

应用 UHPLC/MS/MS 高通量检测食品中多类有毒生物碱

作者

Guoyin Lai, Lijian Wu,
Zhongda Lin, Liyi Lin,
Dunming Xu, Zhigang Zhang
厦门海关技术中心, 中国厦门

Meiling Lu
安捷伦科技(中国)有限公司

摘要

本应用简报介绍了一种简便的样品前处理方法, 结合 Agilent 1290 Infinity II LC 和 Agilent 6470A 三重四极杆液质联用系统对食品基质中的多类生物碱进行高通量测定。采用基质匹配校准标样进行校正, 发现在稀释的面包、牛奶、葡萄酒和米粉提取基质中, 18 种生物碱在 0.50–50.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内具有非常好的线性。考虑到 10 倍的稀释倍数, 这相当于基质中 5.0–500 $\mu\text{g/kg}$ 。所有分析物的线性回归系数均大于 0.995。在 0.5 $\mu\text{g/L}$ 的最低校准浓度下 (相当于样品中 5.0 $\mu\text{g/kg}$), 所有分析物的信噪比 (S/N) 均大于 10。在浓度为 5、50 和 250 $\mu\text{g/kg}$ 的四种不同基质中, 分析物回收率范围为 90%–110%, 相应的相对标准偏差在 2.3%–7.9% 之间。结果表明, 该方法具有很高的灵敏度、准确度和精密度。这种简单的样品前处理与快速 LC/MS/MS 检测相结合的方法可以用于食品基质中多类生物碱残留的高通量筛查。

前言

生物碱是一类具有含氮杂环结构的天然碱性物质。它们通常表现出很高的生物活性，是中药的主要成分。生物碱存在于一些植物中，意外摄入可能会造成有害影响^[1]。根据欧盟法规 2016/239 (EU)，某些婴幼儿谷类食品中的莨菪烷生物碱（包括阿托品和东莨菪碱）的最大残留限量 (MRL) 低至 1 µg/kg^[2]。在欧盟 No. 37/2010 (EU) 法规中，把秋水仙碱列入了禁止清单^[3]。中国允许在所有动物源性食品基质中使用阿托品，并且未规定 MRL，国内也没有其它法规对食品基质中生物碱的含量进行限制^[4]。然而，含生物碱的杂草意外混入农作物或家畜意外摄入含生物碱的杂草可能增加公众的暴露风险。因此，建立灵敏可靠的方法对食品基质中的生物碱进行常规监测至关重要。事实上，生物碱的物理化学性质差异很大，并且还涉及许多复杂的基质。开发一种可靠的方法来同时监测多种生物碱面临着较大的挑战。现有的报道主要集中在具有相似化学性质的生物碱的同时检测^[5,6]。本应用简报提供了一种简单的样品前处理方法，结合快速 LC/MS/MS 方法，实现对牛奶、葡萄酒、面包和米粉等 4 种食品基质中的 5 类共 18 种生物碱的同时高通量测定。

实验部分

标样制备和样品前处理步骤

所有 5 类共 18 种生物碱化合物均购自安谱科技公司（中国上海），用甲醇配制为 1.0 g/L 的储备液，于 -20 °C 下保存。然后用相应的基质提取物稀释储备液，得到校准标样溶液。

将固体样品 (2.0 g) 加入 50 mL 离心管中，然后加入 5 mL 水进行水化。再加入 10 mL 乙腈，接着加入 5 mL Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液 (pH 3)。将离心管充分涡旋混合 2 分钟，然后在 7500 rpm 的转速

下离心 5 分钟。收集上清液，经 0.22 µm 膜过滤后，用 LC/MS 进行分析。液体样品（如牛奶和葡萄酒）遵循相同的萃取程序，只是省去初始水化步骤。

液相色谱系统

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪，配备如下模块：

- Agilent 1290 Infinity II 二元泵，内置脱气机
- Agilent 1290 Infinity II 自动进样器，带针座反冲功能
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱

液相色谱条件

参数	值																		
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (3.0 × 50 mm, 1.8 µm)																		
流动相	A: 0.1% 甲酸水溶液; B: 甲醇																		
流速	0.50 mL/min																		
柱温	40 °C																		
进样量	2.0 µL																		
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%A</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>1</td><td>80</td><td>20</td></tr><tr><td>7</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>9</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>10</td><td>90</td><td>10</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%A	%B	0	90	10	1	80	20	7	20	80	9	90	10	10	90	10
时间 (min)	%A	%B																	
0	90	10																	
1	80	20																	
7	20	80																	
9	90	10																	
10	90	10																	

质谱条件

参数	值
MS	Agilent 6470A 三重四极杆液质联用系统
离子源	安捷伦喷射流 ESI
电离模式	正离子
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	500 V
雾化气压力	N ₂ (35 psi)
干燥气 (N ₂) 温度	300 °C
干燥气流速	8 L/min
鞘气 (N ₂) 温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
采集模式	MRM

结果与讨论

生物碱在酸性条件下很容易被质子化。因此，实验选择 ESI 正离子电离下的 MRM 扫描模式。实验中考察了不同的流动相组合，包括水/甲醇、水/乙腈、0.1% 甲酸/甲醇和 0.1% 甲酸/乙腈。大多数生物碱在甲醇中比在乙腈中的响应更好。在酸化水中，色谱峰更窄、更对称且强度更高；而在非酸化水中，观察到峰拖尾且强度较低。因此，最终选择酸化的水/甲醇作为二元流动相。然后，在所选流动相条件下对 MRM 参数进行了优化。表 1 列出了得到的参数。

对于那些色谱上未能得到理想分离的化合物，通过其特征 MRM 离子对可实现对化合物的准确定量。图 1 显示了来自不同类别的 18 种生物碱的典型 MRM 叠加色谱图。

表 1. 用于高灵敏度检测的优化 MRM 参数

分析物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)
毒扁豆碱	2.250	275.8	219.2, 162.2*	110	7, 22*
东莨菪碱	1.898	303.8	137.9, 156.1*	120	23, 15*
秋水仙碱	4.771	399.9	358.1, 309.9*	135	22, 32*
土的宁	2.368	334.9	156.1, 184.1*	135	55, 44*
可的松	5.307	360.9	162.9, 121.2*	135	25, 36*
伪麻黄碱	1.719	166	148.1, 133.0*	80	10, 20*
喜树碱	5.262	348.8	305.0, 249.0*	135	25, 33*
安妥	3.912	202.8	185.8, 144.1*	135	20, 20*
阿托品	2.554	290	124.1, 93.0*	135	26, 35*
新乌头碱	4.906	632.1	571.8, 105.0*	135	35, 60*
次乌头碱	5.059	616.2	556.6, 105.3*	135	50, 50*
10,11-二甲氧基番木鳖碱	2.594	394.9	243.6, 323.9*	135	46, 46*
荷叶碱	4.122	295.8	265.1, 249.9*	135	15, 17*
鬼臼毒素	5.532	414.8	246.6, 397.1*	135	10, 5*
10-羟基喜树碱	4.773	364.8	320.5, 235.7*	135	30, 33*
乌头碱	5.119	646.2	586.6, 105.3*	135	45, 50*
钩吻碱	2.171	322.8	70.1, 235.8*	135	32, 37*
茄碱	4.965	868.5	98.3, 398.1*	135	92, 92*

* 定量离子

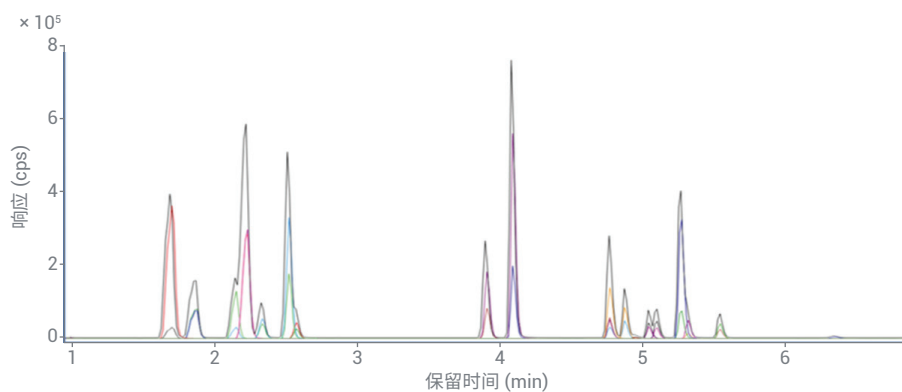


图 1. 不同类别的 18 种生物碱在浓度为 50 µg/L 时的叠加 MRM 色谱图

样品前处理优化和方法性能

实验考察了以甲醇和乙腈作为萃取溶剂时的效果。结果表明，乙腈可提供更高的回收率。此外，还考察了所需的萃取溶剂体积。如图 2 所示，随着萃取体积从 5 mL 增加到 10 mL，各种生物碱的回收率均有所提高，大部分化合物的绝对回收率大于 60%。当体积从 10 mL 增加到 15 mL 时，两种化合物的回收率下降，而其它化合物的回收率继续增加。考虑到萃取会导致实际样品被稀释而影响灵敏度，因而选择 10 mL 萃取溶剂进行目标化合物的萃取。

由于生物碱在酸性条件下易溶于水，并以阳离子形式存在。为达到酸性 pH 值，在萃取溶剂中加入 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液。如图 3 所示，大多数化合物在 pH 值为 3 和 4 时的绝对回收率要高于 pH 值为 5 时的回收率。因此，萃取时选择 pH 3 的缓冲液。

利用在基质和纯溶剂中得到的线性响应斜率的比值来评估基质效应。结果发现，基质，尤其是面包，对可的松和鬼臼毒素的影响较为严重（图 4）。

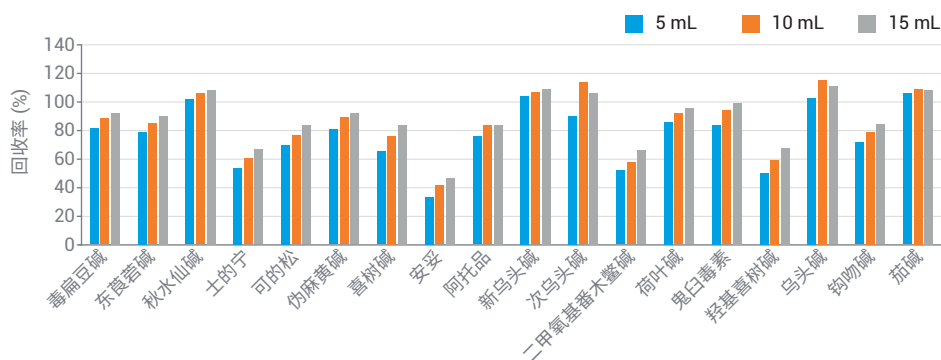


图 2. 萃取溶剂体积对回收率的影响

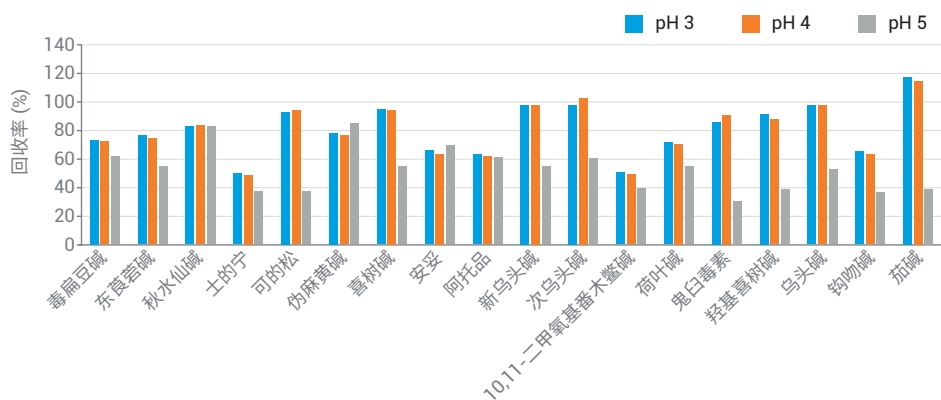


图 3. 萃取溶剂的 pH 对各个分析物回收率的影响

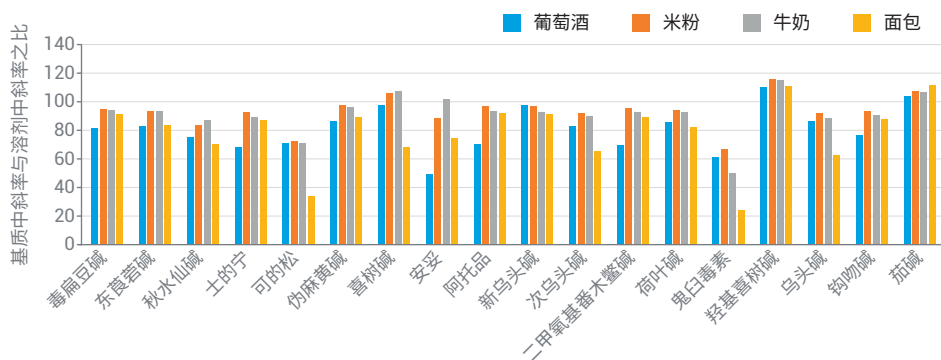


图 4. 生物碱检测的基质效应。注：采用相对斜率评估基质效应

因而，为降低基质效应带来的定量偏差，采用基质匹配校准曲线进行定量分析。结果表明，生物碱类化合物在 0.5–50 µg/L 范围内表现出出色的线性，线性回归相关系数 (R^2) 均高于 0.995。在 0.5 µg/L (考虑到方法的 10 倍稀释，相当于样品中 5.0 µg/kg) 的最低校准浓度下，18 种生物碱的信噪比均大于 10。因此，18 种生物碱的定量限 (LOQ) 统一为 5.0 µg/kg。

在 3 种添加浓度 (5、50 和 250 µg/kg) 下对 4 种基质的样品进行加标实验，每种基质一式六份，分析加标样品，评估分析方法的回收率和精密度。相应的进样溶液浓度分别为 0.5、5.0 和 25 µg/L。从表 2 可以看出，所有基质在各浓度下的回收率均在 82%–119% 之间，%RSD 在 2.3%–7.9% 之间，表明该方法的准确度和精密度均满足定量分析的要求。

表 2. 不同食品基质中 3 个加标水平下生物碱的平均回收率和相对标准偏差 (n = 6) 一览表

分析物	加标浓度 (µg/kg)	葡萄酒		牛奶		米粉		面包	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
毒扁豆碱	0.5	99	4.5	112	2.3	113	2.7	101	5.7
	5	112	3.7	116	4.3	101	3.5	112	6.2
	50	100	4.8	105	4.8	116	3.7	109	4.5
东莨菪碱	0.5	99	3.8	111	6.8	110	3.7	92	2.5
	5	117	3.1	119	4.4	90	2.8	114	3.6
	50	97	3.8	104	4	119	3.1	110	4
秋水仙碱	0.5	85	4.5	112	3.5	83	2.6	88	2.8
	5	110	4.8	117	3.4	107	3.3	112	3.8
	50	101	2.5	103	3	119	3.9	107	3.3
土的宁	0.5	86	3.2	90	4	103	2.5	111	4.3
	5	86	3.4	118	4.9	96	4.8	116	4.8
	50	103	4.2	107	2.4	116	4.6	107	3.3
可的松	0.5	92	3.4	117	4.5	103	3.5	106	4.8
	5	102	4.4	96	4	100	2.6	105	2.4
	50	94	6.3	99	3.8	119	2.4	110	4.8
伪麻黄碱	0.5	91	3.2	110	2.4	113	6.8	96	2.5
	5	101	2.4	118	2.9	95	2.5	112	4.9
	50	99	3.8	106	7.1	118	5.6	109	7.3
喜树碱	0.5	109	5.1	104	3	96	3.2	103	4.9
	5	112	5	118	2.8	111	7.6	109	3.8
	50	97	5	103	2.9	117	6.4	106	5.2
安妥	0.5	100	2.5	108	7.4	110	3.5	88	4.3
	5	115	4.3	112	2.6	114	5.6	112	4.9
	50	98	3.9	104	6	110	5.6	105	2.7
阿托品	0.5	82	2.8	111	2.6	110	7.3	92	4.9
	5	106	5.6	115	3.3	103	6.2	115	4.9
	50	102	3.4	107	4.5	101	7.1	109	3.4
新乌头碱	0.5	91	6.6	110	3	109	3	102	4.5
	5	106	3.5	112	4.4	98	4.3	101	2.7
	50	93	2.9	104	4.3	117	4.7	105	2.3
次乌头碱	0.5	88	3.8	112	2.7	107	3.6	95	2.8
	5	118	2.9	99	4.8	92	2.5	108	2.4
	50	102	2.7	100	4.2	112	7.1	103	4.7

分析物	加标浓度 (µg/kg)	葡萄酒		牛奶		米粉		面包	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
10,11-二甲氧基番木鳖碱	0.5	86	3.7	105	3.6	109	7	106	2.9
	5	105	5.1	101	4.2	103	5.2	116	3.5
	50	103	4.7	108	5.5	119	3.7	108	3.3
荷叶碱	0.5	91	2.4	117	3.6	112	2.9	97	4.7
	5	117	6.3	115	5.3	98	2.5	114	4.3
	50	96	5.6	104	4.4	117	3.5	109	3.2
鬼臼毒素	0.5	83	6.5	108	6.5	110	7.9	85	2.4
	5	106	3.3	109	2.4	99	4.4	111	3.1
	50	101	6.4	94	6.5	107	2.7	109	3.6
10-羟基喜树碱	0.5	86	4.4	93	2.8	83	6.6	106	3.5
	5	113	6.3	110	2.4	96	3.5	103	3.9
	50	90	2.7	102	5.7	114	2.7	105	3.1
乌头碱	0.5	89	5.1	105	5.3	107	6.3	90	3.4
	5	116	2.9	111	2.9	93	5.9	111	2.7
	50	100	3.6	103	2.6	119	4.6	105	3.5
钩吻碱	0.5	91	4.1	107	2.9	113	5.5	92	2.8
	5	115	2.4	119	4.3	107	6.7	115	2.8
	50	100	2.6	105	3.2	119	3.7	107	2.6
茄碱	0.5	97	3.2	101	4.2	89	6.1	115	2.7
	5	106	3	104	2.7	93	2.9	92	6.7
	50	89	2.8	102	3	104	2.3	106	5.5

结论

本应用简报提供了一种简单前处理结合UHPLC/MS/MS方法，能够同时测定葡萄酒、牛奶、面包和米粉中的18种生物碱。该方法具有出色的线性、较高的灵敏度、优异的准确度和精密度，并且操作简便、性能可靠，有望用于食品中这些生物碱的常规监测。

参考文献

- Meng, P. J. The Properties of Toxic Alkaloids and Analysis. *Chinese Journal of Chemical Bulletin* **2010**, 6, 484–489
- Commission Regulation (EU) 2016/239. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/0f2d0cd3-d764-11e5-8fea-01aa75ed71a1/language-en>
- Commission Regulation (EU) No 37/2010. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1561467502930&uri=CELEX:32010R0037>
- 中华人民共和国农业部，动物性食品中兽药使用公告汇总，2017年3月9日。 <https://max.book118.com/html/2018/0912/8121000107001123.shtm>
- Jain, V. et al. Analysis of Alkaloids in Areca Nut-Containing Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65(9), 1977–1983
- Lv, C. et al. Determination of Five Pyrrolidine Alkaloids in Honey by HPLC-MS/MS. *Chin. J. Chromatogr.* **2013**, 31(11), 1046–1050

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019年7月31日，中国出版
5994-1125ZHCN

