

研究报告

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中
5 种罂粟壳生物碱基质效应

陈丹丹,简龙海,茹歌,俞灵,王柯,郑荣
(上海市食品药品检验所,上海 201203)

摘要:目的 考察 3 种不同食品基质中罂粟碱、吗啡等 5 种生物碱类物质在超高效液相色谱-串联质谱法检测中的基质效应。方法 用提取前与提取后空白溶液加标方法分析基质效应的影响,并配制不同浓度加标溶液,通过拟合标准曲线,比较斜率、截距等,评估 5 种生物碱成分测定的基质效应。结果 固体、半固体基质样品基质效应较强,那可丁、蒂巴因、可待因易受基质效应影响,通过优化梯度洗脱程序、加入内标溶液、稀释样品等方法可有效降低或消除基质效应影响。结论 基质效应与基质种类、化合物种类等有明显关系,本试验中基质效应的改进方法可为不同样品基质中罂粟壳生物碱的测定提供参考。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱;生物碱;基质效应;罂粟壳;测定

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)02-0111-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.02.003

Matrix effects in the analysis of five poppy husk alkaloids in food by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Dandan, JIAN Longhai, RU Ge, YU Ling, WANG Ke, ZHENG Rong
(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To investigate the matrix effects of 5 alkaloids such as papaverine and morphine in 3 different food matrices by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The matrix effect was analyzed before and after the extraction of the blank solution spiked with different concentration of the standard solution. The matrix effect of the determination of the 5 alkaloids was evaluated by fitting the standard curve and comparing the slope and intercept. **Results** The matrix effect of solid and semisolid matrix were strong, and narcotine, thebaine and codeine were easily influenced by the matrix effect. The effect of matrix effect could be effectively reduced or eliminated by optimizing the gradient elution program, adding internal standard solution and dilution samples. **Conclusion** The matrix effect was closely related to the type of sample matrix and the structure of compound. The improved method of matrix effect in this study could provide reference for the determination of poppy husk alkaloids in different sample matrix.

Key words: Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; alkaloid; matrix effects; opium poppy husk; determination

随着经济水平的不断提高,各类食品、调味品等不同品种陆续出现,极大的改善了生活品质,但不法商家也趁虚而入,为获得较好的口感,在火锅、麻辣烫、卤肉汁等汤汁和调味料食品中非法添加罂粟壳等禁用成分。罂粟壳中含有罂粟碱、吗啡、可待因多种生物碱,长期食用会因麻痹等作用,使味觉感知能力降低,并会出现慢性中毒,最终产生成

瘾性,严重危害消费者的健康。

目前对该类成分的测定已有多种方法,包括气相色谱法^[1]、气相色谱-质谱法^[2]、液相色谱法^[3]、液相色谱-质谱法^[4]等,其中液相色谱-质谱法由于其快速、简便、准确的特点,广泛应用于火锅中罂粟碱等成分的测定。但由于食品样品基质比较复杂,基质中的非挥发性组分与待测物质,在雾滴表面离子化的过程中产生竞争,影响电喷雾接口处的离子化效率,可能会增强或抑制被分析物离子的形成效能,产生基质增强或抑制效应,成为影响方法灵敏度和准确度的关键因素^[5];因此,本研究在 DB 31/2010—2012《食品安全地方标准 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

收稿日期:2018-11-02

基金项目:上海市科委科研计划项目(17DZ2204500)

作者简介:陈丹丹 女 药师 研究方向为食品化妆品理化分析

E-mail:851500771@qq.com

通信作者:郑荣 女 副主任药师 研究方向为食品化妆品监督检查

E-mail:zhengrongsifdc@163.com

谱-串联质谱法》^[6]基础上,对3种不同食品罂粟碱成分测定时的基质效应进行考察,并通过优化梯度洗脱程序、稀释样品、加入同位素内标等方法有效地降低或消除基质干扰及基质效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

火锅汤料(液体,Y)、烤肉酱(半固体,BG)、调味粉(固体,G)均购自超市。

1.1.2 主要仪器与试剂

超高效液相色谱仪(配备自动进样器、二元泵、脱气机,美国 Waters)、API4000 质谱仪(美国 AB SCIEX)、涡旋振荡器、离心机、超声处理器。

吗啡(171201-201324,纯度 99.1%)、磷酸可待因(171203-201005,纯度 99.6%)、盐酸罂粟碱(779-9302,纯度 100%)、蒂巴因(171216-200403,纯度 100%)、那可丁(171224-200403,纯度 100%)均购自中国生物制品检定研究院,吗啡-D3 对照品溶液(FE102010-04,浓度 1 mg/ml)、磷酸可待因-D3 对照品溶液(FE081012-03,浓度 1.0 mg/ml)均购自美国 Cerilliant,甲酸铵、甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,试验用水由 Milli-Q 纯水仪制备,QuEChERS 粉末(6 g 无水硫酸镁与 1.5 g 无水醋酸钠的混合粉末,北京艾杰尔科技有限公司),0.22 μm 尼龙滤膜。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的制备

标准储备液:精密称取罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因标准品适量,用 0.5% 甲酸-甲醇溶液配制罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因浓度均为 1.0 mg/ml 的标准储备液。

混合标准溶液:精密吸取浓度为 1.0 mg/ml 的罂粟碱、那可丁、蒂巴因储备液各 0.1 ml 和浓度为 1.0 mg/ml 的吗啡、可待因储备液各 5 ml 于 20 ml 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,摇匀,即得含罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 5 μg/ml 和吗啡、可待因浓度为 250 μg/ml 的混合标准溶液。

1.2.2 样品溶液的制备

空白基质样品溶液的制备(QuEChERS 法):称取混匀后的火锅汤料、烤肉酱、调味粉样品各 2.0 g,置于 50 ml 聚四氟乙烯具塞离心管中,加入水 3 ml (固体粉末类样品加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 5 ml)、乙腈 15 ml,涡旋振荡 1 min,超声处理 30 min,取出,加入 1 份 QuEChERS 粉末,迅速振摇,涡旋振荡 1 min,4 000 r/min 离心 5 min(离心半径 3 220 g),取上清液,0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液,即得。

A 组标准曲线溶液的制备(空白溶剂加标,以下简称 Line A):取罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡、可待因标准品,分别加乙腈制成一系列浓度的标准曲线溶液,浓度见表 1。

表 1 标准曲线浓度(μg/L)

分析物	St1	St2	St3	St4	St5
罂粟碱	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00
那可丁	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00
蒂巴因	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00
吗啡	2.50	5.00	12.50	25.00	50.00
可待因	2.50	5.00	12.50	25.00	50.00

B 组标准曲线溶液的制备(空白样品提取液加标,以下简称 Line B):取 3 种空白基质样品溶液,分别加入适量标准储备液,制成与 Line A 相同浓度的系列标准曲线溶液。

C 组标准曲线溶液的制备(空白样品加标,以下简称 Line C):称取混匀后的火锅汤料、烤肉酱、调味粉样品各 2.0 g,分别加入适量标准储备液,后续操作按 1.2.2 中的 QuEChERS 处理方法,制成与 Line A 相同浓度的系列标准曲线溶液。

1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱:ACQUITY UPLC BEH HILIC (2.1 mm×100 mm,1.7 μm);流动相:以含 0.1% 甲酸的乙腈为 A 相,以含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 甲酸铵水溶液为 B 相;梯度洗脱程序:0.00~1.00 min,94% A;1.00~6.50 min,94%~85% A;6.50~7.00 min,85%~94% A;7.00~15.00 min,94% A;流速 0.3 ml/min;进样量 5 μl。

质谱:正离子电喷雾离子化(ESI⁺);雾化气压力 344.75 kPa;气帘气压力 151.69 kPa;去溶剂气压力 310.28 kPa;喷雾电压 5 500 V;去溶剂温度 500 °C;碰撞气压力 34.48 kPa;离子驻留时间均为 50 ms;各化合物的检测离子对、去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)等质谱参数见表 2。

2 结果与分析

2.1 基质效应评价方法

基质效应评价一般采用提取后空白样品溶液加标方法来考察,通过测定与纯溶剂相同浓度标准溶液的仪器响应进行比较,若仪器响应减弱,则为基质抑制效应,相反则为基质增强效应。但考虑到基质效应的增强或抑制强度一般随分析物浓度的变化而发生改变,本研究配制了不同浓度的系列标准曲线溶液,通过考察峰面积比值(基质标准样品峰面积/试剂标准样品峰面积)及各标准曲线的线性相关系数、斜率及截距等^[7],综合评价样品的基

表 2 7 种化合物的质谱条件
Table 2 MS parameters of seven compounds

分析物	定性离子对 /(m/z)	定量离子对 /(m/z)	DP /V	CE /eV
罂粟碱	340.2/202.1	340.2/202.1	92	36
	340.2/171.1			40
那可丁	414.2/220.2	414.2/220.2	95	30
	414.2/353.1			34
蒂巴因	312.0/58.2	312.0/58.2	52	38
	312.0/251.0			35
吗啡	286.0/181.1	286.0/181.1	97	47
	286.0/165.1			51
可待因	300.0/215.1	300.0/215.1	90	34
	300.0/165.2			55
吗啡-D3	289.0/201.1	289.0/185.1	95	36
	289.0/185.1			40
可待因-D3	303.0/215.2	303.0/215.2	80	35
	303.0/165.2			52

质效应,在评价基质效应时,同时考察了前处理方法的回收率。

2.2 基质效应比较结果

2.2.1 不同基质的基质效应比较

研究比较了液体样品、半固体样品及固体样品中 5 种生物碱成分的基质效应,结果显示,除吗啡表现为较弱的基质增强效应外,3 种样品基质中的其他四种分析物均表现出不同程度的基质抑制效应,固体样品基质抑制程度最高,半固体样品居中,液体样品最低。以蒂巴因为例(见图 1),液体、半固体、固体的 Line B 依次向下偏离 Line A,两条曲线的斜率比值 $Slope_{lineB}/Slope_{lineA}$ 在 0.65 ~ 0.96 范围内。蒂巴因在固体样品中表现出了明显的基质抑制效应,分析可能是由于固体基质复杂程度更高,同时油脂含量高,前处理过程中残留的油脂样品在离子源影响待分析物的电离,导致基质抑制效应更强。

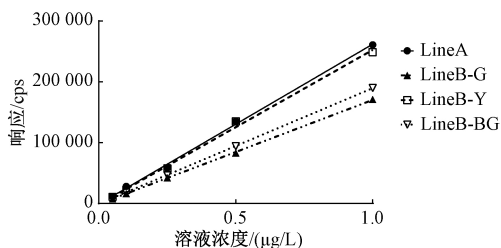


图 1 蒂巴因不同标准曲线比较

Figure 1 Comparison of the baine's different standard curves

考察不同基质样品的 Line C 与 Line B 发现,除吗啡外的其他 4 种分析物,Line C 均有不同程度的向下偏离 Line B,说明经过 QuEChERS 法的样品处理,分析物有一定的损失。但在实际应用中,Line B、Line C 一般会与 Line A 产生不同程度的偏离,若斜率产生明显偏离,表示在该样品基质或处理方法

下,单位浓度分析物的响应值发生了变化;若斜率接近,截距产生了明显偏离,则表示分析过程中存在一定的本底值,而单位浓度分析物的响应值未受到明显影响,可通过一定的方法予以校正^[8]。考察两条曲线的斜率比,比值在 84.7% ~ 109.7%,表明损失率基本在可接受的范围内,该前处理方法可用于 5 种生物碱测定。

2.2.2 不同分析物的基质效应比较

罂粟碱、那可丁、蒂巴因及可待因在不同基质中均表现为不同程度的基质抑制效应。其中那可丁、蒂巴因的基质抑制效应较明显,以 $Slope_{lineB}/Slope_{lineA}$ 结果作为基质效应的评价,结果如图 2 所示,吗啡在不同基质中均表现出较弱的基质增强效应,但该化合物质谱响应可能受仪器因素影响较大,存在重复性较差、线性不好的问题。

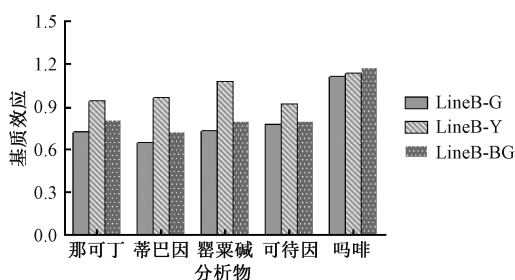


图 2 5 种成分在 3 种基质中的基质效应

Figure 2 Matrix effect of 5 compounds in 3 samples

2.3 基质效应的改进研究

从上述分析中可以看出,那可丁及蒂巴因在部分样品中存在明显的基质效应,吗啡在测定时存在重复性差、线性差的问题。为提升方法的通用性及适用范围,需改善样品的基质效应。

2.3.1 色谱分离对基质效应的改进研究

基质效应产生的部分原因是色谱分离时样品中共流出物,对待分析物在离子源的电离产生抑制作用导致,优化色谱分离可减少该因素的影响^[9]。本试验中测定的 5 种生物碱成分在 C18 反相色谱柱保留较差,亲水作用色谱(HILIC)柱对强极性化合物保留效果较好,且在 DB 31/2010—2012 中已用于罂粟碱等成分分析。但已有方法中各化合物保留时间均较短,吗啡与可待因分离度较差。本试验通过调节乙腈的比例,最终使各化合物保留时间在 3~7 min,同时吗啡与可待因达到基线分离,流动相调整前后图谱详见图 3。

2.3.2 稀释法对基质效应的改进研究

基质标准曲线法为改善基质效应的常用方法,但由于本试验中各类食品基质差异大,难以获得代表性的空白基质样品,因此试验主要考察稀释法对基质效应的改善。稀释法是通过降低干扰组

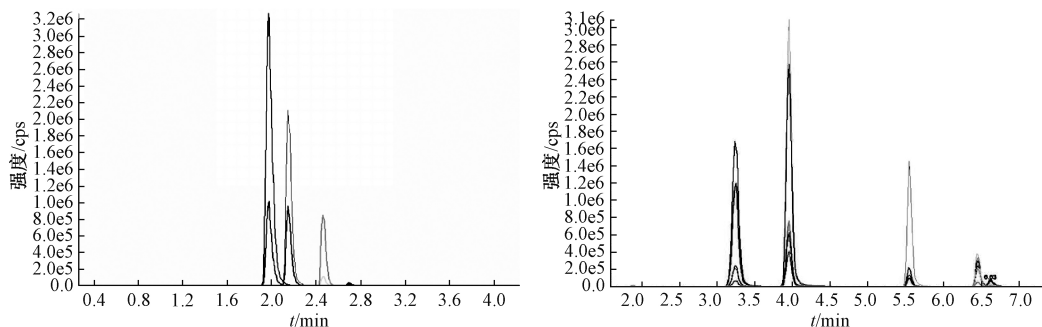


图3 流动相比比例调整前(左)、后(右)总离子流(TIC)图谱

Figure 3 TIC before (left) and after (right) the adjustment of ratio of mobile phase

分的浓度来减弱对目标分析物的离子化影响,得到目标分析物和干扰组分同比例稀释的样品。

为研究样品稀释法对基质效应的影响,以固体基质样品为例,考察稀释因子分别为1、5、10、20的基质效应的强弱。定义稀释因子 $d = V_f/V_i$,其中 V_f 为空白基质稀释后最终体积, V_i 为吸取空白基质最初体积^[10],以浓度为5 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液为例,采用峰面积比值(基质标准样品峰面积/试剂标准样品峰面积)对基质效应评价。结果表明,稀释因子为20时,蒂巴因、那可丁及罂粟碱的基质效应得到明显改善,见图4。同时方法回收率明显改善,结果均在80%~110%。但吗啡及可待因由于质谱响应不及其他3个化合物,稀释法影响了方法检测的灵敏度,因此为保证检测结果的准确性,针对吗啡及可待因两个化合物试验进一步考察了内标法。

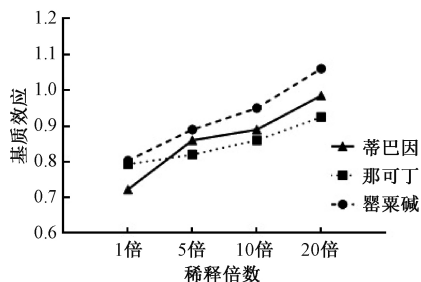


图4 稀释倍数对基质效应影响

Figure 4 Influence of dilution on matrix effect

2.3.3 同位素内标法对基质效应的改进研究

同位素内标与待测物结构相同,在色谱行为、保留时间及质谱响应等各方面都具有相似的结果,受基质效应的影响也一致,因此被认为是补偿基质效应最理想的方法^[11]。但同位素内标通常价格昂贵,有些不易获得。本研究根据实际购买到的同位素内标及试验需要,考察了同位素内标对吗啡和可待因两种目标分析物的基质效应的补偿作用,回收率结果均在80%~110%,结果表明,内标法可在不改变样品取样量、不影响测定灵敏度的情况下明显改善目标分析物的基质效应。

3 小结

采用 QuEChERS 前处理方法,建立了火锅调料等食品中罂粟碱、吗啡、可待因、那可丁和蒂巴因5种禁用成分的分析方法,为保证建立的方法专属性和准确度,本研究评估了3种不同类型基质的基质效应:考察样品的纯溶剂、萃取前添加、萃取后添加的校准曲线(5个浓度点)的差异,采用优化梯度洗脱程序、稀释样品及同位素内标等方法降低或消除基质效应。与原 DB 31/2010—2012 比较,优化后方法检出限与定量限均有提高,罂粟碱、那可丁、蒂巴因检出限为3 $\mu\text{g/kg}$,吗啡、可待因检出限为12 $\mu\text{g/kg}$ 。优化后方法的基质适用范围更广,由于基质效应得到改善,方法的准确度、重复性更好,可以满足市场监管需要。

参考文献

- [1] 范翔,冯家力,陈东洋,等.双柱分离-气相色谱法测定火锅底料中罂粟碱[J].中国卫生检验杂志,2015,25(14):2296-2298,2301.
- [2] 沈平,谢朝梅,谢燕湘,等.GC-MS法直接测定食品中罂粟壳提取物的残留量[J].中国卫生检验杂志,2015,25(20):3466-3468.
- [3] 徐丽红,王建清,陶秋,等.高效液相色谱同时测定3类食品中的5种罂粟壳生物碱[J].分析测试学报,2011,30(12):1387-1391.
- [4] 刘晓茂,杨志伟,崔宗岩,等.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.
- [5] ROGATSKY E, STEIN D. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency; new parameters for validation of method development [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2005, 16(11): 1757-1759.
- [6] 上海市食品药品监督管理局.食品安全地方标准 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;DB 31/2010—2012[S]. 2012.
- [7] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. Anal Chem, 2003, 75(13):3019-3030.

- [8] HOFF R B, RÜBENSAM G, JANK L, et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis [J]. *Talanta*, 2015, 132(3):443-450.
- [9] 沈斐,许燕娟,姜晟,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水华样品中微囊藻毒素及其基质效应的消除[J]. *色谱*, 2017, 35(7):772-777.
- [10] 刘进玺,秦珊珊,冯书惠,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食用菌中农药多残留的基质效应[J]. *食品科学*, 2016, 37(18):171-177.
- [11] LEE S, KIM B, KIM J. Development of isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry for the accurate determination of fluoroquinolones in animal meat products: optimization of chromatographic separation for eliminating matrix effects on isotope ratio measurements [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1277(12):35-41.

(上接第 105 页)

3.3 商业化 PCR 反应预混液。

4 仪器和设备

4.1 实时荧光 PCR 仪。

4.2 微量紫外分光光度计。

4.3 恒温水浴锅。

4.4 高速冷冻离心机:离心力 18 000 g 以上。

4.5 微量移液器(0.5 μL~10 μL, 10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL)。

4.6 涡旋振荡器。

4.7 天平:感量 0.001 g。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

(1)样品只有单块鱼肉组成:使用灭菌剪刀适量剪取中心部位鱼肉。

(2)样品有五块以下鱼肉组成:使用灭菌剪刀适量剪取每个组成部分的中心部位鱼肉。

(3)样品有五块以上鱼肉组成:随机挑选 5 块鱼肉,使用灭菌剪刀适量剪取每个组成部分的中心部位鱼肉。

将所取得的鱼肉使用灭菌去离子水洗涤,离心去除上清液,尽可能剪碎并混匀。

注:速冻鳕鱼产品应在完全解冻后再取样。

5.2 DNA 提取

按照商业化 DNA 提取试剂盒说明书中要求的取样量称取样品,每个样品设置两个平行,按照商业化 DNA 提取试剂盒说明书操作。

5.3 DNA 浓度测定

取 1 μL DNA 溶液,使用微量紫外分光光度计按照 dsDNA(双链 DNA)计算方式检测其浓度。

5.4 实时荧光 PCR 扩增

实时荧光 PCR 反应体系见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系

PCR 预混液(2×)	10 μL
10 μmol/L 上游引物	0.4 μL
10 μmol/L 下游引物	0.4 μL
10 μmol/L 探针	0.2 μL
DNA	20-50 ng
灭菌去离子水	补充至总体积 20 μL

PCR 反应程序:95 ℃ 15 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 34 s(读取荧光),40 个循环。

5.5 实验对照

分别设置阳性对照、阴性对照、PCR 空白对照、空白提取对照各一个。

阳性对照:含相应物种的 DNA。

- 氏弓形杆菌[J].现代食品科技, 2013, 29(10): 2533-2537.
- [14] 王敏,顾一心,梁昊,等.北京市零售鸡肉标本中弓形杆菌污染初步分析[J].疾病监测, 2016, 31(12): 1050-1054.
- [15] RAHIMI E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran [J]. Br Poult Sci, 2014, 55(2): 174-180.
- [16] ADESIJI Y O, COKER A O, OLOKE J K. Detection of *Arcobacter* in feces and healthy chickens in Osogbo, Nigeria [J]. J Food Prot, 2011, 74(1): 119-121.
- [17] SCULLION R, HARRINGTON C S, MADDEN R H. Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland [J]. J Food Prot, 2006, 69(8): 1986-1990.
- [18] COLLADO L, GUARRO J, FIGUERAS M J. Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish [J]. J Food Prot, 2009, 72(5): 1102-1106.
- [19] HOUF K, DE ZUTTER L, VAN HOOF J, et al. Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing [J]. J Food Prot, 2002, 65(8): 1233-1239.
- [20] ATABAY H I, CORRY J E, ON S L. Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens [J]. J Appl Microbiol, 1998, 84(6): 1007-1016.

(上接第115页)

阴性对照:不含相应物种的DNA。

PCR空白对照:以灭菌去离子水替代DNA加入实时荧光PCR反应体系。

空白提取对照:以灭菌去离子水替代样品进行DNA提取。

6 结果判断与表述

6.1 质量控制

若以下条件的其中一条不满足要求时,结果视为无效:

阳性对照:荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的Ct值 <30.0 ;

阴性对照:Ct值 ≥ 35.0 ;

PCR空白对照:Ct值 ≥ 35.0 ;

空白提取对照:Ct值 ≥ 35.0 ;

内参照反应:荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的Ct值 <30.0 ;

样品平行反应:Ct值经6.2结果判定后应一致。

6.2 结果判定

(1)如Ct值 <30.0 ,且质量控制符合要求,则判定为检出相应物种源性成分。

(2)如Ct值 ≥ 30.0 ,且质量控制符合要求,则判定为未检出相应物种源性成分。

6.3 结果表述

检出XXX源性成分。

未检出XXX源性成分。

7 防污染措施

检测过程中放置交叉污染的措施按照GB/T 27403中的规定执行。

8 方法检出限

裸盖鱼引物探针检出限范围为0.1%~5%,油鱼引物探针检出限范围为1%~10%,南极犬牙鱼引物探针检出限范围为1%~2%。

注:因使用的设备、试剂盒不同,其检出限有所差异。

本方法负责起草单位:深圳市计量质量检测研究院。

验证单位:河南省产品质量监督检验院、天津市食品安全检测技术研究院、重庆市食品药品检验检测研究院、福建省食品药品质量检验研究院、广东省食品检验所。

主要起草人:林霖、张世伟、吴佳辉、王坤、杨国武、杨俊。

(相关链接:http://gkml.samr.gov.cn/nsjg/spcjs/201903/t20190306_291727.html)