

# 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健食品中 15种非法添加降糖化学药物

杨庆懿<sup>1\*</sup>, 杨柳<sup>2</sup>, 王凯<sup>1</sup>, 王芳斌<sup>1</sup>, 孙桂芳<sup>1</sup>

(1. 湖南省食品质量监督检验研究院, 长沙 410001; 2. 湖南省药品检验研究院, 长沙 410001)

**摘要:** **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时测定保健食品中 15 种非法添加降糖化学药物的方法。**方法** 样品采用乙腈超声提取, 采用 UPLC-MS/MS 进行检测, 以 Atlantis@dC<sub>15</sub> (2.1 mm×150 mm, 3 μm)为色谱柱, 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱程序为 0~3 min, 90%A; 3~15min, 90%~60%A; 15~28 min, 60%~0%A; 28~29 min, 0%A; 29~30 min, 0~90%A; 30~31 min, 90%A; 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样体积 5 μL。选择 ESI 离子源, 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 通过比较 MRM 通道中样品峰与对照品峰的分子离子峰, 二级碎片离子峰等信息确定添加的化学药。**结果** 15 种化学药物的线性范围宽, 相关性好,  $r \geq 0.995$ , 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.58%~5.12%( $n=6$ ); 加标浓度为 20、100、200 ng/mL 时, 回收率为 81.0%~120.1%, 检出限为 0.010~0.120 μg/g, 定量限在 0.034~0.39 μg/g。应用该方法对 48 批样品进行了检测, 其中有 2 批次样品中检出盐酸苯乙双胍和格列本脲。**结论** 本方法专属性强, 灵敏度高, 适用于保健食品中非法添加 15 种降糖化学药物的快速检测。

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

## Simultaneous determination of 15 kinds of illegally added hypoglycemic chemicals in health foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YANG Qing-Yi<sup>1\*</sup>, YANG Liu<sup>2</sup>, WANG Kai<sup>1</sup>, WANG Fang-Bin<sup>1</sup>, SUN Gui-Fang<sup>1</sup>

(1. Human Institute of Supervision and Institute for Food Quality, Changsha, 410001, China; 2. Hunan Institute for Drug Inspection, Changsha 410001, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for simultaneous determination of 15 kinds of illegally added hypoglycemic chemicals in health foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The sample was ultrasonically extracted with acetonitrile and detected by UPLC-MS/MS, using Atlantis@dC<sub>15</sub> (2.1 mm × 150 mm, 3 μm) as the column and 0.1% aqueous formic acid (A)-acetonitrile (B) as mobile phase. The gradient elution program was 0-3 min, 90%A; 3-15min, 90%~60%A; 15-28 min, 60%~0%A; 28-29 min, 0%A; 29-30 min, 0~90%A; 30-31 min, 90%A. The volume flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 5 μL. **Results** The linear range of 15 chemical drugs was wide and the correlation was good,  $r \geq 0.995$ , and the relative standard deviation (RSD) was 1.58%~5.12%

\*通讯作者: 杨庆懿, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 24283548@qq.com

\*Corresponding author: YANG Qing-Yi, Master, Engineer, Hunan Institute of Supervision and Institute for Food Quality, Changsha 410001, China. E-mail: 24283548@qq.com

( $n=6$ ). The recoveries at 3 spiked (20, 100, 200 ng/mL) were 81.0%-120.1%, the limits of detection were 0.010-0.120  $\mu\text{g/g}$ , and the limits of quantification were 0.034-0.39  $\mu\text{g/g}$ . The 48 batches of samples were tested by this method, and phenformin hydrochloride and glibenclamide were detected in 2 batches. **Conclusion** This method has strong specificity and high sensitivity, which is suitable for rapid detection of illegally adding 15 kinds of hypoglycemic chemicals in health foods.

**KEY WORDS:** ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; health food; hypoglycemic chemical; illegally added

## 1 引言

目前,糖尿病的发病率在不断上升并且呈现低龄化的特征。据统计,我国目前糖尿病患者人数已超过1亿,占全世界糖尿病患者总数的三分之一,成为全球糖尿病第一大国<sup>[1]</sup>。市场上宣称有调节血糖作用的保健食品种类较多,一些不良厂家为了追逐利润,在此类保健食品内添加降糖类化学药物,而这些化学药物添加在保健食品中有许多不可控的风险,会损坏人的肝肾功能,严重的可能发生猝死。已有多篇文献讨论了调节血糖类保健食品中对非法添加化学药物的测定,主要采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[2-4]</sup>、离子色谱法<sup>[5]</sup>、近红外光谱法<sup>[6]</sup>及高效液相色谱串联质谱法(high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)<sup>[7-15]</sup>。相对于其他方法,HPLC-MS/MS法具有准确性高、灵敏度高等优点。

本研究建立了UPLC-MS/MS同时测定保健食品中15种非法添加降糖化学药物的方法,以期对保健食品的监管提供更便捷、准确的方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器、试剂与材料

LC30超高效液相色谱仪(日本岛津公司);SCIEX API 5500串联质谱仪(美国AB公司);Milli-Q(默克化工技术(上海)有限公司);SB25-12D超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);XS-205电子天平(美国梅特勒公司)。

对照品:马来酸罗格列酮(批号100952-200701)、米格列醇(批号101301-201401)、格列吡嗪(批号100281-201604)、多索茶碱(批号100625-201202)、格列喹酮(批号100280-201403)、格列美脲(批号100674-201503)、瑞格列奈(批号100753-201303)、伏格列波糖(批号100826-201403)、格列波脲(批号520026-201401)、格列齐特(批号100269-201505)、盐酸二甲双胍(批号100664-201203)、格列本脲(批号100135-201105)、盐酸吡格列酮(批号100634-201703)、盐酸苯乙双胍(批号100922-201001)、阿卡波糖(批号100808-201704)(中国食品药品检定研究院)。

乙腈(美国Hollywell公司,色谱纯);甲酸(美国默克

公司,色谱纯);实验用水均为超纯水。

样品均来自市场购买、国家抽验样品、省级抽验样品及稽查打假样品。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 UPLC 色谱条件

Atlantis@dC<sub>15</sub>(2.1 mm×150 mm, 3  $\mu\text{m}$ )为色谱柱,0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~3 min, 90%A; 3~15 min, 90%~60%A; 15~28 min, 60%~0%A; 28~29 min, 0%A; 29~30 min, 0~90%A; 30~31 min, 90%A);体积流量0.3 mL/min,柱温40  $^{\circ}\text{C}$ ,进样体积5  $\mu\text{L}$ 。

#### 2.2.2 MS/MS 质谱条件

毛细管电压:3.5 kV;电喷雾正离子模式(ESI<sup>+</sup>)和负离子模式(ESI<sup>-</sup>);扫描模式:多离子反应监测(multiple reaction monitoring, MRM);雾化气(普通氮气)流量:50 L/h;脱溶剂气温度:550  $^{\circ}\text{C}$ ;辅助加热气(普通氮气)流量:60 L/h;碰撞气(氩气):1.5 mtorr。将15种化学药对照品按正离子和负离子模式制成两组混合对照品溶液,分别对流出物质的定性离子和定量离子进行质谱扫描。

#### 2.2.3 溶液的制备

##### 1) 对照品溶液

各精密称取上述15种对照品称取约20 mg,用乙腈溶解并定容至10 mL,配制标准储备溶液。取适量标准储备溶液,用乙腈稀释,配制成20  $\mu\text{g/mL}$ 混合标准溶液,并用50%乙腈逐步稀释至浓度分别为10、20、50、100、200、300 ng/mL混合标准溶液。

##### 2) 供试品溶液

胶囊剂取其内容物、片剂经研磨均匀成粉末状。精密称取样品0.5 g,置于50 mL容量瓶中,加乙腈适量,超声提取15 min,放冷至室温,用乙腈定容至刻度(若样品中含有油脂,则将样品提取液在-20  $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置24~48 h,时间可视样品是否澄清而定),5000 r/min离心5 min,取上清液,用乙腈稀释100倍,经0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,作为供试品溶液,并视情况进一步稀释。

## 3 结果与分析

### 3.1 流动相的选择

在流动相的选择中,本课题分别比较甲醇与乙腈2种

有机相,结果显示以乙腈为有机相的分离效果略优于甲醇,故采用乙腈为有机相;比较 3 种水相:水、0.1%甲酸水溶液和 5 mmol/L 乙酸铵溶液,结果显示加入 0.1%甲酸能够显著增强化合物的响应,而加入乙酸铵对于响应值无明显改善,故选择 0.1%甲酸水溶液作为水相。

### 3.2 质谱条件的优化

在乙腈-0.1%甲酸水溶液的梯度洗脱条件中,15 种化学药采用正离子模式,以 MRM 模式可以获得较好的灵敏度和稳定性。优化毛细管电压、锥孔电压、脱溶液气流速、脱溶剂温度、锥孔反吹气流速、碰撞能量等参数,选择灵敏度高、稳定性和重现性好的提取离子作为定量离子,次之的作为定性离子,结果如表 1 所示。

15 种化学药的分子离子峰、主要碎片离子峰及其质谱数据采集参数见表 1,15 种化学药的选择提取离子 MRM 谱图如图 1 所示。

### 3.3 方法学考察

#### 3.3.1 线性范围、检出限、定量限

将“2.2.3”项下系列浓度为 10、20、50、100、200、300 ng/mL 的混合标准溶液,按“2.2.1”和“2.2.2”项下的色谱条件和质谱条件进样测定,以色谱峰峰面积为纵坐标(Y),

浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,得线性回归方程和相关系数( $r$ ),结果见表 2。结果表明 15 种化学药的标准曲线相关系数  $r$  均达 0.995 以上,呈良好线性关系。取不含任何化学成分的保健食品加入混合标准溶液,经稀释后进样,以信噪比为 3 时计算各成分的检出限,信噪比为 10 时的定量限,15 种化学药物的检出限为 0.010~0.12  $\mu\text{g/g}$ ,定量限为 0.034~0.39  $\mu\text{g/g}$ ,结果见表 2,说明该方法具有较高的灵敏度,能够满足非法添加降糖类化学药的检测要求。

#### 3.3.2 重复性

取不含任何化学成分的保健食品共 6 份,分别精密加入混合标准溶液适量,使含各成分浓度约为 100 ng/mL,按“2.2.1”和“2.2.2”项下方法处理并测定,各成分含量的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.58%~5.12%( $n=6$ ),结果见表 2,显示该方法具有良好的重复性。

#### 3.3.3 加样回收率试验

以不含任何化学药的保健食品为基质,采用 3 个浓度(20、100、200 ng/mL)添加混合标准溶液,按“2.2.1”和“2.2.2”项下方法处理并测定,回收率以测出量对加入量的百分比值表示,回收率范围在 81.0%~120.1%,结果见表 2,显示该方法回收率较好。

表 1 15 种化学药物的质谱采集参数  
Table 1 MS spectra parameters for 15 drugs

出峰时间/min	成分	电离模式	母离子( $m/z$ )	碎片离子( $m/z$ )	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	
0.85	米格列醇	ES+	208	146*	190	105	26, 20
0.89	盐酸二甲双胍	ES+	130	60*	71	96	19, 32
0.89	阿卡波糖	ES+	646.2	304*	146	110	32, 41
0.90	伏格列波糖	ES+	268	92*	250	100	27, 27
1.12	盐酸苯乙双胍	ES+	206	60*	105	75	26, 40
1.19	马来酸罗格列酮	ES+	358	135*	94	105	34, 55
1.24	多索茶碱	ES+	267	87*	151	45	30, 26
1.24	盐酸吡格列酮	ES+	357	134*	119	100	36, 64
17.71	格列吡嗪	ES+	446	321*	167	80	16, 35
15.54	瑞格列奈	ES+	453	230*	86	110	40, 30
19.30	格列齐特	ES+	324	127*	110	150	25, 30
20.32	格列波脲	ES+	367	349*	170	100	15, 28
21.08	格列本脲	ES+	494	369*	169	100	16, 49
21.59	格列美脲	ES+	491	352*	126	100	17, 33
22.66	格列喹酮	ES+	528	403*	386	122	15, 33

注:带\*的为定量离子



图 1 15 种化学药对照品定量定性离子对的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of 15 reference compounds

表 2 15 个化学药线性范围、相关系数、检出限、定量限、回收率、重复性、精度度

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients, LODs and LOQs, recovery, repetition and precision of 15 drugs

成分	检出限 ( $\mu\text{g/g}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/g}$ )	回归方程	$r$	线性范围 ( $\text{ng/mL}$ )	回收率/%	RSD/%
米格列醇	0.0316	0.1055	$Y=5095.30405X+3.91192e^5$	0.9975	10.38~311.3	81.4~119.9	4.62
盐酸二甲双胍	0.0165	0.0558	$Y=6063.81385X+1.67150e^6$	0.9996	10.66~319.8	84.4~116.3	4.07
阿卡波糖	0.0764	0.2548	$Y=2653.51170X+7.92438e^4$	0.9973	9.89~296.7	93.5~119.3	3.58
伏格列波糖	0.0329	0.1096	$Y=2811.01967X+1.39031e^5$	0.9968	9.675~290.3	81.7~115.8	3.8
盐酸苯乙双胍	0.0163	0.0543	$Y=9.71683e^4X+4.02578e^6$	0.9995	10.20~306.0	97.4~115.1	2.89
马来酸罗格列酮	0.0081	0.0271	$Y=5.03963e^4X+5.71061e^6$	0.997	9.610~288.3	98.9~119.0	4.76
盐酸吡格列酮	0.0383	0.1277	$Y=11230.70089X+1.68111e^5$	0.9978	10.38~311.3	81.0~115.3	1.67
格列吡嗪	0.0138	0.0461	$Y=25009.60893X-1.00276e^5$	0.9973	10.30~309.2	86.8~105.9	5.61
瑞格列奈	0.0101	0.0337	$Y=1.29997e^5X+4.20760e^6$	0.9959	11.09~332.7	101.4~120.1	4.24
多索茶碱	0.0299	0.0999	$Y=6.71715e^4X+1.96398e^6$	0.9962	9.65~289.5	106.7~117.1	4.19
格列齐特	0.0079	0.0264	$Y=6.54286e^5X+3.25987e^7$	0.9985	10.26~307.8	87.7~120.0	1.87
格列波脲	0.1171	0.3903	$Y=28038.23436X+1.31522e^5$	0.9961	9.680~290.4	93.5~115.2	5.1
格列本脲	0.0147	0.0493	$Y=20934.43753X+1.30850e^5$	0.9974	10.30~308.9	85.0~100.6	4.46
格列美脲	0.0717	0.2392	$Y=5506.09706X+14794.00346$	0.9982	10.10~302.9	84.7~111.1	3.87
格列喹酮	0.0152	0.0507	$Y=5.42257e^4X+1.28639e^5$	0.9983	11.98~359.3	82.8~100.6	4.67

### 3.4 样品测定

利用建立的 UPLC-MS/MS 法对我院 2018 年度的国抽、省抽、稽查打假的样品以及从市场购买样品共 48 批次进行检测,有 2 批样品同时检出盐酸苯乙双胍和格列本脲,苯乙双胍的含量为 1.5、3.6 mg/g; 格列本脲的含量为 8.2、13.8 mg/g。

## 4 结论

本方法对样品进行一次提取和进样即可获得相应的质谱信息,根据色谱保留时间、母离子和子离子信息,即可判断样品中是否添加了 15 种化学药成分。该方法操作简便、适用范围广、灵敏度高,可用于加强对保健食品中非法添加化学药的监督检测。

### 参考文献

- [1] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. *Diabet Car*, 2013, (36): 67-74.
- [2] 李荣, 卫星华, 董靖. HPLC-DAD 法测定中成药及保健食品中非法添加 16 种降糖类化学药物的研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(5): 1022-1025.  
Li R, Wei XH, Dong J. Determination of 16 antidiabetic agents illegally added in traditional chinese medicines and health food by HPLC-DAD [J]. *Liaoning J TCM*, 2018, 45(5): 1022-1025.
- [3] 励炯, 曹青文, 王姣斐, 等. 基于空心核颗粒色谱技术结合 HPLC 法快速测定保健食品中非法添加 13 种降糖化学成分[J]. *中草药*, 2017, 48(13): 2666-2669.  
Li J, Cao QW, Wang JF, *et al.* Detection of 13 anti-diabetic drugs illegally added in health food by HPLC with solid nuclear particle chromatographic column [J]. *Trad Herb Drug*, 2017, 48(13): 2666-2669.
- [4] 尚士博, 安康, 何漾, 等. 高效液相色谱法同时测定泡茶中的 4 种非法添加化学药物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(16): 4296-4300.  
Shang SB, An K, He Y, *et al.* Simultaneous determination of 4 kinds of illegal added of chemical drugs in teabags by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(16): 4296-4300.
- [5] 朱俐, 冯雪, 尹利辉. 离子迁移谱法快速筛查保健食品中非法添加降糖类药品[J]. *分析科学学报*, 2018, 34(2): 165-169.  
Zhu L, Feng X, Yin LH. Rapid screening of illegally added hypoglycemic drugs in health foods by ion migration spectrometry [J]. *J Anal Sci*, 2018, 34(2): 165-169.
- [6] Fernandes RS, Costa FSL, Valderrama P, *et al.* Non-destructive detection of adulterated tablets of glibenclamide using NIR and solid-phase fluorescence spectroscopy and chemometric methods [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, (66): 85-90.
- [7] 马双成, 魏锋. 保健食品安全性检测[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.  
Ma SC, Wei F. Safety inspection of health food [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011.
- [8] 殷帅, 吴公平, 雷玉萍. 液质联用法检测中成药和保健食品中添加辅助降血糖类药品的研究[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(12): 2400-2403.  
Yin S, Wu GP, Lei YP. HPLC-MS/MS determination of auxiliary hypoglycemic agents in traditional Chinese medicine and healthy foods [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(12): 2400-2403.
- [9] 吴杨, 张圆, 闵春艳, 等. 辅助降血糖类保健食品非法添加化学物质检测方法研究[J]. *中国执业药师*, 2014, 11(10): 11-14.  
Wu Y, Zhang Y, Min CY, *et al.* Study on the detection method for illegally added chemicals in auxiliary hypoglycemic health food [J]. *China Licens Pharm*, 2014, 11(10): 11-14.
- [10] 张喆, 高青, 余倩, 等. 中药制剂及保健品中违禁添加 9 种化学降糖药的 HPLC-MS/MS 定性检测[J]. *中国医药工业杂志*, 2007, 38(1): 39-43.  
Zhang Z, Gao Q, Yu Q, *et al.* Detection of 9 anti-diabetic agens in traditional chinese medicines and health care products by HPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm*, 2007, 38(1): 39-43.
- [11] 隋海山, 王立娟, 戚威. HPLC-MS/MS 法检测中成药和食品中违法添加的 10 种降糖类药物[J]. *中国医药指南*, 2016, 22(1): 36-37.  
Sui HS, Wang LJ, Qi W. Detection of anti-diabetic agents in chinese patent medicines and food by HPLC-MS/MS [J]. *Guid China Med*, 2016, 22(1): 36-37.
- [12] 罗疆南, 曹玲, 谭力, 等. HPLC-MS/MS 检测中药及保健品中添加了 11 种降糖类化学药物[J]. *中国药学杂志*, 2010, 45(11): 68-70.  
Lu JN, Cao L, Tan L, *et al.* Determination of 11 anti-diabetics mixed illegally into traditional Chinese medicines and health care products by HPLC-MS/MS [J]. *Chin Pharm J*, 2010, 45(11): 68-70.
- [13] 黄湘鹭, 王静文, 曹进, 等. 降血糖类保健食品中非法添加的 8 种药物检测及实例分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(10): 149-152.  
Huang XL, Wang JW, Cao J, *et al.* Determination of 8 drugs in antidiabetic supplements: A case study [J]. *Food Sci*, 2014, 35(10): 149-152.
- [14] 魏清芳, 王嘉林. 液相色谱-串联四极杆质谱测定中药及保健品中非法添加 8 种化学降糖药[J]. *中国药事*, 2011, 25(1): 70-72.  
Wei QF, Wang JL. Detection of 8 kinds of antidiabetics illegally added in traditional chinese medicinal preparations and health foods by the liquid chromatography tandem with quadrupole mass spectrometry method [J]. *Chin Pharm Aff*, 2011, 25(1): 70-72.
- [15] 朱峰, 阮丽萍, 马永建, 等. 超高效液相色谱-串联质谱联用法同时检测降糖类和减肥类保健品中 20 种非法添加的化学降糖药物[J]. *色谱*, 2014, 32(1): 13-20.  
Zhu F, Ruan LP, Ma YJ, *et al.* Simultaneous detecmination of 20 illeyally added anti-diabetic chemical components in hypoglycemic and weight-reducing health foods by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(1): 13-20.

(责任编辑: 陈雨薇)

### 作者简介



杨庆懿, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: 24283548@qq.com