

UPLC-MS/MS 测定减肥食品中 8 种非法添加化学成分

裘一婧¹, 曹王丽², 方玲^{2,3*} (1.杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.浙江康恩贝制药股份有限公司, 杭州 310052; 3.浙江中药制药技术重点实验室, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立一种简便有效检测减肥食品中非法添加化学成分的 UPLC-MS/MS 检测方法。方法 采用 UPLC-MS/MS 法, 以 Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) 色谱柱分离, 串联四级杆质谱仪检测, 多反应监测模式进行定性定量分析, 以流动相 A(0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液)-B(甲醇)进行梯度洗脱; 柱温: 40 °C; 流速: 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL。样品以甲醇为溶剂超声提取, 快速定性定量检测非法添加在减肥食品中的麻黄碱、咖啡因、呋塞米、芬氟拉明、酚酞、N-单去甲基西布曲明、N,N-双去甲基西布曲明、西布曲明 8 种化学成分。结果 8 种减肥类化学成分质谱检测的线性范围宽, 相关性 $R^2 \geq 0.995$; 方法检测限为 0.042~0.175 μg·mL⁻¹, 定量限为 0.126~0.525 μg·mL⁻¹, 方法精密度 RSD($n=6$) 为 1.7%~4.7%; 3 个浓度水平的平均回收率为 90.3%~105.1%。结论 本方法专属性强、操作简单、方便快捷, 可作为食品中非法添加减肥类化学成分的有效检测方法。

关键词: UPLC-MS/MS; 减肥食品; 化学成分; 非法添加

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)10-1441-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.10.017

引用本文: 裘一婧, 曹王丽, 方玲. UPLC-MS/MS 法测定减肥食品中 8 种非法添加化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1441-1446.

Determination of 8 Illegal Added Chemical Composition in the Slimming Health Food by UPLC-MS/MS

QIU Yijing¹, CAO Wangli², FANG Ling^{2,3*} (1.Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China; 3.Zhejiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a UPLC-MS/MS method to determine illegal chemical composition added into the slimming health food. **METHODS** The analysis was performed by a UPLC-MS/MS system with Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) column, with 0.02 mol·L⁻¹ acetic acid (A)-methanol (B) as mobile phase by gradient elution at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, and the column temperature was 40 °C. Multiple-reaction monitoring (MRM) was performed to identify and quantify 8 chemical drugs, including ephedrine hydrochloride, caffeine, furosemide, fenfluramine, phenolphthalein, N-single demethylated sibutramine, N,N-didesmethylsibutramine and sibutramine. **RESULTS** A good resolution of 8 kinds of chemical drugs were obtained under this UPLC-MS/MS condition. Eight linear calibration curves were obtained with $R^2 \geq 0.996$. The limits of qualification and quantitation were in the range of 0.042–0.175 μg·mL⁻¹ and 0.126–0.525 μg·mL⁻¹. The precision of the method were showed by RSD ($n=6$) ranged from 1.7% to 4.7%. The average recoveries ($n=6$) were in the range of 90.3% to 105.1% at three concentrations levels. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, and highly sensitive, which can be used for the determination of illegally added chemical drugs in slimming health foods.

KEY WORDS: UPLC-MS/MS; slimming health food; chemical composition; illegally added

目前, 以瘦为美的审美观成为社会的主流, 而肥胖带来的健康问题也日益凸显, 故人们对减肥产品的需求也越来越大。一些企业为增强减肥效果, 在保健食品和中成药中非法添加化学药物, 对消费者的身体和经济均造成严重危害^[1]。有关部门积极应对, 制定相关的实验方法, 例如国家食品药品监督管理局颁布的药品检验补充检验方法和检验项目批准件 2012005、食药监办许[2010]114

等对中成药和保健食品进行监管, 而消费者日常食用的减肥食品中是否存在非法添加化学药物未见报道。麻黄碱、咖啡因、呋塞米、芬氟拉明、酚酞、N-单去甲基西布曲明、N,N-双去甲基西布曲明、西布曲明, 上述 8 种化学成分为非法添加的重灾区, 长期食用会造成成瘾性、肝肾功能损坏等严重不良反应^[2-5]。

目前用于减肥类保健食品非法添加的筛查方

作者简介: 裘一婧, 女, 主管药师 Tel: (0571)85463892
(0571)87774842 E-mail: fangl@conbagroup.com

E-mail: honeyqyj@163.com

*通信作者: 方玲, 女, 教授 Tel:

法主要有 HPLC、HPLC-MS、GC-MS、薄层色谱法等^[6-9]。国家食品药品监督管理局食药监办许[2010]114 号文附件 2“减肥类保健食品违法添加药物的检测方法”，适用于减肥类中成药及保健食品中非法添加 5 种化学药品的筛查和验证，但该方法操作时间长^[10-12]。

本研究针对减肥食品中非法添加减肥类化学成分检测方法的缺失和标准落后的情况，初步建立快速检验和定性定量分析方法，采用 UPLC-MS/MS 检测食品中添加麻黄碱、咖啡因、呋塞米、芬氟拉明、酚酞、*N*-单去甲基西布曲明、*N,N*-双去甲基西布曲明、西布曲明 8 种化学成分，为打击非法添加、药品监管及规范保健食品市场提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器

超高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪 G6410BA、电喷雾离子化源(ESI)、Mass Hunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.01.03、Mass Hunter Workstation Software Quantitative Analysis Version B.01.04 数据处理系统(美国 Agilent 公司); MILLI-Q 纯水-超纯水系统(美国 Millipore 仪器公司); 8510 J-DTH 超声清洗仪(YAMATO)

1.2 样品与试剂

本实验测定 12 批次减肥类食品，均为杭州市食品药品监督管理局抽样所得，具体信息见表 1。

表 1 减肥类食品抽样情况

Tab. 1 Sampling of diet foods

序号	样品名称	批号
1	纤体梅	87261081
2	纤姿梅	1261001388
3	肠清梅	3617208
4	金广元修身梅	103
5	妙女郎酵素梅	20130813
6	酵素青梅	220003
7	台湾西梅排毒减肥果	RT1013
8	果然神奇瘦身咖啡	20150408
9	酵素枣	20150403
10	纤梅	-
11	纤果酵素饮	061210
12	减肥饼干	240453

麻黄碱(批号: 171241-201007, 纯度: 99.7%)、咖啡因(批号: 171215-2010, 纯度: 99.9%)、呋塞米(批号: 100544-2001102, 纯度: 99.7%)、芬氟

拉明(批号: 0073-0002, 纯度: 100%)、酚酞(批号: 100091-199601, 纯度: 100%)、单去甲基西布曲明(批号: 520002-201301, 纯度: 98.8%)、双去甲基西布曲明(批号: 520001-201301, 纯度: 98.9%)、西布曲明(批号: 100624-200401, 纯度: 100%)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 实验用水为超纯水, 其他试剂均为色谱纯。

2 方法

2.1 UPLC 色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(A)-甲醇(B), 梯度如下: 0 min, 70%A, 0~4 min, 70%A→10%A, 4~11 min, 10%A; 柱温: 40 °C; 流速: 0.3 mL·min⁻¹, 进样量为 2 μL。

2.2 质谱条件

毛细管电压: 3.0 kV; 脱溶剂气(N₂)流量为 12 L·min⁻¹; 喷雾气流量为 40 psi; 脱溶剂气温度为 325 °C; 采用多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM)模式检测; 离子模式为 ESI⁺/ESI⁻。8 种减肥类化学成分的其他质谱分析参数见表 2。8 种减肥类化学成分 MRM 色谱图见图 1。

表 2 8 种减肥类化学成分的质谱分析参数

Tab. 2 The MS parameters for 8 slimming drugs

组分	离子模式	监测离子对	锥孔电压/v	碰撞能量/v
麻黄碱	ESI ⁺	166>148*	25	25
		166>132		20
咖啡因	ESI ⁺	195>138*	25	15
		329>285		12
呋塞米	ESI ⁻	329>205*	25	12
		232>186.9*		10
芬氟拉明	ESI ⁺	232>159.1	25	15
		319>225*		30
酚酞	ESI ⁺	319>297	25	25
		266>153*		10
<i>N</i> -单去甲基西布曲明	ESI ⁺	266>125	25	15
		252>139		10
<i>N,N</i> -双去甲基西布曲明	ESI ⁺	252>125*	25	10
		280>179		10
西布曲明	ESI ⁺	280>139*	25	15

注: *为定量离子对。

Note: * was the ion pair for quantitation.

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 分别精密称取麻黄碱、咖啡因、呋塞米、西布曲明对照品 20 mg, 芬氟拉明、酚酞、*N*-单去甲基西布曲明、*N,N*-双去甲基西布曲明对照品 10 mg, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇超声溶解, 稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸

取上述溶液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇,配制含麻黄碱、咖啡因、呋塞米、西布曲明的浓度为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 含芬氟拉明、酚酞、*N*-单去甲基西布曲明、*N,N*-双去甲基西布曲明对照品浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备溶液。分别精密吸取上述对照品储备溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 分别置于 50 mL 量瓶中,加流动相稀释定容,分别作为对照品系列溶液(1)~(6)。

2.3.2 供试品溶液 液体、固体饮料类食品:取供试品 10 mL,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇约 20 mL,加流动相稀释至刻度,用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,即得。

话梅蜜饯类食品:取供试样品 1 粒,剪碎后精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇约 20 mL,超声提取 30 min(100 W, 56 kHz),冷却至室温,加流动相稀释至刻度,用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,即得。

饼干糕点类食品:取供试样品 10 g,研碎后精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇约 20 mL,超声提取 30 min(100 W, 56 kHz),冷却至室温,加流动相稀释至刻度,用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,即得。

样品中检出添加减肥类化学成分的 MRM 色谱图见图 2。

3 结果

3.1 线性关系、检测限和定量限

取已制备的对照品系列溶液,分别进样 $2\text{ }\mu\text{L}$,以定量监测离子对的离子流中谱峰面积(*Y*)为纵坐标,对照品浓度(*X*, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标进行线性关系考察,结果表明 8 种化学药在各自的质量浓度范围内与色谱峰峰面积均呈良好线性关系,均在 0.995~0.999,结果见表 3。

取 12 号样品(检测结果为阴性)10 g,加入适当稀释的混合对照品溶液,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,以信噪比为 3 时 8 种减肥成分的检测限和信噪比为 10 时的定量限, LOD 为

$0.042\sim 0.175\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, LOQ 为 $0.126\sim 0.525\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明方法具有较高的灵敏度,完全能满足非法添加化学药的检测要求,结果见表 3。

3.2 重复性试验

取对照品系列溶液(3)连续进样 6 次, RSD 分别为 4.7%, 4.2%, 3.0%, 1.7%, 2.1%, 3.0%, 3.8%, 2.7%。表明该方法重复性较好,结果见表 3。

3.3 加样回收率试验

取 12 号样品(阴性),每份称取样品 10 g,分别加入适量的对照品储备溶液 0.2, 0.6, 1 mL,平行 3 份,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,检测含量,计算回收率,结果显示 8 种化学成分的加样回收率均在 90.3%~105.1%,结果见表 4。

3.4 日间精密度

以对照品系列溶液(3)3 d 重复进样,每天重复进样 3 次,峰面积的 RSD 作为日间精密度,日间精密度 RSD 控制在 1.7%~4.5%。表明方法精密度良好,结果见表 4。

3.5 样品定性检测

本方法采用“MRM”模式检测,如表 1 所示质谱分析方法,每一成分都有多个(咖啡因有 1 个,其余成分 2 个)检测通道,每一通道对应一个监测离子对。样品检测时,若某一成分对应的多个通道中均出现与对照品保留时间一致的谱峰,并且这几个离子的相对丰度与对照品一致,则可判定样品中检出该成分。定性结果见表 5,表中各成分的丰度数据均符合欧盟 2002/657/EC 法规关于定性判断时相对离子丰度得允许偏差范围,可判断这些离子的相对丰度一致。按上述法规的分值法(质谱分析方法鉴定点数)计算,上述定性过程已达到 4 分, >3 分的要求,可判断样品 1~9 号中均检出酚酞,10 号检出咖啡因减肥成分,样品 11、12 号为阴性样品,其余 6 种减肥成分均未检出。

表 3 8 种减肥非法添加成分的线性关系、检测限、定量限和重复性

Tab. 3 Linear regression results, LOD, LOQ and reproducibility of 8 slimming drugs

组分	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	线性方程	相关性(R^2)	检测限 (LOD, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限 (LOQ, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	重复性 RSD ($n=6$)/%
麻黄碱	0.428~4.28	$Y=2\ 071.9X-151.35$	0.996	0.171	0.514	4.7
咖啡因	0.413~4.13	$Y=11\ 204X-714.79$	0.998	0.165	0.496	4.2
呋塞米	0.437~4.37	$Y=12\ 473X+745.21$	0.995	0.175	0.525	3.0
芬氟拉明	0.234~2.34	$Y=47\ 841X-1358.6$	0.998	0.058	0.174	1.7
酚酞	0.232~2.32	$Y=234\ 865X-34452$	0.997	0.093	0.278	2.1
<i>N</i> -单去甲基西布曲明	0.210~2.10	$Y=59\ 157X-2783.9$	0.997	0.042	0.126	3.0
<i>N,N</i> -双去甲基西布曲明	0.207~2.07	$Y=24\ 191X-312.07$	0.999	0.083	0.249	3.8
西布曲明	0.401~4.01	$Y=6\ 848.1X+357.72$	0.999	0.160	0.481	2.7

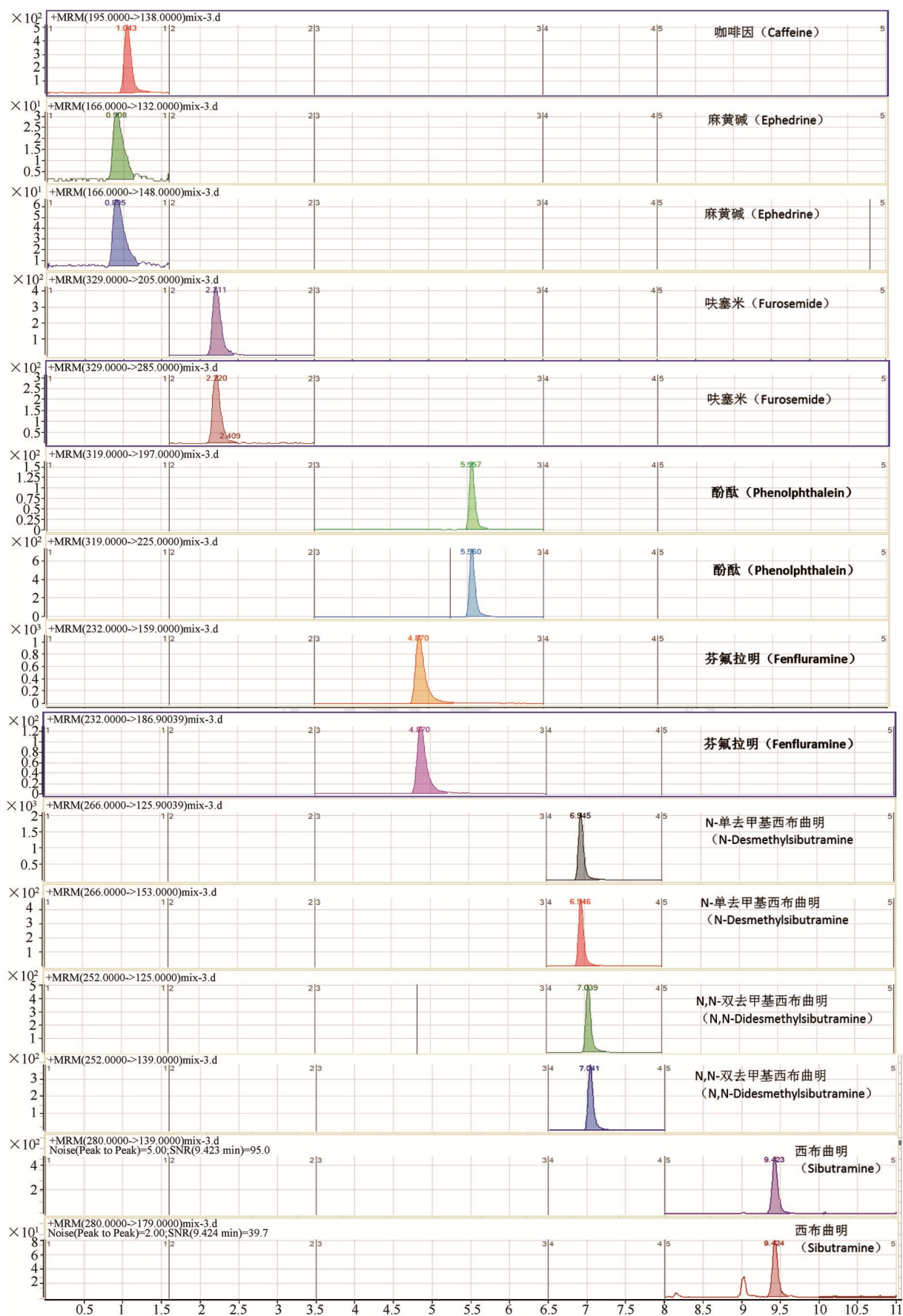


图 1 8 种减肥类化学成分 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM of 8 chemical drugs used for slimming

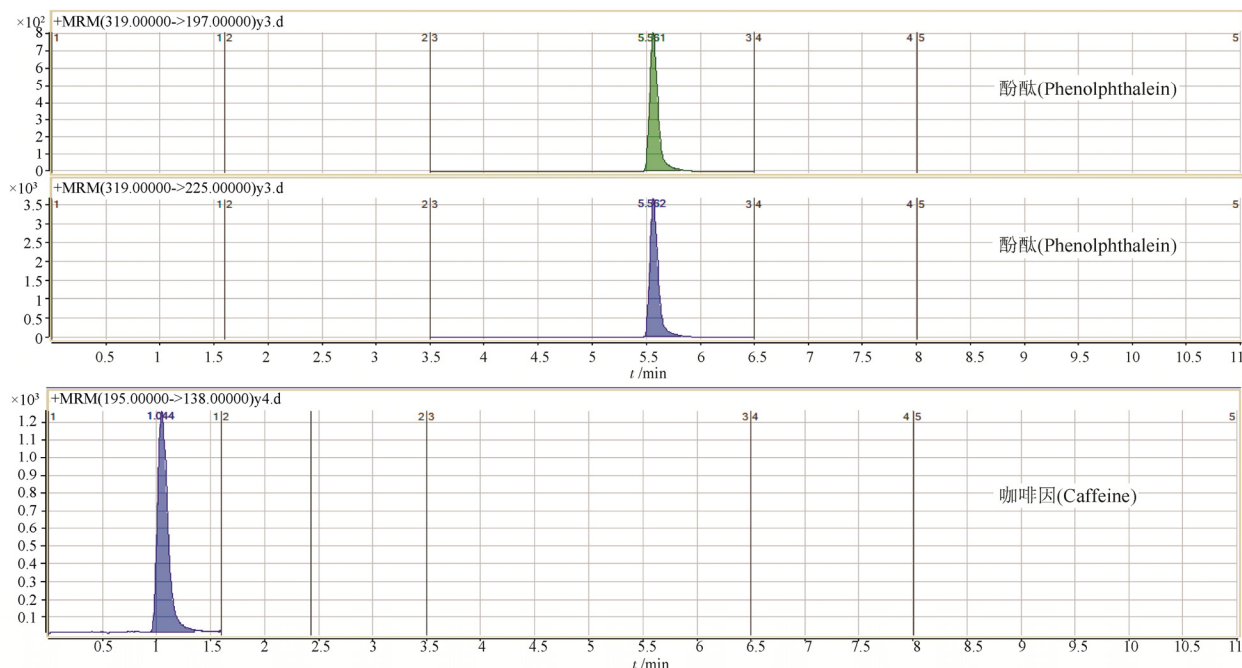


图2 样品中检出化学成分的MRM色谱图

注：以样品1和样品10的MRM色谱图为代表。

Fig. 2 MRM chromatogram of the chemical composition detected in samples

Note: The sample is represented by MRM chromatogram of sample 1 and sample 10.

表4 回收率与日间精密度(n=3)

Tab. 4 The recoveries and inter-day precision(n=3)

组分	添加浓度水平/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均回收率/%	日间精密度/%
麻黄碱	0.856	103.7	3.7
	2.568	94.2	
	4.28	98.8	
咖啡因	0.826	93.1	4.1
	2.478	95.3	
	4.13	95.4	
呋塞米	0.874 4	95.7	3.9
	2.623 2	97.2	
	4.372	99.2	
芬氟拉明	0.467 2	95.1	2.1
	1.401 6	96.8	
	2.336	97.4	
酚酞	0.464	98.2	2.6
	1.392	101.1	
	2.32	97.9	
N-单去甲基西布曲明	0.420 8	95.7	3.8
	1.262 4	97.2	
	2.104	97.8	
N,N-双去甲基西布曲明	0.414 4	105.1	4.5
	1.243 2	90.3	
	2.072	95.4	
西布曲明	0.801 6	96.2	1.7
	2.404 8	97.1	
	4.008	100.9	

表5 8种减肥成分定性分析

Tab. 5 The qualitative analysis of 8 slimming drugs

组分	监测离子对/ $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$	对照品各离子丰度/%	样品中各成分离子丰度/%	
			1~9号	10~11号
酚酞	319>225*	80.9	80.4~81.2	/
	319>297	19.8	19.2~20.2	
咖啡因	195>138*	21.8	/	20.5~22.3
		78.6		78.0~79.5

注：*为定量离子对。

Note: * was the ion pair for quantitation.

3.6 样品定量检测

根据定量监测离子对的离子流图中谱峰峰面积外标法计算样品中减肥化学成分的含量。定量结果见表6。

4 讨论

本实验基于UPLC-MS/MS的超高分辨能力、超高分析速度及质谱提供的结构信息，开发减肥食品中常见非法添加盐酸麻黄碱、咖啡因、呋塞米、芬氟拉明、酚酞、N-单去甲基西布曲明、N,N-双去甲基西布曲明和西布曲明8种化学成分的定性定量检测方法。通过MRM扫描模式，针对每个化合物选取2个特征碎片离子(咖啡因一个碎片离子)作为定性依据，同时选择其中响应较高的反应离子对作为定量离子对，从而实现对上述8种化学添加药物的定性定量分析，并将上述方法应用

表 6 样品中 8 种减肥化学成分的分析结果

Tab. 6 Detection results of 8 slimming drugs in samples
mg·g⁻¹

序号	样品名称	批号	酚酞	咖啡因	其余 6 种 减肥成分
1	纤体梅	87261081	0.026	未检出	未检出
2	纤姿梅	1261001388	11.017	未检出	未检出
3	肠清梅	3617208	12.341	未检出	未检出
4	金广元修身梅	103	0.014	未检出	未检出
5	妙女郎酵素梅	20130813	12.977	未检出	未检出
6	酵素青梅	220003	10.765	未检出	未检出
7	台湾西梅排毒 减肥果	RT1013	0.312	未检出	未检出
8	果然神奇瘦身 咖啡	20150408	7.031	—	未检出
9	酵素枣	20150403	0.311	未检出	未检出
10	纤梅	—	未检出	0.180	未检出
11	纤果酵素饮	061210	未检出	未检出	未检出
12	减肥饼干	240453	未检出	未检出	未检出

于 12 批减肥食品的非法添加检测工作,结果表明,12 批减肥类保健食品 9 类添加了酚酞,1 类添加了咖啡因。

实验采用 UPLC 作为分离手段,分析速度快,只需 11 min 即可完成检测,在实际快检及处理药品绿色通道检验时,效果良好。采用串联四极杆的 MRM 模式检测,可同时进行定性定量分析,利用化学成分的各母离子、子离子信息,已符合定性检测的判定要求,可作为减肥食品中质量与安全用药的控制方法不仅可用于检测胶囊剂和颗粒剂样品中添加的化学减肥药,也可用于其他剂型中成药和保健食品的快速筛查。本法集快速初筛技术、验证技术和准确定量于一体,既节省了大量的人力物力,又极大地提高了非标检测工作的效率,为打击非法添加,为药品监管及规范保健食品市场提供技术支撑,具有重要的社会意义。

REFERENCES

[1] ZHAO X J. Adverse reaction of hormone drugs [J]. Med J

Liaoning(辽宁医药学杂志), 2001, 15(60): 294-296.

[2] LIAO Y. Screening for 10 anti-rheumatism chemical components in health food and chinese traditional medicine by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 37(7): 868-871.

[3] ZHOU B, LIU J, ZHU J. Adverse reactions and complacations of glucocorticosteroid drugs [J]. China Pharm(中国药业), 2002, 15(6): 43-44.

[4] PAN W, GU X R, LIU Z Z. LC-MS/MS determination of 23 nonsteroidal anti-inflammatory drugs in traditional Chinese medicine preparation [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(2): 261-266.

[5] MA W, CHENG L, ZHANG L W. 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]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2014, 4(8): 1161-1170.

[6] WANG J W, HUANG X L, CAO J. Simultaneous determination of 25 illegally added drugs in diet health ffoods by ultra-high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2014, 32(2): 151-156.

[7] OU B L, ZHAO J L, ZOU Y. Simultaneous determination of 16 glucocorticoids added in Chinese patent medicine and health products by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(9): 1178-1182.

[8] LAI G F, CHENG B, LU J. Dertermination of chemical components illegally mixed in antriheumatic traditional Chinese medicine by LC-MS [J]. China Pharm(中国药业), 2010, 13(4): 32-33.

[9] SHEN G F, ZHU J, QIU Y J. UPLC-MS/MS method for determination of sibutramine and its desmethyl derivatives added in slimming foods [J]. Chin Pham J(中国药理学杂志), 2011, 46(20): 1609-1611.

[10] ZHU B, ZHAO Z G, WANG Z W, et al. Analysis of 15 sedatives and soporifics illegally added into functional foods and traditional Chinese medicine preparations by LC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(4): 745-751.

[11] LI D, WEN H M, CUI F C. LC-MS/MS screening for 36 chemical components in health food and Chinese traditional patent medicine [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(8): 1527-1532.

[12] ZEN M F, ZHANG X B. Identification of four components of diabetes medicine added illegally to health products by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2006, 23(6): 506-507.

收稿日期: 2017-03-22
(本文责编: 蔡珊珊)