

超高效液相色谱-高分辨质谱法检测保健食品中 14 种降血糖类药物

严 华, 张朝晖*, 崔凤云, 刘阳晴雪, 齐鹤鸣, 别 玮, 梁娜娜, 韩 深

(北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 100026)

摘 要: 目的 建立超高效液相色谱-高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry)检测不同剂型保健食品中 14 种降血糖类药物的分析方法。**方法** 样品经甲醇-水(8:2, V:V)提取液提取, C₁₈ 吸附剂净化。经 ZORBAX SB Aq C₁₈(100 mm×2.1 mm, 3.0 μm)色谱柱分离, 以 0.1%甲酸(A)和 0.1%甲酸-乙腈(B)作为流动相, 梯度洗脱。采用电喷雾电离, 正离子检测, 全扫描-数据依赖二级扫描模式(Full-MS/dd-MS²)进行筛查, 全扫描模式(Full-MS)进行定量。**结果** 14 种降血糖类药物在一定浓度范围内具有良好的线性关系, 相关系数(r^2)大于 0.99。14 种降血糖类药物在 0.5、1.0 和 5.0 mg/kg 添加水平的回收率为 69.6%~109.4%, 相对标准偏差小于 10% ($n=6$), 方法定量限为 1.0 mg/kg。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合测定不同剂型保健食品中 14 种降血糖类药物。

关键词: 降血糖类药物; 超高效液相色谱-高分辨质谱法; 保健食品

Determination of 14 antidiabetic drugs in health foods by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry

YAN Hua, ZHANG Zhao-Hui*, CUI Feng-Yun, LIU Yang-Qing-Xue, QI He-Ming, BIE Wei, LIANG Na-Na, HAN Shen

(Inspection and Quarantine Technique Center, Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of 14 antidiabetic drugs in health foods by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted with methanol-H₂O (8:2, V:V), and cleaned by C₁₈ sorbent. The chromatographic separations were performed on an Agilent SB Aq C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 3.0 μm) with 0.1% formic acid solution and acetonitrile as mobile phase by gradient elution. The MS analysis was operated under the positive electrospray ionization mode. Data obtained under the Full Ms/dd-MS² scan mode or Full MS mode was used for confirmation or quantitation, respectively. **Results** The 14 kinds of antidiabetic drugs had a good linear relationship within a certain concentration range, and the correlation coefficient (r^2) was greater than 0.99. The recoveries of 14 antidiabetic drugs at the supplemental levels of 0.5, 1.0 and 5.0 mg/kg were 69.6%~109.4%, the relative standard deviations were less than 10% ($n=6$), and the limit of

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2017IK144)

Fund: Supported by Science and Technology Planning Project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2017IK144)

*通讯作者: 张朝晖, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhangzhaohuibiqtc@163.com

*Corresponding author: ZHANG Zhao-Hui, Senior Engineer, Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No. 6, Tianshuiyuan Street, Chaoyang District, Beijing 100026, China. E-mail: zhangzhaohuibiqtc@163.com

quantification of the method was 1.0 mg/kg. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for detecting antidiabetic drugs in different dosage forms of health foods.

KEY WORDS: antidiabetic drugs; ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry; health food

1 引言

近年来,随着人们生活水平的提高,中国成人糖尿病患病率呈井喷式增长^[1]。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。由于糖尿病具有终身不可治愈的特点,病人需要长期服用药物对血糖进行控制。长期服用降血糖药物的不良反应和副反应较多,因此人们更青睐食疗法,对降血糖类保健品的需求越来越大。目前市场上降血糖保健品种类繁多,主要以降糖茶、降糖胶囊、降糖奶粉、降糖麦片等品种为代表。但是一些违法商家被利益驱使,违法添加具有降糖功能的化学药物的行为时有发生。

降血糖类药物主要包括磺脲类、双胍类、苯磺酸促泌剂类、胰岛素增敏剂、 α -糖苷酶抑制剂类等,用于该类药物治疗的方法主要有薄层色谱法^[1,2]、近红外光谱法^[3,4]、高效液相色谱法^[5,6]、高效液相色谱-串联质谱法^[7-9]、高效液相色谱-高分辨质谱联用法^[10-12]等。现行有效的行业标准 SN/T 3864-2014《出口保健食品中二甲双胍、苯乙双胍的测定》^[13]和 SN/T 3146-2012《出口食品中苯乙双胍、格列苯脲、格列齐特、格列吡嗪、格列美脲检测方法液相色谱-质谱/质谱法》^[14]均不能满足多种类型的降血糖药物的检测。SN/T 3864-2014 规定了二甲双胍、苯乙双胍两种降血糖药物的检测方法,方法采用液相色谱测定,外标法定量,阳性样品需经液相色谱-质谱/质谱法确证。SN/T 3146-2012 仅规定了苯乙双胍、格列苯脲、格列齐特、格列吡嗪、格列美脲 5 种降血糖药的检测方法。在降血糖药的检测标准方面,还缺乏能覆盖多种降血糖类药物的检测方法,因此,亟需发展保健食品中多种降血糖类药物的快速、准确、高通量的筛查方法,以弥补相应检测方法空白,保障公众身体健康。

本研究以降糖粉剂、降糖胶囊、降糖茶等不同剂型的降血糖保健食品为研究对象,采用超高效液相色谱-高分辨质谱检测技术,针对多种降血糖类药物进行筛查检测技术研究,并对进出口和市售保健食品进行监测,以期为保障进出口保健食品质量和消费者身体健康提供可靠的技术支持。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

UltiMate3000 超高相液相色谱仪,配备在线脱气机、四元梯度泵、柱温箱、自动进样器(美国 Thermo Scientific 公司);四级杆-静电场轨道阱超高分辨质谱仪

(Q-Exactive mass spectrometer)(美国 Thermo Scientific 公司),配备电喷雾离子源(ESI 源);Sigma 3K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);Milli-Q 纯水器(美国 Millipore 公司);IKA MS3 涡旋混匀器(德国 IKA 公司)。

14 种降血糖类药物对照品:瑞格列奈、那格列奈、米格列奈、格列吡嗪、格列苯脲、格列美脲、格列喹酮、二甲双胍、甲苯磺丁脲、格列波脲、吡格列酮、吡咯齐特、苯乙双胍、罗格列酮标准品(纯度>98%,加拿大 TRC 公司)。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,美国 Fisher Chemical 公司);C₁₈ 吸附剂(C₁₈, 40~60 μ m)、乙二胺-N-丙基吸附剂(ethylenediamine-N-propyl adsorbent, PSA, 40~60 μ m)、石墨化炭黑吸附剂(graphitized carbon black adsorbent, GCB, 120~140 目)、佛罗里硅土吸附剂(Florisil, 60~100 目)以及中性氧化铝(Alu-N, 150 目)(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。试验用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

降血糖类药物标准溶液配制:分别准确称取 10 mg 左右的 14 种降血糖类药物对照品到 10 mL 的容量瓶中,用甲醇配成标准贮备液,-20 $^{\circ}$ C 保存。量取适量 14 种降血糖类药物贮备液,置棕色容量瓶中,用甲醇稀释成浓度为 10 mg/L 混合工作液。

甲醇-水提取液(8:2, V:V):取超纯水 20 mL,加入甲醇 80 mL 混匀。

2.2.2 样品前处理

称取 0.50 g(精确到 0.01g)样品,置于 50 mL 离心管中,加入 50 mL 甲醇-水(8:2, V:V),涡旋 1 min,超声 10 min,8000 r/min 离心 10 min。称取 100 mg C₁₈ 吸附剂于 10 mL 试管中,取 2 mL 上清液至该试管,涡旋 1 min,1500 r/min 离心,取上清液过 0.22 μ m 滤膜,待测。

2.2.3 液相色谱-高分辨质谱条件

1) 液相色谱条件

色谱柱:Agilent SB AQ 柱(2.1 mm \times 100 mm, 3.0 μ m);流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为乙腈。梯度洗脱:0~6 min,95%~10% A;6.0~9.0 min,保持 10% A;9.0~9.1 min,10%~95% A;9.1~12.0 min,保持 95% A。流速:300 μ L/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2) 质谱条件

Q-Exactive 质谱系统,配有 HESI 源,采用正离子模式,喷雾电压为 3.2 kV,毛细管温度和辅助气温度分别为 325 $^{\circ}$ C 和 350 $^{\circ}$ C,鞘气流速和辅助气流速分别为 40 L/min

和 10 L/min, S-lens RF 值为 60。喷雾气和碰撞气均为氮气。数据采集前使用校正溶液(含咖啡因、四肽 MRFA 和 Ultramark1621 的混合溶液)对质量轴进行校正。扫描方式分别采用正离子 Full MS/dd-MS² 模式以及 Full MS 模式进行定性筛查和定量分析。Full MS/dd-MS² 模式包含 1 次一级全扫描(分辨率 70000 FWHM)和 1 次数据依赖的二级扫描(分辨率 17500 FWHM)。一级全扫描范围为 m/z 50~1000, 自动增益控制(automatic gain control, AGC) 和离子注入时间(ion implantation time, IT) 分别设为 $1.0e^6$ 和 100 ms; dd-MS² 二级质谱扫描 AGC 为 $2.0e^5$, 最大 IT 为 60 ms, isolation window 设置为 $2.0m/z$ 。Full MS 模式下设置参数为分辨率 70000 FWHM, 扫描范围 m/z 50~1000, AGC 为 $3e^6$, 最大 IT 为 200 ms。

2.2.4 基质工作曲线

将混合工作液用甲醇稀释到 100 ng/mL, 再依次稀释成 50、25、10、5、2.5、1.0 ng/mL, 得到混合标准溶液; 在空白降糖粉剂、降糖茶剂、降糖胶囊样品中加入 1.00 mL 浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 ng/mL 的标准溶液, 加入 49 mL 甲醇-水(8:2, V:V), 其余步骤按“2.2.2”进行处理, 得到基质工作曲线。UHPLC-Q-Exactive MS 进样测定, 以各组分的峰面积对其质量浓度绘制曲线, 获得各种化合物的基质工作曲线、线性相关系数。

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化

将 14 种降血糖类药物的混合标准溶液注入液相色谱-质谱体系中, 考察 14 种降血糖类药物在正负离子模式两种不同扫描模式下的响应情况。结果表明, 在正离子扫描模式下 14 种降血糖药物均可获得良好的色谱峰形和较高

的响应值, 而在负离子模式下化合物的响应值明显低于正离子模式, 因此选择在正离子模式下进行扫描分析。

利用 Full MS/dd-MS² 模式可对样品中的未知化合物进行筛查, Full MS/dd-MS² 模式包含 1 次一级 Full-ms 全扫描和 1 次 dd-ms² 数据依赖的二级扫描。Full-ms 和 dd-ms² 扫描分别采用 70000FWHM 和 17500FWHM 的分辨率, Full-ms 在四极杆中选择目标母离子作为前体离子, dd-MS² 对目标母离子的碎片进行扫描。为了选择 full-ms 扫描的质量分辨率, 需要在选择性和灵敏度之间做出折衷。质量分辨率的提高带来了更高的质量精度和更好的选择性, 但由于扫描速度的降低, 高分辨率(如 140000 FWHM)将显著影响灵敏度。对于大多数分析物, 70000 FWHM 的分辨率是最佳的。对于 dd-ms² 扫描, 采用 17500 FWHM 的分辨率以节省扫描时间并确保 full-ms 具有足够扫描点。

由于 Full MS/dd-MS² 模式会损失一部分母离子, 因此在定量分析的时候选择 Full MS 模式, 以目标化合物的母离子进行准确定量, 同时根据母离子的精确质量数和保留时间对目标化合物进行定性。在 Full-ms 模式下, 设置分辨率为 70000 FWHM。

在 Full MS/dd-MS² 模式下对 14 种降糖药混合标准溶液进行 HPLC-Q-Exactive 数据采集, 根据 $[M+H]^+$ 理论计算值对采集到的质谱原始数据进行母离子提取, 根据母离子提取谱图获取母离子的实测值以及保留时间, 再在母离子提取谱图上获取子离子信息。将采集到的母离子、子离子、保留时间等信息输入到 antidiabetic drug database 数据库中, 形成 antidiabetic drug database。14 种降糖药的名称、分子式及质谱信息见表 1。从表 1 可见, 14 种降糖药的质量偏差为 $0.69 \times 10^{-6} \sim 3.61 \times 10^{-6}$ 。

表 1 14 种降糖药名称、分子式及质谱信息
Table 1 Name, formular and mass spectrometry informations of 14 antidiabetic drugs

编号	化合物名称	分子式	$[M+H]^+$ 理论计算值	$[M+H]^+$ 实测值	质量偏差($\times 10^{-6}$)	子离子
1	格列苯脲	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$	494.15110	494.15240	2.63	169.00500
2	格列波脲	$C_{18}H_{26}N_2O_4S$	367.16860	367.16940	2.18	170.15390
3	格列齐特	$C_{15}H_{21}N_3O_3S$	324.13764	324.13864	3.08	110.09670
4	格列美脲	$C_{24}H_{34}N_4O_5S$	491.23227	491.23360	2.7	352.13240
5	格列吡嗪	$C_{21}H_{27}N_5O_4S$	446.18570	446.18730	3.59	321.10110
6	格列喹酮	$C_{27}H_{33}N_3O_6S$	528.21628	528.21810	3.44	403.13280
7	二甲双胍	$C_4H_{11}N_5$	130.10872	130.10919	3.61	71.06116
8	米格列奈	$C_{19}H_{25}NO_3$	316.19072	316.19156	265	298.17993
9	那格列奈	$C_{19}H_{27}NO_3$	318.20637	318.20615	0.69	166.08624
10	苯乙双胍	$C_{10}H_{15}N_5$	206.14002	206.14056	2.62	105.07025
11	吡格列酮	$C_{19}H_{20}N_2O_3S$	357.12674	357.12747	2.04	134.09640
12	瑞格列奈	$C_{27}H_{36}N_2O_4$	453.27478	453.27573	2.1	230.19020
13	罗格列酮	$C_{18}H_{19}N_3O_3S$	358.12199	358.12258	1.64	135.09180
14	甲苯磺丁脲	$C_{12}H_{18}N_2O_3S$	271.11109	271.11133	0.88	155.01610

3.2 液相色谱条件的优化

首先考察了色谱流动相的影响, 由于本研究所含的分析物均含有碱性基团, 因此水中添加 0.1% 甲酸来增强质子化和灵敏度。对有机流动溶剂甲醇和乙腈进行比较, 结果表明在 2 种流动相体系下目标分析物在 10 min 内均可得到有效分离, 0.1% 甲酸水-乙腈体系的洗脱能力更好, 各化合物保留时间比 0.1% 甲酸水-甲醇体系的保留时间短, 且大部分化合物可达到基线分离。因此, 选择 0.1% 甲酸水-乙腈作为二元流动溶剂体系。

其次考察了不同色谱柱对分离效果的影响。比较了 Thermo Fisher Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)和 Agilent SB AQ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.0 μm)2 种色谱柱的分离效果。结果表明, 二甲双胍由于极性较强, 在 Hypersil Gold C₁₈ 柱上基本没有保留, 保留时间仅为 0.86 min(图 1b), 而在 SB AQ 柱上, 二甲双胍的保留时间为 1.46 min(图 1a)。14 个化合物中, 格列吡嗪和米格列奈在 SB AQ 柱上保留时间分别为 7.09 min 和 7.15 min, 未达到基线分离, 其余各化合物可基本达到基线分离。在 Hypersil Gold C₁₈ 柱上有 3 组化合物未实现基线分离, 分别是瑞格列奈和格列吡嗪(保留时间分别为 5.52 min 和 5.61 min), 米格列奈和格列齐特(保留时间分别为 6.24 min 和 6.19 min)、那格列奈和格列美脲(保留时间分别为 6.76 min 和 6.73 min)。综合比较, 选择 Agilent SB AQ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.0 μm)作为分离柱。

3.3 前处理条件优化

3.3.1 提取条件优化

在 0.5 g 降糖奶粉、降糖茶、苦瓜洋参胶囊中添加 2 mg/kg 的降糖药物, 分别以 50 mL 甲醇、80% 甲醇-水、50% 甲醇-水、乙腈、80% 乙腈-水、50% 乙腈-水进行提取, 以加标回收率考察方法优劣, 结果见表 2。结果发现, 提取溶剂对降糖药的回收率影响较大, 6 种提取试剂比较, 降糖奶粉和降糖茶以 80% 甲醇-水作为提取试剂时回收率最佳, 分别为 73.8% 和 78.4%。由于苦瓜洋参胶囊内容物为糊状物, 其组成主要包括大豆油、甘油、明胶、蜂蜡等成分, 采用纯乙腈和纯甲醇提取时, 样品溶解性较差, 采用 50% 的甲醇-水做提取试剂时, 样品溶解性较好, 但离心后溶液仍呈乳浊状。比较加标回收率发现 6 种提取试剂对苦瓜洋参胶囊的平均回收率均>80%。从提取试剂的通用性考虑, 以 80% 甲醇-水作为提取试剂最佳。

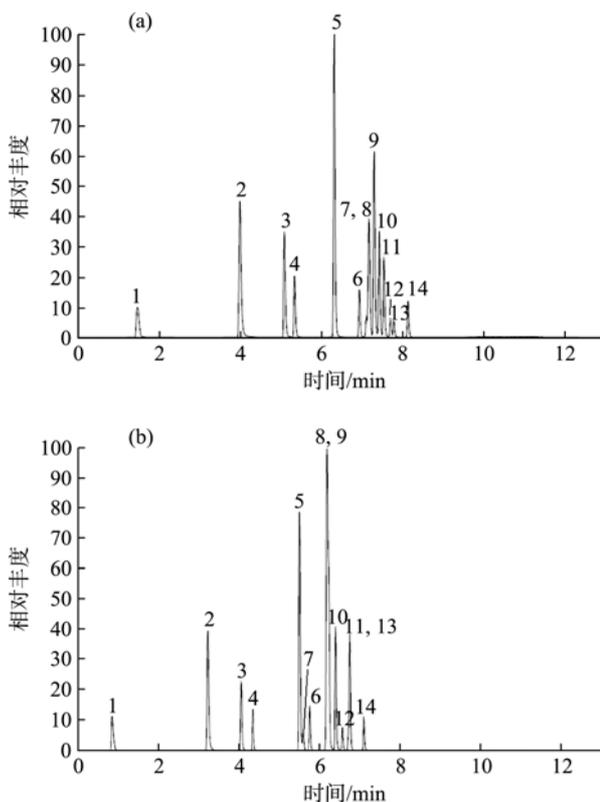
3.3.2 净化条件优化

QuEChERS 方法采用分散固相萃取的方式进行净化, 常用的吸附剂包括 C₁₈、PSA、GCB、Florisil 以及 Alumina-N。吸附剂在吸附杂质的同时, 也可能吸附目标化合物, 因此会影响目标化合物的回收率, 因此在选择吸附剂时, 应尽量选择对目标化合物影响小的吸附剂。

表 2 不同提取试剂对添加回收率的影响

Table 2 Influence of different extraction solutions on the recoveries

提取试剂	降糖奶粉/%	降糖茶/%	苦瓜洋参胶囊/%
甲醇	55.1	73.6	82.2
80% 甲醇-水	73.8	78.4	80.4
50% 甲醇-水	47.2	70.0	89.6
乙腈	70.2	77.8	86.6
80% 乙腈-水	62.0	69.5	88.8
50% 乙腈-水	54.3	74.9	80.6



注: (a) Thermo Fisher Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); (b) Agilent SB AQ C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.0 μm) 1-14 代表的化合物分别为: 1. 二甲双胍; 2. 苯乙双胍; 3. 罗格列酮; 4. 吡格列酮; 5. 瑞格列奈; 6. 甲苯磺丁脲; 7. 格列吡嗪; 8. 米格列奈; 9. 格列齐特; 10. 格列波脲; 11. 那格列奈; 12. 格列苯脲; 13. 格列美脲; 14. 格列喹酮。

图 1 不同色谱柱对 14 种降血糖类药物分离效果的影响

Fig.1 Influence of different columns on the separation performance of 14 antidiabetic drugs

在 0.5 g 降糖奶粉、降糖茶、苦瓜洋参胶囊中添加 2 mg/kg 的降糖药物, 经 80% 甲醇-水提取后, 取 2 mL 上清液, 分别以 100 mg C₁₈、PSA、Aluminum、GCB、Florisil 进行净化后, 过 0.22 μm 滤膜, 上机检测, 比较不同吸附剂吸附后的回收率, 以相同添加量不经吸附剂净化为对照组, 结果见表 3。

对实验结果进行分析发现,采用C₁₈和Florisil净化后的平均回收率与对照组接近,但采用Florisil净化后二甲双胍和苯乙双胍的回收率明显低于对照组。采用Alumina-N、PSA和GCB净化后的平均回收率低于对照组,说明这3种吸附剂对目标化合物有一定的吸附能力。综合比较,采用C₁₈吸附剂进行净化效果较好。

表3 不同吸附剂对添加回收率的影响

Table 3 Influence of different adsorbents on the recoveries

吸附剂	降糖奶粉/%	降糖茶/%	苦瓜洋参胶囊/%
C ₁₈	111.1	74.4	86.6
PSA	79.7	45.8	48.6
GCB	42.7	29.7	35.4
Florisil	112.4	72.6	84.0
Alumina-N	109.7	61.4	68.1
对照组	111.0	71.8	86.5

3.4 方法的线性范围及检出限

取14种降糖药物的标准储备液适量,用0.1%FA-乙腈(1:9, V:V)稀释成不同浓度的混合标准品溶液,采用Full-MS模式进行数据采集分析,母离子定量,记录不同浓度下各标准品浓度所对应的峰面积,并分别测定各非法添加物的检出限(S/N=3),结果见表4。结果表明,14种降糖药物在1~250 ng/mL的浓度范围内线性关系良好,相关系

数(r^2)均大于0.99。

以能达到信噪比S/N=3时样品的最低浓度为检出限(limit of detection, LOD),以能达到S/N=10时样品的最低浓度为定量限(limit of quantity, LOQ)。用基质提取液添加低浓度水平的标准溶液,获得每种化合物对应信噪比等于3(S/N=3)时的含量,以此为该化合物的检出限。14种降血糖化合物的检出限为0.3 mg/kg,定量限为1.0 mg/kg。

3.5 回收率及精密度实验

在空白降糖奶粉、降糖茶、降糖胶囊基质中分别添加0.5、1.0和5.0 mg/kg的降糖类药物,以基质加标曲线定量,测定14种降糖类药物的加标回收率,结果如表5所示。由表5可知:降糖奶粉加标浓度为0.5 mg/kg时,回收率在75.2%~89.2%之间,RSD在3.35%~12.9%之间;加标浓度为1.0 mg/kg时,回收率在82.6%~103.7%之间,RSD在3.1%~7.59%之间;加标浓度为5.0 mg/kg时,回收率在85.8%~97.6%之间,RSD在2.76%~4.78%之间。降糖茶加标浓度为0.5 mg/kg时,回收率在69.2%~92.0%之间,RSD在4.35%~12.4%之间;加标浓度为1.0 mg/kg时,回收率在73.7%~93.4%之间,RSD在4.42%~8.8%之间;加标浓度为5.0 mg/kg时,回收率在85.7%~99.7%之间,RSD在2.56%~6.97%之间。降糖胶囊加标浓度为0.5 mg/kg时,回收率在69.6%~89.1%之间,RSD在6.56%~9.64%之间;加标浓度为1.0 mg/kg时,回收率在74.6%~101.8%之间,RSD在3.63%~9.14%之间;加标浓度为5.0 mg/kg时,回收率在94.8%~109.4%之间,RSD在3.56%~7.74%之间。

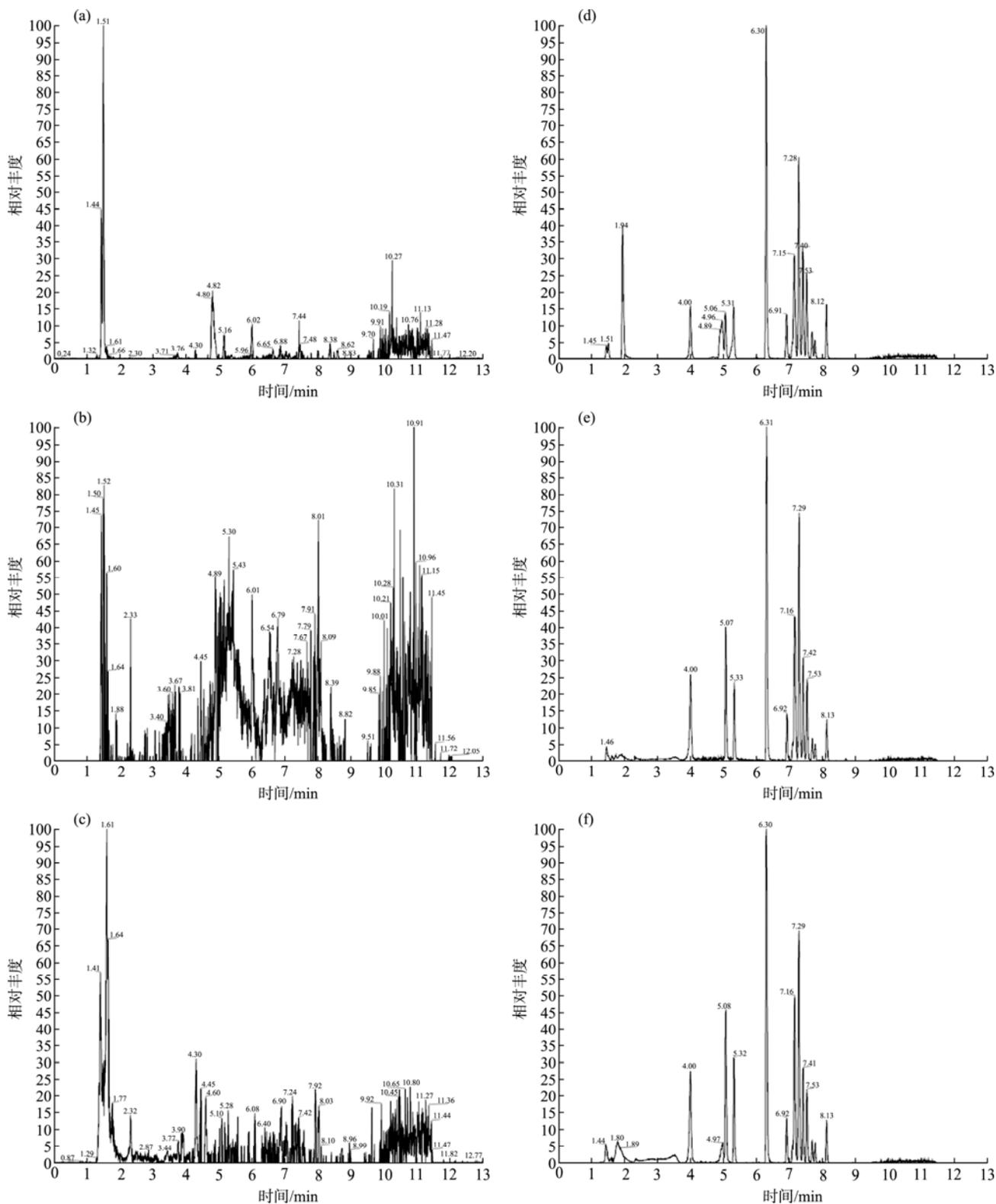
表4 14种降糖药物的线性方程、线性范围和相关系数

Table 4 Regression equations, linear ranges and correlation coefficients of 14 antidiabetic drugs

编号	化合物名称	线性方程	线性范围/(ng/mL)	相关系数
1	格列苯脲	$Y=1.28 \times 10^6 X - 2.86 \times 10^6$	1~250	0.9990
2	格列波脲	$Y=5.23 \times 10^6 X - 3.43 \times 10^6$	1~250	0.9997
3	格列齐特	$Y=1.05 \times 10^7 X + 7.12 \times 10^6$	1~250	0.9991
4	格列美脲	$Y=8.86 \times 10^5 X - 2.82 \times 10^6$	1~250	0.9976
5	格列吡嗪	$Y=1.05 \times 10^6 X - 2.27 \times 10^6$	1~250	0.9992
6	格列喹酮	$Y=1.94 \times 10^6 X - 3.82 \times 10^6$	1~250	0.9989
7	二甲双胍	$Y=4.10 \times 10^6 X + 1.36 \times 10^6$	1~250	0.9997
8	米格列奈	$Y=6.88 \times 10^6 X + 6.42 \times 10^6$	1~250	0.9998
9	那格列奈	$Y=3.92 \times 10^6 X - 1.85 \times 10^6$	1~250	0.9998
10	苯乙双胍	$Y=1.40 \times 10^7 X + 2.06 \times 10^7$	1~250	0.9964
11	吡格列酮	$Y=2.89 \times 10^6 X + 1.21 \times 10^7$	1~250	0.9974
12	瑞格列奈	$Y=1.50 \times 10^7 X + 2.45 \times 10^7$	1~250	0.9994
13	罗格列酮	$Y=4.93 \times 10^6 X + 3.81 \times 10^7$	1~250	0.9911
14	甲苯磺丁脲	$Y=2.34 \times 10^6 X + 1.01 \times 10^6$	1~250	0.9999

表 5 不同剂型保健食品中添加 14 种降血糖药物的回收率及相对标准偏差($n=6$)Table 5 The recoveries and the relative standard deviation of the 14 antidiabetic drugs in different health products ($n=6$)

序号	化合物名称	剂型	0.5 mg/kg		1.0 mg/kg		5.0 mg/kg	
			回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
1	格列苯脲	粉剂	89.2	3.35	93.0	6.42	95.5	4.61
		茶剂	82.9	4.35	82.5	4.42	93.4	5.07
		胶囊	78.8	8.91	87.1	6.86	105.4	6.94
2	格列波脲	粉剂	83.6	8.4	98.2	6.64	96.1	5.83
		茶剂	82.6	10.5	86.1	7.95	94.9	6.44
		胶囊	72.1	7.62	79.4	6.25	103.3	6.63
3	格列齐特	粉剂	86.4	8.12	103.1	5.56	94.9	3.1
		茶剂	81.7	7.64	83.3	8.8	99.7	6.23
		胶囊	72.2	8.67	80.2	7.62	94.8	7.74
4	格列美脲	粉剂	89.2	8.76	94.8	6.82	89.3	4.24
		茶剂	76.8	9.82	84.9	6.03	87.9	6.76
		胶囊	78.1	9.64	96.4	7.54	109.4	7.14
5	格列吡嗪	粉剂	82.4	7.72	95.7	5.64	99.4	7.59
		茶剂	87	8.31	90.4	7.27	96.8	5.58
		胶囊	72.8	9.08	80.8	3.71	104.6	6.91
6	格列喹酮	粉剂	83.2	6.57	87.4	7.31	85.8	5.16
		茶剂	82.9	7.21	83.5	6.34	93.9	4.34
		胶囊	89.1	9.18	98.1	7.38	102.3	5.33
7	二甲双胍	粉剂	75.2	10.3	81.4	6.92	83.4	5.17
		茶剂	69.2	7.42	73.7	6.96	86.5	5.95
		胶囊	72.3	9.19	79.5	3.66	100.8	5.43
8	米格列奈	粉剂	86	8.16	83.1	8.59	95.7	5.24
		茶剂	91.9	12.4	88.7	8.28	85.7	2.56
		胶囊	74.1	8.66	101.8	8.35	98.8	6.37
9	那格列奈	粉剂	80.9	10.9	86.1	8.54	99.8	6.56
		茶剂	92	5.33	93.4	7.13	92	6.97
		胶囊	80.9	6.56	81.8	3.63	99.5	5.82
10	苯乙双胍	粉剂	82.8	7.9	89.2	7.67	82.6	5.85
		茶剂	71.2	7.8	82.3	5.97	88.1	6.84
		胶囊	69.6	7.75	74.6	9.06	98.2	5.73
11	吡格列酮	粉剂	81.4	10.1	100.5	8.75	103.7	4.93
		茶剂	84.6	8.61	88.2	8.51	92.7	4.56
		胶囊	72.9	7.07	83.1	8.03	97.9	5.86
12	瑞格列奈	粉剂	88.9	6.96	110.6	8.93	99.8	6.46
		茶剂	78.1	8.75	84.1	6.67	99.4	5.49
		胶囊	80.6	8.39	92.2	4.91	98.1	3.68
13	罗格列酮	粉剂	89.1	6.42	105.1	8.99	94.4	5.77
		茶剂	78.1	9.29	81.4	6.93	93.5	5.57
		胶囊	77.2	9.23	86.7	6.57	104.7	4.15
14	甲苯磺丁脲	粉剂	84.2	12.9	91.6	9.15	101.3	7.04
		茶剂	77.9	7.27	89.1	4.67	94.6	4.65
		胶囊	84.1	8.25	91.3	9.14	96.8	3.56



注: (a) 降糖奶粉空白; (b) 降糖茶空白; (c) 胶囊空白; (d) 降糖奶粉基质添加; (e) 降糖茶基质添加; (f) 胶囊基质添加。

图 2 不同剂型保健品空白及基质添加混合提取离子流图

Fig.2 Ion chromatograms of blanks and matrix supplements in different health products

3.6 实际样品测定

对样品进行前处理后,并对样品溶液进行 Full MS/dd-MS²分析,通过多通道提取 14 种已知目标物的母离子进行分析,得到降糖奶粉、降糖茶和降糖胶囊中的 14 种降血糖药物的混合提取流图 (mixed extraction chromatograms, MEICs)如图 2(a)~(c)所示。在样品基质提取液中加入 14 种降血糖类药物,构建不同基质添加的 UHPL-Q-Exactive MS 指纹图谱,结果如图 2(d)~(f)所示,根据指纹图谱对比,可对样品结果进行快速筛查。对于疑似阳性的样品,采用保留时间以及二级质谱比对的方式进一步进行确证。利用本方法对 18 份不同剂型降血糖类保健

品进行的检测,所有样品均未检出降血糖类药物。样品信息见表 6。

4 结 论

本研究通过建立不同剂型保健食品的 QuEChERS 前处理方法和 UPLC-Q-Exactive 高分辨质谱筛查方法和定量分析方法,实现了对保健食品中苯茴酸促泌剂等 14 种降血糖类药物的同时检测分析。研究建立的 QuEChERS 前处理方法具有一定的通用性,对不同剂型的保健食品均能有效提取,UPLC-Q-Exactive 高分辨质谱的筛查方法和定量分析方法具有可扩展性,可实现更多药物的筛查和定量分析。

表 6 降血糖类保健品样品信息及分析结果
Table 6 Sample informations and analysis results of different health food

序号	样品名称	规格	生产厂家	检测结果
1	恩百苦瓜洋参软胶囊	0.5 g/粒	上海尚海生物科技有限公司	未检出
2	帝泊洱卓清速溶茶	0.5 g/袋	云南天力士	未检出
3	玉竹葛根青钱柳茶	3 g/袋	合肥柏禾堂生物科技有限公司	未检出
4	阿尔发消渴麦片	30 g/袋	天津阿尔发保健品有限公司	未检出
5	百合康排苦瓜洋参软胶囊	500 mg/粒	威海百合生物技术有限公司	未检出
6	唐友安配方粉	90 片/瓶	吉林省利君生物科技有限公司	未检出
7	葛根苦瓜铬胶囊	0.4 g/粒	威海南波湾生物技术有限公司	未检出
8	万松堂青钱柳茶	3 g/袋	随州市万松堂康汇保健品有限公司	未检出
9	阿尔发消渴茶	3 g/袋	天津阿尔发保健品有限公司	未检出
10	青钱消渴迪可莱茶	3 g/袋	江西省修水神茶实业有限公司	未检出
11	阿尔发消渴麦片	30 g/袋	天津阿尔发保健品有限公司	未检出
12	益力佳营养配方粉(辅助降血糖)	200 g/罐	美国雅培制药有限公司(原产国西班牙)	未检出
13	阿尔发富铬奶粉	400 g/袋	天津阿尔发保健品有限公司	未检出
14	阿尔发营养麦片	30 g/袋	天津阿尔发保健品有限公司	未检出
15	阿尔法豆奶粉	30 g/袋	天津阿尔发保健品有限公司	未检出
16	低生堂杂粮麦片	30 g/袋	天津港保税区爱信食品有限公司	未检出
17	伊利中老年奶粉	900 g/听	内蒙古伊利集团	未检出
18	菇神牌复配破壁灵芝孢子粉胶囊	0.4 g/粒	盐城神农保健食品有限公司	未检出

参考文献

- [1] 张中湖, 李军, 谢强胜, 等. TLC-SERS 高通量筛查中成药与保健食品中添加剂的降糖化学物质[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 467-476.
Zhang ZH, Li J, Xie QS, et al. High-throughput screening of the hypoglycemic chemicals added in Chinese patent medicines and health foods by TLC-SERS [J]. Chin J Pharm Anal 2019, 39(3): 467-476.
- [2] Kumasaka K, Kojima T, Honda H, et al. Screening and quantitative analysis for sulfonyleurea-type oral antidiabetic agents in adulterated health food using thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography [J]. J Health Sci, 2005, 51(4): 453-460.
- [3] Feng Y, Lei D, Hu C. Rapid identification of illegal synthetic adulterants in herbal anti-diabetic medicines using near infrared spectroscopy [J]. Spectrochimic Acta Part A Molec Biomolec Spectrosc, 2014, 125(9): 363-374.
- [4] 张昊天, 孙超, 宋志铭. 近红外聚类分析法快速检验中成药及保健品中的非法添加 4 种降糖类物质[J]. 黑龙江医药, 2017, 30(2): 237-241.
Zhang HT, Sun C, Song ZM. Rapid detection of 4 kinds of hypoglycemic drugs illegally added in Chinese patent medicine and health care products by near infrared cluster analysis [J]. Heilongjiang Med J, 2017, 30(2): 237-241.
- [5] 励炯, 曹青文, 王姣斐, 等. 基于实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): 2666–2673.
- 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]. *Chin Trad Herb Drug*, 2017, 48(13): 2666–2673.
- [6] 王豆, 杨欣, 程怡凡, 等. 高效液相色谱法同时鉴定保健胶囊食品中非法添加的 9 种降糖药成分[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(8): 1377–1381.
- Wang D, Yang X, Cheng YF, *et al.* Identification of nine components of antidiabetic medicine to health food capsules by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(8): 1377–1381.
- [7] 杨庆懿, 杨柳, 王凯, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 2038–2042.
- Yang QY, Yang L, Wang K, *et al.* Simultaneous determination of 15 kinds of illegally added hypoglycemic chemicals in health foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(7): 2038–2042.
- [8] 张建丽, 王占良, 张亦农. LC-MS/MS 法定性检测保健品中非法添加的降糖药[J]. 质谱学报, 2009, 30(5): 271–274.
- Zhang JL, Wang ZL, Zhang YN. Detection of antidiabetics in health products by LC-MS/MS [J]. *J Chin Mass Spectrom*, 2009, 30(5): 271–274.
- [9] Ma J, Pawar RS, Grundel E. Validation of an LC-MS/MS method for analysis of anti-diabetic drugs in botanical dietary supplement labeled for blood sugar management [J]. *Drug Test Anal*, 2018, (10): 609–617.
- [10] Guo C, Shi F, Jiang S, *et al.* Simultaneous identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated antidiabetics in herbal medicines and dietary supplements using high-resolution bench to pquadropole-Orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Lif Sci*, 2014, (967): 174–182.
- [11] 杜彦山, 李强, 吴春敏, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速筛查及定量分析保健品中 11 种非法添加降糖药物[J]. 色谱, 2015, 35(4): 371–376.
- Du YS, Li Q, Wu CM, *et al.* Rapid screening and quantitative detection of 11 illegally added antidiabetics in health care products by ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 35(4): 371–376.
- [12] 丁博, 王志元, 谢建军, 等. QuEChERS 前处理技术联合液相色谱-四极杆飞行时间质谱法检测保健食品中 24 种违禁降血糖、降血压和降血脂药物[J]. 色谱, 2016, 34(6): 583–590.
- Ding B, Wang ZY, Xie JJ, *et al.* Determination of 24 antihyperglycemic, antihypertensive and antihyperlipidemic drugs illegally added in health food samples by liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2016, 34(6): 583–590.
- [13] SN/T 3864-2014 出口保健食品中二甲双胍、苯乙双胍的测定[S]
- SN/T 3864-2014 Determination of metformin and phenformin in health foods for export [S]
- [14] SN/T 3146-2012 出口食品中苯乙双胍、格列苯脲、格列齐特、格列吡嗪、格列美脲检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S]
- SN/T 3146-2012 Determination of phenformin, glibenclamide, gliclazide, glipizide, glimepiride in foods for export-LC-MS/MS [S].

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



严 华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: yanh@bjciq.gov.cn



张朝晖, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: zhangzhaohuibiqtc@163.com