

三重四极杆质谱法快速检测火锅酱料中罂粟壳生物碱成分的残留

LCMSMS-139

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定火锅酱料中罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因等五种生物碱的分析方法。火锅酱料经适当的样品前处理后,用超高效液相色谱分离,三重四极杆质谱仪进行定量分析。吗啡等五种物质在各自的浓度范围内线性良好,相关系数在 0.9991~0.9998 范围内,方法检出限在 0.30~4.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,定量限在 1.0~15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。火锅酱料基质加标三个不同浓度进行回收率方法验证,所得回收率范围为 68%~100%,精密密度 RSD% 均在 14.8% 以下,回收率和精密密度均符合《GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测》,检测方法确认的技术要求。

关键词: 火锅酱料 罂粟壳 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

罂粟壳(Pericarpium Papaveris)为罂粟科植物罂粟采完鸦片后的干燥成熟果壳,含有 20 多种生物碱,其中以吗啡(Morphine)、可待因(Codeine)、那可丁(Narcotine)、罂粟碱(Papavarine)、蒂巴因(Thebaine)等为主要成分。罂粟壳中的生物碱会使人嗜睡和性格改变,引起某种程度的惬意和欣快感,可造成人注意力、思维和记忆性能的衰退,长期食用会引起精神失常,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易使消费者成瘾,长期食用者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。近日来,网上和电视频频曝光一些不法商家和饭店为了牟取暴利,在火锅、麻辣烫、牛肉粉、烤禽类等的汤料和辅料中添加罂粟壳及其水浸物等违禁原料,类似的例子有“段氏龙虾”汤底被曝添加罂粟壳粉,某酒家将罂粟壳磨成粉末添入了熬制卤水的卤水包当中,使食物味道鲜美,吸引更多的食客,让消费者“吃了还想吃”。坊间早有流传称,为了留住客人,一些酒家和大排档在酱料或汤底添加罂粟碱早已是业内招揽顾客的公开秘密,但一直以来都没有标准的检测方法作为依据,很难对不法商家进行惩治。全国首个针对火锅中罂粟碱等物质检测的食品安全地方标准从 2013 年 5 月起在上海实施,这项标准明确了火锅中可能出现的罂粟碱、吗啡、那可丁等五种成瘾性物质的测定方法。随着一些案件的曝光,食品中罂粟壳及其水浸物的残留对人体的危害逐渐引起了大家的关注。岛津三重四极杆串联质谱仪采用多反应监测模式,能有效的排除基质干扰,具有高效的分离效率,在确证罂粟壳成分的生物碱具有一定的优势。

本文建立岛津超高效液相色谱与三重四极杆串联质谱联用法快速分离、准确检测火锅酱料中罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因的残留,可以确证火锅酱料是否添加罂粟壳。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8030 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Kinetex C₁₈ 4.6 \times 100 mmL., 2.6 μm

流动相: A- 甲醇(含 0.1% 甲酸),

B-10 mmol/L 甲酸铵(含 0.1% 甲酸)

洗脱方式: 梯度洗脱(见表 1)

流速: 0.4 mL/min

进样体积: 20 μL

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

质谱条件

分析仪器: LCMS-8030

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度: 400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式: 多反应监测(MRM)

驻留时间: 50 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表1 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	80%
0.50	Pumps	Pump B Conc.	80%
1.00	Pumps	Pump B Conc.	50%
4.50	Pumps	Pump B Conc.	50%
5.00	Pumps	Pump B Conc.	80%
8.80	Controller	Stop	

表2 指定离子对MRM优化参数

化合物名称	英文名称	CAS号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3Pre Bias (V)
吗啡	Morphine	57-27-2	286.0	165.3 [*]	-18.0	-45.0	-11.0
			286.0	181.3	-30.0	-50.0	-19.0
可待因	Codeine	76-57-3	300.4	215.2 [*]	-14.0	-30.0	-16.0
			300.4	165.4	-14.0	-50.0	-30.0
罂粟碱	Papavarine	58-74-2	340.4	202.2 [*]	-17.0	-30.0	-15.0
			340.4	171.1	-17.0	-40.0	-19.0
蒂巴因	Thebaine	115-37-7	312.3	58.3 [*]	-15.0	-30.0	-23.0
			312.3	249.1	-15.0	-15.0	-13.0
那可丁	Narcotine	128-62-1	414.4	220.5 [*]	-21.0	-30.0	-25.0
			414.4	353.3	-21.0	-25.0	-26.0
吗啡-D ₃	Morphine-D ₃	67293-88-3	289.4	165.2 [*]	-14.0	-50.0	-23.0
			289.4	185.2	-30.0	-35.0	-23.0
可待因-D ₃	Codeine-D ₃	70420-71-2	303.5	165.2 [*]	-14.0	-50.0	-19.0
			303.5	215.3	-14.0	-25.0	-15.0

^{*}表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

精密称取吗啡、可待因、罂粟碱、蒂巴因和那可丁对照品 0.01 g 置于 10 mL 容量瓶中, 加入含 0.5% 甲酸的甲醇溶液溶解并定容至刻度即得标准储备液。分别取 0.5 mL 罂粟碱、那可丁、蒂巴因标准储备液和 2.5 mL 吗啡、可待因标准储备液于 10 mL 容量瓶中配制成混合标样浓度为 50 μg/mL 的罂粟碱、那可丁、蒂巴因和 250 μg/mL 的吗啡、可待因。

将 1.0 mg/mL 同位素标准物质吗啡 -D₃ 和可待因 -D₃ 用甲醇稀释成混标浓度为 5 μg/mL 的 2 种混合内标, 用流动相 B 稀释成混标浓度为 100 ng/mL 的内标。

采用逐级稀释的方法, 取 6 个具塞小瓶, 分别加入乙腈各 0.5 mL, 向第一个小瓶中加入 0.5 mL 混标, 取 0.5 mL 至第二个小瓶中, 混匀, 取 0.5 mL 至第三个小瓶中, 混匀; 按此对半稀释法, 依次制得标准曲线系列, 再向各小瓶

中加入 0.5 mL 浓度为 100 ng/mL 的同位素内标工作液，使得内标物的浓度为 50 ng/mL，标准曲线系列溶液含吗啡等各水平浓度的准确值见表 3。取标准曲线系列溶液 20 μ L 直接进样，以标准溶液浓度为横坐标，罂粟碱、那可丁、蒂巴因峰面积为纵坐标建立外标定量法，吗啡、可待因分别与其内标物吗啡-D₃ 和可待因-D₃ 的峰面积比值作为纵坐标建立内标定量法。

表3 标准品称量值和曲线系列浓度点 (ng/mL)

名称	称样量 (g)	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6
吗啡	0.01100	3.34	6.68	13.35	26.7	53.4	106.8
可待因	0.01225	2.87	5.74	11.48	23.0	45.9	91.9
罂粟碱	0.01318	0.743	1.486	2.97	5.94	11.9	23.8
蒂巴因	0.01170	0.731	1.46	2.92	5.85	11.7	23.4
那可丁	0.00993	0.621	2.48	4.96	9.93	19.86	39.7

1.3.2 样品前处理方法

精密称取 2.0 g 供试品（精确到 0.01g），置于 250 mL 具塞锥形瓶中，加入 150 μ L 同位素内标工作液 5 μ g/mL，再加入 5 mL 水，超声（必要时在摇床温热水中振摇片刻）使样品分散均匀，加入 15 mL 乙腈，充分涡旋（底层完全漂起）1 分钟，加入无水硫酸镁 6.0 g 和无水醋酸钠 1.5 g 的混合物，迅速振摇，充分涡旋 1 min。取上清液（必要时以 4000 r/min 离心 5 min）作为样品提取液，备用。精密取上清液适量 1 mL 移入 3 mL 离心管中，吹干，加入 1 mL 流动相 B，充分溶解，以 20000 r/min 的转速离心 1 min，取上清液（必要时用滤纸吸去油层）过 0.22 μ m 滤膜于进样小瓶中直接进样。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子质谱扫描图



图1 吗啡的一级质谱图（左图）和产物离子质谱扫描图（CE值为-40V）（右图）

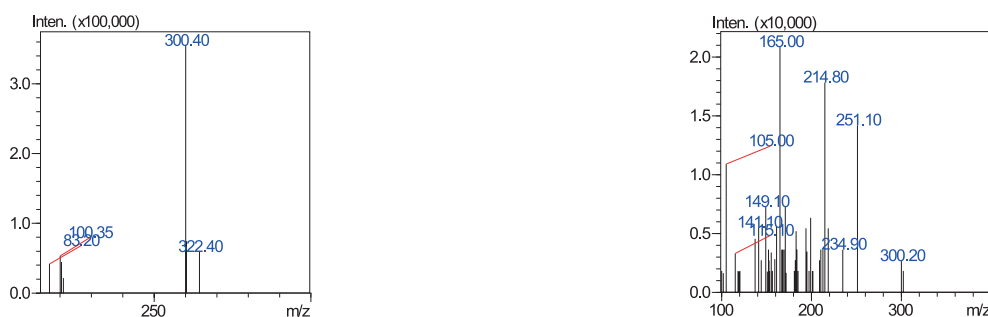


图2 可待因的一级质谱图（左图）和产物离子质谱扫描图（CE值为-40V）（右图）



图3 罂粟碱的一级质谱图 (左图) 和产物离子质谱扫描图 (CE值为-30V) (右图)



图4 蒂巴因的一级质谱图 (左图) 和产物离子质谱扫描图 (CE值为-25V) (右图)



图5 那可丁的一级质谱图 (左图) 和产物离子质谱扫描图 (CE值为-25V) (右图)



图6 吗啡-D3的一级质谱图 (左图) 和产物离子质谱扫描图 (CE值为-40V) (右图)



图7 可待因-D3的一级质谱图 (左图) 和产物离子质谱扫描图 (CE值为-40V) (右图)

2.2 标准品的 MRM 色谱图

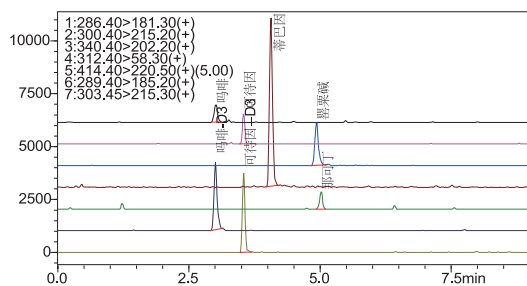


图8 生物碱的MRM色谱图

吗啡: 13.35 ng/mL; 可待因: 11.48 ng/mL; 蒂巴因: 2.92 ng/mL; 罂粟碱: 2.97 ng/mL;
 那可丁: 4.96 ng/mL; 吗啡-D3: 50 ng/mL; 可待因-D3: 50 ng/mL

2.3 线性关系

将标准系列工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以标准溶液浓度为横坐标，罂粟碱、那可丁、蒂巴因峰面积为纵坐标建立外标定量法，吗啡、可待因分别与其内标物吗啡 -D₃ 和可待因 -D₃ 的峰面积比值作为纵坐标建立内标定量法。如图 9 至图 11 所示，吗啡等 5 种物质在各自的浓度范围内，线性相关性良好，相关系数在 0.9991~0.9998 之间，准确度在 78.8%~123.3% 之间（见表 4）。



图9 吗啡（左图）和可待因（右图）的标准工作曲线

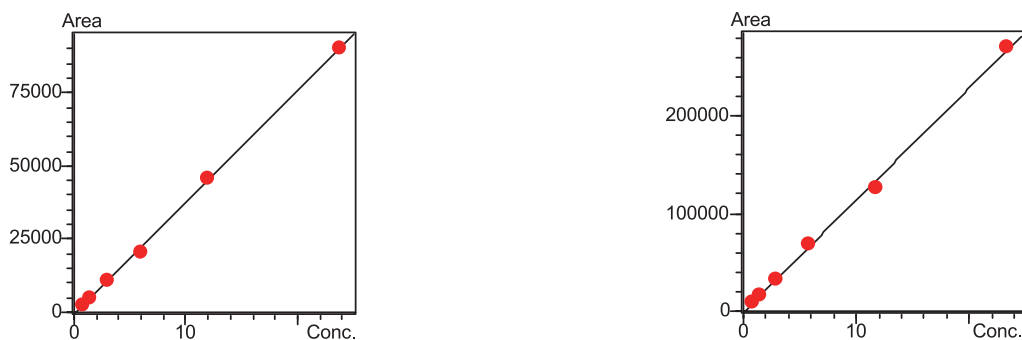


图10 罂粟碱（左图）和蒂巴因（右图）的标准工作曲线

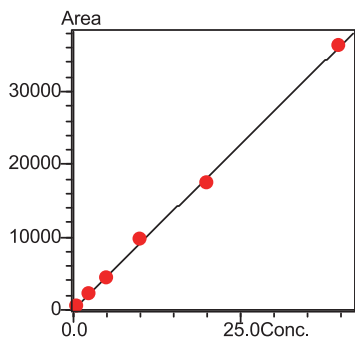


图11 那可丁的标准工作曲线

表4 吗啡等5种物质的标准曲线

编号	化合物名称	校准曲线	准确度	相关系数 (R)
1	吗啡	$Y = (0.0224052)X + (0.000875975)$	78.8%~120.2%	0.9991
2	可待因	$Y = (0.0209861)X + (0.00717652)$	87.3%~111.5%	0.9997
3	罂粟碱	$Y = (3828.62)X + (-815.299)$	94.2%~117.4%	0.9998
4	蒂巴因	$Y = (11476.3)X + (-1100.22)$	93.6%~123.3%	0.9993
5	那可丁	$Y = (909.477)X + (49.4005)$	83.2%~109.9%	0.9996

2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样（浓度见表5），平行测定6次，7种物质的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在0.035%~0.695%和1.73%~7.75%之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	化合物名称	RSD% (浓度 1)		RSD% (浓度 3)		RSD% (浓度 6)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	吗啡	0.503	7.35	0.141	5.70	0.035	3.17
2	可待因	0.152	5.52	0.179	4.13	0.039	2.35
3	罂粟碱	0.391	7.49	0.427	5.38	0.142	1.73
4	蒂巴因	0.242	7.75	0.239	4.87	0.114	3.30
5	那可丁	0.203	6.63	0.326	5.39	0.057	4.15
6	吗啡-D ₃	0.695	4.70	0.096	4.59	0.104	2.91
7	可待因-D ₃	0.125	4.94	0.151	3.54	0.054	1.96

2.5 方法检出限和定量限

为了考察本方法灵敏度，按照1.3.2样品前处理方法配制加标低浓度的基质样品平行进样计算信噪比（加标浓度见表6）。按照3倍信噪比和10倍信噪比计算方式分别作为检出限和定量限，计算所得结果见表6，五种目标析物检出限范围在0.30~4.6 μg/kg之间，定量限范围在1.0~15.3 μg/kg之间。方法灵敏度优于上海市地方标准《DB 31/2010-2012 火锅食品中罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因的测定 液相色谱-串联质谱法》规定的本标准罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因的检出限分别为8 μg/kg、40 μg/kg、8 μg/kg、40 μg/kg、8 μg/kg。定量限分别为25 μg/kg、125 μg/kg、25 μg/kg、125 μg/kg、25 μg/kg。

表6 方法检出限和定量限 (μg/kg)

编号	名称	浓度 (μg/kg)	信噪比 (S/N)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
1	吗啡	40	26	4.6	15.3
2	可待因	40	38	3.2	10.7
3	罂粟碱	8	32	0.8	2.7
4	蒂巴因	8	31	0.8	2.7
5	那可丁	8	82	0.3	1.0

2.6 基质加标实验

图 12 (左图) 为火锅酱料基质按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图, 由图 12 (左图) 可知火锅酱料基质并未检出吗啡等五种物质, 火锅酱料基质中加标的 MRM 色谱图如图 12 (右图) 所示, 基质加标低浓度样品所得信号强度在定量限以上均有很好的响应。基质样品平行加标三份不同浓度水平的标准品进行前处理, 在不同浓度下五种物质的回收率范围为 68%~100%, 精密度 RSD% 均在 14.8% 以下 (见表 7), 各水平回收率符合《GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测》, 检测方法确认的技术要求 (即被测组分含量范围在 100~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和小于 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 含量, 回收率允许范围分别在 80%~110% 和 60%~120% 以内), 精密度 RSD% 也符合《GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测》, 检测方法确认的技术要求 (即被测组分含量分别在 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平范围内, 变异系数 (CV%) 分别在 21% 和 15% 以下)。

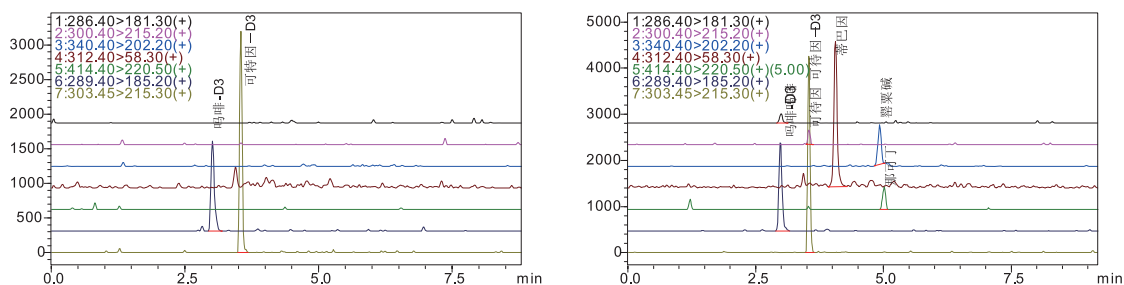


图12 火锅酱料基质MRM色谱图(左图)和基质加标低浓度MRM色谱图(右图)

吗啡: 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 可待因: 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 蒂巴因: 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 罍粟碱: 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$;

那可丁: 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 吗啡-D3: 37.5 ng/mL ; 可待因-D3: 37.5 ng/mL

表7 火锅酱料加标不同浓度回收率结果 (n=6)

化合物	回收率 (%)			精密度 (RSD%)		
	Low($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Medium($\mu\text{g}/\text{kg}$)	High($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Low($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Medium($\mu\text{g}/\text{kg}$)	High($\mu\text{g}/\text{kg}$)
吗啡	100%	91%	90%	7.1%	4.9%	1.3%
可待因	78%	69%	82%	4.2%	10.3%	8.7%
罍粟碱	86%	80%	68%	2.0%	7.4%	6.5%
蒂巴因	81%	78%	70%	8.6%	3.2%	9.2%
那可丁	100%	90%	75%	8.8%	1.4%	14.8%

Low: 吗啡、可待因加标浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 罍粟碱、蒂巴因、那可丁加标浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$;

Medium: 吗啡、可待因加标浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 罍粟碱、蒂巴因、那可丁加标浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$;

High: 吗啡、可待因加标浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 罍粟碱、蒂巴因、那可丁加标浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$;

2.7 实际样品分析

购买超市和菜市场上不同牌子的 4 种火锅酱料, 将所建立的分析方法用于实际样品分析, 4 种火锅酱料均未检测到上述五种物质。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定火锅酱料中罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因等五种生物碱的分析方法。五种目标物在各自的浓度范围内线性良好，相关系数在 0.9991~0.9998 范围内，方法检出限范围在 0.30~4.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间，定量限范围在 1.0~15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。采取空白火锅酱料基质加标三个不同浓度进行回收率方法验证，所得回收率范围为 68%~100%，精密度 RSD% 均在 14.8% 以下，回收率和精密度均符合《GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测》，检测方法确认的技术要求。实验结果表明使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8030 联用仪建立该分析方法具有快速、灵敏度高，可以满足食药监系统对食品安全快速检测和实验室确证检测的需求。