

液相色谱-质谱法测定火锅汤料中的罂粟碱

杨洁, 王智, 张辉珍*, 翟士星, 于宙, 张凤艳, 殷冀煜, 王晓斌
(青岛市产品质量监督检验所, 山东 青岛 266061)

摘要: 采用高效液相色谱-三重四极杆串联质谱, 多反应检测模式定量, 建立火锅汤料中5种罂粟碱残留的分析方法, 优化了样品的前处理过程、色谱条件、质谱参数等条件。吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可丁的检出限分别为2.4、2.4、1.2、0.048、0.024 ng/mL, 定量限分别为8.0、8.0、4.0、0.16、0.08 ng/mL, 加标回收率介于81.3%~103.5%, 相对标准偏差介于3.02%~4.55%。本方法具有操作简单、准确、灵敏度高优点, 可对火锅汤料中是否添加了罂粟壳进行快速检测分析。

关键词: 罂粟碱; 高效液相色谱-三重四极杆串联质谱; 多离子反应监测

Determination of Papaverine and Other Alkaloids in Hot Pot Soup Seasoning by HPLC-MS-MS

YANG Jie, WANG Zhi, ZHANG Hui-zhen*, ZHAI Shi-xing, YU Zhou, ZHANG Feng-yan, YIN Ji-yu, WANG Xiao-bin
(Qingdao Supervision and Testing Center of Product Quality, Qingdao 266061, China)

Abstract: A method for the determination of five alkaloid residues in hot pot soup seasoning using a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) was described. The pretreatment procedure, chromatographic conditions and mass spectrometric conditions were optimized. The detection limits for morphine, codeine, thebaine, narcotine and papaverine were 2.4, 2.4, 1.2, 0.048 and 0.024 ng/mL and the quantitative determination limits were 8.0, 8.0, 4.0, 0.16 and 0.08 ng/mL, respectively. The spiked recoveries were between 81.3% and 103.5%, and the relative standard deviations ranged from 3.02% to 4.55%. This method has the advantages of easy operation, high sensitivity and accuracy.

Key words: papaverine; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; multi-reaction monitoring (MRM)

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)22-0243-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201422047

罂粟壳含有20多种生物碱, 其中主要成分为吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱和那可丁^[1]。罂粟壳中的生物碱能引起某种程度的惬意和欣快感, 可造成人注意力、思维和记忆功能的衰退, 长期使用会引起精神失常, 出现幻觉, 严重时甚至会导致呼吸停止而死亡。添加了罂粟壳的食物口感独特, 有些不法商贩在火锅汤料中添加罂粟壳, 长期食用无论从身体上还是心理上都会对其产生严重的依赖性, 造成严重的毒物癖^[2]。由于罂粟壳对人体的危害逐渐被人所认识, 食品中违法添加罂粟壳及其提取物也逐渐引起人们的关注, 为了维护广大人民的身体健康, 严厉打击非法添加现象, 建立快速、准确的食品中生物碱的测定方法具有重要意义。

目前测定罂粟碱的方法主要有分光光度法^[3]、薄层色谱法^[4-5]、示波极谱法^[6-7]、气相色谱法^[8-9]、高效液相色谱法^[10-11]、气相色谱-质谱联用法^[12-13]、液相色谱-质谱联用法^[14-15]。气相色谱-质谱联用具有较高的检测灵敏度, 适用于食品中生物碱残留的测定, 但目前的检测方法前处

理相对较为繁琐, 不适合大批样品的快速检测分析。为此, 本实验选用吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱和那可丁5种生物碱作为火锅汤料中添加罂粟壳的标示成分, 建立了简便快速的前处理分析方法, 并用液相色谱-三重四极杆串联质谱进行定性定量测定, 具有准确、灵敏度高等优点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱, 那可丁5种标准物质 青岛市公安局; 甲醇(色谱纯) 美国Sigma-Aldrich公司; 乙酸铵(优级纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 氨水、乙酸(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 乙二胺-N-丙基硅烷(primary secondary amine, PSA) 填料: 粒度40~70 μm; C₁₈填料: 40~50 μm; 超纯水由Millipore纯水系统制备。

收稿日期: 2013-12-19

作者简介: 杨洁(1982—), 女, 工程师, 博士, 研究方向为食品检验。E-mail: mxvv@sina.com

*通信作者: 张辉珍(1966—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为食品检验。E-mail: zhanghuizhen1966@sina.com

1.2 仪器与设备

Quattro Premier XE液相色谱-质谱联用仪 美国 Waters公司；超声波清洗器、旋涡混合器。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 柱温: 30 °C; 进样体积: 5 μL。流动相A为甲醇; 流动相B为10 mmol/L的乙酸铵溶液; 流速: 0.2 mL/min; 梯度洗脱: 0~1 min, 保持A、B的比例为60:40; 1~6 min, A:B的比例从60:40逐渐增加到100:0; 6~7 min, A:B的比例降至60:40, 保持4 min。

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源, 正离子多反应监控扫描模式。毛细管电压3.2 kV; 锥孔电压30 V; 离子源温度120 °C; RF透镜1.2:1; 锥孔反吹气流量50 L/h; 脱溶剂温度350 °C; 脱溶剂气流量600 L/h; 碰撞室氩气压力0.3 Pa。各化合物质谱条件参数见表1。

表1 5种生物碱质谱参数
Table1 Mass spectral parameters for five alkaloids

物质名称	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	驻留时间/s	碰撞能量/eV
吗啡	285.9	164.7*	0.1	35
		180.7	0.1	35
可待因	299.9	164.5*	0.1	40
		214.7	0.1	25
蒂巴因	311.9	57.7*	0.1	12
		248.6	0.1	15
罂粟碱	339.8	201.6*	0.1	25
		170.5	0.1	36
那可丁	413.8	219.6*	0.1	20
		352.5	0.1	20

注: *.定量离子。

1.3.3 样品预处理

称取5 g样品于25 mL比色管中, 加0.625 mL氨水, 加入15 mL甲醇, 将比色管放入超声波中超声20 min, 取出, 冷却至室温, 加水定容至刻度, 摇匀, 8 000 r/min离心5 min, 取出待净化。称取60 mg PSA, 60 mg C₁₈于10 mL聚四氟乙烯离心塑料管中, 移取2 mL上清液于此离心管中, 涡旋1 min, 8 000 r/min离心5 min, 取上清液, 用0.22 μm的有机相滤膜过滤, 待测。

1.3.4 甲醇体积分数的选择

称取5 g空白试样于25 mL比色管中, 添加一定浓度的该5种生物碱, 加入0.625 mL氨水, 以保持溶液为碱性, 加入甲醇0、0.5、1、2.5、5、10、15、20 mL, 再向前7个试样中加入适量水 (总试液体积为20 mL左右), 超声20 min, 取出, 冷却至室温, 用水定容至刻度, 第8个试样用甲醇定容至刻度, 摇匀, 8 000 r/min离心5 min, 取上清液, 用0.22 μm的有机相滤膜过滤, 滤液进行液相色谱-质谱分析。

1.3.5 样品中罂粟碱含量计算

$$\text{罂粟碱含量}/(\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V}{m} \times 10^{-3}$$

式中: *C*为标准曲线中获得的生物碱质量浓度/(ng/mL); *V*为提取液体积/mL; *m*为样品质量/g。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择

由于吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱和那可丁均易溶于甲醇, 因此选用甲醇作为流动相A, 用100%的甲醇作为流动相, 发现这5种生物碱无法得到有效分离。结合资料^[16]选择10 mmol/L的乙酸铵溶液作为流动相B, 选用初始流动相甲醇与乙酸铵的比例分别为55:45、60:40、65:35, 发现在55:45时峰形较宽, 在60:40和65:35时均得到较好的峰形, 但在65:35时吗啡与可待因之间分离不好。因此选用初始甲醇(A)和乙酸铵(B)的比例为60:40, 在优化条件下发现流动相的变化梯度为0~1 min, 保持*V*(A):*V*(B)=60:40; 1~6 min, *V*(A):*V*(B)=60:40逐渐增加为*V*(A):*V*(B)=100:0; 6~7 min间, A与B的比例降至60:40, 保持4 min。在该条件下5种化合物得到有效分离, 并且缩短了分析时间, 提高了分析效率, 为大批样品的快速分析提供参考。

2.2 样品提取试剂的选择

首先配制3种标准溶液: 标准溶液1, 吗啡、可待因和蒂巴因质量浓度均为2 μg/mL; 标准溶液2, 罂粟碱质量浓度200 ng/mL; 标准溶液3, 那可丁质量浓度为100 ng/mL。移取50 μL的标准溶液1、20 μL的标准溶液2和20 μL的标准溶液3, 配制成混合溶液4、混合溶液5和混合溶液6各1 mL。混合溶液4、5、6中吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱和那可丁的质量浓度都分别为100、100、100、4 ng/mL和2 ng/mL。混合溶液4、5和6采用的稀释剂分别为: 50%甲醇 (含2.5%乙酸)、50%甲醇和50%甲醇 (含2.5%氨水)。将这3种混合溶液进样分析, 结果如图1所示。由于罂粟壳中的生物碱在酸性 (图1a) 和中性 (图1b) 条件下水溶性增加, 导致吗啡、可待因、蒂巴因在柱中无保留, 造成峰形差, 峰高低。碱性条件下 (图1c), 在柱中保留时间延长, 明显改善其色谱行为, 化合物的流出顺序为吗啡 (1.37 min)、可待因 (1.88 min)、蒂巴因 (2.55 min)、罂粟碱 (3.86 min) 和那可丁 (4.74 min)。

由于该5种生物碱在酸性条件下形成盐类易溶于水, 因此以往的分析前处理方法中均采用酸性溶液提取食品中的罂粟壳残留物, 再经过MCX柱固相萃取, 用碱性甲醇洗脱, 浓缩后再进行进样分析, 此方法操作过程相对较为繁琐, 为了简化操作流程, 利用该5种生物碱

在碱性条件下易溶于有机溶剂的特性,选择有机溶剂在碱性条件下提取试样中罂粟壳残留成分,并考察不同体积分数甲醇的提取效率,甲醇的体积分数从0~100%,结果如图2所示。由图2可以看出,当甲醇体积分数高于60%时,5种生物碱均能获得较高的峰面积。因此测定火锅汤料样品时,称量样品5 g于25 mL比色管中,碱性条件下(加入0.625 mL氨水)加入纯甲醇15 mL,按上述步骤超声提取,定容,摇匀即可。

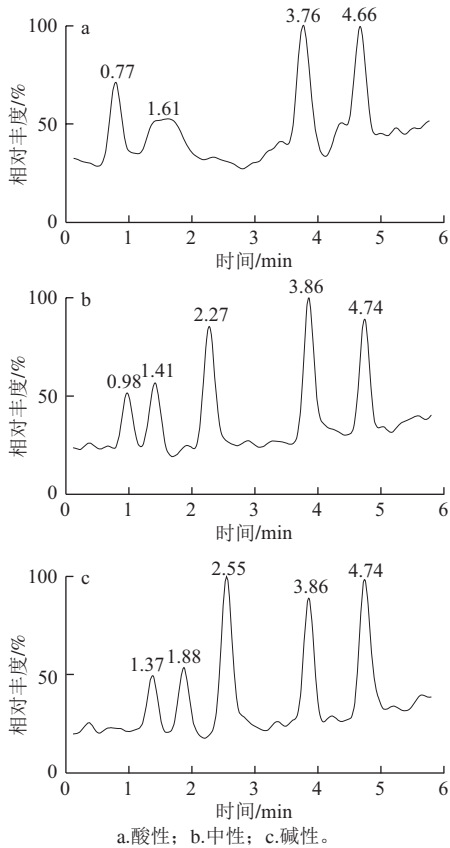


图1 不同稀释溶剂稀释的生物碱的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms of alkaloids in different diluents

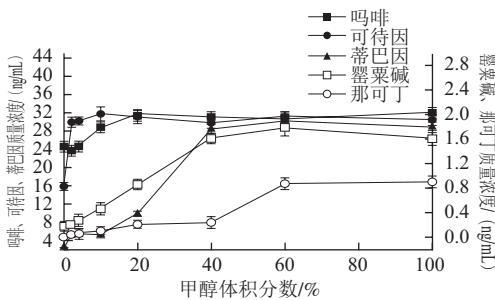


图2 不同甲醇体积分数提取试剂对5种生物碱提取效率的影响

Fig.2 Extraction efficiency of five alkaloids with different concentrations of methanol

2.3 净化方法的选择

火锅汤料中含有大量的蛋白质和油脂,并且含有成

分复杂的调味料,这些组分的存在都会干扰目标化合物的测定,因此对提取液进行净化已成为准确测定的关键步骤之一。研究^[17]表明提取液经过MCX柱吸附、洗脱后取得较好的净化效果^[17]。但是由于火锅汤料中组成成分相对复杂,通过固相小柱时可造成流速较慢,洗脱困难,并且操作步骤也相对繁琐。为了解决以上问题,本实验采用分散固相萃取法来对提取液进行净化,直接将固相吸附剂加入提取液中,该操作简便快捷。结合资料^[18],PSA是极性吸附剂,同时含有伯胺和仲胺基团,具有弱的阴离子交换能力,有利于去除油脂和糖,C₁₈有利于去除汤料中的色素,因此选用PSA和C₁₈作为净化剂,去除杂质干扰。称取60 mg PSA、60 mg C₁₈于10 mL聚四氟乙烯离心塑料管中,移取2 mL待净化上清液于此离心管中,涡旋1 min,8 000 r/min离心5 min,取上清液,用0.22 μm的有机相滤膜过滤,分析结果表明杂质峰明显减少,并能获得较高的回收率。

2.4 方法的线性实验

将5种生物碱配制成吗啡、可待因、蒂巴因均为100 ng/mL,罂粟碱4 ng/mL,那可丁2 ng/mL的混合溶液,再取这5种生物碱的混合溶液100、200、300、400、500 μL于瓶中,定容至1 mL,进样分析,以组分的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,所得标准曲线见表2。

表2 5种生物碱的标准回归曲线

物质名称	回归方程	相关系数
吗啡	$y = 3.515\ 07x + 7.208\ 81$	0.993\ 8
可待因	$y = 1.724\ 16x + 3.224$	0.990\ 6
蒂巴因	$y = 14.163\ 8x + 3.501\ 71$	0.995\ 6
罂粟碱	$y = 271.417x + 25.349$	0.991\ 1
那可丁	$y = 467.37x + 3.628\ 7$	0.994\ 3

2.5 方法的回收率和精密度实验

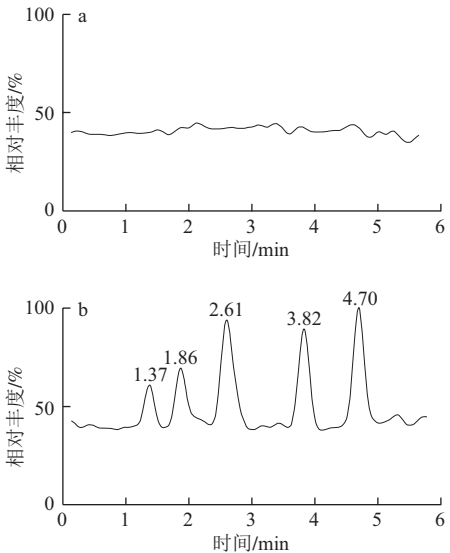


图3 空白基质(a)和加标基质(b)总离子流图

Fig.3 Total ion chromatograms of blank and spiked matrix-matched samples

取空白试样12份,分为两组,每组6份进行重复性实验。第1组加入低质量浓度的混合标准溶液,使配制后试液中的吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱和那可丁质量浓度分别为10、10、10、0.4 ng/mL和0.2 ng/mL。第2组加入高质量浓度的混合标准溶液,使配制后试液中的上述5种化合物质量浓度分别为30、30、30、1.2 ng/mL和0.6 ng/mL。按1.3.3节的前处理方法进行处理,进样分析,空白基质及加标样品的总离子流图如图3所示。该5种化合物的回收率及相对标准偏差见表3。回收率在81.3%~103.5%之间,相对标准偏差介于3.02%~4.55%之间。

表3 5种生物碱回收率及相对标准偏差
Table 3 Precision (RSD) and recoveries of five alkaloids

物质名称	加入量/ (ng/mL)	测得量/ (ng/mL)	平均回收 率/%	相对标准偏 差/% (n=6)
吗啡	10	8.131	81.3	3.26
	30	24.564	81.9	4.55
可待因	10	9.026	90.3	4.02
	30	27.305	91.0	3.87
蒂巴因	10	9.623	96.2	3.57
	30	28.881	96.3	4.05
罂粟碱	0.4	0.369	92.2	4.38
	1.2	1.084	90.3	4.51
那可丁	0.2	0.196	98.0	3.02
	0.6	0.621	103.5	3.11

2.6 方法的灵敏度实验

将吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可丁配制成10、10、10、0.4、0.2 ng/mL后进样,3倍信噪比条件下溶液质量浓度为检出限,可推算出这5种生物碱的绝对检出限分别为2.4、2.4、1.2、0.048、0.024 ng/mL,10倍信噪比条件下溶液质量浓度为最低定量限,得出这5种生物碱的最低定量限分别为8.0、8.0、4.0、0.16、0.08 ng/mL。

3 结 论

采用三重四极杆的电喷雾离子源,使用多离子反应监测方式检测,能对吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、

那可丁进行准确分析,方法检出限分别为2.4、2.4、1.2、0.048、0.024 ng/mL,可获得较低的检出限,能满足火锅汤料中罂粟壳残留的分析测定。选用大于60%的甲醇溶液在碱性条件下能充分提取样品中罂粟壳残留物,回收率在81.3%~103.5%之间,使用该前处理方法,进样分析,所得相对标准偏差介于3.02%~4.55%之间,该方法适用于大批食品中罂粟壳残留的准确、快速测定。

参考文献:

[1] 戴维杰,钮伟民. 高效液相色谱法检测掺罂粟壳食品中的罂粟碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(5): 607-608.

[2] 张虹,廖文娟,蔡增轩,等. 液质联用法检测掺罂粟壳食物中生物碱的残留[J]. 分析与检测, 2005, 31(12): 93-97.

[3] 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, 6(1): 53-54.

[4] 涂晓明. 薄层层析法测定火锅及涮羊肉汤料调料中阿片生物碱的研究[J]. 环境与健康杂志, 1992, 9(增刊1): 373-374.

[5] 马明善. 掺伪食品中罂粟壳的纸层色谱测定法[J]. 中国卫生检验杂志, 1992, 2(6): 375.

[6] 陶锐. 火锅汤料中吗啡的示波极谱测定[J]. 中国卫生检验杂志, 1994, 4(3): 140-143.

[7] 王河川. 示波极谱法在卫生检测中的应用[M]. 成都: 电子科技大学出版社, 1993: 274-276.

[8] 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, 10(1): 38-40.

[9] 秦启发,刘守亮,杨素林. 气相色谱法测定阿片生物碱的研究[J]. 预防医学情报杂志, 2002, 18(2): 187-188.

[10] 李秋霞,肖国军,周聪. 固相萃取-液相色谱检测火锅汤料中吗啡、可待因和罂粟碱[J]. 中国职业医学, 2011, 38(8): 58-61.

[11] 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.

[12] 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, 32(1): 51.

[13] 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.

[14] 王珂,郑荣,简龙海,等. 火锅汤料中5种生物碱成分的液相色谱-串联质谱测定法[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 363-365.

[15] 王力清,酆明浩,李锦清,等. 超高效液相质谱-串联质谱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.

[16] CRAIGE V, TRENERRY, ROBERT J W, et al. Determination of morphine and related alkaloids in crude morphine, poppy straw and opium preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1995, 7(18): 217-225.

[17] 廖文娟,张虹,任一平. 液相色谱-串联四极杆质谱法测定罂粟壳主要成分在止咳药中的含量[J]. 分析化学, 2006, 34(8): 1175-1178.

[18] 毛丹,简龙海,郑荣,王珂,等. 火锅食品中罂粟壳生物碱的液相色谱-串联质谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(1): 88.