

超高效液相色谱-串联质谱法快速检测保健食品中非法添加的 6 种减肥类化学成分的研究

钮正睿¹, 张庆生¹, 曹进¹, 顾雪竹^{2*}

(1. 中国食品药品检定研究院食品化妆品检定所, 北京 100050;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**建立减肥类保健食品中非法添加的 6 种化学成分的快速检测方法。**方法:**采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS-MS),Acquity BEH-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相乙腈-0.1% 甲酸进行梯度洗脱,电喷雾电离(ESI),选择性离子扫描(SIR)和多反应监测(MRM)模式,对 25 个减肥类保健食品进行 6 种化学成分非法添加的分析。**结果:**6 份样品检出了非法添加成分盐酸西布曲明和酚酞。**结论:**该方法专属性强,灵敏度高,适用于减肥类保健食品中非法添加成分的筛选及确证工作。

[关键词] 超高效液相色谱-串联质谱; 选择性离子扫描; 多反应监测; 减肥类保健食品; 非法添加

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0091-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180091

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140722.1442.002.html>

[网络出版时间] 2014-07-22 14:42

Research of Rapid Detection for Six Chemical Constitutes Illegally Added into Health Foods for Diet by UPLC-MS-MS

NIU Zheng-rui¹, ZHANG Qing-sheng¹, CAO Jin¹, GU Xue-zhu^{2*}

(1. Institute for Food and Cosmetics Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing, 100700, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study was to establish a rapid detection method for six chemical constituents illegally added into health foods for diet. **Method:** This method used on the ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrum (UPLC-MS-MS) technology, in which an Acquity BEH-C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) was used with the mobile phase of 0.1% formic acid and acetonitrile by gradient elution. The target compounds were analyzed through electrospray ionization, selective ion scan (SIR) and multiple-reaction monitoring (MRM) modes. The compounds illegally added into slimming health foods were qualitatively identified and quantitatively determined according to the quasi-molecular ion peaks and the MRM chromatography peaks by comparison with those of reference substances. This method was used for analysis of 25 batches of health foods for diet. **Result:** Sibutramine hydrochloride and phenolphthalein were found in 6 batches of slimming health foods. **Conclusion:** The method is of great specificity, and sensitivity and can be used to detect the chemical compositions into the slimming health foods.

[Key words] UPLC-MS-MS; selective ion scan; multiple-reaction monitoring; health foods for diet; illegally addition

[收稿日期] 20140605(004)

[第一作者] 钮正睿, 博士, 助理研究员, 从事食品化妆品质量分析研究, Tel:010-67095914, E-mail:liuhy@bjmu.edu.cn

[通讯作者] * 顾雪竹, 本科, 助理研究员, 从事中药化学、中药炮制研究, Tel:010-64014411-2975, E-mail:guxuezhu@gmail.com

随着人们生活水平的提高,对保健品的需求明显增加,某些不法商家为了追求利益,在保健品中非法添加化学成分以求增强保健品功效,从而扩大销量。这不仅损害了消费者的经济利益,更危害了消费者的身体健康。在减肥类保健食品非法添加检测中,国家食品药品监督管理局已经发布药品检验补充检验方法和检验项目批准件(2006004号)和“关于印发保健食品安全风险监测有关检测目录和检测方法的通知”(食药监办许[2010]114号),其中收录了5种非法添加成分的检测方法,使用高效液相色谱法,分析时间较长,且质谱定性离子信息较少。本文使用超高效液相色谱-串联质谱,建立了6种减肥类成分的检验方法,为打击不法行为提供了技术保障。

1 材料

1.1 仪器 Acquity UPLC(美国waters),Xevo TQ-S型三重四级杆串联质谱仪(美国waters),AL204型1/1万分析天平、XP 205型1/10万分析天平(METTLER TOLEDO)。

1.2 试剂 乙腈、甲醇(色谱纯,Merck),超纯水,质谱级甲酸(ACS)。对照品:咖啡因(批号171215-201211,纯度99.9%),盐酸麻黄碱(批号171241-201007,纯度99.7%),盐酸芬氟拉明(批号100073-200002),酚酞(批号100090-199601),盐酸西布曲明(批号100624-200401),呋塞米(批号100544-201102,纯度99.7%),均由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 检测条件

2.1.1 色谱条件 Acquity BEH-C₁₈色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(表1),流速0.3 mL · min⁻¹,柱温35℃,进样量2 μL,强洗针溶剂乙腈-水(90:10,含0.1%甲酸),弱洗针溶剂乙腈-水(10:90)。

表1 流动相梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0	90	10
2	80	20
6	50	50
6.1	2	98
9	2	98

2.1.2 质谱条件 离子化模式电喷雾,离子源温度150℃,正负离子扫描,正离子模式毛细管电压

3 kV,负离子模式毛细管电压0.5 kV,脱溶剂气温度400℃,脱溶剂气流量800 L · h⁻¹,锥孔气流量150 L · h⁻¹,各化合物的锥孔电压、准分子离子和主要碎片离子以及碰撞能量见表2。

表2 6种化合物的二级质谱参数

化合物	锥孔电压	准分子离子	MRM特征离子	MRM碰撞能量
	/V	(m/z)	(m/z)	/V
盐酸麻黄碱	16	166.0	148.0 ¹⁾ ,132.9,124.9	10,20,10
咖啡因	16	195.0	138.0 ¹⁾ ,110.0	18,25
盐酸芬氟拉明	30	232.0	187.0,159.0 ¹⁾ ,109.0	12,22,40
酚酞	30	319.2	225.0 ¹⁾ ,197.0,141.0	15,30,40
盐酸西布曲明	32	280.2	152.9,138.9,124.9 ¹⁾	14,14,24
呋塞米*	10	328.9	285.0 ¹⁾ ,204.9	15,20

注:¹⁾为定量离子;呋塞米为负离子扫描模式。

2.2 对照品溶液和供试液制备

2.2.1 对照品溶液制备 分别精密称取咖啡因5.05 mg、盐酸芬氟拉明5.21 mg、酚酞5.22 mg、呋塞米5.36 mg、盐酸麻黄碱25.11 mg和盐酸西布曲明5.28 mg置于50 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得咖啡因101 mg · L⁻¹,盐酸芬氟拉明104 mg · L⁻¹,酚酞104 mg · L⁻¹,呋塞米107 mg · L⁻¹,盐酸麻黄碱502.2 mg · L⁻¹,盐酸西布曲明106 mg · L⁻¹标准储备液。

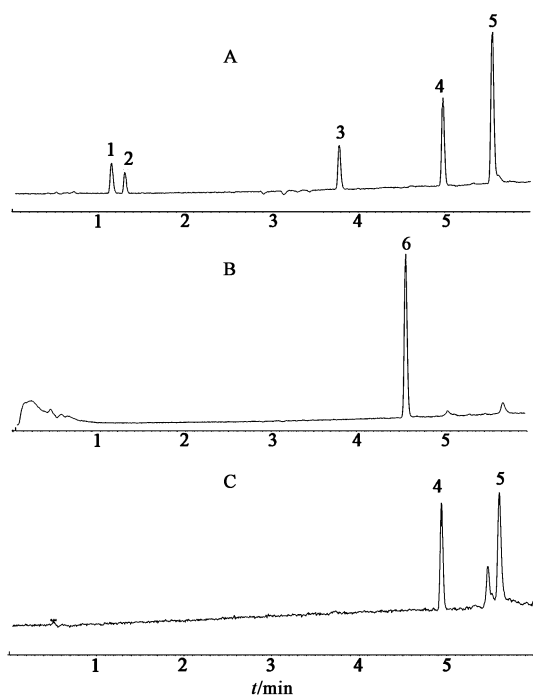
2.2.2 供试品溶液制备 精密称取相当于1次服用量的样品(片剂应研细,胶囊取内容物,口服液等液态样品可直接称量),置于50 mL量瓶中,加甲醇适量,超声提取15 min,放冷至室温,加甲醇稀释至刻度,摇匀后过0.22 μm微孔滤膜,根据样品浓度加入甲醇稀释,作为供试品溶液。

2.3 定性鉴别 精密量取各标准品储备液适量,加甲醇稀释制成混合对照品溶液,分别为咖啡因101 μg · L⁻¹、盐酸芬氟拉明20.8 μg · L⁻¹、酚酞208 μg · L⁻¹、呋塞米214 μg · L⁻¹、盐酸麻黄碱251.1 μg · L⁻¹和盐酸西布曲明106 μg · L⁻¹。

分别取混合对照品溶液和供试品溶液各2 μL,注入液质联用仪,在相同条件下,对二者进行SIR扫描分析,其中6份样品检测到盐酸西布曲明和/或酚酞的准分子离子峰m/z 280.2,319.2(图1)。

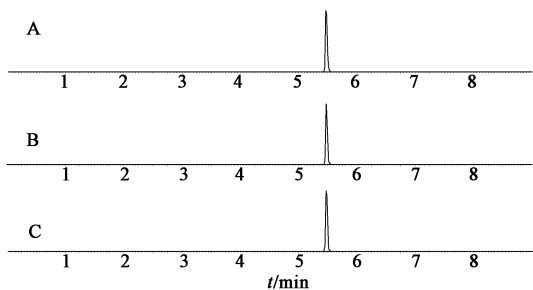
分别对m/z 280.2,319.2进行MRM模式分析,对照品溶液和供试品溶液的MRM特征离子的色谱峰保留时间一致(图2~5),结合SIR准分子离子质量数、MRM特征离子和色谱峰保留时间三方面的信

息,可证实6批保健食品中添加了盐酸西布曲明和/或酚酞。



A. 正离子模式; B. 负离子模式; C. 阳性样品 SIR
1. 盐酸麻黄碱; 2. 咖啡因; 3. 盐酸芬氟拉明; 4. 酚酞;
5. 盐酸西布曲明; 6. 呋塞米

图1 混合标准溶液及阳性样品 SIR 离子流



A. 280.2 > 152.9; B. 280.2 > 138.9; C. 280.2 > 124.9 (表3同)

图2 混合标准溶液中盐酸西布曲明 MRM

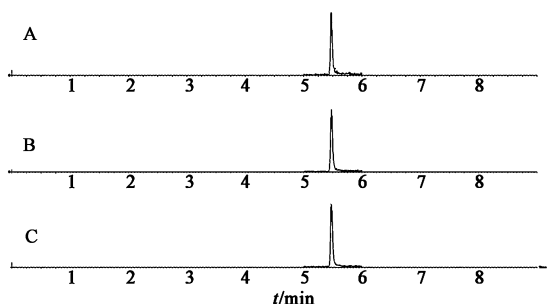
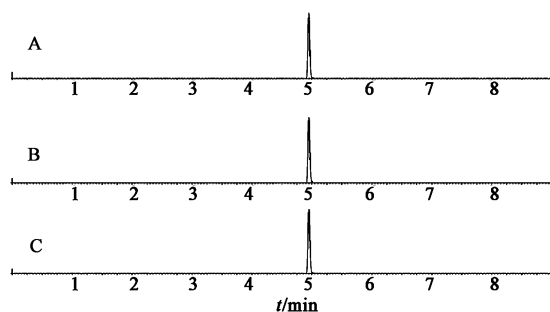


图3 阳性样品中盐酸西布曲明 MRM



A. 319.2 > 225; B. 319.2 > 197; C. 319.2 > 141 (表5同)

图4 混合标准溶液中酚酞 MRM

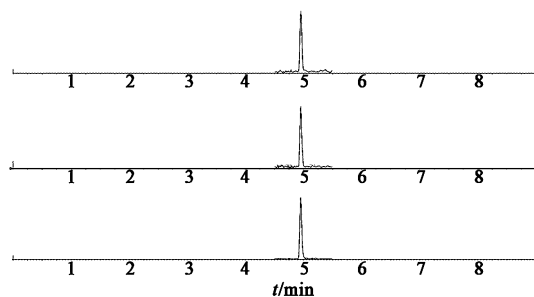


图5 阳性样品中酚酞 MRM

2.4 定量测定

2.4.1 线性关系考察 精密量取盐酸西布曲明和酚酞对照品储备液,用甲醇稀释成 21.2, 52.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。取该溶液逐步用甲醇稀释得到盐酸西布曲明为 10.6, 5.30, 2.65, 1.32, 0.660 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 酚酞为 26.0, 13.0, 6.50, 3.25, 1.62 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,分别取 10 μL 注入液质联用仪,表1中标注*号的离子作为定量离子,其他离子辅助定性,测定盐酸西布曲明和酚酞的峰面积,以峰面积为横坐标,质量浓度为纵坐标,计算回归方程,盐酸西布曲明的回归方程为 $Y = 8.0052 \times 10^{-4} X - 43.528 (r = 0.9989)$; $Y = 9.1512 \times 10^{-4} X - 16.021 (r = 0.9979)$; 结果表明,盐酸西布曲明在 6.60 ~ 212 pg 、酚酞在 16.2 ~ 520 pg 线性关系良好。

2.4.2 加样回收率试验 取经检测不含有非法添加成分的空白样品 9 份,置于 50 mL 量瓶中,作 3 个浓度的加样回收试验,①精密加入盐酸西布曲明和酚酞质量浓度分别为 21.2, 52.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液 2 mL; ②精密加入上述混合品溶液 10 mL; ③精密加入上述混合对照品溶液 20 mL。之后按照供试液制备方法制备,最终定容体积为 50 mL,进样 10 μL ,计算回收率,结果见表 3。

2.4.3 精密度试验 取 2.4.1 项下盐酸西布曲明 (5.30 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、酚酞 (13.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的混合对照品

溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 以定量离子的色谱峰面积计算, 结果盐酸西布曲明和酚酞峰面积 RSD 2.89%, 2.21%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定含量, 结果盐酸西布曲明和酚酞的峰面积 RSD 2.97%, 3.15%, 表明样品至少 24 h 内稳定。

表 3 减肥类保健食品中盐酸西布曲明(A)和酚酞(B)加样回收率

加入量/ng		测得量/ng		回收率/%		平均值/%		RSD/%	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
42.4	104	38.5	100	90.8	96.1				
42.4	104	37.9	92.5	89.4	88.9	90.5	91.7	1.1	4.3
42.4	104	38.7	93.5	91.3	89.9				
212	520	200	533	94.3	102				
212	520	205	532	96.7	102	97.6	102	4.0	0.9
212	520	216	524	101	101				
424	1040	433	1025	102	98.5				
424	1040	450	1059	106	101	104	100	2.0	1.7
424	1040	445	1052	105	101				

2.4.5 定量限和检出限测定 取阳性样品溶液稀释并用 MRM 模式测定, 盐酸西布曲明和酚酞的检出限分别为 0.1, 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 盐酸西布曲明和酚酞的定量限分别为 0.4, 0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4.6 样品含量测定 对从市场上抽样所得的 25 份样品按照 2.2.2 项下提取并测定, 其中 6 份样品(样品编号 4, 7, 9, 10, 12, 14)检出了盐酸西布曲明和/或酚酞, 6 份阳性样品中的 3 份(编号 4, 12, 14)同时检出了西布曲明和酚酞。西布曲明的添加量在 0.67% ~ 2.47%, 酚酞的添加量在 0.45% ~ 6.87%。见表 4。

3 讨论

国家食品药品监督管理局已经发布“关于印发保健食品安全风险监测有关检测目录和检测方法的通知”(食药监办许[2010]114号, 以下简称“通知”)中没有麻黄碱的检测方法, 其他 5 种物质 MRM 的碎片为 1~2 个。本研究增加了麻黄碱的检测方法, 并通过优化将芬氟拉明、酚酞和西布曲明的子离子增加为 3 个, 咖啡因和呋塞米的子离子增加

表 4 减肥类保健食品中非法添加的检测 %

No.	盐酸西布曲明	酚酞	No.	盐酸西布曲明	酚酞
1	n. d.	n. d.	14	1.50	0.45
2	n. d.	n. d.	15	n. d.	n. d.
3	n. d.	n. d.	16	n. d.	n. d.
4	0.67	6.87	17	n. d.	n. d.
5	n. d.	n. d.	18	n. d.	n. d.
6	n. d.	n. d.	19	n. d.	n. d.
7	2.47	n. d.	20	n. d.	n. d.
8	n. d.	n. d.	21	n. d.	n. d.
9	2.08	n. d.	22	n. d.	n. d.
10	1.85	n. d.	23	n. d.	n. d.
11	n. d.	n. d.	24	n. d.	n. d.
12	1.81	6.23	25	n. d.	n. d.
13	n. d.	n. d.			

为 2 个, 加强了方法专属性, 减少误判。

“通知”中使用了 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵-0.1% 乙酸系统作为流动相, 常规 HPLC 方法分离; 本方法采用 0.1% 甲酸, 简化了流动相的配制, 并采用 UPLC 进行分析, 将分析时间从 30 min 缩短至 9 min, 大大提高了检测效率。

过高浓度的样品不仅会对质谱造成污染, 同时也会产生离子抑制, 因此不宜选择过高的浓度范围。在测定样品中, 由于样品中非法添加量未知, 最好从较低浓度探索样品的浓度, 根据需要作出合理的稀释。

[参考文献]

- [1] 国家食品药品监督管理局. 关于印发保健食品安全风险监测有关检测目录和检测方法的通知[S]. 2010.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件(2006004号)[S]. 2006.
- [3] 张涛. LC-MS/MS 法分析减肥保健食品中非法添加的酚酞[J]. 中国医药科学, 2011, 1(18): 98.
- [4] 谢华, 张娟红, 王荣, 等. UPLC-MS/MS 法测定呋塞米方法学研究[C]. 兰州: 西北地区第七届色谱学术报告会暨甘肃省第十二届色谱年会论文集, 2012: 224.
- [5] 张翠英, 李振国, 刘乃强. UPLC-MS/MS 法检测减肥剂中非法添加麻黄碱、西布曲明和芬氟拉明[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(8): 1890.

[责任编辑 顾雪竹]