

# 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<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 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  $5 \times 10^{-4}$  ~ 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。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<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 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 μg. 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<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3]</sup>、荧光分光光度法<sup>[4]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5-9]</sup>以及液相色谱—串联质谱法<sup>[5-9]</sup>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<sup>[5-7,9]</sup>, 也有学者<sup>[8]</sup>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, C<sub>18</sub>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<sup>[8-10]</sup>, 选择 3 种缓冲盐溶液 (HCOONH<sub>4</sub>、CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 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<sub>SN</sub> = 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<sup>[11]</sup>, 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<sup>[4,8]</sup>, 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 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 缓冲液作为流动相时, 分析时间相对较短, 故选择 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 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 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 溶液相对 HCOONH<sub>4</sub> 溶液、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 溶液作为流动相。

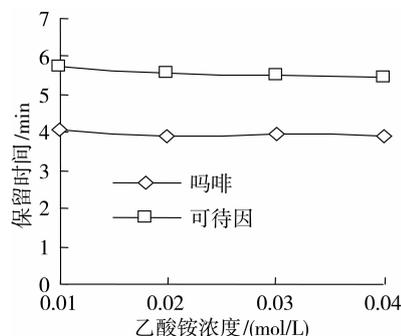


图1 流动相浓度对出峰时间的影响

### 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。

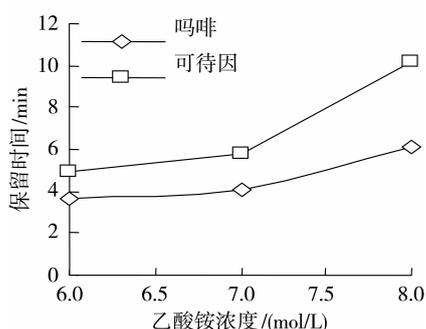


图2 流动相 pH 值对出峰时间的影响

### 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。

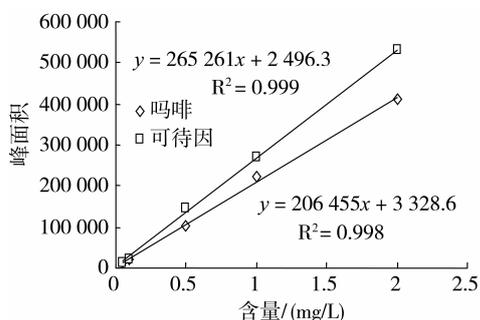


图3 吗啡、可待因的标准曲线

### 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 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 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<sup>-4</sup> ~ 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, 胡风祖, 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.