

利用 SFC-MS/MS 测定植源性食品 中的吡咯里西啶类生物碱

ASMS 2019 TP-221

Anja Grüning¹, Gesa J. Schad¹, Jan Stenzler²

¹ Shimadzu Europa GmbH, Albert-Hahn-Str. 6-10,
47269 Duisburg, Germany,

² Shimadzu Deutschland GmbH, Keniastr. 38,
47269 Duisburg, Germany

概述

- 利用超临界流体色谱与 MS/MS 联用技术开发吡咯里西啶类生物碱 (PA) 的检测方法。
- 使用手性色谱柱分离异构体。
- 34 种 PA 的定量范围至少为 2 至 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 对于所有目标物, 加权回归结果 r^2 均大于 0.99, $S/N > 10$ (LLOQ 水平)。

引言

吡咯里西啶类生物碱 (PA) 是潜在的致癌植物代谢物。它们主要出现在岩梅科、菊科和豆科植物中。它们含有一个吡咯烷核心, 是一大类杂环生物碱, 主要来自 4 种 桔梗碱、反转录碱、日三碱和个体碱。。如果 PA 具有 1,2- 双键和酯化侧链 (这是 PA 激活肝脏的结构前提), 则 PA 具有肝毒性。接触食品、饮料或植物药中的 PA 可能会对人类健康造成长期影响。

根据现有数据, 食物链污染物专家小组 (CONTAM) 提出了一份应监测食品中 PAs 的清单 [1]。由于某些分析物是异构体, 无法通过不同的质量加以区分, 因此必须通过色谱法进行分离。LC-MS/MS 是测定 PA 的标准方法, 然而, 分离这些化合物的同分异构体往往难度比较大。SFC 与 RP-LC 相比具有互补的色谱选择性, 并且在分离立体异构体方面具有优势, 这一点在开发测定 34 种 PA (包括 5 种番茄红素和 2 种番茄红素异构体) 的分离方法中得到了证明。

方法与材料

样品制备

茶叶样品用 0.05 M 硫酸超声提取两次。在对样品进行固相萃取 (SPE) [2] 之前, 先用氢氧化铵调节合并提取物的 pH 值。分离方法中得到了证明。

SPE 方法

SPE 滤芯	: ISOLUTE® C18 (EC), 200 mg, 3 mL, Biotage
调节	: 2 x 2.5 mL 甲醇
平衡	: 2 x 2.5 MI 水
样品装载	: 2 x 2.5 MI 提取液
冲洗	: 2 x 2.5 MI 水
洗脱	: 2 x 2.5 MI 甲醇 (如果是绿茶或红茶, 则加入 2.5% 的 NH_4OH)

利用 SFC-MS/MS 测定植源性食品中的 吡咯里西啶类生物碱

洗脱后，在 50°C 的氮气流中干燥提取物约 60 分钟。

样品用 1 mL 甲醇复溶并充分混合。在将样品转移到自动进样器玻璃瓶中之前，先离心 10 分钟。

SFC 方法

仪器	: Nexera UC, Shimadzu
色谱柱	: CHIRALPAK®, IG-3, 0.3 x 10 cm, 3 µm SFC, Daicel
流动相 A	: CO ₂
B	: 甲醇中的 50 mM 甲酸铵
C	: 甲醇
D	: 0.1 % 甲酸 (补充流量)
流速	: 1 mL/min
柱温	: 35°C
BPR 压力	: 100 bar
BPR 温度	: 50°C
时间程序	: 8 分钟三元梯度, 针对 PA 异构体的分离进行了优化

MS 条件

仪器	: LCMS-8060, 岛津
离子化	: ESI 正
雾化气流速	: 3 L/min
加热气流速	: 17 L/min
干燥气流速	: 3 L/min
接口温度	: 400°C
DL 温度	: 300°C
加热模块温度	: 500°C
CID 气	: 270 kPa
接口电压	: 1 kV

结果

SFC-MS/MS 方法的开发

茶叶样品用 0.05 M 硫酸超声提取两次。在对样品进行固相萃取 (SPE) [2] 之前，先用氢氧化铵调节合并提取物的 pH 值。分离方法中得到了证明。通过测试 32 种固定相和流动相组合 (一套四种不同的 Daicel CHIRALPAK® 系列色谱柱和八种不同的改性剂)，对

34 种不同的 PA 进行了方法测试。在确定了分离 34 种 PA 的最合适组合后，对梯度条件、流速和色谱柱温度进行了优化，以便在最短的总体分析时间内实现所有异构体的基线分离 (图 1)。

利用 SFC-MS/MS 测定植源性食品中的吡咯里西啶类生物碱

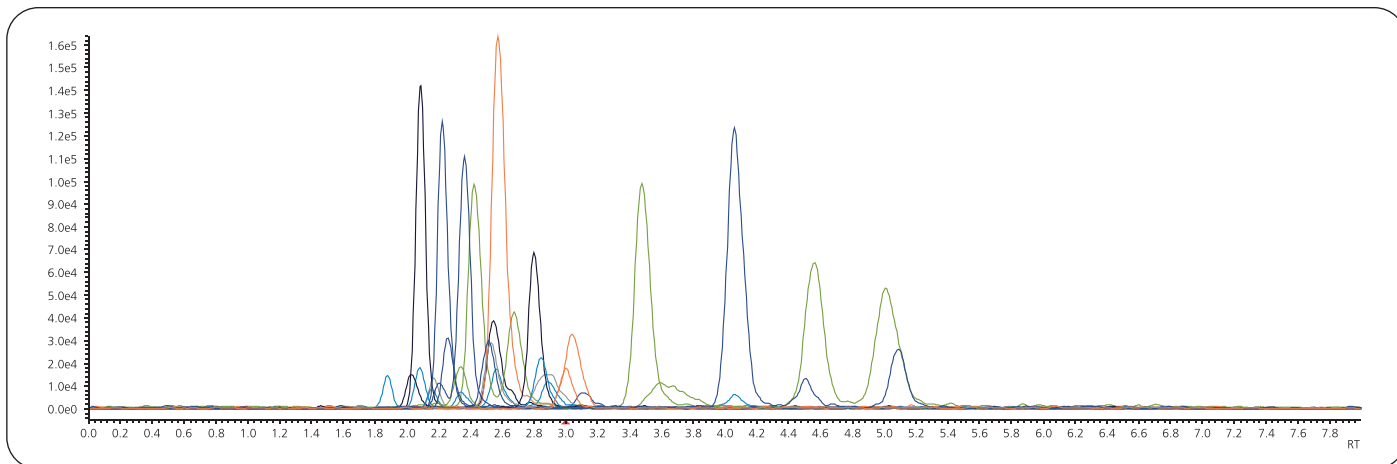


图 1：SFC-MS 分析 34 种吡咯里西啶类生物碱的典型色谱图

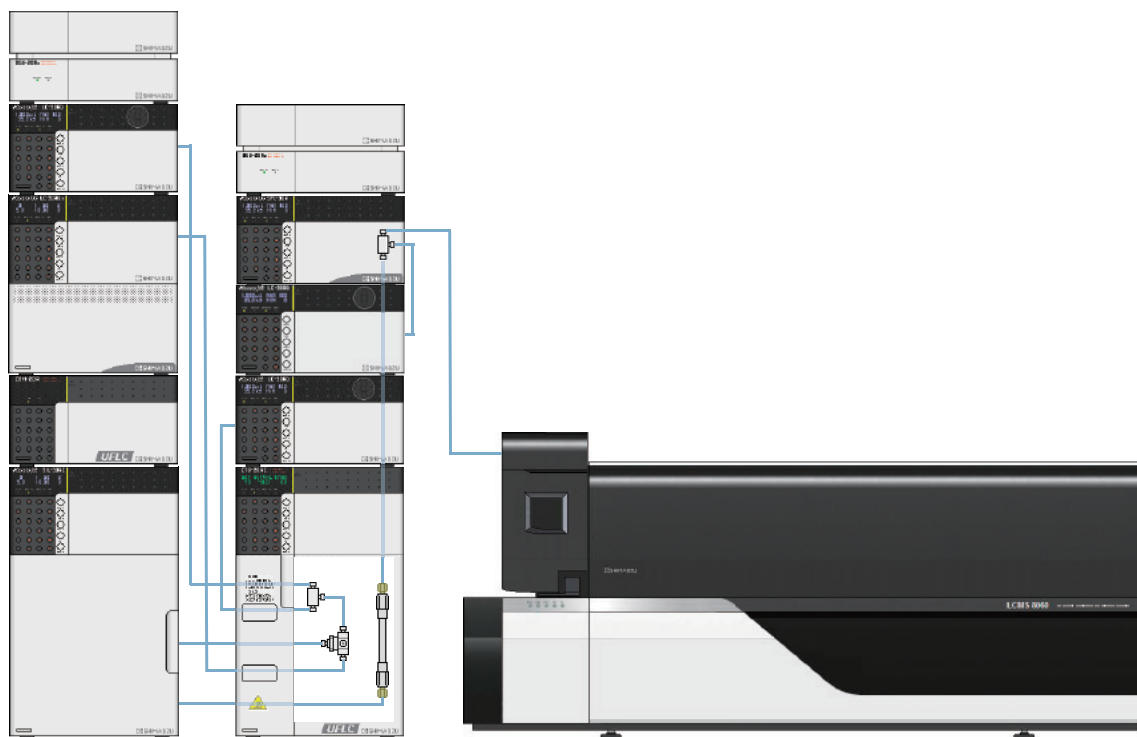


图 2：设置 SFC-MS/MS 分析系统

茶叶样品定量分析

通过使用以上的仪器条件，可以对 18 种 PA 和 16 种与之相关的 N- 氧化物进行定量。红茶基质中的校准曲线（平行进样 2 次）显示出良好的精度和准确度。即使是在茶叶这样复杂的基质中，我们也能轻松定量 PAs，其范围至少在 2 至 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。所有目标物的加权回归结果 r^2 均大于 0.99，LLOQ 水平的信噪比大于 10。

示例校准曲线如图 4 所示。图 3 显示了番茄红素和千里光碱异构体的色谱分离图。表 1 列出了不同 PA 的 LLOQ。

在一个应用实例中，共分析了 10 个市售茶叶样本。在 10 种吡咯里西啶类生物碱中，有 4 种可以检测到一种或多种高于其低限定量的生物碱。一个样品中含有欧罗巴碱、天芥菜碱、毛果天芥菜碱及其相关的 N- 氧化物，3 个样品中含有石松胺、刺甘草查尔酮及其相关的 N- 氧化物。

表 1：红茶基质中吡咯里西啶类生物碱的低限量

	红茶 LLOQ			红茶 LLOQ	
	ng/mL	$\mu\text{g}/\text{kg}$		ng/mL	$\mu\text{g}/\text{kg}$
1 蓝薊定	0.050	0.20	18 野百合碱 -N- 氧化物	0.500	2.00
2 蓝薊定 -N- 氧化物	0.250	1.00	19 倒千里光碱	0.500	2.00
3 芥子碱	0.500	2.00	20 倒千里光碱 N- 氧化物	0.500	2.00
4 芥子碱 -N- 氧化物	0.125	0.50	21 千里光碱	0.125	0.50
5 欧罗巴碱 (HCl)	0.125	0.50	22 千里光碱 N- 氧化物	0.125	0.50
6 欧罗巴碱 -N- 氧化物	0.050	0.20	23 千里光菲灵碱	0.250	1.00
7 天芥菜碱	0.050	0.20	24 千里光菲灵碱 -N- 氧化物	0.250	1.00
8 天芥菜碱 -N- 氧化物	0.025	0.10	25 塞内湊碱	0.250	1.00
9 促黑激素	0.125	0.50	26 塞内湊碱 -N- 氧化物	0.125	0.50
10 促黑激素 N- 氧化物	0.125	0.50	27 克氏千里光宁碱	0.050	0.20
11 雅各宾碱	0.250	1.00	28 毛束草碱	0.125	0.50
12 雅各宾碱 -N- 氧化物	0.250	1.00	29 大尾摇碱	0.125	0.50
13 毛果天芥菜碱	0.025	0.10	30 大尾摇碱 N- 氧化物	0.125	0.50
14 毛果天芥菜碱 N- 氧化物	0.125	0.50	31 刺甘草查尔酮	0.125	0.50
15 石松胺	0.125	0.50	32 刺甘草查尔酮 -N- 氧化物	0.050	0.20
16 石松胺 N- 氧化物	0.125	0.50	33 Rinderin	0.025	0.10
17 野百合碱	0.500	2.00	34 Rinderin-N- 氧化物	0.050	0.20

利用 SFC-MS/MS 测定植源性食品中的吡咯里西啶类生物碱

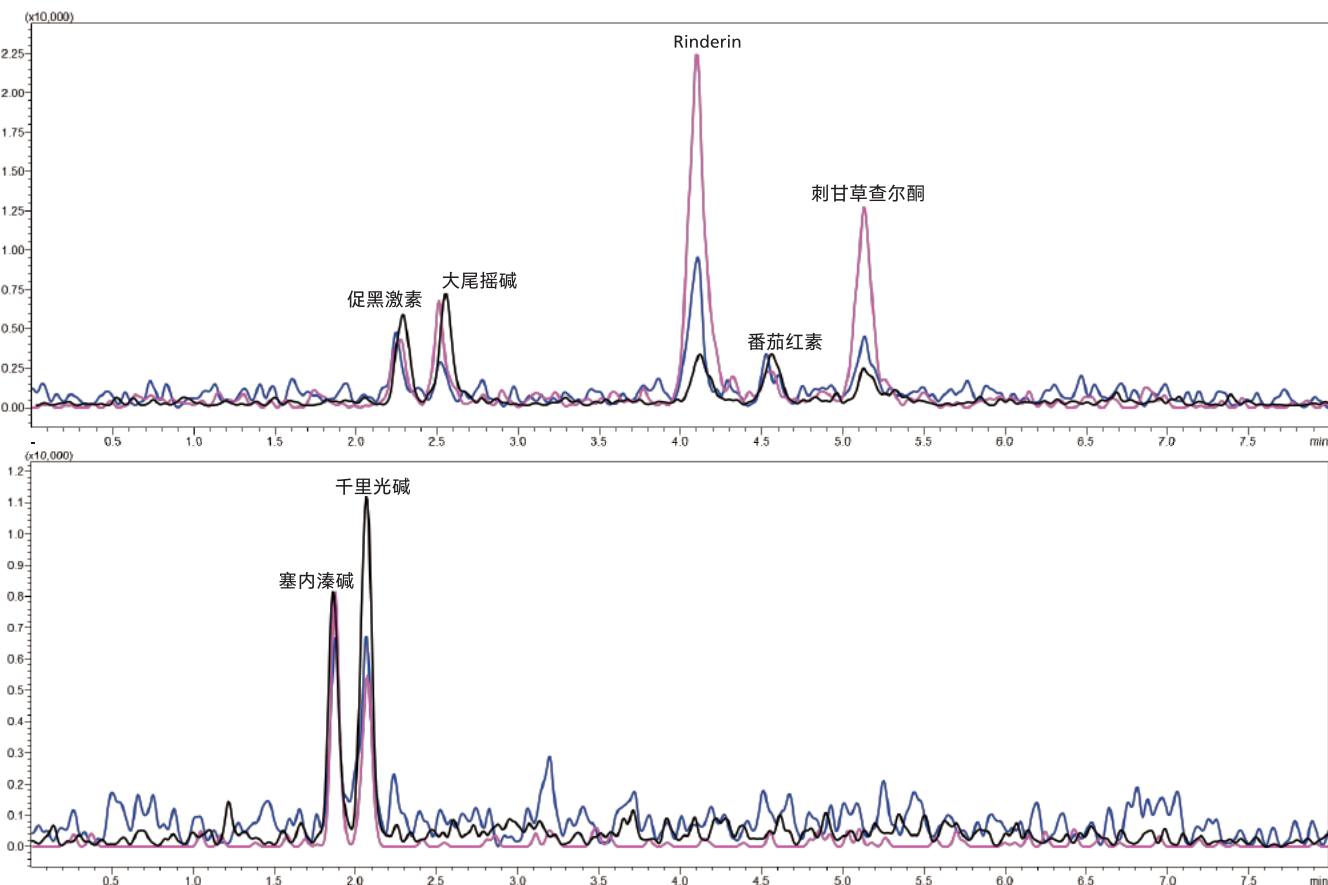


图 3: 番茄红素和千里光碱异构体的色谱分离图

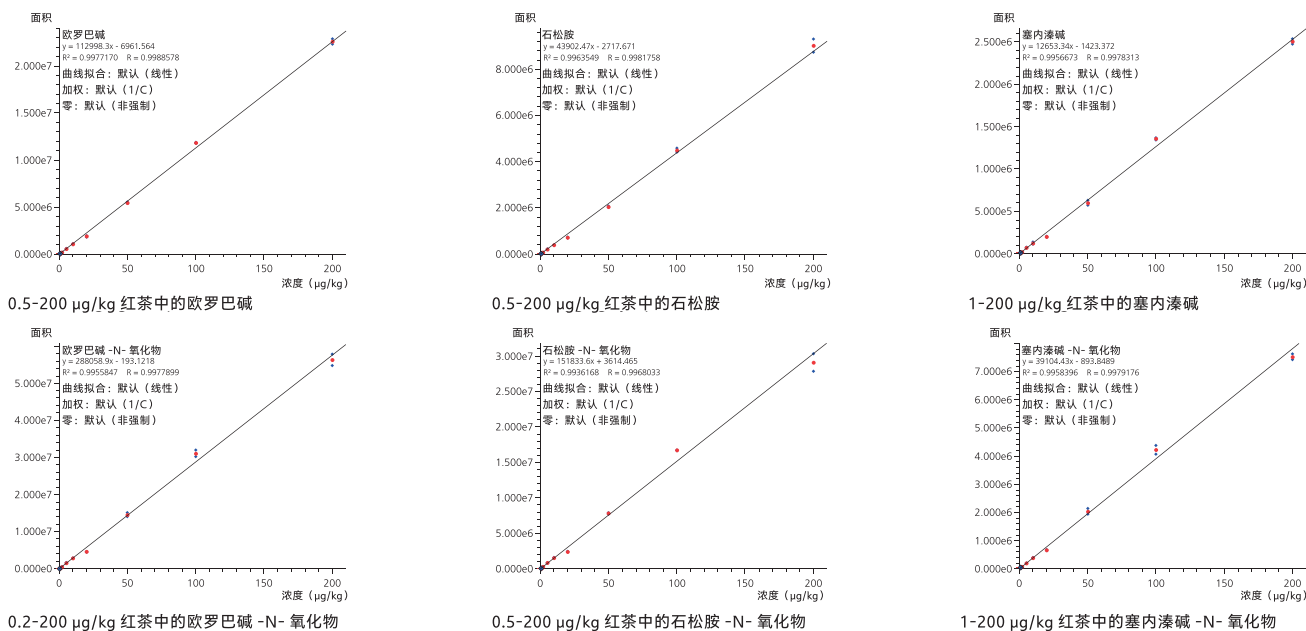


图 4: 红茶基质中的示例校准曲线

结论

本应用开发一种 SFC-MS/MS 在 8 分钟内分析植物源性食品中 34 种 PA 的高灵敏度分析方法，同时可实现 5 种番茄红素和 2 种番茄红素立体异构体的基线分离。通过测定实际茶叶样品中的 PA 含量，可以确定该方法适用于食品样品。

参考文献

- [1] EFSA Journal 2017;15(7):4908: Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements
- [2] Method description BfR-PA-Tee-2.0/2014; Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in plant material using SPE-LC-MS/MS

本介绍中的产品和应用仅供研究使用（RUO），不适用于诊断程序

岛津应用云

