

俞灵, 宋立华. QuEChERS-UPLC-MS/MS 检测餐饮小龙虾中 5 种生物碱 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 324–331. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030219

YU Ling, SONG Lihua. Rapid Determination of Five Alkaloids in Catering Crayfish by QuEChERS-UPLC-MS/MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 324–331. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030219

· 分析检测 ·

QuEChERS-UPLC-MS/MS 检测餐饮 小龙虾中 5 种生物碱

俞 灵^{1,2}, 宋立华^{1,*}

(1.上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240;

2.上海市食品药品检验研究院, 上海 201203)

摘 要: 针对市售餐饮小龙虾, 利用 QuEChERS 方法进行前处理, 建立超高效液相色谱—串联质谱 (UPLC-MS/MS) 联用法检测小龙虾中吗啡、可待因、那可丁、罂粟碱、蒂巴因 5 种生物碱的分析方法。样品经粉碎搅匀制备后用 0.1 mol/L 盐酸溶液涡旋分散并超声处理 30 min, 然后利用乙腈及 QuEChERS 粉末 (6 g 无水硫酸镁与 1.5 g 无水醋酸钠) 提取, 离心后吸取上清溶液进样分析。色谱分离条件为: 固定相采用 ACQUITY UPLCTM BEH HILIC 色谱柱 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm), 流动相采用分别含 0.1% 甲酸的乙腈和 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 甲酸铵溶液进行梯度洗脱, 经电喷雾正离子 (ESI⁺) 模式电离及多反应监测 (MRM) 分析和定量测定目标化合物, 并选用 9 种市售小龙虾作为试样进行检验。结果表明, 内标法定量分析吗啡、可待因的线性浓度范围为 5~250 ng/mL, 外标法定量分析罂粟碱、那可丁、蒂巴因的线性浓度范围为 1~50 ng/mL, 在线性范围内峰面积与进样浓度 (ng/mL) 间的相关系数均大于 0.995。5 种生物碱的检出限为 0.6~3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 2.0~12.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均加标回收率 (n=6) 为 80%~110% 之间, 相对标准偏差小于 10%, 9 种市售样品未检出罂粟碱等 5 种组分。该方法操作快速简单、灵敏度高, 适用于小龙虾中 5 种生物碱的定性与定量分析。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS), QuEChERS, 生物碱, 小龙虾

中图分类号: TS207

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)02-0324-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030219



本文网刊:

Rapid Determination of Five Alkaloids in Catering Crayfish by QuEChERS-UPLC-MS/MS

YU Ling^{1,2}, SONG Lihua^{1,*}

(1.School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2.Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: In this study, a method for the determination of morphine, codeine, nacodine, papaverine and tibain residues in catering crayfish by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established. After preparation of crush and mixture, the samples were stirred and dispersed with 0.1 mol/L hydrochloric acid solution and ultrasonic treated for 30 min, then extracted with acetonitrile and QuEChERS powder (6 g anhydrous magnesium sulfate and 1.5 g anhydrous sodium acetate). After centrifugation, the supernatant was pipetted for analysis. The chromatographic separation conditions were as follows: Stationary phase was used ACQUITY UPLCTM BEH HILIC chromatographic column (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm). The mobile phase of gradient elution was composed of acetonitrile and 10 mmol/L ammonium formate containing 0.1% formic acid, respectively. The target compounds were analyzed and quantified via electrospray ionization (ESI⁺) mode ionization and multiple reaction monitoring (MRM), and 9 kinds of commercial crayfish were selected as samples for inspection. The results showed that the linear range of internal standard

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: 上海市科技兴农项目 (2019-02-08-00-08-F01154)。

作者简介: 俞灵 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: fishyu1014@foxmail.com。

* 通信作者: 宋立华 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工与营养, E-mail: lihuas@sjtu.edu.cn。

method for quantitative analysis of morphine and codeine was 5~250 ng/mL, and that of external standard method for quantitative analysis of papaverine, nacodine and tibain was 1~50 ng/mL. Within the linear range, the correlation coefficient between peak area and injection concentration (ng/mL) was greater than 0.995. The detection limits and the limits of quantitation of five alkaloids were 0.6~3.7 µg/kg and 2.0~12.4 µg/kg, respectively. The averaged recoveries (n=6) were 80%~110% and the relative standard deviations (RSDs) were below 10%, and the papaverine and other 5 components were detected in 9 commercial samples. The method was suitable for the qualitative and quantitative analysis of five alkaloids, and was fast, simple, and sensitive.

Key words: ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); QuEChERS; alkaloid; crayfish

罂粟壳为罂粟科植物罂粟(*Papaver somniferum*) 采完阿片后干燥成熟的果壳, 含有 20 多种生物碱, 其中以吗啡、那可丁、罂粟碱、可待因及蒂巴因等为主要生物碱成分^[1]。食用添加罂粟壳的食品会使人产生某种程度的惬意和欣快感。一些不法商家和饭店为谋取暴利, 在火锅、麻辣烫、牛肉粉及烤禽类等汤料和辅料中添加罂粟壳、罂粟籽及其水浸物等违禁原料, 使食物味道鲜美, 以吸引更多的食客。消费者长期食用含有罂粟壳等类似物质的食物不但容易成瘾, 还会对人体神经系统造成损害, 并可能造成慢性中毒^[2]。鉴于其危害, 中国卫生部于 2008 年将罂粟壳列于《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)》^[3]中, 国家多次明令禁止在食品中违法添加, 有关部门也要求严厉查处, 严格监管。因此, 针对不同种类的食品, 建立准确检测罂粟壳或其类似物中主要生物碱的分析方法, 可为保证食品安全提供技术支持。

目前, 关于生物碱的测定主要有分光光度法^[4]、薄层色谱法^[5]、气相色谱法^[6-7]、高效液相色谱法^[8-9], 但这些方法灵敏度较低, 检测限高。生物碱分析常用的样品前处理方法主要有氯仿萃取法^[10]、甲醇超声法^[11]和固相萃取法等^[12-14], 但是方法复杂繁琐。近几年有研究采用 QuEChERS 方法进行前处理^[15], 利用气相色谱-质谱^[16-17]或液相色谱-质谱联用法进行分析^[18-22], 但多是围绕经常食用的火锅底料或食品汤料中生物碱的检测^[23-27]。小龙虾作为日常餐饮中较受大众欢迎的食品, 其季节性较强, 小龙虾富含蛋白质, 且餐饮小龙虾一般都含有较多油脂和辛香料, 食品基质复杂, 因此目前针对餐饮小龙虾中罂粟碱等生物碱的检测尚未引起关注, 关于这类样品中生物碱的含量检测报道不多。食品基质、色谱分析条件及前处理方法等均会影响方法的检出限及灵敏度。因此, 本研究旨在建立可用于测定餐饮小龙虾中吗啡、可待因、罂粟碱、蒂巴因、那可丁 5 种生物碱含量的 QuEChERS-UPLC-MS/MS 分析方法, 为富含蛋白质及油脂类等基质样品中上述 5 种生物碱的检测提供可参考的技术数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小龙虾熟制品 购于川沙夜市摊, 分别来自三

个摊位, 每个摊位三种口味(蒜蓉、麻辣、十三香), 每种口味各 500 g; 吗啡(纯度 99.1%)、可待因(纯度 99.6%)、罂粟碱(纯度 100%)、蒂巴因(纯度 100%)、那可丁(纯度 100%) 标准品, 中国生物制品检定研究院; 吗啡-D3(浓度 1 mg/mL)、可待因-D3(浓度 1 mg/mL) 美国 Cerilliant 公司; 甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯, 美国 Merck 公司; 甲酸铵(色谱纯) 美国 Sigma-Aldrich 公司; 氯仿、石油醚(60~90 °C)、氨水、甲醇、盐酸、氢氧化钠 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; MCX 柱 美国 Waters 公司; QuEChERS 粉末(6 g 无水硫酸镁与 1.5 g 无水醋酸钠的混合粉末) 北京艾杰尔科技有限公司; 0.22 µm 尼龙滤膜 天津津腾公司。

API4000 质谱仪 美国 AB SCIEX 公司; Acquity UPLC 超高效液相色谱仪、ACQUITY UPLCTM BEH HILIC 色谱柱(1.7 µm, 2.1×100 mm)、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 µm, 2.1×100 mm)、MCX 柱 美国 Waters 公司; MS3 涡旋振荡器 德国 IKA 公司; 5810R 离心机 德国 Eppendorf 公司; B9500S 超声处理器 上海 Branson 公司; 超纯水机 Millipore 公司; 电子天平 Sartorius 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的制备 标准储备液: 精密称取罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因标准品适量, 用 0.5% 甲酸-甲醇溶液配制成罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因浓度均为 1.0 mg/mL 的标准储备液。

混合标准液 A: 精密吸取浓度为 1.0 mg/mL 的罂粟碱、那可丁、蒂巴因储备液各 0.1 mL 和浓度为 1.0 mg/mL 的吗啡、可待因储备液各 0.5 mL 于 20 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至刻度, 摇匀, 即得含罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 5 µg/mL 和吗啡、可待因浓度为 25 µg/mL 的混合标准溶液 A。

混合标准液 B: 精密吸取混合标准溶液 A 0.3 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至刻度, 摇匀, 即得含盐酸罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 150 ng/mL 和吗啡、可待因浓度为 750 ng/mL 的混合标准溶液 B。

同位素内标混合工作溶液(5.0 µg/mL): 分别精密吸取吗啡-D3、可待因-D3 内标物质(浓度均为 1 mg/mL)各 1 mL 置于 200 mL 容量瓶中, 用甲醇定

容至刻度,得到吗啡-D3、可待因-D3的浓度均为5.0 μg/mL的混合内标溶液。

标准曲线溶液的制备:5种生物碱标准品分别用乙腈稀释,其中罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度分别为1~50 ng/mL,以罂粟碱、蒂巴因和那可丁的色谱峰面积为纵坐标,罂粟碱、蒂巴因和那可丁的浓度为横坐标绘制标准工作曲线;吗啡、可待因采用内标定量法(注:由于基质效应的影响),二者浓度范围为5~250 ng/mL(准确移取上述吗啡-D3、可待因-D3同位素内标混合工作溶液,加入制作标准曲线的溶液中,内标的质量浓度均为50.0 ng/mL),以吗啡和可待因的色谱峰与相应内标物面积的比值为纵坐标,吗啡和可待因的浓度为横坐标绘制标准工作曲线(见表1)。

表1 标准曲线线性范围(ng/mL)

Table 1 Linear range of standard curve concentration range (ng/mL)

方法	标准品	c ₁	c ₂	c ₃	c ₄	c ₅	c ₆
外标法	罂粟碱	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00	50.00
	那可丁	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00	50.00
	蒂巴因	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00	50.00
内标法	可待因	5.00	10.00	25.00	50.00	100.00	250.00
	吗啡	5.00	10.00	25.00	50.00	100.00	250.00

1.2.2 样品前处理 取小龙虾样品,去壳,搅碎,混匀,称取2.0 g(精确到0.001 g),分别采用如下提取方法:

方法一(70%甲醇-氯仿提取法)^[11]:于50 mL聚四氟乙烯具塞离心管中,加入70%甲醇20 mL,超声处理30 min,放入离心机中,以4000 r/min的转速离心5 min,移取上清液,上清液蒸干,用0.1 mol/L的盐酸20 mL溶解,转移至分液漏斗中,加入石油醚(60~90 °C)20 mL,振摇,弃去石油醚相,水相用氨水调节pH至9,用氯仿提取2次,每次20 mL,合并氯仿液,氯仿液蒸干,用甲醇溶解并定容至10 mL。0.22 μm滤膜过滤,取滤液待测。

方法二(0.1 mol/L的盐酸-氯仿提取法)^[10]:于50 mL聚四氟乙烯具塞离心管中,加0.1 mol/L的盐酸20 mL,超声处理30 min,放入离心机中,以4000 r/min的转速离心5 min,移取上清液,上清液转移至分液漏斗中,加入石油醚(60~90 °C)20 mL,振摇,弃去石油醚相,水相用氨水调节pH至9,用氯仿提取2次,每次20 mL,合并氯仿液,蒸干,用甲醇溶解并定容至10 mL。0.22 μm滤膜过滤,取滤液待测。

方法三(0.1 mol/L的盐酸-固相萃取法)^[28]:于50 mL聚四氟乙烯具塞离心管中,加0.1 mol/L的盐酸20 mL,超声处理30 min,放入离心机中,以4000 r/min的转速离心5 min,移取上清液,上清液转移至分液漏斗中,加入石油醚(60~90 °C)20 mL,振摇,弃去石油醚相,水相以3 mL/min通过MCX柱(先用3 mL甲醇,3 mL 0.1 mol/L的HCl活化),分别用10 mL 1 mol/L的HCl、20 mL 50%甲醇淋洗,

再用含5%氨水的甲醇20 mL洗脱,蒸干,用甲醇溶解并定容至10 mL。0.22 μm滤膜过滤,取滤液待测。

方法四(QuEChERS法)^[29]:于50 mL聚四氟乙烯具塞离心管中,加入吗啡-D3、可待因-D3混合内标溶液150 μL,再加入10 mL 0.1 mol/L的盐酸,涡旋1 min,超声处理30 min,用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH呈中性,加入15 mL乙腈,剧烈震荡涡旋1 min,再加入6 g无水硫酸镁和1.5 g无水醋酸钠的混合粉末,涡旋混合1 min,放入离心机中,以4000 r/min的转速离心5 min,移取上清液,0.22 μm滤膜过滤,取滤液待测。

1.2.3 色谱条件 ACQUITY UPLCTM BEH HILIC色谱柱(1.7 μm, 2.1×100 mm);流动相:A为含0.1%甲酸的乙腈,B为含0.1%甲酸的10 mmol/L甲酸铵溶液;柱温:室温;进样量:5 μL;流速:0.3 mL/min;梯度洗脱条件如表2所示。

表2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution procedure

时间(min)	A(%)	B(%)
0	90	10
2.50	90	10
3.00	75	25
6.50	75	25
7.00	90	10
10.00	90	10

1.2.4 质谱条件离子源 电喷雾离子(ESI)源;正离子扫描模式;雾化气、气帘气、辅助气、碰撞气均为高纯氮气(大于99.999%);雾化气压力:50 psi;气帘气压力:22 psi;去溶剂气压力:45 psi;喷雾电压:5500 V;去溶剂温度:500 °C;碰撞气压力:5 psi;离子驻留时间:均为50 ms;各化合物的检测离子对、去簇电压(DP值)、碰撞能量(CE值)等质谱参数如表3

表3 5种生物碱的保留时间、定性离子对、定量离子对和碰撞能量信息^[15]

Table 3 Retention time, qualitative ion pair, quantitative ion pair and collision energy information of five poppy shell alkaloids^[15]

组分名称	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	去簇电压 (DP)/V	碰撞气能量 (CE)/eV
那可丁	3.24	414.4/220.5	414.4/220.5	95	30
		414.4/353.3			34
罂粟碱	3.89	340.4/202.2	340.4/202.2	92	38
		340.4/171.1			49
蒂巴因	5.15	312.3/58.3	312.3/58.3	52	38
		312.3/249.1			22
可待因	5.95	300.4/215.2	300.4/215.2	90	34
		300.4/165.4			55
吗啡	6.11	286.0/181.3	286.0/181.3	97	50
		286.0/165.3			50
可待因-D3	5.96	303.5/215.3	303.5/215.3	80	35
		303.5/165.2			60
吗啡-D3	6.10	289.4/185.2	289.4/185.2	95	40
		289.4/165.2			53

所示(为本实验室前期建立的实验条件)^[15];使用前应调节各参数使质谱灵敏度达到检测要求,仪器条件的设置可参考文献[15]。

1.2.5 定性和定量分析 定性:在相同实验条件下测定标准溶液和样品溶液,若样品溶液中检出色谱峰的保留时间与相应标准溶液色谱峰的保留时间一致,且样品溶液的质谱离子对相对丰度与浓度相当标准溶液的质谱离子对相对丰度相比较,参考其它食品检测标准中相对离子丰度的最大允许偏差的数值,以及欧盟对农药残留测定法中有关液相色谱—串联质谱法定性判断的标准,相对离子丰度(k)的相对偏差不超过表 4 规定的范围,则可判定样品中存在该组分。

表 4 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差
Table 4 Maximum allowable deviation of relative ion abundance in qualitative determination

相对离子丰度(%)	k>50	50≥k>20	20≥k>10	k≤10
允许的相对偏差(%)	±20	±25	±30	±50

定量:罂粟碱、那可丁和蒂巴因采用外标法定量;吗啡和可待因采用内标法定量。

1.2.6 回收率实验 对实验用的 9 份小龙虾样品各称取 2 g,分别加入混合标准溶液 A(罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 5 μg/mL 和吗啡、可待因浓度为 25 μg/mL)30 μL,按照 1.2.2 中的方法四(QuEChERS 法)进行样品前处理,以内标法计算吗啡、可待因的回收率,外标法计算罂粟碱、那可丁和蒂巴因的回收率。

1.3 数据处理

UPLC-MS/MS 数据采集使用 AB SCIEX Analyst software 软件,处理数据和绘图采用 g GraphPad Prism 软件(version 7, San Diego, CA);所有实验均重复三次,结果以平均值±SD 表示。

按下式计算小龙虾中的罂粟碱等的含量。

$$X = \frac{c \times V \times f \times 1000}{M}$$

式中: X 表示试样中各待测物的含量(μg/kg); c 表示从标准曲线中读出的供试品溶液中各待测物的浓度(μg/L); V 表示样液的提取体积(L); M 表示试样的质量(g); f 表示样液稀释因子。

2 结果与分析

2.1 液相色谱—串联质谱条件的确定

2.1.1 色谱柱的选择 分别采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm, 2.1×100 mm)、ACQUITY UPLCTM BEH HILIC 色谱柱(1.7 μm, 2.1×100 mm)进行测定,结果在酸性流动相(以含 0.1% 甲酸为水相)的条件下,吗啡、可待因在 C₁₈ 色谱柱上无保留,但在 HILIC 色谱柱上保留能力较强;在中性流动相(以 10 mmol/L 甲酸铵为水相)的条件下,吗啡、可待因在 C₁₈ 色谱柱上峰形拖尾,但在 HILIC 色谱柱上

峰形对称。罂粟碱、那可丁、蒂巴因在两种色谱柱上均有较好的保留能力和峰形。综合上述结果,采用 HILIC 色谱柱进行分析。

2.1.2 流动相的选择 经预实验发现,在 HILIC 色谱柱上,流动相中含甲酸铵时,可显著改善各待测化合物的峰形,且甲酸铵的浓度变化对结果影响不大;流动相中的甲酸可延长罂粟碱、那可丁的保留时间,改善那可丁的峰形;流动相中乙腈的含量可显著影响各待测物的保留时间,通过调节乙腈的浓度,可使吗啡、可待因达到基线分离,有利于定性结果的判断。最终确定流动相组成为:含 0.1% 甲酸的乙腈及含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 甲酸铵溶液进行梯度洗脱。

2.1.3 质谱条件的选择 罂粟碱等 5 种生物碱的电喷雾离子化效果均较好,故采用电喷雾离子化源进行分析。将 0.2 μg/mL 的标准溶液(利用注射泵设置流速为 5 μL/min)通过三通管与流动相(流速为 0.3 mL/min)汇合后注入到离子源中,在正离子模式下扫描,结果得到各待测组分的准分子离子峰。然后对各准分子离子峰分别进行扫描,选择响应最高时的 DP 值(去簇电压)后再进行子离子扫描,得到碎片离子信息。在 MRM 模式下,对各个子离子进行扫描,选取响应最高的 CE 值(碰撞气能量)后再分别对质谱中的离子喷雾电压、雾化气、干燥气流速温度等质谱参数进行优化。

综合上述结果,采用以含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 甲酸铵和含 0.1% 甲酸的乙腈为流动相,利用 HILIC 色谱柱进行分析。根据上述分析条件形成的标准溶液总离子流(TIC)图谱如图 1 所示,五种生物碱分离效果良好。

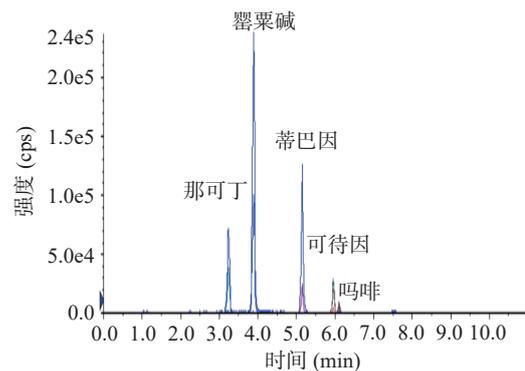


图 1 吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁和蒂巴因总离子流(TIC)图谱

Fig.1 Total ion chromatograms of morphine, codeine, papaverine, noscapine and thebaine

2.2 样品前处理方法的确定

针对本研究所采用的四种前处理方法,利用样品加标实验对比考察提取效果,结果如图 2 所示:方法三(盐酸-固相萃取法)回收率最低,方法一(甲醇-氯仿提取法)和方法二(盐酸-氯仿提取法)虽回收率高于方法三,但操作较为繁琐,且试剂氯仿毒性较大,整体上方法四(QuEChERS 法)回收率及重复性均优

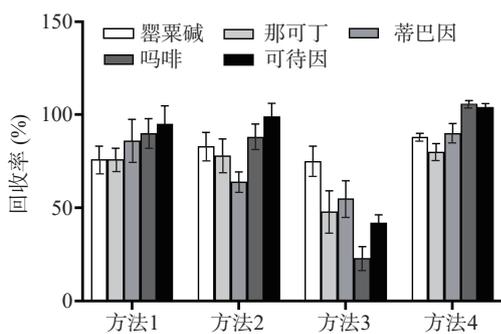


图2 不同提取方法提取率比较

Fig.2 Comparison of extraction rates of different extraction methods

于其他三种方法,最终选用 1.2.2 中的方法四(QuE-ChERS 法)作为样品的前处理方法。

2.3 定量分析方法的选择

为比较常用外标定量分析方法在 5 种生物碱中的应用效果,对实验用的 9 份样品各称取 2 g,分别加入混合标准溶液 A(罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 5 μg/mL 和吗啡、可待因浓度为 25 μg/mL)30 μL,按照 1.2.2 中的方法四(QuEChERS 法)进行样品前处理,以外标法定量分析回收率。结果表明,吗啡和可待因的回收率范围为 30%~80%,罂粟碱、那可丁和蒂巴因的回收率为 80%~110%(图 3)。说明利用外标法定量分析吗啡和可待因受样品基质效应影响较明显,而罂粟碱、那可丁和蒂巴因的基质效应较小。

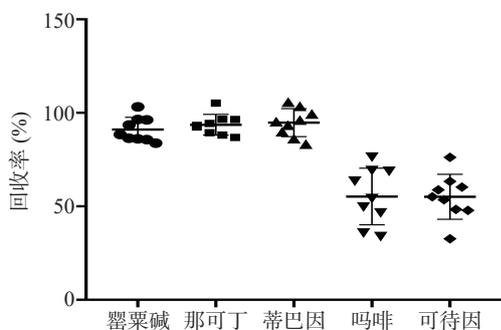


图3 5种生物碱成分外标法定量的回收率

Fig.3 Recovery rate of five alkaloids by external standard method

由于餐饮小龙虾为熟制品,富含油脂及各种调味料,且不同商家及口味其制作工艺也有区别,基质比较复杂,其中存在非挥发性组分与待测物质,在雾滴表面离子化的过程中产生竞争,影响电喷雾接口处的离子化效率,可能会增强或抑制被分析物离子的形成效率,产生基质增强或抑制效应,成为影响方法灵敏度和准确度的关键因素。为消除基质效应的影响,外标法一般可以通过稀释样品后进样分析或采用标准加入法。但是稀释样品溶液会影响方法检测的灵敏度;如采用标准加入法,基质的影响会使结果的重复性较差。吗啡和可待因均可获得到商品化的同位素内标。因此,本方法可采用内标法定量分析吗啡和可待因,采用外标法定量分析罂粟碱、那可丁和蒂巴

因,以同时兼顾检测要求、实际可操作性及检测成本。

按照 1.2.2 方法四(QuEChERS 法)及 1.2.6 回收率测定方法进行样品前处理,以内标法计算吗啡、可待因的回收率,外标法计算罂粟碱、那可丁和蒂巴因的回收率,结果如图 4 所示,五个化合物回收率范围均在 80%~110% 之间。

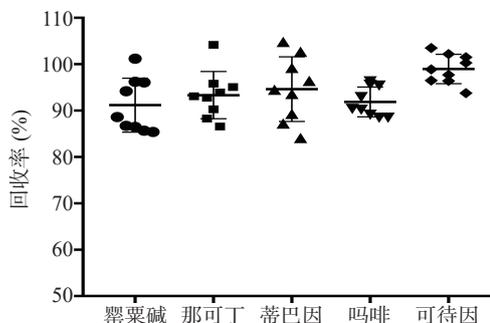


图4 外标法定量罂粟碱、那可丁、蒂巴因和内标法定量吗啡、可待因的回收率

Fig.4 Recoveries of papaverine, nacodine, thebaine by external standard method and morphine and codeine by internal standard method

2.4 方法学验证

2.4.1 标准曲线线性范围 标准曲线线性范围如表 5 所示,本实验方法吗啡、可待因线性浓度范围为 5~250 ng/mL,罂粟碱、那可丁、蒂巴因线性浓度范围为 1~50 ng/mL,线性范围内峰面积和进样浓度 (ng/mL)呈良好的线性关系,相关系数均大于 0.995,说明各目标化合物在线性范围内有很好的相关性。

表5 5种生物碱定量分析线性范围

组分名称	回归方程	相关系数	浓度范围(ng/mL)	定量方法
罂粟碱	Y=3.91E4X-4.9E3	0.9992	1~50	外标
那可丁	Y=3.58E4X-3.78E3	0.9991	1~50	外标
蒂巴因	Y=1.36E4-2.92E3	0.9993	1~50	外标
吗啡	Y=0.0185X-0.0241	0.9996	5~250	内标
可待因	Y=0.0164X-0.00887	0.9993	5~250	内标

2.4.2 检出限、定量限的确定 利用空白对照样品添加 5 种罂粟壳生物碱确定检出限、定量限,以 3 倍信噪比的检测浓度为方法检出限(LOD),以 10 倍信噪比的检测浓度为定量限(LOQ),结果表明罂粟碱检出限为 0.6 μg/kg,定量限为 2.0 μg/kg;那可丁检出限为 0.7 μg/kg,定量限为 2.5 μg/kg;蒂巴因检出限检出限为 0.8 μg/kg,定量限为 2.7 μg/kg;吗啡检出限为 3.7 μg/kg,定量限为 12.4 μg/kg;可待因检出限为 2.7 μg/kg,定量限为 9.3 μg/kg(表 6)。

2.4.3 准确度和精密度分析 以准确度和精密度评价方法的有效性,称取 18 份样品(每份质量为 2.0 g, n=6),分别设置了低、中、高 3 个浓度水平的回收实验,每个浓度水平进行 6 次平行实验。回收率结果如表 7 所示,从表中数据可看出加标回收实验回收

表 6 五种生物碱检出限及定量限

Table 6 Detection limit and quantitative limit of five alkaloids

组分名称	空白加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	信噪比	检出限($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限($\mu\text{g}/\text{kg}$)
罂粟碱	2.5	12.3	0.6	2.0
那可丁	2.5	10.2	0.7	2.5
蒂巴因	2.5	9.3	0.8	2.7
吗啡	12.5	10.1	3.7	12.4
可待因	12.5	13.5	2.7	9.3

表 7 准确度与精密度结果($n=6$)Table 7 Accuracy and precision results ($n=6$)

目标物	低浓度			中浓度			高浓度		
	样品加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	RSD(%)	样品加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	RSD(%)	样品加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	RSD(%)
罂粟碱	11.25	106.1	8.20	75	102.4	1.80	300	87.5	1.20
那可丁	11.25	107.6	2.20	75	101.8	1.80	300	90.8	6.10
蒂巴因	11.25	109.9	3.70	75	98.4	5.60	300	86.4	2.60
吗啡	56.25	99.6	0.20	375	93.5	0.06	1500	99.3	0.07
可待因	56.25	96.8	0.07	375	95.3	0.04	1500	98.2	0.06

率均在 80%~110% 之间, RSD 在 0.06%~8.20% 之间,表明本方法具有较好的准确度和精密度。

2.5 实际样品测定结果

为验证 QuEChERS-UPLC-MS/MS 方法检测餐饮小龙虾中 5 种生物碱的可行性,从川沙夜市摊购买了 9 份小龙虾熟制品,以本实验建立的检测方法进行分析,结果均未检出罂粟碱等 5 种待测组分,说明当地夜市摊小龙虾制品未有非法添加罂粟壳、罂粟籽及其水浸物等违禁原料。

3 讨论

首先,在样品前处理方面,蒂巴因、可待因、罂粟碱、那可丁均属于碱性有机毒物,与酸作用能生成易溶于水的盐,吗啡属于两性有机毒物,在酸性或碱性水溶液中均易成为溶于水的盐类,呈游离状态时能溶于乙腈等有机溶剂。本方法比较了盐酸-固相萃取法、甲醇-氯仿提取法、盐酸-氯仿提取法及 QuEChERS 法对这五种生物碱的提取效果,结果表明盐酸-固相萃取法(MCX 柱)提取率最低,QuEChERS 提取效果较好,这与胡争艳等^[30]利用 QuEChERS 法提取含油脂类较多的火锅样品的结果有所不同,表明相同的提取方法,当食品基质不同时,提取效果有所不同,因此对于不同类型基质的样品,应选择合适快速提取方法。

其次,在色谱分离的固定相选择方面,吗啡、可待因均为强极性化合物,目前已有将 BEH HILIC 柱用于吗啡、可待因、罂粟碱等物质的液-质联用分析^[30-31],本研究进一步对比了常用色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(1.7 μm , 2.1 \times 100 mm)与 HILIC 色谱柱(1.7 μm , 2.1 \times 100 mm)对 5 种生物碱的分离效果,结果表明罂粟碱、那可丁、蒂巴因在两种色谱柱上均有较好的保留行为,但吗啡、可待因在 C_{18} 色谱柱上无保留,因此,若同时检测小龙虾中

5 种生物碱成分,采用亲水色谱柱(HILIC)效果较好。在流动相方面,目前对于检测罂粟碱类化合物,大都选用 10 mmol/L 甲酸铵-乙腈体系的酸性流动相^[30,32]。本试验以 0.1% 甲酸为水相时,发现吗啡、可待因在 C_{18} 色谱柱上无保留,但在 HILIC 色谱柱上保留能力较强;以中性流动相甲酸铵(10 mmol/L)为水相时,吗啡、可待因在 C_{18} 色谱柱上峰形拖尾,而在 HILIC 色谱柱上峰形对称。罂粟碱、那可丁、蒂巴因在两种色谱柱上均有较好的保留能力和峰形,综合五种生物碱的保留行为,本方法选用 0.1% 甲酸的乙腈和含 0.1% 甲酸的甲酸铵(10 mmol/L)溶液为流动相,采用 HILIC 色谱柱进行分析可获得较好的分离效果。

本方法的检出限可达到 0.6~3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,定量限为 2.0~12.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,此外,采用内标法定量分析吗啡、可待因的线性浓度范围为 5~250 ng/mL,外标法定量分析罂粟碱、那可丁、蒂巴因的线性浓度范围为 1~50 ng/mL,在线性范围内峰面积与进样浓度(ng/mL)间的相关系数均大于 0.995。加标回收率为 80%~110%,相对标准偏差小于 10%,总体较已有部分方法有所改进^[24,33],可较好地满足市场监管的需要。

本方法的不足之处,为了消除基质的影响,采用内标法来对吗啡和可待因进行测定,但一般来说内标难以获得,且增加了分析费用,有待于进一步改进。

4 结论

本文建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)联用法检测餐饮小龙虾中吗啡、可待因、那可丁、罂粟碱、蒂巴因 5 种生物碱的分析方法。利用 QuEChERS 前处理方法结合亲水色谱柱(HILIC),操作简单、迅速,方法的灵敏度高,准确度、重复性好,可以满足市场监管小龙虾或其他蛋白质含量较高的样品中罂粟壳生物碱残留量的需要。

参考文献

- [1] 陈伟, 乔勇升, 董贵军. 高效液相色谱-荧光检测法同时检测火锅底料中吗啡和可待因[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(6): 89-91. [CHEN Wei, QIAO Yongsheng, DONG Guijun. Simultaneous determination of morphine and codeine in hot pot sauces by high performance liquid chromatography fluorescence detection[J]. Grain, Oil and Food Science and Technology, 2015, 23(6): 89-91.]
- [2] 陆茂林, 赵春城, 蔡建荣, 等. 罂粟碱检测方法进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2002(4): 504-505. [LU Maolin, ZHAO Chun-cheng, CAI Jianrong, et al. Progress in detection methods of papaverine[J]. Chinese Journal of Hygienic Inspection, 2002(4): 504-505.]
- [3] 食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)[2008-12-15]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s3594/200812/38511.htm>. [List of non edible substances that may be illegally added to food and varieties of food additives that are easy to abuse (the first batch)[2008-12-15]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s3594/200812/38511.htm>]
- [4] 张朝云. 食品中罂粟壳残留的检测现状[J]. 中国卫生检验杂志, 1996(1): 53-55. [ZHANG Chaoyun. Detection status of poppy shell residues in food[J]. Chinese Journal of Hygienic Inspection, 1996(1): 53-55.]
- [5] 姜典镇, 杜道运, 谢文涛. 薄层层析法定量测定食品中阿片生物碱[J]. 河南预防医学杂志, 1997(3): 149-151. [JIANG Dianzhen, DU Daoyun, XIE Wentao. Quantitative determination of opioid alkaloids in food by thin layer chromatography[J]. Henan Journal of preventive medicine, 1997(3): 149-151.]
- [6] 李永芳, 付耀华, 侯晓燕. 气相色谱法测定食品中罂粟壳残留的研究与应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2000(1): 38-40. [LI Yongfang, FU Yaohua, HOU Xiaoyan. Study and application of determination of poppy shell residue in food by gas chromatography[J]. Chinese Journal of Hygienic Inspection, 2000(1): 38-40.]
- [7] 沈平, 谢朝梅, 谢燕湘. 气相色谱-质谱法测定食品中罂粟壳提取物的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2016, 52(1): 48-51. [SHEN Ping, XIE Chaomei, XIE Yanxiang. Determination of residues of poppy shell extract in food by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Physical and Chemical Inspection-Chemical Volume, 2016, 52(1): 48-51.]
- [8] 徐丽红, 王建清, 陶秋, 等. 高效液相色谱同时测定3类食品中的5种罂粟壳生物碱[J]. 分析测试学报, 2011, 30(12): 1387-1391. [XU Lihong, WANG Jianqing, TAO Qiu, et al. Simultaneous determination of five poppy shell alkaloids in three kinds of food by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Analysis and Testing, 2011, 30(12): 1387-1391.]
- [9] 信海红, 王庭欣, 朱路甲, 等. 超声波微波萃取-高效液相色谱法检测肉汤中的罂粟碱[J]. 中国食品添加剂, 2012(4): 250-252. [XIN Haihong, WANG Tingxin, ZHU Lujia, et al. Determination of papaverine in broth by ultrasonic microwave extraction high performance liquid chromatography[J]. China Food Additives, 2012(4): 250-252.]
- [10] 冯雪顺, 李胜蓉, 李发生. 薄层法测定食品中罂粟壳残留方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 1992(4): 238-240. [FENG Xueshun, LI Shengrong, LI Fasheng. Study on determination of poppy shell residue in food by TLC[J]. Chinese Journal of Hygienic Inspection, 1992(4): 238-240.]
- [11] 杜黎明, 许庆琴, 吴秀兰. 大口径毛细管气相色谱法测定罂粟壳中的生物碱[J]. 色谱, 1999(6): 578-579. [DU Liming, XU Qingqin, WU Xiulan. Determination of alkaloids in poppy shell by large bore capillary gas chromatography[J]. Chromatography, 1999(6): 578-579.]
- [12] 刘敏敏, 张朝正, 李延志, 等. 液相色谱-串联质谱法检测火锅底料中罂粟壳[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(12): 91-94. [LIU Minmin, ZHANG Chaozheng, LI Yanzhi, et al. Determination of poppy shell in hot pot bottom by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Research and Development, 2012, 33(12): 91-94.]
- [13] 陈伟, 乔勇升, 胡慧. 固相萃取-高效液相色谱法测定卤菜中的蒂巴因[J]. 食品工业, 2020, 41(1): 327-330. [CHEN Wei, QIAO Yongsheng, HU Hui. Determination of tibain in pickled vegetables by solid phase extraction high performance liquid chromatography[J]. Food Industry, 2020, 41(1): 327-330.]
- [14] 覃弘毅, 刘小玲. 超高效液相色谱-串联质谱法结合全自动固相萃取测定螺蛳粉中5种罂粟壳生物碱[J]. 食品科技, 2021, 46(10): 284-289. [QIN Hongyi, LIU Xiaoling. Determination of five poppy shell alkaloids in snail powder by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with automatic solid phase extraction[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(10): 284-289.]
- [15] 简龙海, 茹歌, 陈丹丹, 等. 亲水作用液相色谱-串联质谱法快速测定食品中罂粟壳的生物碱残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2797-2803. [JIAN Longhai, RU Ge, CHEN Dandan, et al. Rapid determination of alkaloid residues in poppy husk by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2017, 8(7): 2797-2803.]
- [16] 王莉莉, 刘仲. 气相色谱-质谱法检测食品中的生物碱[J]. 现代预防医学, 2005(1): 51. [WANG Lili, LIU Zhong. Determination of alkaloids in food by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Modern Preventive Medicine, 2005(1): 51.]
- [17] 张艳萍, 廖华乐, 肖兵, 等. GC/MS测定食品中罂粟碱和吗啡含量[J]. 卫生研究, 2011, 40(4): 512-513. [ZHANG Yanping, LIAO Huale, XIAO Bing, et al. Determination of papaverine and morphine in food by GC/MS[J]. Health Research, 2011, 40(4): 512-513.]
- [18] 李航, 贺亚玲, 陈小泉, 等. QuEChERS/UPLC-MS测定火锅调料中罂粟壳(粉)的研究[J]. 食品与药品, 2014, 16(4): 284-287. [LI Hang, HE Yaling, CHEN Xiaoquan, et al. Determination of poppy shell (powder) in hot pot seasoning by QuEChERS/UPLC-MS[J]. Food and Drug, 2014, 16(4): 284-287.]
- [19] 尹华, 陆卫明. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定火锅调料中罂粟壳[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(18): 6633-6638. [YIN Hua, LU Weiming. Determination of poppy shell in hot pot seasoning by QuEChERS high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2020, 11(18): 6633-6638.]

- [20] 王力清, 邴明浩, 李锦清, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法高通量快速测定调料中罂粟壳生物碱含量[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 168-172. [WANG Liqing, LI Minghao, LI Jinqing, et al. Rapid determination of alkaloid content of poppy shell in seasoning by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food and Fermentation Industry, 2012, 38(8): 168-172.]
- [21] 华向美, 周迎春, 刘少博. 碱提取-UPLC-MS/MS-内标法测定食品中 5 种罂粟壳生物碱[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(12): 182-191. [HUA Xiangmei, ZHOU Yingchun, LIU Shaobo. Determination of five poppy shell alkaloids in food by alkaline extraction-UPLC-MS/MS-internal standard method[J]. China Food Additives, 2021, 32(12): 182-191.]
- [22] 王岩. 高效液相色谱串联质谱法测定油辣椒中的罂粟壳[J]. 食品安全导刊, 2021(30): 72-74, 77. [WANG Yan. Determination of poppy shells in oil pepper by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Safety Guide, 2021(30): 72-74, 77.]
- [23] 彭文浩. QuEChERS-气质联用法测定火锅汤料中的罂粟碱和吗啡[J]. 海峡预防医学杂志, 2019, 25(4): 60-62. [PENG Wenhao. Determination of papaverine and morphine in hot pot soup by QuEChERS GC-MS[J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2019, 25(4): 60-62.]
- [24] 李兴根, 乔勇升, 陈伟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定火锅底料中的 5 种罂粟壳生物碱残留[J]. 分析测试学报, 2018, 37(4): 446-451. [LI Xinggen, QIAO Yongsheng, CHEN Wei, et al. Rapid determination of five poppy shell alkaloids residues in hot pot bottom by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Analysis and Testing, 2018, 37(4): 446-451.]
- [25] 马凯, 杨昌彪, 黄永桥, 等. QuEChERS 结合 UHPLC-MS/MS 测定火锅汤料中禁用染料及罂粟壳[J]. 食品工业, 2019, 40(9): 245-248. [MA Kai, YANG Changbiao, HUANG Yongqiao, et al. Determination of banned dyes and poppy shells in hot pot soup by QuEChERS combined with uhplc-ms/MS[J]. Food Industry, 2019, 40(9): 245-248.]
- [26] 陈小雪, 乔彬, 王斌. UPLC-MS/MS 法测定凉皮汤料中的罂粟壳成分[J]. 现代食品, 2021(13): 143-145. [CHEN Xiaoxue, QIAO Bin, WANG Bin. UPLC-MS/MS determination of poppy shells in Liangpi soup[J]. Modern Food, 2021(13): 143-145.]
- [27] 杨昌彪, 李占彬, 阙跃飞, 等. UPLC/MSMS 内标法测定火锅食品中 5 种生物碱和 15 种喹诺酮类药物[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(15): 288-294. [YANG Changbiao, LI Zhanbin, QUE Yuefei, et al. Determination of 5 alkaloids and 15 quinolones in hot pot food by UPLC/MSMS internal standard method[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(15): 288-294.]
- [28] 花露, 叶平, 陆杰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定辣条中的 5 种罂粟碱[J]. 中国调味品, 2018, 43(8): 142-146. [HUA Lu, YE Ping, LU Jie, et al. Simultaneous determination of five papaverines in spicy strips by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Condiments, 2018, 43(8): 142-146.]
- [29] 李俊霞, 马丽雅, 林河通, 等. 果蔬中农药残留检测分析研究进展[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(6): 1-9. [LI Junxia, MA Liya, LIN Hetong, et al. Research progress on detection and analysis of pesticide residues in fruits and vegetables[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2021, 49(6): 1-9.]
- [30] 胡争艳, 吴平谷, 王立媛, 等. SPE-UPLC-MS/MS 法同时测定火锅食品中 5 种生物碱[J]. 预防医学, 2018, 30(7): 750-753. [HU Zhengyan, WU Pinggu, WANG Liyuan, et al. Simultaneous determination of five alkaloids in hot pot food by SPE-UPLC-MS/MS[J]. Preventive Medicine, 2018, 30(7): 750-753.]
- [31] 顾万江, 周春艳, 唐晓琴, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中 5 种生物碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(17): 2481-2484. [GU Wanjiang, ZHOU Chunyan, TANG Xiaoqin, et al. Simultaneous determination of five alkaloids in food by solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Hygienic Inspection, 2014, 24(17): 2481-2484.]
- [32] 吴义春, 孙丽, 苏晶, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-质谱联用法测定酱卤肉中 5 种罂粟壳生物碱[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(4): 103-106. [WU Yichun, SUN Li, SU Jing, et al. Determination of five poppy shell alkaloids in pickled meat by QuEChERS ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. China Food Additives, 2021, 32(4): 103-106.]
- [33] 张弛, 任君, 陈达炜, 等. 分散微固相萃取-超高效液相色谱-高分辨质谱法测定火锅底料中罂粟壳生物碱[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(1): 29-35. [ZHANG Chi, REN Jun, CHEN Dawei, et al. Determination of poppy shell alkaloids in hot pot sauces by dispersive micro solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(1): 29-35.]