

超高效液相色谱-串联质谱法测定 保健食品中 78 种非法添加化学药物

刘子雄¹, 黄景辉¹, 谭贵良², 谢国丹¹, 李雪雁², 王乾蕾¹, 李向丽³, 刘研³, 张景强², 胡敏⁴

(1. 中山市食品药品检验所, 广东中山 528437) (2. 电子科技大学中山学院, 广东中山 528402)

(3. 中山火炬职业技术学院健康产业学院, 广东中山 528436) (4. 广东省生态环境技术研究所, 广东广州 510650)

摘要: 建立了超高效液相色谱-串联质谱法快速筛查减肥、抗疲劳和增强免疫力类保健食品中非法添加 78 种化学药物的方法。保健食品样品经甲醇溶剂提取、QuEChERS 净化, 试样以 C18 柱分离, 多反应监测 (MRM) 模式进行定量与定性分析, 采用外标法定量。采用 ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (2.1×100 mm, 1.7 μm) 进行分离, 以乙腈和乙酸铵溶液 (含 0.1% 甲酸) 作为流动相, 进行梯度洗脱, 质谱采用正离子和负离子同时扫描分析。在优化的色谱、质谱条件下, 78 种化学药物能够得到较好分离, 在线性范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.9991, 检出限 (LOQ) 为 0.5 μg/kg~420 μg/kg。各组分在三个不同加标水平下平均回收率为 59.9%~120.7%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.3%~16.2%。运用本方法对 57 批次保健食品进行快速筛查, 检出 41 批次样品含有一种或多种非法添加药物, 被检出的药物为西布曲明、苜蓿西布曲明、氯代西布曲明、酚酞、伪麻黄碱、麻黄碱、二甲双胍、咖啡因、茶碱、番泻苷 A、番泻苷 B、吠塞米、大黄素和西地那非。本方法样品处理过程简单, 分析时间短, 准确可靠, 灵敏度高, 适用于保健食品中非法添加化学药物的定性定量检测及快速筛查。

关键词: 保健食品; 化学药物; QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱; 非法添加

文章编号: 1673-9078(2020)12-283-292

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0551

Determination of 78 Chemical Drugs Illegally Added in Health Food by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LIU Zi-xiong¹, HUANG JING-hui¹, TAN Gui-liang², XIE Guo-dan¹, LI Xue-yan², WANG Qian-lei¹, LI Xiang-li³,
LIU Yan³, ZHANG Jing-qiang², HU Min⁴

(1. Zhongshan Institute for Food and Drug Control, Zhongshan 528437, China)

(2. University of Electronic Science and Technology of China, Zhongshan Institute, Zhongshan 528402, China)

(3. School of Health Industry, Zhongshan Torch Vocational and Technical College, Zhongshan 528436, China)

(4. Guangdong Institute of Eco-environmental Science & Technology, Guangzhou 510650, China)

Abstract: A method was developed for the determination of 78 chemical drugs illegally added in three types of health foods (slimming,引文格式:

刘子雄, 黄景辉, 谭贵良, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定保健食品中 78 种非法添加化学药物[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 283-292

LIU Zi-xiong, HUANG JING-hui, TAN Gui-liang, et al. Determination of 78 chemical drugs illegally added in health food by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 283-292

收稿日期: 2020-06-11

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2017A030313218; 2020A1515011308); 中山市社会公益重大专项 (2018B1025); 电子科技大学中山学院教学团队项目 (JXTD201901)

作者简介: 刘子雄 (1984-), 男, 工程师, 研究方向: 食品检测分析

通讯作者: 谭贵良 (1977-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品质量与安全; 胡敏 (1982-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 环境分析、分子生物学

anti-fatigue and sexual promoting health foods) by QuEChERS--ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The samples were extracted with methanol. The extracted solution was purified with QuEChERS approach. The seventy eight chemical drugs were then separated on a ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1×100 mm, 1.7 μm) through gradient elution with acetonitrile and 10 mmol/L of ammonium acetate solution (0.1% formic acid) using as mobile phase and detected by MS/MS under multi-reactions monitoring (MRM) modes (ESI⁺ and ESI⁻). The chemical drugs were quantified with external standard method. Under the optimal conditions, these chemical drugs were well separated, and had good linear relationship ($r \geq 0.9991$). The limits of detection (LOD) ($S/N \geq 3$) were 0.5 μg/kg~420 μg/kg. The average recoveries at three spiked levels were in the range of 59.9%~120.7%, with the relative standard deviation (RSD, $n=3$) of 1.3%~16.2%. This newly developed method was successfully applied for the determination of 57 health food samples, in which 14 chemical drugs were found in 41 samples. The developed method is rapid, simple, sensitive and highly efficient which can be used for the qualitative and quantitative determination of illegally added chemical drugs in the slimming, anti-fatigue and sexual promoting health foods.

Key words: health food; chemical drugs; QuEChERS; UPLC-MS/MS; illegal add

随着人们生活水平的提高以及亚健康人群的不断增多,人们对保健食品的需求日益旺盛。保健食品不以治疗疾病为目的,往往只适用于特定人群食用,具有调节机体功能的作用,对人体不产生任何急性、亚急性或慢性危害,可对人们正常膳食进行有益补充。特别是近年来减肥类、抗体力疲劳类和增强免疫力类保健食品行业发展异常火爆,但存在发展过快、过热,较为混乱的局面。面对巨大的市场需求和利益诱惑,不少不法商贩为了缩短疗效周期、凸显产品功能,往往添加一些可以促进疗效的化学药物,达到牟取暴利的目的。可以说减肥类、抗体力疲劳类、增强免疫力类三大类保健食品已经成为非法添加的重灾区^[1,2]。由于非法添加随意性大,剂量不明确,消费者长期、超量服用而引起毒性,为消费者的健康埋下了巨大隐患^[2]。尽管早在2012年3月,国家食品药品监督管理局发布了保健食品中可能非法添加的物质名单(第一批),我国对该类保健食品中非法添加化学药物的监管不断加强,但是国内市场监管部门对相关保健品中非法添加化学药物抽检种类、数量都比较少,且检测时间较长,灵敏度也不够高,无法满足实际监管的需要。

目前检测这些保健食品中非法添加化学药物的方法主要有:薄层色谱法(TIC)^[3,4]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[5]、液相色谱法(HPLC)^[6-8]、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)^[1,9-13]、液相色谱-飞行时间质谱法^[14-17]、毛细管电泳法^[18,19]、免疫层析法^[20]和酶联免疫吸附法(ELISA)^[17,21]。这些方法中,LC-MS/MS法因其具有高灵敏度和高选择性是检测这些非法添加药物的常用方法强有力确证工具。已有的保健食品样品前处理净化技术主要有:液-液萃取、固相萃取、免疫亲和柱净化和多功能净化柱净化。由于前两者需耗费大量试剂,操作步骤繁琐且专属性差,采用QuEChERS净化则具有良好的专属性和富集性,已被广泛应用于个各类食品农药、真菌毒素等残留分

析^[22,23]。本研究针对目前减肥类保健食品中非法添加药物检测数量的不足,采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)建立了检测减肥类保健食品中78种非法添加化学药物的高通量检测方法,并对网络上销售的57批次减肥、抗疲劳和增强免疫力类保健食品进行检测。本方法简便、快速、灵敏度高,可为相关市场监管部门对此类产品的监管提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

1290/6460 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(UPLC-MS/MS),美国Ailent公司;MILLI-Q纯水机,美国Millipore公司;高速冷冻离心机,德国Sigma公司。

1.2 试剂与样品

78种化学药物标准品:盐酸西布曲明(125494-59-9)、N-单去甲基西布曲明(168835-59-4)、氯代西布曲明(84485-08-5)、N,N-双去甲基西布曲明(84484-78-6)、N-单去甲基西布曲明(84467-94-7)、苄基西布曲明(1446140-91-5)、盐酸舍曲林(79559-97-0)、苯巴比妥(50-06-6)、氢溴酸西酞普兰(59729-32-7)、氟西汀(54910-89-3)、盐酸绿卡色林(846589-98-8)、唑尼沙胺(68291-97-4)、咖啡因(58-08-2)、盐酸麻黄碱(50-98-6)、去甲伪麻黄碱(37577-07-4)、盐酸伪麻黄碱(345-78-8)、茶碱(58-55-9)、螺内酯(52-01-7)、氢氯噻嗪(58-93-5)、氯噻嗪(58-94-6)、布美他尼(28395-03-1)、氨苯蝶啶(396-01-0)、托拉塞米(56211-40-6)、呋塞米(54-31-9)、比沙可啶(603-50-9)、酚酞(77-09-8)、大黄素(518-82-1)、番泻苷B(128-57-4)、奥利司他(96829-58-2)、利莫那班(158681-13-1)、苯乙双胍

(834-28-6)、二甲双胍(1115-70-4)、格列吡嗪(29094-61-9)、格列齐特(21187-98-4)、罗格列酮(155141-29-0)、甲苯磺丁脲(64-77-7)、洛伐他汀(75330-75-5)、辛伐他汀(79902-63-9)、烟酸(59-67-6)、盐酸可乐定(4205-91-8)、卡托普利(62571-86-2)、硝苯地平(21829-25-4)、格列苯脲(10238-21-8)、格列美脲(93479-97-1)、瑞格列奈(135062-02-1)、盐酸吡格列酮(112529-15-4)、格列喹酮(33342-05-1)、西地那非(139755-83-2)、那莫西地那非(371959-09-0)、豪莫西地那非(642928-07-2)、红地那非(831217-01-7)、那红地那非(949091-38-7)、他达那非(171596-29-5)、伐地那非(224785-91-5)、伪伐地那非(224788-34-5)、甲睾酮(58-18-4)、氯美扎酮(80-77-3)、罗通定(10097-84-4)、三唑仑(28911-01-5)、安定(439-14-5)、阿普唑仑(28981-97-7)、氯硝西洋(1622-61-3)、硝基安定(146-22-5)、氨甲环酸(1197-18-8)、盐酸文拉法辛(99300-78-4)、醋氯芬酸(89796-99-6)、青藤碱(115-53-7)、沙丁胺醇(18559-94-9)、马来酸氯苯那敏(113-92-8)、盐酸二氧丙嗪(13754-56-8)、氨基他达那非(385769-84-6)、硫代艾地那非(856190-47-1)、羟基红地那非(147676-56-0)、乌地那非(268203-93-6)、番泻苷 A(81-27-6)、巯基西地那非(479073-79-5)、

甲基麻黄碱(552-79-4)、异戊巴比妥(57-43-2)、N-去甲基西地那非(139755-82-1)。

甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,德国 Merck 公司;无水 MgSO₄ (分析纯),广州化学试剂厂;PSA 吸附剂、C18 吸附剂,美国 Agilent 公司;实验室用水符合 GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》中二级水的规定。减肥类保健食品或声称具有减肥功效的保健食品购自网上。

1.3 色谱-质谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1×100 mm, 1.7 μm);柱温:40 °C;进样体积:1 μL;流速:0.3 mL/min;流动相:A 为 10 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸),B 为乙腈,梯度洗脱程序:0~5 min, 95% A 和 5% B; 5~6 min, 80% A 和 20% B; 6~10 min, 25% A 和 75% B, 10~15 min, 5% A 和 95% B。

质谱条件鞘流电喷雾离子源(JetESI);正、负离子扫描;多反应监测(MRM);鞘气温度:350 °C;鞘气流量:11 L/min;喷嘴电压:500 V(ESI⁺)/~1000 V(ESI⁻);雾化气压力:45 psi;毛细管电压:4000 V(ESI⁺)/3500 V(ESI⁻);离子驻留时间(Dwell time):3 ms,其他条件见表 1。

表 1 分析药物的质谱信息

Table 1 Mass parameters of analytes

序号	药物名称	ESI 模式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV	毛细管出口电压/V	保留时间/min
1	二甲双胍	ESI ⁺	130.1 [M+H] ⁺	60.2*/71.2	12, 24	58	0.925
2	烟酸	ESI ⁺	124 [M+H] ⁺	78.2/80.2*	24, 24	68	1.169
3	氨甲环酸	ESI ⁺	158.1 [M+H] ⁺	67.2/95.2*	28, 12	63	1.347
4	沙丁胺醇	ESI ⁺	240.2 [M+H] ⁺	148.1*/222	16, 4	63	4.235
5	去甲伪麻黄碱	ESI ⁺	152.1 [M+H] ⁺	117.1/134.1*	16, 4	50	4.709
6	茶碱	ESI ⁻	179.1 [M-H] ⁻	122/164*	24, 22	164	5.774
7	麻黄碱	ESI ⁺	166.1 [M+H] ⁺	117.1/148.2*	20, 8	68	6.268
8	伪麻黄碱	ESI ⁺	166.1 [M+H] ⁺	117.1/148.2*	20, 8	68	6.706
9	氢氯噻嗪	ESI ⁻	295.9 [M-H] ⁻	204.8/268.8*	24, 16	159	6.848
10	甲基麻黄碱	ESI ⁺	180.1 [M+H] ⁺	46.2*/162.1	16, 12	64	7.030
11	盐酸可乐定	ESI ⁺	230 [M+H] ⁺	42.2*/44.2	50, 28	124	7.045
12	青藤碱	ESI ⁺	330.2 [M+H] ⁺	44.2*/58.2	36, 28	172	7.381
13	咖啡因	ESI ⁺	195.1 [M+H] ⁺	42.2*/138.1	50, 20	81	7.387
14	苯乙双胍	ESI ⁺	206.1 [M+H] ⁺	60.2*/105.1	16, 28	78	7.598
15	番泻苷 B	ESI ⁻	861 [M-H] ⁻	385.9*/699	42, 29	360	7.618
16	氨茶蝶啶	ESI ⁺	254.1 [M+H] ⁺	104.1/237*	44, 28	149	7.710
17	卡托普利	ESI ⁺	218.1 [M+H] ⁺	70.2*/116.1	20, 8	63	7.793
18	番泻苷 A	ESI ⁻	861 [M-H] ⁻	385.9*/699	42, 29	360	7.795
19	唑尼沙胺	ESI ⁻	211 [M-H] ⁻	119*/147	12, 4	68	8.133

转下页

接上页

20	盐酸二氧丙嗪	ESI ⁺	317.1[M+H] ⁺	71.2/86.2*	50,24	91	8.226
21	氯卡色林	ESI ⁺	196.1[M+H] ⁺	128.1/129.1*	48,32	78	8.248
22	罗格列酮	ESI ⁺	358.1[M+H] ⁺	107.1/135.1*	44,28	81	8.369
23	羟基红地那非	ESI ⁺	483.3[M+H] ⁺	127.1*/143.1	32,36	215	8.379
24	文拉法辛	ESI ⁺	278.2[M+H] ⁺	58.2*/206.1	16,8	58	8.424
25	那红地那非	ESI ⁺	453.3[M+H] ⁺	97.2*/113.1	32,32	182	8.432
26	罗通定	ESI ⁺	356.2[M+H] ⁺	165.1/192.1*	24,28	144	8.483
27	马来酸氯苯那敏	ESI ⁺	275.1[M+H] ⁺	167/229.9*	40,12	98	8.505
28	红地那非	ESI ⁺	467.3[M+H] ⁺	111.1*/127.1	32,32	195	8.512
29	托拉塞米	ESI ⁺	349.1[M+H] ⁺	168/264*	50,12	63	8.533
30	苯巴比妥	ESI ⁻	230.9[M-H] ⁻	42*/85	14,5	85	8.547
31	伐地那非	ESI ⁺	489.2[M+H] ⁺	151.1*/312.1	50,40	210	8.560
32	N-去甲基西地那非	ESI ⁺	461.2[M+H] ⁺	85.2*/283.0	36,40	197	8.610
33	乌地那非	ESI ⁺	517[M+H] ⁺	112.1*/283	40,52	210	8.867
34	西地那非	ESI ⁺	475.2[M+H] ⁺	58.2*/100.2	50,32	192	8.690
35	西酞普兰	ESI ⁺	325.2[M+H] ⁺	109.1*/262.1	24,16	129	8.761
36	豪莫西地那非	ESI ⁺	489.2[M+H] ⁺	58.2/72.2*	36,48	197	8.771
37	氯噻嗪	ESI ⁻	293.9[M-H] ⁻	178.9/213.8*	50,32	164	8.803
38	呋塞米	ESI ⁻	329[M-H] ⁻	204.9/284.8*	20,12	81	8.803
39	氯美扎酮	ESI ⁺	274.0[M+H] ⁺	153.8*/209	13,12	70	8.863
40	氨基他达那非	ESI ⁺	391.1[M+H] ⁺	204/269*	68,12	115	8.989
41	异戊巴比妥	ESI ⁻	225.1[M-H] ⁻	42*/182	16,8	119	9.080
42	酚酞	ESI ⁺	319.1[M+H] ⁺	141.1/225*	18,20	68	9.087
43	氟西汀	ESI ⁺	310.1[M+H] ⁺	44.2*/148.1	8,4	53	9.185
44	硝基安定	ESI ⁺	282.1[M+H] ⁺	180/236*	44,24	81	9.187
45	阿普唑仑	ESI ⁺	309.1[M+H] ⁺	205*/281.0	48,28	164	9.234
46	N,N-双去甲基西布曲明	ESI ⁺	252.1[M+H] ⁺	125*/139	24,4	60	9.237
47	他达那非	ESI ⁺	389.9[M+H] ⁺	135/268*	26,9	100	9.245
48	氯硝西洋	ESI ⁺	316.1[M+H] ⁺	214/270*	44,24	91	9.249
49	舍曲林	ESI ⁺	306.1[M+H] ⁺	158.9*/274.9	28,8	58	9.267
50	三唑仑	ESI ⁺	343.1[M+H] ⁺	238.9/308*	48,28	167	9.280
51	吡格列酮	ESI ⁺	357[M+H] ⁺	119.1/134.1*	50,32	79	9.295
52	N-单去甲基西布曲明	ESI ⁺	266.2[M+H] ⁺	125*/139	28,12	95	9.321
53	格列吡嗪	ESI ⁺	446.2[M+H] ⁺	103.1/321*	48,8	53	9.326
54	西布曲明	ESI ⁺	280.2[M+H] ⁺	125*/139	24,12	58	9.447
55	甲苯磺丁脲	ESI ⁺	271.1[M+H] ⁺	74.2/91.2*	8,36	58	9.448
56	布美他尼	ESI ⁺	365.1[M+H] ⁺	184/240*	20,16	58	9.489
57	苄基西布曲明	ESI ⁺	314.2[M+H] ⁺	91.2*/125	40,20	63	9.542
58	硫代艾地那非	ESI ⁺	505[M+H] ⁺	99*/113.1	40,32	190	9.579
59	硝苯地平	ESI ⁺	347.1[M+H] ⁺	254/315*	16,4	58	9.653
60	巯基西地那非	ESI ⁺	491.2[M+H] ⁺	58.2*/100.1	50, 32	187	9.664
61	醋氯芬酸	ESI ⁺	354[M+H] ⁺	214*/215	40,20	73	9.685
62	氯代西布曲明	ESI ⁺	314.2[M+H] ⁺	46.2/158.9*	12,32	58	9.769

转下页

接上页

63	格列齐特	ESI ⁺	324.1[M+H] ⁺	110.1*/127.1	20,16	139	9.817
64	安定	ESI ⁺	285.1[M+H] ⁺	154/193*	28,36	68	9.917
65	甲萘酮	ESI ⁺	303.2[M+H] ⁺	97.2/109.1*	28,28	68	9.933
66	比沙可啶	ESI ⁺	262.1[M+H] ⁺	184*/226	28,16	139	9.944
67	螺内酯	ESI ⁺	341	105.1/107.1*	50,36	93	9.946
68	格列苯脲	ESI ⁺	494.2[M+H] ⁺	169/368.9*	40,8	53	10.070
69	伪伐地那非	ESI ⁺	460.2[M+H] ⁺	151*/312.1	50,40	195	10.105
70	格列美脲	ESI ⁺	491.2[M+H] ⁺	126.1*/352.1	28,8	58	10.200
71	大黄素	ESI ⁻	269[M-H] ⁻	224.9*/240.9	24,28	159	10.264
72	格列喹酮	ESI ⁺	528.2[M+H] ⁺	386/403*	20,8	63	10.621
73	那莫西地那非	ESI ⁺	460.2[M+H] ⁺	283*/299	40,40	200	10.640
74	洛伐他汀	ESI ⁺	405.3[M+H] ⁺	199.1*/225.1	8,16	58	11.210
75	瑞格列奈	ESI ⁺	453.3[M+H] ⁺	86.2/230.1*	28,28	63	11.356
76	辛伐他汀	ESI ⁺	419.3[M+H] ⁺	199*/325	8	65	11.649
77	利莫那班	ESI ⁺	463.1[M+H] ⁺	84.2/362.9*	28,28	164	11.842
78	奥利司他	ESI ⁺	496.4[M+H] ⁺	114.1/319.3*	24,8	159	13.853

注: *为定量离子。

1.4 样品处理方法

准确称取 1 g 粉碎的试样 (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇 (液体样品加入 19 mL), 涡旋 3 min, 超声提取 30 min, 于 4 °C 下 10000 r/min 离心 5 min, 转移 3 mL 上清液到 QuEChERS 净化管 (内含 150 mg PSA、900 mg MgSO₄) 中, 涡旋 1 min, 在 10000 r/min 下离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 过滤后上 UPLC-MS/MS 分析。

1.5 标准储备液及工作液的配置

用甲醇分别将各 78 种标准品配置成单标储备液, 置于 -20 °C 冰箱中保存。取适量的各单标储备液, 用甲醇配成混标中间工作液。配制标准工作曲线时, 根据要求将混标中间工作液用流动相稀释成不同浓度, 现配现用。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

以 0.3 mL/min 的流速向质谱仪中注入化学药物标准溶液, 确定其最佳质谱条件。分别在正、负离子模式下进行一级全扫描, 确定目标化合物的母离子质量数。茶碱、双氢氯噻吩、番泻苷 B、番泻苷 A、唑尼沙胺、苯巴比妥、氯噻嗪、呋塞米、异戊巴比妥、大黄素 10 个药物, 易失去氢离子, 在负电离模式下可以得到较好的响应, 其余 68 个药物均在正离子模式下具

有更高的响应值。因此, 依据洗脱顺序设定正离子和负离子模式之间的转换即可实现这 78 种化学药物的同时检测。经过优化后, 以正离子模式检测的药物, 几乎均以 [M+H]⁺ 或 [M+Na]⁺ 形成母离子, 而螺内酯则在正离子模式易脱去乙酰基硫基, 生成 m/z 为 341 的带正电荷的稳定离子峰^[24]; 以负离子模式检测的药物均以 [M-H]⁻ 方式形成母离子 (见表 1)。针对每个母离子选取两个子离子用以对化合物进行定性和定量分析。目标化合物的定性和定量离子对的质谱检测参数见表 1。

2.2 液相色谱条件的优化

在液相色谱-质谱方法中通常采用水-甲醇或水-乙腈作为流动相来分析目标待测物, 有时也在流动相中添加低浓度的甲酸、乙酸或乙酸铵, 使靶标物质离子化强度增大, 从而增强色谱峰强度, 以获得良好的分离和出峰效果。本研究分别考察了 10 mmol/L 乙酸铵-乙腈、10 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1%甲酸)-乙腈、10 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1%甲酸)-甲醇、水 (0.1%甲酸)-乙腈和作为流动相的分离效果。试验结果表明, 在相同梯度条件下, 10 mmol/L 乙酸铵-乙腈作为流动相时, 番泻苷 A 与番泻苷 B 不能很好的分离, 随后发现番泻苷 A 和 B 的色谱分离与流动相的 pH 有很大的关系, 在流动相加入甲酸有效改善分离; 10 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1%甲酸)-甲醇作为流动相时, 麻黄碱与伪麻黄碱并不能有效分开。与水 (0.1%甲酸)-乙腈流动相比, 与 10 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1%甲酸)-乙腈流

动相中随着盐的加入，色谱柱的保留性能有所增强，可以改善部分物质峰型，增强部分负离子物质的响应强度，78种化学药物能得到很好地分离。因此最终采用10 mmol/L 乙酸铵（内含0.1%甲酸）-乙腈作为流动相。该流动相条件下78种化学药物的分离效果见图1所示。

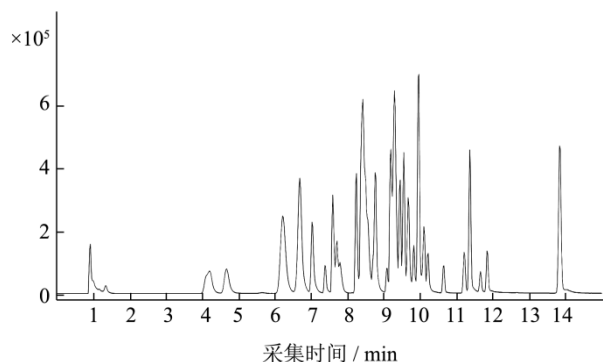


图1 优化条件下78种化学药物总离子流图

Fig.1 TIC chromatogram of the 78chemical drugs

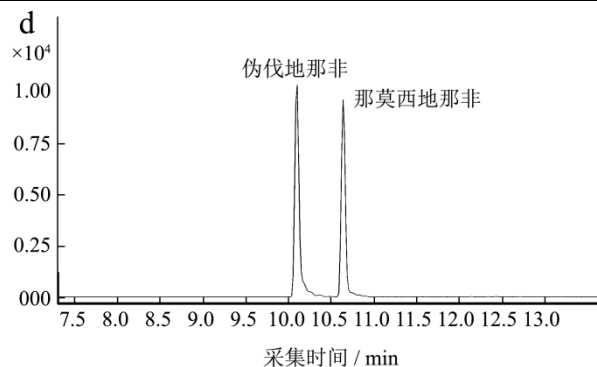
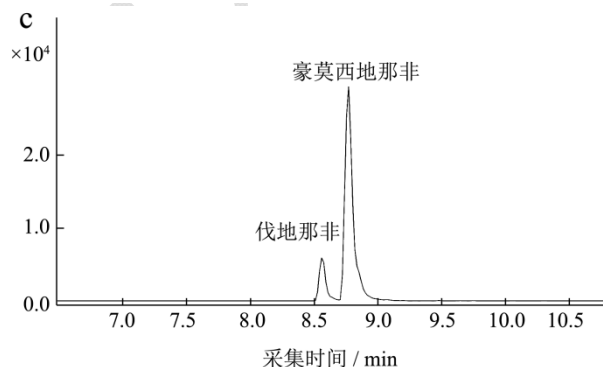
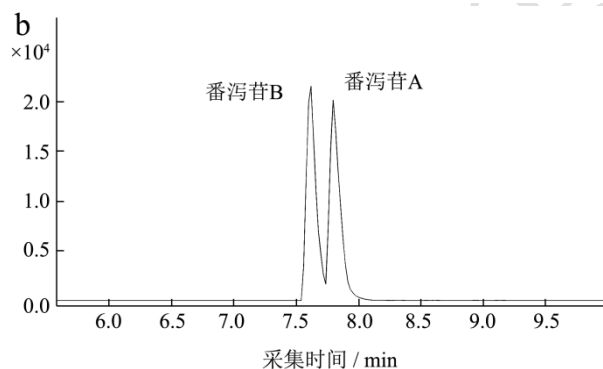
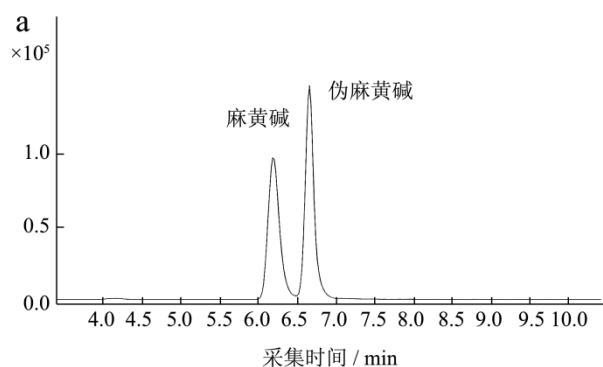


图2 优化条件下同分异构体色谱图

Fig.2 TIC chromatogram of isomers

同分异构体是具有相同分子量但不同结构式的物质。对于质谱检测器，无论是低分辨质谱还是高分辨质谱，所监测的母离子完全一致，二级碎片离子也具有一定程度的重合性^[23]。在本文最优的色谱条件和质谱条件下，麻黄碱和伪麻黄碱、番泻苷A和番泻苷B、伐地那非和豪莫西地那非、伪伐地那非和那莫西地那非4对同分异构体均得到有效分离和辨别（图2）。

2.3 样品提取条件的优化

78种化学药物易溶于极性有机溶剂。本试验对比了分别以甲醇和乙腈作为溶剂的提取效果，结果发现甲醇的提取率最高，因此选择甲醇作为提取溶剂。实验中采用基质固相分散（QuEChERS）净化的方法对样品进行了净化。QuEChERS作为一种新的提取净化技术，具有省时省力，操作方便的优点，可以将样品的分散、萃取及净化一次完成。本实验对不同成分组成的净化管的净化效果（净化管A：含150 mg PSA、900 mg MgSO₄；净化管B：含400 mg PSA、1200 mg MgSO₄；净化管C：含150 mg PSA、150 mg C18、900 mg MgSO₄）进行了比较。结果发现，经过净化管A净化后，多数药物的回收率较高，化学药物的回收率在在60.5%~119.2%之间。

2.4 基质效应考察结果

对于基质复制的胶囊样品，直接用甲醇提取、QuEChERS净化后上机测定，由于基质效应而导致回收率偏低。本研究将不含目标待测物的样品按上述前处理方法处理后得到基质空白溶液，分别向基质空白和甲醇中添加一定浓度的待测物混合标准溶液，进行UPLC-MS/MS分析。通过计算各药物在基质溶液与标准溶液中峰面积的差异，用来评价胶囊样品的基质效应。若两者的峰面积之比在80%~120%之间，表明基质效应不明显；在50%~80%或120%~150%，表明存

在轻微基质效应；低于50%或高于150%则表明基质效应及其显著^[25]。本试验选取了预先测定不含上述78种化学药物的胶囊进行基质效应考察。以这些阴性样品作为基质空白，利用相同的前处理方法向其加入配制好的混合标准溶液，测定各药物的峰面积（A）。接着以甲醇为溶剂配制相应浓度的混合标准溶液，测定其峰面积（B）。按照Huang等^[25]报道的方法计算基质效

应，基质效应ME(%)=B/A×100。经定量测定表明，大部分药物的基质效应为80.3%~119.2%，基质效应不明显；但有12个药物的基质效应明显，其中5个低于50%、7个高于150%。因此，本方法采用基质溶液匹配曲线消除基质效应的影响，以提高定量分析的准确度。

2.5 标准曲线与定量限

表2 78种化学药物的线性范围和检出限

Table 2 Linear equations and limits of detection (LOD) of the 78 chemical drugs

序号	药物名称	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	序号	药物名称	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)
1	二甲双胍	2~200	9	40	氨基他达那非	2~1000	306
2	烟酸	10~200	12.5	41	异戊巴比妥	50~10000	420
3	氯甲环酸	5~200	40	42	酚酞	2~200	25
4	沙丁胺醇	2~500	8.8	43	氟西汀	0.5~1000	17.8
5	去甲伪麻黄碱	1~200	5	44	硝基安定	2~200	19
6	茶碱	10~1000	100	45	阿普唑仑	0.5~1000	23.6
7	麻黄碱	2~1000	7	46	N,N-双去甲基西布曲明	0.5~200	19.4
8	伪麻黄碱	2~1000	2.6	47	他达那非	50~5000	52.8
9	氯氯噻嗪	10~1000	100	48	氯硝西洋	1~500	16.7
10	甲基麻黄碱	0.5~500	4.6	49	舍曲林	0.5~500	27
11	可乐定	0.5~1000	5.2	50	三唑仑	5~500	19.2
12	青藤碱	1~1000	35.7	51	吡格列酮	0.5~1000	150
13	咖啡因	10~1000	138	52	N-单去甲基西布曲明	0.5~1000	6.8
14	苯乙双胍	0.5~500	5	53	格列吡嗪	2.5~1000	144.6
15	番泻苷B	100~20000	216	54	西布曲明	0.5~1000	11.6
16	氯苯蝶啶	0.5~500	23.6	55	甲苯磺丁脲	10~1000	50.8
17	卡托普利	10~1000	50	56	布美他尼	20~1000	165
18	番泻苷A	100~20000	102	57	苄基西布曲明	0.5~1000	4.8
19	唑尼沙胺	100~10000	172	58	硫代艾地那非	0.5~500	0.5
20	盐酸二氧丙嗪	0.5~1000	22.2	59	硝苯地平	0.5~1000	15
21	氯卡色林	0.5~500	19.6	60	巯基西地那非	1~1000	32.2
22	罗格列酮	0.5~1000	4	61	醋氯芬酸	10~1000	71
23	羟基红地那非	0.5~500	29.6	62	氯代西布曲明	5~1000	9.2
24	文拉法辛	0.5~1000	4	63	格列齐特	1~1000	12.6
25	那红地那非	0.5~1000	18.8	64	安定	0.5~500	2.9
26	罗通定	0.5~500	10	65	甲睾酮	2~200	11.4
27	马来酸氯苯那敏	0.5~500	14	66	比沙可啶	0.5~1000	8
28	红地那非	0.5~500	12.5	67	螺内酯	50~1000	168
29	托拉塞米	1~1000	26	68	格列苯脲	0.5~1000	18.9
30	苯巴比妥	100~5000	164	69	伪伐地那非	0.5~1000	15
31	伐地那非	2~500	24	70	格列美脲	0.5~1000	29
32	N-去甲基西地那非	2~500	42	71	大黄素	0.5~200	8.4
33	乌地那非	2~500	25.2	72	格列喹酮	5~1000	35

转下页

接上页

34	西地那非	2~500	22	73	那莫西地那非	0.5~200	15
35	西酞普兰	2~500	19	74	洛伐他汀	2.5~5000	8.4
36	豪莫西地那非	1~500	26.8	75	瑞格列奈	0.5~200	2.7
37	氯塞嗪	5~200	20	76	辛伐他汀	2.5~5000	2.1
38	呋塞米	10~500	194	77	利莫那班	0.5~200	2
39	氯美扎酮	200~10000	203	78	奥利司他	5~500	1.9

取混合对照品溶液,配置不同质量浓度的混合标准溶液,按 1.3 方法进样测定,以质量浓度(x)为横坐标,各目标物定量离子对峰面积(y)为纵坐标,绘制标准工作曲线,考察标准溶液曲线的线性范围和相关系数(r)。结果显示,各种化学药物均呈良好的线性关系, $r \geq 0.9991$ (表 2)。取阴性样品,加入不同浓度的混标溶液,按照“1.4 样品处理方法”中给定的方法进行前处理,上机测定,以信噪比为 3 (S/N=3) 计算 78 种药物的方法检出限 (LOD), 结果见表 2 (表中的定量限由阴性胶囊空白样品计算而来)。不同基质样品的 LOD 在 0.5~420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。

2.6 精密度和方法回收率

精密吸取混合标准溶液 1 μL , 按 1.3 色谱、质谱条件重复测定 6 次, 78 种目标化合物的相对标准偏差 (RSD, n=6) 为 0.51%~8.2%。以不含目标分析物的胶囊、片剂、口服液和保健酒作为空白样品, 分别添加低 (加标 1)、中 (加标 2) 和高 (加标 3) 三个水平的 78 种化学药物进行加标试验, 计算方法的加标回收率, 每个添加浓度做 3 个平行。其中, 加标 1、加标 2 和加标 3 分别为各药物定量限的 1 倍、10 倍和 100 倍。测得 78 种化学药物的加标回收率为 59.9%~120.7%, RSD (n=3) 为 1.3%~16.2%。说明本方法能够满足不同剂型样品的分析要求, 可用于日常分析的检测。

2.7 样品测定

本试验对从网络销售平台上购买的不同品牌的声称据具有减肥、抗疲劳和增强免疫力功效的 57 批次保健品 (胶囊 28 批、片剂 10 批、冲剂 12 批次、口服液 2 批、保健酒 5 批) 进行了检测分析。检测结果发现, 有 41 批保健食品中检出非法添加化学药物, 检出减肥类非法添加化学药物 13 种 (西布曲明、苄基西布曲明、氯代西布曲明、酚酞、伪麻黄碱、麻黄碱、二甲双胍、咖啡因、茶碱、番泻苷 A、番泻苷 B、呋塞米、大黄素), 抗疲劳和增强免疫力类非法添加化学药物 1 种 (西地那非)。其中, 3 个样 (胶囊) 检出西布曲明, 含量为 2.29~2.69 g/kg ; 3 个样 (胶囊) 检出苄基西布

曲明, 含量为 0.75~1.27 mg/kg ; 3 个样 (胶囊) 检出氯代西布曲明, 含量为 0.14~0.22 mg/kg ; 1 个样 (胶囊) 检出酚酞, 含量为 766.5 mg/kg ; 1 个样 (胶囊) 检出伪麻黄碱, 含量为 5.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1 个样 (胶囊) 检出麻黄碱, 含量为 11.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 18 个样 (胶囊、片剂、冲剂、口服液、保健酒) 检出二甲双胍, 含量为 11.7~176.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 20 个样 (胶囊、片剂、冲剂、口服液) 检出咖啡因, 含量为 0.001~7.43 g/kg ; 11 个样 (胶囊、片剂、冲剂) 检出茶碱, 含量为 0.31~11.8 mg/kg ; 6 个样 (胶囊、冲剂) 同时检出番泻苷 A 和番泻苷 B, 含量为 15.7~365.1 mg/kg ; 1 个样 (保健酒) 检出呋塞米, 含量为 400.0 mg/kg ; 10 个样 (胶囊、片剂、冲剂) 检出大黄素, 含量为 2.40~169.0 mg/kg ; 1 个样 (保健酒) 检出西地那非, 含量为 1.72 mg/kg 。

3 结论

针对目前市场上保健食品中非法添加药物存在筛查不全面、难以得到有效监管的问题, 本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法高通量检测减肥、抗疲劳和增强免疫力类保健品中 78 种非法添加化学药物的方法。样品经甲醇溶剂提取、QuEChERS 净化、过滤后直接进样测定。与传统的提取净化技术相比, 该技术具有试剂使用量少、操作步骤少及处理时间短等诸多优点。根据各目标物质的保留时间、母离子和子离子的精确质量数可实现对 78 种化学药物的高通量定性和定量分析, 可在 14 min 内完成整个仪器上机检测分析过程。在优化色谱、质谱条件下, 78 种化学药物能够得到较好分离, 在线性范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.9991, 检出限 (LOQ) 为 0.5~420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法具有前处理过程简单、分析时间短、测定结果准确可靠、通量高等特点, 适用于保健食品中非法添加化学药物的定性与定量检测。从检测结果来看, 减肥类保健品、抗疲劳和增强免疫力类保健食品的非法添现象非常普遍, 政府部门应加大对该类产品的监管力度。

参考文献

- [1] 黄芳, 吴惠勤, 黄晓兰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测

- 定保健品及中成药中非法添加的17种壮阳类化学药[J]. 色谱, 2016, 34(3): 270-278
- HUANG Fang, WU Hui-qin, HUANG Xiao-lan, et al. Simultaneous determination of 17 aphrodisiac chemical drugs illegally added in health products and Chinese patent medicines by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal Chromatography, 2016, 34(3): 270-278
- [2] 李建辉, 张朝晖, 王琳, 等. 减肥保健食品中非法添加物检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 1585-1595
- LI Jian-hui, ZHANG Zhao-hui, WANG Lin, et al. Research progress of analysis of illegal additives in weight-reducing dietary supplements [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(5): 1585-1595
- [3] 许凤, 李莉, 张宏莲, 等. 薄层色谱扫描法对减肥保健食品中酚酞的定性定量分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1634-1640
- XU Feng, LI Li, ZHANG Hong-lian, et al. Identification and determination of phenolphthalein added into the anti-obesity product and healthcare food by TLCS [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(9): 1634-1640
- [4] Ariburnu E, Uludag MF, Yalcinkaya H, et al. Comparative determination of sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 64-65(4): 77-81
- [5] 朱志鑫, 吴惠勤, 黄晓兰, 等. 气相色谱-质谱法检测减肥食品中芬氟拉明和西布曲明[J]. 现代食品科技, 2012, 28(10): 1419-1422
- ZHU Zhi-xin, WU Hui-qin, HUANG Xiao-lan et al. Quantification of sibutramine and fenfluramine in slimming foods by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(10): 1419-1422
- [6] 刘春霖, 刁飞燕, 谢强胜, 等. 高效液相色谱法测定减肥类保健食品中番泻苷A、番泻苷B的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(9): 3347-3352
- LIU Chun-lin, DIAO Fei-yan, XIE Qiang-sheng, et al. Determination of sennoside A and sennoside B in slimming health foods by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(9): 3347-3352
- [7] Deconinck E, Verlinde K, Courselle P, et al. A validated ultra high pressure liquid chromatographic method for the characterisation of confiscated illegal slimming products containing anorexics [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 59(1): 38-43
- [8] 雷毅, 黄艳婷, 罗卓雅. 高效液相色谱法测定壮阳保健品中4种硫代西地那非类药物[J]. 理化检验(化学分册), 2014, 50(5): 530-535
- LEI Yi, HUANG Yan-ting, LUO Zhuo-ya. HPLC determination of 4 thiosildenafil in sexual promoting health-care nitritives [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2014, 50(5): 530-535
- [9] Huang ZQ, Xiao S, Huang DL, et al. Simultaneous determination of sibutramine and N-di-desmethyl sibutramine in dietary supplements for weight control by HPLC-ESI-MS [J]. J Chromatogr Sci, 2008, 46(8): 707-711
- [10] WILSON P, MASSE C. Detection of synthetic drugs as adulterants in natural and herbal slimming products by LC-ESI-MS/MS with polarity switching [J]. Journal of AOAC International. 2016, (99): 929-940
- [11] 马微, 程丽, 张兰威, 等. 基质分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定减肥保健食品中20种违禁添加药物[J]. 分析化学, 2014, 42(8): 1161-1170
- MA Wei, CHENG Li, ZHANG Lan-wei, et al. Simultaneous determination of 20 anti-obesity drugs illegally added in weight-loss functional foods by matrix solid phase dispersion-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(8): 1161-1170
- [12] 李卓, 张亚锋, 孙晓, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定抗疲劳类保健食品及补肾壮阳类中成药中15种添加药物[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(6): 1127-1133
- LI Zhuo, ZHANG Ya-feng, SUN Xiao, et al. Determination of 15 additives in invigorant Chinese patent medicines and antifatigue dietary supplements by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(6): 1127-1133
- [13] 李晓蕾, 陈军, 杨朝芬, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测辅助降血脂保健食品中6种非法添加化学药物[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 320-325
- LI Xiao-lei, CHEN Jun, YANG Chao-fen, et al. Determination of six antilipemic chemicals illegally added in antilipemic functional foods by UPLC-MS/MS [J]. Food Science, 2018, 39(18): 320-325
- [14] 芦丽, 宫旭, 冯有龙. UPLC-IT/TOF MS快速筛查确证保健食品中36种非法添加的减肥、降血脂、通便类药物[J]. 中草药, 2019, 17(10): 1667-1676
- LU Li, GONG Xu, FENG You-long. Fast screening and identification of 36 illegally added weight-loss, lipid lowering, cathartic drugs in health products by UPLC-IT/TOF MS [J]. Central South Pharmacy, 2019, 17(10): 1667-1676
- [15] 丁博, 王志元, 谢建军, 等. QuEChERS前处理技术联合液相色谱-四极杆飞行时间质谱法检测保健食品中24种违禁降血

- 糖、降血压和降血脂药物[J]. 色谱, 2016, 34(6): 583-590
- DING Bo, WANG Zhi-yuan, XIE Jian-jun, et al. Determination of 24 antihyperglycemic, antihypertensive and antihyperlipidemic drugs illegally added in health food samples by liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(6): 583-590
- [16] 于泓, 胡青, 张甦, 等. 补肾壮阳类中药及保健食品中31种5型磷酸二酯酶抑制剂的高分辨四级杆飞行时间质谱定性定量检测方法[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(15): 1312-1318
- YU Hong, HU Qing, ZHANG Su, et al. Qualitative and quantitative analysis of 31 PDE-5 inhibitors in herbal products and dietary supplements by UPLC /Q-TOF-MS [J]. Chin Pharm J, 2013, 48(15): 1312-1318
- [17] 欧爱芬, 张挺, 彭述辉. 胶体金免疫层析试纸条法和HPLC-QTOF-MS法检测保健品中那非类化学药物的比较[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2017, 30(3): 32-36
- OU Ai-fen, ZHANG Ting, PENG Shu-hui. Comparison between colloidal gold immunochromatographic strips and HPLC-QTOF-MS for determination of tadalafil in health care products [J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2017, 30(3): 32-36
- [18] Cianchino V, Acosta G, Ortega C, et al. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis [J]. Food Chem, 2008, 108(3): 1075-1081
- [19] 李阳, 薛丰, 王媛, 等. 高效毛细管电泳法同时测定减肥类功能食品中7种违禁成分[J]. 分析化学, 2011, 39(11): 1716-1720
- LI Yang, XUE Feng, WANG Yuan, et al. Simultaneous determination of seven adulterants in slimming functional foods by high performance capillary electrophoresis [J]. Chin J Anal Chem, 2011, 39(11): 1716-1720
- [20] Suryoprabowo S, LIU Liqiang, KUANG Hua, et al. Gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of sibutramine and sildenafil in slimming tea and coffee [J]. Science China Materials, 2020, 63(4): 654-659
- [21] 李瑞婷, 陆建超, 王弘, 等. 直接竞争酶联免疫吸附法用于糖浆类保健食品中西地那非检测的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 24: 84-88
- LI Rui-ting, LU Jian-chao, WANG Hong, et al. Development of direct competitive enzyme-linked immunoassay for sildenafil analysis in health foods [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 24: 84-88
- [22] 赵英莲, 张梓琪, 赵鑫, 等. QuEChERS技术在食品真菌毒素检测中的研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(1): 1-5
- ZHAO Ying-lian, ZHANG Zi-qi, ZHAO Xin, et al. Research progress on QuEChERS technology in the detection of mycotoxins in food [J]. China Brewing, 2020, 39(1): 1-5
- [23] 朱峰, 于洁, 霍宗利, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱法检测青菜中214种农药残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 3(1): 25-31
- ZHU Feng, YU Jie, HUO Zong-li, et al. Determination of 214 pesticide residues in green vegetables using QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 3(1): 25-31
- [24] 许立, 吴鸳鸯, 寿林均, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定减肥类保健食品中27种违法添加化学药品[J]. 食品工业科技, 2017, 38(13): 248-256
- XU Li, WU Yuan-yang, SHOU Lin-jun, et al. Simultaneous determination of 27 chemical drugs illegally added in slimming health food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(13): 248-256
- [25] Huang YJ, Cheng MM, Li WH, et al. Simultaneous extraction of four classes of antibiotics in soil, manure and sewage sludge and analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the isotope-labelled internal standard method [J]. Analytical Methods, 2013, 5: 3721-3731
-
- (上接第 132 页)
- [33] 李苑, 王丽平, 余海霞, 等. 电场对三疣梭子蟹微冻贮藏过程中品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(5): 192-197.
- LI Yuan, WANG Li-ping, YU Hai-xia, et al. Effect of electric field on the quality of *Portunus trituberculatus* during superchilling [J]. Food Research and Development, 2018, 39(5): 192-197
- [34] Ko W C, Yang S Y, Chang C K, et al. Effects of adjustable parallel high voltage electrostatic field on the freshness of tilapia (*Oreochromis niloticus*) during refrigeration [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 66: 151-157