

超高效液相色谱法测定保健食品中氨甲环酸和氨基己酸含量

郭建博, 朱小红*, 赵彬, 宋莉, 牟霄, 吕卓, 刘海静

(陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱法(ultra high performance liquid chromatography, UPLC)测定保健食品中氨甲环酸和氨基己酸非法添加物的检测方法。**方法** 样品经溶剂提取后, 经 HILIC 色谱柱进行分离、质谱检测后, 对样品中的氨甲环酸和氨基己酸定性、定量分析。**结果** 样品经 HILIC 柱分离后, 氨甲环酸和氨基己酸能够得到有效的色谱保留和分离, 并且待测物不受样品基质的影响。该方法在 1.0~100 ng/mL 浓度范围(样品含量 0.05~5 $\mu\text{g/g}$)内, 线性关系良好, 方法的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值小于 2%, 方法平均回收率为 93.4%~100.3%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 能够适用于保健食品中氨甲环酸和氨基己酸的定性、定量检查。

关键词: 保健食品; 氨甲环酸; 氨基己酸; 超高效液相色谱法

Determination of tranexamic acid and aminocaproic acid content in health foods by ultra performance liquid chromatography

GUO Jian-Bo, ZHU Xiao-Hong*, ZHAO Bin, SONG Li, MOU Xiao, LV Zhuo, LIU Hai-Jing

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

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of the illegal addition of tranexamic acid and aminocaproic acid in health care products by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** Samples were extracted with organic solvent, separated by HILIC column, and qualitatively and quantitatively analyzed by mass spectrometer. **Results** After the sample was separated by HILIC column, tranexamic acid and aminocaproic acid could be effectively chromatographically retained and separated, and the analyte was not affected by the sample matrix. This method had a good linearity in the concentration range of 1.0-100 ng/mL (sample content 0.05-5 $\mu\text{g/g}$). The relative standard deviation (RSD) was less than 2%, and the average recovery rate was 93.4%-100.3%. **Conclusion** This method is rapid, accurate and sensitive, which is suitable for qualitative and quantitative examination of tranexamic acid and aminocaproic acid in health foods.

KEY WORDS: health care products; tranexamic acid; aminocaproic acid; ultra performance liquid chromatography

1 引言

氨甲环酸和氨基己酸具有明确的抗纤维蛋白酶作用,

临床上常作为外伤出血凝血药和血栓溶栓药使用^[1-3], 同时, 氨甲环酸和氨基己酸对黄褐斑具有明确的治疗作用^[4], 氨甲环酸在日本已被批准临床用于黄褐斑的治疗。氨甲环

*通讯作者: 朱小红, 主任药师, 主要研究方向为食品质量安全和风险分析评估。E-mail: 742653574@qq.com

*Corresponding author: ZHU Xiao-Hong, Chief Pharmacist, Branch for Food Inspection, Shaanxi Institute for Food and Drug Control, NO. 21, 5th Keji Road, Gaoxin District, Xi'an 710065, China. E-mail: 742653574@qq.com

酸一方面能够竞争性抑制酪氨酸酶从而抑制和色素细胞中黑色素的形成; 另一方面, 其通过抑制真皮层内相关细胞因子对黑色素细胞的刺激来延缓黄褐斑的形成。氨甲环酸和氨基己酸在我国属于食品中禁止添加的物质, 但一些保健食品生产企业为增强产品的功效, 在祛黄褐斑类保健食品中非法添加氨甲环酸和氨基己酸, 这样会造成一定的消费风险, 因此有必要对祛黄褐斑类保健食品中非法添加氨甲环酸和氨基己酸进行必要的风险监测和排查。

氨甲环酸和氨基己酸通常采用液相色谱-紫外检测器进行检测^[5,6]。根据其结构和理化性质可知(图 1), 氨甲环酸和氨基己酸均具有极高的水溶性, 采用液相色谱法检测时需在流动相中加入离子对试剂以抑制过早出峰^[7,8]。同时氨甲环酸和氨基己酸均没有紫外吸收基团, 一般采用紫外末端波长 200~220 nm 进行检测, 使得检测方法检出限偏高 (>1 mg/mL), 检出能力不足。

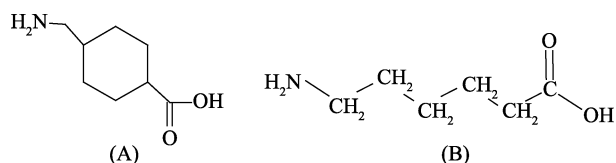


图 1 氨甲环酸(A)和氨基己酸(B)结构式

Fig.1 The chemical structure of tranexamic acid (A) and aminocaproic acid (B)

食药监食监三〔2016〕28号附件3中收录的《保健食品中非法添加氨甲环酸检验方法》用以检测保健食品中氨甲环酸的非法添加^[9]。该方法是通过液相检测, 首先比对样品色谱峰和对照品色谱峰的保留时间、紫外光谱图; 当均相同时, 进行质谱检测, 对比样品色谱峰和对照品色谱峰的母亲子、子离子质谱峰, 最后进行综合判断。但在实际操作中发现, 多数样品在保留时间处具有较多的干扰(采用紫外检测), 且存在低含量阳性样品漏检问题。

根据食药监食监三〔2016〕28号附件3, 本研究重新构建超高效液相色谱法检测保健食品中氨甲环酸非法添加的分析方法, 增加待测物氨基己酸, 同时对方法进行优化并对所建立方法的定性、定量准确性进行考察, 以期为保健食品中氨甲环酸非法添加的监管提供更准确、快速的检测方法。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

对照品: 氨甲环酸(反-4-氨基环己烷甲酸, 纯度98%, 日本东京化成工业株式会社); 氨基己酸(6-氨基己酸, 纯度100%, 美国Sigma公司); 甲酸、甲酸铵、磷酸、磷酸二氢钠(色谱纯)、乙腈、甲醇(分析纯, 美国Sigma公司)。

保健食品样本: 2018年国家保健食品抽检样品。

仪器: Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱仪, 配有二极管阵列检测器(ultra performance liquid chromatography-diode array detector, UPLC-DAD)、Agilent 1290 Infinity LC-6540 超高效液相色谱仪, 配飞行时间质谱仪(ultra performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometer, UPLC-QToF)(美国Agilent公司); ACQUITY UPLC I-CLASS-XEVO TQ 超高效液相色谱仪, 配三重四级杆质谱仪(ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometer, UPLC-DAD)(美国Waters公司); BT 25S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); Ultrasonic Generator 超声波发生器、Synergy 超纯水机(美国Millipore®公司)。

2.2 色谱条件

液相色谱-光谱检测条件^[9]: 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相: 甲醇: 水溶液(32:68, V:V); 进样量: 5 μL; 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 35 °C, DAD 检测器光谱扫描(200~400 nm), 220 nm 处监测。

液相色谱-质谱检测条件: 色谱柱: Waters BEH HILIC (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相: 按表1进行梯度洗脱。三重四级杆质谱条件: ESI 电离源, 正离子多反应离子检测, 各化合物检测离子见表2, 离子源温度 150 °C, 脱溶剂气温度 500 °C, 脱溶剂气流量 1000 L/h, 毛细管电压 2.0 kV, 锥孔电压 20 V。样品定性条件见表2。

飞行时间质谱条件: 双 ESI 电离源, 毛细管电压 4 kV, 干燥气温度 350 °C, Fragmentor 电压: 175 V, 锥孔电压 65 V, 正离子扫描检测, 扫描范围: 100~1100 Da, 扫描频率 300 ms/全扫描, 检测时以 $m/z=121.0508$ 和 922.0097 进行质量轴监测, 液相条件同表3。

表 1 UPLC-MSⁿ 检测梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution condition in UPLC-MSⁿ detection

时间/min	乙腈 (含 0.1%甲酸)/%	10 mmol/L 甲酸铵 (含 0.1%甲酸)/%
0	95	5
1.2	95	5
3.5	80	20
5	80	20
5.1	95	5

流动相平衡 3 min 后进样

2.3 实验方法

2.3.1 对照品溶液的配制

分别取氨甲环酸和氨基己酸对照品适量, 置于量瓶中, 加纯水溶解并稀释至刻度, 混匀, 制成浓度均为 1 mg/mL 的

对照品储备液(此溶液同时作为液相色谱-光谱检测对照溶液),该溶液于4℃下保存期为30d。分别精密量取对照品储备液置于量瓶中,85%乙腈溶液稀释并定容,制成浓度均为10μg/mL的对照品使用液,该溶液于4℃下保存期为30d。分别精密量取对照品使用液置于量瓶中,85%乙腈溶液稀释并定容,制成浓度分别为1.0、10、20、50、100ng/mL的对照品标准工作曲线溶液,该溶液现用现配。

表2 UPLC-MSⁿ 检测定性、定量离子对和碰撞能参考值
Table 2 Qualitative and quantitative ion pairs and collision energy reference values in UPLC-MSⁿ detection

化合物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV
氨甲环酸	158.1	95.1*	15
		67.1	30
		122.9	10
氨基己酸	132.1	69.0*	20
		78.9	15

注: *定量离子

表3 UPLC-QToF 检测条件
Table 3 Conditions on UPLC-QToF detection

化合物	检测质荷比(<i>m/z</i>)/Da
氨甲环酸	158.2214
氨基己酸	132.1815

2.3.2 样品测试溶液的制备

将粉碎并混匀的样品约1.0g置于50mL量瓶中,加入85%乙腈溶液30mL,超声提取30min,取出,放置室温,85%乙腈溶液定容并稀释至刻度,混匀,过0.22μm微孔滤膜,取滤液待测。

3 结果与分析

3.1 检测方法的建立

3.1.1 检测方法的确定

采用食药监食监三〔2016〕28号文附件3中收录的《保健食品中非法添加氨甲环酸检验方法》测定样品中的氨甲环酸,该方法首先采用液相色谱法进行检测,当供试品色谱中出现与对照品保留时间相同的色谱峰,则比较该色谱峰的紫外吸收光谱;当供试品色谱中色谱峰保留时间和紫外吸收光谱均相同时,采用高效液相色谱-质谱联用法进行样品确证。该方法的主要缺点在于:(1)采用UPLC-DAD检测时,样品干扰严重(检测波长为220nm)且方法检出限较高(4mg/g);(2)UPLC-DAD和UPLC-MSⁿ检出能力不同,若首先采用UPLC-DAD检测易造成漏检。以2018年国家保健食品一抽检样品(氨甲环酸阳性样品)为例,

对照品色谱峰保留时间为3.153min,紫外光谱扫描图见图2a,测定样品在2.8~3.5min内存在多个色谱峰合并现象,且在3.153min处无色谱峰,通过紫外光谱扫描图(图2b)不能判定该样品中含有氨甲环酸,该样品按照食药监食监三〔2016〕28号附件3检验可判为合格样品(假阴性样品)。该方法在实际操作中存在样品在保留时间处干扰较多(采用紫外检测)和低含量阳性样品漏检问题,根据方法中存在的问题,本研究建立了UPLC-MSⁿ测定保健食品中非法添加氨甲环酸和氨基己酸的方法。

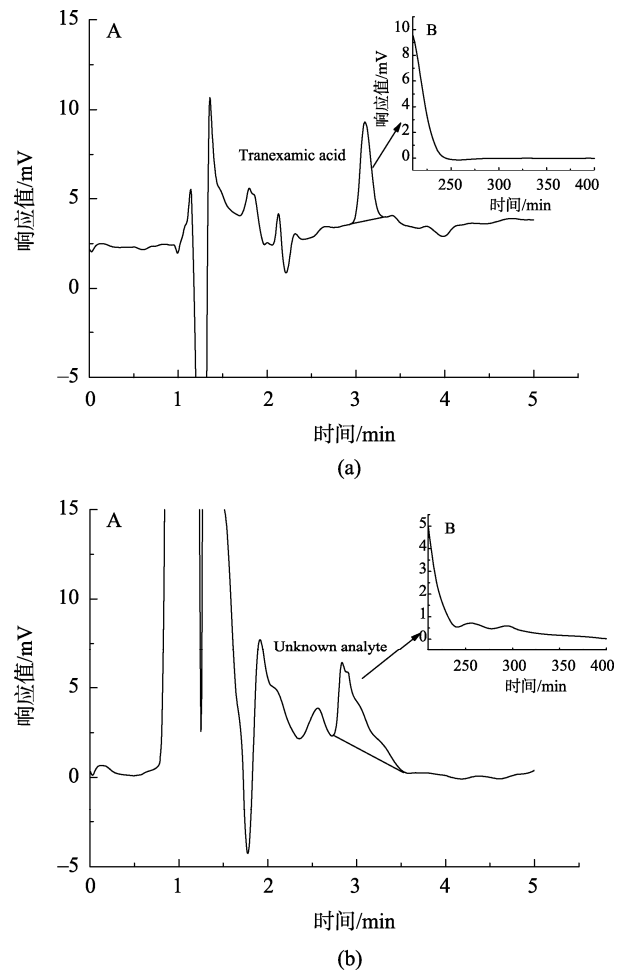


图2 氨甲环酸对照品溶液(a)和样品溶液(b)色谱图(A)、紫外扫描光谱图(B)

Fig.2 The chromatography (A) and UV scanning spectrum (B) of standard (a) and sample (b) solution of tranexamic acid

3.1.2 色谱柱的选择

氨甲环酸和氨基己酸均为水溶性化合物,在可适用于液质联用仪流动相系统中,其在十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(下简称C₁₈柱)上保留性较差(流动相为表1的流动相,有机相:水相=(5:95,V:V),基本没有色谱保留(图3),且由于保健食品样品基质复杂,当待测物在色谱柱上保留时间较短,出峰时间过早时,可能存在较强的质谱基质效应(图

4), 影响待测物的定量。根据氨甲环酸和氨基己酸的结构特征, 本研究改变色谱分离系统, 即采用正相分离系统, 对氨甲环酸和氨基己酸进行分离测定。亲水色谱柱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)是一种用来改善在反相色谱中保留较差的强极性物质保留行为的色谱技术^[10,11]。它通过采用强极性固定性, 并且结合高比例有机相-低比例水相组成的流动相来实现这一目的^[12,13]。本研究采用 HILIC 柱后, 氨甲环酸和氨基己酸的色谱峰均有所延迟(图 3), 且氨甲环酸和氨基己酸的色谱峰能够达到基本分离。

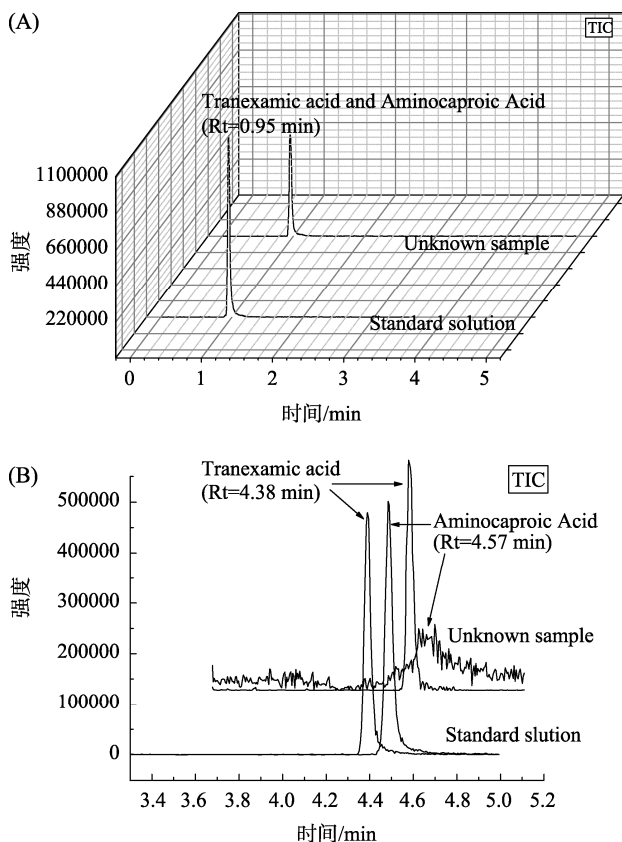


图 3 UPLC-MSⁿ测定氨甲环酸和氨基己酸色谱图(A)经 C₁₈柱分离、(V)经 HILIC 柱分离

Fig.3 The peaks obtained from chromatography's separated by (A) C₁₈ and (B) HILIC column

3.1.3 流动相的选择

氨甲环酸和氨基己酸结构中均存在氨基和羧基官能团, 采用正离子检测时需要抑制待测物中羧基官能团的电离, 结合文献报道^[6,11], 适当调整流动相比例, 并且依据 HILIC 色谱系统中流动相的使用要求^[11,13], 确定采用乙腈-(甲酸铵-甲酸)缓冲盐溶液作为测定方法中的流动相组成, 梯度洗脱待测物, 测定样品中的氨甲环酸和氨基己酸。

3.2 样品测定方法学

3.2.1 线性关系和标准曲线

考察 UPLC-MSⁿ 法测定氨甲环酸和氨基己酸的线性

行为, 结果表明, 在浓度范围为 1.0、10、20、50、100 ng/mL (样品含量 0.05~5 μg/g)时, 线性关系良好, 线性方程氨甲环酸为 $A=712203.6C.-1003.1$ 、氨基己酸为 $A=501587.9C.-302.9$ (A 为峰面积, C 为标准溶液浓度), 相关系数 r 均大于 0.999。

3.2.2 方法定性专属性实验

采用质谱检测时, 当检测质荷比小于 300 Da, 且样品未经过净化, 存在干扰物源内裂解等原因时, 以子离子比率作为样品定性依据存在 0.5%~2%的误判率^[14,15]。本研究待测物母离子质荷比均小于 300 Da, 且检测样品为保健食品直提液。因此在本研究中, 采用 UPLC-QToF 对阳性样品、不同基质的阴性样品加标后的模拟阳性样品和阴性样品进行检测, 验证所建立的检测方法的定性准确性。阳性样品 1 批(含量 3.21 μg/g)、模拟阳性样品 15 批(基质包括中药提取物、营养素补充剂类保健食品等, 待测物含量范围 0.5~10 μg/g)和阴性样品 15 批的定性结果见表 4。由结果可知, 采用 2 种检测方法进行检测, 定性结果重合率为 100%, 表明建立的方法用于保健食品中氨甲环酸和氨基己酸非法添加的检测, 基本能够准确定性。

表 4 UPLC-MSⁿ 检测法和 UPLC-QToF 检测法定性结果重合率
Table 4 The match ratio of samples detected via UPLC-MSⁿ and UPLC-QToF

	UPLC-MS ⁿ 法 检测/批	UPLC-QToF 法 检测/批	重合率 /%
阳性样品	1	1	100
模拟阳性样品	15	15	100
阴性样品	15	15	100

注: 采用 UPLC-QToF 检测时, 样品取样量为 1 g, 样品提取液为 10 mL。

3.2.3 方法的回收率实验

准备待测物标准溶液、阴性样品溶液和阴性样品加标溶液, 分别进样, 经色谱柱分离后, 记录待测物色谱峰面积, 考察方法回收率。结果如表 5, 建立的方法具有良好的回收率。

表 5 回收率实验结果($n=5$)
Table 5 The recovery results ($n=5$)

待测物	加入量 /(μg/g)	测得量/(μg/g)		回收率/%	
		C ₁₈ 柱	HILIC 柱	C ₁₈ 柱	HILIC 柱
氨甲 环酸	0.1	0.021±0.003	0.098±0.001	21.5±3.1	98.1±1.0
	1.0	0.57±0.026	0.93±0.016	57.6±2.6	93.4±1.6
	3.0	2.3±0.15	2.9±0.18	76.5±4.9	97.7±4.0
氨基 己酸	0.1	0.034±0.006	0.098±0.012	34.1±6.0	98.2±3.0
	1.0	0.69±0.018	0.99±0.013	69.3±1.8	99.1±1.3
	3.0	2.1±0.11	3.0±0.11	81.2±4.2	100.3±3.7

3.2.4 基质效应考察

取已知阴性样品,按照 2.3.2 制备样品溶液。采用柱后标准灌注法和柱前标准加入法分别考察方法基质效应。

柱后标准灌注法^[15,16]:在色谱柱后质谱仪前连接三通,一路接色谱柱,一路接柱后蠕动泵,一路接质谱仪。通过柱后蠕动泵,向质谱仪中连续灌注待测物标准溶液(浓度为 30 ng/mL),待信号平衡后分别记录待测物母离子离子的响应值(I_0)。液相进样器注入阴性样品溶液,经色谱柱后汇入三通,记录待测物母离子的响应值(I_1),样品基质效应为 I_1/I_0 ,结果见图 4。从结果可以看出,注入阴性样品后 1~2 min 内,在经 C_{18} 柱和 HILIC 柱的色谱共流出物作用下,待测物显现出明显的基质效应影响。相较于 C_{18} 柱,经 HILIC 柱的色谱共流出物对氨基环酸和氨基己酸上均显示了较小的基质效应,这与 C_{18} 柱和 HILIC 柱的色谱分离机理相关^[12,13]。

柱前标准加入法:按照“3.2.3 回收率”试验,准备样品,样品基质效应为阴性样品加标溶液峰面积/待测物标准溶液峰面积,结果见表 5。从结果可以看出,经 HILIC 柱分离后,阴性样品色谱共流出物对待测物没有基质效应。

3.2.5 精密度

取阳性样品 6 份,按实验方法测定,计算精密度,结果表明,阳性样品含量为 3.21 $\mu\text{g/g}$ (氨基环酸检出),SD 值为 0.03 $\mu\text{g/g}$,RSD 值为 0.9%。取阴性样品 6 份,加入氨基己酸对照品溶液(0.1 $\mu\text{g/g}$)按实验方法测定,计算精密度,结果表明,样品含量为 0.099 $\mu\text{g/g}$,SD 值为 0.001 $\mu\text{g/g}$,RSD 值为 1.0%。结果表明,方法精密度良好。

3.2.6 检出限和定量限

取阴性样品,加入不同浓度的对照品溶液。按照实验方法提取、测定,考察方法的检测限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$),结果表明建立的方法对氨基环酸和氨基己酸检出限为 0.03 $\mu\text{g/g}$,定量限为 0.1 $\mu\text{g/g}$ 。

4 结论

本研究结合已发布的检验方法,构建和优化保健食品中氨基环酸和氨基己酸的检测方法,并对其方法进行方法学评价。样品经 HILIC 柱分离后经 MS^n 定性、定量检测。所建立的方法能够简便、快速、准确的对保健食品中氨基环酸和氨基己酸非法添加的定性、定量检测,有利于保护人民群众的合法权益和身体健康。

参考文献

- [1] Marcelo AL, Bárbara T, Cavalheiro GOF. Systematic review and meta-analyses of tranexamic acid use for bleeding reduction in prostate surgery [J]. *J Clin Anesthes*, 2018, 48(8): 32–38.
- [2] Joshua M, Brian H, Preveshen M, *et al*. The efficacy and safety of topical tranexamic acid: A systematic review and meta-analysis [J]. *Transfus Med Rev*, 2018, 32(3): 165–178.
- [3] Liu QL, Geng PS, Shi LY, *et al*. Tranexamic acid versus aminocaproic acid for blood management after total knee and total hip arthroplasty: A systematic review and meta-analysis [J]. *Inter J Surg*, 2018, (54): 105–112.
- [4] Hwee CL, Tien GST, Chee LG. Oral tranexamic acid (TA) in the treatment of melasma: A retrospective analysis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2016, 75(2): 385–392.
- [5] Eduarda MPS, Luisa B, Paula S, *et al*. Analytical methods for quantification of tranexamic acid in biological fluids: A review [J]. *Microchem J*, 2017, (134): 333–342.
- [6] Ashfaq M, Aslam A, Mustafa G, *et al*. Derivatization/chromophore introduction of tranexamic acid and its HPLC determination in pharmaceutical formulations [J]. *J Ass Arab Univ Basic Appl Sci*, 2015, (17): 51–56.
- [7] 中华人民共和国药典 2015 年版 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

The pharmacopeia of RPC Part II 2015 Ed [M]. Beijing: China Medical

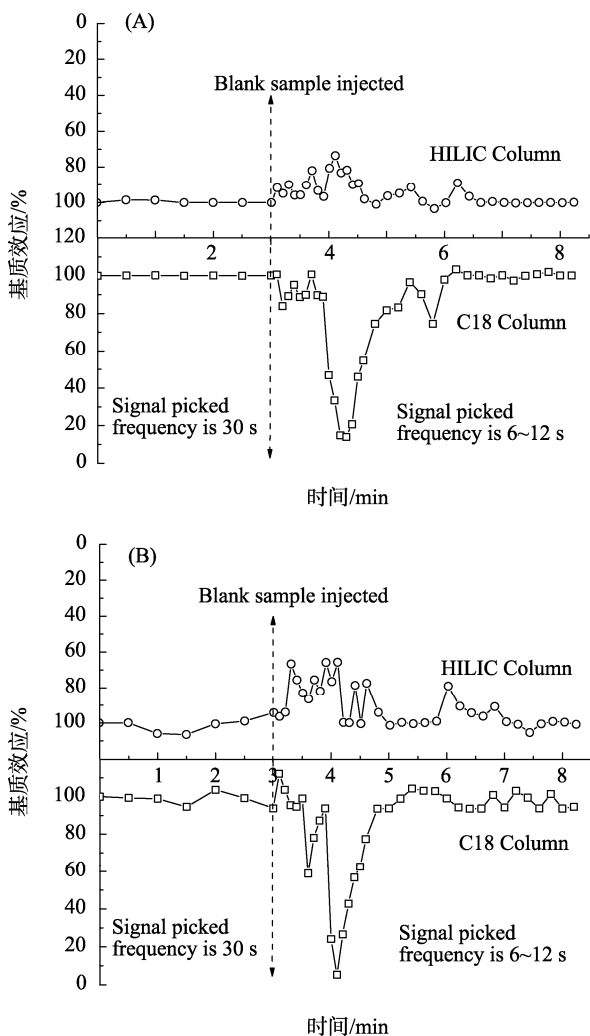


图 4 氨基环酸(1)和氨基己酸(2)基质效应考察

Fig.4 The matrix effects of tranexamic acid (A) and aminocaproic Acid (B) through C_{18} and HILIC column

- and Drug Technology Press, 2015.
- [8] 保健食品中非法添加氨甲环酸检验方法, 食药监食监三[2016] 28 号附件 3[Z].
Illegal added material determination of tranexamic acid in health care products, CFDA file NO. [2016] 28 attachment NO. 3 [Z].
- [9] Getu K, Huiying S, Ann VS, *et al.* Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87(18): 142–154.
- [10] Udani LK, Sagar SV, Naser AT, *et al.* Development of a LC-MS method for simultaneous determination of amoxicillin and metronidazole in human serum using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1089(1): 78–83.
- [11] Steven J, Evelien DS, Evelien W, *et al.* Analysis of illegal peptide drugs via HILIC-DAD-MS [J]. *Talanta*, 2017, 174(1): 562–571.
- [12] Giorgio M, Patrik A, Mariarosa M, *et al.* Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review [J]. *Food Chem*, 2018, 257(15): 53–66.
- [13] Imir GM, Michael R, Kara L, *et al.* Reproducibility assessment for a broad spectrum drug screening method from urine using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry [J]. *Clin Mass Spectrom*, 2018, (8): 1–7.
- [14] Arpana V, Oliver F. Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics [J]. *Trac Trend Anal Chem*, 2015, (69): 52–61.
- [15] Alan P, Katarzyna M, Paulina L, *et al.* Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 127(5): 232–255.
- [16] Thorsten R. Determination of molecular formulas of natural organic matter molecules by (ultra-) high-resolution mass spectrometry: Status and needs [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(18): 3687–3701.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



郭建博, 副主任药师, 主要研究方向为食品质量安全检测。

E-mail: guojianbo2004@sina.com



朱小红, 主任药师, 主要研究方向为食品质量安全和风险分析评估。

E-mail: 742653574@qq.com