

超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定干茶中 35 种吡咯里西啶生物碱

董 璐¹, 张晓林², 杨 晨¹, 赵旌妍¹, 王学梅¹, 褚莹倩², 李雪花^{1*}

(1. 大连理工大学环境学院, 工业生态与环境工程重点实验室, 辽宁 大连 116024;

2. 大连海关技术中心, 辽宁 大连 116001)

摘要:吡咯里西啶生物碱(PAs)是一类植物内源产生的次生代谢产物,具有肝毒性、遗传毒性和致癌性等毒性作用。现有研究覆盖 PAs 种类有限,且由于同分异构体色谱分离难,大多研究采用加和定量策略。因此,本研究基于超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(UHPLC-MS/MS)建立了干茶样本中欧盟法规限量的 35 种 PAs 的分析方法,其中有 33 种目标化合物获得了色谱分离,可以实现单独定量,有 2 种异构体共流出,进行加和定量。在电喷雾离子源(ESI)正离子模式下电离、多反应监测(MRM)模式下扫描,35 种 PAs 在各自范围内呈现良好的线性关系($r^2 > 0.99$),方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别为 0.2~8.0 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.5~25.0 $\mu\text{g/kg}$ 。在 1、2 和 5 倍 LOQ 加标水平下,茶叶基质中均有 89% 以上的目标化合物平均回收率为 70%~130%,3 次平行实验相对标准偏差(RSD)小于 20%(蓝萵定和毛果天芥菜碱 RSD 小于 30%)。应用该方法对 21 份黑茶和 30 份红茶样本进行检测,黑茶样本中 35 种 PAs 检出率为 19.05%,总含量为 5.07~15.48 $\mu\text{g/kg}$,红茶样本中无 PAs 检出。所建立的分析方法可为茶叶样本中 PAs 的组成、含量及风险评估提供技术支撑。

关键词:吡咯里西啶生物碱;超高效液相色谱-三重四极杆质谱法;茶叶

中图分类号:O658

文献标识码:A

Determination of 35 pyrrolizidine alkaloids in dried tea by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

DONG Lu¹, ZHANG Xiaolin², YANG Chen¹, ZHAO Jingyan¹, WANG Xuemei¹,

CHU Yingqian², LI Xuehua^{1*}

(1. Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, School of Environment, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; 2. Technology Center of Dalian Customs District, Dalian 116001, China)

Abstract: Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are natural toxins widely distributed in plants, which naturally occur in about 3% of the world's flowering plants. To date, more than 660 PAs and their nitrogen oxides have been identified in over 6 000 plants. Some PAs are hepatotoxic, genotoxic and tumorigenic, posing significant health risks to humans. These alkaloids are commonly detected as contaminants in various food products, including tea, grains, milk, honey, as well as plant-derived pharmaceuticals and dietary supplements. Currently, most studies on the quantitative methods for PAs focus on a limited number of PAs and employ an additive quantification strategy, largely due to the challenges associated with chromatographic separation of isomers. These approaches limit

收稿日期:2025-02-16

* 通讯联系人 .E-mail: lixuehua@dlut.edu.cn.

基金项目:辽宁省应用基础研究项目(2023JH2/101700338);海关总署科技计划项目(2024HK120);大连海关科技计划项目(2023DK07).

Foundation item: Applied Basic Research Program of Liaoning Province (No. 2023JH2/101700338); Science and Technology Program Projects of the General Administration of Customs (No. 2024HK120); Science and Technology Program Project of Dalian Customs (No. 2023DK07).

the ability to assess exposure and health risk accurately. Herein, a method was established to quantify 35 PAs individually in dried tea samples using ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The 35 target compounds were divided into two groups. The first group included 30 PAs, while the second group consisted of 5 PAs. These compounds were separated on Waters Acquity BEH C18 (150 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) and Thermo Acclaim™ C30 (150 mm×2.1 mm, 3.0 μ m) chromatographic columns, respectively. Mobile phases were H₂O containing 5 mmol/L ammonium formate and 0.13% formic acid (pH=3) and methanol-acetonitrile (4:6, volume ratio) containing 0.1% formic acid. The 33 target compounds were separated and 2 isomers co-eluted. Under positive-ion electrospray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) mode, target compounds were quantified using the external standard method with the matrix-matched standard curve. The results demonstrated that all target compounds showed good linearity ($r^2>0.99$) in their respective mass concentration ranges. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) of the method were in the range of 0.2–8.0 μ g/kg and 0.5–25.0 μ g/kg, respectively. The average recoveries of more than 89% compounds were in the range of 70%–130% at spiked levels of 1, 2, and 5 fold-LOQs and the relative standard deviations (RSDs) were less than 20% (RSDs of lasiocarpine and echimidine were less than 30%). Moreover, the quantitative method of the 35 PAs was applied to 21 dark tea and 30 black tea samples from Yunnan and Fujian Province, where PAs were detected in 4 dark samples with total contents ranging from 5.07 to 15.48 μ g/kg and were not detected in black tea samples. The detection rate of PAs in dark tea samples was higher than that of black tea samples. That might be because most dark tea was processed from fresh leaves picked by machines, and this attribution could be associated with the mixing of weeds containing PAs during tea harvesting. And the detected concentrations of all samples were lower than the maximum levels of tea in European Union regulations, indicating that the tea samples involved in this research are basically safe. In brief, the quantitative method of the 35 PAs facilitates the analysis of the occurrence, composition and potential risks in tea samples.

Key words: pyrrolizidine alkaloids (PAs); ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); tea

吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)是一类植物内源产生的次生代谢产物。其存在非常广泛,全世界约有 6 000 种植物可以产生 PAs, 占有开花植物的 3%, 目前有 660 余种 PAs (包含吡咯里西啶生物碱氮氧化物 PANOs)已被识别^[1-3]。PAs 在植物的化学防御系统中起着关键作用,帮助抵御食草动物、昆虫及病原体的侵害^[4]。PAs 是由千里光次碱和千里光次酸两个基本部分组成的酯类物质。根据千里光次碱的吡咯环结构中 1,2 位碳原子之间形成的键是否饱和,PAs 可分

为饱和型 PAs 和不饱和型 PAs。饱和型 PAs 通常无毒或毒性较弱,而不饱和型 PAs 由于其不可忽视的毒性成为关注的热点。根据千里光次碱结构的差异,不饱和型 PAs 又可进一步分为倒千里光碱型(retronecine-type PAs)和奥索千里光裂碱型(otonecine-type PAs) (图 1)^[5]。PAs 具有多种毒性作用,包括肝毒性、遗传毒性和致癌性等^[6-9],但不同 PAs 间毒性差异很大。Ruan 等^[5]把发挥毒性作用的中间体吡咯-蛋白加合物作为生物标志物来评估 PAs 的毒性程度,结果证明倒千里光碱型 PAs 的

引用本文:董璐,张晓林,杨晨,赵旌妍,王学梅,褚莹倩,李雪花.超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定干茶中 35 种吡咯里西啶生物碱.色谱,2025,43(12):1342-1353.

DONG Lu, ZHANG Xiaolin, YANG Chen, ZHAO Jingyan, WANG Xuemei, CHU Yingqian, LI Xuehua. Determination of 35 pyrrolizidine alkaloids in dried tea by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(12): 1342-1353.

毒性大于奥索千里光裂碱型。同时进一步对不同结构的倒千里光碱型 PAs 进行对比发现,开环二酯的代谢活化和毒性远高于大环二酯。因此,发展多种 PAs 单独定量的分析技术是提升 PAs 健康风险评估可靠性和准确性的有效手段。

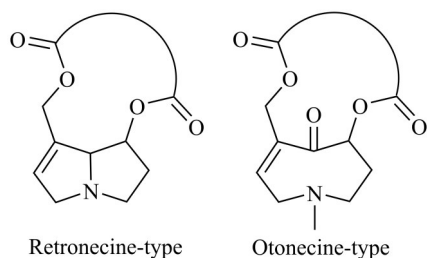


图 1 倒千里光碱型和奥索千里光裂碱型 PAs 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of retronecine-type pyrrolizidine alkaloids (PAs) and otonecine-type PAs

由于 PAs 暴露对人体健康存在不良影响,欧盟颁布了《欧盟委员会条例(欧盟)》((EU)2023/915)^[10],规定了干茶样本中 35 种 PAs 总和的最高含量为 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。但当前 PAs 检测方法研究普遍存在目标物覆盖不足的问题,Jiao 等^[11,12]分析了我国安徽省茶叶和茶园杂草中 15 种 PAs 的存在水平,目标物质仅涵盖欧盟法规限量中的 13 种;陈言凯等^[13]虽开发了同时测定乳粉及液体乳中 26 种 PAs 的分析方法,但法规物质覆盖率仅 54.3% (19/35);Rizzo 等^[14]使用高分辨质谱建立了 118 种 PAs 的筛查方法,但仅能对 28 种 PAs 进行准确定量;张新娜等^[15]将甘草中检测目标扩展至 34 种 PAs,但其中也仅包含了法规严格限量的 24 种,且未考察全缘千里光碱等共洗脱干扰物。姚蕾琚等^[16]和黄琼^[17]分别建立了茶叶中 27 种 PAs 和牛奶中 30 种 PAs 的定量分析方法,但目标物均仅涵盖了法规中规定的 21 种 PAs,且忽略了多个可能与目标 PAs 共流出的物质,如可能与石松胺和促黑激素共流出的凌德草碱、刺凌德草碱和大尾摇碱等,这对目标 PAs 的定量存在干扰。此外,PAs 中含有多种同分异构体,色谱分离较为困难。因此对于难以色谱分离的同分异构体,大多数研究只能以两种或更多种化合物的加和浓度进行报道。万静宜等^[18]分析了我国市售茶叶样本中 21 种 PAs 的存在水平,其中 19 种实现了色谱分离;Jansons 等^[19]基于纳流液相色谱-串联质谱法建立了 30 种 PAs 的分析方法,其中仅 24 种实现了完全色谱分离和单独定量;Peloso 等^[20]对意大利市场上 600 多种食品中的 16 种目标 PAs 进行了单独定量,并对其余 19 种难以色谱分离的 PAs 进行分组加和定

量。但值得注意的是,对多种目标物质进行加和定量可能存在交叉干扰的问题,不利于后续的健康风险评估及科学管控。

茶是一种消费最广泛的非酒精饮料,茶叶样本中频繁检出 PAs,欧盟食品和饲料快速预警系统中经常发布有关茶叶及其制品中检出高含量 PAs 的报道^[21-23],因此饮茶可能导致人群暴露于 PAs 进而产生潜在健康风险^[12,24]。但我国作为茶叶生产和消费大国,茶叶中 PAs 存在水平的相关研究十分有限,分析方法也有待完善^[25,26]。因此,本研究基于超高效液相色谱-三重四级杆质谱法(ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)开发了欧盟法规限量中 35 种 PAs 的定量分析方法,并采用干茶样本进行了验证。将 35 种目标 PAs 分为两组分别测定,最终有 33 种目标化合物获得了色谱分离,可以单独定量,有 2 种化合物(即促黑激素氮氧化物和大尾摇碱氮氧化物)共流出,进行加和定量。应用本研究开发的方法分析了我国云南和福建省 21 份黑茶和 30 份红茶样本中 PAs 的存在水平,在 4 份样本中检出了 PAs。本研究建立的分析方法可为茶叶中 PAs 的组成、含量及风险评估提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

LC-30 AD 液相色谱系统(日本 Shimadzu 公司)、QTRAP 6500 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Quintix 612 精度为 0.01 g 分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ-500DE 超声萃取仪(昆山超声仪器有限公司);3-18K 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);SPE-12 固相萃取装置(美国 Supelco 公司);N-EVAP112 氮吹浓缩仪(美国 Organomation 公司);混合型阳离子交换固相萃取小柱(Oasis MCX 小柱, 60 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司);Arium 超纯水机(德国 Sartorius 公司);0.22 μm 滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司)。

甲醇、乙腈、甲酸铵、甲酸、硫酸、氨水均购于德国 Merck 公司;纯净水购于广州屈臣氏食品饮料有限公司;21 份黑茶样本取自云南省 4 个茶叶产区(勐海茶区、易武茶区、普洱茶区、临沧茶区)种植园;30 份红茶样本分别取自云南省(18 份)和福建省(12 份)茶叶种植园;35 种 PAs 标准品(见表 1)

购于天津阿尔塔科技股份有限公司,质量浓度均为 100 μg/mL(乙腈溶液中)。

1.2 标准溶液配制

分别准确吸取 20 μL 35 种单标储备液于 10 mL 容量瓶中,后用乙腈定容至 10 mL 以配制 200 ng/mL 混合标准储备液。使用乙腈将上述混合标准储备液逐级稀释成 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL 的一系列混合标准溶液,于-18 ℃冰箱中避光保存。

取 500 μL 处理后的干茶样品溶液,加入适量 200 ng/mL 混合标准储备液配制成一系列的 PAs 混合基质匹配标准溶液,质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL,于-18 ℃冰箱中避光保存。

1.3 样品前处理

前处理方法在前人已发表研究^[18,27-29]的基础上进行了改进,具体步骤如下:准确称量(2.00±0.01) g 干茶粉末样品置于离心管中,加入 20 mL 含 0.05

表 1 35 种目标 PAs 的信息
Table 1 Information of the 35 target PAs

No.	Compound	Abbr.	Chinese name	CAS No.	Molecular formula
1	intermediate	Im	促黑激素	10285-06-0	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅
2	rinderine	Rn	凌德草碱	6029-84-1	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅
3	indicine	Id	大尾摇碱	480-82-0	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅
4	lycopsamine	La	石松胺	10285-07-1	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅
5	echinatine	En	刺凌德草碱	480-83-1	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅
6	heliotrine	Hn	天芥菜碱	303-33-3	C ₁₆ H ₂₇ NO ₅
7	rinderine-N-oxide	RnN	凌德草碱氮氧化物	137821-16-0	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆
8	echinatine-N-oxide	EnN	刺凌德草碱氮氧化物	20267-93-0	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆
9	intermediate-N-oxide	ImN	促黑激素氮氧化物	95462-14-9	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆
10	indicine-N-oxide	IdN	大尾摇碱氮氧化物	41708-76-3	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆
11	lycopsamine-N-oxide	LaN	石松碱胺氮氧化物	95462-15-0	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆
12	europine	Eu	欧天芥菜碱	570-19-4	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆
13	heliotrine-N-oxide	HnN	天芥菜碱氮氧化物	6209-65-0	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆
14	seneciphylline	Sp	千里光菲林	480-81-9	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅
15	spartioidine	St	鹰爪千里光碱	520-59-2	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅
16	integerrimine	Ir	全缘千里光碱	480-79-5	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅
17	senecivernine	Sv	春千里光碱	72755-25-0	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅
18	senecionine	Sc	千里光宁碱	130-01-8	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅
19	europine-N-oxide	EuN	欧天芥菜碱氮氧化物	65582-53-8	C ₁₆ H ₂₇ NO ₇
20	spartioidine-N-oxide	StN	鹰爪千里光碱氮氧化物	171038165(CID)	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆
21	seneciphylline-N-oxide	SpN	千里光菲林氮氧化物	38710-26-8	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆
22	senecivernine-N-oxide	SvN	春千里光碱氮氧化物	101687-28-9	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆
23	integerrimine-N-oxide	IrN	全缘千里光碱氮氧化物	85955-28-8	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆
24	senecionine-N-oxide	ScN	千里光宁碱氮氧化物	13268-67-2	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆
25	usaramine	Us	光萼野百合碱	15503-87-4	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆
26	retrorsine	Re	倒千里光碱	480-54-6	C ₁₈ H ₂₅ NO ⁶
27	senkirkine	Sk	克氏千里光碱	2318-18-5	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆
28	retrorsine-N-oxide	ReN	倒千里光碱氮氧化物	15503-86-3	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇
29	usaramine-N-oxide	UsN	光萼野百合碱氮氧化物	117020-54-9	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇
30	heliosupine	Hs	天芥菜平	32728-78-2	C ₂₀ H ₃₁ NO ₇
31	echimidine	Em	蓝薊定	520-68-3	C ₂₀ H ₃₁ NO ₇
32	lasiocarpine	Lc	毛果天芥菜碱	303-34-4	C ₂₁ H ₃₃ NO ₇
33	echimidine-N-oxide	EmN	蓝薊定氮氧化物	41093-89-4	C ₂₀ H ₃₁ NO ₈
34	heliosupine-N-oxide	HsN	天芥菜平氮氧化物	31701-88-9	C ₂₀ H ₃₁ NO ₈
35	lasiocarpine-N-oxide	LcN	毛果天芥菜碱氮氧化物	127-30-0	C ₂₁ H ₃₃ NO ₈

mol/L 硫酸的甲醇-水(1:1, 体积比)提取液, 涡旋 30 s 后超声萃取 10 min, 将提取物离心(10 000 r/min, 5 min)后取 1 mL 上清液加载到已用 1.5 mL 甲醇和 1.5 mL 水活化的 Waters Oasis MCX(60 mg, 3 mL)固相萃取柱上, 接着用 2 mL 水和 2 mL 甲醇淋洗 SPE 小柱, 用 2 mL 含 2.5% 氨水的甲醇溶液洗脱 PAs。将洗脱的溶液置于氮气下干燥, 后用 500 μ L 初始流动相溶液复溶, 过 0.22 μ m 滤膜后上机测定。

1.4 UHPLC-MS/MS 检测条件

本研究将 35 种目标 PAs 分为两组分别测定。第一组包括 30 种目标化合物, 第二组包括其余 5 种同分异构体目标化合物(见表 2)。第一组化合物用方法 1 分析, 第二组化合物用方法 2 分析。

1.4.1 方法 1

色谱柱: Waters Acquity BEH C18(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, 美国 Waters 公司); 流动相 A: 含 5 mmol/L 甲酸铵的 0.13% 甲酸水溶液(pH=3), 流动相 B: 含 0.1% 甲酸的甲醇-乙腈(4:6, 体积比)溶液; 梯度洗脱程序: 0~0.01 min, 5%B; 0.01~18 min, 5%B~15%B; 18~30 min, 15%B~35%B; 30~31 min, 35%B~95%B; 31~33 min, 95%B; 33~34 min, 95%B~5%B; 34~35 min, 5%B。流速为 0.3 mL/min; 进样量为 5 μ L; 柱温为 40 $^{\circ}$ C。

离子源: 电喷雾电离(ESI)源, 正离子模式; 扫描方式: 多反应监测模式(MRM); 气帘气(curtain gas)流速为 30 L/min, 喷雾电压(ionspray voltage)为 5 500 V, 离子源温度为 550 $^{\circ}$ C。目标化合物的保留时间、母离子、子离子、去簇电压(declustering potential, DP)、碰撞能量(collision energy, CE)等质谱信息见表 2。使用 UHPLC-MS/MS 配套的 Analyst 软件进行数据采集, MultiQuant 软件进行数据分析。

1.4.2 方法 2

色谱柱: Thermo AcclaimTM C30(150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.0 μ m, 美国 Thermo 公司); 流动相 A: 含 5 mmol/L 甲酸铵的 0.13% 甲酸水溶液(pH=3), 流动相 B: 含 0.1% 甲酸的甲醇-乙腈(4:6, 体积比)溶液; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 1%B; 1.0~16.0 min, 1%B~4%B; 16.0~16.1 min, 4%B~95%B; 16.1~19.5 min, 95%B; 19.5~19.6 min, 95%B~1%B。流速为 0.4 mL/min; 进样量为 5 μ L; 柱温为 40 $^{\circ}$ C。

质谱条件同 1.4.1 节。

2 结果与讨论

2.1 方法优化

2.1.1 色谱条件的优化

35 种目标 PAs 中有 10 组同分异构体物质, 其中分子式为 $C_{15}H_{25}NO_5$ (Im、Rn、Id、La、En)、 $C_{15}H_{25}NO_6$ (RnN、EnN、ImN、IdN、LaN) 和 $C_{18}H_{25}NO_6$ (SvN、IrN、ScN、Us、Re) 各有 5 种同分异构体, 分子式为 $C_{18}H_{25}NO_5$ (Ir、Sv、Sc) 有 3 种同分异构体, 分子式为 $C_{16}H_{27}NO_6$ (Eu、HnN)、 $C_{18}H_{23}NO_5$ (Sp、St)、 $C_{18}H_{23}NO_6$ (SpN、StN)、 $C_{18}H_{25}NO_7$ (ReN、UsN)、 $C_{20}H_{31}NO_7$ (Hs、Em) 和 $C_{20}H_{31}NO_8$ (EmN、HsN) 各有 2 种同分异构体。同分异构体质谱碎片一致, 无法在质谱的 MRM 模式下进行分离, 因此需要优化色谱条件将同分异构体完全分离后才能进行准确定性和定量。色谱柱是色谱分离的重要影响因素, 本研究分别考察了色谱柱 Waters Acquity BEH C18(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)、Waters CORTECSTM UPLC C18+ (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μ m)、Waters Acquity CSHTM C18(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)、Waters Acquity UPLC HSS T3(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m)、Waters Acquity HSS PFP(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m)、Thermo Hypersil gold C18(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μ m)、Agilent XDB C18(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) 和 Agilent Poroshell EC-C18(150 mm $\times$ 2.1 mm, 2.7 μ m), 分别标记为柱 1~8, 对应的 35 种 PAs 的分离情况如图 2 所示。可以看出, 柱 1~6 均对目标物具有较好的保留(图 2a~2f), 而柱 7 和柱 8 无分离优势(图 2g 和 2h)。进而通过对多组同分异构体的提取离子流色谱图分析发现, Waters Acquity BEH C18 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)对分子式为 $C_{18}H_{25}NO_5$ 的 3 个同分异构体和分子式为 $C_{18}H_{25}NO_7$ 的 2 个同分异构体有显著的分离优势, 因此选择柱 1 作为本研究的色谱柱。但分子式为 $C_{15}H_{25}NO_5$ 的 5 个同分异构体在已有 8 根色谱柱上均不能实现完全的色谱分离。针对该组同分异构体, 本研究发现具有更长碳链填料和更大粒径的 Thermo AcclaimTM 色谱柱 C30(150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.0 μ m)表现出明显的分离优势, 可以实现对 5 个化合物完全的基线分离。因此使用该色谱柱对 Im、Rn、Id、La 和 En 进行色谱分离。

为了提高色谱分离效果和目标化合物的检测灵敏度, 并获得良好的峰形, 实验对流动相体系进

表 2 35 种 PAs 的质谱参数
Table 2 MS parameters for the 35 PAs

No.	Compound	Retention time/min	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	DP/V	CEs/eV
Method 1						
1	Hn	15.85	314.2	138.1 [*] , 156.1	90	27, 33
2	RnN	9.64	316.2	111.1 [*] , 172.1	125	54, 35
3	EnN	9.90	316.2	111.1 [*] , 172.1	120	47, 36
4	ImN	10.50	316.2	138.1 [*] , 172.1	100	38, 38
5	IdN	10.50	316.2	172.1 [*] , 94.2	105	36, 61
6	LaN	10.99	316.2	138.1 [*] , 172.1	115	40, 38
7	Eu	8.14	330.0	138.1 [*] , 254.1	100	29, 24
8	HnN	17.53	330.0	111.1 [*] , 172.1	140	48, 37
9	St	15.99	334.2	120.3 [*] , 138.3	110	36, 37
10	Sp	16.49	334.2	120.3 [*] , 306.1	140	36, 37
11	Ir	20.96	336.1	94.2 [*] , 120.3	135	44, 38
12	Sv	21.27	336.1	120.3 [*] , 138.1	140	39, 41
13	Sc	21.78	336.1	120.3 [*] , 138.1	100	38, 39
14	EuN	9.19	346.0	172.1 [*] , 328.3	110	38, 30
15	StN	17.46	350.2	118.2 [*] , 94.2	140	38, 72
16	SpN	18.11	350.2	120.3 [*] , 118.2	150	40, 39
17	Us	14.09	352.3	94.2 [*] , 120.3	130	36, 41
18	Re	14.56	352.3	120.3 [*] , 324.1	140	41, 36
19	SvN	21.90	352.3	118.2 [*] , 120.3	150	40, 43
20	IrN	22.15	352.3	120.3 [*] , 94.2	150	44, 66
21	ScN	22.76	352.3	118.2 [*] , 120.3	150	41, 41
22	Sk	25.07	366.2	150.1 [*] , 168.1	120	35, 46
23	ReN	14.93	368.2	118.2 [*] , 136.2	165	39, 45
24	UsN	15.12	368.2	120.3 [*] , 94.2	170	40, 73
25	Hs	25.00	398.2	120.3 [*] , 220.2	100	35, 25
26	Em	25.24	398.2	120.3 [*] , 220.2	100	33, 23
27	Lc	28.94	412.3	120.3 [*] , 336.3	115	34, 23
28	EmN	24.85	414.2	254.1 [*] , 352.2	120	39, 32
29	HsN	26.86	414.2	94.2 [*] , 254.1	140	70, 39
30	LcN	30.60	428.2	136.2 [*] , 254.1	130	42, 37
Method 2						
31	Im	9.73	300.2	138.1 [*] , 156.1	67	26, 36
32	Rn	10.54	300.2	138.1 [*] , 156.1	105	29, 37
33	Id	11.02	300.2	138.1 [*] , 94.2	110	33, 33
34	La	11.44	300.2	156.1 [*] , 138.1	70	37, 27
35	En	12.13	300.2	138.1 [*] , 156.1	90	29, 35

DP: declustering potential; CE: collision energy; * quantitative ion.

行了优化。分别考察了甲醇、乙腈和不同比例的甲醇-乙腈作为流动相有机相时的色谱分离效果。结果表明,甲醇-水作为流动相时,PAs 出峰时间较晚且对 C₁₈H₂₅NO₇(ReN、UsN)同分异构体分离效果不理想,出现多个肩峰和无法达到完全基线分离的情况。而在乙腈-水流动相体系下,30 min 内可以实现所有 PAs 的有效分离,但 C₁₈H₂₅NO₆(SvN、IrN、

ScN、Us、Re)同分异构体的分离度较差,噪声大,灵敏度低。因此实验对比了不同比例甲醇-乙腈对色谱分离的影响。结果显示,有机相为甲醇-乙腈(4:6,体积比)时,目标化合物色谱分离效果最好。此外,为改善色谱峰形,在流动相的水相中添加 5 mmol/L 甲酸铵缓冲盐,色谱峰形在一定程度上得到改善,拖尾减少。在水相和有机相中均添加甲酸

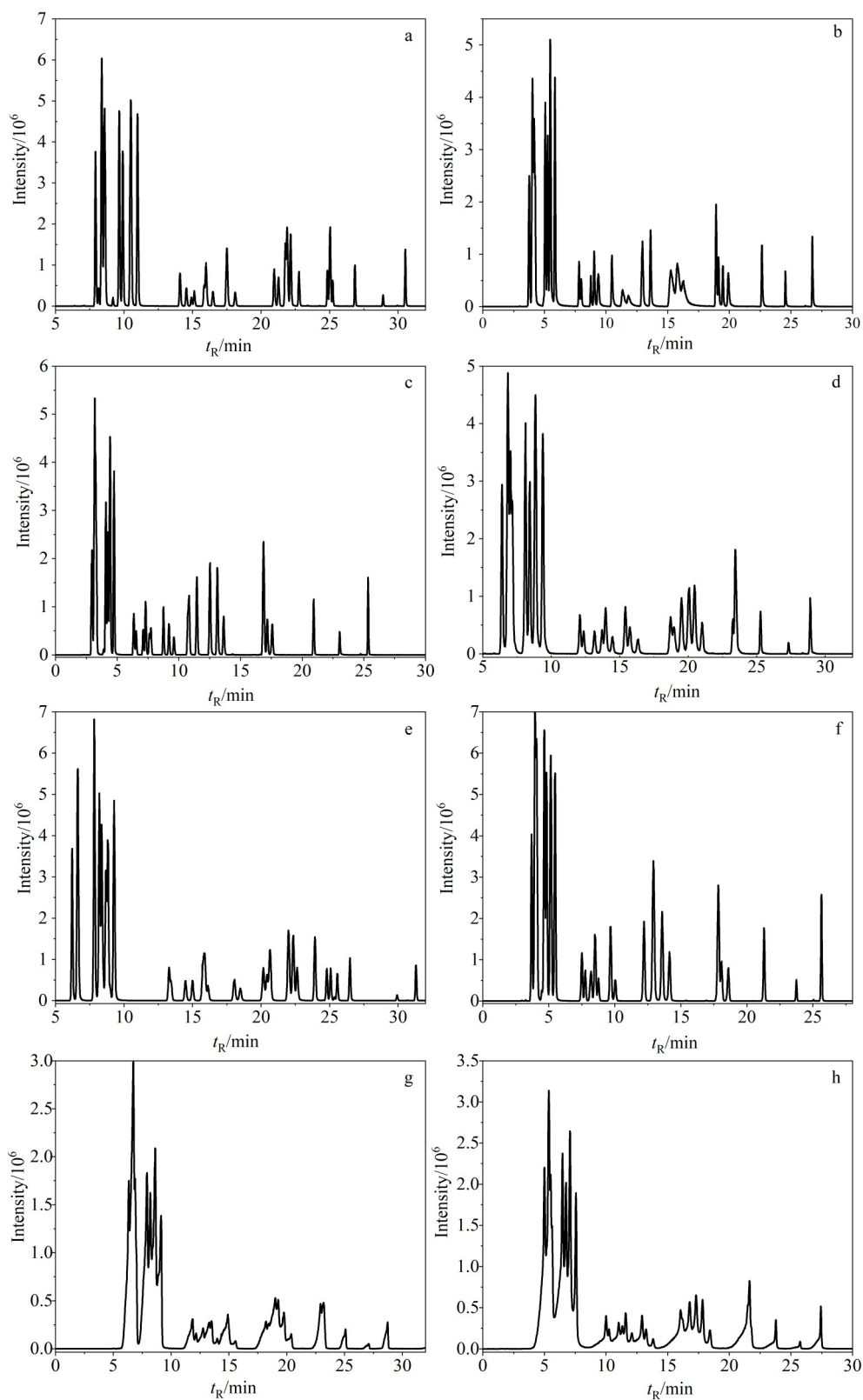


图 2 采用不同色谱柱时 35 种 PAs 的总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatograms of the 35 PAs with different chromatographic columns

a. column 1: Waters Acquity BEH C18 (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm); b. column 2: Waters CORTECSTM UPLC C18+ (150 mm×2.1 mm, 1.6 μm); c. column 3: Waters Acquity CSHTM C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); d. column 4: Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); e. column 5: Waters Acquity HSS PFP (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); f. column 6: Thermo Hypersil gold C18 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm); g. column 7: Agilent XDB C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); h. column 8: Agilent Poroshell EC-C18 (150 mm×2.1 mm, 2.7 μm).

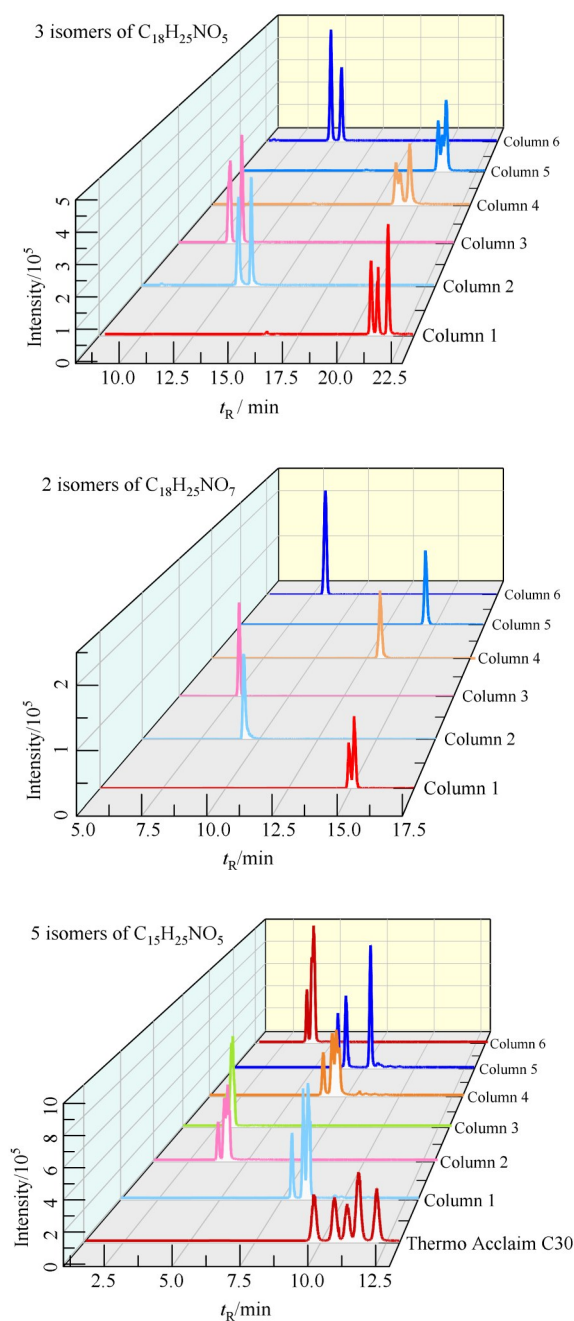


图 3 采用不同色谱柱时 3 组同分异构体的提取离子流色谱图
Fig. 3 Extracted ion chromatograms of the three groups of isomers with different chromatographic columns

后,目标化合物离子化效率和相应强度提高。综合考虑,选择流动相 A 为含 5 mmol/L 甲酸铵的 0.13% 甲酸水溶液(pH=3),流动相 B 为含 0.1% 甲酸的甲醇-乙腈(4:6,体积比)的流动相体系。在该流动相体系下 35 种 PAs 具有较好的响应和峰形,且通过优化梯度洗脱程序,能通过两种方法实现欧盟法规限量中 35 种 PAs 最大程度的基线分离。

2.1.2 质谱条件的优化

采用单标单针进样的方式,将 35 种 20 ng/mL 的 PAs 标准储备液分别直接注入质谱仪中用于质谱条件的优化。在 ESI 源正离子模式下进行扫描(m/z 100~500)选择母离子,确定 35 种目标物的母离子峰均为 $[M+H]^+$ 。在确定母离子的基础上进行子离子扫描,获得各化合物的碎片离子,通过比较响应值选择 2 个子离子碎片,以响应值高的通道作为定量离子通道,响应值略低的作为定性离子通道。利用母离子的信号强度优化 DP,子离子的信号强度优化 CE。在最佳质谱条件的基础上建立了 MRM 扫描模式进行信息采集。目标 PAs 的保留时间和质谱参数信息如表 2 所示。

在最优的色谱和质谱条件下得到 35 种 PAs 的提取离子流色谱图见图 4。

2.2 基质效应

与溶剂相比,茶叶基质复杂,含有多种干扰 PAs 测定的其他物质,这种干扰称为基质效应(ME)。采用基质匹配标准曲线与溶剂标准曲线斜率的比值计算基质效应。ME 值大于 100% 表明存在基质增强效应;ME 值小于 100% 表明存在基质抑制效应;ME 值为 80%~120% 时,表明基质效应影响较小。本研究以茶叶样本为例,35 种 PAs 的 ME 范围为 16.32%~62.82%(如表 3 所示)。表明所有化合物均存在较强的基质抑制效应,因此采用基质匹配标准曲线对目标化合物进行定量分析。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围、检出限和定量限

以基质匹配标准溶液中各 PAs 的质量浓度为横坐标 x (ng/mL),以定量离子的峰面积为纵坐标 y ,绘制基质匹配标准曲线。如表 3 所示,35 种 PAs 在各自范围内线性关系良好,根据干茶空白样品的 3 倍信噪比确定方法的检出限(LOD)、10 倍信噪比确定方法的定量限(LOQ),LOD 和 LOQ 分别为 0.2~8.0 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.5~25.0 $\mu\text{g/kg}$ (见表 3)。

2.3.2 回收率与精密度

以空白茶叶为基质分别进行 1、2 和 5 倍定量限水平的加标试验,进行准确度与精密度验证,每个加标水平重复 3 次。结果如表 4 所示,分别有 91%、89% 和 89% 的化合物平均回收率为 70%~130%,且平行实验 RSD 小于 20%(Em 和 Lc 的 RSD 小于 30%)。表明所建立的分析方法结果可靠,符合《食品安全国家标准 化学分析方法验证通

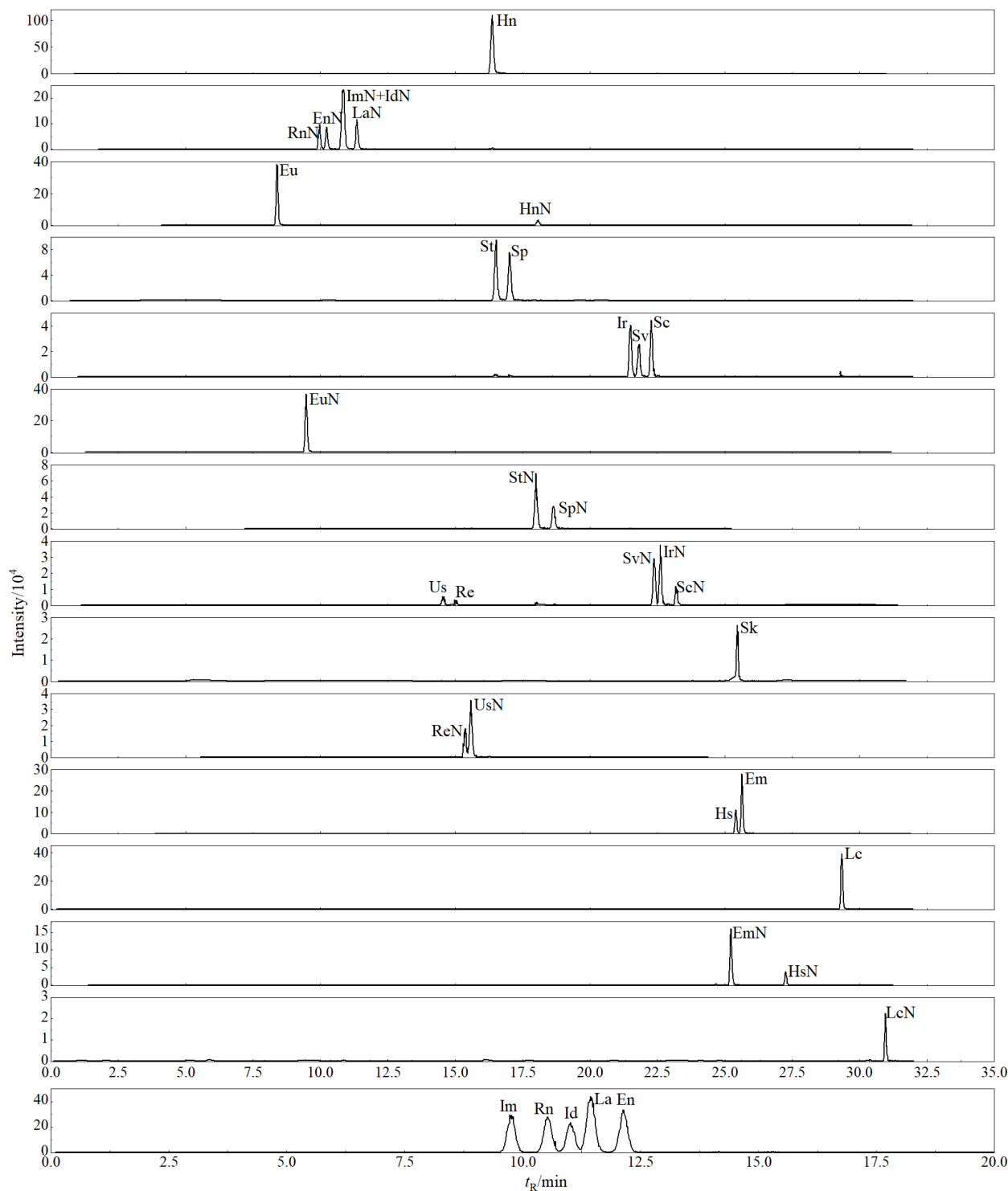


图4 35种PAs的提取离子流色谱图

Fig. 4 Extracted ion chromatograms of the 35 PAs

则》(GB 5009.295-2023),可用于实际样品中 35 种 PAs 的定量分析。

2.4 干茶样本中 35 种 PAs 的水平

应用本研究开发的分析方法分析了 2023 年在我国云南省和福建省当地茶园采摘的 51 份干茶样

本,其中包括 21 份黑茶样本和 30 份红茶样本。在黑茶样本中有 4 份检出 En,无其他 PAs 检出,样本检出率为 19.05%,红茶样本中无 PAs 检出。黑茶样本中 PAs 的检出率高于红茶样本,与先前我国茶叶中 PAs 存在水平的研究结果一致^[30]。这可能是由

表 3 35 种 PAs 的线性范围、回归方程、相关系数(r^2)、检出限、定量限和基质效应
Table 3 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients (r^2), limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs) and matrix effects (MEs) of the 35 PAs

No.	Compound	Linear range/(ng/mL)	Linear equation	r^2	LOD/($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/($\mu\text{g/kg}$)	ME/%
1	Im	1.0–50	$y=64396.8x-4097.0$	0.99957	1.5	5.0	58.78
2	Rn	1.0–50	$y=54473.0x+4620.6$	0.99975	1.5	5.0	60.23
3	Id	1.0–50	$y=93011.4x+11787.3$	0.99997	1.5	5.0	59.29
4	La	1.0–50	$y=141403.0x+16000.25$	0.99989	1.5	5.0	62.63
5	En	1.0–50	$y=102298.0x+14059.8$	0.99943	1.5	5.0	62.82
6	Hn	0.5–50	$y=113915.0x+771.1$	0.99959	0.8	2.5	30.17
7	RnN	0.5–50	$y=17860.4x+5398.1$	0.99882	0.8	2.5	48.99
8	EnN	0.5–50	$y=11125.4x+5638.8$	0.99973	0.8	2.5	44.58
9	ImN+IdN	0.5–50	$y=31401.2x+514.4$	0.99861	0.8	2.5	41.50
10	LaN	1.0–50	$y=10096.9x+1671.2$	0.99833	1.5	5.0	38.91
11	Eu	1.0–50	$y=33206.8x+104.9$	0.99894	1.5	5.0	38.84
12	HnN	0.5–50	$y=8551.7x-3097.7$	0.99919	0.8	2.5	33.77
13	St	2.0–50	$y=20318.3x-1751.8$	0.99977	3.0	10.0	30.26
14	Sp	5.0–50	$y=8454.2x-640.7$	0.99780	4.0	15.0	28.95
15	Ir	5.0–50	$y=2569.1x-1780.5$	0.99862	8.0	25.0	24.19
16	Sv	5.0–50	$y=4156.5x-2436.8$	0.99777	8.0	25.0	22.57
17	Sc	5.0–50	$y=9133.6x-977.0$	0.99996	8.0	25.0	23.30
18	EuN	0.5–50	$y=49642.3x+2209.9$	0.99969	0.8	2.5	47.76
19	StN	5.0–50	$y=9330.5x+4833.7$	0.99989	8.0	25.0	34.17
20	SpN	5.0–50	$y=5981.4x-4522.1$	0.99945	8.0	25.0	34.47
21	Us	5.0–50	$y=2956.7x-738.5$	0.99915	8.0	25.0	35.14
22	Re	5.0–50	$y=3240.6x+385.7$	0.99524	8.0	25.0	30.51
23	SvN	5.0–50	$y=6866.6x+290.6$	0.99942	4.0	15.0	23.82
24	IrN	5.0–50	$y=8510.5x-2032.7$	0.99867	8.0	25.0	26.62
25	ScN	5.0–50	$y=2823.5x-2151.6$	0.99836	8.0	25.0	22.41
26	Sk	2.0–50	$y=5586.3x+490.3$	0.99630	3.0	10.0	16.32
27	ReN	5.0–50	$y=3956.3x+201.1$	0.99876	8.0	25.0	40.54
28	UsN	5.0–50	$y=4269.1x-1747.5$	0.99976	8.0	25.0	35.10
29	Hs	0.5–50	$y=46828.3x+1671.4$	0.99832	0.8	2.5	19.46
30	Em	0.2–50	$y=78071.9x+2183.4$	0.99867	0.3	1.0	21.84
31	Lc	0.1–50	$y=194483.0x+4496.9$	0.99933	0.2	0.5	28.93
32	EmN	0.5–50	$y=45288.1x+1928.7$	0.99984	0.8	2.5	21.80
33	HsN	1.0–50	$y=11093.7x+257.6$	0.99904	1.5	5.0	30.05
34	LcN	1.0–50	$y=9142.0x-0.5$	0.99976	1.5	5.0	33.96

y : peak area; x : mass concentration, ng/mL. The unit $\mu\text{g/kg}$ is converted according to sample pretreatment process.

于大多数黑茶由机器采摘的鲜叶加工而成,采茶过程中难以避免地混入了含有 PAs 的杂草。所检出的 4 份黑茶中 En 最高含量为 15.48 $\mu\text{g/kg}$,其次为 8.67、8.01 和 5.07 $\mu\text{g/kg}$ 。所有样本中 PAs 含量均未超过欧盟限值标准对干茶样本中 35 种 PAs 总含量的最大限量(150 $\mu\text{g/kg}$)。

表 4 干茶基质中 35 种 PAs 的加标回收率和相对标准偏差
Table 4 Spiked recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the 35 PAs in dried tea samples

Compound	1 fold-LOQ		2 fold-LOQ		5 fold-LOQ	
	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Im	77.29	8.40	74.00	7.81	70.77	1.65
Rn	73.23	2.83	75.02	3.92	71.02	2.36

表 4 (续)
Table 4 (Continued)

Compound	1 fold-LOQ		2 fold-LOQ		5 fold-LOQ	
	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Id	72.51	5.54	71.32	2.49	71.89	3.02
La	75.46	6.20	75.02	10.46	71.50	1.93
En	76.56	0.80	75.43	7.01	74.47	4.25
Hn	52.56	6.47	55.50	11.20	64.36	3.23
RnN	89.72	2.12	86.54	1.21	87.82	2.28
EnN	86.17	7.96	85.35	7.23	84.84	0.11
ImN+IdN	90.12	2.50	90.33	4.90	88.46	0.87
LaN	86.33	2.41	83.22	8.93	83.48	1.28
Eu	68.52	8.01	66.92	9.46	68.47	3.56
HnN	78.40	3.57	78.92	11.88	79.20	1.91
St	68.88	7.33	60.10	14.92	59.84	7.45
Sp	104.83	9.73	74.43	15.79	70.78	0.67
Ir	80.66	19.14	70.75	5.86	75.83	6.86
Sv	79.40	11.35	73.07	17.40	70.84	1.77
Sc	70.03	7.16	60.82	7.76	65.36	2.85
EuN	90.46	4.06	93.64	3.38	94.13	8.77
StN	76.01	17.92	78.13	16.45	78.81	4.46
SpN	78.81	19.81	76.06	12.69	81.29	5.01
Us	71.69	8.81	70.29	7.97	70.49	6.87
Re	75.85	17.86	78.37	1.75	71.51	4.47
SvN	85.33	10.10	83.44	5.51	82.32	0.48
IrN	90.31	9.42	84.74	5.89	85.63	9.30
ScN	85.41	8.42	104.88	13.53	91.32	4.85
Sk	119.47	8.82	111.97	8.43	109.40	1.55
ReN	94.96	12.04	96.95	6.23	101.59	7.41
UsN	96.71	8.71	107.00	4.05	87.87	7.73
Hs	80.79	8.30	76.59	7.85	83.69	6.06
Em	82.45	22.02	75.10	20.89	73.43	3.33
Lc	96.43	27.55	90.90	10.30	100.33	5.50
EmN	111.99	6.55	98.32	16.82	98.21	2.58
HsN	70.38	12.56	82.18	7.95	90.26	1.14
LcN	76.63	4.47	84.55	5.65	85.45	3.76

3 结论

本研究基于 UHPLC-MS/MS 建立了干茶样本中 35 种 PAs 的定量分析方法。33 种 PAs 实现色谱分离和单独定量,可以更加准确地确定 PAs 的单独含量而不只是加和定量。应用该方法分析了云南省和福建省的 21 份黑茶和 30 份红茶样本中 PAs 存在水平,有 4 份样本检出。本研究的 PAs 定量分析方法可为茶叶中 PAs 的组成、含量及风险评估提供技术支撑。

参考文献:

- [1] Beuerle T, Benford D, Brimer L, et al. EFSA J, 2011, 9 (11): 2406
- [2] Lu Y S, Qiu J, Mu X Y, et al. Foods, 2024, 13(4): 536
- [3] Casado N, Morante Z, Sierra I. Trends Food Sci Technol, 2022, 120: 123
- [4] Moreira R, Pereira D M, Valentao P, et al. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1668
- [5] Ruan J, Yang M, Fu P, et al. Chem Res Toxicol, 2014, 27 (6): 1030
- [6] Wang Z, Han H, Wang C, et al. Toxins, 2021, 13(12): 849
- [7] Xia Q, Zhao Y, Von T, et al. Chem Res Toxicol, 2013, 26 (9): 1384

- [8] Fu P P, Xia Q S, Lin G, et al. *Drug Metab Rev*, 2004, 36 (1): 1
- [9] Xia Q, Ma L, He X, et al. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28 (4): 615
- [10] European Union. Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on Maximum Levels for Certain Contaminants in Food and Repealing Regulation (EC) No 1881/2006. [2025-03-18]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02023R0915-20250101>
- [11] Jiao W, Zhu L, Shen T, et al. *Food Chem*, 2024, 434: 137305
- [12] Jiao W, Zhu L, Li Q X, et al. *J Agric Food Chem*, 2023, 71 (48): 19045
- [13] Chen Y K. *Food Science*, 2024, 45(24): 266
陈言凯. *食品科学*, 2024, 45(24): 266
- [14] Rizzo S, Celano R, Piccinelli A L, et al. *Food Chem*, 2023, 423: 136306
- [15] Zhang X N, Ma L Y. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(8): 314
张新娜, 马丽艳. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(8): 314
- [16] Yao L J, Chen Y Q, Lin H, et al. *Journal of Tea Science*, 2024, 44(5): 831
姚蕾珺, 陈燕秋, 林浩, 等. *茶叶科学*, 2024, 44(5): 831
- [17] Huang Q. [MS Dissertation]. Anhui: Anhui Agricultural University, 2022
黄琼. [硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2022
- [18] Wan J Y, Feng C, Chen Y H, et al. *Journal of Instrumental Analysis*, 2023, 42(10): 1351
万静宜, 冯超, 陈宇航, 等. *分析测试学报*, 2023, 42(10): 1351
- [19] Jansons M, Fedorenko D, Pavlenko R, et al. *J Chromatogr A*, 2022, 1676: 463269
- [20] Peloso M, Sonfack G M, Paduano S, et al. *Molecules*, 2023, 28(14): 5346
- [21] Bodi D, Ronczka S, Gottschalk C, et al. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2014, 31 (11): 1886
- [22] Chung M, Zhao N, Wang D, et al. *Adv Nutr*, 2020, 11 (4): 790
- [23] Mathon C, Edler P, Bieri S, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(28): 7345
- [24] Knutsen H K, Alexander J, Barreg R L, et al. *EFSA J*, 2017, 15(7): 4908
- [25] Jiao Y N, Peng M X, Liang X, et al. *China Tea*, 2024, 46 (3): 12
焦艳娜, 彭梦香, 梁香, 等. *中国茶叶*, 2024, 46(3): 12
- [26] Han H L, Jiang C L, Wang C, et al. *Food Science*, 2021, 42(17): 255
韩浩蕾, 姜长岭, 王晨, 等. *食品科学*, 2021, 42(17): 255
- [27] Zhu L. [MS Dissertation]. Anhui: Anhui Agricultural University, 2021
朱雷. [硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2021
- [28] Xu X L, Xu B Z, Wang H, et al. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2021, 33(6): 783
许秀丽, 许博舟, 王茜, 等. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33 (6): 783
- [29] He Y, Zhu L, Ma J, et al. *Environ Pollut*, 2020, 267: 115542
- [30] Han H, Jiang C, Wang C, et al. *Food Control*, 2022, 132: 108518