

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱法 快速筛查减肥食品中非法添加物

张虹艳^{1,2}, 谢瑜杰¹, 常巧英¹, 吴兴强¹, 夏 寒^{1,2},
仝凯旋¹, 范春林¹, 陈 辉¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176;

2. 河北大学化学与材料科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 本研究建立了超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(UHPLC-Q/Orbitrap MS)法快速筛查减肥类食品中非法添加的化学药物。采用乙腈超声提取样品, 使用 UHPLC-Q/Orbitrap MS 采集数据, 以青梅和果冻为基质, 外标法定量分析。基于 7 种自建的减肥类食品非法添加物数据库, 在青梅中检出 1 种未知添加物。通过分析未知添加物的分子离子峰、二级质谱碎片离子信息及同位素信息, 结合密度泛函理论, 并经过标准品验证, 确认其为新型非法添加物 4-氯双醋酐丁。通过优化样品提取溶剂和流动相溶液, 考察了 8 种非法添加物的检出限、定量限、线性范围、回收率、相对标准偏差和基质效应。结果表明, 脱乙酰比沙可啶和比沙可啶的检出限为 0.001 mg/kg、定量限为 0.005 mg/kg, 其余 6 种化合物的检出限为 0.05 mg/kg、定量限为 0.1 mg/kg, 线性相关系数(R^2)不低于 0.999, 所有化合物均表现为中性和弱基质效应, 回收率为 71.02%~103.01%, 相对标准偏差为 0.87%~13.24%。将该方法应用于减肥类食品青梅和果冻的快速筛查中, 30%青梅检出 4-氯双醋酐丁。本方法适用于减肥类食品中非法添加物的快速定性、定量分析, 可在潜在风险物识别方面发挥作用。

关键词: 减肥食品; 非法添加物; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(UHPLC-Q/Orbitrap MS); 可疑物筛查

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)05-0712-11

doi: 10.7538/zpxb.2023.0138

Rapid Screening of Illegal Additives in Diet Foods by Ultra-Performance Liquid Chromatography Quadrupole Electrostatic Field Orbitrap Mass Spectrometry

ZHANG Hong-yan^{1,2}, XIE Yu-jie¹, CHANG Qiao-ying¹, WU Xing-qiang¹,
XIA Han^{1,2}, TONG Kai-xuan¹, FAN Chun-lin¹, CHEN Hui¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;

2. College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: A method of ultra-high performance liquid chromatography quadrupole electrostatic field Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q/Orbitrap MS) was developed for rapid screening illegal additives in diet food. The efficacy of three extraction solvents for methanol, acetonitrile and

acetonitrile containing 1% formic acid were evaluated for the extraction of illegal additives from green plums and jellies. Ultimately, acetonitrile is selected to extract illegally additives under ultrasonication. In order to achieve good separation of the additives by UHPLC in diet foods, four mobile phases were compared, including methanol (0.1% formic acid)-water (0.1% formic acid and 5 mmol/L ammonium acetate), acetonitrile (0.1% formic acid)-water (0.1% formic acid and 5 mmol/L ammonium acetate), acetonitrile-water (5 mmol/L ammonium acetate), acetonitrile-water. The effects of mobile phases and acidity levels on the chromatographic behavior of the additives were investigated, and acetonitrile-water containing 5 mmol/L ammonium acetate shows the best performance under appropriate gradient. Then, the MS data were acquired in Full MS/dd-MS² mode on UHPLC-Q/Orbitrap MS with the matrix-matched external standard method for quantification. Based on the self-constructed database of illegal additives in diet foods, one unknown additive is detected in a diet food containing green plums and jelly. By characterizing the molecular ion peak, secondary fragment ion information, and isotopic information, the unknown compound is identified to be 4-chlorobisacetophenetidin, also an illegal additive, which was verified by computation of density functional theory and analysis of the standard substance. To validate the accuracy and reliability of the method, the limits of detection (LODs), the limits of quantification (LOQs), linear ranges, recoveries, relative standard deviations (RSDs) and matrix effect (ME) for eight compounds were determined. The LODs and LOQs of deacetyl-bisacodyl and bisacodyl are 0.001 and 0.005 mg/kg, respectively. The LODs and LOQs of other compounds are 0.05 and 0.1 mg/kg, respectively. The correlation coefficient (R^2) is higher than 0.999. All of the compounds exhibit varying degrees of MEs from moderate to weak, and the recoveries is in the range of 71.02%-103.01% with the RSDs of 0.87%-13.24%. The approach was applied to diet food containing green plums and jelly. The 4-chlorobisacodyl are detected in 30% of the green plums, suggesting that this method is suitable for the rapid qualitative and quantitative analysis of illegal additives in diet food. It is also demonstrated that the established screening process plays a positive role in identifying potential risk substances. The combination of quantum chemistry computation and mass spectrometry provides a novel strategy for the identification of unknown additives in food.

Key words: diet food; illegal additives; ultra-high performance liquid chromatography quadrupole electrostatic field Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q/Orbitrap MS); suspicious substance screening

双醋酚丁、比沙可啶和双酚沙丁为类似物,其对应的衍生物分别为双丙酚丁、脱乙酰比沙可啶和双酚沙丁醋酸酯,此外,酚酞也是双醋酚丁的类似物。这些化合物具有相似的性质和危害性,食用添加上述物质的食品会对人体健康产生不良影响,甚至威胁生命。最近,国家市场监督管理总局组织相关部门查办了宣称“减肥”功能食品非法添加药品、药品衍生物或类似物的系列案件,并发布了《酚汀(酚丁)、酚酞及其酯类衍生物或类似物有毒有害专家认定意见》,指出食品中检出酚汀(酚丁)、酚酞及其酯类衍生物或

类似物均属于非法添加^[1]。

目前,针对减肥类非法添加物常用的前处理方法有 QuEChERS 法^[2]、超声提取法^[3-5]、固相萃取法^[6-7]等,检测方法主要有液相色谱法^[6]、气相色谱-质谱法^[8]、液相色谱-质谱法^[2,7]、高分辨液相色谱-质谱法^[3-5,9]、近红外光谱法^[10]、表面增强拉曼光谱法^[11-12]、离子迁移质谱法^[13-14]等。这些方法均为靶向检测法,而违法添加的化学药物成分来源多样,不仅有处方药、治疗药物的结构修饰物、已撤市药物,还有尚未获得批准的新型药物或其先导化合物,因此,已发布的检验项目不

能全面涵盖监管中发现的非法添加药物种类^[15]。高分辨质谱的非靶向筛查方法具有独特优势。当未知物与已知化合物的结构以及质谱特征存在相似性时,可通过匹配质谱数据库中的保留时间、特征二级碎片离子、同位素分布或特征中性丢失发现潜在的衍生物或类似物^[16],继而通过质量亏损、化合物转化规律和质谱裂解规律推导化合物结构,在靶向的基础上进一步筛查与鉴定^[17],不断补充和提升对未知非法添加物筛查的能力。

本研究拟以典型网红减肥食品青梅(固体类)和果冻(半固体类)为基质,建立超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱法快速检测减肥类食品中酚汀、酚酞及其酯类衍生物、类似物等8种非法添加物,并对样品提取溶剂和流动相溶液进行优化,建立了减肥类食品非法添加物的质谱数据库,搭建基于数据库匹配的非靶向筛查流程。通过分子离子峰、二级碎片离子及同位素信息,结合密度泛函理论(DFT),推测可疑物结构,鉴定新型潜在非法添加物,并将该方法应用于市售青梅和果冻的检测。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Ultimate 3000 高效液相色谱-Q-Exactive 静电场轨道阱高分辨质谱联用仪:美国 Thermo Fisher 公司产品;Milli-Q 超纯水仪:美国 Millipore 公司产品;超声波清洗器:中国江苏昆山超声仪器有限公司产品。

1.2 样品与试剂

酚酞(纯度 98.0%)、脱乙酰比沙可啶(纯度 99.8%)、比沙可啶(纯度 99.9%)、双酚沙丁醋酸酯(纯度 99.2%)、双丙酚丁(纯度 98.0%)、双醋酚丁(纯度 90.2%)、双酚沙丁(纯度 98.6%)、4-氯双醋酚丁(纯度 97.8%)标准溶液:天津阿尔塔科技有限公司产品;甲酸(色谱纯):上海安谱实验科技股份有限公司产品;甲醇、乙腈(色谱纯):德国默克公司产品。

1.3 标准溶液配制

标准储备溶液的浓度约为 1 000 mg/L,取适量的各标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 100 mg/L 标准中间溶液,再用甲醇

逐级稀释,配制成 0.5、1、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 系列混合标准工作溶液,待用。

1.4 样品前处理

称取 1 g(精确至 0.01 g)匀浆处理后的试样于 15 mL 离心管中,加入 10 mL 乙腈,混匀 1 min,40 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 20 min,室温下充分冷却,以 3 000 r/min 离心约 5 min,取上清液,过 0.22 μm 有机滤膜,待上机检测。

1.5 实验条件

1.5.1 色谱条件 Accucore aQ 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 2.6 μm);柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量 5 μL ;流动相:A 为 5 mmol/L 乙酸铵-水溶液,B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~3 min(1%~30%B),3~6 min(30%~40%B),6~9 min(40%B),9~15 min(40%~60%B),15~19 min(60%~90%B),19~23 min(90%B),23~23.01 min(90%~1%B),23.01~27 min(1%B);流速 0.4 mL/min。

1.5.2 质谱条件 正离子模式;喷雾电压 3 kV;毛细管温度 325 $^{\circ}\text{C}$;加热器温度 350 $^{\circ}\text{C}$;鞘气压强 4 MPa;辅助气压强 1 MPa;扫描模式为 Full MS/dd-MS²;质量扫描范围 m/z 80~1 100;一级全扫描(Full MS):分辨率 70 000 FWHM, C-trap 最大容量(AGC target) 1×10^6 , C-trap 最大注入时间 200 ms;数据依赖二级子离子扫描(dd-MS²):分辨率 17 500 FWHM, C-trap 最大容量 2×10^5 , C-trap 最大注入时间 100 ms;循环次数为 5;归一化碰撞能量 20、40、60 eV;动态排除时间 8 s。

数据依赖性采集(DIA):质量扫描范围 m/z 50~950;分辨率 35 000;自动增益 2×10^5 ;最大离子注入时间为 auto;MSX count 为 1;归一化碰撞能量 20、40 和 60 eV;分 2 个采集窗口进行采集,第 1 个采集窗口:质量扫描范围 m/z 50~450,隔离窗口 m/z 52.0,将一级扫描质量范围分为 m/z 50~100、100~150、150~200、200~250、250~300、300~350、350~400、400~450 共 8 段;第 2 个采集窗口:质量扫描范围 m/z 450~950,隔离窗口 m/z 104.0,将一级扫描质量范围分为 m/z 450~550、550~650、650~750、750~850、850~950 共 5 段。

1.6 理论计算

采用 Gaussian 09W 软件进行理论计算,并利

用 DFT 进行结构优化和频率计算,完成结构优化后,进行频率计算时不存在虚频。本研究采用电子和热自由能的总和进行能量讨论,所有结构的振动频率和单点能的计算均基于相同基组 B3LYP/6-31G(d', p') 进行。采用 Gaussview 软件 (6.0 版本) 显示优化后的结构。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件优化

本实验对比了甲醇、乙腈、乙腈(含 1%甲酸)3 种溶剂的提取效果。在青梅和果冻阴性样品中添加目标化合物后,按 1.4 节方法提取并检测,以各化合物的添加回收率为指标,结果示于图 1。可见,以乙腈作为提取溶剂时,回收率略高于乙腈(含 1%甲酸),且明显高于甲醇。因此,选择乙腈作为最佳提取溶剂。

2.2 色谱条件优化

本实验考察了甲醇(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸+5 mmol/L 乙酸铵)、乙腈(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸+5 mmol/L 乙酸铵)、乙腈-水(5 mmol/L 乙酸铵)、乙腈-水 4 种流动相对 8 种化合物色谱行为的影响,不同流动相下,脱乙酰比沙可啶和双酚沙丁目标物的峰形和峰面积变化情况示于图 2。可见,以甲醇作为流动相的色谱峰峰面积大于乙腈,与文献^[18]报道一致。这是由于乙腈中的 N 带孤电子,偏碱性,属弱质子受体,可同待测物争夺溶液体系中的质子,导致加氢峰母离子的

生成受到抑制,相应的质谱峰面积减小。甲醇中—OH 的 H 可发生微弱电离,偏酸性,属弱质子受体,可给予待测物 H^+ ,促使加氢峰母离子的生成,质谱峰面积增大^[19-20]。然而,以甲醇作为流动相时,由于存在溶剂效应,使脱乙酰比沙可啶和双酚沙丁的色谱峰出现肩峰,而使用乙腈作为流动相可有效改善峰形,并且随着流动相酸性减弱,峰形改善明显,以乙腈-水(5 mmol/L 乙酸铵)作为流动相时,待测物峰形最优。推测待测化合物多偏碱性,易与色谱柱的硅羟基发生相互作用造成拖尾展宽等问题,弱碱性流动相降低了结合硅羟基的倾向,使待测物得到更好的保留,从而改善峰形^[21]。另外,随着流动相酸性减弱,多数待测物的质谱响应增强,表现出较强的 pH 依赖性,流动相 pH 值的变化会显著影响其电离效率,从而影响质谱响应,这可能与化合物分子理化特性(如表面积、表面电荷等)有关^[22]。因此,选择乙腈-水(5 mmol/L 乙酸铵)作为流动相。

2.3 数据库的建立

分别配制 1 000 $\mu\text{g/L}$ 酚酞、脱乙酰比沙可啶、比沙可啶、双酚沙丁醋酸酯、双丙酚丁、双醋酚丁、双酚沙丁的单标溶液,在分辨率 70 000 FWHM 下进行 Full MS 模式采集,选择响应最高的加和离子形式。将得到的一级理论精确质量数、加和离子等信息添加至采集列表中进行 dd-MS² 自动触发二级质谱模式,在不同的碰撞能量下确定最佳的碎片离子信息,得到二级质谱图。采

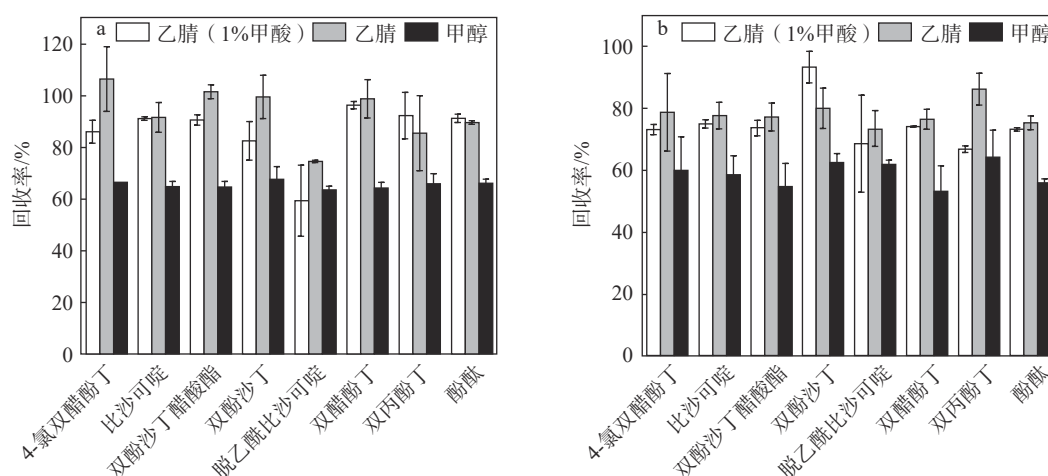
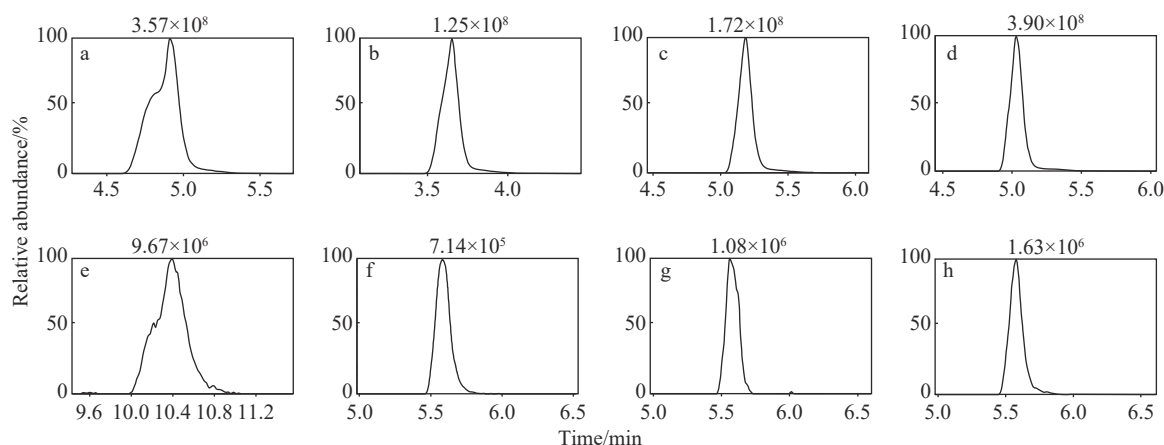


图1 不同提取溶剂对青梅(a)和果冻(b)的回收率

Fig. 1 Recovery rates of greenplums (a) and jelly (b) with different extraction solvents



注: a.e. 甲醇(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸+5 mmol/L 乙酸铵); b.f. 乙腈(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸+5 mmol/L 乙酸铵); c.g. 乙腈-水; d.h. 乙腈-水(5 mmol/L 乙酸铵)

图2 脱乙酰比沙可啶(a, b, c, d)和双酚沙丁(e, f, g, h)在4种不同流动相中的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of deacetylbisacodyl (a, b, c, d) and bisoxatin (e, f, g, h) in four different mobile phases

用1.5节方法,在Full MS/dd-MS²模式下分析7种减肥类非法添加物的标准溶液,得到每种化合物的保留时间、母离子和子离子信息,建立数据库。

2.4 可疑物筛查流程

可疑物筛查流程示于图3,在Full MS/DIA模式下对可疑物进行一级和二级扫描,通过离子强度、信噪比、峰面积、峰形、同位素分布等条件筛选候选离子。基于已建立的质谱数据库对比共有峰、差异峰、中性丢失、同位素分布等信息,通过质量亏损、化合物转化规律和质谱裂解规律推导疑似化合物结构,再使用标准物质质谱图进行结构确认。

使用自建的质谱数据库筛查实际样品,在青梅中发现谱库之外的可疑化合物。双醋酚丁发

生质子化后得到 m/z 402.136 60 分子离子峰,然后丢失对乙酰氧基苯基得到 m/z 266.081 2,进一步发生 β H 转移丢失乙酰基得到 m/z 224.070 6,继续脱去 CO 得到 m/z 196.075 62,示于图4a。将可疑物与自建数据库进行对比发现,可疑物的分子离子峰为 m/z 436.094 42,产物离子为 m/z 300.042 05、258.031 68、107.049 46,示于图4b。可疑物的分子离子 m/z 436.094 42 比双醋酚丁的分子离子 m/z 402.136 60 多1个氯原子;产物离子 m/z 300.042 05 和 258.031 68 分别比双醋酚丁的产物离子 m/z 266.081 60 和 224.070 91 多1个氯原子。此外,依据可疑物分子离子和产物离子的同位素分布(1:3),可以初步推断其比双醋酚丁多1个氯原子。

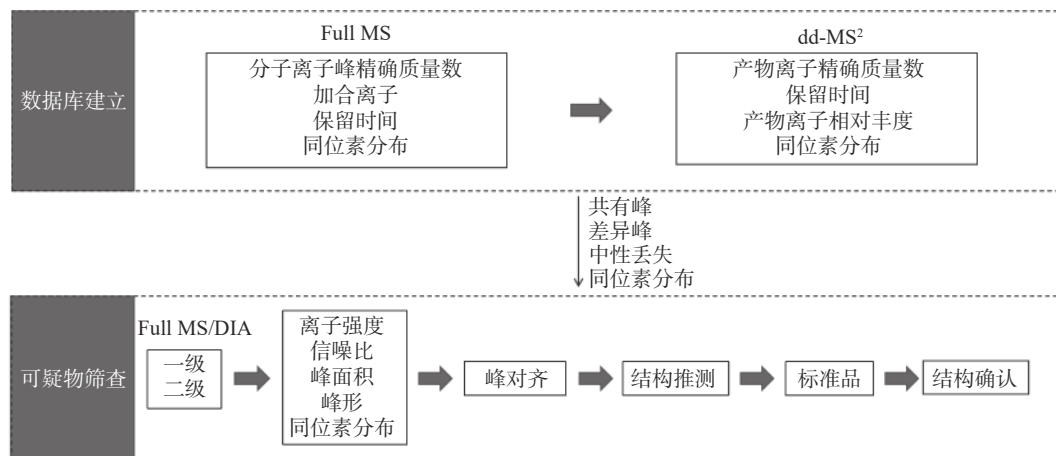


图3 可疑物质谱筛查流程图

Fig. 3 Flow chart of suspicious substance screening by mass spectrometry

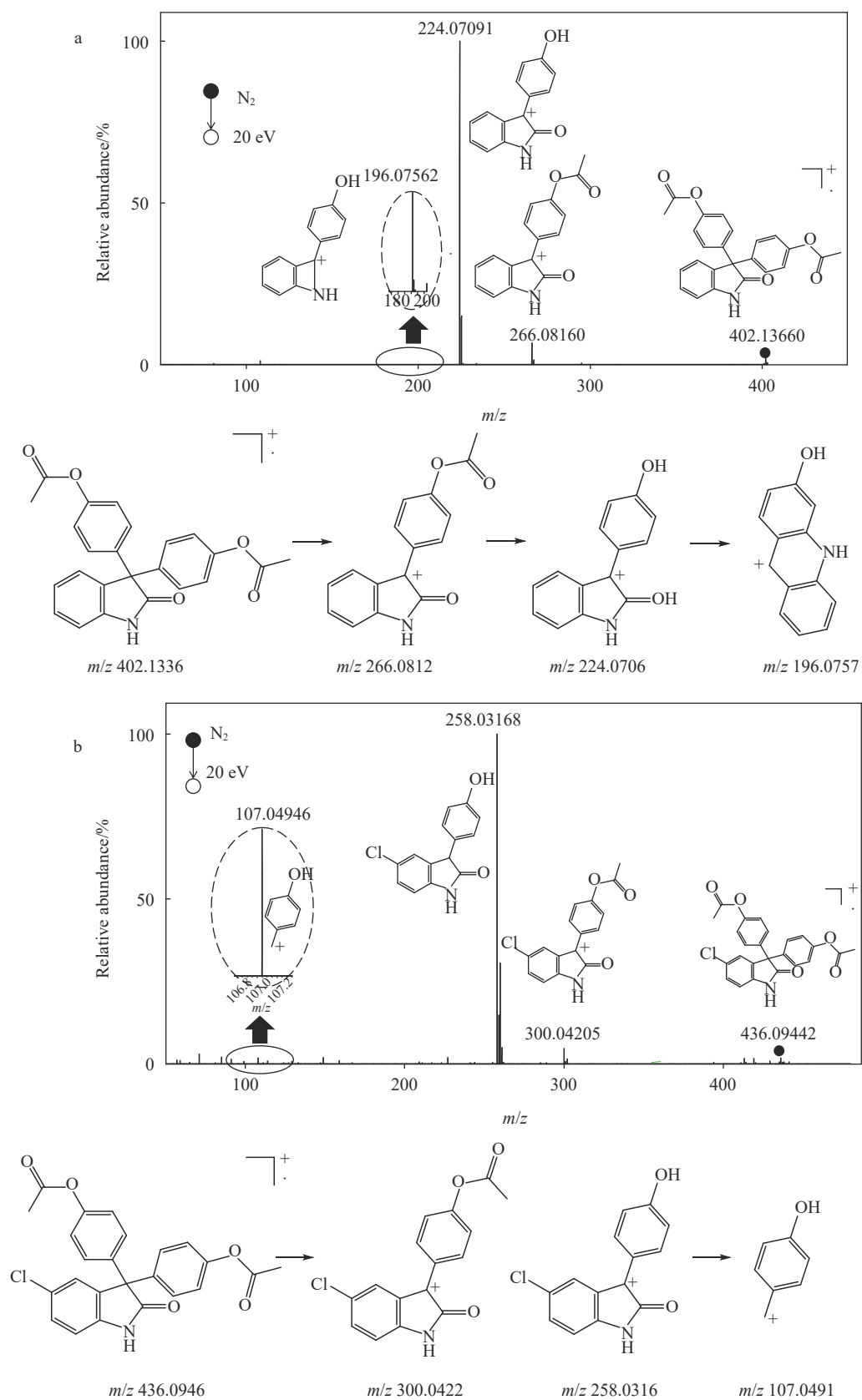


图4 双醋酐丁(a)和可疑物(b)的质谱图以及裂解路径

Fig. 4 Mass spectra and cleavage pathways of oxyphephenisatine diacetate (a) and suspicious substances (b)

由于可疑物裂解产生了对甲基苯酚(m/z 107.049 46)的碎片,表明氯原子连接在吡啶酮上,但取代位置不能确定。因此,借助 DFT 方法在 B3LYP/6-31G(d', p') 基组上计算不同氯原子位点的自由能,量化计算结果示于图 5。当氯原子连接在 4 号位时,自由能最低,结构最稳定,初步判断该可疑物为 4-氯双醋酐丁。然而,由于氯原子不同取代位点对自由能的影响较小,因此以上分析结果仅可作为辅助,最终还需标准品验证。在 Full MS/dd-MS² 模式下采集 4-氯双醋酐丁标准溶液的质谱信息,发现其保留时间、分子离子峰和产物离子均与可疑物匹配良好,故确定该可疑物为 4-氯双醋酐丁,并将其补充至质谱数据库,列于表 1。

2.5 基质效应

采用溶剂和空白基质提取液配制标准曲线和基质曲线,以浓度和峰面积绘制标准曲线,基于基质匹配标准曲线和溶剂标准曲线的斜率,由式(1)计算得到基质效应(ME)。当 $|ME| < 20\%$

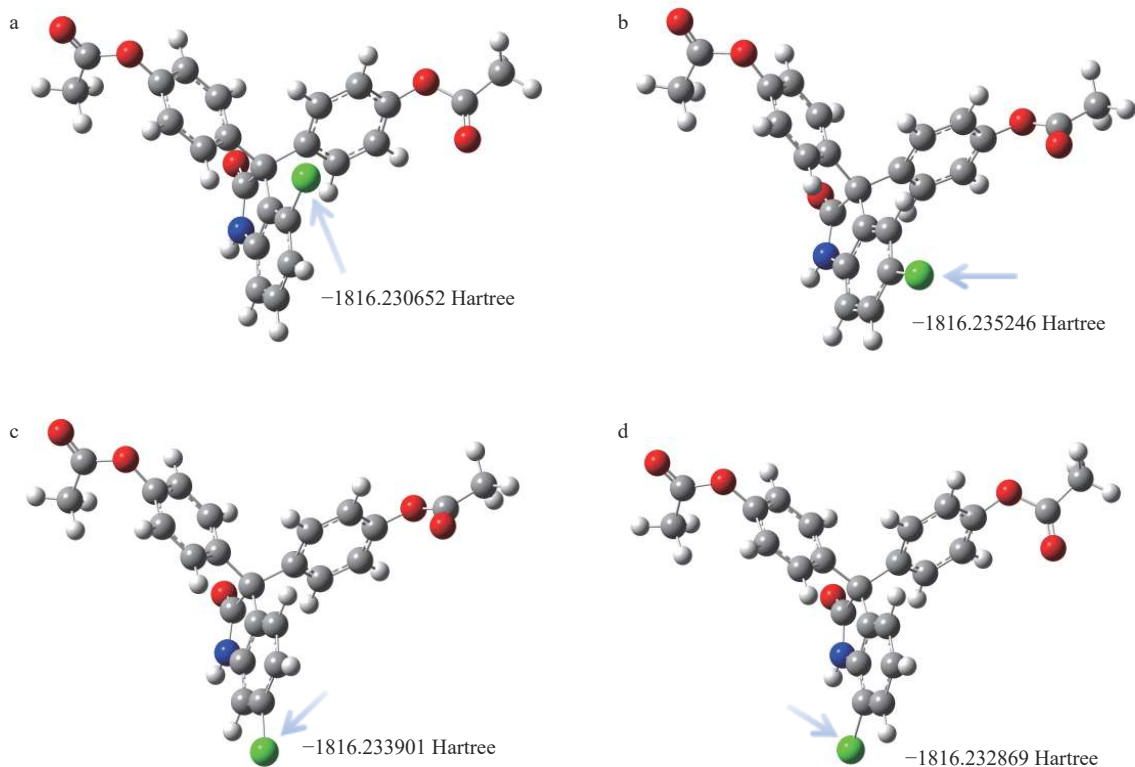
时,为弱基质效应; $20\% < |ME| < 50\%$ 时,为中等基质效应; $|ME| > 50\%$ 时,为强基质效应。结果表明,8 种化合物的基质效应集中在 $-10.90\% \sim -36.66\%$ 之间,为中等和弱基质效应。因此,采用基质匹配标准溶液法以消除基质引起的定量误差。

$$ME(\%) = \frac{\text{斜率(基质标曲)} - \text{斜率(溶剂标曲)}}{\text{斜率(基质标曲)}} \times 100\% \quad (1)$$

2.6 方法学验证

2.6.1 线性范围、检出限和定量限 以甲醇为溶剂,配制 0.5、1、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 系列混合标准溶液,考察目标化合物的线性范围。按质谱响应情况选取 5 个浓度点,以浓度为横坐标,分子离子峰提取离子流图的色谱峰面积为纵坐标,得到标准曲线及相关系数(R^2),列于表 2。可见,各化合物的线性关系良好, R^2 均不低于 0.999,能够满足定量分析的要求。

以青梅和果冻的空白样品提取液作为溶剂,配制一定浓度(0.5、1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$)



注: a. 3-氯双醋酐丁; b. 4-氯双醋酐丁; c. 5-氯双醋酐丁; d. 6-氯双醋酐丁

图 5 氯原子不同结合位点的可疑物结构优化及自由能量化计算

Fig. 5 Structural optimization and free energy calculation of suspicious compounds with different binding sites of chlorine atoms

表 1 8 种目标物的质谱信息
Table 1 Mass spectrometric information for 8 target substances

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	保留时间 Retention time/min	加合方式 Adduct ion	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	产物离子 Daughter ion (<i>m/z</i>)
1	酚酞	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	6.02	[M+H] ⁺	319.0965	225.0546, 197.0597, 169.0648, 141.0699
2	脱乙酰比沙可啶	C ₁₈ H ₁₅ NO ₂	5.03	[M+H] ⁺	278.1176	184.0757, 167.0730
3	比沙可啶	C ₂₂ H ₁₉ NO ₄	10.17	[M+H] ⁺	362.1387	184.0757, 226.0863
4	双酚沙丁醋酸酯	C ₂₄ H ₁₉ NO ₆	11.05	[M+H] ⁺	418.1285	240.0655, 212.0706, 149.0233, 71.0855, 85.1012
5	双丙酚丁	C ₂₆ H ₂₃ NO ₅	14.17	[M+H] ⁺	430.1649	224.0706, 196.0757
6	双醋酚丁	C ₂₄ H ₁₉ NO ₅	10.02	[M+H] ⁺	402.1336	266.0812, 224.0706, 196.0757
7	双酚沙丁	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄	5.57	[M+H] ⁺	334.1074	240.0655, 212.0706
8	4-氯双醋酚丁	C ₂₄ H ₁₈ ClNO ₅	12.45	[M+H] ⁺	436.0947	300.0421, 258.0317

表 2 8 种目标物的线性范围、决定系数、检出限、定量限、平均回收率、相对标准偏差及基质效应(*n*=6)
Table 2 Linear ranges, correlation coefficient, LODs, LOQs, average recoveries, RSDs and ME of 8 target substances (*n*=6)

序号 No.	化合物 Compound	线性范围 Linear range/ (μg/L)	相关 系数(<i>R</i> ²) Correlation coefficient	检出限 LOD/ (mg/kg)	定量限 LOQ/ (mg/kg)	青梅Greenplum				果冻Jelly			
						回收率(相对标准偏差) Recovery (RSD)/%			基质 效应 ME/%	回收率(RSD) Recovery (RSD)/%			基质 效应 ME/%
						1×LOQ	2×LOQ	10×LOQ		1×LOQ	2×LOQ	10×LOQ	
1	酚酞	10~200	0.9996	0.05	0.1	91.16 (5.23)	97.43 (6.60)	82.15 (7.27)	-29.25	94.02 (10.54)	82.96 (8.11)	79.73 (5.00)	-23.08
2	脱乙酰比沙可啶	0.5~20	0.9993	0.001	0.005	73.98 (4.34)	72.35 (1.67)	71.02 (4.41)	-16.48	82.29 (1.73)	85.96 (1.79)	85.11 (2.67)	-24.20
3	比沙可啶	0.5~20	0.9997	0.001	0.005	77.58 (2.40)	85.53 (3.57)	77.35 (4.26)	-14.08	81.63 (2.64)	81.38 (4.55)	73.07 (0.87)	-20.31
4	双酚沙丁醋酸酯	10~200	0.9997	0.05	0.1	79.15 (3.29)	82.69 (1.59)	84.53 (9.82)	-25.37	72.31 (6.94)	96.31 (3.80)	77.94 (2.64)	-23.35
5	双丙酚丁	10~200	0.9997	0.05	0.1	78.28 (3.82)	77.92 (2.51)	81.51 (13.24)	-36.66	71.73 (4.00)	98.52 (3.28)	71.46 (3.50)	-31.40
6	双醋酚丁	10~200	0.9996	0.05	0.1	90.78 (4.85)	86.09 (3.96)	84.68 (7.67)	-10.90	80.01 (5.89)	89.17 (4.20)	78.81 (2.08)	-11.50
7	双酚沙丁	10~200	0.9995	0.05	0.1	86.43 (3.77)	81.25 (4.41)	83.78 (1.83)	-24.88	77.59 (5.85)	99.29 (7.37)	81.49 (2.10)	-22.94
8	4-氯双醋酚丁	10~200	0.9991	0.05	0.1	74.02 (7.30)	73.86 (3.55)	80.67 (11.22)	-31.28	71.18 (9.08)	103.01 (7.19)	75.39 (3.87)	-28.39

的系列基质加标溶液,依次进样分析。以分子离子峰提取离子流图的色谱峰 3 倍信噪比为检出限(LOD),以化合物在线性范围中满足回收率在 70%~120%区间内的最低浓度为定量限(LOQ)。结果表明,脱乙酰比沙可啶和比沙可啶的检出限为 0.001 mg/kg,定量限为 0.005 mg/kg,其他化合物的检出限和定量限分别为 0.05、0.1 mg/kg。

2.6.2 回收率和精密度 在 1 倍、2 倍和 10 倍 LOQ 添加水平下对空白青梅和果冻进行添加回收实验,每个加标浓度设置 6 个平行样品,其添加回收率和相对标准偏差(RSD)列于表 2。可见,回收率为 71.02%~103.01%,RSD 为 0.87%~13.24%。

2.7 实际样品检测

应用本方法分析各 10 批次青梅和果冻

实际样品,结果示于图6。有3批次青梅中检出4-氯双醋酚丁,检出浓度分别为8.2、20.0、7.2 mg/kg。4-氯双醋酚丁为通过自建数据库推测并经过标准品验证的潜在风险物,表明减肥类食品中非法添加手段越来越隐蔽。

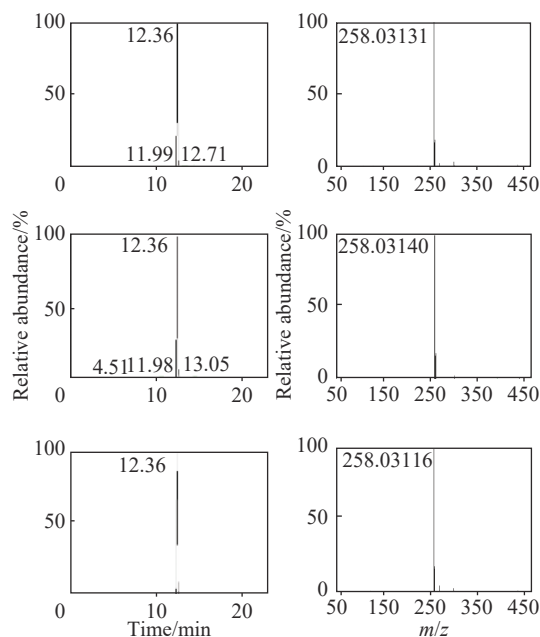


图6 3种阳性样品的色谱图与质谱图

Fig. 6 Chromatograms and mass spectra of three positive samples

3 结论

本文建立了乙腈超声提取样品, UHPLC-Q-Orbitrap 采集数据, 基质匹配外标法定量的方法, 实现了食品中减肥类非法添加药物的快速筛查测定。基于自建数据库发现可疑色谱峰, 通过分析分子离子峰、二级碎片离子信息及同位素信息, 结合密度泛函理论推测可疑物结构式, 经与标准品对比, 确认新的非法添加物。方法学验证和实际样品检测结果表明, 该方法适用于食品中减肥类非法添加药物的快速筛查。

参考文献:

- [1] 国家市场监督管理总局. 市场监管总局办公厅关于打击食品中非法添加酚丁(酚丁)、酚酞及其酯类衍生物或类似物违法行为的通知[EB/OL]. (2023-10-13)[2023-11-20]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxgk/fdzdgnr/zfjcs/art/2023/art_5b69a28fde634bfab1dc178a63fce009.html.
- [2] 黄芊, 叶梦薇, 冯丽凤, 林柏纬, 林钦, 王征. 全自动 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定功能型休闲食品中 58 种非法添加药物[J]. 食品科技, 2022, 47(12): 299-306.
HUANG Qian, YE Mengwei, FENG Lifeng, LIN Bowei, LIN Qin, WANG Zheng. Determination of 58 illegally added chemical drugs in functional leisure food by automatic QuEChERS-UPLC-MS/MS[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(12): 299-306(in Chinese).
- [3] 徐红斌, 张申平, 杜茹芸, 周静, 翁史昱. 超高效液相色谱-Orbitrap 高分辨质谱用于减肥和壮阳类保健食品中 32 种非法添加药物的快速筛查和确证[J]. 色谱, 2022, 40(6): 531-540.
XU Hongbin, ZHANG Shenping, DU Ruyun, ZHOU Jing, WENG Shiyu. Ultra-high performance liquid chromatography-Orbitrap high-resolution mass spectrometry for rapid screening and identification of 32 illegally added drugs in slimming and anti-impotence health foods[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(6): 531-540(in Chinese).
- [4] 洪灯, 谢文, 侯建波, 胡晓莉, 史颖珠, 李杰. 高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查保健食品中的西布曲明及其 5 种衍生物[J]. 色谱, 2019, 37(11): 1 173-1 178.
HONG Deng, XIE Wen, HOU Jianbo, HU Xiaoli, SHI Yingzhu, LI Jie. Rapid screening of sibutramine and five derivatives in health food by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(11): 1 173-1 178(in Chinese).
- [5] 孙健, 诸艳蓉, 胡青, 于泓, 张静娴, 刘贤贤, 季申. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法定性筛查 52 种减肥类非法食品添加物[J]. 上海预防医学, 2022, 34(6): 519-525.
SUN Jian, ZHU Yanrong, HU Qing, YU Hong, ZHANG Jingxian, LIU Xianxian, JI Shen. Qualitative screening of 52 illegally adulterated weight-losing compounds in foods by ultra highperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2022, 34(6): 519-525 (in Chinese).
- [6] 金鑫, 朱志英. HPLC 法快速测定保健食品中化学药物添加的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 201-

- 208.
- JIN Xin, ZHU Zhiying. Rapid determination of chemical drugs addition in health food by HPLC[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(21): 201-208(in Chinese).
- [7] 朱吕, 陆春燕, 厉晨皓, 贺慧琳, 刘俊. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中4种减肥类非法添加药物[J]. *分析仪器*, 2020(5): 36-41.
- ZHU LV, LU Chunyan, LI Chenhao, HE Huilin, LIU Jun. Simultaneous determination of 4 compounds illegally added in foods and losing weight health foods by HPLC-MS/MS[J]. *Analytical Instrumentation*, 2020(5): 36-41(in Chinese).
- [8] 张丽霞, 郭庆园, 韦晓群, 向君毅, 刘桂兴, 陈利苹, 李向梅. GC-MS法测定减肥类保健食品中五种非法添加物[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(6): 332-336.
- ZHANG Lixia, GUO Qingyuan, WEI Xiaoqun, XIANG Junyi, LIU Guixing, CHEN Liping, LI Xiangmei. Determination of five illegal additives in the slimming health food by GC-MS[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(6): 332-336(in Chinese).
- [9] 刘静, 吴琼, 王超. 液相色谱-离子阱质谱法同时测定减肥类保健食品中非法添加的12种化学药物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(18): 7 286-7 292.
- LIU Jing, WU Qiong, WANG Chao. Simultaneous determination of 12 kinds of chemical drugs illegally mixed into slimming health foods by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(18): 7 286-7 292(in Chinese).
- [10] 王冰洁, 周刚, 张彦斌, 姜莎. 近红外法快速检测保健食品中非法添加酚酞[J]. *食品安全导刊*, 2022(6): 46-49.
- WANG Bingjie, ZHOU Gang, ZHANG Yanbin, JIANG Sha. Near infrared method for detection of illegal addition of phenolphthalein in weight loss product[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(6): 46-49(in Chinese).
- [11] 王一玮, 史国华, 张兰天, 李俊娣, 郭美娟. SERS在保健食品非法添加物快速检测中的应用[J]. *食品工业*, 2021, 42(10): 218-222.
- WANG Yiwei, SHI Guohua, ZHANG Lantian, LI Jundi, GUO Meijuan. Application of surface enhanced raman spectroscopy in rapid detection of health food illegal additives[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(10): 218-222(in Chinese).
- [12] 张烨, 杨国伟, 陈煜, 阎安婷. 表面增强拉曼光谱法快速检测减肥类保健食品中的比沙可啶[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(5): 1 778-1 782.
- ZHANG Ye, YANG Guowei, CHEN Yu, YAN Anting. Rapid determination of bisacodyl in weight-loss functional foods by surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(5): 1 778-1 782(in Chinese).
- [13] 徐硕, 金鹏飞, 徐文峰, 邝咏梅. 离子迁移谱技术在中药和保健品中非法添加化学药物检测中的应用[J]. *中南药学*, 2020, 18(4): 620-626.
- XU Shuo, JIN Pengfei, XU Wenfeng, KUANG Yongmei. Ion mobility spectrometry in the detection of illegally adulterated chemical substances in Chinese medicines and health foods[J]. *Central South Pharmacy*, 2020, 18(4): 620-626(in Chinese).
- [14] 孙晶, 柳雨影, 曹玲, 冯有龙, 胡浩彬. 电喷雾-离子迁移谱快速检测减肥类保健食品中非法添加的22种化学药物[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14): 228-233.
- SUN Jing, LIU Yuying, CAO Ling, FENG Youlong, HU Haobin. Rapid detection of 22 illegally added chemicals in weight-loss health foods by electrospray ionization-ion mobility spectrometry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(14): 228-233(in Chinese).
- [15] 张璐, 李可强, 朱辉, 赵美瑾, 关昕, 刘洪喆, 吴琼. 减肥类保健食品中非法添加化学药物及检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(3): 904-913.
- ZHANG Lu, LI Keqiang, ZHU Hui, ZHAO Meijin, GUAN Xin, LIU Hongzhe, WU Qiong. Research progress on illegal additions of chemical drugs in health food for weight loss and their detection technologies[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(3): 904-913(in Chinese).
- [16] LIANG W, ZHENG F, CHEN T, ZHANG X, XIA Y, LI Z, LU X, ZHAO C, XU G. Nontargeted screening method for veterinary drugs and their metabolites based on fragmentation characteristics from ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 130 928.
- [17] IBÁÑEZ M, BIJLSMA L, PITARCH E, LÓPEZ F J, HERNÁNDEZ F. Occurrence of pharmaceutical metabolites and transformation products in the aquatic environment of the Mediterranean Area[J]. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2021, doi: [10.1016/J.TEAC.2021.E00118](https://doi.org/10.1016/J.TEAC.2021.E00118).

- [18] 吴成, 赵志强. 液相色谱质谱测定中甲醇乙腈对农药响应的影响[J]. 分析实验室, 2015, 34(6): 711-716.
WU Cheng, ZHAO Zhiqiang. Influence of methanol and acetonitrile on pesticides response by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2015, 34(6): 711-716(in Chinese).
- [19] HUFFMAN B A, POLTASH M L, HUGHEY C A. Effect of polar protic and polar aprotic solvents on negative-ion electrospray ionization and chromatographic separation of small acidic molecules[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(22): 9 942-9 950.
- [20] SILVESTER S. Mobile phase pH and organic modifier in reversed-phase LC-ESI-MS bioanalytical methods: assessment of sensitivity, chromatography and correlation of retention time with in silico logD predictions[J]. Bioanalysis, 2013, 5(22): 2 753-2 770.
- [21] BROOKHART A, ARORA M, McCULLAGH M, WILSON I D, PLUMB R S, VISSERS J P, TANNA N. Understanding mobile phase buffer composition and chemical structure effects on electrospray ionization mass spectrometry response[J]. Journal of Chromatography A, 2023, 1 696: 463 966.
- [22] TAN A, FANARAS J C. Use of high-pH (basic/alkaline) mobile phases for LC-MS or LC-MS/MS bioanalysis[J]. [Biomedical Chromatography](#), 2019, 33(1): e4409.
- (收稿日期: 2023-12-06; 修回日期: 2024-01-15)