Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

快速筛查四种抗炎/降血糖类保健食品中非法添加的化学成分

范自全，白旭
沃特世科技（上海）有限公司

应用优势

本实验在UNIFI®数据处理平台上，针对已知和未知的“非法添加”成分，成功地建立起一种快速准确的分析筛查方法。该方法具有下列优势：

- 采用Waters®专利的MS^E的数据采集模式，一针进样即可得到所有峰的分子离子和相应的子离子信息
- 采用基于Oracle关系型数据库的UNIFI系统鉴定已知或未知的成分，数据库是开放性的，用户可以自己添加化合物和编辑数据库
- 功能强大的UNIFI软件提供多种工作流程，将科学数据库和灵活数据处理及报告模板相结合，使工作流程简单化，大大提高工作效率

关键词

保健食品，非法添加，成分筛查，UNIFI，抗炎，降血糖

简介

随着人们生活节奏逐渐加快，工作压力增大，越来越多的人处于亚健康状态，具有调节人体机能的保健食品逐渐受到人们的欢迎。但保健食品不是药物，不具有治疗效果。市售的保健食品以“纯天然，效果佳、无毒副作用”等宣传手段博得消费者的青睐，经中国消费者协会调查显示，有相当比例的保健食品存在“非法添加”现象。保健食品中非法添加的化学成分，对食用者危害极大，严重影响食用者的用药安全。

日趋严重的形势也得到了相关部门的重视，随着国家对“非法添加”问题的重视程度与打击力度的加大，“非法添加”现象得到一定程度的抑制，但同时也出现了一些新的问题，如添加的化学成分种类增多、对照品获取难等[1,2]。这些问题的出现给“非法添加”化学成分的检测带来了严重挑战。因此，需要建立一种快速、准确、专属性强的方法对“非法添加”成分进行筛查，为保健食品的安全提供支持依据。

实验

样品制备

共收集到4份市售保健食品，样品剂型分为胶囊和丸剂，将样品研磨成粉状后，分别称取样品10 mg，加入MeOH/H_2O＝50/50 (v/v) 超声提取10 min，至终浓度1.0 mg/mL，备用。

LC条件

系统：	ACQUITY UPLC® I-Class
色谱柱：	ACQUITY® BEH C_{18}，2.1 × 100 mm，1.7 µm
柱温：	40 ˚C
进样量：	1 µL
流速：	400 µL/min
流动相A：	0.2 mM 甲酸铵的水溶液（含0.1% 甲酸）
流动相B：	乙腈 (含0.1% 甲酸)

MS条件

MS系统：	Waters Xevo® G2-S QTof™
采集模式：	分辨率模式ESI^+，MS^E
毛细管电压：	3 kV
锥孔电压：	30 V
源温度：	150 ˚C
雾化气温度：	450 ˚C
雾化气流速：	800 L/h
锥孔气流速：	20 L/h
采集质量范围：	50–1200 Da
Lock mass：	亮氨酸脑啡肽（LE）400 ng/mL
扫描时间：	0.1 s
碰撞能量：	Low CE，6 eV High CE，15-40 eV

结果与讨论

本实验采用超高效液相色谱与四级杆飞行时间质谱对收集到的4种保健食品进行检测，采用UNIFI软件进行数据处理，实验结果表明：4种保健品均含有非法添加成分，结果如表1所示。

样品	添加成分	分子式	碎片离子数	*m/z*	误差[a]	数据库RT[b]	实际RT[c]	响应	加合物
未知胶囊1	吡咯昔康	$C_{15}H_{13}N_3O_4S$	5	332.0704	0.4	4.09	3.95	224693	+H, +Na
	吲哚美辛	$C_{19}H_{16}ClNO_4$	4	358.0837	-0.3	5.35	5.16	72638	+H, +Na
	双氯芬酸钠[d]	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	2	296.0237	-0.3	5.17	5.17	33761	+H
未知胶囊2	盐酸苯乙酸胍	$C_{10}H_{15}N_5$	5	206.1400	0.0	2.31	2.25	324977	+H
	马来酸罗格列酮	$C_{18}H_{19}N_3O_3S$	2	358.1217	-0.3	2.93	2.90	130565	+H
	格列本脲	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$	3	494.1523	1.2	5.30	5.09	264315	+H, +Na
未知胶囊3	盐酸苯乙双胍	$C_{10}H_{15}N_5$	5	206.1399	-0.1	2.31	2.25	326257	+H
	格列本脲	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$	4	494.1510	-0.1	5.30	5.09	154345	+H, +Na
伸筋壮骨丸	对乙酰氨基酚	$C_8H_9NO_2$	1	152.0704	-0.2	1.74	1.70	2084	+H
	甲氧苄啶	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	4	291.1467	1.5	2.40	2.34	2221	+H
	吡咯昔康	$C_{15}H_{13}N_3O_4S$	5	332.0702	0.3	4.09	3.95	340434	+H, +Na
	吲哚美辛	$C_{19}H_{16}ClNO_4$	4	358.0836	-0.4	5.35	5.16	54788	+H, +Na
	保泰松	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	4	309.1592	-0.6	5.59	5.38	6429	+H, +Na
	双氯芬酸钠[d]	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	2	296.0234	-0.5	5.17	5.17	85289	+H

表1. 4种保健品的检测结果。
注：a，单位为mDa; b，保留时间（分钟）；c，保留时间（分钟）；d，通过鉴定后添加成分。

本实验采用ACQUITY UPLC I-Class及Xevo G2-S QTof系统进行测定，UNIFI软件进行数据处理，对保健食品中“非法添加”成分建立了系统的筛查方法，完成了4种市售保健食品中“非法添加”成分的快速筛查和鉴定。

准确的筛查结果取决于采集到的高质量质谱数据。本方案中采用了具有沃特世专利的非数据依赖型MS^E采集方式，此方式由“低碰撞能”与“高碰撞能”两种扫描交替构成，分别记录母离子及碎片离子信息，使我们在一次液质分析中同时获得所有峰的精确母离子和相应的子离子碎片信息（如图1所示）。

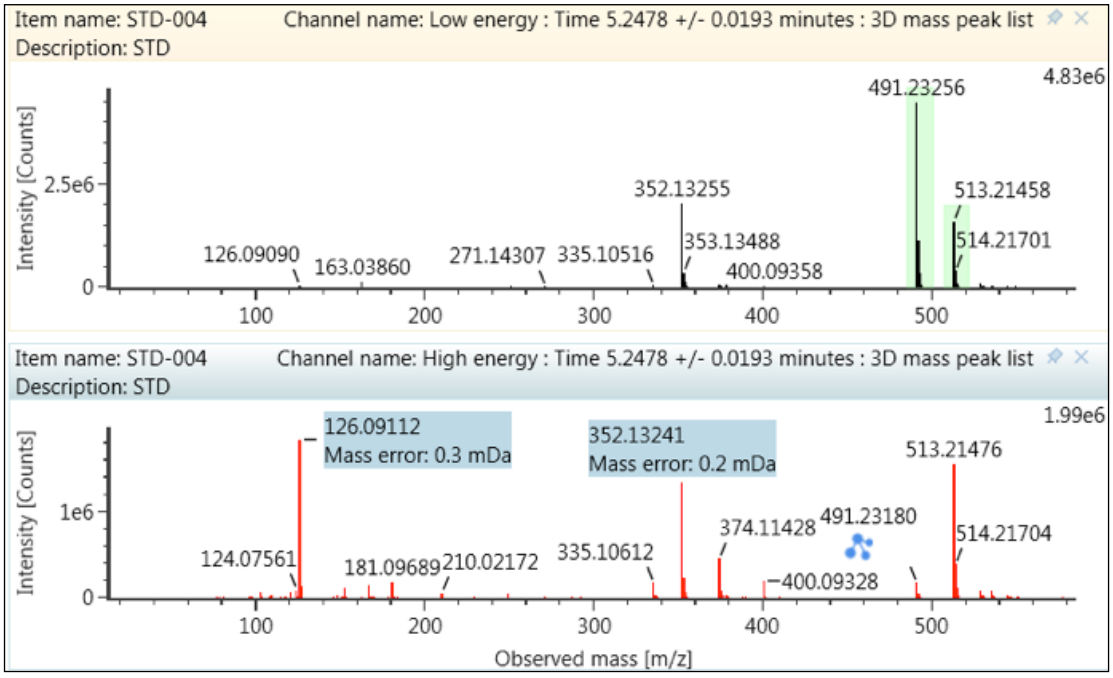

图1. MS^E数据采集方式采集的质谱图。低碰撞能ESI+模式下的质谱扫描图（上图）提供母离子信息；高碰撞能ESI+模式下的质谱扫描图（下图）提供子离子碎片信息。

根据检测目的的不同，保健食品中化学成分添加检测分为两种：目标性分析和非目标性分析。保健食品基质非常复杂，所能添加的化学成分种类繁多，样品中潜在的目标化合物的种类、数量和浓度的差异性为非法添加检验工作也带来了相当大的挑战。

我们应用UNIFI科学数据库解决上述所有难题。该数据库综合母离子、碎片离子和保留时间等数据，并将每个化合物做了药效学分类，用户可根据化合物的中文名称、英文名称或分类检索非法添加的成分。这些成分的母离子、碎片离子和保留时间数据均为基于标准品在同样的采集方法下采集到的数据。本实验通过UNIFI软件对采集到的样品数据与数据库进行匹配，针对数据库已有的“目标性”化合物，该软件通过保留时间、精确质量数及二级碎片等多种要素进行确证，以提高检测准确度、减少“假阳性”结果。样品只需一针进样即可得到所有相关信息，自动通过软件处理数据，给出报告，大大提高非法添加的分析效率。

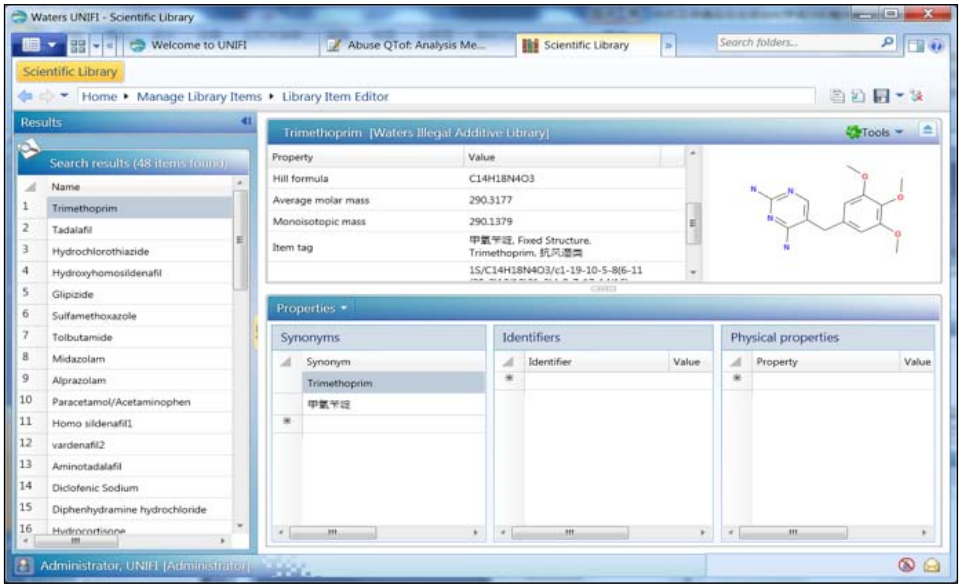

图2. 非法添加数据库的基本结构及其包含的信息，化合物的名称（中文名与英文名），化学结构、分子式、精确质量以及药效学分类。

随着造假手段的提高，保健食品中添加的化学成分的种类趋向于完全“未知”的化合物。常规的检测方法中，对完全未知成分的定性是一项比较困难的工作。UNIFI非法添加数据库可贵之处在于，它可方便直观地确认和添加之前“未知”的化合物，便于根据不同需求不断扩充完善。功能强大的UNIFI软件提供了“说明工具栏”，直接链接到586个在线数据库自动检索。它提供“手动鉴定”、“元素组成分析”、“碎片离子匹配”及结构类似物的“共有碎片离子”[3]匹配等功能，以实现对未知化合物的鉴定，并可将结构直接倒回数据库中，有利于提高未来分析的有效性，让研究者不再受未知分析物的困扰。

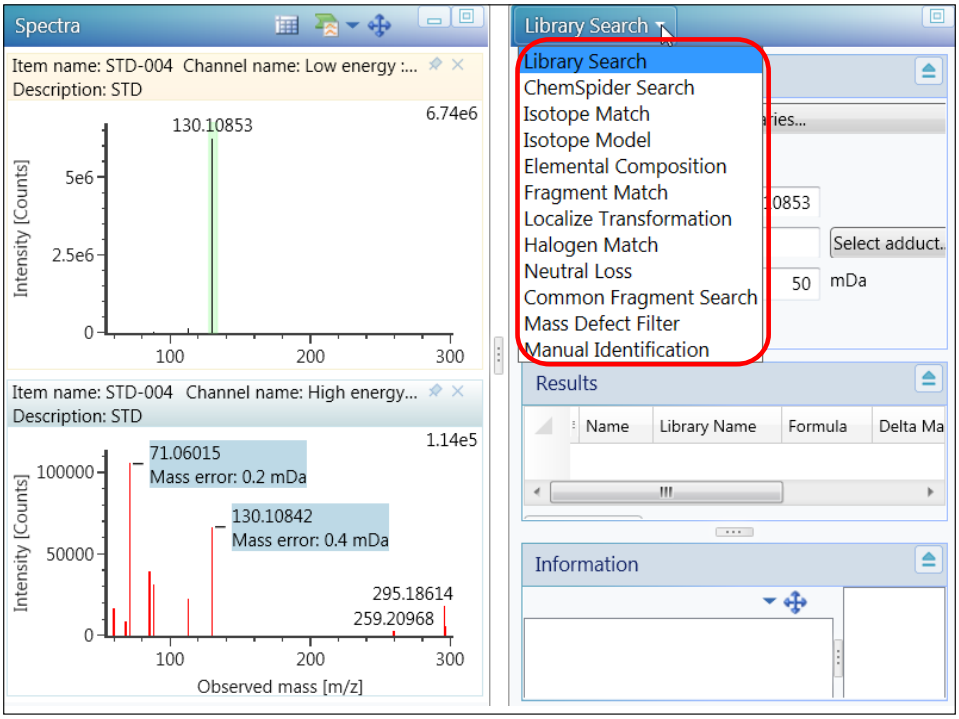

图3. UNIFI软件提供了“说明工具栏”和多种未知化合物鉴定途径。

通过UNIFI软件中预设的工作流程模板，用户根据具体应用定制不同的工作流程并加以保存，以提升数据查看的便捷性。UNIFI自动对采集的质谱数据进行数据库匹配，所得的结果经保留时间、精确质量数及二级碎片等多种要素确证。通过数据过滤器，突出显示所选化合物，并自动给出化学物结构，显示样品图谱中确定的所有组分。最终通过UNIFI自带的报告模板打印出报告，整个流程简便快速且高度自动化，提高了数据分析效率。

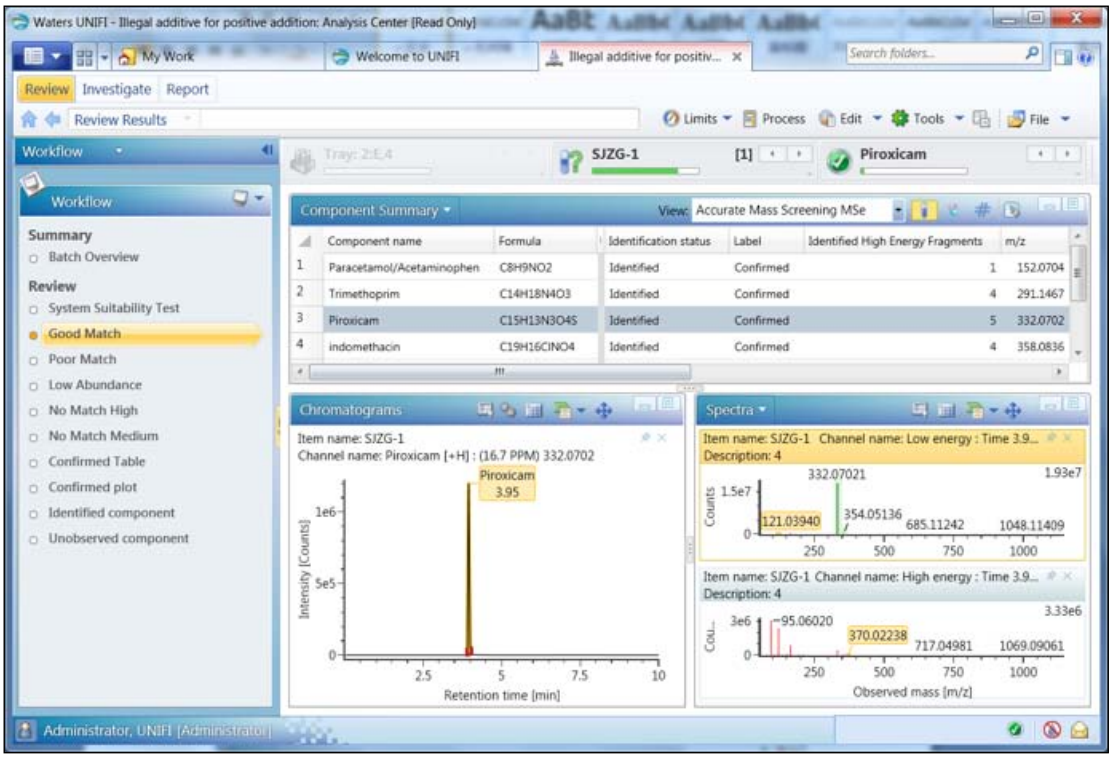

图4. 通过UNIFI预设的工作流程模板处理的数据结果。

结论

本实验在UNIFI“非法添加”数据库的基础上，建立了一种新型分析筛查方法。该方法可以在单次分析过程中同时检测保健食品中已知和目前未知的非法添加成分，采用功能强大的 UNIFI软件处理数据，方法简单有效。

采用固定的液相与质谱采集方法——全扫描数据采用沃特世专利的MS^E的数据采集模式，一针进样就得到所有峰的母离子和相应的子离子信息，让研究人员能够最大程度的排除假阳性结果，并在单次筛查中轻松完成鉴定和确证。

UNIFI科学数据库综合了非法添加化学成分的母离子、碎片离子和保留时间信息，结合自动鉴定功能，可快速完成从采样到数据处理，到最后的报告打印步骤，提高工作效率。本应用同时对目前未知的非法添加成分进行了多种方式的定性检测，并将结果直接倒回数据库中，用户可根据实验需求不断扩充数据库，有利于提高未来分析的有效性。

实验结果表明，本实验建立的筛查方法能快速准确地对实际样品进行验证，所有成分的定性分析工作皆由软件自动进行，简化的工作流程提高了非法添加检测的工作效率。

参考文献

1. 郭志鑫，董培智，申国华，裴社强，保健食品非法添加化学药品的特点与监管建议. 中国药事，2013，27(11):1132-1134

2. 王震红，杨永刚，王新意，薛娇，中成药及保健食品中非法添加化学药品检验中的问题与对策. 实用药物与临床，2013，16(6):553-555

3. Salman Azimi, Nayan S. Mistry, and Michelle Wood. UPLC/MS/MS for the Screening, Confirmation, and Quantification of Drugs Illegally Added to Herbal/Dietary Supplements for the Enhancement of Male Sexual Performance. *Waters Application Note*.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, UNIFI, ACQUITY UPLC, ACQUITY, Xevo 和The Science of What's Possible 是沃特世公司的注册商标。QTof是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自拥有者所有。

©2014 年沃特世公司。印制于中国。

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com