DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250904004
引用格式: 刘文菁. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法快速测定茶叶中吡咯里西啶生物碱[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(2): 48–55.
LIU WJ. Rapid determination of pyrrolizidine alkaloids in tea by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(2): 48–55. (in Chinese with English abstract).

QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法快速测定茶叶中吡咯里西啶生物碱

刘文菁*

(国家加工食品质量监督检验中心, 福建省产品质量检验研究院, 福州 350002)

摘 要: 目的 建立 QuEChERS 前处理技术结合超高效液相色谱-串联质谱法检测茶叶中 21 种吡咯里西啶生物碱的分析方法。**方法** 样品加水浸泡, 采用 0.1%甲酸乙腈超声提取, QuEChERS 净化处理, 经微孔滤膜过滤后, 滤液上机分析, 在电喷雾正离子模式下采用多反应监测进行测定。**结果** 21 种吡咯里西啶生物碱在设定的各浓度区间内线性关系良好, 相关系数(r^2)均超过 0.998, 且该方法的检出限为 0.03~3.00 μg/kg, 定量限为 0.10~10.00 μg/kg, 平均回收率在 81.3%~116.3%之间, 相对标准偏差为 0.5%~10.6%。**结论** 该方法简单、快速, 能够满足茶叶中吡咯里西啶生物碱的检测需求; 同时将该方法应用于市售茶叶的检测, 发现部分样品检出石松胺、石松胺 N-氧化物和印美定碱。

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

Rapid determination of pyrrolizidine alkaloids in tea by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Wen-Jing*

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

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of 21 kinds of pyrrolizidine alkaloids in tea by QuEChERS pretreatment combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Tea samples were first hydrated with water, extracted by 0.1% formic acid acetonitrile, purified by QuEChERS, and then filtered by microporous filter membrane, the filtrate was directly for analysis. The samples were measured in electrospray positive ion source and multi-reaction monitoring mode. **Results** Within each specified concentration range, 21 kinds of pyrrolizidine alkaloids showed excellent linearity, with the correlation coefficient (r^2) exceeding 0.998. The limits of detection were 0.03–3.00 μg/kg, limits of quantitation were 0.10–10.00 μg/kg. while

收稿日期: 2025-09-04
基金项目: 福建省市场监督管理局科技项目(FJMS2023074); 福建省产品质量检验研究院科研项目(KY202316A)
第一作者/*通信作者: 刘文菁(1991—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检验分析。E-mail: 978015951@qq.com

the average recovery rates varied from 81.3% to 116.3% and the relative standard deviations were between 0.5% and 10.6%. **Conclusion**　The method is simple and rapid, and can meet the detection requirements of pyrrolizidine alkaloids in tea. Meanwhile, when applied to the detection of commercially available tea samples, it is found that some samples contained lycopsamine, lycopsamine N-oxide and intermedine.

KEY WORDS: tea; pyrrolizidine alkaloids; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS

0　引　言

吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)是一种新型天然毒素, 因其广泛存在、结构多样及潜在肝毒性、肾毒性和遗传毒性而备受关注[1−3]。目前已发现 660 多种 PAs 及其氮氧化物[4−5]。PAs 主要由菊科、紫草科、豆科等植物产生, 通过根系分泌或花粉漂移迁移至邻近作物。现已有文献多次报道茶叶检出 PAs[6−10], 茶叶本身是不含有 PAs, 主要是因为茶园中存在含有 PAs 的植物(如千里光等), 可能通过土壤、水等环境间接污染茶叶, 或者在采摘过程中误混入含 PAs 的杂草从而造成污染[11−13]。目前茶叶中 PAs 污染已成为全球共性问题[12], 欧美国家已重点监测花草茶中 PAs 污染水平。2023 年欧盟发布的(EU)2023/915 中规定, 茶叶中 PAs 最大残留限量指标为 150 μg/kg, 也成为了继农药残留之后的又一项技术壁垒[13]。近年来, 欧盟食品饲料类快速预警系统也时有通报我国出口茶叶及其制品中检出 PAs, 导致我国茶叶出口受阻。然而, 目前我国针对茶叶中 PAs 的研究相对较少, 缺乏茶叶中 PAs 污染的基础数据, 茶叶中 PAs 的残留也尚未制定相关限量标准[13], 仅《中国药典》(2020 年版)对“千里光”等药材作了相关规定。因此, 建立一种茶叶中多种 PAs 的快速检测方法对研究茶叶中 PAs 污染水平及限量制定具有重要的现实意义。

植物源性样品中 PAs 检测方法主要有核磁共振法[14]、分光光度法[15]、免疫学方法[16−18]、液相色谱-串联质谱法[7,19−23]、气相色谱法[24−25]和气相色谱-质谱法[13,26]。液相色谱-串联质谱法因具有更高的选择性和灵敏度, 且前处理更简单快速, 尤其是针对茶叶这类基质复杂的样品, 成为国际上主流的分析方法, 但也有采用高分辨质谱法[21,27]进行快速筛查的, 这也是筛查未知 PAs 的新手段。植物源性食品中 PAs 前处理方法主要是采用酸性溶液提取、固相萃取小柱净化的方法。然而, 张新娜等[28]则利用 QuEChERS 法测定甘草中多种 PAs, 以及姚蕾珺等[22]采用一体化 QuEChERS 净化法测定茶叶中 PAs。目前 QuEChERS 法主要用于茶叶中农药残留测定[29], 可有效净化茶叶中多种色素、有机酸等物质, 且具有操作简单快速、成本低等优势, 但该方法用于茶叶中 PAs 测定的还较少, 主要是由于常规 QuEChERS 填料组合通常是乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶(primary-secondary amine, PSA)、石墨化炭黑、十八烷基硅烷等按一定比例混合, 易出现过度吸附低极性物质[30], 用于茶叶中测定则易出现咖啡因共洗脱、石墨化炭黑过度吸附低极性 PAs 等问题。因此, 本研究针对茶叶基质特征和 PAs 的特性, 优化盐析比例、筛选新型复合填料建立适用于茶叶中 PAs 测定的 QuEChERS 法, 结合超高效液相色谱-串联质谱技术建立茶叶中 21 种 PAs 的分析方法, 以期实现茶叶中多种 PAs 的快速测定, 为评估茶叶中 PAs 污染水平提供基础数据, 并为监管部门提供技术参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

33 份茶叶样品, 购买于当地超市及专卖店。

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 无水硫酸镁(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 无水乙酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲酸、乙酸铵、甲酸铵(色谱纯, 美国 Sigma 公司); PSA(粒度 40~60 μm, 日本 GL Sciences 公司); 聚四氟乙烯微孔滤膜(0.22 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 羧基功能化多壁碳纳米管(carboxyl-functionalized multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs-COOH, 粒径 5 nm, 美国 Agela Technologies 公司); 试验用水(屈臣氏蒸馏水)。

21 种吡咯里西啶生物碱标准溶液: 蓝蓟定(echimidine, Em)、蓝蓟定 N-氧化物(echimidine N-oxide, EmNO)、克氏千里光碱(senkirkine, Sk)、毛果天芥菜碱(lasiocarpine, Lc)、N-氧化毛果天芥菜碱(lasiocarpine-N-oxide, LcNO)、欧天芥菜碱(europine, Eu)、N-氧化欧天芥菜碱(europine N-oxide, EuNO)、春千里光碱(senecivernine, Sv)、N-氧化春千里光碱(senecivernine N-oxide, SvNO)、天芥菜碱(heliotrine, He)、N-氧化天芥菜碱(heliotrine N-oxide, HeNO)、印美定碱(intermedine, Im)、N-氧化印美定碱(intermedine N-oxide, ImNO)、石松胺(lycopsamine, Ly)、石松胺 N-氧化物(lycopsamine N-oxide, LyNO)、倒千里光碱(retrorsine, Re)、倒千里光碱 N-氧化物(retrorsine N-oxide, ReNO)、千里光宁碱(senecionine, Sn)、千里光宁碱 N-氧化物(senecionine N-oxide, SnNO)、千里光非灵(seneciophylline, Sp)、N-氧化千里光非灵碱(seneciophylline N-oxide, SpNO)(质量浓度均为 100 μg/mL, 天津阿尔塔公司)。

1.2　仪器与设备

SHIMADZU LCMS-8050 高效液相色谱串联质谱仪

[岛津仪器(苏州)有限公司]; Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); Satorius BSA 124S 分析天平[精度 0.01 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; IKAMS 3 basic 涡旋混合器、SIGmR 4-16ks 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KQ-800KDE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)[沃特世科技(上海)有限公司]。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 流动相: 水相(A)为含 0.1 mmol/L 乙酸铵的 0.1%甲酸水, 有机相(B)为 90%甲醇溶液(含 0.1%甲酸); 柱温: 40 ℃, 流速: 0.3 mL/min, 进样量: 5 μL, 梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 5%~10% B; 2.0~8.0 min, 10%~30% B; 8.0~12.0 min, 30%~95% B; 12.0~12.1 min, 95%~99% B; 12.1~15.0 min, 99% B; 15.0~15.1 min, 5% B。

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI); 多反应离子监测模式; 正离子扫描模式; 雾化气流量: 3.0 L/min; 干燥气流量: 5.0 L/min; 加热气流量: 15.0 L/min; 接口温度: 300 ℃; 脱溶剂温度: 250 ℃; 加热块温度: 400 ℃; 驻留时间: 5 ms; 定性、定量离子对及其他质谱参数见表 1。

表 1 21 种 PAs 质谱参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of 21 kinds of PAs

名称	保留时间/min	母离子(*m*/*z*)	子离子(*m*/*z*)	碰撞能量/V
Eu	7.31	330.2	138.1*/156.0	31/40
EuNO	8.03	346.2	172.0*/111.0	44/63
Im	7.21	300.2	138.1*/156.1	28/40
ImNO	8.49	316.2	138.1*/172.1	37/39
Ly	7.50	300.2	138.1*/156.0	28/40
LyNO	8.79	316.2	138.1*/172.1	37/39
Re	9.33	352.2	120.1*/138.1	40/39
ReNO	9.56	368.2	118.1*/136.1	38/33
He	10.30	314.2	138.1*/156.1	28/38
HeNO	10.80	330.2	138.1*/172.1	31/39
Sp	10.10	334.2	120.1*/138.1	36/39
SpNO	10.50	350.1	120.1*/136.1	40/35
Sn	11.05	336.2	120.1*/138.1	38/38
SnNO	11.20	352.3	118.1*/136.1	46/29
Em	11.60	398.2	120.1*/220.1	32/25
EmNO	12.00	414.2	254.1*/352.2	39/35
Sv	11.04	336.3	120.1*/138.1	38/38
SvNO	11.07	352.3	118.1*/136.1	44/29
Sk	11.10	336.2	220.1*/150.1	43/49
Lc	12.20	412.2	120.1*/336.2	36/26
LcNO	12.50	428.2	136.1*/254.2	38/42

注: *为定量离子。

1.3.3 标准溶液配制

准确吸取适量各标准品溶液(质量浓度均为 100 μg/mL)于容量瓶中, 加入适量甲醇, 并定容至刻度线, 混匀后转至标准溶液瓶, 得到 21 种 PAs 混合标准中间液(1 μg/mL), 于–20 ℃冰箱避光保存。

1.3.4 标准工作曲线溶液的配制

准确吸取适量 21 种 PAs 混合标准中间溶液, 用甲醇稀释成 10 μg/L 的混合标准使用液, 分别吸取混合标准使用液 10、20、50、100、200、400 μL 于 1 mL 容量瓶中, 用空白基质溶液定容, 混匀, 基质匹配标准曲线系列质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 μg/L, 临用现配。

1.3.5 样品前处理

称取 2.00 g 茶叶(精确至 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中, 加入 10 mL 水后涡旋振荡使其充分混匀, 浸泡 30 min, 在浸泡好的样品中加 10 mL 0.1%甲酸乙腈, 涡旋混匀, 再超声 20 min, 加入盐包(含 6 g 无水硫酸镁和 1.5 g 乙酸钠), 振荡 1 min, 4500 r/min 离心 5 min, 取上清液 2 mL 至 15 mL QuEChERS 净化管(含 100 mg PSA)中, 涡旋 1 min, 4500 r/min 离心 3 min, 取 1.0 mL 至试管中, 加入 4.0 mL 纯水, 涡旋混匀, 经微孔滤膜过滤后上机测定。

1.4 数据处理

本研究采用岛津 LabSolutions Insight 工作站进行数据采集和数据处理, WPS Office 2024 进行统计分析, Origin 2021 绘图。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

取适量各标准溶液, 用 50%乙腈溶液配制成质量浓度为 500 ng/mL 混合标准使用液, 不接色谱柱模式下直接注入质谱仪进行采集分析, 在正、负离子模式下进行全扫描, 结果表明, 在正离子模式下灵敏度较高, 分子离子峰均为 $[M+H]^+$。因此, 采用正离子模式, 先采用 Q1 扫描, 分别获得化合物的母离子, 将化合物母离子进一步碰撞, 得到化合物的最优碎片离子, 以响应最大的碎片作为定量离子, 次大的碎片作为定性离子, 在仪器上输入选定的碎片离子自动优化碰撞能等质谱参数, 质谱参数详见表 1。

2.2 色谱条件的优化

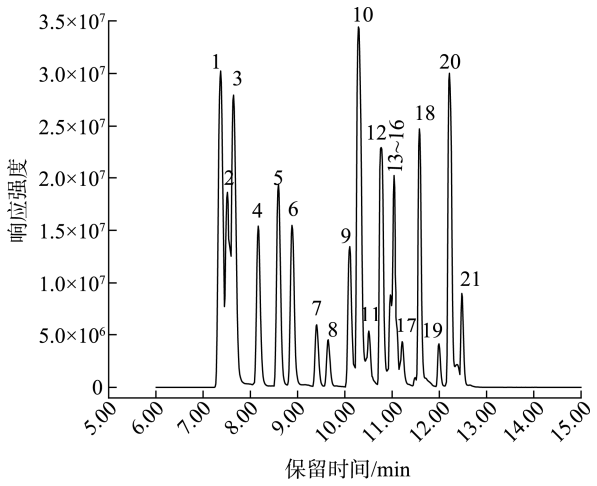
2.2.1 色谱柱的选择

本研究考察了 3 种色谱柱对 21 种 PAs 类化合物的分离效果, 分别为 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)和 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)。结果发现, 4 对同分异构体(Im 和 Ly、ImNO 和 LyNO、Sn 和 Sv、SnNO 和 SvNO)在 BEH C_{18} 和 HSS T3

(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)色谱柱上分离效果不佳, 无法实现基线分离; 最终以 HSS T3 (2.1 mm× 150 mm, 1.8 μm)作为分析柱。

2.2.2　流动相的选择

本研究考察 4 种流动相体系对 21 种 PAs 类化合物的峰形、离子化效率的影响, 分别为 0.1%甲酸水-乙腈、0.1%甲酸水-甲醇、含 0.1 mmol/L 乙酸铵的 0.1%甲酸水-甲醇、含 0.1 mmol/L 乙酸铵的 0.1%甲酸水-含 0.1%甲酸的 90%甲醇水。结果显示, 有机相为甲醇时, 21 种目标物的峰形和响应情况及 4 对同分异构体的分离效果均比乙腈作为有机相时更佳, 当水相为含 0.1 mmol/L 乙酸铵的 0.1%甲酸水溶液, 有机相为 90%甲醇溶液(含有 0.1%甲酸), 21 种目标物的分离度、峰形、响应达到最佳, 故以 0.1%甲酸水溶液(含有 0.1 mmol/L 乙酸铵)-90%甲醇水溶液(含有 0.1%甲酸)为流动相。21 种化合物的总离子流图见图 1。



注: 1~21 分别为 Im、Eu、Ly、EuNO、ImNO、LyNO、Re、ReNO、Sp、He、SpNO、HeNO、Sv、Sn、SvNO、Sk、SnNO、Em、EmNO、Lc、LcNO。

图 1　21 种化合物的总离子流色谱图(100 ng/mL)

Fig.1　Total ion chromatograms of 21 kinds of analytes (100 ng/mL)

2.3　前处理方法的优化

2.3.1　提取液的选择

据文献[8,22,31]报道目前用来提取茶叶中 PAs 类化合物的溶剂主要有 0.05 mol/L 硫酸溶液、1%甲酸乙腈、0.1%甲酸甲醇等, 说明提取 PAs 类物质的常用溶剂是酸性溶剂。本研究分别考察了 0.05 mol/L 硫酸溶液、1%甲酸乙腈、0.1%甲酸甲醇、0.1%甲酸乙腈 4 种提取液结合 QuEChERS 净化方式对 21 种 PAs 的影响。采用空白基质加标回收实验(加标浓度为 600 μg/kg)的方式对比 4 种提取液的提取效果。结果发现(表 2), 4 种提取液对 21 种 PAs 提取效果无明显差异, 回收率均在 70%以上, 但结合 QuEChERS 净化方式, 发现将茶叶经水浸泡后, 用酸化乙腈提取, 21 种 PAs 的回收率均在 75%以上。故本研究选择加水浸泡后, 用 0.1%甲酸乙腈作为提取溶液。

表 2　不同提取溶剂对 21 种 PAs 的影响(*n*=3)

Table 2　Effects of different extraction solvents on 21 kinds of PAs (*n*=3)

化合物	平均回收率/%				
	0.05 mol/L 硫酸溶液	1%甲酸乙腈	0.1%甲酸甲醇	0.1%甲酸乙腈	加水浸泡+0.1%甲酸乙腈
Eu	76.1	86.5	81.7	84.5	98.1
EuNO	72.0	84.1	77.3	79.8	75.6
Im	71.6	76.4	70.2	82.7	85.8
ImNO	70.1	72.9	84.5	76.1	84.6
Ly	77.0	84.5	88.1	86.8	85.1
LyNO	75.4	95.1	72.2	77.0	90.5
Re	93.7	79.0	76.9	90.6	108.1
ReNO	74.7	82.4	82.5	77.0	92.1
He	74.9	78.9	72.0	85.5	90.8
HeNO	75.9	76.5	74.3	78.5	104.0
Sp	85.6	76.7	75.5	85.3	80.5
SpNO	76.5	81.5	82.0	79.4	107.9
Sn	78.2	77.3	77.5	86.6	101.5
SnNO	75.6	73.5	85.5	76.2	89.6
Em	83.0	96.5	70.4	91.8	97.4
EmNO	74.3	80.5	80.2	75.4	98.3
Sv	74.0	84.1	82.6	84.6	87.7
SvNO	80.1	74.9	76.5	74.9	76.6
Sk	74.6	75.7	70.2	77.1	84.9
Lc	77.5	83.0	80.2	81.9	96.6
LcNO	75.4	82.8	79.8	79.2	88.1

2.3.2　净化方式的选择

茶叶基质较为复杂, 基质中色素、氨基酸和糖等成分会对提取过程和检测仪器产生显著干扰。本研究采用 QuEChERS 方法对茶叶样品进行净化, 考察不同吸附剂对 21 种 PAs 类化合物的影响。将不同配比的吸附剂分别置于 15 mL 净化管中(净化管 1: 200 mg PSA; 净化管 2: 50 mg MWCNTs-COOH+200 mg PSA; 净化管 3: 100 mg MWCNTs-COOH+200 mg PSA; 净化管 4: 200 mg MWCNTs-COOH+200 mg PSA; 净化管 5: 400 mg MWCNTs-COOH+200 mg PSA; 净化管 6: 30 mg MWCNTs-COOH+200 mg PSA; 净化管 7: 10 mg MWCNTs-COOH+200 mg PSA), 加入 4 mL 用 20%乙腈水配制的 20 μg/L 的混合标准溶液, 涡旋 1 min, 4500 r/min 离心 3 min, 过滤后进样分析。结果如表 3, 净化管 3、4、5 中大部分目标物被严重吸附, 回收率在 50%以下; 净化管 6、7 减少了 MWCNTs-COOH 用量, 仍有部分目标物被吸附;

表 3 不同净化方式对 21 种 PAs 的影响(n=3)

Table 3 Effects of different purification methods on 21 kinds of PAs (n=3)

化合物	平均回收率/%						
	净化管 1	净化管 2	净化管 3	净化管 4	净化管 5	净化管 6	净化管 7
Eu	97.2	85.8	64.2	39.4	20.6	82.4	80.7
EuNO	98.0	96.9	95.5	92.6	86.2	91.4	91.5
Im	95.6	79.7	55.1	25.1	7.4	81.5	90.4
ImNO	96.3	95.1	90.7	90.0	89.8	97.0	98.9
Ly	97.6	77.3	53.3	23.6	7.8	78.3	87.0
LyNO	99.8	92.1	89.5	88.5	89.5	98.7	99.1
Re	96.5	90.3	87.7	80.4	62.7	58.4	70.1
ReNO	92.7	91.2	85.5	85.6	65.8	91.8	91.9
He	95.5	60.4	36.9	17.6	7.4	63.5	74.3
HeNO	92.2	90.3	86.7	84.8	72.1	96.6	97.1
Sp	95.9	36.5	16.0	6.8	2.7	45.2	61.9
SpNO	95.5	94.1	90.2	75.0	57.2	86.6	90.5
Sn	97.8	39.5	19.5	7.9	3.6	46.1	62.4
SnNO	80.2	ND	ND	ND	ND	95.1	95.9
Em	96.2	32.4	16.1	7.1	3.2	38.3	53.6
EmNO	95.6	45.8	26.4	14.6	7.2	52.3	64.3
Sv	92.2	38.1	19.9	8.2	3.7	46.2	61.7
SvNO	91.6	90.2	93.2	81.0	61.1	89.4	96.9
Sk	95.1	40.9	20.6	9.2	ND	46.1	59.6
Lc	96.8	3.5	1.2	0.4	0.2	ND	ND
LcNO	90.6	36.4	17.9	9.6	4.4	ND	40.2

注: ND 表示未检出。

采用净化管 1 测得的 21 种 PAs 的回收率均良好。采用空白样品加标方式, 对比 20、50、100 mg PSA 净化 1 mL 试样液的净化效果, 发现结果无明显差异, 综合考虑检验成本和净化效果, 最终采用 50 mg PSA 净化 1 mL 试样液的净化方式。

2.4 基质效应

质谱分析中基质效应(matrix effect, ME)是普遍存在的, ME 会使目标物的响应增强或减弱, 从而干扰测定结果的灵敏度和准确性。按本研究方法考察茶叶的 ME, 按照该计算方式: ME/%=(基质匹配标准溶液峰面积/溶剂标准溶液峰面积–1)×100%, 当 ME<0 时, 表现为基质抑制, ME>0 时, 表现为基质增强, ME 在–20%至+20%之间表示 ME 不明显。根据优化后的方法考察茶叶中 21 种 PAs 的 MEs, 结果发现, 白茶中 EuNO 和乌龙茶中 LyNO 的 MEs 值大于 20%, 表现为 ME 明显增强; 红茶中 ReNO、Sp、SpNO、Sn、Sv、Sk、SvNO、SnNO、Re、Em、EmNO、Lc、lcNO, 白茶中 He、HeNO、Sp、SpNO、Sn、Sv、Sk、SvNO、SnNO、EmNO、Lc、lcNO 和乌龙茶中 Sn、Sv、Sk、SvNO、SnNO 的 MEs 值小于–20%, 表现为较强的基质抑制, 其余分析物的 MEs 值在–15%至+15%之间, 说明 ME 不明显。考虑到 ME, 最终选择基质溶液匹配的方式配制标准曲线溶液。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性关系、检出限与定量限

称取空白茶叶按本研究方法获得空白样品基质溶液, 用空白样品基质溶液配制系列浓度的混合标准溶液, 分别以目标物质量浓度为横坐标(X, μg/L), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。21 种 PAs 在 0.1~4.0 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)在 0.998 以上, 以 3 倍信噪比计算检出限, 检出限范围为 0.03~3.00 μg/kg, 10 倍信噪比计算定量限, 定量限范围为 0.10~10.00 μg/kg, 能够满足实验要求, 详见表 4。

2.5.2 回收率和精密度

以阴性茶叶为基质, ImNO、LyNO、Sk、LcNO 以 5.0、

10.0、25.0 μg/kg 进行加标回收实验, SpNO 以 10.0、25.0、100.0 μg/kg 进行加标回收实验, 其余化合物以 2.5、10.0、25.0 μg/kg 进行加标回收实验, 每个加标水平平行测定 6 次, 计算各化合物的平均加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果如表 5, 在相应加标水平下, 21 种 PAs 的平均回收率在 81.3%~116.3%之间, RSDs (n=6)为 0.5%~10.6%, 说明该方法回收率与精密度均较好, 能够满足分析需求。

表 4　21 种 PAs 的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 4　Linear equations, correlation coefficients, limit of detection and limit of quantitation of 21 kinds of PAs

目标物	线性方程	r^2	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
EU	Y=195993X+1904.42293	0.99949	0.29	0.98
EuNO	Y=164723X+5008.21530	0.99901	0.20	0.68
Im	Y=339498X+4439.19756	0.99988	0.52	1.73
ImNO	Y=207474X–5833.86108	0.99898	1.25	4.17
Ly	Y=316609X–9775.23985	0.99984	0.40	1.32
LyNO	Y=154790X–5237.22404	0.99978	1.53	5.10
Re	Y=74375.2X–9125.85607	0.99978	0.49	1.62
ReNO	Y=36950.5X–1060.48389	0.99944	0.20	0.68
He	Y=626383X–39891.1	0.99973	0.12	0.40
HeNO	Y=35868.1X–685.38571	0.99940	0.08	0.27
Sp	Y=128000X–3352.07842	0.99930	0.57	1.89
SpNO	Y=38709.2X–3866.23341	0.99976	3.00	10.00
Sn	Y=215573X–27975.85682	0.99928	0.30	1.00
SnNO	Y=30874.6X–2435.15481	0.99936	0.06	0.21
Em	Y=177875X–29302.07300	0.99874	0.18	0.60
EmNO	Y=49883.2X–8525.11303	0.99935	0.38	1.27
Sv	Y=214189X–9575.16247	0.99912	0.45	1.50
SvNO	Y=76095.7X–5450.97055	0.99848	0.06	0.22
Sk	Y=14596.84912X–5253.68173	0.99986	1.47	4.90
Lc	Y=510690X–87039.4	0.99943	0.03	0.10
LcNO	Y=5832X–12980.9993	0.99931	1.11	3.70

表 5　21 种 PAs 的平均回收率和 RSDs (n=6)

Table 5　Average recoveries and RSDs of 21 kinds of PAs (n=6)

化合物	加标水平/(μg/kg)	平均回收率/%	RSDs/%	化合物	加标水平/(μg/kg)	平均回收率/%	RSDs/%	化合物	加标水平/(μg/kg)	平均回收率/%	RSDs/%
EU	2.5	96.5	10.6	ReNO	2.5	103.8	4.4	Em	2.5	90.4	1.2
	10.0	100.1	6.3		10.0	87.1	3.0		10.0	105.6	0.5
	25.0	96.7	6.4		25.0	86.6	5.7		25.0	111.6	3.5
EuNO	2.5	99.9	4.1	He	2.5	89.4	7.5	EmNO	2.5	85.2	5.8
	10.0	99.2	5.3		10.0	86.1	4.2		10.0	97.3	7.0
	25.0	86.3	2.0		25.0	95.4	1.5		25.0	101.9	2.7
Im	2.5	103.1	3.5	HeNO	2.5	106.4	4.3	Sv	2.5	91.9	4.4
	10.0	103.5	4.0		10.0	111.8	3.2		10.0	107.0	4.5
	25.0	91.3	5.6		25.0	95.8	2.3		25.0	88.3	3.6
ImNO	5.0	103.4	4.6	Sp	2.5	112.4	5.9	SvNO	2.5	83.7	2.5
	10.0	106.4	2.0		10.0	99.7	6.5		10.0	107.2	3.3
	25.0	108.9	3.1		25.0	91.8	3.9		25.0	81.3	1.2

表 5(续)

化合物	加标水平/(μg/kg)	平均回收率/%	RSDs/%	化合物	加标水平/(μg/kg)	平均回收率/%	RSDs/%	化合物	加标水平/(μg/kg)	平均回收率/%	RSDs/%
Ly	2.5	93.6	7.8	SpNO	10.0	116.3	1.7	Sk	5.0	105.4	6.0
	10.0	111.2	5.0		25.0	94.6	5.8		10.0	88.1	3.3
	25.0	99.8	5.2		100.0	107.6	4.3		25.0	104.2	2.6
LyNO	5.0	94.6	5.5	Sn	2.5	96.9	5.4	Lc	2.5	97.8	5.3
	10.0	102.0	3.5		10.0	105.7	2.5		10.0	103.2	1.2
	25.0	100.3	5.0		25.0	107.0	2.7		25.0	96.0	5.9
Re	2.5	96.2	3.0	SnNO	2.5	95.1	4.1	LcNO	5.0	106.6	6.5
	10.0	113.9	4.4		10.0	91.2	5.5		10.0	107.6	4.8
	25.0	94.0	3.6		25.0	85.6	2.7		25.0	92.7	1.2

2.6 实际样品测定

选择具有代表性的 33 份市售茶叶样品按本研究方法进行测定。结果发现, 33 份茶叶样品中有 6 份检出 Ly, 检测值在 12.41~135.8 μg/kg; 5 份检出 LyNO, 检测值在 9.45~22.13 μg/kg; 1 份检出 Im, 检测值为 4.73 μg/kg; 其余化合物均未检出, 说明茶叶存在吡咯里西啶生物碱的污染, 需引起重视。

3 结 论

本研究通过对色谱质谱条件以及 QuEChERS 前处理条件进行优化, 建立 QuEChERS 前处理方法结合超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中 21 种吡咯里西啶生物碱的分析方法, 同时, 将该方法应用于市售 33 份茶叶的检测, 发现部分茶叶有检出 Ly、LyNO 和 Im。该方法前处理较为高效简便, 重现性好, 灵敏度和准确度较高, 能够满足茶叶中 PAs 的检测需求, 为后续制定 PAs 的标准提供了技术参考。

参考文献

[1] CASADO N, MORANTE-ZARCERO S, SIERRA I. The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 120: 123–139.

[2] HE YS, ZHU L, MA J, *et al*. Metabolism-mediated cytotoxicity and genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids [J]. Archives of Toxicology, 2021, 95(6): 1917–1942.

[3] TESCHKE R, VONGDALA N, QUAN NV, *et al*. Metabolic toxification of 1,2-unsaturated pyrrolizidine alkaloids causes human hepatic sinusoidal obstruction syndrome: The update [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19): 10419.

[4] KEUTH O, HUMPF HU, FÜRST P. Pyrrolizidine alkaloids: Analytical challenges [M]. Elsevier: Encyclopedia of Food Chemistry, 2019.

[5] MA CH, 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: 50–60.

[6] KALTNER F, STIGLBAUER B, RYCHLIK M, *et al*. Development of a sensitive analytical method for determining 44 pyrrolizidine alkaloids in teas and herbal teas via LC-ESI-MS/MS [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411(27): 7233–7249.

[7] 万静宜, 冯超, 陈宇航, 等. 茶叶中 21 种吡咯里西啶生物碱检测方法研究[J]. 分析测试学报, 2023, 42(10): 1351–1356.
WAN JY, FENG C, CHEN YH, *et al*. Simultaneous determination of 21 pyrrolizidine alkaloids in tea [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(10): 1351–1356.

[8] PICRON JF, HERMAN M, VAN HE, *et al*. Analytical strategies for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plant based food and examination of the transfer rate during the infusion process [J]. Food Chemistry, 2018, 266: 514–523.

[9] KNUTSEN HK, ALEXANDER J, BARREGÅRD L, *et al*. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements [J]. EFSA Journal, 2017, 15(7): e04908.

[10] MULDER PPJ, LOPEZ P, CASTELLARI M, *et al*. Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: Results of a survey across Europe [J]. Food Additives & Contaminants Part A, 2018, 35(1): 118–133.

[11] VAN WBE, STANDER MA, LONG HS. Senecio angustifolius as the major source of pyrrolizidine alkaloid contamination of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) [J]. South African Journal of Botany, 2017, 110: 124–131.

[12] 黄旦益, 马军辉, 王羽, 等.吡咯里西啶生物碱及茶叶中的来源分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(2): 229–236.
HUANG DY, MA JH, WANG Y, *et al*. Pyrrolizidine alkaloids and its source analysis in tea [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(2): 229–236.

[13] 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.
HAN HL, JIANG CL, WANG C, *et al*. Pyrrolizidine alkaloids in tea: A review of analytical methods, contamination levels and health risk [J].

Food Science, 2021, 42(17): 255–266.

[14] MEDINA JCM, GAUZE GF, VIDOTTI GJ, *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.

[15] JEANNETTE T, HOVERMALE A, CRAIG M. Metabolism of pyrrolizidine alkaloids by *Peptostreptococcus heliotrinreducens* and a mixed culture derived from ovine ruminal fluid [J]. Biophysical Chemistry 2002, 101–102(2002): 387–399.

[16] LI YH, KAN WL, LI N, *et al*. Assessment of pyrrolizidine alkaloid-induced toxicity in an *in vitro* screening model [J]. Journal Ethnopharmacol, 2013, 150(2): 560–567.

[17] HE X, XIA Q, FU PP. 7-glutathione-pyrrole and 7-cysteine pyrrole are potential carcinogenic metabolites of *Pyrrolizi dinealkaloids* [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 2017, 35: 69–83.

[18] LI X, YANG X, XU D, *et al*. Magnetic resonance imaging findings in the patients with pyrrolizidine alkaloids-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome [J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2017, 15(6): 955–957.

[19] 廖仕成, 李荷丽, 刘红河, 等. 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, 13(1): 141–149.
LIAO SC, LI HL, LIU HH, *et al*. 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]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(1): 141–149.

[20] 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.
TONG XB, LIU GF, ZHOU ZX. Study on extraction and quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids [J]. Cereals & Oils, 2024, 37(4): 158–162.

[21] RIZZO S, CELANO R, PICCINELLI AL, *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.

[22] 姚蕾珺, 陈燕秋, 林浩, 等. 一体化 QuEChERS 净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中 27 种吡咯里西啶类生物碱[J]. 茶叶科学, 2024, 44(5): 831–842.
YAO LJ, CHEN YQ, LIN H, *et al*. Simultaneous determination of 27 pyrrolizidine alkaloids in tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with integrated QuEChERS purification [J]. Journal of Tea Science, 2024, 44(5): 831–842.

[23] 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.
CHEN YK. Rapid determination of 26 pyrrolizidine alkaloids in milk power and liquid milk by solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 2024, 45(24): 266–272.

[24] 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.

[25] 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.
ZHU L, HUA RM, WANG LY, *et al*. Research progress on detection and analysis methods of pyrrolizidine alkaloids in plants [J]. Quality and Safety of Agro-Products, 2021(4): 36–42, 46.

[26] 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.

[27] JEONG WT, LIM HB. Determination and chemical profling of toxic pyrrolizidine alkaloids in botanical samples with UPLC-Q-TOFMS [J]. Chromatographia, 2019, 82: 1653–1664.

[28] 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, MA LY. Determination of pyrrolizidine alkaloids in licorice by QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and risk analysis [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(8): 314–321.

[29] TRIPATHY V, SHARMA KK, GUPTA R, *et al*. Simultaneous monitoring and dietary risk assessment of 386 pesticides in market samples of black tea [J]. Food Chemistry, 2023, 420: 136103.

[30] 刘文菁, 戴明, 何孟杭, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 快速测定乳粉中 28 种真菌毒素[J]. 食品科技, 2025, 50(3): 338–347.
LIU WJ, DAI M, HE MH, *et al*. Rapid determination of 28 kinds of mycotoxins in milk powder by QuEChERS-UPLC-MS/MS [J]. Food Science and Technology, 2025, 50(3): 338–347.

[31] MATHON C, EDDER P, BIERI S, *et al*. Survey of pyrrolizidine alkaloids in teas and herbal teas on the Swiss market using HPLC-MS/MS [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(28): 7345–7354.

(责任编辑: 蔡世佳　安香玉)