

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

陈伟, 乔勇升, 董贵军

(泰州市食品药品检验所, 江苏泰州 225300)

摘要:建立了高效液相色谱—荧光法同时测定吗啡和可待因的方法。采用的色谱柱为 C_{18} 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 检测激发波长为 285 nm, 发射波长为 340 nm; 流动相为甲醇—0.01 mol/L 乙酸铵 (体积比为 40:60), 流速 1.0 mL/min。实验结果表明, 进样量为 5×10^{-4} ~ 0.02 μ g 时其质量浓度与相应峰面积有良好的线性关系, 最低检测限达到 0.12 ng。样品中吗啡和可待因的回收率为 91.1% ~ 94.6%。方法快速准确, 简便灵敏, 分离度高, 能够满足火锅底料中吗啡和可待因的检测要求。

关键词: 高效液相色谱; 荧光检测法; 吗啡; 可待因

中图分类号: TS 207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2015)06-0089-03

Determination of morphine and codeine in hot pot condiment by high performance liquid chromatography – fluorescence detection

CHEN Wei, QIAO Yong-sheng, DONG Gui-jun

(Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou Jiangsu 225300)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography with fluorescence method was developed for determination of morphine and codeine. The liquid chromatographic experiment was carried out under the following conditions: the detector was a fluorescence with excitation wavelength at 285 nm and emission wavelength at 340 nm. An C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) was used. The mobile phase was a mixture of methanol and 0.01 mol/L ammonium acetate (40:60, v/v). The flow rate was 1.0 mL/min. The result showed that a good linear relationship between mass concentration and corresponding peak area was the feeding in range of 0.5 ng to 0.02 μ g. The lowest detection limit was 0.12 ng. The average recovery of sample for morphine and codeine was 91.1% ~ 94.6%. The method is rapid, accurate, sensitive and suitable for the separation and determination of morphine and codeine in hot pot condiment.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); fluorescence detection method; morphine; codeine

罂粟壳俗称大烟壳, 为罂粟科植物罂粟割取浆汁后的干燥成熟果壳, 内含 20 多种生物碱, 其中含量最多的生物碱分别为吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可汀^[1-2]。罂粟壳中生物碱虽然含量较少, 但如果长期食用含有这类毒品的食物, 会出现发冷、出虚汗、乏力、面黄肌瘦、犯困等症状, 严重时可能对神经系统、消化系统造成损害, 甚至出现内分泌失调等症状。在我国, 罂粟壳作为非食用物质, 是不允许在食品及调味品中添加使用。但近年来少数食品生产经营者为了招揽顾客, 牟取暴利, 在火锅及其调味

料中添加罂粟壳及其水浸物等违禁原料, 使食物味道鲜美, 严重危害消费者的健康。

检测罂粟壳中五种生物碱的方法主要有紫外分光光度法^[3]、荧光分光光度法^[4]、高效液相色谱法^[5-9]以及液相色谱—串联质谱法^[5-9]等。这些方法各有特点, 现以高效液相色谱法和液相色谱—串联质谱法为主流, 但液相色谱—串联质谱法一般对仪器和人员的要求较高, 所以高效液相色谱法方便快捷、易于操作而得到广泛应用。已有学者利用高效液相色谱—紫外检测法研究测定出吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可汀这五种生物碱的方法^[5-7,9], 也有学者^[8]利用高效液相色谱—荧光检测法对罂粟壳中的罂粟碱建立了检测方法, 但利用高效液相

收稿日期: 2015-04-03

作者简介: 陈伟, 1985 年出生, 男, 工程师, 硕士。

色谱—荧光检测法对其他几种生物碱(吗啡、可待因、蒂巴因、那可汀)检测还没有报道。在实际应用中由于荧光检测器灵敏度比紫外检测器高2个数量级,一些高效液相色谱—紫外检测法无法检出的含低浓度罂粟壳生物碱样品,可以用高效液相色谱—荧光检测法检出。本实验研究利用高效液相色谱—荧光检测法测定食品中吗啡和可待因含量的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统(配荧光检测器 Waters 2475, C₁₈柱 250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Waters 公司; F-2500 荧光光度计: 日本日立公司。

罂粟碱混标(吗啡 97.0%、可待因 97.0%) 标准品: Sigma 公司; 甲醇和乙腈为色谱纯。

1.2 实验方法

1.2.1 HPLC 分析条件优化

检测波长: 吗啡、可待因标准溶液进行荧光激发波长扫描和发射波长扫描(220 ~ 800 nm), 确定荧光检测的激发波长和发射波长。

流动相: 在甲醇: 缓冲盐 = 40: 60 (v/v), 流速 1.0 mL/min 的条件下, 根据相关文献^[8-10], 选择 3 种缓冲盐溶液 (HCOONH₄、CH₃COONH₄、Na₂HPO₄) 比较在不同浓度(0.01、0.02、0.03 mol/L)、不同 pH 值(6.0、7.0、8.0) 条件下对吗啡、可待因保留时间和分离度的影响。

1.2.2 标准曲线的制作

称取适量的吗啡、可待因标准品混标, 配制成各含吗啡、可待因 0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 μg/mL 标准混合溶液, 进液相色谱仪进行分析, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线。计算吗啡、可待因的线性范围、回归方程及相关系数, 并以信噪比 R_{SN} = 3 对应的质量浓度确定吗啡、可待因的检出限。

1.2.3 精密度、回收率试验

1 d 内连续 6 次对同一混标样进行 HPLC 分析, 测定吗啡、可待因的保留时间和峰面积, 计算精密度, 以相对标准偏差表示。

在样品中加入标准溶液后, 前处理参考相关标准 DB 31/2010—2012^[11], 加入 5 mL 水振荡分散均匀后加入 15 mL 乙腈, 涡旋振荡 1 min, 加入 6 g 无水硫酸镁和 1.5 g 无水醋酸钠的混合粉末, 涡旋振荡 1 min, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液待净化。上机测定吗啡、可待因的含量, 计算回收率。

2 结果与分析

2.1 激发波长和发射波长

利用荧光光度计, 分别对吗啡、可待因混标溶液

的激发波长和发射波长进行扫描。此外据文献报道^[4,8], 罂粟碱的在激发波长 282 nm, 吸收波长 355 nm 处有好的特性, 罂粟碱、吗啡、可待因属于同系物, 荧光性质相近, 综合考虑选择测定吗啡、可待因的荧光激发波长 280 nm, 吸收波长 340 nm。

2.2 流动相的选择

参考文献[8-10], 实验过程中比较了 3 种流动相体系的色谱图分离效果, 铵盐、磷酸盐缓冲溶液在紫外区几乎无吸收, 是紫外、荧光分析最常用的流动相。本实验中比较了不同缓冲液作为流动相时(甲醇: 缓冲盐 = 40: 60, 流速 1.0 mL/min), 吗啡、可待因的分离情况。结果表明: 上述 3 种盐缓冲溶液对吗啡、可待因的出峰顺序和分离效果无显著性差异, 但是 CH₃COONH₄ 缓冲液作为流动相时, 分析时间相对较短, 故选择 CH₃COONH₄ 溶液为本实验的流动相。

2.3 流动相浓度的选择

在流动相体系中, 缓冲盐溶液的浓度直接影响其缓冲容量, 在流动相中的存在形式及溶液的离子强度, 从而影响物质在色谱柱上的分离效果。缓冲溶液的浓度越高, 待测物的存在形式越稳定, 但缓冲溶液的浓度不能过高, 因为其浓度增高时, 离子强度也增大, 对组分分离不利, 同时影响泵和柱子的寿命, 增加流动相的本底吸收, 降低测定的灵敏度。本实验中 CH₃COONH₄ 溶液相对 HCOONH₄ 溶液、Na₂HPO₄ 溶液来说分离效果好, 对吗啡和可待因影响不是很明显, 吗啡和可待因均能得到有效分离(如图 1)。考虑到高盐浓度对泵和柱子的不利影响, 本实验选用 0.01 mol/L CH₃COONH₄ 溶液作为流动相。

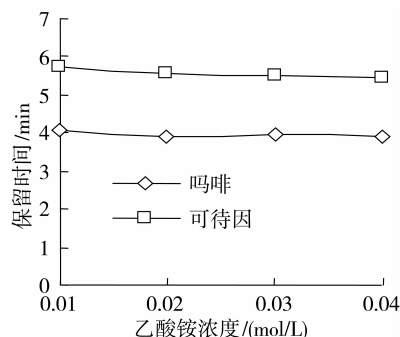


图1 流动相浓度对出峰时间的影响

2.4 流动相 pH 值的选择

由图 2 可知, 当 pH 值为 6.0 时, 吗啡和可待因两者的峰不能完全分开, 分离度 $R < 1.0$, 影响两个组分的含量计算; pH 值为 7.0 时, 吗啡和可待因的峰能够分开, 分离度 $1.0 < R < 1.5$, 未达到理想的分离效果; 提高 pH 值到 8.0, 吗啡和可待因的分离效果最好, 分离度 $R > 1.5$, 且两个组分的

出峰时间较适宜,有利于避免在样品检测时被其他组分干扰。因此,最终确定最适流动相 pH 值为 8.0。

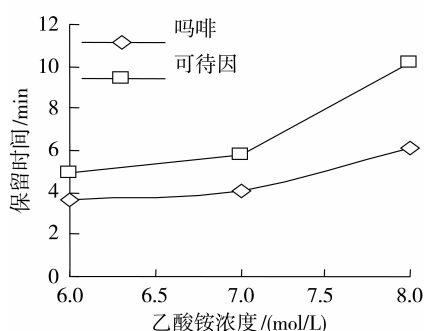


图2 流动相 pH 值对出峰时间的影响

2.5 线性范围和检测限

精密称取吗啡、可待因混标,用甲醇配制成混标储备液。移取混标储备液适量,用甲醇配制成各含吗啡、可待因 0.05、0.1、0.5、1.0 和 2.0 mg/L 共五个质量浓度的系列混合标准曲线,依次吸取 10 μL 进样进行 HPLC 分析。以峰面积 y 对质量浓度进行回归处理,得到的回归方程为吗啡: $y = 206\ 455x + 3\ 328.6$, R^2 为 0.998,可待因: $y = 265\ 261x + 2\ 496.3$, R^2 为 0.999,如图 3 所示,线性范围为吗啡、可待因 0.05 ~ 2.0 mg/L。结果表明,在一定的质量浓度范围内,吗啡和可待因对照品的峰面积和对应的质量浓度呈良好的线性关系。实验中按信噪比略大于 3 来计算检测限,得到的最低检测限为吗啡 0.12 ng、可待因 0.12 ng。

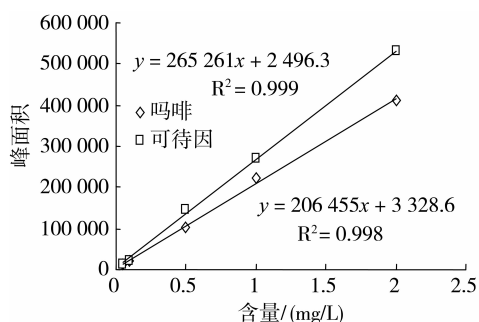


图3 吗啡、可待因的标准曲线

2.6 精密度试验

精密吸取 0.5 mg/L 吗啡和可待因对照品混标 10 μL 进行 HPLC 检测。连续进样 5 次,测得峰面积的相对标准偏差为吗啡 0.63%、可待因 0.60%,表明方法的精密度良好。

2.7 回收率试验

加标回收率试验中,选取市场购买的火锅底料样品进行加标回收试验,分别向样品中加入各含吗啡和可待因 50、100、150 μg 的对照品,对样品按上

述方法进行前处理,上机测定,结果如表 1 所示,加标回收率能达到吗啡 93.1%、可待因 92.3%,说明检测方法较可靠。

表1 吗啡和可待因的加标回收率

	添加量 / μg	回收量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %
吗啡	100	91.1	91.1	93.1
	150	140.4	93.6	
	200	189.2	94.6	
可待因	100	91.3	91.3	92.3
	150	140.8	93.7	
	200	183.7	91.8	

3 结论

采用高效液相色谱—荧光检测法测定火锅底料中吗啡和可待因含量时,可在荧光激发波长 280 nm,吸收波长 340 nm,流动相中缓冲盐溶液选择为 pH 值 8.0 的 0.01 mol/L CH₃COONH₄ 盐溶液,可以得到较理想的色谱分析结果。在样品进样量为 5 × 10⁻⁴ ~ 0.02 μg 时其质量浓度与相应峰面积有良好的线性关系,最低检测限 达到 0.12 ng,罂粟籽中吗啡和可待因的回收率为 91.1% ~ 94.6%。该方法快速准确,简便灵敏,分离度高,能够满足有关火锅底料中非法添加吗啡和可待因的检测要求,可为食品安全监管提供强有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] National Pharmacopoeia Committee of China. Pharmacopoeia of People's of China. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 302 - 303.
- [2] Wang F F, Guo L, Zeng A M, Yang Y, Jiang X M, Modern Business Trade Industry. 2009. (3): 279 - 280.
- [3] Tang Yong, Luan Jie, Wang Qian, Wu Li, Cao Rui, Liu Shu hong, Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2002, 24(4): 413.
- [4] Yan Chengnong, Shangguan Yunfeng. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2003, 22(3): 5.
- [5] Dai Weijie, Niu Weimin. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2003, 13(5): 607.
- [6] Wang Jianxin, Chen Wenhui, Wang Bin, Dong Yahua, Xu Bo. Occupation and Health, 2004, 20(6): 56.
- [7] Hao Hongyan, Guo Jixian, Shun Qingsheng, Liang Jie, Yu Yunqiu. Che Zhentao. Acta Pharmaceutica Sinica, 2000, 35(4): 289.
- [8] 皮立, 胡凤祖, 师治贤, 等. 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, 11(23): 639 - 641.
- [9] 徐丽红, 王建清, 陶秋等. 高效液相色谱同时测定 3 类食品中 5 种罂粟壳生物碱[J]. 分析测试学报, 2011, 12(30): 1387 - 1391.
- [10] 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, 2013, 34(1): 91 - 93.
- [11] 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[S]. 上海市食品药品监督管理局.