

Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry The on of addition of diacetphenol and bispropofol

Fei Wang

Bozhou Food and Drug Control Institute, Bole, Xinjiang, 833400, China

Abstract

In this study, the analytical method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-M S/MS) was established. The samples were optimized by three extraction methods (80 °C methanol water extraction, quartz sand grinding, diatomite assisted extraction), separated by BEH C18 column, detected by multiple reaction monitoring (MRM) mode, and quantified by external standard method. The results showed that the recovery rate (91%, 90% propofol 90%), and the matrix effect was negligible. The method has high sensitivity (detection limit 20 μ g/kg, quantification limit 50 μ g/kg), which is suitable for the rapid detection of high-risk illegal additives in bariose.

Keywords

diacetophl; ultra-high performance liquid chromatography-series mass spectrometry; weight loss jelly; diatomite extraction

超高效液相色谱—串联质谱法快速测定减肥软糖中非法添加双醋酚丁及双丙酚丁的研究

王飞

博州食品药品检验所, 中国·新疆 博乐 833400

摘 要

本研究建立了超高效液相色谱—串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 快速测定减肥软糖中双醋酚丁和双丙酚丁的分析方法。样品经三种提取方式 (80℃ 甲醇水提取、石英砂研磨后提取、硅藻土辅助提取) 优化后, 采用 BEH C18 色谱柱分离, 多反应监测 (MRM) 模式检测, 外标法定量。结果表明, 硅藻土辅助提取法回收率最高 (双醋酚丁 91%, 双丙酚丁 90%), 基质效应可忽略。方法灵敏度高 (检出限 20 μ g/kg, 定量限 50 μ g/kg), 适用于减肥软糖中高风险非法添加物的快速检测。

关键词

双醋酚丁; 双丙酚丁; 超高效液相色谱—串联质谱法; 减肥软糖; 硅藻土提取

1 引言

近年来, 随着肥胖问题日益严重, 减肥类食品市场需求激增。然而, 部分不良商家为追求产品效果, 非法添加高风险化学药物 (如双醋酚丁、双丙酚丁等) 的现象屡禁不止。这类化合物具有强刺激性泻药作用, 长期摄入可能导致肠道功能紊乱、电解质失衡甚至致癌风险^[1-2]。目前, 我国已对传统减肥药物 (如西布曲明、酚酞) 建立了严格的监管体系, 但新型酚丁类衍生物因缺乏标准检测方法, 仍存在监管盲区^[3-4]。文献报道显示, 此类药物在酵素果冻、咖啡等食品中频繁检出^[5], 但针对软糖等复杂基质的研究仍属空白。

减肥软糖因质地黏稠、添加剂多样 (如明胶、糖浆),

其样品前处理难度显著高于液体或粉末类食品。现有检测方法多采用直接溶剂提取或简单超声处理, 但存在目标物释放不完全、基质干扰严重等问题^[6-7]。通过常规的加标回收验证实验, 由于提取不完全, 直接加入标准物质回收率实验不具有质量控制的意义。经阳性样品制备后的回收率验证, 传统提取方法回收率一般在 40% 左右。近年来, 硅藻土、石英砂等吸附剂因能有效破坏基质结构、提高提取效率, 逐渐应用于食品检测领域^[8-9], 但其在减肥软糖中的适用性尚未验证。基于此, 本研究结合超高效液相色谱—串联质谱技术 (UPLC-MS/MS), 系统优化提取方法, 建立一种高效、可靠的检测方案, 为减肥软糖中非法添加物的监管提供技术支持。

【作者简介】王飞 (1986-), 男, 中国河南永城人, 本科, 高级工程师, 从事食品检测, 食品检测实验室管理研究。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

双醋酚丁标准品 (Bepure,1000 μg/mL)、双丙酚丁标准品 (Bepure,1000 μg/mL); 甲醇、乙腈 (色谱纯): Fisher (金标); 甲酸 (色谱纯): 阿拉丁试剂; 石英砂 (60 目)、硅藻土 (分析纯): 国药集团; 超纯水。

2.2 仪器与设备

I-Class/XEVO TQD 质谱仪 (美国 Waters 公司); BILON-650CT 超声波清洗仪 (上海比朗仪器有限公司); 涡旋混匀仪 (深圳逗点有限公司); 5430R 高速离心机 (eppendorf)。

2.3 实验方法

2.3.1 标准物质的配置

10 mg/L 标准中间溶液: 取各标准储备液 0.1mL 于 10 mL 容量瓶, 并用乙腈定容。

标准系列工作液: 吸取适量标准中间溶液用 80% 甲醇溶液 (含 0.1% 甲酸) 稀释, 得到质量浓度分别为 1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 的标准系列工作液。

2.3.2 阳性回收样品制备

称取 50 g 软糖基质 (主要成分为明胶、麦芽糖浆), 加入 450 mL 水, 加热并持续不断搅拌至样品溶解, 边搅拌边冷却, 80℃时分别添加双醋酚丁、双丙酚丁标准储备液 (1000 mg/L) 各 25 μL、50 μL、250 μL 混匀后冷却成型, 即制得组分含量为 50 μg/kg、100 μg/kg、500 μg/kg 的阳性样品。

2.3.3 样品前处理

方法 1 (80℃甲醇水提取): 称取 1.0 g 软糖样品, 加入 20 mL 含 0.1% 甲酸的 80% 甲醇水溶液, 称重, 80℃水浴超声提取 20 min, 冷却后补足重量, 离心后过 0.22 μm 滤膜。

方法 2 (石英砂研磨提取): 样品与 1 g 石英砂研磨至均质, 加入 20 mL 含 0.1% 甲酸的 80% 甲醇水溶液, 称重, 80℃水浴超声提取 20 min, 冷却后补足重量, 离心后过 0.22 μm 滤膜。

方法 3 (硅藻土辅助提取): 样品与 1 g 硅藻土混合, 研磨至均质。加入 20 mL 含 0.1% 甲酸的 80% 甲醇水溶液, 称重, 80℃水浴超声提取 20 min, 冷却后补足重量, 离心后过 0.22 μm 滤膜。

2.3.4 色谱条件

色谱柱: Waters BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 流速为 0.2mL/min; 进样量: 2 μL; 柱温: 40℃; 梯度洗脱程序: 0 ~ 2 min, 5% B; 2 ~ 5 min, 5% ~ 90% B; 5 ~ 6.5 min, 90% B; 6.5 ~ 7 min, 90% ~ 5% B; 7 ~ 8 min, 5% B。

2.3.5 质谱条件

质谱参数: ESI⁺ 模式, 毛细管电压 2.2 kV, 脱落剂气温度 500℃, 离子源温度 150℃, 其他条件见表 1。

表 1 双醋酚丁与双丙酚丁的质谱参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)	保留时间 (min)
双醋酚丁	402.2	224.1*	40	25	5.63
		266.1		10	
双丙酚丁	430.2	224.0*	55	16	5.92
		280.1		9	

注: * 为定量离子

3 实验优化结果

软糖中含有大量的增稠剂, 如卡拉胶、明胶等, 同时含有大量的麦芽糖等物质。这些增稠剂和糖类的存在使软糖需要在 80℃水浴加热才能完全溶解。通过常规的 80℃水浴加热超声的提取方法, 阳性回收样品的回收率低于 40%。因此常规的加标回收验证实验, 由于提取不完全, 直接加入标准物质回收率实验不具有质量控制的意义。

本实验采用了阳性回收样品制备的办法考察回收率。在阳性回收样品 50、100、500 μg/kg 三个添加水平下, 双醋酚丁和双丙酚丁的回收率见表 1。硅藻土辅助提取法显著优于其他方法 (P<0.05), 其高吸附性可有效释放目标物。

表 2 三种提取方法的平均回收率 (n=7)

化合物	添加水平 (μg/kg)	方法 1 回收 率 (%)	方法 2 回收 率 (%)	方法 3 回收 率 (%)
双醋酚丁	50	44.5	81.0	91.2
	100	44.6	82.3	91.3
	500	46.9	84.1	92.4
双丙酚丁	50	41.2	79.2	93.5
	100	42.5	80.0	93.5
	500	47.8	83.5	94.9

4 方法学验证

4.1 线性范围、检出限与定量限

以使用硅藻土均质, 采用 80% 甲醇水溶液 (含 0.1% 甲酸) 为溶剂提取后的基质溶液, 配制双醋酚丁和双丙酚丁的系列混合标准溶液 (浓度范围: 1、2、5、10、20、50、100 ng/mL), 直接进样分析。以目标物浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 建立标准曲线。结果显示, 两种化合物在 1~100 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数 (r) 均大于 0.999 (表 1)。以信噪比 (S/N) ≥3 和 ≥10 分别确定方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 双醋酚丁和双丙酚丁的 LOD 均为 20 μg/kg, LOQ 均为 50 μg/kg。

表 3 线性方程、检出限与定量限

化合物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 (r)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
双醋酚丁	1~100	$y = 2573.1x + 263.244$ $y=2573.1x+263.244$	0.9999	20	50
双丙酚丁	1~100	$y = 4778.99x + 645.406$ $y=4778.99x+645.406$	0.9996	20	50

4.2 回收率与精密度

使用阳性回收样品，按定量限（50 μg/kg）、2 倍定量限（100 μg/kg）及 10 倍定量限（500 μg/kg）三个水平进行阳性样品加标回收实验，结果显示方法的准确度与精密度均满足检测要求（回收率 80%~120%，RSD ≤15%）。（见表 2）

4.3 基质效应考察

基质效应（matrix effect，ME）是液质分析中经常存在的问题。采用比较基质提取液和纯溶剂中 3 种目标物混合响应值，以评估基质效应。ME < 90% 或 ME > 110%，存在基质抑制或增强作用，90% ≤ ME ≤ 110%，则无明显基质效应。

用 80% 甲醇水溶液（含 0.1% 甲酸）配制质量浓度分别为 1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 的系列标准工作液，用硅藻土提取方法提取的空白基质提取液配制 10、50、100 ng/mL 3 个基质标准液，用溶剂配制的标准系列工作曲线来校准计算得出 3 个基质标准液的相应浓度。结果测得两种化合物的 3 个浓度范围为 9.31 ~ 9.59 ng/mL、47.6 ~ 47.0 ng/mL、95.4 ~ 95.9 ng/mL，3 个浓度范围比均在 90% ~ 110% 范围内。因此，改进的方法无明显的基质效应。

表 4 基质效应考察结果

化合物	基质标准液浓度 (ng/mL)	溶剂曲线校准浓度 (ng/mL)	ME(%)
双醋酚丁	10	9.31	93.1
	50	47.6	95.2
	100	95.9	95.9
双丙酚丁	10	9.41	94.1
	50	47.0	94.0
	100	95.4	95.4

5 结果与讨论

本研究建立的 UPLC-MS/MS 方法结合硅藻土辅助提取法，可高效检测减肥软糖中双醋酚丁和双丙酚丁，回收率高达 90% 以上，经方法学验证，可作为软糖中双醋酚丁和双丙酚丁的监测检验方法。

参考文献

[1] Beyaz Coskun A, Sagdigoğlu Celep A G. Therapeutic modulation methods of gut microbiota and gut-liver axis [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62 (23): 6505-6515.

[2] van de Koppel S, Ekhardt C, Roelen C, et al. An Indonesian slimming drug with undeclared ingredients causing harm [J]. Drug Testing and Analysis, 2023, 15 (6): 695-700.

[3] 国家市场监督管理总局. 食品补充检验方法: BJS 202209 [S]. 2022.

[4] 刘家丽. 食品中非法添加物质情况及其检测方法研究概述[J]. 中国食品药品监督, 2022 (8): 90-95.

[5] Yun J, Choi J, Kwon K, et al. Screening of anti-obesity drugs, their analogues and prohibited ingredients in slimming foods [J]. Korean Journal of Food Science and Technology, 2016, 48 (5): 424-429.

[6] 王若松. QuEChERS-液相色谱—串联质谱法快速测定保健食品中双醋酚丁含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12 (19): 7675-7680.

[7] 黄康惠, 卢鑫, 周燕, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定食品中双酚丁等泻火药物[J]. 食品科技, 2023, 48 (6): 301-307.

[8] 范春蕾, 陈达杰, 陈倩倩, 等. 植物源性保健食品中60种非法添加物同时测定方法研究[J]. 中国口岸科学技术, 2023, 5 (7): 39-46.

[9] 张毅, 夏义平, 林启惠, 等. 固相萃取—高效液相色谱法测定果冻中8种人工合成色素[J]. 现代预防医学, 2018, 45 (19): 3581-3585.