

火锅底料中吗啡组分的检测方法研究

鲍会梅

(江苏食品职业技术学院食品与营养工程学院, 江苏淮安 223003)

摘要: 采用高效液相色谱法, 将组分从固体中转移到液体中是保障定量结果符合真实值的前提, 将甲醇溶解法确定为前处理的基本方法。火锅底料中吗啡含量为 5.51%、7.60%、10.20%, 以 C₁₈ 柱为分析柱, 使用国产固相萃取小柱可以得到 98.7% 的回收率。流动相 0.05 mol/L 磷酸二氢钾、0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠水溶液-乙腈; 柱温 35 °C; 流速 1 mL/min; 检测波长 220 nm, 分析了火锅底料中的吗啡。

关键词: 吗啡; 高效液相色谱; 火锅底料

文章编号: 1673-9078(2012)10-1411-1415

Method Research of Detection of Morphine Component in Chafing Dish

BAO Hui-mei

(Jiangsu Food Vocational Technical College of Engineering Food and Nutrition, Huai'an 223003, China)

Abstract: Using high performance liquid chromatography, transferring component from solid to liquid is a prerequisite for the protection of quantitative results of real value, water-soluble solution to determine the basic method for pre-treatment. Results showed that the chafing dish morphine content were 5.31%, 7.60%, 10.20% detected by HPLC on a C₁₈ column. the use of domestic solid phase extraction column can give recovery rate of 98.7%. The HPLC detection conditions were mobile phase 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate, 0.0025 mol/L heptane sulfonate aqueous solution - acetonitrile, column temperature 35 °C, flow rate 1 mL/min, and detection wavelength.

Key words: morphine; HPLC; pot bottom material

吗啡 (Morphine) 是一种精神科药物, 化学式为 C₁₇H₁₉NO₃, 分子量为 285.34。1806 年法国化学家 F·泽尔蒂纳首次从鸦片中分离出来, 是鸦片的主要有效成分。纯吗啡为白色结晶粉末, 无臭, 味苦, 易溶于水, 在医疗上是极为有效的中枢神经抑制剂, 而作为滥用药物, 是我国乃至世界司法部门重点监控和打击的毒品之一。吗啡在医院有做镇痛药使用, 在民间使用的话是毒品。注射会产生欣快感, 有很强的成瘾性。

近年来, 由于火锅饮食的盛行, 一些不法经营者为达到盈利目的, 向火锅中添加罂粟壳, 严重违反了国家有关规定, 对人民群众的身体健康造成了危害。为了加强监督工作, 我们对火锅汤料中微量吗啡的定量检测方法进行了探讨, 对样品的提取方法、色谱分离条件进行了改进, 提高了分离效果和方法的检出灵敏度, 并对样品中的微量吗啡进行了分析, 取得了比较满意的结果^[9]。

本文采用高效液相色谱法, 将组分从固体中转移到液体中是保障定量结果符合真实值的前提, 将甲醇溶解法确定为前处理的基本方法。考虑到火锅底料样

本的复杂性, 及实验中测定的样本可能含有很多未知的杂质, 本实验进一步开发和优化了固相萃取方法。分析了火锅底料中的吗啡。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

液相色谱仪: Prominence UFLC 型, 日本岛津公司; 固相萃取小柱: C₁₈ (天津富集科技有限公司), Sep-Pak Vac (美国 waters 公司); 色谱柱: Inertsil ODS-SP(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 日本岛津公司; 纯水仪: Synergy UV 型, 美国 Millipore 公司; 分析天平: XP1025, 日本岛津公司; 盐酸吗啡标准对照品: 纯度 99.5%, 中国药品生物制品检验所; 乙腈、甲醇、庚烷磺酸钠: 色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司; 磷酸二氢钾: 分析纯, 中国西陇化工股份有限公司; 甲醇、氯仿: 国药集团化学试剂有限公司; 试验用火锅底料: 选自淮安市三种不同品牌的火锅店中火锅底料

1.2 试验方法

1.2.1 吗啡标准溶液的制备

精密称取盐酸吗啡标准品 10.0000 mg, 加入甲醇定容至 10 mL, 制成含盐酸吗啡 1.00 mg/mL 的对照品储备溶液。根据实验所需将吗啡 1.00 mg/mL 的对照品

收稿日期: 2012-05-28

作者简介: 鲍会梅 (1974-), 女, 硕士, 高级实验师, 主要从事食品理化检验教学工作

储备溶液稀释成 0.1 mg/mL 的对照品使用溶液。

1.2.2 火锅底料中吗啡的提取

准确称取经研碎的三种不同品牌的火锅底料每种取三份, 每份各 10g → 分别置于索氏提取器中, 用石油醚(60~90℃)回流提取至无色 → 弃去石油醚, 将滤纸筒中的石油醚挥尽, 再用 70% 甲醇回流提取 → 提取液蒸干, 残渣加水、10% 无水碳酸钠水溶液、氯化铵超声处理, 使成混悬液 → 定量转移至分液漏斗中, 用氯仿-异丙醇(3:1)混合液提取 → 合并提取液, 用含 2 滴浓氨水的水溶液 20 mL 洗涤 → 用水洗涤两次 → 合并三次水洗液 → 再用上述混合溶剂 20 mL 回提一次, 回提液与原提取液合并, 用铺有少量无水硫酸钠的漏斗滤过, 置水浴上蒸干, 残渣加适量甲醇溶解 → 离心 → 过滤 → 上清液 → 吗啡样品^[8]。

1.2.3 标准系列管的制备

精密吸取 1.00 mg/mL 对照品储备溶液, 依次用 0.1 mg/mL 的甲醇溶液稀释成质量浓度分别为 0.0005、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.2 mg/mL 的系列对照品溶液。分别取不同浓度的对照品溶液 10 μL 进样, 记录响应的峰面积。

1.2.4 计算公式

$$X = \frac{C_{\text{标}} \times m_{\text{样}} \times V}{C_{\text{样}} \times 10^3}$$

注: X-供试品中吗啡的含量(%); $C_{\text{标}}$ -标准品的浓度(mg/mL); $m_{\text{样}}$ -样品的质量(g); V-加入溶剂的体积(mL); $C_{\text{样}}$ -测得样品的浓度(mg/mL)。

1.2.5 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-SP (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 日本岛津公司); 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾、0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠水溶液-乙腈; 流动相梯度程序: 以 6% 有机相(乙腈)为初始浓度, 即 0.05 mol/L 磷酸二氢钾、0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠水溶液: 乙腈(94:6, V/V), 以 2 %/min 升至 26%, 9 %/min 升至 35%, 保持 10 min^[1]。流速 1 mL/min; 柱温: 35℃; 检测波长: 220 nm。

1.2.6 固相萃取方法的确定

考虑到火锅底料样本的复杂性, 即测定的样本可能含有很多未知杂质, 本实验进一步开发和优化了固相萃取方法。

1.2.6.1 固相萃取小柱活化方法

实验采用两种活化试剂依次对固相萃取小柱进行活化^[1]。活化试剂 I, 甲醇: 水=3:1 (V/V), 活化试剂 II, 水, 对试剂 I 的用量进行考查, 当用量分别为 3、5、7、10 mL 时, 回收率分别为 78.2、94.4、98.2、98.3%。(本实验中回收率计算结果是由固相萃取的吗啡组分峰面积除以同体积甲醇溶液直接溶解同质量鸦片样品的吗啡组分峰面积得到的。)可见, 用量达到 7 mL 时

已经足够。对于活化试剂 II 水的用量, 由于活化后需用氨水润洗, 其用量对实验效果影响不明显, 按经验值选择 3 mL。

1.2.6.2 前处理方法的确定及回收率考察

实验比较了水溶解法与 SPE 固相萃取法的提取效率, 多次测量得到固相萃取方法回收率平均值为 98.7% (n=10), 能够满足检测要求, 并且减少了杂质。因此, 固相萃取法可以作为水溶解法的补充, 在杂质较多、有效成分较少、水溶解法不能满足要求时作为补充方法续用。最终确定固相萃取方法为: 选用甲醇: 水=3:1 (V/V) 的混合液 7 mL、水 3 mL 活化小柱, 2 mL 0.1% 氨水冲洗小柱, 上样 2 mL 并在样品溶液中加入 0.1% 氨水 1~2 滴, 7 mL 水淋洗、5 mL 含 10% 甲醇的 5% 醋酸洗脱^[10]。

此外, 实验中还将国产和进口萃取小柱的萃取效果做了比较。分别取国产固相萃取小柱 6 支、进口固相萃取小柱 6 支, 按 1.2.1 节的方法配制成供试品溶液。采用上文所述的固相萃取方法, 测得国产固相萃取小柱回收率 98.5%、进口固相萃取小柱回收率 99.9%。结果表明, 进口固相萃取小柱略优于国产固相萃取小柱, 而国产固相萃取小柱已经可以满足实验需要, 各实验室可以根据自身情况选择不同的固相萃取小柱。

1.2.6.3 前处理方法的确定

表 1 不同提取方法的提取结果

提取方法	样本质量/mg	峰面积	归一化
甲醇溶解	9.93	2056489	207098.6
反提	9.82	1336311	136080.5
0.05mol/L 磷酸缓冲液	10.12	1948839	192573
pH 3.27 水溶液	9.87	1855771.7	188021.45
pH 3.96 水溶液	9.82	1857761.1	189181.37
pH 4.42 水溶液	10.05	2038758	202861.5
pH 5.95 水溶液	10.09	1983621	196592.8
pH 6.35 水溶液	9.97	1969610	197553.7
pH 6.72 水溶液	10.07	1928161	191475.8
pH 6.84 水溶液	9.99	1876478	187835.6
pH 7.39 水溶液	10.12	1908552	188592.1

注: (归一化结果数值=峰面积/样本质量)

在吗啡的定量分析中, 最大程度的将吗啡组分从固体中转移到液体中是保障定量结果符合真实值的前提, 本实验分别比较了甲醇溶解法、反提法、磷酸缓冲液提取、不同 pH 值的盐酸水溶液提取(pH 3.2~7.4, 8 个点)等方法。按不同方法提取、液相色谱分析并按称取样本质量归一化后的结果如表 1 所示。

实验表明: 甲醇对吗啡的溶解能力略高于水, 同

时明显好于反提法; pH 值对水提取法的效果影响小且在 pH 3.2~7.4 范围内无显著规律。甲醇溶解法溶解的杂质较多, 综合考虑以上因素, 将甲醇溶解法确定为前处理的基本方法。

2 实验结果与分析

2.1 吗啡浓度的测定结果

2.1.1 线性关系

分别精密吸取按 1.2.2 配制成的火锅底料供试品溶液, 每份样品进样 10 μL, 结果显示吗啡峰形对称, 与相邻峰分离度良好色谱图。

分别取不同浓度的对照品溶液 10 μL 进样, 记录响应的峰面积。

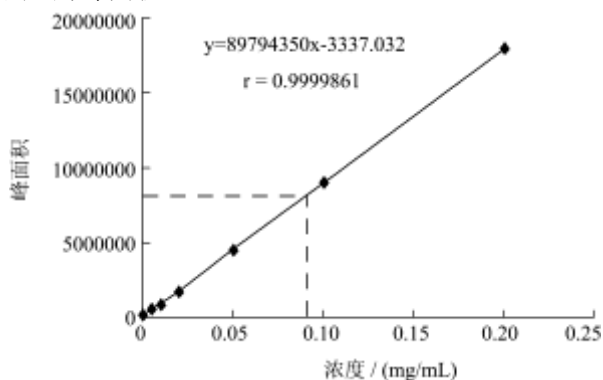


图 1 标准工作曲线

Fig 1 The calibration curve

如图 1 以对照品峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 X 为横坐标进行线性回归, 结果表明, 吗啡在 0.02-2μg 范围内呈良好的线性关系。根据 1.2.4 公式可得吗啡含量, 结果见表 2。

表 2 不同品牌火锅底料中吗啡含量测定结果

Table 2 Morphine contents of samples of different brand

品牌一/%	品牌二/%	品牌三/%
5.30	7.60	10.21
5.31	7.59	10.20
5.32	7.61	10.19

2.1.2 精密度实验

分别取高、中、低三个浓度的吗啡标准溶液, 各浓度连续进样 10 针, 计算样本的日内相对标准偏差; 连续检测 6 d, 计算样本的日渐相对标准偏差, 结果见表 3。

2.1.3 回收率实验

由于吗啡组分多以吗啡碱或盐的形式存在, 因此在上样前需用氨水润洗小柱并在上样时将样品调至碱性, 使其以碱的形式与 C₁₈ 填料充分结合并且不易被淋洗液洗脱。对于氨水浓度的选择, 设计实验取 0~1% 间的六个浓度, 分别以 2 mL 润洗小柱, 上样液

为 2 mL 样品加 0.5 mL 相应浓度的氨水。结果如图 2 所示, 说明只需要少量氨水即可获得 >99% 的高回收率。

表 3 吗啡的日内、日间精密度实验结果

Table 3 The days of morphine, daytime experimental results of precision

对照品溶液浓度/(mg/mL)	日内精密度 (n=10)		日间精密度 (n=6)	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
	RSD/%	RSD/%	RSD/%	RSD/%
0.0002	0.14	0.57	1.31	2.47
0.02	0.12	0.53	1.23	2.36
0.2	0.11	0.51	1.18	2.19

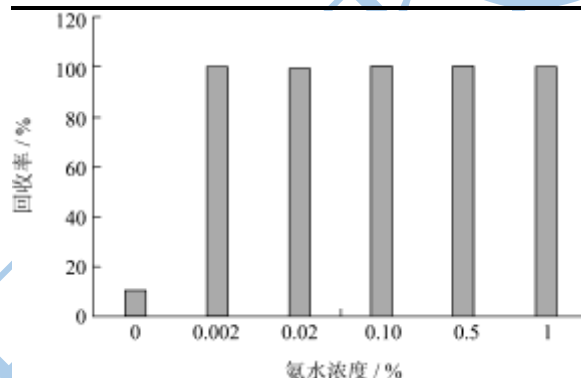


图 2 氨水浓度对固相萃取回收率的影响

Fig.2 Effect of ammonia water concentration on the recovery rate of solid-phase extraction

2.2 测定条件的优化

2.2.1 流动相的选择

实验分别考察了磷酸盐缓冲体系、醋酸铵-三乙胺缓冲体系和庚烷磺酸钠-磷酸二氢钾离子对体系作为水相时的情况。磷酸缓冲体系保留时间过短且峰形差; 醋酸铵-三乙胺体系虽然能够得到较为满意的理论塔板数, 但仍然存在较为严重的峰形不对称及基线下漂现象, 而庚烷磺酸钠-磷酸二氢钾离子对体系不仅具有合适的保留行为并且具有很好的正态峰形。

为实现色谱行为的最优化, 实验中还进一步考察了离子对体系 pH 值变化情况、离子对试剂浓度、缓冲盐浓度、三乙胺改性剂浓度对吗啡分离和检测的影响。实验结果显示, 离子对体系 pH 变化只对保留时间略有影响, 对吗啡柱效及拖尾因子均无显著影响; 磷酸二氢钾、庚烷磺酸钠分别在 0.05 mol/L 和 0.0025 mol/L 浓度下具有柱效极大值, 保留时间随着磷酸二氢钾浓度的增加逐渐减小, 而随着庚烷磺酸钠浓度的增加逐渐延长; 三乙胺改性剂浓度对峰形的改善不大。综上所述, 流动相确定为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾、0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠水溶液-乙腈体系。

2.2.2 初始浓度的选择

理论塔板数是衡量柱效高低的代表性参数。在其它参数恒定时改变有机相初始浓度,发现峰面积、拖尾因子无显著变化,保留时间随初始浓度增加而减小,而理论塔板数有明显的规律性变化。

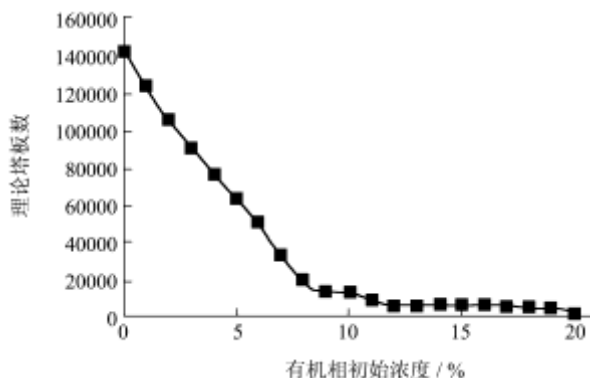


图3 有机相初始浓度-理论塔板数变化曲线图

Fig.3 Effect of initial concentration of organic phase on the number of theoretical plates

结果如图3所示,在0~8%范围内,随初始浓度增加,塔板数迅速减少,在8%之后进入平台期并略有降低。初始浓度为0%时塔板数最高,但保留时间长达23.85 min,考虑到在测定中批量处理样本的时效性,保留时间不宜过长,且咖啡因是主要成分中保留时间最短的,若等到成分全部出峰,需要更多的时间,并且,初始浓度低时梯度回复慢,下一针进样前所需平衡时间较长,也会耗费一部分时间。所以暂将有机相初始浓度定在4%~8%范围内。确定采用6%乙腈的初始浓度

2.2.3 梯度速率的选择

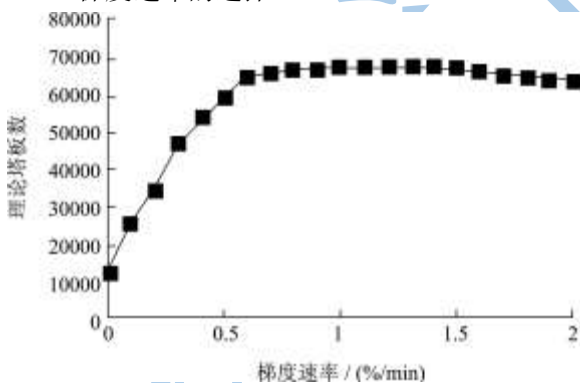


图4 梯度速率-理论塔板数变化曲线图

Fig.4 Effect of gradient rate on the number of theoretical plates

当梯度速率在0~0.6 %/min 范围内升高时,塔板数迅速升高,而超过0.6 %/min 之后进入平台期,并在1.5~2 %/min 范围内略有下降。当梯度速率在0~2 %/min 范围内升高时,虽然峰面积无显著变化,而峰高不断升高,响应不断增强。所以,梯度速率应大于0.6 %/min。鉴于梯度速率超过1.7 %/min 后峰高增加已不显著、理论塔板略有下降、保留时间随梯度

速率增加而减少,故实验没有考察梯度速率大于2 %/min 后的情况。综合以上情况,暂将梯度速率定在0.6~2 %/min 范围内。

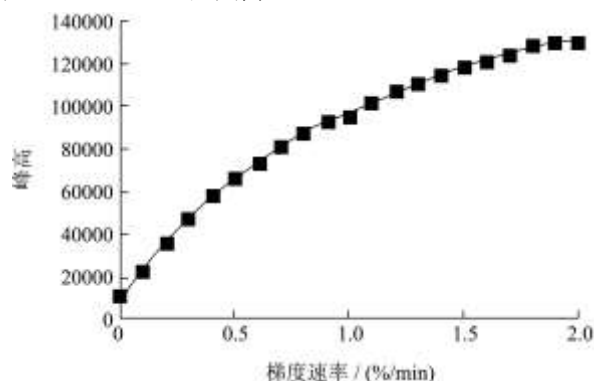


图5 梯度速率-峰高变化曲线图

Fig.5 Effect of gradient rate on peak height

结果如图4、5所示,在上述初始浓度及梯度速率实验确定的参数范围内,考察梯度速率分别为2、1.5、1、0.6 %/min 时不同初始浓度条件下的各个指标,综合考虑保留时间、塔板数、峰高和拖尾因子等因素,最终确定2%/min 的梯度速率。

2.2.4 淋洗与洗脱方法的选择

实验分别考察了以3、5、7、9、11 mL水作为淋洗剂的效果,结果表明,杂质峰数量和面积无显著差异。对于洗脱液,分别考察了氯仿和含10%甲醇的5%醋酸的洗脱效果,后者优于前者,且减少了挥发复溶的步骤,更加简便。分别以3、4、5、6 mL含10%甲醇的5%醋酸润洗小柱,实验表明以3 mL润洗时回收率已超过98%,保险起见,选择3 mL作为洗脱液体积。

2.2.5 流速的选择

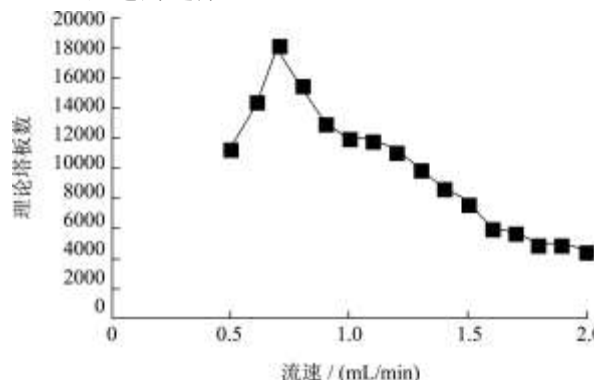


图6 流速-理论塔板数变化曲线图

Fig.6 Effect of flow rate on the number of theoretical plates

在起始浓度、梯度速率、柱温一定的条件下进行流速实验,如图6、7所示,当流速为0.7 mL/min 时,塔板数达到极值,在0.7~2 范围内,随流速增大,塔板数持续降低。并且,在0.5~2 mL/min 范围内,随流速增大,峰面积持续降低。

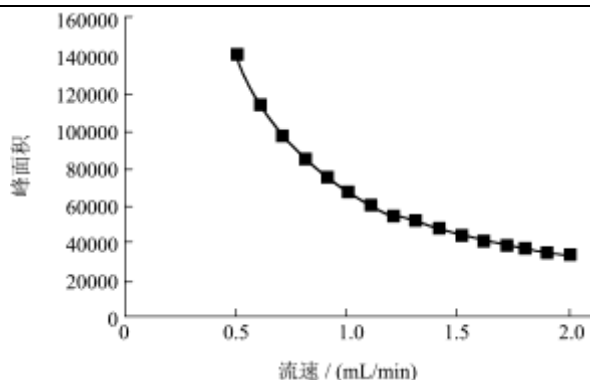


图7 流速-峰面积变化曲线图

Fig.7 Effect of flow rate on the peak area

结果如图 6、7 所示, 考虑到低流速会导致重现性降低、色谱柱损耗增大、保留时间过长等问题, 流速最终确定为 1 mL/min。

2.2.6 柱温的选择

在起始浓度、流速、梯度速率一定的条件下, 将柱温分别设置于 20、25、30、35、40、45 °C 进行实验。

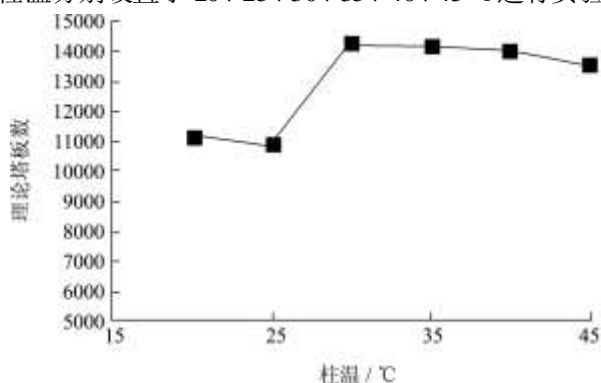


图8 柱温-理论塔板数变化曲线图

Fig.8 Effect of column temperature on the number of theoretical plates

结果如图 8 所示, 塔板数在 30 °C 时最高, 35 °C 次之。随温度升高, 保留时间减少、峰高增加。考虑到仪器温度设置限制和降低损耗等因素, 选择 35 °C。

3 结论

3.1 在样本的测定分析中, 最大程度的将吗啡组分从固体中转移到液体中是保障定量结果符合真实值的前提, 本实验分别比较了甲醇溶解法、反提法、磷酸缓冲液提取、不同 pH 值的盐酸水溶液提取 (pH 3.1~7.4, 8 个点) 等方法。按不同方法提取、液相色谱分析并

按称取样本的质量归一化后的结果显示, 综合考虑上述因素, 将甲醇溶解法确定为前处理的基本方法。

3.2 考虑到火锅底料样本的复杂性, 及实验中测定的样本可能含有很多未知的杂质, 本实验进一步开发和优化了固相萃取方法。对本实验前处理方法首先甲醇溶解法, 固相萃取法可以作为水溶法的补充。使用国产固相萃取小柱可以得到 98.7% 的回收率, 能够满足要求, 进口固相萃取小柱略优于国产柱。

3.3 本实验对吗啡的高效液相色谱分析条件进行了系统优化, 最终确定的分析条件为: 流动相 0.05 mol/L 磷酸二氢钾、0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠水溶液-乙腈; 柱温 35 °C; 流速 1 mL/min; 流动相梯度程序: 以 6% 有机相 (乙腈) 为初始浓度, 以 2 %/min 升至 26%, 以 9 %/min 升至 35%, 保持 9 min; 检测波长 220 nm。建立了一个适合于检测和科学研究的吗啡 HPLC 分析方法。

参考文献

- [1] 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, 17(4): 401-402
- [2] 黄桂颖, 向卫东, 杨幼慧, 等. 反相高效液相色谱法测定荔枝肉中 10 种有机酸[J]. 现代食品科技, 2009, 25(5): 568-570
- [3] 黄贞子, 于晓英, 贾薇. 固相萃取净化-反相 HPLC 法测定调料中 5 种阿片生物碱[J]. 环境与健康杂志, 2000, 17: 30-31
- [4] 陈建军. 固相萃取-反相高效液相色谱法测定火锅中吗啡和可待因[J]. 实用预防医学, 2006, 13(3): 766-767
- [5] 李咏杰, 孙伟, 张新威, 等. 罂粟壳中吗啡提取方法的研究[A]. 第二届全国毒品检验技术交流会论文集[C]. 北京: 群众出版社, 2005, 60-67
- [6] 王强, 洗燕萍, 罗海英, 等. 高效液相色谱法检测鸡蛋中三聚氰胺[J]. 现代食品科技, 2009, 25(6): 711-713
- [7] 李永庆, 陈蕾, 赵文, 等. 中国药典中阿片系列品种吗啡含量测定方法的研究与建立[J]. 中国药品标准, 2004, 5(1): 18-21
- [8] 顾利红, 施亦斌. 反相 HPLC 法测定罂粟壳中吗啡、可待因的含量[J]. 今日药学, 1999, 3: 17-18
- [9] 李莉, 朱铭洪, 何执静. 高效液相色谱法测定火锅汤料中微量吗啡[J]. 江苏预防医学, 1997, 3: 87-89
- [10] 王勇. 固相萃取技术-HPLC 测定复方甘草片中吗啡的含量[J]. 色谱, 1998, 16(3): 229-231