

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定减肥类保健食品 中 3 种违法添加的缓泻药成分的含量

肖之敏<sup>1,2\*</sup>, 莫益倩<sup>1,2</sup>, 廖雯意<sup>2,3</sup>, 李志龙<sup>2,3</sup>

(1. 广东省食品工业公共实验室, 广州 511442; 2. 广东省食品工业研究所有限公司, 广州 511442;  
3. 广东省食品质量监督检验站, 广州 511442)

**摘要: 目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定减肥类保健食品中脱乙酰比沙可啶、双醋酚丁和比沙可啶 3 种违法添加的缓泻药含量的方法。**方法** 样品用甲醇超声提取后, 十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱分离, 乙腈-0.1%甲酸水作为流动相洗脱, 以电喷雾离子源正离子模式电离, 结合多反应监测模式采集多个离子对进行测定。**结果** 3 种缓泻药成分在 1.0~100  $\mu\text{g/L}$  范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.9991, 平均回收率为 82.8%~94.6%, 相对标准偏差为 4.52%~6.33%, 方法检出限均为 25  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限均为 80  $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 该方法回收率高, 灵敏度高, 重现性好, 操作简便, 适用于实验室的批量测定。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 减肥类; 保健食品; 缓泻药

## Determination for 3 kinds of illegally added laxatives in slimming health foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIAO Zhi-Min<sup>1,2\*</sup>, MO Yi-Qian<sup>1,2</sup>, LIAO Wen-Yi<sup>2,3</sup>, LI Zhi-Long<sup>2,3</sup>

(1. Guangdong Provincial Public Laboratory of Food Industry, Guangzhou 511442, China; 2. Guangdong Food Industry Institute Co., Ltd., Guangzhou 511442, China; 3. Guangdong Food Quality Supervision and Inspection Station, Guangzhou 511442, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of 3 kinds of illegal laxatives of deacetyl bisacridine, bisacetophenol and bisacridine in slimming health foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS). **Methods** After ultrasonic extraction with methanol, the samples were separated by octyl silane bonded silica gel chromatographic column, and acetonitrile-0.1% formic acid water was eluted as mobile phase. The samples were ionized by electrospray ion source positive ion mode, and multiple ion pairs were collected in combination with multi-reaction monitoring mode for determination. **Results** The linear relationship of the 3 cathartic ingredients was good in the range of 1.0~100  $\mu\text{g/L}$ , the correlation coefficient was all more than 0.9991, the average recoveries were 82.8%-94.6%, and the relative standard deviations were 4.52%-6.33%, the limit of detection was 25  $\mu\text{g/kg}$ , the limit of quantitative was 80  $\mu\text{g/kg}$ . **Conclusion** This method has high recovery rate, high sensitivity, good reproducibility, and simple operation. It is suitable for batch determination in the laboratory.

**KEY WORDS:** ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; slimming; health food; laxative

\*通讯作者: 肖之敏, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。 E-mail: 635126366@qq.com

\*Corresponding author: XIAO Zhi-Min, Assistant Engineer, Guangdong Food Industry Institute Co., Ltd, 303 Jinxin Avenue, Nancun Town, Panyu District, Guangzhou, Guangdong, China. E-mail: 635126366@qq.com

## 1 引言

双酚类药物是一种刺激性的缓泻药物,主要作用于大肠,刺激结肠,阻止肠液被肠壁吸收而引起腹泻,临床上用于治疗急性和慢性便秘<sup>[1]</sup>,也可用于结肠镜检查、肠道 X 线检查或腹部手术前肠道清洁<sup>[2,3]</sup>。由于双酚类泻药对治疗慢性便秘具有良好的效果,且安全并可耐受<sup>[4]</sup>,因此可长期使用。但临床上,过量的使用对患者也有一定的副作用,如比沙可啶,可使患者产生腹痛、恶心、呕吐等不良反应<sup>[5]</sup>。同时,有文献报道,长期使用比沙可啶可导致结肠冗余扩张或结肠袋消失,可能导致结肠神经和平滑肌损伤<sup>[6]</sup>。由于此类缓泻药物可通过引起腹泻而降低体重,所以有可能被违法添加在减肥类的保健食品中,从而对消费者的健康安全造成威胁。因此,需要对保健食品中的违法添加情况加大监管力度,但目前还没有相关的国标方法,在 BJS 201701《食品中西布曲明等化合物的测定》<sup>[7]</sup>中规定了比沙可啶的检测方法,而脱乙酰比沙可啶和双醋酚丁还没有相关的标准方法(3 种化合物的化学式如图 1),所以有必要对相关的检测方法进行更深入的研究。

目前,保健食品中违法添加剂的检测方法以液相色谱-二极管阵列法<sup>[8-10]</sup>和液相色谱串联质谱法<sup>[11-13]</sup>为主,此外薄层色谱法<sup>[14]</sup>、毛细管电泳法<sup>[15]</sup>、气相色谱-质谱联用法<sup>[16]</sup>也有应用于检测此类产品的报道。但薄层色谱法操作不方便,且难以准确定量;毛细管电泳法虽然分离能力强,但其灵敏度难以应用于痕量分析;气相色谱-质谱联用法对于化合物特性要求较高,难以气化和离子化的化合物测定有一定的局限性。液相色谱应用范围广,但如果使用二极管阵列检测器进行测定,杂质影响较大,从而影响目标物的分析;液相色谱-串联质谱法对目标物选择性强,能在较短时间内对多种化合物进行分析,定性定量能力也较液相色谱法强。且目前关于同时检测减肥类保健品中比沙可啶、脱乙酰比沙可啶和双醋酚丁的方法相对较少。因此,本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法对减肥类保健食品中的比沙可啶、脱乙酰比沙可啶和双醋酚丁 3 种缓

泻药成分进行测定,优化了提取条件和仪器参数,建立 3 种缓泻药成分的质谱分析数据库,为后续的相关分析测定研究提供了参考依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器

4000Q 超高效液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI)和 MRM 模式(美国 AB Sciex 公司); H2500R-2 高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司); KQ3200V 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); IKA Vortex4 涡旋混匀器(广州仪科实验室技术有限公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

### 2.2 材料与试剂

减肥类保健食品(日常实验室检测样品);甲酸、甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔公司);比沙可啶(纯度 $\geq 98.5\%$ )、脱乙酰比沙可啶(纯度 $\geq 98.0\%$ )、双醋酚丁(纯度 $\geq 99.0\%$ )标准品(上海安谱实验科技股份有限公司)。

### 2.3 实验条件

#### 2.3.1 标准溶液的配制

标准溶液:分别称取适量标准品,用甲醇溶解并配成浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液,于 4 °C 下避光保存。

混合标准工作溶液:分别准确移取一定体积的每种标准储备液,用空白基质溶液重新定容成 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50  $\mu\text{g/L}$  的混合标准工作液。

#### 2.3.2 供试品溶液的制备

固体试样:取适量混匀,研细,称取粉末 1.0 g(精确至 0.01 g),精密称定于 50 mL 离心管中,加入甲醇 24 mL,超声提取 15 min,冷却至室温,离心后上清液转移至 50 mL 比色管中。残渣重复提取 1 次,合并提取液并用甲醇定容,摇匀,用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,待测。

液体试样:取适量摇匀,称取 1.0 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入甲醇 48 mL,超声提取 15 min,放冷,离心后上清液转移至 50 mL 比色管中。并用甲醇定容,摇匀,用微孔滤膜过滤,待测。

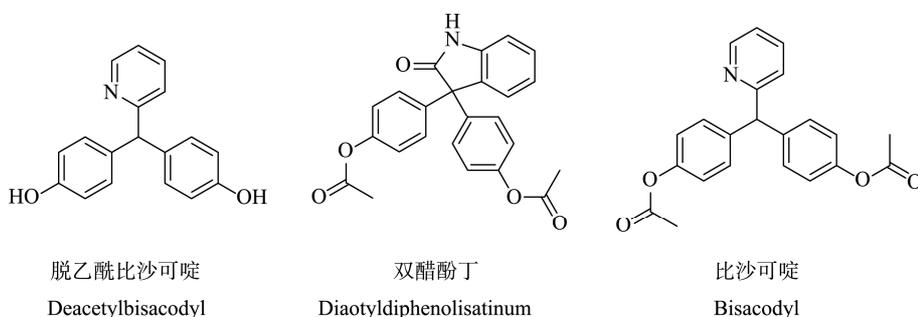


图 1 3 种化合物的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of three compounds

### 2.3.3 色谱条件

色谱柱: Agilent poroshell EC C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×3.0 mm, 2.7 μm); 柱温为 40 °C; 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(体积分数, B); 流速: 0.40 mL/min; 进样量: 10 μL; 采用等度洗脱方式洗脱分离: A:B(7:3, V:V)。

### 2.3.4 质谱条件

电喷雾电离源模式(ESI): 正模式电离; 气帘气: 25 psi; 电离电压(IS): 5000 V; 离子源温度(TEM): 500 °C; 雾化气(GAS1): 50 psi; 加热辅助气(GAS2): 50 psi; 碰撞气(CAD): medium; 采集模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式。

## 3 结果与分析

### 3.1 质谱参数的优化

由于3种缓泻药化合物分别含有仲胺和叔胺结构, 倾向于得到质子, 在电喷雾正离子模式下容易形成稳定的分子离子峰[M+H]<sup>+</sup>, 且离子丰度较高, 因此选用正离子模式对目标物进行离子化。在不连接色谱的情况下, 以流动注射的方式将单标标准溶液注入离子源, 对母离子质荷比进行扫描后, 加大碰撞电压, 并对二级碎片扫描, 选择响应值较高的两个碎片的质荷比和响应强度作为定性定量依据。在多反应监测模式下, 优化影响对各个碎片响应强度的参数去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞电压(collision energy, CE), 进一步提高分析的灵敏度。详细参数见表1。3种缓泻药化合物的提取离子流色谱图见图2。

表1 多反应监测采集3种化合物的MS/MS参数  
Table 1 MS/MS parameters of three analytes by MRM

分析物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞电压/eV
脱乙酰比沙可啶	278.0	184.2*	84.4	23.9
		167.2	84.4	54.6
双醋酚丁	402.1	224.1*	101.0	31.9
		266.1	101.0	15.9
比沙可啶	362.1	184.0*	90.0	21.7
		226.1	90.0	25.4

注: “\*”表示该离子为定量离子。

### 3.2 提取溶剂的对比和选择

由于目标物极性较低, 所以理应使用低极性溶剂进行提取, 但考虑到测定的反相色谱系统, 且考虑到脱乙酰比沙可啶含有2个酚羟基, 具有一定极性, 最终选择乙腈、甲醇和80%甲醇水溶液(体积分数)3种溶剂进行考察, 以回收率为考察依据。结果发现, 以乙腈作为提取溶剂, 对于某些样品, 提取后溶液较浑浊, 3种缓泻药成分回收率也

较低, 可能是由于乙腈沉淀能力较强, 在提取过程中使某些杂质成分沉淀, 从而吸附目标物导致回收率降低。而80%甲醇水溶液作为提取溶剂时, 脱乙酰比沙可啶的回收率较其他2种成分高, 但总体上对比, 回收率仍不如甲醇。因此, 最终选择甲醇作为提取溶剂。3种缓泻药成分在不同提取溶剂下的回收率见图3。

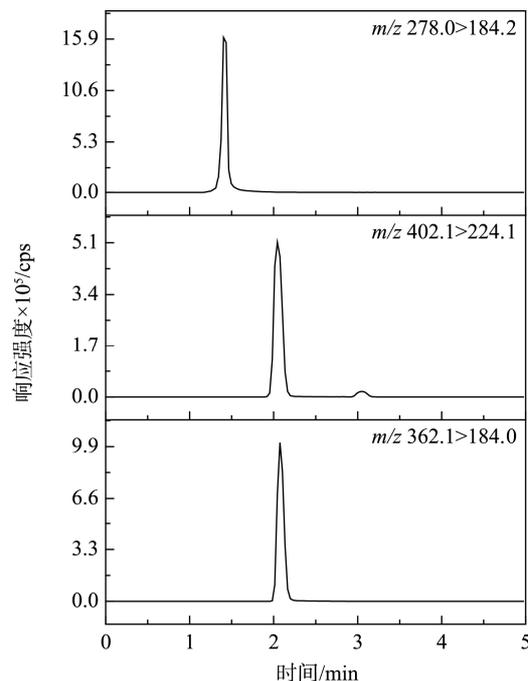


图2 3种化合物提取离子流色谱图

Fig.2 Extract ion chromatogram of three analytes

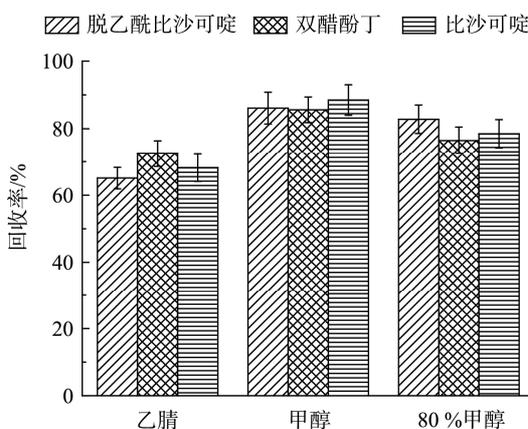


图3 提取溶剂对回收率的影响(n=6)

Fig.3 Effect of extraction solvent on recoveries (n=6)

### 3.3 基质效应

为考察实验的基质效应, 在曲线线性范围内, 用空白基质液配制3个浓度的基质标准液以判定基质效应对响应值的影响, 浓度分别为1.0、5.0和10 μg/L。通过峰面积和纯溶剂曲线计算得出相应浓度, 浓度若为实际浓度的

90%~110%，则判定基质效应不明显。结果测得 3 个浓度分别为 0.56、3.35 和 71.3  $\mu\text{g/L}$ ，即分别 56.0%、67.0%和 71.3%，说明基质效应呈负影响，且影响较明显，因此，需要采用基质曲线进行计算，以校正基质效应造成的偏差。

### 3.4 方法的线性范围和检出限

在本方法所确定的实验条件下，用基质空白将混合标准溶液稀释至 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50  $\mu\text{g/L}$  进行测定，以峰面积(Y 轴)对相应的浓度(X 轴)作图，结果表明，待测化合物浓度与对应的峰面积呈现良好的线性关系(见表 2)。同时，以仪器的信噪比 3 倍和 10 倍确定方法的检出限和定量限，3 种缓泻药成分的检出限均为 25.0  $\mu\text{g/kg}$ ，定量限均为 80.0  $\mu\text{g/kg}$ 。

### 3.5 回收率与精密度分析

用 3 种缓泻药成分呈阴性的样品按定量限的 1 倍、2 倍和 5 倍 3 个浓度水平的添加回收试验，每个浓度水平进行 6 次重复实验，并通过 6 次重复测定数据计算相对标准偏差，以考察方法的稳定性。测得 3 种缓泻药成分的平均回收率在 82.8%~94.6%之间，相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 4.52%~6.33%。方法学结果表明，该方法经基质曲线校正后，回收率高，精密度和重现性满

足测定要求。测得 3 个化合物回收率范围及相对标准偏差见表 3。

### 3.6 样品的实际测定应用

将已建立的方法应用于实际样品的检测中，对 10 个减肥茶，10 个减肥颗粒冲剂和 10 个左旋肉碱咖啡，共 30 个样品进行测定。其中有 1 个减肥茶样品测出比沙可啶，含量为 611  $\mu\text{g/kg}$ ，而所有样品均没有检出脱乙酰比沙可啶和双醋酚丁。阳性样品比沙可啶提取离子流色谱图见图 4。

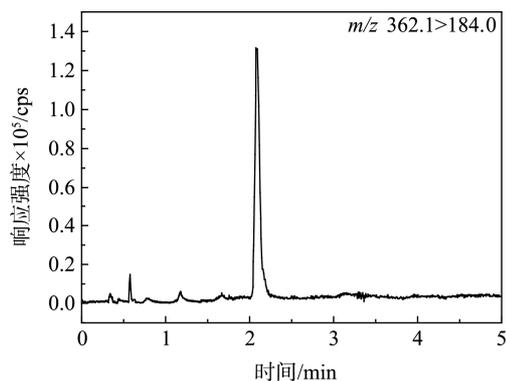


图 4 阳性样品比沙可啶提取离子流色谱图  
Fig.4 Extract ion chromatogram of bisacodyl in positive sample

表 2 3 种化合物线性方程、检出限和定量限

Table 2 Linear equations, limits of detection and limits of quantitation for three analytes

化合物	浓度范围/ $(\mu\text{g/L})$	线性方程	相关系数 $r$	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$	定量限/ $(\mu\text{g/kg})$
脱乙酰比沙可啶	1.0~100	$Y=19000X+11400$	0.9995	25.0	80.0
双醋酚丁	1.0~100	$Y=1090X+8460$	0.9991	25.0	80.0
比沙可啶	1.0~100	$Y=29500X+11900$	0.9997	25.0	80.0

表 3 3 种化合物的平均回收率和相对标准偏差( $n=6$ )

Table 3 Recoveries and relative standard deviation for three analytes( $n=6$ )

化合物	本底值/ $(\mu\text{g/kg})$	添加水平/ $(\mu\text{g/kg})$	测得值/ $(\mu\text{g/kg})$	回收率/%	RSD/%
脱乙酰比沙可啶	ND	25.0	20.8	83.2	4.52
	ND	50.0	44.3	88.6	5.30
	ND	125	112.8	90.2	5.86
双醋酚丁	ND	25.0	20.7	82.8	5.77
	ND	50.0	43.5	87.0	4.88
	ND	125	112.3	89.8	5.93
比沙可啶	ND	25.0	22.2	88.8	5.84
	ND	50.0	47.3	94.6	6.33
	ND	125	106.9	85.5	5.18

## 4 结论

本文用纯溶剂超声提取方法对样品进行提取,对比了不同溶剂对回收率的影响,同时使用了基质曲线校正测定结果。优化质谱参数,使3种缓泻药成分具有较高灵敏度,在此方法的色谱条件下,种目标物在2 min左右完全出峰,且峰型良好。对实验进行方法学验证,结果表明,本方法回收率高,灵敏度高,重复性好。同时操作简便,快捷高效,且检测成本低,所用试剂毒性低,可用于日常批量检测。

## 参考文献

- [1] Camilleri M, Bharucha AE. Behavioural and new pharmacological treatments for constipation: getting the balance right [J]. *Gut*, 2010, 59(9): 1288–1296.
- [2] Fabrizio P, Cristian V, Stefano B, *et al.* 2-Litre polyethylene glycol-citrate-simethicone plus bisacodyl versus 4-litre polyethylene glycol as preparation for colonoscopy in chronic constipation [J]. *Digest Liver Dis*, 2015, 47(10): 857–863.
- [3] Wang HS, Lin JK. A randomized prospective trial of bowel preparation for colonoscopy with Fortrans compared with bisacodyl [J]. *J Chin Med Assoc*, 2003, 66(6): 364–369.
- [4] Wald A. Is chronic use of stimulant laxatives harmful to the colon [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2003, 36(5): 386–389.
- [5] Kamm MA, Muellerlissner S, Wald A, *et al.* Oral bisacodyl is effective and well-tolerated in patients with chronic constipation [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011, 9(7): 577–583.
- [6] Leng-Peschlow E. Effects of sennosides A+B and bisacodyl on rat large intestine [J]. *Pharmacology*, 1989, 38(5): 310–318.
- [7] BJS 201701 食品中西布曲明等化合物的测定[S].  
BJS 201701 Determination of chemical compounds in food [S].
- [8] 徐文峰, 金鹏飞, 徐硕, 等. 高效液相色谱法测定便秘糖衣丸中3种有效成分的含量[J]. *中南药学*, 2019, 17(9): 1525–1528.  
Xu WF, Jin PF, Xu S, *et al.* Content determination of 3 active ingredients in Surulac-S by high performance liquid chromatography [J]. *Cent South Pharm*, 2019, 17(9): 1525–1528.
- [9] 鲁辉, 钱叶飞, 张斌, 等. 减肥类保健食品中蒽醌类成分及非法添加化学药物的测定[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 88–93.  
Lu H, Qian YF, Zhang B, *et al.* Determination of rhubarb anthraquinones and illegally added chemical drugs in weight-loss functional foods [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(10): 88–93.
- [10] 张晓丹, 傅小英, 陈静, 等. HPLC-DAD 数据库快速筛查减肥类中药制剂及保健食品中的10种非法添加化学药物[J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(2): 195–201.  
Zhang XD, Fu XY, Chen J, *et al.* A HPLC-DAD spectrum library for rapidly detecting 10 anti-obesity chemicals illegally adulterated intraditional Chinese medicines and healthy foods [J]. *Chin J New Drugs*, 2012, 21(2): 195–201.
- [11] 江孝敏, 华晔, 吴国萍. 高效液相三重四极杆质谱法测定保健品中非法添加的减肥类药物[J]. *江苏警官学院学报*, 2017, 32(3): 120–122.  
Jiang XM, Hua Y, Wu GP. Analysis on the illegal addition of weight loss drugs in health products by using HPLC-MS/MS [J]. *J Jiangsu Pol Officer Coll*, 2017, 32(3): 120–122.
- [12] 许立, 吴鸳鸯, 寿林均, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定减肥类保健食品中27种违法添加化学药品[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(13): 248–256, 306.  
Xu L, Wu YY, Shou LJ, *et al.* Simultaneous determination of 27 chemical drugs illegally added in slimming health food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(13): 248–256, 306.
- [13] 马微, 彭涛, 朱明达, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定减肥保健食品中11种食欲抑制剂[J]. *分析化学*, 2009, 37(11): 1583–1589.  
Ma W, Peng T, Zhu MD, *et al.* Simultaneous determination of 11 appetite suppressants in weight-loss functional foods by accelerated solvent extraction-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37(11): 1583–1589.
- [14] 刘若冰, 刘灿辉. 减肥类保健食品中非法添加盐酸西布曲明的快速检测[J]. *中国医药指南*, 2013, (21): 100–102.  
Liu RB, Liu CH. The rapid determination of illegal adulterants of sibutramine hydrochloride in weight reducing dietary supplement [J]. *Guide Chin Med*, 2013, (21): 100–102.
- [15] 李阳, 薛丰, 王媛, 等. 高效毛细管电泳法同时测定减肥类功能食品中7种违禁成分[J]. *分析化学*, 2011, 39(11): 1716–1720.  
Li Y, Xue F, Wang Y, *et al.* Simultaneous determination of seven adulterants in slimming functional foods by high performance capillary electrophoresis [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(11): 1716–1720.
- [16] 朱志鑫, 吴惠勤, 黄晓兰, 等. 气相色谱-质谱法检测减肥食品中芬氟拉明和西布曲明[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(10): 1419–1422.  
Zhu ZX, Wu HQ, Huang XL, *et al.* Quantification of sibutramine and fenfluramine in slimming foods by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2012, 28(10): 1419–1422.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



肖之敏, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 635126366@qq.com