

超高效液相-串联质谱法测定食品中罂粟壳成分

张子臣¹, 杜国辉², 曹 宁³, 刘建洋¹, 朱爱国^{4*}

(1. 山东标准检测技术有限公司, 济南 250100; 2. 山东商业职业技术学院, 济南 250100;
3. 中华全国供销合作总社济南果品研究院, 济南 250100; 4. 山东省农业科学院试验基地, 济南 250100)

摘 要: **目的** 建立超高效液相-串联质谱法测定食品中罂粟壳成分的分析方法。**方法** 罂粟壳经乙腈提取后, 经 PCX 固相萃取柱净化, 选择 BEH HILIC 柱(粒径 1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm), 以含 0.1%甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵溶液和甲酸乙腈溶液(0.1%)作为流动相进行梯度洗脱, 在 0.3 mL/min 流速下, 以多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描模式进行检测, 外标法定量。**结果** 吗啡、可待因在 25~250 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内, 回收率为 68.30%~80.81%。罂粟碱、那可丁、蒂巴因在 0.5~2.5 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内, 回收率为 68.34%~78.91%。本方法罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因定量限分别为 0.5、0.5、0.5、25、25 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 该方法简便、快速、可靠, 可用于各种食品中罂粟壳生物碱的快速筛查与确证。

关键词: 罂粟壳; 罂粟碱; 吗啡; 前处理方法; 液相色谱质谱联用法

Determination of *Pericarpium Papaveris* in food by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Zi-Chen¹, DU Guo-Hui², CAO Ning³, LIU Jian-Yang¹, ZHU Ai-Guo^{4*}

(1. Shandong Standard Testing Technology Co., Ltd., Ji'nan 250100, China; 2. Shandong Institute of Commerce and Technology, Ji'nan 250100, China; 3. Jinan Fruit Research Institute All China Federation of Supply and Marketing Co Operatives, Ji'nan 250100, China; 4. Shandong Academy of Agricultural Sciences Test Base, Ji'nan 250100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of *Pericarpium papaveris* in food. **Methods** After extraction with acetonitrile, *Pericarpium papaveris* was purified by PCX solid phase extraction column. The liquid was performed on BEH HILIC (1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm) with gradient elution of 10 mmol/L ammonium acetate solution (containing 0.1% formic acid) and acetonitrile (containing 0.1% formic acid), and the flow rate was 0.3 mL/min. The sample was detected in multiple reaction monitoring (MRM) scan mode, and quantified by external standard method. **Results** The recoveries rate of morphine, codeine in the range of 25–250 $\mu\text{g/kg}$ was 68.30%–80.81%. The recoveries rate of papaverine, nacodin and thebaine in the range of 0.5–2.5 $\mu\text{g/kg}$ was 68.34%–78.91%. The quantitative limits of papaverine, nacodin, thebaine, morphine and codeine of the method were 0.5, 0.5, 0.5, 25, 25 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** This method is simple, fast and reliable, which can be used for rapid screening and confirmation of poppy shell alkaloids in various foods.

KEY WORDS: *Pericarpium papaveris*; papaverine; morphine; pretreatment method; liquid chromatography-mass spectrometry

*通讯作者: 朱爱国, 助理研究员, 主要研究方向为农业科研基地管理。E-mail: zagcg1968@163.com

*Corresponding author: ZHU Ai-Guo, Assistant Professor, China Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan Industrial North Road 202, Ji'nan 250100, China. E-mail: zagcg1968@163.com

1 引言

我国近年来食品中掺伪罂粟壳成分屡禁不止, 出现可能添加的食品已经从传统的火锅底料到麻辣烫、卤肉制品、各种肉汤、各种饮料等。对于不同品类的食品检测罂粟壳成分的方法研究较多, 但大部分只针对某一种食品, 局限性比较大。目前研究的检测方法主要有液相色谱-串联质谱法^[1]、气质联用法^[2]、气相色谱法^[3]、液相色谱法^[4]、酶联免疫法^[5]、薄层法^[6]、示波极谱法^[7]、化学检测法^[8]、荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法^[9]等检测方法。2018 年市场监管总局关于发布《食品中吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁和蒂巴因的测定》食品补充检验方法的公告^[10], 该公告中的方法也是采用的液质法。相比较其他几种检测方法, 液相色谱-串联质谱法更加快速准确抗干扰。

本研究建立了一种通用的测定食品中罂粟壳成分的检测方法, 简单、准确、快速的测定食品中罂粟壳成分, 以期食品安全检测提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

Waters ACQUITY™ UPLC I-Class XEVO TQS-micro 超高效液相-串联三重四级杆质谱联用仪(沃特世公司); ACQUITY™ UPLC BEH HILIC(3.0 mm×100 mm, 1.7 μm)、TGL-20bR 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); PCX 阳离子交换柱: 60 mg/3 mL(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

吗啡、可待因、蒂巴因、盐酸罂粟碱、那可丁(混合标准溶液, 上海安谱公司); 乙腈、甲醇、乙酸铵、甲酸、乙酸(色谱纯, 德国默克公司); 三氯乙酸、氨水、正己烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水(杭州娃哈哈集团)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

称取 2 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚四氟乙烯具塞离心管中, 固体样品、半固体样品加入 10 mL 温水, 涡旋振荡 30 s, 液体直接加 1%乙酸-乙腈 10 mL 提取液, 超声提取 15 min 后, 加入 2 g 氯化钠, 涡旋振荡 30 s, 以 8000 r/min 冷冻离心 5 min, 取 2 mL 上清液加入 8 mL 1%三氯乙酸溶液, 待净化。

将阳离子交换小柱连接到真空过柱装置。将待净化溶液上柱, 依次用 3 mL 水、3 mL 2%甲酸水溶液和 3 mL 甲醇洗涤柱子并彻底抽干, 最后用 5 mL 的 5%氨水甲醇溶液洗脱柱子上的待测成分。流速控制在 1 mL/min。洗脱液在 40 °C 水浴下氮气吹干。

初始流动相定容至 1 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 滤液

待液相色谱-串联质谱检测。

2.2.2 色谱条件

色谱柱: BEH HILIC 柱(粒径 1.7 μm, 2.1 mm×100 mm), 或性能相当者; 进样量: 2 μL; 柱温: 40 °C; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: A 相: 含 0.1 %甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵溶, B 相: 甲酸乙腈溶液(0.1%)液, 按表 1 进行梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient eluting procedure

时间/min	A 相/%	B 相/%
0.00	10.0	90.0
0.30	10.0	90.0
1.00	20.0	80.0
2.50	20.0	80.0
3.00	10.0	90.0
6.00	10.0	90.0

电喷雾离子源(ESI+); 扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 3.2 kV(+); 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气(N₂)温度: 550 °C; 脱溶剂气流量: 1000 L/h; 锥孔气流量: 120 L/h; 碰撞气(Ar)流速: 2.5 L/h, 离子扫描信息见表 2。5 种待测物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 5 种化合物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压
Table 2 Qualitative ion pairs, quantitative ion pairs, declustering meters of 5 compounds

组分名称	离子对(<i>m/z</i>)	锥孔电压/eV	碰撞能量/eV
罂粟碱	340.20/202.27*	26	24
	340.20/171.24		36
吗啡	286.14/152.32*	58	54
	286.14/1127.90		62
那可丁	414.20/220.23*	60	44
	414.20/205.33		22
可待因	299.90/58.11*	46	26
	299.90/215.24		24
蒂巴因	312.00/58.11*	28	12
	312.00/2519.20		14

*代表定量离子。

3.1 结果与分析

3.1.1 提取液的选择

本研究对 1%三氯乙酸^[11]、1%乙酸-乙腈^[12,13]、0.1 mol/L 盐酸溶液提取液进行了比较, 实验证明 1%三氯乙酸对于吗啡和可待因不用内标的情况下, 熟肉制品

的回收不到 50%, 0.1 mol/L 盐酸溶液提取率相对高一些, 对于复杂基质的火锅底料、麻辣烫底料样品, 提取出来的杂质也较多, 后续净化困难, 整体回收效率低。1%乙酸-乙腈直接提取, 蛋白质较多的样品沉淀效果明显, 提取效率较前 2 种方法更高一些。因此选择 1%乙酸-乙腈作为提取液。

3.1.2 净化方法的选择

经实验发现 QuEChERS^[14]方法净化, 针对基质较为复杂的样品, 效率并不理想, 对仪器的耐受力要求较高。本研究对比了 HLB、MCX 和 PCX 三款柱子, 从净化效果来看, MCX 和 PCX 较 HLB 更好, MCX 和 PCX 比较, PCX 回收损失更小, 同时净化效率较 MCX 高。因此提取后稀释 5 倍后再上 PCX 柱净化, 可以除去更多的基质效应^[15,16]。

3.2 液相色谱柱的选择

本研究比较了实验室常用的 BEH C₁₈ 柱、ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱、BEH T3 柱, BEH C₁₈ 柱和 BEH T3 柱对于罂粟壳的 5 种成分的保留分离能力较弱, 保留时间不到 1 min, 峰型一般。经验证 ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱保留时间在 1~3.5 min 之间, 峰型对称, 最终选择 UPLC BEH HILIC 柱。

3.3 质谱条件的优化

利用 Waters UPLC I-Class XEVO TQS-micro 超高效

液相-串联三重四级杆质谱联用仪的自动优化功能, 对 5 种罂粟壳成分进行了逐一优化, 找到了最佳的定性离子对、定量离子对、锥孔电压及碰撞能量, 见表 2。

3.4 线性范围和检出限

将配制好的标准溶液上机检测, 以质量浓度(X , ng/L)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制 5 种罂粟壳生物碱的标准曲线。其中吗啡在 10~500 ng/L 浓度范围内呈现良好的线性关系, 可待因在 10~500 ng/L 浓度范围内呈现良好的线性关系, 蒂巴因、盐酸罂粟碱和那可丁在 0.10~5.0 ng/L 浓度范围内呈现良好的线性关系 r^2 均大于 0.997。空白样品添加 5 种罂粟壳生物碱的定量检出限 (limit of quantitation, LOQ), ($S/N \geq 10$)见表 3。

3.5 回收率

向麻辣烫料、火锅底料、熟牛肉阴性样品中添加低、中、高 3 个水平的混合中间使用液, 其中, 罂粟碱、那可丁、蒂巴因为 0.5、2.5、5 $\mu\text{g/kg}$, 吗啡、可待因的添加水平为 25、125、250 $\mu\text{g/kg}$ 。按 2.2.1 中所述方法计算加标回收率, 结果如表 4 所示。结果表明, 5 种罂粟壳生物碱的平均回收率为 68.34~80.81%, 该方法适用快速鉴别或定量检测食品中 5 种罂粟壳生物碱, 其中部分加标回收率较低主要原因是样品基质复杂, 可以适当的选取内标物质提高样品回收率。

表 3 5 种生物碱的线性方程、相关系数和检出限
Table 3 Five kinds of alkaloids linear equation, correlation coefficient and detection limit

编号	名称	保留时/min	线性范围/(ng/mL)	线性方程	相关系数	定量限/($\mu\text{g/kg}$)
1	吗啡	3.12	10.00~500.00	$Y=-5344.62+793.311\times X$	0.9993	25
2	蒂巴因	2.46	0.10~5.00	$Y=-1950.2+24667.7\times X$	0.9983	0.5
3	可待因	2.83	10.00~500.00	$Y=-14813.1+1135.04\times X$	0.9979	25
4	罂粟碱	1.12	0.10~5.00	$Y=-12796+513581\times X$	0.9989	0.5
5	那可汀	1.01	0.10~5.00	$Y=-18066.2+298230\times X$	0.9986	0.5

表 4 5 种罂粟壳生物碱在 3 种不同基质中的回收情况
Table 4 Recovery of five poppy shell alkaloids in three different substrates

化合物	(火锅底料) 回收率/%	(麻辣烫料) 回收率/%	(熟牛肉) 回收率/%
罂粟碱	71.83~78.76	73.14~78.62	69.09~75.74
那可汀	76.90~70.38	71.12~78.91	69.87~75.19
蒂巴因	68.34~73.94	70.76~76.28	70.67~75.61
吗啡	70.18~78.93	73.17~80.81	68.30~73.93
可待因	69.34~73.62	70.73~76.14	69.44~74.95

4 结 论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中 5 种罂粟碱的分析方法, 在净化样品中采用了 PCX 固相萃取的前处理方法, 有效去除了杂质对目标检测物的干扰, 减少了基质效应, 同时优化了仪器检测参数, 提高了检测的灵敏度。该方法灵敏度高, 选择性好, 线性关系、回收率等方法学指标较好, 能够同时快速检测食品中 5 种罂粟壳生物碱, 为食品行业中 5 种常见的罂粟壳生物碱的监测提供了技术支持。

参考文献

- [1] 刘红, 魏柳珍. 食品中罂粟壳成分残留检测技术及前处理技术研究进展[J]. 药物分析杂志, 2017, (10): 1747-1753.
Liu H, Wei LZ. Research progress in detection techniques and pretreatment techniques for the *Pericarpium Papaveris* residues in foods [J]. Chin J Pharm Anal, 2017, (10): 1747-1753.
- [2] 张艳萍, 廖华乐, 肖兵. GC/MS 测定食品中罂粟碱和吗啡含量[J]. 卫生研究, 2011, (4): 100-101.
Zhang YP, Liao HL, Xiao B. Determination of papaverine and morphine in Food by GC/MS [J]. J Hyg Res, 2011, (4): 100-101.
- [3] 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.
Li YF, Fu YH, Hou XY. Study and application of determination of *Pericarpium Papaveris* residues in food by gas chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2000, 10(1): 38-40.
- [4] 皮立, 胡凤祖, 师治贤. 高效液相色谱-荧光检测法测定罂粟籽和火锅汤料中的罂粟碱[J]. 色谱, 2005, (6): 78-80.
Pi L, Hu FZ, Shi ZX. Determination of papaverine in seeds of papaver somniferum l. and soup of chafing dish by high performance liquid chromatography-fluorescence detection [J]. Chin J Chromatogr, 2005, (6): 78-80.
- [5] 张东升, 蔡建荣, 蔡正森. ELISA 法快速测定火锅底料及调料中的罂粟碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, (2): 82-83.
Zhang DS, Cai JR, Cai ZS. Rapid determination of papaverine in hotpot base and seasoning by ELISA [J]. Chin J Health Lab Technol, 2004, (2): 82-83.
- [6] 孙立波, 李静, 李杨. 薄层扫描法测定烧(电)烤食品中阿片生物碱含量[J]. 中国公共卫生, 1998, (11): 28-29.
Sun LB, Li J, Li Y. Determination of opioid alkaloids in roasted (electric) roasted foods by TLC scanning [J]. Chin J Public Health, 1998, (11): 28-29.
- [7] 陶锐, 高舸, 杨元. 火锅汤料中吗啡的示波极谱测定[J]. 中国卫生检验杂志, 1994, (3): 14-17.
Tao R, Gao K, Yang Y. Oscillopolarographic determination of morphine in hotpot soup [J]. Chin J Health Lab Technol, 1994, (3): 14-17.
- [8] 黄卫平. 食品中罂粟壳残留检测方法[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(1): 111-113.
Huang WP. *Pericarpium papaveris* residues detection method in food [J]. Chin J Public Health, 2002, 18(1): 111-113.
- [9] 高琴, 宗凯, 杨捷琳. 食品及调味品中罂粟成分的实时荧光 PCR 检测方法[J]. 中国调味品, 2016, 41(12): 113-117.
Gao Q, Zong K, Yang JL. Detection of Papaver somniferum food and condiment by real-time PCR [J]. Chin Condiment, 2016, 41 (12): 113-117.
- [10] 市场监管总局关于发布《食品中吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁和蒂巴因的测定》食品补充检验方法的公告[DB/OL]. [2018-04-19]. http://www.gov.cn/xinwen/2018-04/19/content_5284110.htm.
General administration of market supervision on the release of the food morphine, codeine, papaverine, naltrexate and thebaine determination of the beverage γ -butyrolactone and related substances [DB/OL]. [2018-04-19]. http://www.gov.cn/xinwen/2018-04/19/content_5284110.htm.
- [11] 范忠刚, 孙海新, 孙丕春, 等. 熟肉制品中罂粟壳成分的液相色谱-串联质谱检测方法研究[J]. 中国食品添加剂, 2017, (3): 157-161.
Fan ZG, Sun HX, Sun PC, et al. Study of the determination of *Papaveris pericarpium* in cooked meat by LC-MS/MS [J]. China Food Addit, 2017, (3): 157-161.
- [12] 刘晓茂, 杨志伟, 崔宗岩. 固相萃取-液质联用测定火锅底料中 5 种生物碱[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(22): 144-148.
Liu XM, Yang ZW, Cui ZY. Determining of five alkaloids residues in hotpot seasoning using solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2016, 37(22): 144-148.
- [13] 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, (17): 2481-2484.
GU WJ, Zhou CY, Tang XQ, et al. Simultaneous determination of 5 alkaloids in foods by solid-phase extraction coupled with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, (17): 2481-2484.
- [14] Lee S, Park Y, Han E, et al. Thebaine in hair as a marker for chronic use of illegal opium poppy substances [J]. Forensic Sci Int, 2011, 204(1-3): 115-118.
- [15] 张林田, 黄少玉, 陆奕, 等. 固相萃取/HPLC-MS/MS 检测食品中吗啡等五种罂粟壳生物碱残留[J]. 分析实验室, 2014, 33(6): 722-725.
Zhang LT, Huang SY, Lu Y, et al. Determination of morphine and other four *Pericarpium papaveris* alkaloid residues in hot pot seasonings and snack foods by solid phase extraction and HPLC-MS/MS [J]. Chin J Anal Lab, 2014, 33(6): 722-725.
- [16] 张子臣, 李凯, 许彤宇, 等. 液相色谱质谱联用法测定食品中罂粟壳成分的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3368-3375.
Zhang ZC, LI K, XU TY, et al. Research progress in liquid chromatography-mass spectrometry for detection of *Pericarpium Papaveris* residues [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(13): 3368-3375.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



张子臣, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为农兽药残留分析/食品安全研究。
E-mail: sst_zzc@163.com

朱爱国, 助理研究员, 主要研究方向为
主要研究方向为农业科研基地管理。
E-mail: zagcg1968@163.com