172*/138 | 152 | 32/38 |
| 天芥菜碱(He) | 12.113 | 314.2 | 156/138* | 149 | 32/38 |
| 大尾摇碱(Ic) | 18.508 | 300.2 | 156.1/138.0* | 141 | 33/38 |
| 石松胺(Ly) | 6.288 | 300.2 | 156/138* | 149 | 33/38 |
| 促黑激素(Im) | 6.591 | 300.2 | 156/138* | 144 | 33/38 |
| 倒千里光裂碱(Ret) | 1.499 | 156.2 | 112.0*/108.1 | 106 | 30/35 |

注: *为定量离子。毛果天芥菜碱 N-氧化物(lasiocarpine N-oxide, LcNO); 蓝薊定 N-氧化物(echimidine N-oxide, EmNO); 毛果天芥菜碱(lasiocarpine, Lc); 蓝薊定(echimidine, Em); 千里光碱 N-氧化物(jacobine N-oxide, JbNO); 倒千里光碱 N-氧化物(retrorsine N-oxide, ReNO); 克氏千里光碱(senkirkine, Sk); 芥菜甙 N-氧化物(erucifoline N-oxide, ErNO); 7-乙酰基介质 N-氧化物(7-acetylintermediate N-oxide, 7-ImNO); 毛束草碱(trichodesmine, Td); 夹可宾千里光碱(jacobine, Jb); 倒千里光碱(retrorsine, Re); 春千里光碱 N-氧化物(senecivernine N-oxide, SvNO); SnNO; 芝麻菜叶千里光碱(erucifoline N-oxide, Er); 千里光菲灵碱 N-氧化物(seneciphylline N-oxide, SpNO); 欧天芥菜碱 N-氧化物(europine N-oxide, EuNO); 7-乙酰中间丁(7-cetylintermediate, 7-Im); 7-乙酰基印美定(7-acetyllycopsamine, 7-Ly); 野百合碱 N-氧化物(monocrotaline N-oxide, McNO); 千里光菲灵碱(seneciphylline, Sp); 欧天芥菜碱(europine, Eu); 野百合碱(monocrotaline, Mc); 大尾摇碱 N-氧化物(indicine N-oxide, IcNO); 石松胺 N-氧化物(lycopsamine N-oxide, LyNO); 促黑激素 N-氧化物(intermediate N-oxide, ImNO); 天芥菜碱(heliotrin, He); 大尾摇碱(indicine, Ic); 石松胺(lycopsamine, Ly); 促黑激素(melatonin stimulating hormone, Im); 倒千里光裂碱(retronecine, Ret)。

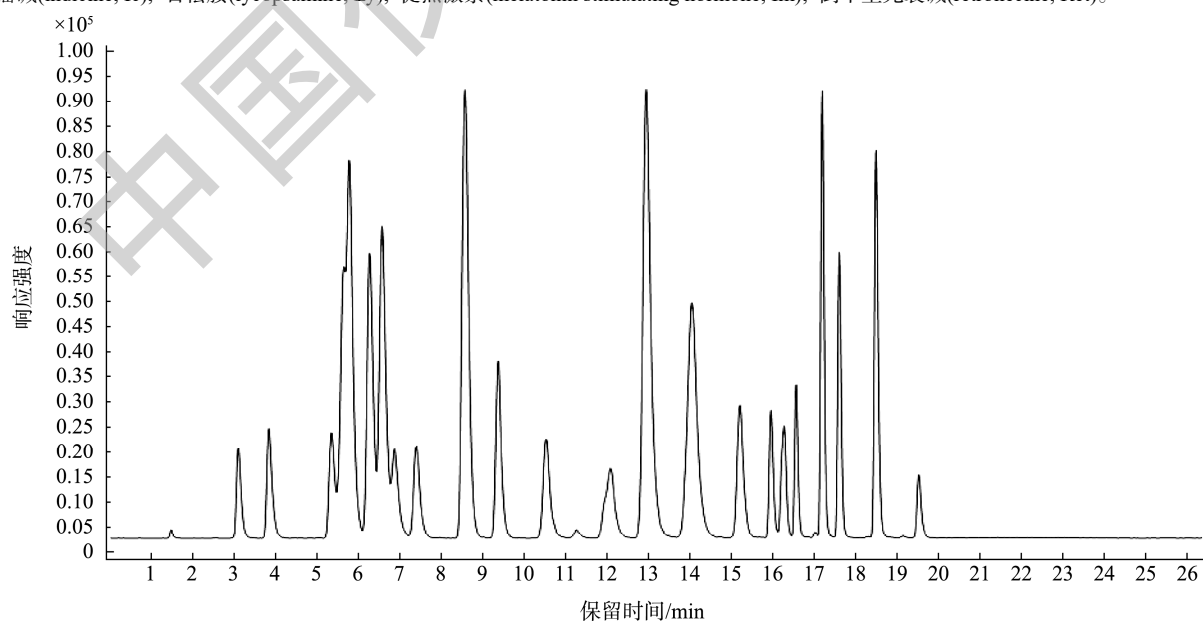


图 3 34 种 PAs 标准溶液总离子流图
Fig.3 Total ion current graph of the standard solutions of 34 kinds of PAs

1.4 数据处理

液相色谱-串联质谱数据通过液相色谱-质谱 Masshunter 工作站进行采集和分析, 利用 Excel 2013 进行数据分析和图表处理。

2 结果与分析

HeNO、Sv、Sn 和 SnNO 这 4 种生物碱在食品中污染水平较高^[19], 其提取和分析方法具有较强的代表性, 因此选择这 4 种 PAs 来探索甘草中这类物质分析的前处理方法。

2.1 不同溶剂提取的影响

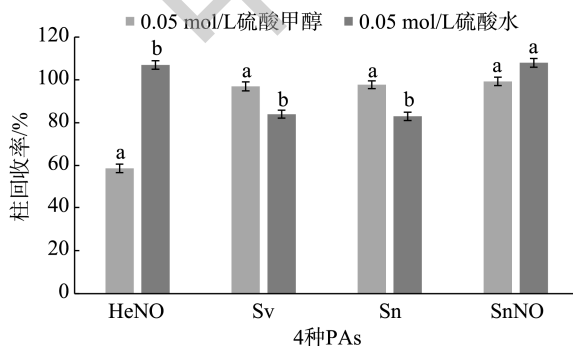
选择 0.05 mol/L 硫酸水溶液和 0.05 mol/L 硫酸甲醇溶液为提取溶剂来优化提取溶剂, 甘草样品中加入标准溶液经过振荡提取后, 提取液经过 SPE 柱子净化, 提取效率见表 3。Sv、Sn 和 SnNO 在两种提取溶剂中的提取效率差异不显著, 但 HeNO 在硫酸水溶液中的提取效率明显高于硫酸甲醇溶液。

表 3 不同提取溶剂的回收率
Table 3 Recoveries of different extraction solvents

| 提取溶剂 | 回收率/% | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | HeNO | Sv | Sn | SnNO |
| 0.05 mol/L 硫酸甲醇溶液 | 32.5 ^a | 75.7 ^a | 83.5 ^a | 80.2 ^a |
| 0.05 mol/L 硫酸水溶液 | 91.9 ^b | 74.7 ^a | 75.6 ^a | 82.4 ^a |

注: 同列不同字母表示具有显著性差异。

图 4 显示两种提取溶剂的 SPE 柱回收率。在硫酸水溶液体系中 4 种 PAs 的柱回收率在 83%~108%之间, 硫酸甲醇溶液体系中 Sv、Sn 的回收率高于硫酸水溶液, 但 HeNO 和 SnNO 则低于在硫酸水溶液中的柱回收率。其中, HeNO 的柱回收率只有 58.7%, 这也可能是 HeNO 的提取回收率低的原因。有文献报道指出 PA 氮氧化物较 PA 更加不稳定, 容易降解^[20]。故提取实验选取 0.05 mol/L 硫酸水为提取溶剂, 这也与 WIEDENFELD 等^[21]、ASSEM 等^[22]报道的研究方法一致。



注: 同一 PAs 柱子上方字母不同表示具有显著性差异, 图 5、6 同。

图 4 不同提取溶剂的柱回收率

Fig.4 Column recoveries of different extraction solvents

2.2 不同提取方式的影响

在提取溶剂为 0.05 mol/L 硫酸水溶液时, 比较了超声 2 h 提取和 QuEChERS^[23]自动样品制备系统振荡 15 min 提取的差异。如图 5 所示, 超声和 QuEChERS 振荡的提取效率均在 70%~90%之间, 无显著差异。但在提取过程中结合国家标准(GB 23200.113—2018《食品安全国家标准 植物源性食品中 208 种农药及其代谢物残留量的测定 气相色谱-质谱联用法》)加入陶瓷均质子后, 4 种 PAs 的回收率提高至 98.1%~105.0%之间。这是因为加入陶瓷均质子后, 提取溶液与甘草样品在振荡过程中的接触面积增大, 提高了混合均匀度, 提取效率显著上升。

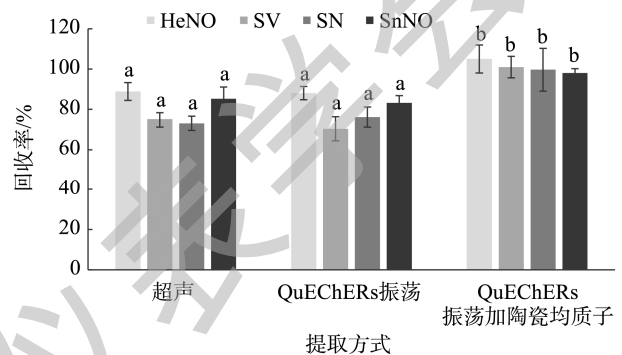


图 5 不同的提取方式对 PAs 回收率的影响

Fig.5 PAs recoveries of different extraction methods

2.3 不同 SPE 净化方式的影响

甘草样品经过硫酸水溶液直接提取后, 提取液里的非目标物, 如糖、色素等会影响 PAs 的检测, 同时加大了基质效应^[24]。此外, 没有经过净化的液体也会对液相色谱和质谱检测产生影响, 经 SPE 柱净化后不仅可以降低以上影响还可以浓缩样液以提高检出限水平。因此, 根据 PAs 的性质选取了 3 种 SPE 小柱: MCX (3cc)、PCX (60 mg)、PCX (500 mg)^[25]进行了对比分析。基质标准溶液经过 SPE 小柱净化处理结果如图 6 所示。其中 PCX-500 mg 的柱回收率最高, 4 种 PAs 的回收率在 83.7%~108.0%之间, 故选择 PCX-500 mg 为净化方式, 这与 CREWS 等^[26]中的

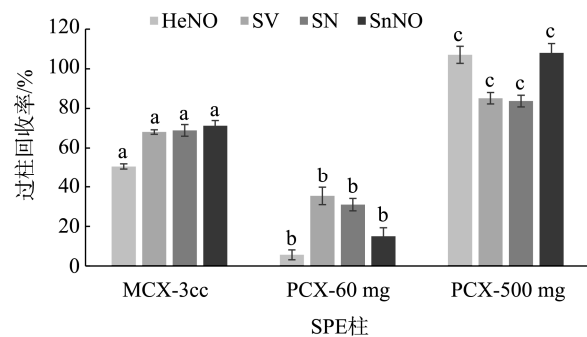


图 6 不同 SPE 柱的回收率

Fig.6 Recoveries of different SPE columns

净化方式一致。本研究的净化方式采用典型的上样-清洗-洗脱方法, 利用酸性条件下质子化碱性化合物(即 PAs)的阳离子交换机制, 完成清洗步骤后用碱性溶剂(2.5%氨水的甲醇)进行洗脱, 从而将 PAs 从小柱中洗脱回收^[27-28]。

2.4 方法验证实验

2.4.1 方法的线性关系和定量限测定

线性范围以 4 种 PAs 作为参考, 把 4 种 PAs 配制成质量浓度为 5、20、50、100 和 200 ng/mL 的标准工作溶液, 按已建立测定条件进行分析, 以质量浓度为横坐标, 定量离子峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 确定 10 倍信噪比为计算方法的定量限。标准溶液的线性方程、相关系数和定量限见表 4。4 种 PAs 的线性方程相关系数均大于 0.99, 满足检测要求。

表 4 4 种 PAs 的线性范围、相关系数和定量限
Table 4 Linear ranges, correlation coefficients and limits of quantification of 4 kinds of PAs

| 名称 | 线性方程 | 相关系数(r^2) | 定量限/($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|------|--------------------|---------------|---------------------------------|
| HeNO | $Y=1730.6X+2022$ | 0.9991 | 1.0 |
| Sn | $Y=484.12X+427.22$ | 0.9998 | 2.0 |
| Sv | $Y=347.04X-345.16$ | 0.9994 | 2.5 |
| SnNO | $Y=462.05X-815.44$ | 0.9997 | 2.0 |

2.4.2 方法的准确度和精密度

采用添加回收的方法测定方法的准确度。向空白样品中添加不同浓度的 34 种 PAs 标准溶液, 根据已确定的条件进行分析。添加回收实验结果见表 5。

表 5 34 种 PAs 添加回收率测定结果($n=6$)
表 5 Recoveries and relative standard deviations of 34 kinds of PAs ($n=6$)

| 名称 | 添加量/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 回收率/% | RSDs/% | 添加量/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 回收率/% | RSDs/% | 添加量/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 回收率/% | RSDs/% |
|--------|---------------------------------|-------|--------|---------------------------------|-------|--------|---------------------------------|-------|--------|
| LcNO | 10 | 74.7 | 3.49 | 20 | 76.0 | 3.02 | 50 | 82.0 | 2.94 |
| EmNO | 10 | 78.1 | 5.87 | 20 | 82.5 | 1.26 | 50 | 92.0 | 2.76 |
| Lc | 10 | 82.2 | 4.64 | 20 | 89.0 | 4.26 | 50 | 103.0 | 1.87 |
| Em | 10 | 81.1 | 4.39 | 20 | 85.5 | 3.92 | 50 | 95.0 | 1.01 |
| JbNO | 10 | 78.8 | 4.93 | 20 | 83.5 | 2.45 | 50 | 95.8 | 1.51 |
| ReNO | 10 | 81.9 | 5.53 | 20 | 87.5 | 5.20 | 50 | 98.6 | 3.62 |
| Sk | 10 | 80.1 | 5.39 | 20 | 86.5 | 4.25 | 50 | 101.0 | 1.87 |
| ErNO | 10 | 84.1 | 5.77 | 20 | 87.0 | 1.88 | 50 | 96.8 | 0.84 |
| 7-ImNO | 10 | 80.9 | 5.19 | 20 | 84.5 | 1.58 | 50 | 112.0 | 2.59 |
| Td | 10 | 74.3 | 4.52 | 20 | 81.0 | 1.95 | 50 | 79.4 | 1.92 |
| Jb | 10 | 80.1 | 3.25 | 20 | 83.0 | 3.26 | 50 | 93.4 | 2.90 |
| Re | 10 | 84.4 | 4.35 | 20 | 86.5 | 1.82 | 50 | 93.8 | 4.21 |
| SvNO | 10 | 79.8 | 4.43 | 20 | 82.5 | 1.51 | 50 | 92.0 | 2.90 |
| SnNO | 10 | 77.6 | 1.79 | 20 | 83.0 | 1.15 | 50 | 91.4 | 2.99 |
| Er | 10 | 86.0 | 4.27 | 20 | 106.0 | 1.08 | 50 | 108.0 | 2.40 |
| SpNO | 10 | 77.8 | 5.25 | 20 | 88.0 | 2.46 | 50 | 89.8 | 1.72 |
| EuNO | 10 | 84.4 | 5.29 | 20 | 90.0 | 0.29 | 50 | 108.0 | 2.72 |
| 7-Im | 10 | 73.4 | 4.95 | 20 | 77.5 | 1.13 | 50 | 80.2 | 4.65 |
| 7-Ly | 10 | 80.9 | 5.63 | 20 | 84.5 | 5.21 | 50 | 91.4 | 3.56 |
| McNO | 10 | 72.2 | 5.70 | 20 | 78.0 | 1.33 | 50 | 77.8 | 5.21 |
| Sv | 10 | 84.9 | 8.18 | 20 | 85.5 | 3.64 | 50 | 85.4 | 6.91 |
| Sn | 10 | 84.5 | 4.07 | 20 | 85.0 | 2.07 | 50 | 89.6 | 6.29 |
| Sp | 10 | 80.4 | 6.13 | 20 | 80.5 | 4.75 | 50 | 84.4 | 1.75 |
| HeNO | 10 | 80.9 | 5.99 | 20 | 86.0 | 1.53 | 50 | 95.0 | 4.73 |
| Eu | 10 | 72.2 | 5.83 | 20 | 76.0 | 4.78 | 50 | 84.4 | 1.86 |
| Mc | 10 | 79.8 | 4.64 | 20 | 83.5 | 1.07 | 50 | 77.0 | 1.67 |
| IcNO | 10 | 73.1 | 5.81 | 20 | 75.0 | 1.70 | 50 | 99.6 | 2.86 |
| LyNO | 10 | 71.3 | 5.18 | 20 | 72.5 | 2.89 | 50 | 88.6 | 1.57 |
| ImNO | 10 | 77.0 | 6.54 | 20 | 73.5 | 3.48 | 50 | 92.6 | 3.72 |
| He | 10 | 72.7 | 5.88 | 20 | 72.5 | 1.77 | 50 | 76.4 | 5.31 |
| Ic | 10 | 72.3 | 4.26 | 20 | 78.5 | 1.87 | 50 | 77.2 | 4.64 |
| Ly | 10 | 72.8 | 4.95 | 20 | 76.0 | 1.23 | 50 | 89.0 | 4.37 |
| Im | 10 | 73.4 | 6.66 | 20 | 77.5 | 1.10 | 50 | 80.2 | 5.73 |
| Ret | 10 | 74.2 | 4.35 | 20 | 86.5 | 1.86 | 50 | 83.6 | 5.32 |

注: 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。

从表 5 中可以看出 3 个不同浓度的 34 种 PAs 的添加回收率在 71.3%~112.0%之间, RSDs 在 0.29%~8.18%之间, 满足检测要求。

2.5 甘草中 PAs 的风险调查

对采集的 172 个甘草样品统一磨碎过筛处理后, 采用上述的提取和检测方法进行分析。172 个样品中共检出 38 个阳性样品, 检出率为 22.1%, PAs 总含量在 9.5~118.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。根据欧盟在 2020 年 12 月发布的 COMMISSION REGULATION (EU) 2020/2040 文件中对粮食和花草茶 PAs 的限量标准, PAs 总量不超过 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[29], 本次检测的 172 个甘草样品中 PAs 含量均低于欧盟对 PAs 的限量。

由图 7 可以看出 Ly、LyNO、He、IcNO 在甘草中的检出次数较多。这 4 种 PAs 的化学结构式如图 8 所示, 它们的双稠吡咯环均含有 1,2 位双键, 会形成烯丙醇酯代谢物, 可引起肝静脉闭塞性疾病的发生^[30], 还可引起肺、肾等器官毒性等。欧洲食品安全局和草药制品委员会在 2020 年发布的文件中规定成人(75 kg)每天摄入量不得超过 1.8 μg , 儿童(40 kg)不得超过 0.96 μg 。以本次甘草中 PAs 的检出最大值(118.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)推算, 如果成人每天饮用或者食用含有 PAs 的甘草约 14 g, 可能对人体健康产生危害, 因此大量食用甘草存在风险。

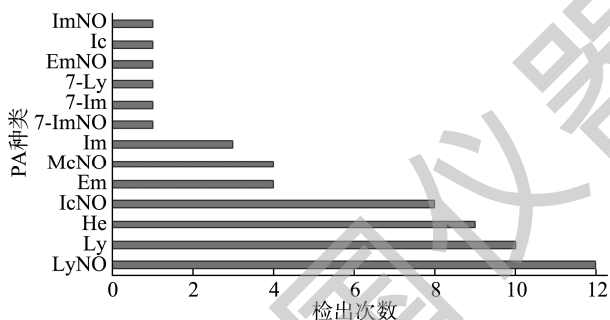


图 7 PAs 的检出次数
Fig.7 Detection frequency of PAs

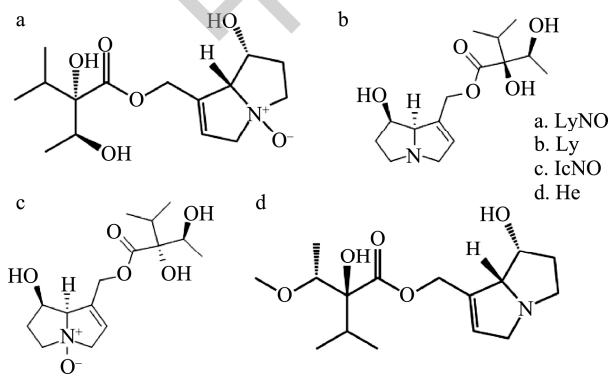


图 8 4 种 PAs 的化学结构图
Fig.8 Chemical structures diagram of 4 kinds of PAs

3 结论

本研究建立的 QuEChERS 提取和 HPLC-MS/MS 检测甘草中 34 种 PAs 的方法回收率为 71.3%~112.0%, RSDs 在 0.29%~8.18%之间, 能够快速和准确地检测甘草中的 PAs, 同时利用建立的方法对甘草中 PAs 的含量进行了风险调查。172 个甘草样品中有 38 个样品检出 PAs, 其总含量在 9.5~118.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 均低于欧盟对 PAs 的限量(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。甘草作为一味重要的中草药材, 在中药方剂中大量使用, 而且世界贸易组织贸易技术壁垒委员会和欧盟食品和饲料类快速预警系统都曾对我国出口草本原料中 PAs 含量过高发布警告, 因此本研究对我国甘草中 PAs 的含量调查及风险分析提供了数据支持。本研究只对 34 中 PAs 进行了监测, 建议在未来的工作中建立更全面系统的 PAs 分析检测方法。

参考文献

- [1] 张静, 胡代琼, 刘三侠, 等. 常见甘草品种有效成分及药理作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2012, 31: 23-27.
ZHANG J, HU DQ, LIU SX, *et al.* Research progress on active ingredients and pharmacological effects of common licorice varieties [J]. J Tradit Chin Vet, 2012, 31: 23-27.
- [2] 王兵, 王亚新, 赵红燕, 等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 215-218.
WANG B, WANG YX, ZHAO HY, *et al.* Research progress on the main components of licorice and their pharmacological effects [J]. J Jilin Med Univ, 2013, 34(3): 215-218.
- [3] 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.
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.
- [4] WINK M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective [J]. Phytochemistry, 2003, 64: 3-19.
- [5] KOPP T, ABDEL-TAWAB M, MIZAIKOFF B. Extracting and analyzing pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants: A review [J]. Toxins, 2020, 12: 320.
- [6] 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.
- [7] WIEDENFELD H, EDGAR J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants [J]. Phytochem Rev, 2011, 10: 137-151.
- [8] ASSEM E, MICHAEL W. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the boraginaceae structures, distribution, and biological properties [J]. Diversity, 2014, 6: 188-282.
- [9] GEBUREK I, PREISS-WEIGERT A, LAHRSEN-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.
- [10] 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.
- [11] MOSSOBA MM, LIN HS, ANDRZEJEWSKI D, *et al.* Application of gas chromatography matrix-isolation Fourier-transform infrared-spectroscopy to the identification of pyrrolizidine alkaloids from comfrey root (*Symphytum officinale* L.) [J]. *J AOAC Int*, 1994, 77: 1167–1174.
- [12] BIRECKA H, CATALFAMOJ L, EISEN RN. A sensitive method for detection and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20: 343–344.
- [13] PIETERS LAC, VAN ZAM, VRIELING K, *et al.* Determination of the pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* by proton and carbon-13 NMR spectroscopy [J]. *Mag Res Chem*, 1989, 27: 754–759.
- [14] MROCZEK T, GLOWNIAK K, WLASZCZYK A. Simultaneous determination of N-oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion-pair high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 949: 249–262.
- [15] 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.
- 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*, 2019, 10(23): 7839–7643.
- [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] 管珂, 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.
- 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.
- [19] 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.
- 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.
- [20] CREWS C, DRIFFIELD M, BERTHILLER F, *et al.* Loss of pyrrolizidine alkaloids on decomposition of ragwort (*Senecio jacobaea*) as measured by LC-TOF-MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 3669–3673.
- [21] WIEDENFELD H, EDGAR J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10: 137–151.
- [22] ASSEM E, MICHAEL W. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the boraginaceae structures, distribution, and biological properties [J]. *Diversity*, 2014, 6: 188–282.
- [23] 罗景阳, 袁帅, 李巧莲, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法检测茶叶中二硫代氨基甲酸酯(盐)残留量[J]. *食品科技*, 2023, 48(1): 270–276.
- LUO JY, YUAN S, LI QL, *et al.* QuEChERS-high performance liquid chromatography-coupled mass spectrometry for the detection of the residual of dithiocarbamate (salt) in tea [J]. *Food Sci*, 2023, 48(1): 270–276.
- [24] CHAMBERS E, WAGRQWSKI-DIEHL DM, LU Z, *et al.* Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 22–34.
- [25] 张子臣, 杜国辉, 曹宁, 等. 超高效液相-串联质谱法测定食品中罂粟壳成分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(23): 8111–8114.
- ZHANG ZC, DU GH, CAO N, *et al.* Determination of *Pericarpium papaveris* in food by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(23): 8111–8114.
- [26] CREWS C, ANDERSON WAC. Detection of ragwort alkaloids in toxic hay by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. *Vet Rec*, 2009, 165: 568–569.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] CHEN Z, HUO JR. Hepatic *veno-occlusive* disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations [J]. *Netherland J Med*, 2010, 68: 252–260.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介

张新娜, 主要研究方向为农产品检测技术。

E-mail: xinnazh1215@163.com

马丽艳, 博士, 教授级实验师, 主要研究方向为食品安全技术。

E-mail: lyma1203@cau.edu.cn