

安神类保健食品中新型非法添加药物的检测研究

林芳, 王一欣, 李涛*, 刘海静, 袁磊

(陕西省食品药品检验所, 西安 710065)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱法(UPLC)及气相色谱-质谱(GC-MS)法, 用于检测并确证安神类保健食品中的新型非法添加药物。 **方法** 采用溶剂超声或液-液萃取方式对样品进行提取后, 采用 UPLC 进行测定。UPLC 采用 ZORBAX SB-C₁₈(2.1×150 mm, 1.8 μm)色谱柱分离, 采用乙腈和 0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.4 mL/min, 采集 210 nm 色谱图进行样品初筛。GC-MS 采用 DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)分离, 程序升温条件为: 初始温度 150 °C(1 min), 以 8 °C/min 升至 250 °C(5 min), 12 °C/min 升至 280 °C(15 min), 选择 EI 离子源, 溶剂延迟 2 min, 质谱扫描 50~600 amu。 **结果** 本方法能够在 23 min 内快速检测安神类保健食品中的新型非法添加药物, 先经 UPLC 分析样品发现可疑色谱峰, 再运用气质联用技术确证为一种新型非法添加药物盐酸氟桂利嗪。 **结论** 该方法快速、简便、准确, 为保健食品中新型非法添加药物的检测提供了研究思路和参考。

关键词: 保健食品; 新型非法添加物; 盐酸氟桂利嗪; 气相色谱-质谱法; 超高效液相色谱法

Study on determination of new illegal additives in sleep-improving health-care foods

LIN Fang, WANG Yi-Xin, LI Tao*, LIU Hai-Jing, YUAN Lei

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of ultra performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for determination and confirmation of new illegal drug added in sleep-improving health-care foods. **Method** The samples were extracted through solvent ultrasonic extraction or the liquid-liquid extraction and tested by UPLC. In the UPLC method, ZORBAX SB-C₁₈ column (2.1×150 mm, 1.8 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid for linear gradient elution. The flow rate was 0.4 mL/min. The detection wave lengths were 210 nm for preliminary screening. The analytical capillary column of GC-MS was DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm). The temperature programming was as follows: the initial temperature was set at 150 °C (1 min); then raised to 250 °C(5 min) with heating speed of 8 °C/min, and to 280 °C (15 min) with heating speed of 12 °C/min. The EI ion source was selected and the solvent delayed by 2 min. The MS scanning was set at the range of 50~600 amu. **Results** New illegal additives in sleep-improving health-care foods could be effectively detected within 23 min. Through analyzing by UPLC, a suspicious chromatographic peak was detected and then was confirmed to be a new kind of illegal additive flunarizine hydrochloride by GC-MS method. **Conclusion** The

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程项目(2014FWPT-01)

Fund: Supported by the Shaanxi Science and Technology Co-ordination Innovation Project (2014FWPT-01)

*通讯作者: 李涛, 副主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验、食品安全快速检测技术研究。E-mail: westyx@126.com.

*Corresponding author: LI Tao, Vice Director Pharmacist, Shaanxi Institute for Food and Drug Control, No.21, Kejiwu Road, Gaoxin District, Xi'an 710065, China. E-mail: westyx@126.com.

method is rapid, simple and accurate, which provides research mentality and reference for the determination of new illegal additive in health foods.

KEY WORDS: health foods; new illegally additives; flunarizine hydrochloride; gas chromatography-mass spectrometer; ultra performance liquid chromatography

1 引言

随着人们生活质量的提高,食品的营养和保健作用越来越受到重视,利用保健食品改善和调节机体功能也成为自我保健的趋势^[1]。然而有一些非法商家盲目追求利益而忽略了保健食品的安全性^[2],在保健食品中添加处方药成分以增强功效。保健食品因非法添加化学药物而遭到查处的情况屡有报道,这种行为不仅违反了《食品安全法》第38条“生产经营的食品中不得添加任何药品”的规定,而且可能会导致药物滥用,危害消费者的身体健康^[3-8]。2012年12月14日,国家食品药品监督管理局(State food and drug administration, SFDA)发布了保健食品中可能非法添加的物质名单(第一批)^[9],列出6类保健食品中可能添加的多种化学药品。其中安神类保健食品中可能非法添加的物质有地西洋、硝西洋、氯硝西洋、氯氮卓、奥沙西洋、马来酸咪达唑仑、劳拉西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和氯美扎酮等。随着近年来监测监管力度的不断加强,常规的非法添加物已逐渐被不法分子淘汰,取而代之的是一些现有药物的新型合成类似物以逃避国家监管。这些新型非法添加药物更加隐蔽,被盲目应用后可能存在较大的安全隐患,同样为国家法规所不允许,因此对保健食品非法添加物检测方法的灵敏度和准确性提出了更高的要求。

目前,保健食品中非法添加物的检测方法主要有薄层色谱法(TLC)^[10]、高效液相色谱法(HPLC)^[11]、高效液相色谱-质谱法(LC-MS)^[12]、气相色谱法(GC)^[13]和气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[14,15]。本研究结合超高效液相色谱法(UPLC)和气相色谱-质谱(GC-MS)法,筛查、鉴别并确证了安神类保健食品中的一种新型非法添加药物。本研究参照并优化了SFDA药品检验方法、检验项目批准件2009024以及安神类保健食品非法添加化学品检测方法^[16-18],应用超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)对市场上随机抽查的安神类保健食品进行初步筛查。然后利用气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)具有气相色谱的高分离性能及质谱能准确鉴定化合物结构的特点,采用GC-MS检测技术在计算机谱库中检索初步分辨化合物结构,再用标准对照品进行比对即可确证该物质。本研究为保健食品中新型非法添加药物的定性分析和建立检测标准及监控方法提供了有力依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

Agilent1290 Infinity 超高效液相色谱仪(配有1290二极管阵列检测器,美国安捷伦公司); GCMS-QP2010 Ultra 气相色谱法-质谱联用仪(日本岛津公司); NIST05、NIST05s、WILEY7 Autotune 标准质谱库; TACHI CF16RN 型离心机(天美中国科学仪器有限公司); TTL-DCLL 型氮气吹干仪(北京同泰联科技发展有限公司); HH-S6 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); IKA MS3 basic 型涡旋仪(艾卡广州仪器设备有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BS223S 型电子分析天平(德国塞多利斯公司); Synergy 型超纯水仪(美国密理博公司)。

2.2 材料与试剂

检测样品为国家保健食品监督抽检中安神类保健食品。空白样品为固体样品,经国家食品药品监督管理局批件2009024方法及质谱确证检测,不含有待测的18种精神类药物。

甲醇、乙腈(色谱纯, TEDIA 公司); 磷酸(分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司)、三氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水均为超纯水。

对照品: 阿普唑仑、马来酸咪达唑仑、艾司唑仑(纯度99.9%)、三唑仑、氯硝西洋、氯美扎酮、地西洋(纯度99.9%)、硝西洋、劳拉西洋、奥沙西洋、氯氮平(纯度99.8%)、氯氮卓(纯度99.7%)、巴比妥、奋乃静、异戊巴比妥、盐酸异丙嗪(纯度99.4%)、盐酸氟桂利嗪,由中国食品药品检定研究院提供; 苯巴比妥、司可巴比妥,由国家麻醉品实验室提供。

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液的配制

(1) UPLC 对照品溶液的配制

0.8 mg/mL 对照品溶液: 准确称取18种对照品阿普唑仑、马来酸咪达唑仑、艾司唑仑、三唑仑、氯硝西洋、氯美扎酮、地西洋、硝西洋、劳拉西洋、奥沙西洋、氯氮平、氯氮卓、巴比妥、奋乃静、异戊巴比妥、盐酸异丙嗪、苯巴比妥和司可巴比妥各20 mg, 分别置于25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度。

混合对照品溶液: 从每个对照品储备液中, 分别准确移取1~2.5 mL 于同一25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度。为消除样品基质影响, 制备空白样品基质溶液。

(2) GC-MS 对照品溶液的配制

精密称取盐酸氟桂利嗪对照品,精密称取 20 mg,置于 20 mL 容量瓶中,用无水甲醇定容。精确量取 1 mL,转移至 20 mL 容量瓶中,定容至刻度。可根据实验具体情况调节溶液浓度。

2.3.2 色谱条件

(1) UPLC

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm), 柱温: 30 °C; 检测波长: 210 nm; 进样量: 1 μL; 流速: 0.4 mL/min; 流动相 A: 乙腈, 流动相 B: 0.1% 磷酸溶液, 洗脱时间: 15 min, 梯度洗脱。

光谱条件: 光谱范围: 190~400 nm, 光谱步进值: 1.0 nm, 光谱采集模式: 全部。

(2) GC-MS

气相色谱条件: 色谱柱 DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 美国 Restek 公司; 程序升温条件(初始温度 150 °C, 保持 1 min, 以 8 °C/min 升温至 250 °C, 保持 5 min, 再以 12 °C/min 升温至 280 °C, 保持 15 min); 分流比 2:1; 载气(He), 总流量 7.5 mL/min, 柱流量 1.5 mL/min; 进样口温度 280 °C; 柱箱温度 150 °C; 使用恒压模式柱压 135.8 kPa; 进样量 1 μL。

质谱条件: EI 电子轰击电离源, 温度为 250 °C; 电子轰击能量 70 eV; 质量分析器为四级杆, Scan 模式, 扫描质量范围 50~600 amu; 溶剂延迟时间 2 min。

2.3.3 样品前处理

样品前处理方法优化参考国家食品药品监督管理局批件 2009024^[18], 采用氯仿提取, 甲醇作为溶剂的方法。既可以去除样品中过多的杂质干扰, 又可以保证目标物被充分提取^[16,17]。

UPLC 样品: 取样品(口服液取 10 mL, 糖浆取 5 mL, 蒸去乙醇的剂取 10 mL), 加水 10 mL, 加氯仿振荡提取 3 次, 每次 10 mL, 合并氯仿提取液, 离心 5 min, 取上清液经氮气吹干, 再用 1 mL 无水甲醇溶解, 过 0.45 μm 滤膜。

GC-MS 样品: 取样品(胶囊取 2 粒内容物, 片剂取 4 片, 颗粒剂取 1 袋; 均研末细), 加氯仿 10 mL 超声处理 20 min, 3000 r/min 离心 5 min, 取 5 mL 上清液, 置另一干燥试管中, 氮气吹干, 再用 1 mL 无水甲醇溶解, 过 0.45 μm 滤膜。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

以 ZORBAX SB-C₁₈(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)作为分析柱, 以乙腈-0.1%磷酸溶液作流动相, 优化后的梯度洗脱条件见表 1, 运行时间仅需 12 min 即可使 18 种药物保持足够的分离度和良好的峰形, 结果见图 1。经相同色谱条件下对照品单标溶液定性, 可确定 18 种药物的出峰顺序和保留时间^[16]。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	(乙腈)%	(0.1% 磷酸)%
0	10	90
2	30	70
11	40	60
13	10	90
15	10	90

3.2 UPLC 初筛鉴别

采用优化后的 UPLC 色谱条件, 对供试品进行检测, 发现某安神类样品的色谱图(图 2)在保留时间为 8 min 时出现高含量物质峰, 与 18 种混合标准品的色谱图进行(图 1)比对, 发现该色谱峰与 14 号峰即劳拉西洋峰的保留时间接近, 疑似为劳拉西洋。因此与劳拉西洋对照品进行光谱匹配度检索, 发现光谱图特征并不一致, 结果见图 3。同时进行峰纯度比对分析, 显示峰纯度不高, 可证实该物质并不是劳拉西洋。

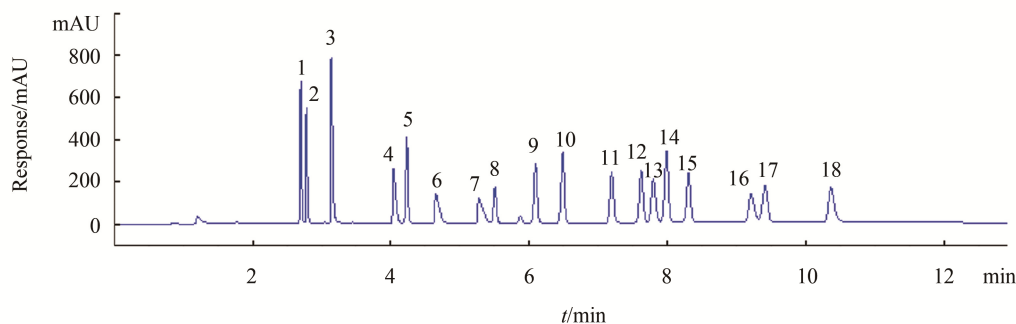


图 1 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱混标溶液分离效果

Fig. 1 Chromatogram of mixed standard solution separated by gradient elution using acetonitrile-0.1% phosphate buffer as the mobile phase.
备注 1. 巴比妥; 2. 氯氮平; 3. 氯氮卓; 4. 马来酸咪达唑仑; 5. 苯巴比妥; 6. 奋乃静; 7. 盐酸异丙嗪; 8. 氯美扎酮; 9. 硝西泮; 10. 异戊巴比妥; 11. 奥沙西泮; 12. 司可巴比妥; 13. 艾司唑仑; 14. 劳拉西洋; 15. 氯硝西泮; 16. 阿普唑仑; 17. 地西泮; 18. 三唑仑

3.3 GC-MS 法测定

进一步对该可疑样品进行确证分析, 取经 2.3.3 处理的样品溶液, 采用 GC-MS 法 Scan 全扫描模式对样品进行检测。首先进行保留时间比对, 再与标准质谱库数据检索结果相对照, 检索结果按匹配度高低排列, 根据所提供的有关化合物结构信息并考虑实际可能添加物质的特征, 初

步推测出峰 A 物质最大可能的结构为氟桂利嗪, 质谱匹配度为 98%, 见图 4~5。考虑到氟桂利嗪主要以盐酸盐的形式存在, 即再与盐酸氟桂利嗪标准品的质谱图进行比对, 总离子流图保留时间与主要碎片离子信息均一致(峰 B), 可确证该药物为盐酸氟桂利嗪, 见图 6~7。将其质谱图存入自建的数据库, 以利于在日后工作中直接通过检索数据库, 更方便快捷的得到样品确证结果。

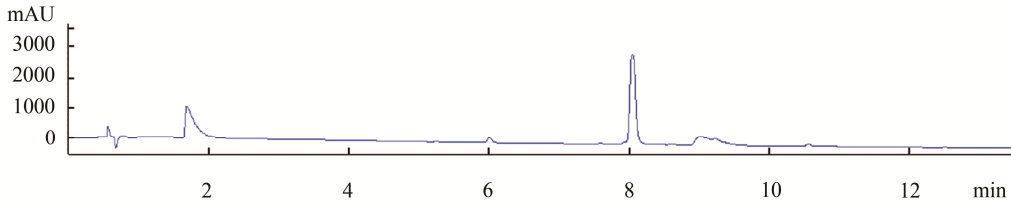


图 2 可疑样品 UPLC 色谱图
Fig. 2 Chromatogram of suspected sample

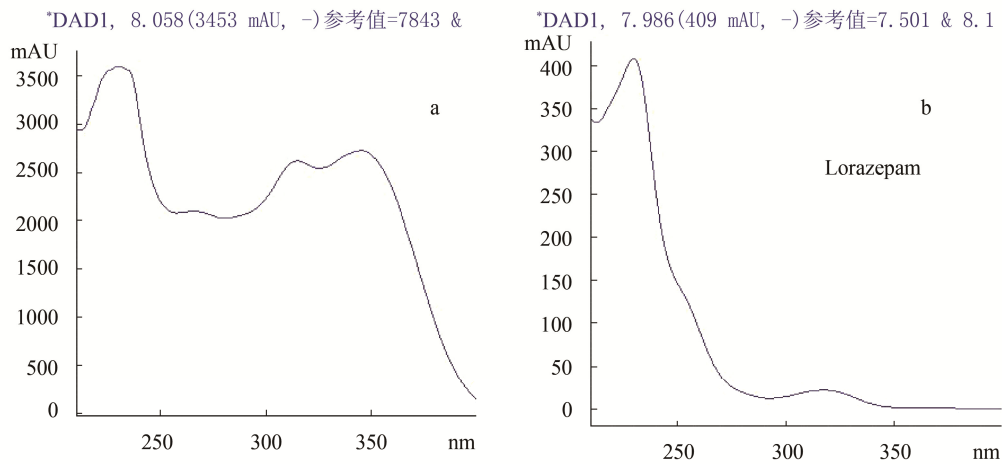


图 3 可疑样品(a)和劳拉西泮对照品(b)光谱图比对
Fig. 3 Comparison of spectrogram of suspected sample(a) and lorazepam standard(b)

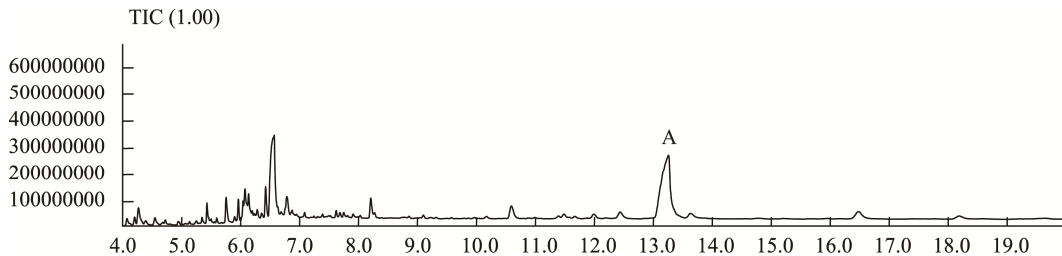


图 4 样品质谱图
Fig. 4 Mass spectrum of the sample

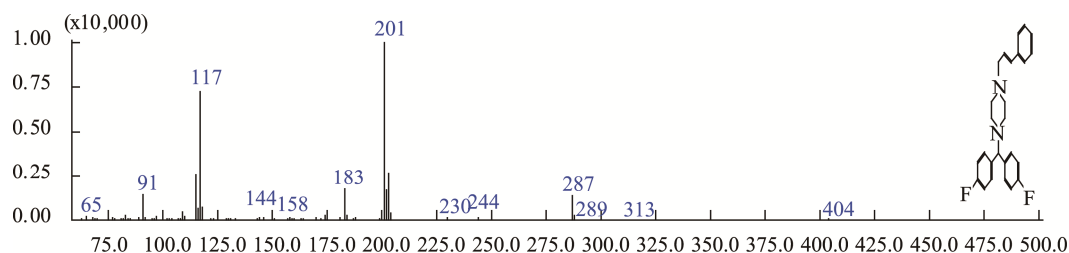


图 5 样品谱库检索结果

Fig. 5 Spectral library search results of the sample

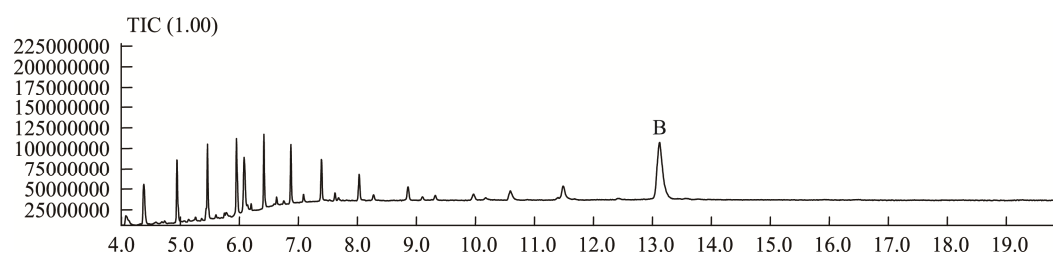


图 6 盐酸氟桂利嗪对照品质谱图

Fig. 6 Mass spectrum of flunarizine hydrochloride

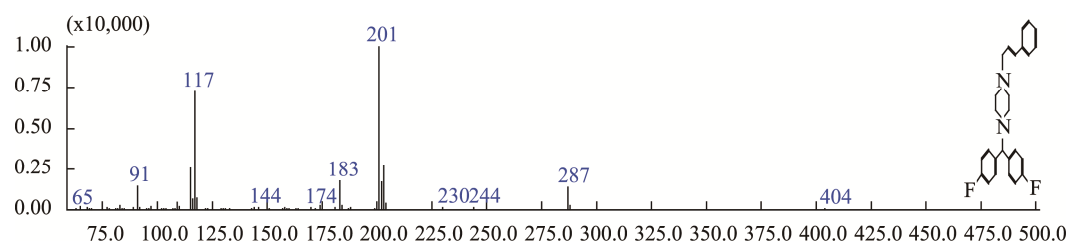


图 7 盐酸氟桂利嗪标准品与标准质谱库比对

Fig. 7 Comparison of flunarizine hydrochloride standard and standard mass spectral library

4 结 论

盐酸氟桂利嗪为桂利嗪类的二氟化衍生物,属于选择性 Ca^{2+} 拮抗剂,对脑血管选择性较好,具有镇静作用,与中枢神经系统抑制剂合用可加重后者的镇静作用,故临床常用于治疗脑血管类疾病。安神类保健食品中的非法添加物通常为镇静催眠类药物,因而盐酸氟桂利嗪被不良商家添加到安神类保健食品中以增强产品改善睡眠的功效。

本研究采用 UPLC 初筛和 GC-MS 定性分析,建立了安神类保健食品中新型非法添加药物的定性检测方法。本方法快速、简便、准确,为保健食品中新型非法添加药物的检测提供了研究思路和参考。

参考文献

- [1] 张圆, 闵春燕, 郝刚, 等. 保健食品中非法添加化学药物的检测方法[J]. 中国执业药师, 2014, 11(7): 35-39.
Zhang Y, Min CY, Hao G, *et al.* Screening method for illegally added chemicals in health foods [J]. *Chin Licd Pharm*, 2014, 11(7): 35-39.
- [2] 郭志鑫, 董培智, 申国华, 等. 保健食品中非法添加化学药品的特点与监管建议[J]. 中国药事, 2013, 27(11): 1132-1134.
Guo ZX, Dong PZ, Shen GH, *et al.* Characteristics of illegal addition of chemicals to health food and recommendations for supervision [J]. *Chin Pharm*, 2013, 27(11): 1132-1134.
- [3] 罗莉, 王长江, 邓大同. 减肥药物研究进展[J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 4-7.
Luo L, Wang CJ, Deng DT. The present research development of losing

- weight [J]. *Auhui Med Pharm J*, 2014, 18(1): 4-7.
- [4] 陈建勇, 彭奋飞, 曾永发. 高血压合并冠心病的合理用药[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(20): 435-436.
Chen JY, Peng FF, Zeng YF. The reasonable uses of medicine of high blood pressure complicated coronary heart disease [J]. *Guide Chin Med*, 2012, 10(20): 435-436.
- [5] 张研, 解军波, 张彦青, 等. 镇静催眠药物的主要作用机制研究进展[J]. *中国药房*, 2011, 22(41): 3906-3909.
Zhang Y, Xie JB, Zhang YQ, *et al*. The present research development of sedative-hypnotic drugs [J]. *Chin Pharm*, 2011, 22(41): 3906-3909.
- [6] 胡广林. 降血糖药物的临床合理使用[J]. *中国医药指南*, 2015, 13(4): 296-298.
Hu GL. The rational ly clinical application of hypoglycemic agents [J]. *Guide Chin Med*, 2015, 13(4): 296-298.
- [7] 全国人民代表大会常务委员会. 中华人民共和国食品安全法[S]. Committee of the National People's Congress. Food Safety Law [S].
- [8] 王静文, 曹进, 王钢力, 等. 保健食品中非法添加药物检测技术研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(1): 1-12.
Wang JW, Cao J, Wang *et al*. Research progress on determination technologies for illegally added drugs in health food [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(1): 1-12.
- [9] 国家食品药品监督管理局保健食品中可能非法添加的物质名单(第一批) [EB/OL]. (2016-03-01) <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1162/76614.html>
State Food and Drug Administration List of substances that may be illegally added in health food (the first batch) [EB/OL]. (2016-03-01) <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1162/76614.html>
- [10] 汪泉, 李翔, 许威, 等. TLC 法快速鉴别保健品中非法添加的 7 种降糖类药物[J]. *安徽医药*, 2012, 16(4): 464-466.
Wang Q, Li X, Xu W, *et al*. Determination of seven antidiabetics illegally adulterated into health care products by TLC [J]. *Auhui Med Pharm J*, 2012, 16(4): 464-466.
- [11] 许奇, 廖刚, 顾炳仁. HPLC 法快速筛选降糖类中成药及保健品中非法加入的化学药品[J]. *中国现代药物应用*, 2010, 4(9): 001-002.
Xu Q, Liao G, Gu BR. Rapid screening of HPLC anti-diabetic traditional Chinese medicines and health products with illegally added chemicals [J]. *Chin J Mod Dug Appl*, 2010, 4(9): 001-002.
- [12] 芦丽, 宫旭, 谭力. 高效液相色谱-离子阱质谱法快速筛查改善睡眠类保健食品中非法添加的 24 种镇静催眠药[J]. *色谱*, 2015, 33(3): 256-266.
Lu L, Gong X, Tan L. Fast screening of 24 sedative hypnotics illegally added in improving sleep health foods by high performance liquid chromatography on trap mass spectrometry [J]. *Chromatography*, 2015, 33(3): 256-266.
- [13] 林晨, 王李平, 林泽鹏, 等. 气相色谱测定保健食品中 3 种植物甾醇的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(15): 69-71.
Lin C, Wang LP, Lin ZP, *et al*. Determination of three phytosterols in feedstuff by GC [J]. *Chin J Exp Tradi Medi Form*, 2014, 20(15): 69-71.
- [14] 李涛, 朱小红, 林芳. GC-MS 联用方法检测降压类中成药及保健食品中非法添加的化学药物[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(11): 2212-2215.
Li T, Zhu XH, Lin F. GC-MS determination of chemical drugs added illegally in Chinese patent medicine and health food [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(11): 2212-2215.
- [15] 朱小红, 李涛, 马鹏飞, 等. 气相色谱-质谱检测方法快速筛查保健食品及中成药中 8 种非甾体抗炎药[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(10): 1847-1852.
Zhu XH, Li T, Ma PF, *et al*. GC-MS rapid screening of eight non-steroidal anti-inflammatory drugs in health foods and traditional Chinese medicines [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(10): 1847-1852.
- [16] 林芳, 李涛, 李继, 等. UPLC-DAD 法快速测定改善睡眠类保健食品中违法添加的 14 种精神药物[J]. *食品科学*, 2013, 34(22): 218-223.
Lin F, Li T, Li J, *et al*. Rapid determination of 14 psychoactive drugs in sleep-improving health-care foods by ultra-high performance liquid chromatography-photodiode array detection [J]. *Food Sci*, 2013, 34(22): 218-223.
- [17] 林芳, 李继, 李涛, 等. UPLC-DAD 法快速测定保健食品中违法添加的 18 种精神药物[J]. *食品科技*, 2013, 38(9): 303-308.
Lin F, Li J, Li T, *et al*. Rapid determination of 18 psychoactive drugs illsgally added in health food by ultra-high performance liquid chromatography with photodiode array detector [J]. *Food Sci Technol*, 2013, 38(9): 303-308.
- [18] 国家食品药品监督管理局. 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. 批准件编号 2009024 安神类中成药中非法添加化学品检测方法[S].
State Food and Drug Administration. State Food and Drug Administration inspection and additional testing methods and project approval documents. Approval documents number 2009024 Screening for illegal adding of chemical compositions in traditional Chinese patent sedatives and tranquilizers [S].

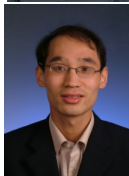
(责任编辑: 姚菲)

作者简介



林芳, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品、保健食品理化检验及安全性检测。

E-mail: fanqiehuayuan@126.com



李涛, 副主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验, 食品安全快速检测技术研究。

E-mail: westyx@126.com