

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

皮 立^{1,2}, 胡凤祖¹, 师治贤¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:用所建立的高效液相色谱 荧光检测法测定了罂粟籽和火锅汤料中的罂粟碱。采用的色谱柱为 RP-C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm); 检测激发波长为 285 nm, 发射波长为 355 nm; 流动相为甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵 (体积比为 70:30), 流速 0.8 mL/min。实验结果表明, 罂粟碱的进样量为 1 × 10⁻⁴ ~ 0.1 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 (以信噪比大于 3 计) 达到 0.02 ng。罂粟籽中罂粟碱的回收率为 99.0% ~ 100.8%。方法快速准确, 简便灵敏, 分离度高, 能够满足有关食品中罂粟碱的检测要求。

关键词:高效液相色谱法; 荧光检测; 罂粟碱; 罂粟籽; 火锅汤

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713 (2005) 06-0639-03

Determination of Papaverine in Seeds of Papaver somniferum L. and Soup of Chafing Dish by High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection

PILI^{1,2}, HU Fengzu¹, SHI Zhixian¹

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A method of reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection was developed for the separation and determination of papaverine in seeds of Papaver somniferum L. and soup of chafing dish. 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 355 nm. An RP-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) was used. The mobile phase was a mixture of methanol and 0.02 mol/L ammonium acetate (70:30, v/v). The flow rate was 0.8 mL/min. A linear range was obtained from 0.1 ng to 0.1 μg with a good correlation. The lowest detection limit was 0.02 ng. The average recovery of seeds for Papaver somniferum L. was 99.0% - 100.8%. The method is rapid, accurate, sensitive and suitable for the separation and determination of papaverine in foods.

Key words: high performance liquid chromatography; fluorescence detection; papaverine; seed of Papaver somniferum L.; soup of chafing dish

罂粟碱 (papaverine), 化学名为 6,7-二甲氧基-1-(3,4-二甲氧基苄基)-异喹啉 [6,7-dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)-isoquinoline], 别名为帕帕非林, 是从鸦片 (opium) 中提取或化学合成制得的一种异喹啉类生物碱, 为结晶或白色结晶性粉末, 熔点为 146 ~ 148 °C, 几乎不溶于水, 微溶于乙醇和乙醚, 易溶于氯仿。罂粟碱对血管、支气管、胃肠道、胆道等平滑肌都有松弛作用, 主要用于脑血栓、肺栓塞、肢端动脉痉挛及动脉栓塞性疼痛等病症的辅助治疗。久服易成瘾, 过量摄入会引起心律不齐, 严重

时致人死亡。罂粟碱主要存在于罂粟壳和罂粟籽 (seeds of Papaver somniferum L.) 内。为了监控罂粟籽在食品中的使用和保证人民群众的饮食安全, 本文用高效液相色谱 荧光检测法 (HPLC-FL) 对罂粟籽和火锅汤料中的罂粟碱进行了分析测定。

检测罂粟碱的方法主要有紫外分光光度法^[1]、荧光分光光度法^[2]和高效液相色谱紫外检测法^[3-5]等。高效液相色谱紫外检测法的重现性好, 但检测灵敏度不能满足实际检测的需要。本文利用高效液相色谱分离度高、重现性好和荧光检测器灵

收稿日期: 2004-11-30

作者简介: 皮立, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物分析和植物化学, Tel: (0971) 6132750, E-mail: pili@nwipb.ac.cn

通讯联系人: 胡凤祖, 女, 副研究员, Tel: (0971) 6132750, E-mail: hufz@nwipb.ac.cn

基金项目: 青海省植物源农药的开发利用前期研究。

敏度比紫外检测器高 2 个数量级的特点,建立了测定罂粟碱含量的高效液相色谱-荧光检测法。将该法用于检测食品中有关毒品原料,结果令人满意。

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂和材料

Waters 600E 高效液相色谱仪, Waters 474 荧光检测器, Waters 746 积分仪, HS3120 超声波清洗仪, Shimadzu RF-540 荧光分光光度计, RE52CS-2 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

甲醇(色谱纯, TED IA 公司)(仅用于流动相的配制), 甲醇(分析纯, 西安试剂厂), 乙酸铵(分析纯, 莱阳化工实验厂), 自制无离子水, 盐酸罂粟碱标准品(Sigma 公司)。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm), 流动相为甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(体积比为 70:30), 流速 0.8 mL/min, 荧光激发波长 285 nm, 发射波长 355 nm, 进样量 10 μL。

1.3 提取方法

罂粟籽中罂粟碱的提取方法:称取 0.1 g 罂粟籽于三角瓶中,加入 20 mL 甲醇,超声 1 h 后取出放冷,再移入 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,先用滤纸过滤,再用 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液进行 HPLC 分析。

火锅汤料和火锅配料中罂粟碱的提取方法:称取约 10 g 样品于锥形瓶中,加入 50 mL 甲醇,称重。超声 30 min 后取出放冷,补足甲醇的损耗量,摇匀,用滤纸过滤,再用甲醇稀释至适当的浓度,用 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液进行 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离条件的选择

2.1.1 流动相

实验过程中考察了 3 种流动相体系对提取效率的影响:(1)甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(体积比为 75:25);(2)0.5% 乙酸铵-1% 三乙胺-甲醇(体积比为 49:1:50);(3)甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(体积比为 70:30)。经试验比较,发现以甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(体积比为 70:30)溶液为流动相时,罂粟籽的分离效果最好,结果见图 1。

2.1.2 激发波长和发射波长

称取适量罂粟碱对照品,用甲醇配成质量浓度为 1 g/L 的溶液。据文献[2]报道,罂粟碱在 282 nm 激发波长处有好的特征性。固定激发波长为 285 nm,在 200~500 nm 的范围内扫描发射波长,

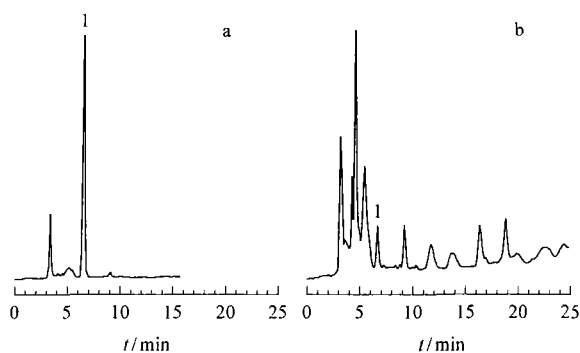


图 1 罂粟碱对照品(a)和罂粟籽(b)的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of papaverine standard (a) and seeds of *Papaver somniferum* L. (b)
1. papaverine.

结果发现 352 nm 处罂粟碱有最大吸收。综合考虑实际应用的结果,采用 285 nm 为激发波长,355 nm 为发射波长,在复杂的火锅汤料的检测中收到了很好的效果。

2.2 提取条件的选择

实验中考察了提取方式、溶剂、提取时间等 3 个因素对提取效率的影响。分别采用索氏提取法和超声提取法,且分别用无水乙醇、甲醇、95%乙醇为溶剂,提取时间分别为 10, 20, 30, 60, 90 min。

比较索氏提取法和超声提取法,发现索氏提取法提取时间长,中间步骤多,提取效果比超声提取法差,因此选择采用超声提取法进行提取。实验发现,罂粟碱在甲醇中提取效率最高,杂质干扰少,所以选择甲醇为溶剂。实验还发现,超声提取 60 min 时的提取效果最佳。

在上述提取条件下,火锅汤料的色谱图见图 2。

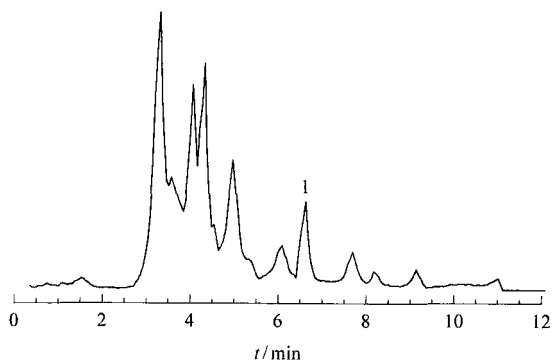


图 2 火锅汤料的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of soup of chafing dish
1. papaverine.

2.3 标准曲线、线性范围和检测限

精密称取罂粟碱对照品约 5 mg 于 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,作为罂粟碱标准储备液。

移取罂粟碱标准储备液适量,加适量甲醇配制

成 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 和 10.0 mg/L 共 5 个质量浓度的系列标准溶液。依次吸取 10 μ L 进样进行 HPLC 分析。以峰面积 Y 对质量浓度 X (mg/L) 进行回归处理, 得到的回归方程为 $Y = 92\ 7476 + 14\ 838.54X$, r 为 0.9997, 线性范围为 0.01 ~ 10.0 mg/L。结果表明, 在一定的质量浓度范围内, 罂粟碱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 0.02 ng。

2.4 精密度试验

精密吸取 10 mg/L 的罂粟碱对照品 10 μ L 进行 HPLC 检测。连续进样 5 次, 测得峰面积的相对标准偏差为 0.90%, 表明方法的精密度良好。

2.5 回收率试验

精密称取已知罂粟碱含量的罂粟籽若干份, 每份约 1 g。向其中分别精密添加 50, 100, 125 μ g 罂粟碱对照品, 按“1.3”节中所述提取方法制备样品液并进行 HPLC 测定, 结果见表 1。

表 1 罂粟碱的加标回收率试验

Table 1 Recovery experiments of papaverine

Background/ μ g	Added/ μ g	Found/ μ g	Recovery/ %	Average recovery/%
106.9	50.3	159.4	104.4	100.4
107.7	50.3	157.2	99.3	
107.9	50.3	157.0	97.6	
107.2	100.6	207.9	100.1	100.8
107.6	100.6	212.3	104.1	
107.5	100.6	206.3	98.3	
108.0	125.7	236.7	102.8	99.0
107.2	125.7	228.9	96.8	
107.0	125.7	229.8	97.3	

2.6 样品的测定

精密称取罂粟籽约 1 g, 按“1.3”节所述制备样品液, 进行 HPLC 测定。对 10 批罂粟籽样品中的罂

粟碱进行测定, 每批样品平行进样 2 次, 测得罂粟碱含量 (质量分数) 为 0.009 0% ~ 0.011 0%。

同时, 对市场随机抽查的 10 批火锅汤料和部分火锅配料的罂粟碱含量进行了检测。取样品约 10 g, 按“1.3”节中所述制备样品液并进行 HPLC 测定, 结果见表 2。

表 2 火锅汤料及火锅配料中罂粟碱的测定结果 (n=2)

Table 2 Determination of papaverine in the soup of chafing dish and formula of chafing dish (n=2) mg/kg

Batch No.	Soup of chafing dish	Formula of chafing dish
1	0.354	31.704
2	-	8.418
3	0.557	-
4	-	26.658
5	0.476	-
6	-	-
7	0.875	0.024
8	-	-
9	0.246	-
10	0.498	-

- : not detected.

参考文献:

- [1] Tang Yong, Luan Jie, Wang Qian, Wu Li, Cao Rui, Liu Shuhong. Acta Academiae Medicinae Sinicae (唐勇, 栾杰, 王黔, 乌丽, 曹蕊, 刘淑红. 中国医学科学院学报), 2002, 24(4): 413
- [2] Yan Chengnong, Shangguan Yunfeng. Chinese Journal of Analysis Laboratory (颜承农, 上官云凤. 分析试验室), 2003, 22(3): 5
- [3] Dai Weijie, Niu Weimin. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (戴维杰, 钮伟民. 中国卫生检验杂志), 2003, 13(5): 607
- [4] Wang Jianxin, Chen Wenhui, Wang Bin, Dong Yahua, Xu Bo. Occupation and Health (王建新, 陈文汇, 王彬, 东亚华, 徐波. 职业与健康), 2004, 20(6): 56
- [5] Hao Hongyan, Guo Jixian, Shun Qingsheng, Liang Jie, Yu Yunqiu, Che Zhentao. Acta Pharmaceutica Sinica (郝红艳, 郭济贤, 顺庆生, 梁杰, 郁韵秋, 车镇涛. 药学报), 2000, 35(4): 289