

超高效液相色谱串联质谱法测定降糖类保健食品中 11 种非法添加

LCMSMS-027

摘要：本文针对降糖类保健品中非法添加的 11 种药物建立了液相色谱 LC-30A 串联三重四极质谱 LCMS-8030 的检测方法。样品经提取后，用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。11 种组分标准曲线的相关系数为 0.994 以上；对 LOQ、LQC、MQC、HQC 四个浓度基质加标溶液进行回收率、精密度实验，取 5 份溶液分别进样，精密度及回收率分别在 0.25%~7.31% 和 78%~110.7% 之间，本方法精密度良好。方法定量限为 0.963~26.2 $\mu\text{g/g}$ 之间；检出限在 0.0400 $\mu\text{g/g}$ ~9.89 $\mu\text{g/g}$ 之间。随即抽取市售降糖类保健品 3 份，实验结果显示本方法可快速筛查违禁组分。

关键词：保健品非法添加 降糖 超高效液相色谱仪 三重四级杆质谱仪

保健品的全称是保健食品，不允许添加药物，但是一些企业为了突出产品的功能，擅自在保健食品中添加违禁物品。保健品中非法添加的各种违禁成分，消费者在不知情的情况下服用，极易造成滥用还可能导致产生药物依赖性。由于保健食品、中药保健品的特殊性，国家食品药品监督管理局在 2011 年 5 月 25 日颁布了关于严厉打击保健食品化妆品非法添加行为的通知。重点对宣称改善睡眠、辅助降血糖、缓解体力疲劳、减肥等功能的保健食品，宣称

美白、祛痘、去皱、抗衰老功能的护肤产品，祛斑、育发、染发等特殊用途化妆品，以及洗浴类产品等进行抽检。保健食品中易非法添加的物质、组分及检测依据（第一批）中明确列出抗疲劳类保健品包括伐地那非、西地那非及他达拉非类非法添加组分。本文利用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用，建立了快速准确测定 11 种降糖类非法添加的方法，供相关人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，

LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODSII
(2.0 mm \times 100 mm, 2.2 μm)

流动相：A - 0.1% 乙酸 + 10 mM 甲酸铵水溶液；
B - 乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 初始浓度为 5%，
时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	45
6.00	Pumps	Pump B Conc.	45
7.00	Pumps	Pump B Conc.	55
8.00	Pumps	Pump B Conc.	90
10.00	Pumps	Pump B Conc.	90
10.10	Pumps	Pump B Conc.	5
14.00	Controller	Stop	

质谱条件
 分析仪器：LCMS-8030
 离子源：ESI(+/-)
 离子源接口电压：4.5 kV/-3.5 kV
 雾化气：氮气 3.0 L/min
 干燥气：氮气 15 L/min
 碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃
 加热模块温度：400℃
 扫描模式：多反应监测 (MRM)
 驻留时间：20 ms
 延迟时间：2 ms
 MRM 参数：见表 2
 三重四极杆离子对及相关电压参数设定如表 2：

表2 三重四极杆离子对及相关电压参数设定表

No.	Name	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	二甲双胍	130.10	60.20*	-14.0	-15.0	-22.0
			71.15	-14.0	-20.0	-14.0
2	苯乙双胍	206.10	60.20*	-23.0	-20.0	-23.0
			105.20	-23.0	-25.0	-20.0
3	氯磺丙脲	274.80	190.00*	29.0	15.0	13.0
			126.20	29.0	30.0	24.0
4	格列吡嗪	446.00	103.15*	-22.0	-45.0	-20.0
			167.00	-22.0	-30.0	-17.0
5	甲苯磺丁脲	271.10	74.20*	-19.0	-15.0	-14.0
			91.15	-19.0	-30.0	-17.0
6	甲磺氮卓脲	312.00	115.15*	-16.0	-20.0	-24.0
			91.10	-16.0	-35.0	-17.0
7	格列奇特	324.10	127.15*	-16.0	-20.0	-13.0
			110.15	-16.0	-20.0	-23.0
8	那格列奈	318.20	69.15*	-16.0	-30.0	-13.0
			120.15	-16.0	-20.0	-12.0
9	格列本脲	494.00	169.00*	-25.0	-35.0	-18.0
			304.05	-25.0	-25.0	-22.0
10	格列美脲	491.10	126.10*	-25.0	-30.0	-13.0
			181.10	-25.0	-30.0	-12.0
11	瑞格列奈	453.10	230.20*	-22.0	-30.0	-16.0
			86.20	-23.0	-30.0	-17.0

*定量离子对

1.3 样品制备

标准溶液配制:

分别精密称取二甲双胍、苯乙双胍、格列美脲、瑞格列奈 2 mg [精确到 0.01 mg, 其中, 盐酸二甲双胍准确称取 2.56 mg (相当于二甲双胍 2 mg)]; 盐酸苯乙双胍准确称取 2.36 mg (相当于苯乙双胍 2 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 的二甲双胍、苯乙双胍、格列美脲、瑞格列奈的标准浓储备溶液。

分别精密称取格列吡嗪、甲磺氮卓脲、格列奇特、格列本脲 2 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的格列吡嗪、甲磺氮卓脲、格列奇特、格列本脲的标准浓储备溶液。

分别精密称取氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、那格列奈 2 mg (精确到 0.01 mg), 置 2 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、那格列奈的标准浓储备溶液。

分别精密量取 11 种降糖类禁化学成分浓储备液 0.5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加入 80% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、格列美脲、瑞格列奈 2 $\mu\text{g/mL}$, 格列吡嗪、甲磺氮卓脲、格列奇特、格列本脲 10 $\mu\text{g/mL}$, 氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、那格列奈 50 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品浓储备液。混合对照品浓储备液以 80% 甲醇溶液按一定比例稀释, 得系列浓度的对照品工作溶液。最终配成: (1) 二甲双胍、苯乙双胍、格列美脲、瑞格列奈 0.8、1.6、3.2、8、16、20、32、40、64、80、200、400、800 ng/mL, 1.6、2 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。(2) 格列吡嗪、甲磺氮卓脲、格列奇特、格列本脲浓度为 4、8、16、40、80、100、160、200、320、400 ng/mL, 1、2、4、8、10 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。(3) 氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、那格列奈浓度为 20、40、80、200、400、500、800 ng/mL, 1、1.6、2、5、10、20、40、50 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。

样品前处理方法:

取样品 5 粒, 5 片或者 5 袋, 倾出内容物, 混匀。取样品约 0.2 g (精确至 1 mg) 于 10 mL 塑料离心管中, 加入 5 mL 甲醇后, 称重。涡旋 60 s 后, 超声 15 min, 放冷后, 再称重, 用甲醇补足减失的重量。4500 rpm 离心 10 min。取样品溶液 20 μL , 加 80% 甲醇稀释至 1 mL, 涡旋 30 s 后, 13000 rpm 离心 10 min。取上清液转入液相小瓶中, 进样 5 μL , 进行 HPLC-MS/MS 分析。超出线性范围的样品稀释后进行 HPLC-MS/MS 分析。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

下图为 10 ng/mL 样品 11 种组分混标色谱图, 峰形正常、分离度良好。

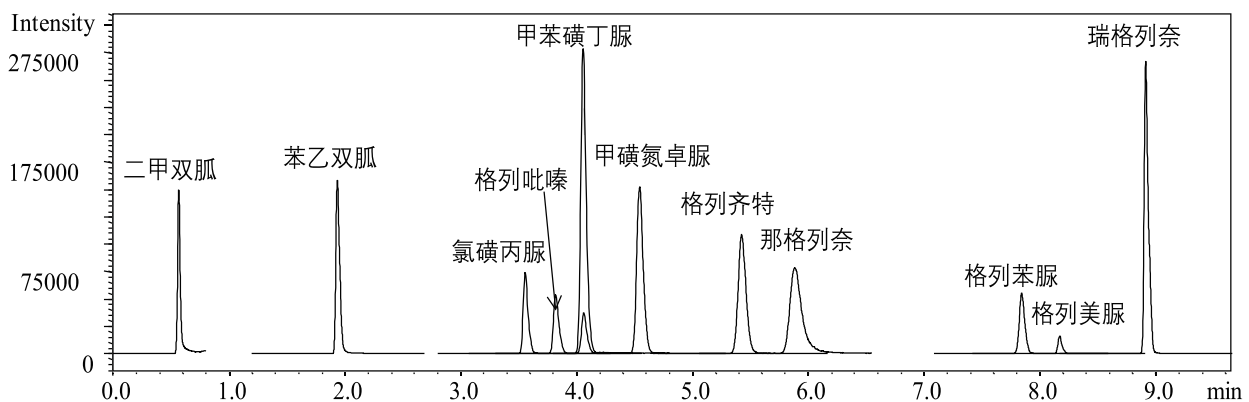


图1 10 ng/mL样品11种组分混标色谱图

2.2 线性关系及检出限

在设定的分析条件下, 结果表明 11 种降糖类违禁成分在线性范围内, 其峰面积线性良好, 相关系数 r 高于 0.994。最低定量浓度 (LOQ) 二甲双胍、苯乙双胍、氯磺丙脲、格列吡嗪、甲苯磺丁脲、甲磺氮卓脲、格列齐特、那格列奈、格列本脲、格列美脲、瑞格列奈分别为 0.963、0.998、24.7、5.00、26.2、5.00、5.02、24.9、5.02、1.04、1.00 $\mu\text{g/g}$, 满足实际样品测定需要。以噪音的 3 倍计算, 二甲双胍、苯乙双胍、氯磺丙脲、格列吡嗪、甲苯磺丁脲、甲磺氮卓脲、格列齐特、那格列奈、格列本脲、格列美脲、瑞格列奈最低检出浓度 (LOD) 分别为 0.0770、0.0798、9.89、2.00、2.10、1.00、1.00、4.98、1.01、0.414、0.0400 $\mu\text{g/g}$ 。

表3 回归方程、相关系数及线性范围及最低定量限 (基质标准曲线)

类别	回归方程	相关系数 r	线性范围	检出限 (ng/mL)	检出浓度 ($\mu\text{g/g}$)
二甲双胍	$Y=1932.007+20977.014X$	1.000	0.963 -48.2 $\mu\text{g/g}$	0.0616	0.0770
苯乙双胍	$Y=3055.323+13252.99X$	0.998	0.998 -49.9 $\mu\text{g/g}$	0.0639	0.0798
氯磺丙脲	$Y=-606.422+259.047X$	0.994	24.7 -1236 $\mu\text{g/g}$	7.92	9.89
格列吡嗪	$Y=-166.785+772.715X$	0.998	5.00 -250 $\mu\text{g/g}$	1.60	2.00
甲苯磺丁脲	$Y=-3176.184+857.126X$	0.995	26.2 -1312 $\mu\text{g/g}$	1.68	2.10
甲磺氮卓脲	$Y=510.439+2555.127X$	1.000	5.00 -250 $\mu\text{g/g}$	0.800	1.00
格列齐特	$Y=952.949+2093.000X$	0.999	5.02 -504 $\mu\text{g/g}$	0.803	1.00
那格列奈	$Y=-301.193+541.488X$	0.999	24.9 -1243 $\mu\text{g/g}$	3.98	4.98
格列本脲	$Y=-125.412+1310.823X$	0.997	5.02 -251 $\mu\text{g/g}$	0.804	1.01
格列美脲	$Y=-28.644+1537.736X$	0.999	1.04 -51.8 $\mu\text{g/g}$	0.331	0.414
瑞格列奈	$Y=1927.581+20218.295X$	1.000	1.00 -50.0 $\mu\text{g/g}$	0.0320	0.0400

2.3 精密度试验

对 LOQ、LQC、MQC、HQC 四个浓度基质加标溶液进行回收率、精密度实验, 得到 5 份溶液分别进样, 精密度及回收率分别在 0.25%~7.31% 和 78%~110.7% 之间, 本方法精密度良好。

表4 降糖类违禁成分的绝对回收率 (n=5)

类别	实际浓度 (μg/g)	检出浓度 (μg/g)	RSD (%)	准确度 (%)
二甲双胍	0.963	0.818±0.013	1.59	84.9
	1.93	1.80±0.03	1.52	93.4
	9.63	9.10±0.16	1.73	94.5
	38.5	34.7±0.3	0.77	90.1
苯乙双胍	0.998	0.663±0.025	3.78	85.4
	2.00	1.71±0.03	1.87	105.7
	9.98	9.45±0.17	1.84	94.6
	39.9	34.1±0.2	0.66	85.5
氯磺丙脲	24.7	24.9±0.7	2.76	100.8
	49.5	48.1±1.1	2.20	97.3
	247	243±4	1.57	98.5
	989	1055±16	1.52	106.6
格列吡嗪	5.00	3.94±0.18	4.64	78.7
	10.0	8.33±0.36	4.32	83.3
	50.0	44.3±0.6	1.28	88.6
	200	188±2	1.19	93.9
甲苯磺丁脲	26.2	27.7±0.8	2.99	105.6
	52.5	51.9±1.2	2.30	98.9
	262	256±2	0.80	97.5
	1050	1162±12	1.00	110.7
甲磺氮卓脲	5.00	4.05±0.14	3.42	81.1
	10.0	8.71±0.12	1.42	87.1
	50.0	46.1±1.2	2.59	92.2
	200	179±2	1.11	89.6
格列齐特	5.02	3.92±0.15	3.73	78.0
	10.0	8.75±0.15	1.69	87.5
	50.2	46.4±0.1	0.25	92.4
	201	182±1	0.53	90.7
那格列奈	24.9	21.4±0.6	2.61	86.0
	49.8	44.3±0.6	1.38	89.0
	249	224±3	1.34	89.9
	995	928±15	1.61	93.2
格列本脲	5.02	4.45±0.25	5.66	88.6
	10.0	9.02±0.23	2.51	90.2

2.4 实际样品含量测定

对筛查确证的阳性样品进行含量测定，代入基质标准曲线，结果如表 5 所示：

表5 降糖保健食品含量测定结果

名称	二甲双胍 (mg/g)	苯乙双胍 (mg/g)	格列本脲 (mg/g)	格列美脲 (mg/g)
平糖 6.0	75.9	0.00975	2.64	ND
唐素清	ND	9.75	2.27	0.00617
神农本草降糖	0.0435	ND	5.91	ND

ND: not detect

■ 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定降糖类保健食品中 11 种非法添加。本法线性范围宽，11 种组分校准曲线的相关系数在 0.994 以上，可以满足实际样品筛查需要。本研究采用 HPLC-MS/MS 法对降糖类保健食品中违法添加的降糖类违禁成分进行含量测定。根据样品测定结果可以看出，市场上销售的降糖保健食品违法添加违禁成分现象十分严重，含量高达几个到几百个毫克，并且存在一种保健食品同时添加几种违禁成分的现象。因此，对降糖保健食品中违法添加化学药物的现象需要加强监管的力度。同时，应制定方法，用于日常检测，保障保健食品安全。