

QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定 火锅调料中罂粟壳

尹 华*, 陆卫明

(常熟市疾病预防控制中心, 常熟 215500)

摘 要: **目的** 建立 QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定火锅调料中的吗啡、可待因、罂粟碱、蒂巴因、那可丁 5 种生物碱含量的方法。**方法** 样品通过 QuEChERS 法处理后, 样品液采用 C₁₈ 色谱分离柱, 以 10 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.1%甲酸)-乙腈(含 0.1%甲酸)作为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾正离子多反应监测模式检测。**结果** 吗啡、可待因的线性范围为 5.0 ~ 250.0 ng/mL, 相关系数为 0.9990 ~ 0.9994, 最低检出限为 2.0 ng/mL, 罂粟碱、那可丁、蒂巴因的线性范围为 1.0 ~ 50.0 ng/mL, 相关系数为 0.9998 ~ 0.9999, 最低检出限为 0.1 ng/mL。平均回收率为 84.5% ~ 100.5%, 相对标准偏差为 0.8% ~ 3.1%。**结论** 该方法快速、简单、灵敏、准确, 适用于火锅调料中罂粟壳的检测。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; QuEChERS; 罂粟壳; 火锅调料

Determination of poppy husk in hotpot seasoning by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YIN Hua*, LU Wei-Ming

(Changshu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changshu 215500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of morphine, codeine, papaverine, thebaine, narcotine in hotpot seasoning by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The sample was processed by the QuEChERS method, then separated by C₁₈ chromatographic column using 10 mmol/L ammonium formate solution (containing 0.1% formic acid)-acetonitrile (containing 0.1% formic acid) as the mobile phase for gradient elution, and detected by electrospray positive ion under multiple reaction monitoring mode detection. **Results** The linear ranges of morphine and codeine were 5.0–250.0 ng/mL, the correlation coefficients were 0.9990–0.9994, the minimum detection limit was 2.0 ng/mL, the linear ranges of papaverine, nacodine and theibain were 1.0–50.0 ng/mL, the correlation coefficients were 0.9998–0.9999, and the minimum detection limit was 0.1 ng/mL. The average recovery rates were 84.5%–100.5%, and the relative standard deviations were 0.8%–3.1%. **Conclusion** This method is rapid, simple, sensitive and accurate, and suitable for the detection of poppy shell in hotpot seasoning.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS; poppy shell; hotpot seasoning

*通讯作者: 尹华, 副主任技师, 主要研究方向为食品检验。E-mail: yinhua970@163.com

*Corresponding author: YIN Hua, Associate Chief Technician, Center for Disease Control and Prevention of Changshu, No.6, Fuyang Road, Changshu, Jiangsu 215500, China. E-mail: yinhua970@163.com

1 引 言

火锅一直深受我国老百姓的喜爱,但是,近年来一些不法商贩为了吸引顾客、牟取暴利,在火锅及其调味料中添加罂粟壳。罂粟壳是罂粟壳植物采完阿片后干燥成熟果壳,内含罂粟碱(papaverine)、吗啡(morphine)、可待因(codeine)、蒂巴因(thebaine)、那可丁(narcotine)等多种生物碱。长期食用添加了罂粟壳的食物会使人上瘾,对身体造成很大的危害。所以国家禁止在火锅底料中添加罂粟壳。

测定罂粟碱等生物碱的主要检测方法有分光光度法、层析法、毛细管电泳法、示波极谱法、高效液相色谱法等^[1-5]。样品前处理主要有溶剂提取法、固相萃取法等^[6-10]。但是这些方法检出率低、前处理复杂繁琐。本研究建立 QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定火锅调料中的吗啡、可待因、罂粟碱、蒂巴因、那可丁 5 种生物碱含量,为严格监测火锅调料中的吗啡、可待因、罂粟碱、蒂巴因、那可丁 5 种生物碱含量提供有力依据。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1200 分析型高效液相色谱、Agilent 6420 高效液相色谱串联质谱,配有 ESI 源和 MassHunter B 05.00 质谱数据系统(美国 Agilent 公司);特鲁斯 TW-400 可视氮吹仪[氮吹仪(天津特鲁斯科技有限公司);TDZ4B-WS 离心机(上海卢湘仪公司)。

甲酸铵、甲酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);盐酸(优级纯)、氢氧化钠(分析纯)(上海凌峰化学试剂有限

公司);乙腈(色谱纯)、dSPE 萃取管(SBEQ-CA8113-1-B)、分散固相萃取(dispersive solid phase extraction, dSPE)纯化管(SBEQ-CA8423-20)、标准品溶液(吗啡、可待因为 50 mg/L,罂粟碱、蒂巴因、那可丁为 10 mg/L)(上海安谱科学仪器有限公司)。

火锅调料来自于常熟市火锅店抽检样品。

2.2 仪器分析条件

2.2.1 液相色谱条件

色谱柱: Agilent SB-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm,), 流动相为: B 相为乙腈(含 0.1%甲酸): D 相为 10 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.1%甲酸),梯度洗脱(表 1);流速 0.3 mL/min;柱温 40 ℃;进样体积 5 μL,平衡时间 12 min。

2.2.2 质谱条件

采用离子源为 ESI, 正离子;离子喷雾电压: 4000 V;雾化气: 氮气, 40 psi;干燥气: 氮气, 流速 10 L/min, 温度 350 ℃;碰撞气: 氮气;检测方式为多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM)方式, MRM 参数见表 2。

表 1 分离生物碱的最佳梯度洗脱表
Table 1 Best gradient elution table for alkaloid separation

时间/min	B 相/%	D 相/%
0	5	95
3	5	95
8	45	55
11	45	55
11.1	95	5
13	95	5

表 2 MRM 模式下质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters in MRM mode

目标物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞诱导解离/V	碰撞池能量/V	加速电压/V	后运行时间/min
吗啡	286	201	80	30	4	1.32
		181	80	40	4	1.32
		165*	80	45	4	1.32
可待因	300	199	100	35	4	3.9
		165	100	50	4	3.9
		153*	100	45	4	3.9
蒂巴因	312	251	80	25	4	9.54
		248.9	80	17	4	9.54
		58*	80	5	4	9.54
罂粟碱	340	324	80	30	4	10.15
		202*	80	25	4	10.15
那可丁	414	353	80	25	4	10.25
		220*	80	25	4	10.25

注: *为定量离子。

2.3 标准曲线配制

将吗啡、可待因含量为 50 mg/L, 罂粟碱、蒂巴因、那可丁含量为 10 mg/L 的混标溶液用 0.1% 的甲酸水溶液配制成吗啡、可待因浓度为 5.0 ~ 250.0 ng/mL, 罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 1.0 ~ 50.0 ng/mL 的系列标准工作溶液。临用现配。

2.4 样品处理

QuEChERS 法称取火锅调料 2 g, 加入 50 mL 具塞聚四氟乙烯 (poly tetra fluoroethylene, PTFE) 瓶内, 加 5 mL 0.1 mol/L 盐酸, 超声提取 30 min, 以 1 mol/L 氢氧化钠调至中性, 然后加入 15 mL 乙腈, 漩涡 1 min, 之后加 6 g 硫酸镁和 1.5 g 无水醋酸钠(dSPE 萃取), 漩涡 1 min, 4000 r/min 离心 4 min, 取 1.5 mL 上清液加入 dSPE 提取管中(含有 100 mg 硫酸镁和 50 mg N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)、100 mg C₁₈ 吸附剂), 漩涡 1 min, 10000 r/min 离心 2 min。取 1 mL 上清液氮吹干, 以 0.1% 甲酸水溶液定容, 过 0.2 μm 膜上液质测定。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

本研究比较了乙酸铵-甲醇、甲酸铵-甲醇、甲酸铵-乙腈作为流动相^[12,13], 对加标样品进行检测。实验发现乙酸铵-甲醇、甲酸铵-甲醇作为流动相时分析时间比较长, 而

且峰形有拖尾。而甲酸铵-乙腈作为流动相时分析时间可以缩短, 峰形得到明显改善, 基线也更加平稳。所以本方法最终采用了甲酸铵-乙腈作为流动相, 并且在流动相中添加了甲酸(含量为 0.1%), 这样保证了流动相体系的 pH 值在 4.5, 有利于目标物的分离和灵敏度的提高。因为流动相的 pH 值对目标化合物在分析柱上的吸附及分离非常重要, 可直接影响离子化效率和离子交换程度^[14,15]。

为了能够使目标化合物更好的分离和获得更高的灵敏度, 采用梯度洗脱。并且设置了后运行时间。在实验中发现, 如果后运行时间不够, 梯度洗脱后体系不能完全平衡, 会导致目标化合物不能被检测, 经过实验把后运行时间设置为 12 min, 最终保证目标化合物的检出(图 1~图 6)。

3.2 样品前处理方法的选择

由于火锅底料分析样品含有大量的脂肪酸和色素, 本研究比较了液液萃取法、HLB 固相萃取法和 QuEChERS 法。液液萃取法采用有机溶剂乙腈来进行萃取, 发现杂质干扰明显, 回收率不高; HLB 固相萃取法耗时长, 灵敏度和回收率低; 而采用 QuEChERS 法来处理样品, 不仅杂质无明显干扰, 而且灵敏度和回收率高, 分析时间也大大缩短。QuEChERS 样品前处理法, 通过加入无水醋酸钠可以促进生物碱由水相转移至有机相, 再用无水硫酸钠去除水相。加入 PSA 可以有效去除脂肪酸, C₁₈ 可以去除色素、甾醇^[11], 这样可以获得基质干扰较少的样品溶液, 有利于样品的检测, 所以最终选择 QuEChERS 法来处理样品。

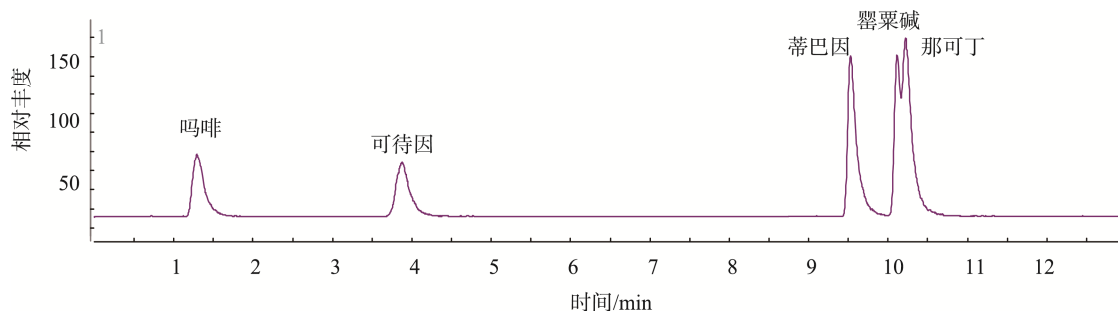


图 1 5 种生物碱总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of 5 alkaloids

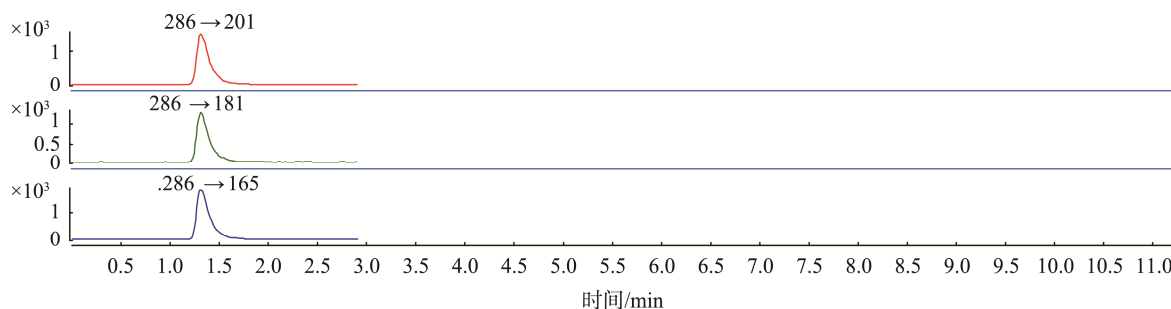


图 2 吗啡标准品的 MRM 色谱图

Fig.2 MRM chromatogram of morphine standard

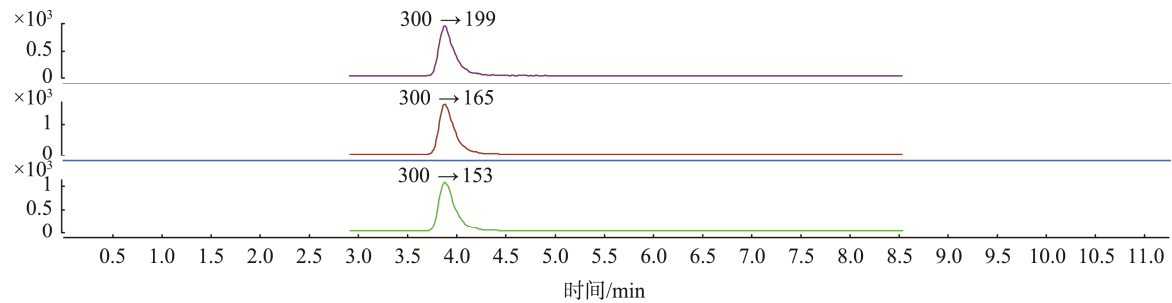


图 3 可待因标准品的 MRM 色谱图
Fig.3 MRM chromatogram of codeine standard

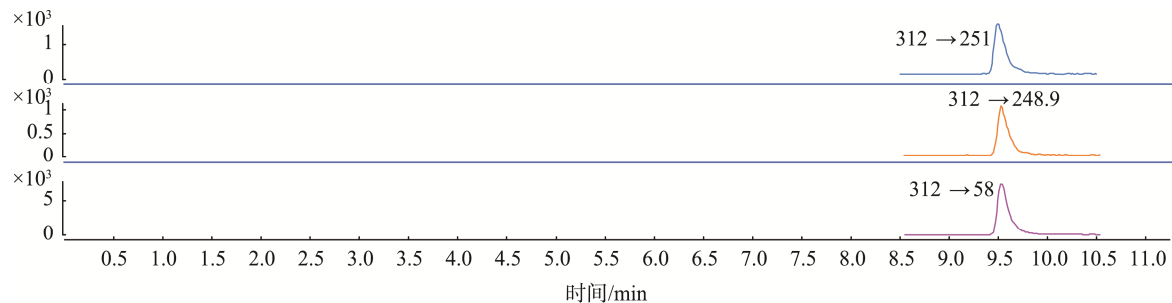


图 4 蒂巴因标准品的 MRM 色谱图
Fig.4 MRM chromatogram of tibain standard

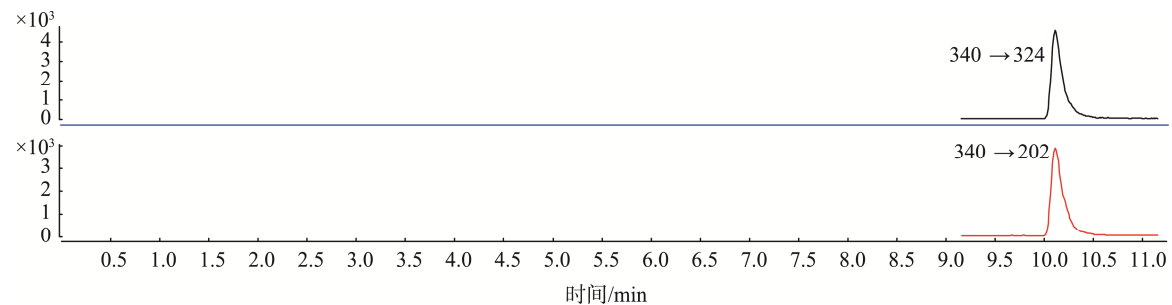


图 5 罂粟碱标准品的 MRM 色谱图
Fig.5 MRM chromatogram of papaverine standard

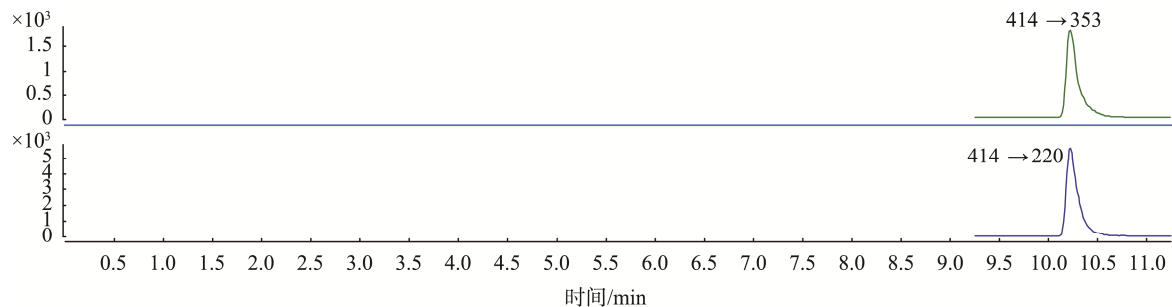


图 6 那可丁标准品的 MRM 色谱图
Fig.6 MRM chromatogram of nacotin standard

3.3 线性范围和检出限

在上述仪器条件下,在吗啡、可待因浓度为 5.0 ~ 250.0 ng/mL,罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 1.0~

50.0 ng/mL 的浓度范围内,吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁、蒂巴因的浓度和峰面积有良好的线性关系,以 3 倍噪音计算其检出限,符合检测要求(表 3)。

表 3 吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可丁标准曲线方程、回归系数和检出限

Table 3 Standard curve equations, regression coefficients and detection limits of morphine, codeine, thebaine, papaverine and nacodin			
目标物	回归方程	相关系数	检出限/(ng/mL)
吗 啡	Y=37.6357X-77.084	0.9990	2.0
可待因	Y=48.2759X-131.67	0.9994	2.0
蒂巴因	Y=1009.89X-84.105	0.9999	0.1
罂粟碱	Y=549.500X-148.08	0.9998	0.1
那可丁	Y=577.121X+30.784	0.9999	0.1

3.4 准确度和精密度试验

取一份吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁、蒂巴因都低于检出限的样品为模拟样品。称取 18 等份, 分为 3 组, 每份质量为 2.0 g, 分别加入不同浓度的标准品混合液, 制备成高中低 3 种浓度的样品, 按上述条件测定, 准确度与精密度都比较好(表 4)。

3.5 方法应用

2019 年常熟市监督所对几家火锅店进行了抽查检测, 共 50 份样品, 应用本方法进行检测, 结果均未检出。

表 4 吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可丁的准确度和精密度(%)
Table 4 Accuracy and precision of morphine, codeine, thebaine, papaverine and nacodine (%)

目标物	低浓度		中浓度		高浓度	
	平均回收率	相对标准偏差	平均回收率	相对标准偏差	平均回收率	相对标准偏差
吗啡	85	3.1	89.2	2.9	90.1	1.6
可待因	92	2.1	88.1	1.6	88.8	0.9
蒂巴因	95	1.1	98	1.2	100.5	0.8
罂粟碱	94	2.1	84.5	1.8	88.5	1.6
那可丁	92	2.3	87	2.1	86.5	1.9

4 结 论

火锅调料中的吗啡、可待因、罂粟碱、蒂巴因、那可丁 5 种生物碱含量的检测方法目前还没有国家标准方法。国家市场监督管理总局推荐的补充检验方法 BJS 201802《食品中吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁和蒂巴因的测定》^[16]中样品用水或盐酸溶液分散均匀, 用乙腈提取后, 经盐析处理, 离心, 取上清液用液相色谱-串联质谱仪检测。此方法提取的上清液不够纯净, 容易受到基质的干扰, 造成灵敏度低, 回收率不高。本研究采用的 QuEChERS 法处理样品, 上清液比较纯净, 无明显的基质干扰, 高效液相色谱-串联质谱法检测灵敏度和回收率高。

火锅调料通过 QuEChERS 法处理, 高效液相色谱-串联质谱法进行检测, 该方法快速、简单、准确度高、精密度好, 提高了分析效率, 缩短了分析时间, 适合于日常样品的检测。

参考文献

[1] Hsu AF, Dorothy B, Ronsld BE, *et al.* Radioimmunoassay for quantitative determination of morphine in capsules of *Papaver somniferun* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(7): 1665-1669.

[2] 王建新, 陈文汇, 王彬, 等. 火锅汤料中罂粟壳成分的高效液相色谱检测法[J]. *职业与健康*, 2004, 20(6): 56.

Wang JX, hen WH, Wang B, *et al.* Determination of poppy shell in hot pot soup by HPLC [J]. *Occupat Health*, 2004, 20(6): 56.

[3] 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]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(12): 93-97.

Zhang H, Liao WJ, Cai ZX, *et al.* Determination of alkaloid residues in foods mixed with poppy shells by LC-MS [J]. *Food Ferment Ind*, 2005, 31(12): 93-97.

[4] 王力清, 酆明浩, 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): 168-171.

Wang LQ, Li MH, Li JQ, *et al.* Rapid and high-throughput determination of alkaloids in poppy shell by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Ferment Ind*, 2012, 38(8): 168-171.

[5] 王柯, 郑荣, 简龙海, 等. 火锅调料中 5 种生物碱成分的液相色谱-串联质谱法[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(2): 363-365.

Wang K, Zheng R, Jian LH, *et al.* Liquid chromatography tandem mass spectrometry of five alkaloids in hot pot seasoning [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(2): 363-365.

[6] 洪萍, 徐陆妹, 楼冰冰, 等. QuEChERS 方法及其在农药残留分析中的应用进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(4): 756-758.

Hong P, Xu LM, Lou BB, *et al.* QuEChERS method and its application in pesticide residue analysis [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2008, 18(4): 756-758.

[7] 刘敏敏, 张朝正, 李廷志, 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 MM, Zhang CZ, Li YZ, *et al.* Determination of poppy shell in hot pot bottom material by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Res Dev*, 2012, 33(12): 91-94.

[8] 毛丹, 简龙海, 郑荣, 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, 1: 90.
- Mao D, Jian LH, Zheng R, *et al.* Determination of papaverine alkaloids in hot pot food by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Environ Health, 2012, (1): 90.
- [9] 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, (4): 100–101.
- Zhang YP, Liao HL, Xiao B, *et al.* Determination of papaverine and morphine in food by GC/MS [J]. J Hyg Res, 2011, (4): 100–101.
- [10] 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): 55.
- Wang LL, Liu Z. Determination of alkaloids in food by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Mod Prev Med, 2005, (1): 55.
- [11] 王越, 马丽霞, 田微. 火锅底料中罂粟壳的高效液相色谱法测定[J]. 色谱, 1999, (4): 401–402.
- Wang Y, Ma LX, Tian W. Determination of poppy shell in chafing dish by HPLC [J]. Chin J Chromatogr, 1999, (4): 401–402.
- [12] 张林田, 史佳虹, 杨晞, 等. 火锅底料及小吃类食品中非法添加罂粟壳的危害及检测技术研究进展[J]. 福建分析测试, 2014, (3): 108–111.
- Zhang LT, Shi JH, Yang X, *et al.* Research progress on harm and detection technology of poppy shell illegally added in hot pot bottom materials and snacks [J]. Fujian Anal Test, 2014, (3): 108–111.
- [13] 谷岩, 刘广福, 张元, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定汤料中罂粟壳提取物残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2011, (12): 41–43.
- Gu Y, Liu GF, Zhang Y, *et al.* Determination of poppy shell extract residue in soup by SPE-HPLC [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2011, (12): 41–43.
- [14] 冯丽娟. 食品中罂粟壳成分检测方法研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- Feng LJ. Study on the determination method of poppy shell in food [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2009, (3): 72–75.
- [15] 刘艳琴, 王浩, 杨红梅, 等. 液相色谱-质谱联用技术测定食品中罂粟碱残留[J]. 食品研究与开发, 2010, (7): 138–140.
- Liu YQ, Wang H, Yang HM, *et al.* Determination of papaverine residue in food by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2010, (7): 138–140.
- [16] BJS 201802 食品中吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁和蒂巴因的测定[S]. BJS 201802 Determination of morphine, codeine, papaverine, nicotine and tibaine in food [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



尹 华, 副主任技师, 主要研究方向
为食品检验.
E-mail: yinhua970@163.com