

## 实验技术与方法

解吸附电晕束电离质谱辅助高效液相色谱法  
检测减肥类保健食品中的违禁药物赵勇<sup>1</sup>, 王华<sup>1,2</sup>, 朱慧果<sup>1</sup>, 吴双<sup>1</sup>, 孙文剑<sup>2</sup>, 丁力<sup>2</sup>, 陈波<sup>1</sup>

(1. 湖南师范大学 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081;

2. 岛津分析技术研发(上海)有限公司, 上海 201201)

**摘要:**目的 利用解吸附电晕束电离质谱(DCBI-MS)对减肥类保健食品中违禁药物进行快速筛选,进而用高效液相色谱法(HPLC-UV)对疑似检出样品准确定量。方法 通过DCBI-MS直接分析,对比标准物质的一级、二级质谱谱图,对检测样品中非法添加的芬氟拉明、酚酞、西布曲明、单去甲基西布曲明、双去甲基西布曲明进行定性鉴别。HPLC-UV对5种目标化合物准确定量。结果 HPLC-UV方法中各目标物的线性范围为0.25~300 mg/L。12个检测样品中3个样品共3种违禁物被DCBI-MS方法检出。高效液相色谱法准确复检结果显示DCBI-MS的半定量结果可信。结论 DCBI-MS无需样品预处理,单个样品的分析时间不到1 min,辅助高效液相色谱法实现了减肥类违禁药物的快速、高通量、高精度检测。

**关键词:**解吸附电晕束离子源质谱; 辅助检测; 高效液相色谱法; 减肥类保健食品; 违禁药物

中图分类号:R151 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)04-0312-06

### Detection of illegal synthetic drugs in weight reducing dietary supplements by hybrid of DCBI-MS and HPLC-UV

Zhao Yong, Wang Hua, Zhu Huiguo, Wu Shuang, Sun Wenjian, Ding Li, Chen Bo

(Key Laboratory of Chemical Biology &amp; Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract: Objective** To use desorption corona beam ionization-mass spectrometry for rapidly screening illegal synthetic drugs in weight reducing dietary supplements, and precisely quantifying the suspected sample by HPLC-UV. **Methods** The qualitative identification of illegal additives, i. e., fenfluramine, phenolphthalein, sibutramine, N-desmethyilsibutramine, N-mono-desmethyilsibutramine in samples was performed by comparing MS and MS<sup>2</sup> spectra of samples with standard substances by DCBI-MS. Accurate quantitation of these five targets was obtained by HPLC-UV. **Results** The concentration of targets was linear in the range of 0.25-300 mg/L. Three illegal synthetic drugs in three of twelve samples were detected by DCBI-MS. The re-detecting results of HPLC-UV showed that the semi-quantitative results of DCBI-MS were credible. **Conclusion** Using DCBI-MS and cooperatively with HPLC-UV in detecting illegal synthetic drugs in weight reducing dietary supplements is fast, high-throughput and high-precision. Sample pretreatment is unnecessary when the determination of multiple components with DCBI-MS method. The analysis time for one aliquot is less than 1 min.

**Key words:** Desorption corona beam ionization (DCBI); auxiliary detection; high performance liquid chromatography (HPLC); weight reducing dietary supplements; illegal synthetic drugs

减肥类保健品一直是市场热点,品种繁多。违法添加药物的情况时有发生。常见的违禁药物芬

氟拉明、西布曲明等对长期食用者有血压升高、心律失常等巨大的危害。

常规减肥类保健食品中常见的违禁物检测主要针对一种或几种目标物<sup>[1-2]</sup>,利用薄层色谱、高效液相色谱以及液-质联用技术<sup>[3-5]</sup>等方法。目前的分析方法普遍存在前处理冗繁,溶剂消耗大,难以应对市场上数量大、品种多、更新周期短的产品,不适应对其中违禁添加物的普遍筛查。

近年,几种典型常压质谱<sup>[6]</sup>用于对食品、药品

收稿日期:2012-03-09

基金项目:国家“863”课题(2010AA023001);国家自然科学基金(20927005);湖南省科技计划课题项目(2010TT1001)

作者简介:赵勇 女 硕士生 研究方向为色谱与药物分析  
E-mail:lanhaiou1986@126.com

通信作者:陈波 男 博士 教授 研究方向为中药及色谱分析  
E-mail:dr-chenpo@vip.sina.com

直接分析<sup>[7-8]</sup>,均凸显出了直接离子化技术常压快速质谱快速、简便、准确的特点。解吸附电晕束电离(DCBI)是一种新兴的离子化技术<sup>[9-10]</sup>,主要优点是以惰性气体氦气作为放电介质,可在大气压下直接对分析物表面物质进行解吸电离。无试剂消耗,对环境不造成任何影响。另外解吸附电晕束电离特有的可见电晕束,可以定位样品待检区域,操作便捷准确。

但由于敞开式环境与解吸附机制,常压质谱多存在重现性低,定量精确度不高的缺陷,这使得DCBI-MS不适合独立作为精确定量的分析工具。

本文结合DCBI-MS快速检测与高效液相精确定量的特点,对减肥类保健品中违禁药物进行快速筛查,进而对疑似含有违禁药物的样品中的违禁药物进行精确定量,满足高通量、结果准确的检测需求。此方法不仅可用于保健食品中违禁药物的检测,对大批量检测复杂基质样品中其他违禁添加物的方法研究也具有借鉴意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Thermo Finnigan-LCQ 离子阱质谱(美国菲尼根质谱公司);解吸附电晕束电离(DCBI)源(日本岛津公司);岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司);

芬氟拉明、酚酞、西布曲明、单去甲基西布曲明、双去甲基西布曲明(中国生物药品检定所,纯度>99%);乙腈、甲醇(HPLC级,湖南化工研究院精细化工研究所);三乙胺、磷酸、甘油均为国产分析纯;超纯水(Millipore公司)。检测样品为本地市场购得的保健食品,各样品的配方组成见表1。

表1 检测样品成分

Table 1 Herbal ingredients contained in samples

样品	配方组成
样品一(茶)	绿茶、金银花、决明子、荷叶、绞股蓝、山楂、番泻叶、蜂蜜
样品二(茶)	乌龙茶、荷叶、山楂、泽泻、决明子、绞股蓝、茯苓
样品三(茶)	绞股蓝、银杏叶、茶多酚、乳糖
样品四(茶)	荷叶、决明子、山楂、桑叶、普洱茶
样品五(茶)	何首乌、金老梅、灵芝、山楂、决明子
样品六(胶囊)	何首乌、金老梅、灵芝、山楂、决明子
样品七(茶)	乌龙茶、泽泻、决明子、金银花、茯苓
样品八(茶)	郁李仁、魔芋、鸡内金、何首乌、人参、灵芝
样品九(胶囊)	郁李仁、魔芋、鸡内金、何首乌、人参、灵芝
样品十(胶囊)	何首乌、陈皮、昆布、荷叶、生山楂
样品十一(茶)	茶叶、绞股蓝、石决明、罗汉果、番泻叶、金银花等
样品十二(茶)	银杏叶、番泻叶、荷叶、决明子

### 1.2 样品处理

色谱分析:取胶囊内容物或茶状固体保健食品

研磨混匀后,精密称取1.00 g,用甲醇25 ml超声提取20 min,所得提取液在转速10 000 r/min下离心10 min,将上清液转移至50 ml容量瓶中,用甲醇定容至刻度得到原始溶液。精确量取2 ml样品溶液,置于10 ml容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀。过0.45 μm有机膜,备用。

质谱分析:取样品0.1 g置于陶瓷片指定位置,滴30 μl甘油混匀(防止样品分散,高温挥发快),将样品置于DCBI源的可见电晕束下采集信号。

### 1.3 实验条件

色谱条件:江申 Spherigel C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A:0.7% 三乙胺(磷酸调pH=3), B:乙腈。梯度洗脱程序:0~25 min, 30%~38.3% B; 25~30 min, 38.3%~90% B; 30~32 min, 90%~30% B; 32~46 min, 30% B;流速1.0 ml/min;检测波长225 nm和263 nm;进样量20 μl。

质谱条件:DCBI源正离子模式,工作电压3.5 kV,电离电流10 μA,解吸气(He)流速0.6 ml/min,载气温度180 °C。进样量5 μl。

离子阱质谱毛细管电压5 V,毛细管温度270 °C,管透镜电压15 V,一级质谱扫描范围80~550 amu。目标化合物结构信息通过碰撞诱导解离(CID)反应获得,母离子选择宽度为0.5 Da, CID碰撞能量为30%,碰撞时间为30 ms,其他条件系统自动优化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DCBI的快速鉴别

DCBI-MS对样品进行检测无需任何样品前处理,五种标准品可同时被检测,且均可以在1 min之内完成鉴定。如图1a所示,芬氟拉明(m/z 232.07)、双去甲基西布曲明(m/z 252.05)、单去甲基西布曲明(m/z 266.08)、西布曲明(m/z 279.83)、酚酞(m/z 318.92)以及内标物西地那非(m/z 474.87)均以质子加合离子形式出现,且各化合物在质谱图中没有相近质荷比离子干扰。

将两种空白胶囊样品和两种空白茶叶样品等量混合按照1.2方法进行提取得到的提取液作为空白样品基质。将各目标物浓度为10、50、100 μg/ml混标分别加入空白样品基质与空白净溶剂中,比较其色谱图峰面积,各目标成分的偏差均小于10%,表明本方法的样品基质效应对方法的影响并不明显。图1b为空白加标样品质谱图,目标物谱峰明确。

为验证在一级谱图中出现的各准分子离子峰

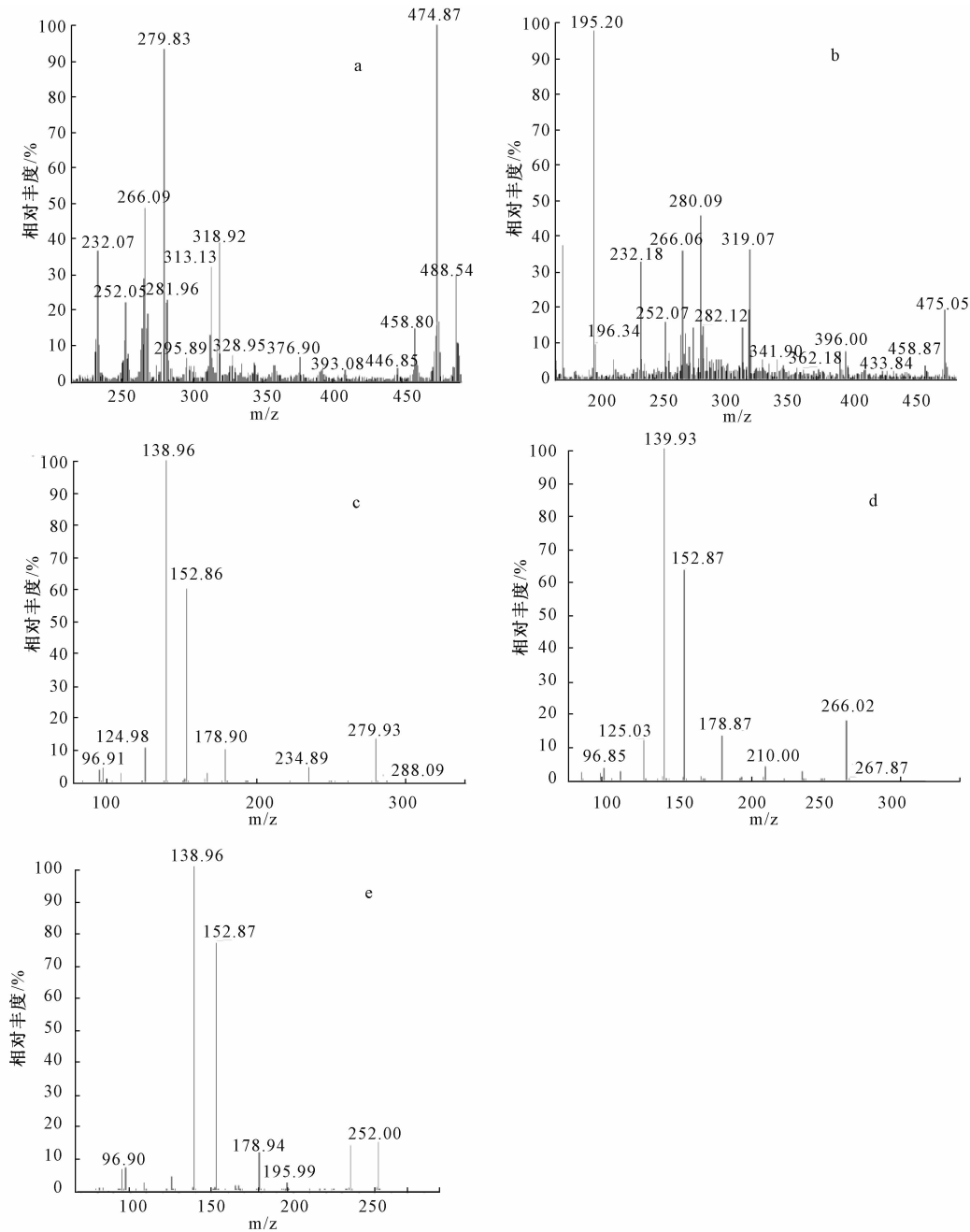


图1 a 5种目标物和内标混合标准品的准分子离子质谱图；b 空白加标样品质谱图；c 西布曲明分子离子的二级质谱图；  
d 单去甲基西布曲明分子离子的二级质谱图；e 双去甲基西布曲明分子离子的二级质谱图  
Figure 1a Molecular ion mass spectra of 5 illegal drug and mixed with internal standard in full scan modes；b. Mass spectra of blank sample spiked with standards；c. MS<sup>2</sup> spectra of molecular ions for sibutramine；d. MS<sup>2</sup> spectra of molecular ions for N-mono-desmethylsibutramin；e. MS<sup>2</sup> spectra of molecular ions for N-di-desmethylsibutramine

的专属性,又对五种目标离子进行二级质谱确证。以西布曲明、单去甲基西布曲明和双去甲基西布曲明为例,其二级谱图如图1c、1d、1e。3种物质因其母核结构相同,在二级谱图中可以观察到相同碎片离子 m/z 138.9 和 m/z 152.8。同时未完全裂解的母离子进一步确证了一级谱图中出现的离子为目标化合物。

### 2.2 DCBI的半定量分析

常压离子化技术受限于敞开式环境和未处理

的样品,一般不用于定量分析。但减肥类产品为了追求疗效违禁添加物的含量常均处在一个较高的水平,DCBI-MS能在合理的浓度范围内给出较可靠的定量值。因此可以利用DCBI的半定量分析对检测样品进行筛选,并且为后续的准确定量提供依据。实验中,以西地那非为内标,利用目标物的选择离子峰面积,分别以内标法和外标法对目标化合物进行定量分析。内标法得出结果如表2。

表2 DCBI-MS方法中五种目标物的线性范围和检出限

Table 2 Calibration curves and detection limits of five targets detected by DCBI-MS

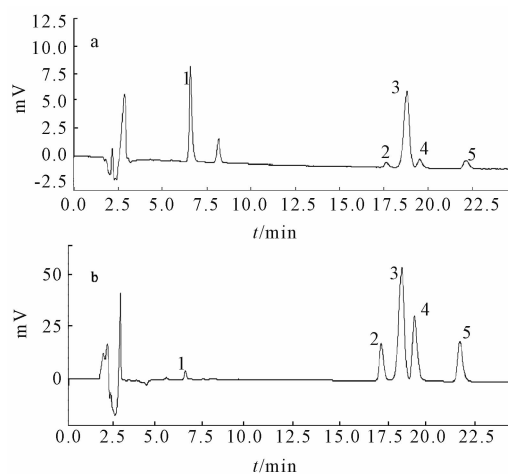
化合物名称	线性范围 ( $\mu\text{g/ml}$ )	线性方程	相关系数	检出限 ( $\mu\text{g/ml}$ )
芬氟拉明	5 ~ 200	$y = 0.0061x + 0.0467$	0.9155	1.5
酚酞	5 ~ 200	$y = 0.0144x + 0.0206$	0.9814	1.5
西布曲明	5 ~ 200	$y = 0.0185x + 0.0701$	0.9318	1
单去甲基西布曲明	5 ~ 200	$y = 0.0698x + 0.0707$	0.9618	1
双去甲基西布曲明	5 ~ 200	$y = 0.0384x + 0.0268$	0.9436	1

在利用二级质谱图中最大丰度子离子进行定量时,外标法结果显示定量重现性较差,精密度低。其中5个浓度标准样品的线性相关系数最好的芬氟拉明仅为0.9899,最差的单去甲基西布曲明则低至0.2482,已经完全失去线性。结果表明,利用DCBI-MS进行目标化合物的定量分析时,需通过一级离子在时间谱图上的峰面积来计算,从而实现半精度定量。

### 2.3 HPLC的检测结果

基于DCBI技术的半定量结果,利用HPLC-UV对疑似检出样品进行进一步精确定量分析。图2为5种目标物标准品的分离色谱图。

在空白样品基质中加入芬氟拉明、酚酞、西布曲明、单去甲基西布曲明、双去甲基西布曲明对照品溶液,制备3种浓度(低、中及高)的样品。各目标物浓度:第1种样品中均为 $1 \mu\text{g/ml}$ ;第2种样品均为 $50 \mu\text{g/ml}$ ,第3种样品均为 $100 \mu\text{g/ml}$ 。每一种浓度平行制备3份。同时用净溶剂配置3种等浓度对照液,进行HPLC-UV分析,考察基质效应。基质效应为加标基质中分析物峰面积( $A_1$ )与相应加



1:芬氟拉明;2:双去甲基西布曲明;3:单去甲基西布曲明;  
4:酚酞;5:西布曲明

a 检测波长 263 nm; b 检测波长 225 nm

图2 HPLC-UV方法中5种药物的色谱图

Figure 2 Chromatogram of the 5 drugs by HPLC-UV

标净溶剂中分析物峰面积( $A_2$ )之比。HPLC-UV定量检测和基质效应结果见表3。

表3 HPLC-UV方法中五种目标物的线性范围和检出限

Table 3 Calibration curves and detection limits of five targets by HPLC-UV

化合物名称	线性范围 ( $\mu\text{g/ml}$ )	线性方程	相关系数	检出限 ( $\mu\text{g/ml}$ )	浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	基质效应
芬氟拉明	0.25 ~ 300	$y = 45603x + 67215$	0.9990	0.1	1	1.03
					50	0.98
					100	1.01
酚酞	0.25 ~ 300	$y = 29969x + 22923$	0.9992	0.1	1	0.94
					50	0.99
					100	1.03
西布曲明	0.25 ~ 300	$y = 29998x + 16147$	0.9993	0.05	1	1.05
					50	0.97
					100	1.04
单去甲基西布曲明	0.25 ~ 300	$y = 45593x + 49801$	0.9990	0.05	1	0.95
					50	0.98
					100	0.93
双去甲基西布曲明	0.25 ~ 300	$y = 26825x + 17558$	0.9990	0.05	1	1.01
					50	0.99
					100	1.03

由表3可见,HPLC-UV法线性范围宽,重现性好,基质对分析物的分析干扰小,定量结果准确。

### 2.4 实际样品检测结果

DCBI-MS对12个检测样品中违禁药物进行定

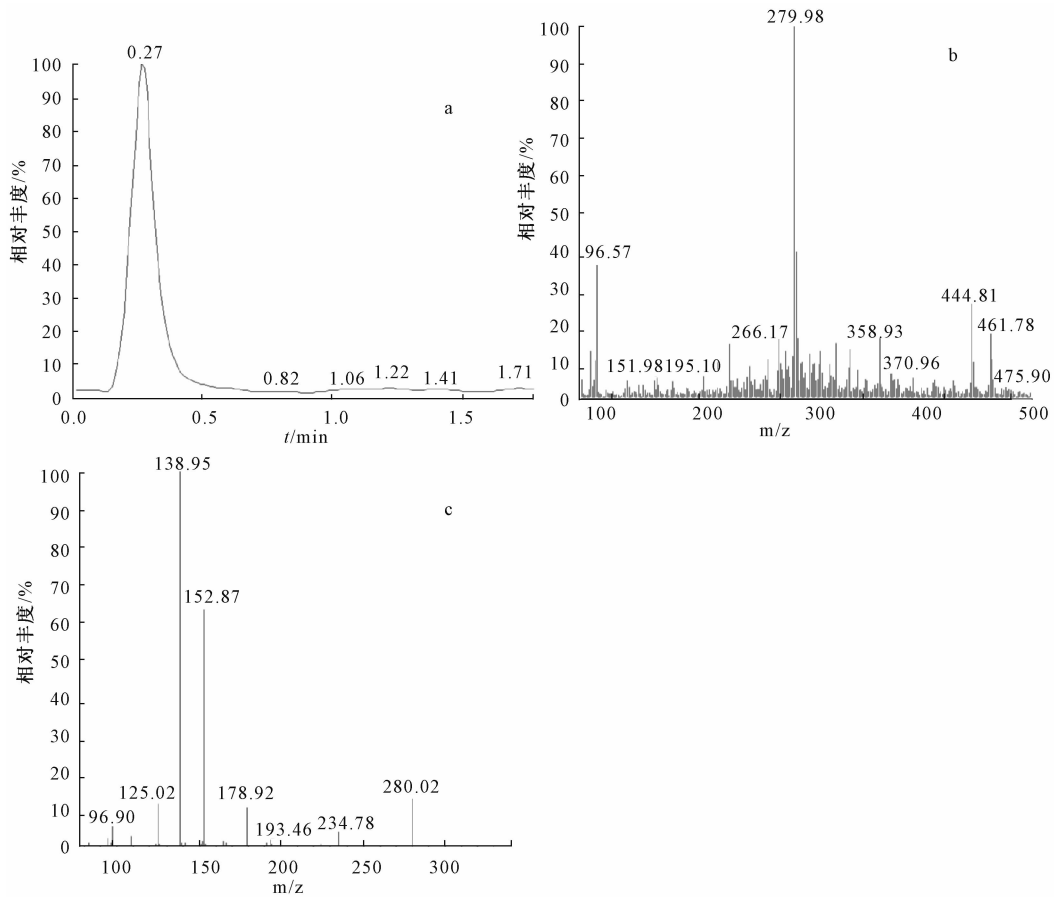


图3 a 样品中西布曲明的选择离子流图; b 样品的质谱图; c 样品中西布曲明的 m/z 280 的子离子谱图

Figure 3 a SIR chromatograms of sibutramine in sample. b Mass spectra of sample.

c Ion mass spectrum of m/z 280 of sibutramine in sample

性鉴别。结果显示,其中1个样品中含单去甲基西布曲明;2个样品中含西布曲明。图3为样品二中西布曲明的选择离子流图和样品的质谱图,从图中可以看出,单个样品检测的时间在0.82 min就可以完成,且信号良好。

HPLC-UV方法定性结果与DCBI-MS一致。分别在1个样品中检测到0.5%的单去甲基西布曲明,另外2个样品中分别检测到3.27%和0.03%西布曲明,说明DCBI-MS可以为HPLC-UV方法提供重要依据。若每个样品的DCBI-MS检测时间为 $T_d$ (约1 min),HPLC-UV检测时间为 $T_h$ (约22.5 min),DCBI-MS对 $N$ (12)种样品进行初筛再HPLC-UV对 $m$ (3)个阳性样品精确定量需要的时间为 $N \times T_d + m \times T_h$ ( $12 \times 1 + 3 \times 22.5 = 79.5$  min),若 $N$ (12)种样品全部用HPLC-UV检测则需要 $N \times T_h$ ( $12 \times 22.5 = 270$  min),因此可以得出结论,DCBI-MS辅助HPLC-UV检测减肥类违禁添加物是一种既快速又准确的方法。

## 2.5 方法展望

DCBI-MS虽有很高的灵敏度,但人工手动进样的误差使重现性变差,准确定量存在一定的局限性,针对这一局限性,良好的样品富集装置和标准

进样装置还有待研究。

## 3 结论

通过DCBI-MS的快速半定量筛选,并进一步对疑似检出违禁药物的样品通过准确的高效液相方法完成定性定量检测,既弥补了敞开式质谱定量不精确的缺陷,又避免了对全部检测样品进行费时、高耗的色谱检测。

## 参考文献

- [1] 陈稚,吴都督. HPLC/ESI-MS测定减肥保健食品中的双去甲基西布曲明[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(1):24-26.
- [2] 黄诺嘉,杨文红,黄奕滨. 减肥类中成药、保健食品、食品中非法添加酚酞、西布曲明等化学成分的快筛检测方法研究[J]. 食品与药品,2011,13(3):114-117.
- [3] SO H K, JEONGMI L, TAEHYUNG Y, et al. Simultaneous determination of anti-diabetes/anti-obesity drugs by LC/PDA, and targeted analysis of sibutramine analog in dietary supplements by LC/MS/MS[J]. Biomed Chromatogr,2009,23:1259-1265.
- [4] WANG Juan, CHEN Bo, YAO Shouzhao. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS[J]. Food Addit Contamin, 2008, 25(7):822-830.

- [5] 沈国芳,余菁,励炯. UPLC-MS/MS 法快速检测减肥类保健品中的芬氟拉明和西布曲明[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(11):2465-2467.
- [6] 陈焕文,胡斌,张燮. 复杂样品质谱分析技术的原理与应用[J]. 分析化学,2010,38(8):1069-1088.
- [7] 陈焕文,张燮,罗明标. 电喷雾解析电离质谱法对食品中苏丹红染料的快速检测[J]. 分析化学,2006,34(4):464-468.
- [8] CHEN Huanwen, TALATY N, TAKATS Z, et al. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry for High-Throughput Analysis of Pharmaceutical Samples in The Ambient Environment[J]. Anal Chem,2005,77(21):6915-6927.
- [9] LI Xiang, WANG Hua, SUN Wenjian, et al. Desorption corona beam ionization coupled with a poly(dimethylsiloxane) substrate: broadening the application of ambient ionization for Water Samples[J]. Anal Chem,2010,82:9188-9193.
- [10] WANG Hua, SUN Wenjian, ZHANG Junsheng, et al. Desorption corona beam ionization source for mass spectrometry[J]. Analyst, 2010,135:688-695.

## 实验技术与方法

# 固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾离子源-串联质谱法 测定人血中羟基化多溴联苯醚

施玉泉<sup>1,2</sup>, 闻胜<sup>2,3</sup>, 李敬光<sup>2</sup>, 赵云峰<sup>2</sup>, 吴永宁<sup>1,2</sup>

(1. 武汉工业学院食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050; 3. 湖北省疾病预防控制中心, 武汉 430072)

**摘要:**目的 建立了固相萃取(SPE)柱萃取和净化、超高效液相色谱-电喷雾离子源-串联质谱(UPLC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS)检测血液中11种羟基化多溴联苯醚(OH-PBDEs)的方法。方法 对流动相和SPE萃取条件进行了优化。结果 人血液加标回收率53.2%~117.9%,相对标准偏差4.71%~18.85%,检出限0.00886~0.0589 ng/ml。结论 本方法不需要衍生化,灵敏度高、准确度和精密度好,简便快速,溶剂消耗量少,适用于人血样品中羟基化多溴联苯醚的测定。

**关键词:**固相萃取;超高效液相色谱-电喷雾离子源-串联质谱;羟基化多溴联苯醚;人血

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)04-0317-05

## Determination of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in human blood by using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Shi Yuquan, Wen Sheng, Li Jingguang, Zhao Yunfeng, Wu Yongning

(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

**Abstract: Objective** A simplified analytical method comprised of solid-phase extraction (SPE) and ultra performance liquid chromatography coupled with negative electrospray ion source tandem mass spectrometry (UPLC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS) has been developed for the determination of eleven hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) in human blood.

**Methods** The solvent for the mobile phase and the SPE conditions were optimized. **Results** The recoveries of the OH-PBDEs spiked in human blood relative to internal standards were in the range of 53.2%-117.9% at three spiked levels. The relative standard deviations (RSD) were 4.71%-18.85%. The limits of detection (LOD, S/N=3) was in the range of 0.00886-0.0589 ng/ml. **Conclusion** The proposed method is sensitive, accurate, fast, simple, low solvent consumption and suitable for the determination of OH-PBDEs in human serum without derivatization.

**Key words:** SPE; UPLC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS; OH-PBDEs; human blood

收稿日期:2012-04-09

基金项目:国家自然科学基金(20907048);卫生公益性科研专项(200902009);湖北省卫生厅青年人才(QJX-2010-33)

作者简介:施玉泉 男 硕士 研究方向为食品安全 E-mail:syq19860108@163.com

通信作者:吴永宁 男 研究员 博士生导师 研究方向为食品安全 E-mail:wuyncdc@yahoo.com.cn

闻胜 男 博士后 研究方向为食品安全 E-mail:wenshenggy@yahoo.cn