

- (1):25-34.
- [11] SARGE T, TALMOR D. Targeting transpulmonary pressure to prevent ventilator induced lung injury[J]. Minerva Anesthesiol, 2009, 75(5):293-299.
- [12] YERRAPUREDDY A, TOBIAS J, MARGULIES SS. Cyclic stretch magnitude and duration affect rat alveolar epithelial gene expression[J]. Cell Physiol Biochem, 2010, 25(1):113-122.
- [13] BRANDL K, SUN L, NEPL C, et al. MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(46):19967-19972.
- [14] PARDO-SAGANTA A, LATASA MU, CASTILLO J, et al. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin is a negative regulator of hepatic acute-phase gene expression[J]. J Hepatol, 2009, 51(6):1010-1020.
- [15] BERASAIN C, GARCÍA-TREVIJANO ER, CASTILLO J, et al. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice[J]. Gastroenterology, 2005, 128(2):424-432.
- [16] LINGGI B, CARPENTER G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(12):649-656.
- [17] CITRI A, YARDEN Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(7):505-516.
- [18] BERASAIN C, GARCÍA-TREVIJANO ER, CASTILLO J, et al. Novel role for amphiregulin in protection from liver injury[J]. J Biol Chem, 2005, 280(19):19012-19020.
- [19] WESTPHALEN K, GUSAROVA GA, ISLAM MN, et al. Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity[J]. Nature, 2014, 506(7489):503-506.
- [20] 赵洁婷, 钟文, 徐建平. microRNA-21 促进人肺腺癌细胞 A549 对顺铂耐药性的研究[J]. 安徽医药, 2017, 21(6):1082-1086.
- [21] LU N, WANG LH, CAO HL, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor in macrophages regulates cytokine production and experimental colitis [J]. J Immunol, 2014, 192(3):1013-1023.
- [22] LIN KK, ROSSI L, BOLES NC, et al. CD81 is essential for thymic entry of hematopoietic stem cells to quiescence following stress-induced proliferation via deactivation of the akt pathway[J]. PLoS Biol, 2011, 9(9):e1001148. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001148 DOI:10.1371/journal.pbio.1001148.
- (收稿日期:2017-10-20,修回日期:2017-12-30)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.06.007

◇ 药物分析 ◇

高效液相-质谱联用法测定改善睡眠类保健食品中的非法添加物

孙晓¹, 田仁芳², 董靖¹, 贾寒冰¹, 张亚锋¹

作者单位:¹西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710054;

²西安怡康医药连锁有限责任公司, 陕西 西安 710054

通信作者: 张亚锋, 男, 副主任药师, 研究方向为药品及食品质量分析, E-mail: 27327242@qq.com

基金项目: 陕西省科学技术厅重点研发计划(2017SF-311)

摘要: **目的** 建立安神类保健食品中非法添加物的高效液相-质谱联用法(HPLC-MS)测定方法。 **方法** 采用 CAPCELLPAK C₁₈ MG III C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.0 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 乙酸), 梯度洗脱, 流速 0.3 mL/min, 柱温 35 ℃, 进样量 10 μL, 采用质谱检测器, 电喷雾正离子模式(ESI⁺), 进行多反应监测(MRM)和扫描。 **结果** 青藤碱、佐匹克隆、褪黑素、文法拉辛、氯苯那敏、罗通定、扎来普隆分别在 7.10~285($r=0.999\ 0$)、7.60~304($r=0.999\ 5$)、7.05~282($r=0.999\ 3$)、6.80~272($r=0.998\ 9$)、7.60~304($r=0.997\ 9$)、8.75~350($r=0.998\ 3$)、7.90~315($r=0.998\ 6$) ng/mL 范围内有良好的线性关系, 加标回收率依次为 97.2% (RSD=2.10%)、97.3% (RSD=1.06%)、96.0% (RSD=1.79%)、97.3% (RSD=1.63%)、99.1% (RSD=0.97%)、95.6% (RSD=0.79%)、98.5% (RSD=1.21%)。 **结论** 该方法灵敏度高、重复性好、准确度好, 对常量、微量甚至痕量非法添加药物能做到准确测定。

关键词: 改善睡眠类保健食品; 高效液相-质谱联用法; 非法添加物

Determination of illegally added chemical drugs in sleep-improving health-food by HPLC-MS

SUN Xiao¹, TIAN Renfang², DONG Jing¹, JIA Hanbing¹, ZHANG Yafeng¹

Author Affiliations: ¹Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710054, China;

²Xi'an YIKANG Pharmaceutical Chains Co., Ltd, Xi'an, Shaanxi 710054, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-MS method for the determination of prohibited chemical drugs in sleep-improving health-food. **Methods** The column was CAPCELLPAK C₁₈ MG III C₁₈ (150 mm × 2.0 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile - 0.01 mol/L ammonium acetate solution (containing 0.1% acetic acid). A gradient elution was used at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 35 °C, and the injection volume was 10 μL. Mass spectrometry detector and electrospray positive ion mode (ESI+) were adopted for multi reaction monitoring (MRM) and screening. **Results** Sinomenine, Zopiclone, Melatonin, Venlafaxine, Chlorpheniramine, Lortidine and Zaleplon showed good linearity in the ranges of 7.10-285 ng/mL ($r=0.999\ 0$), 7.60-304 ng/mL ($r=0.999\ 5$), 7.05-282 ng/mL ($r=0.999\ 3$), 6.80-272 ng/mL ($r=0.998\ 9$), 7.60-304 ng/mL ($r=0.997\ 9$), 8.75-350 ng/mL ($r=0.998\ 3$), and 7.90-315 ng/mL ($r=0.998\ 6$), respectively. The average recoveries were 97.2% (RSD = 2.10%), 97.3% (RSD = 1.06%), 96.0% (RSD = 1.79%), 97.3% (RSD = 1.63%), 99.1% (RSD = 0.97%), 95.6% (RSD = 0.79%) and 98.5% (RSD = 1.21%), respectively. **Conclusion** The method has high sensitivity, good reproducibility and high accuracy, which achieves an accurate determination of the normal, minute or even trace amount of illegally added drugs.

Key words: Sleep-improving health-food; HPLC-MS; Illegally added drug

近年来,人们健康意识不断提升,对保健食品的需求也不断增加^[1]。为了提高产品的市场竞争力,仍有人铤而走险将化学药品加入保健食品中,使保健食品产生速效作用,在短期内骗取群众口碑,进而增加销量谋取巨额利润^[2]。其中,改善睡眠类保健食品需求量较大,临床上应用广泛的安神类化学药物成为了增强此类产品疗效的优先选择^[3-4]。人们如果长期摄入这类化学药物,容易产生药物依赖性,因此对该类产品的风险监测迫在眉睫^[5]。

目前保健食品中非法添加物的检测方法有薄层色谱法、紫外分光光度法、高效液相色谱法、高效液相-质谱联用法(HPLC-MS)等。其中薄层色谱法、紫外分光光度法操作简便,所需时间短,但专属性较弱^[6]。高效液相色谱法具有灵敏度高、专属性好、设备费用适中的优点,但缺点是对于具有相同色谱行为,相同紫外吸收的同母核修饰化合物不具备分离鉴定能力^[7-8]。本研究采用目前最先进科学的HPLC-MS/MS分析测试方法,于2016年7月开展研究,经大量方法学考察,结果证明该方法灵敏度最高、专属性最强。能较大程度避免假阳性结果的产生,同时能做到微量甚至痕量的准确分析,又能避免假阴性结果的产生^[9],可推广应用于改善睡眠类保健食品中的非法添加物的检测监管,进而保障群众用药安全。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1200-6410B 高效液相色谱-质谱联用仪(检测器三重四级杆QQQ,美国Agilent公司);电子分析天平(德国Mettler-Toledo系列);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 青藤碱(批号:110774-200507);佐匹克隆(批号:100870-200801);文法拉辛(批号:100543-200401);罗通定(批号:100452-200301),以上标准物质均购自中国药品生物制品检定院;氯苯那敏

(中国食品药品检定研究院,批号:100047-200606);褪黑素(Dr. Ehrenstorfer. GmbH,批号:41222);扎来普隆(TRC,批号:4-ANR-96-1)。甲醇、冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);乙酸铵(Aladdin,色谱纯)、乙腈(Merck,色谱纯);水(实验室自制,超纯水)。样品为本市辖区内随机抽样所得,001号为梦香源胶囊,002号为白色粉末,003号为安睡片。取阴性样品,加入上述混合标准物质适量,充分混合均匀,作为模拟阳性样品。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件 色谱柱为CAPCELLPAK C₁₈ MG III C₁₈ (150 mm × 2.0 mm, 5 μm)。流动相A为乙腈,流动相B为0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含0.1%乙酸),梯度洗脱:0~6 min, 20% A; 6~6.5 min, 20%~40% A; 6.5~15 min, 40%~45% A; 15~30 min, 45% A; 30~31 min, 45%~20% A; 31~36 min, 20% A。流速0.3 mL/min;柱温35 °C;进样量10 μL;检测器QQQ,离子源ESI+,雾化气温度300 °C,雾化气流速10 L/min,MRM扫描,MRM母离子/子离子信息见表1^[10-11]。

表1 化合物多反应监测离子信息

组分	准分子离子峰/ (m/z)	碎片离子峰/ (m/z)	碎裂电压/ V	碰撞能量/ V
青藤碱	329.8	239.0/180.9 ^a	125	30
佐匹克隆	388.7	344.8 ^a /245.1	95	5
褪黑素	232.9	174.0 ^a /159.0	115	25
文法拉辛	277.9	121.0/58.1 ^a	135	35
氯苯那敏	274.8	229.9 ^a /166.8	105	15
罗通定	355.8	191.9 ^a /164.8	135	27
扎来普隆	305.8	264.0/235.9 ^a	105	23

注:a为定量离子

2.2 标准物质溶液的配制 分别精密称取青藤碱、佐匹克隆、褪黑素、文法拉辛、氯苯那敏、罗通定、扎来普隆标准物质各10.00 mg,分别置于25 mL容量

瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度摇匀,作为标准物质储备溶液;用刻度移液管分别精密移取以上标准物质储备溶液 5 mL,置于 50 mL 容量瓶中,摇匀,作为混合标准物质溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取供试品 5 粒置于研钵中研磨均匀,精密称取 0.45 g,于 50 mL 容量瓶中,加甲醇适量,超声处理 15 min,取出放冷至室温,加甲醇定容至刻度,摇匀,备用。吸取上清液适量稀释 500 倍,0.22 μm 有机系微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。如果样品未检出非法添加物,建议再过滤一瓶未稀释的供试品母液,以排除假阴性结果。

2.4 专属性试验 分别取阴性样品样品、模拟阳性样品按“2.3”项下处理,取混合标准物质、阴性样品、模拟阳性样品按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果模拟阳性样品在与混合标准物质各组分相同保留时间处,离子流图一致。表明该方法可有效排除杂志干扰,专属性良好。总离子流图(TIC 图)见图 1。

2.5 标准工作曲线溶液的配制 精密吸取“2.2”项下混合标准物质溶液适量,依次用甲醇稀释定容,制成混合标准工作曲线溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数 r ,结果表明各组分线性关系良好,见表 2。

表 2 标准曲线方程

组分	回归方程	r 值	线性范围/(ng/mL)
青藤碱	$Y = 0.2021X + 0.0135$	0.9990	7.10 ~ 285.00
佐匹克隆	$Y = 0.1801X + 0.0121$	0.9995	7.60 ~ 303.50
褪黑素	$Y = 0.9311X - 0.1306$	0.9993	7.05 ~ 282.00
文法拉辛	$Y = 0.3002X + 0.0075$	0.9989	6.80 ~ 271.50
氯苯那敏	$Y = 0.2617X + 0.0121$	0.9979	7.60 ~ 304.50
罗通定	$Y = 0.3799X + 0.1023$	0.9983	8.75 ~ 350.00
扎来普隆	$Y = 1.2120X + 0.2017$	0.9986	7.90 ~ 315.00

2.6 精密度试验 精密吸取混合标准物质溶液 10 μL ,按“2.1”项下色谱条件测定,连续进样 6 次,记录峰面积,分别计算 7 种组分的 RSD($n=6$)分别为 1.37%, 1.79%, 1.01%, 0.96%, 1.51%, 1.21%,

0.86%,结果表明仪器精密度良好。

2.7 检出限试验 将各组分标准物质逐级稀释,计算信噪比 $S/N=3$ 时各组分浓度,结果确定青藤碱、佐匹克隆、褪黑素、文法拉辛、氯苯那敏、罗通定、扎来普隆检出限分别是 1.78、2.17、1.76、1.70、1.90、2.19、1.58 ng/mL。

2.8 重复性试验 精密称取模拟阳性样品 6 份,按照“2.3”项下方法同法处理,得到平行样品 6 份,按“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算 6 份样品中 7 种组分的 RSD 分别为 1.74%、1.91%、1.12%、0.99%、1.49%、0.97%、0.89%,结果表明该方法的重复性良好。

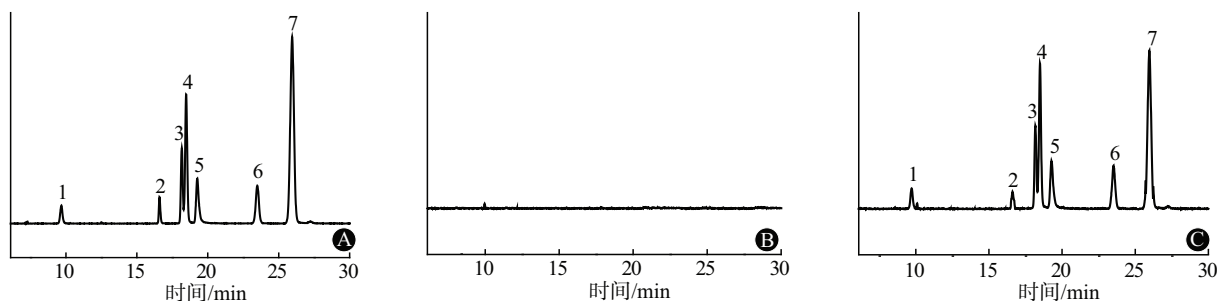
2.9 稳定性试验 精密吸取模拟阳性样品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12 h 按“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,分别计算 7 种组分的 RSD($n=6$)分别为 1.23%、1.01%、1.69%、0.91%、1.51%、1.03%、1.08%,表明样品 12 h 稳定性良好;精密标准物质溶液,分别在 0、2、4、8、16、36 h 按“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,分别计算 7 种组分的 RSD($n=6$)分别为 1.49%、1.17%、1.39%、1.27%、1.55%、1.26%、1.73%,表明标准物质 12 h 稳定性良好。

2.10 加标回收试验 精密称取已知含量的样品 9 份,分为三组,每组 3 份,分别向每份样品加入混合标准物质溶液适量,制成高、中、低三梯度三平行的加标回收样品,按照“2.3”项下同法处理该 9 份样品,按“2.1”项下色谱条件测定,计算各组分回收率,结果表明该方法回收率可靠、稳定,见表 3。

2.11 样品测定 称取 3 批次保健食品样品,按照“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件测定,计算各组分含量,结果 2 批次未检出非法添加组分,1 批次仅检出褪黑素,见表 4。

3 讨论

本文所研究的检测方法,采用了更为先进、科学的 HPLC-MS 联用法。相比于传统的高效液相色谱



注:1. 青藤碱;2. 佐匹克隆;3. 褪黑素;4. 文法拉辛;5. 氯苯那敏;6. 罗通定;7. 扎来普隆

图 1 总离子流图:A 为混合标准物质;B 为阴性样品;C 为模拟阳性样品

表3 加标回收率试验结果

组分	样品含量/ (ng/mL)	加标量/(ng/mL)			测得量/(ng/mL)			平均回收率/%	RSD/%
		梯度1	梯度2	梯度3	梯度1	梯度2	梯度3		
青藤碱	0.00	5.47	6.84	8.21	5.24	6.51	8.15	97.21	2.10
	0.00	5.47	6.84	8.21	5.33	6.54	8.24		
	0.00	5.47	6.84	8.21	5.29	6.50	8.17		
佐匹克隆	0.00	5.87	7.28	8.74	5.65	7.16	8.50	97.31	1.06
	0.00	5.87	7.28	8.74	5.63	7.07	8.44		
	0.00	5.87	7.28	8.74	5.76	7.21	8.49		
褪黑素	0.00	5.42	6.77	8.12	5.11	6.51	7.93	95.99	1.79
	0.00	5.42	6.77	8.12	5.11	6.57	7.91		
	0.00	5.42	6.77	8.12	5.04	6.56	7.89		
文法拉辛	0.00	5.21	6.52	7.82	5.15	6.31	7.51	97.27	1.63
	0.00	5.21	6.52	7.82	5.10	6.26	7.44		
	0.00	5.21	6.52	7.82	5.22	6.39	7.55		
氯苯那敏	0.00	5.85	7.31	8.77	5.89	7.24	8.62	99.09	0.97
	0.00	5.85	7.31	8.77	5.84	7.27	8.56		
	0.00	5.85	7.31	8.77	5.83	7.25	8.60		
罗通定	0.00	6.72	8.40	10.08	6.37	8.09	9.69	95.59	0.79
	0.00	6.72	8.40	10.08	6.39	8.10	9.61		
	0.00	6.72	8.40	10.08	6.37	8.11	9.56		
扎来普隆	0.00	6.05	7.56	9.07	5.89	7.54	8.95	98.51	1.21
	0.00	6.05	7.56	9.07	5.88	7.61	8.83		
	0.00	6.05	7.56	9.07	5.92	7.49	8.95		

表4 样品测定结果/(g/kg)

编号	青藤碱	佐匹克隆	褪黑素	文法拉辛	氯苯那敏	罗通定	扎来普隆
001	0	0	0	0	0	0	0
002	0	0	3.75	0	0	0	0
003	0	0	0	0	0	0	0

谱法、薄层色谱法、理化鉴别等方法,能够极大程度上避免假阳性和假阴性结果的产生,灵敏度更高,定性/定量结果更准确,分析速度更快。

将现有标准(编号 2013002 和编号 2012004)中所囊括的 7 种安神类非法添加物质^[12-13],由三种体系检测改进为单体系单针检测,效率更高结果更准确。相比于(编号 BJS 201710)前处理过程,本研究方法增加了稀释步骤,可有效预防解决质谱检测器的污染问题;其次本方法针对改善睡眠类保健食品违禁药物添加问题,选择了针对性更强的化学添加药物进行检测,待测组离子响应更强,干扰更小。

综上所述,本研究方法能够有效地缩短检测时间,节省实验人员、仪器、试剂等方面的成本,加快实验进度,提高实验准确度,提高了监管分析工作效率,具有很好的应用价值及前景。

参考文献

[1] 雷蕾,欧阳亚楠,杨硕,等. 国内改善睡眠类保健食品现状分析[J]. 中国现代中药,2015,17(10):1091-1095.
[2] 郭志鑫,董培智,申国华,等. 保健食品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.
[3] 鲁艺,韩东岐,黎雪清,等. 安神类和抗风湿类中成药和保健食品中非法添加化学成分的案例分析[J]. 中国药事,2015,29(8):775-781.
[4] 夏路风,李六水,张琪,等. 舒眠胶囊与艾司唑仑治疗失眠症的临床疗效比较[J]. 安徽医药,2015,19(2):367-371.
[5] 高婷,刘亚军,王刚,等. 常用催眠药物研究进展[J]. 有机化学研究,2015,3(3):105-114.
[6] 肖丽和,刘吉金,关潇滢,等. 镇静安神类中成药及保健食品中非法添加化学成分的快速筛查方法研究[J]. 中国当代医药,2009,16(14):15-16.
[7] 汤慧,葛文超,张萍,等. 数字对照品法检测镇静安神类中成药和保健食品中非法添加的 5 种西药成分[J]. 安徽医药,2012,16(11):1601-1603.
[8] 何琳,王凌. 色谱技术在检测中成药和保健食品中非法添加化学物质的应用研究进展[J]. 安徽医药,2011,15(10):1306-1309.
[9] 林芳,王一欣,李涛,等. 安神类保健食品中新型非法添加药物的检测研究[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(4):1631-1636.
[10] 曹玉明. 高效液相色谱法测定小儿氨酚黄那敏颗粒中马来酸氯苯那敏含量及均匀度[J]. 安徽医药,2016,20(8):1486-1489.
[11] 彭耀文,申兰慧,王丽,等. UPLC/Q-TOF-MS 法检测 2 种中成药中土霉素、马来酸氯苯那敏和醋酸泼尼松[J]. 中成药,2015,37(9):1959-1964.
[12] 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(编号:2012004)[S],2012.
[13] 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(编号:2013002)[S],2013.
(收稿日期:2017-12-27,修回日期:2018-02-26)