

减肥保健品中芬氟拉明等 8 种合成食欲抑制剂的测定

王 杉 宓捷波 常文保*

(北京大学化学与分子工程学院化学生物系,生物有机分子工程教育部重点实验室,北京 100871)

邓 静 陆江海 崔凯荣 张长久 吴侔天

(中国兴奋剂检测中心,北京 100029)

摘 要 建立了用气相色谱同时测定减肥保健品中芬氟拉明、苯丁胺、苯非他明、氯苯丁胺、氯苄苯丙胺、苯双甲吗啉、苯甲吗啉及安非泼拉酮等 8 种合成食欲抑制剂的方法,检出限 $< 100 \mu\text{g/L}$ 。分析结果用 GC/MSD 进一步确证,准确、可靠。

关键词 减肥保健品,合成食欲抑制剂,气相色谱,气相色谱/质谱

1 引 言

在市售的各类减肥保健品中,有些含有非法添加的有害物质,其中以合成食欲抑制剂最为常见。典型的食欲抑制剂主要包括芬氟拉明(fenfluramine, FEN)、苯丁胺(phentermine, PHE)、苯非他明(benzphetamine, BPT)、氯苯丁胺(chlorphentermine, CPT)、氯苄苯丙胺(clobenzorex, CBZ)、苯双甲吗啉(phendimetrazine, PDM)、苯甲吗啉(phenmetrazine, PHM)和安非泼拉酮(amfepramone, AFP)等。日本、美国和中国都有因服用过量食欲抑制剂致死的报道。因此,检测减肥保健品中的合成食欲抑制剂对维护消费者的切身利益,规范减肥保健品市场具有非常现实的意义。

目前,分析检测这类食欲抑制剂的方法以各种色谱技术为主,包括 HPLC^[1~3]、HPLC/APCF-MS^[4]、LC/MS/MS^[5]及 GC/MS^[6~8]等。但这些方法检测的对象大都是尿样、血样或组织等生物样品及药物片剂,主要应用于法医、毒理、临床及制药等领域,对于基质复杂的保健品分析缺少一定的针对性。台湾的 Yoe-Ray Ku 等^[9]曾用 HPCE 分析测定了中药中掺入的芬氟拉明等 6 种食欲抑制剂,但该方法用 SPE 混合柱固相萃取,使用的洗脱液二氯甲烷毒性较大。国内汪国权等^[10]也曾利用超声水提及 C₁₈ 柱纯化的前处理方法结合 HPLC 测定减肥茶中芬氟拉明的含量,但检测对象只针对减肥茶类,对其它类型的减肥保健品不一定适用。基于上述方法的局限性,本实验首次针对保健品基质类别的不同,研究了样品的前处理方法,并建立了 GC/NPD 同时测定 FEN、PHE、CPT、PHM、PDM、AFP、BPT 和 CBZ 等 8 种合成食欲抑制剂的方法。步骤简单,方法灵敏,适于大量样品的初筛分析,其阳性结果经 GC/MSD 进一步确证,从而确保分析结果的准确、可靠。方法用于两种市售减肥保健品分析,效果良好。

2 实验部分

2.1 实验仪器及分析条件

GC 5890 气相色谱仪;GC6890/MS5973 气相色谱-质谱联用仪(美国 HP 公司)。色谱条件:HP-5 石英毛细管柱(16.7 m \times 0.20 mm \times 0.33 μm (GC/NPD);25 m \times 0.20 mm \times 0.33 μm (GC/MSD)),载气为氦气。进样口温度为 250 ;检测器及接口温度 280 ;GC/NPD 柱温程序:100 维持 1 min,以 10 /min 的速率升至 200 ,再以 20 /min 的速率升至 300 并维持 6 min。GC/MSD 柱温程序:80 维持 1 min,以 15 /min 的速率升至 180 ,再以 20 /min 的速率升至 280 并维持 6 min。质谱条件:电离源为 EI,电子能量 70 eV;离子源温度 230 ;扫描质量范围 40 ~ 300 amu (m/z);倍增器电压 1388 V。

2003-02-25 收稿;2003-06-30 接受
本文系科技部科技基础性工作专项基金项目(基 2001-15)

2.2 试剂及溶液配制

盐酸芬氟拉明(美国 Sigma 公司);盐酸苯甲吗啉、酒食酸苯双甲吗啉(美国 Alltech 公司);盐酸安非拉酮、盐酸苄非他明、盐酸氯苯丁胺、盐酸氯苄苯丙胺、盐酸苯丁胺均为加拿大兴奋剂实验室馈赠;二苯胺(北京化工厂,分析纯);叔丁基甲醚(美国 Dikma 公司);其它试剂均为国产分析纯试剂。标准对照品溶于水配成浓度为 1.0 g/L 的储备液;二苯胺溶于适量叔丁基甲醚,配成浓度为 1.0×10^{-4} g/L 的含内标提取液。

2.3 材料

保健品基质模拟样(胶囊、片剂、茶、点心、口服液),样品 A($\times \times$ 减肥片)和 B($\times \times$ 胶囊)均为市售的减肥保健品。

2.4 样品前处理方法比较

2.4.1 振荡提取 取样品适量于 10 mL Pyrex 试管中,加入 5.0 mL H_2O (液体样品添加适量水,使总体积为 5.0 mL),于涡旋混合器上混匀。加入 0.5 mol/L KOH 0.5 mL, 3 g NaCl、2.0 mL 含内标的叔丁基甲醚提取液,加盖并拧紧。于振荡器上振荡 10 min, 2500 r/min 离心 5 min。将上层有机相移入 2 mL 进样瓶内,并加入约 0.1 g 无水 Na_2SO_4 脱水。取 2 μ L 提取液进 GC/NPD 分析。

2.4.2 超声振荡提取 同 2.4.1 至加完试剂后,不立即振荡,置于超声水浴中 5 min,取出于振荡器上振荡 5 min,再放回超声水浴中 5 min,如此反复 3 次。以下同 2.4.1。

2.4.3 加入改性剂的超声振荡提取 同 2.4.2,但加提取液前加入 1.0 mL 甲醇。

2.4.4 提取效率回收实验 将 10 μ g 各种食欲抑制剂加入适量样品或 5.0 mL 水中,经适当的方法处理后进 GC 分析,以样品的相对峰面积与空白水对照样相对峰面积之比为回收率,考察各种提取条件对测定结果的影响。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理方法的优化和选择

本实验中影响提取效率的主要因素是非均相样品中固相物质对待测样品的吸附作用。从结构上分析,FEN、BPT、CBZ 和 AFP 的分子链相对较长,疏水结构明显,因而易于吸附于固相物质表面,因此受提取方式和基质的影响明显。提取方式不当时,它们从各种基质中的回收一般会略差于其它 4 种化合物。而样品基质中固相物质的比表面对回收的影响也较大,比表面大的(如含有植物叶片的减肥茶等),吸附能力强,回收相对略差。本实验前处理技术的关键在于如何降低基质对待测物的吸附。实验证明:延长振荡时间,超声处理,加入与水互溶的醇溶剂等均是有效的方法。在几种前处理方法中,2.4.1 方法直接、简单,对于均相溶液样品或可溶解成均相溶液的样品,各合成食欲抑制剂的回收率接近 100%。但该法对于加水后不能完全溶解的非均相样品,部分食欲抑制剂的回收率偏低。以不能完全溶于水的粉末介质(胶囊内容物)为例,PHE、FEN、CPT、PHM、PDM、AFP、BPT 和 CBZ 的回收率分别为 93.2%、55.9%、87.1%、94.6%、96.0%、67.6%、31.7%和 37.6%。其中,FEN、AFP、BPT 和 CBZ 偏低严重。考虑到超声波有明显的解吸附作用,因此,2.4.2 在提取步骤中加入超声处理。实验表明:经过超声及振荡的反复处理后,多数食欲抑制剂的提取效率明显提高,PHE、FEN、CPT、PHM、PDM、AFP、BPT 和 CBZ 的回收率分别为 93.8%、79.4%、93.1%、95.2%、97.1%、85.8%、65.1%和 68.0%。其中,BPT 和 CBZ 的回收率提高了将近一倍。但 FEN、AFP、BPT 和 CBZ 的回收仍不够理想。因此,2.4.3 作进一步的改进:在基质中加入甲醇,以改变液固两相对待测物质的作用力,减少吸附,提高萃取率。结果表明:加入甲醇后,FEN、AFP、BPT 及 CBZ 的回收明显改善,分别提高至 100.0%、97.9%、84.5%和 90.5%。因此,采用 2.4.3“加入改性剂的超声振荡提取”作为样品的通用前处理方法。

3.2 GC/NPD 初筛分析

8 种合成食欲抑制剂标样的色谱图如图 1(a),其相对保留时间见表 1。样品用 2.4.3 所述方法处理后,取 2 μ L 进行色谱分析。以二苯胺为内标,计算样品各色谱峰的相对保留时间,与标样相近者(差值 < 0.1)疑为含有该化合物,需进行气-质联用确证分析。

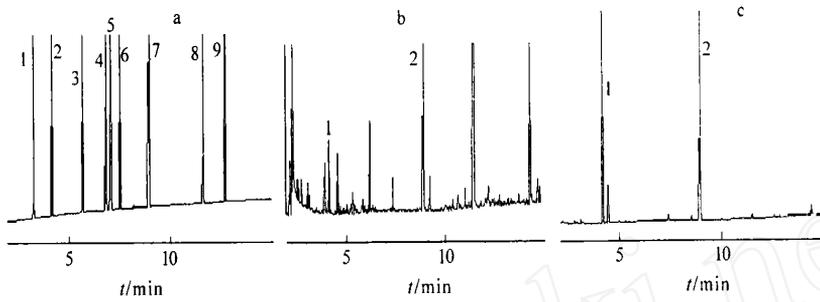


图 1 8 种合成食欲抑制剂 (a) 和实际样品 A 和 B (b, c) 的气相色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a mixture of 8 synthetic anorexics (a) and real sample A and B (b, c) after properly treatment

a. 1. 苯丁胺 (phentermine (PHE)), 2. 芬氟拉明 (fenfluramine (FEN)), 3. 氯苯丁胺 (chlorphentermine (CPT)), 4. 苯甲吗啉 (phenmetrazine (PHM)), 5. 苯二甲吗啉 (phendimetrazine (PDM)), 6. 安非拉酮 (amfepramone (AFP)), 7. 二苯胺 (diphenylamide (internal standard, IS)), 8. 苯非他明 (benzphentermine (BPT)), 9. 氯苄苯丙胺 (clobenzorex (CBZ)); b, c. 1. FEN; 2. IS.

表 1 食欲抑制剂在 GC/NPD 中的保留时间及相对保留时间

Table 1 The retention times and relative retention times of 8 synthetic anorexics in gas chromatography/ nitrogen phosphorous detector (GC/NPD)

食欲抑制剂 Synthetic anorexics	保留时间 Retention time (min)	相对保留时间 Relative retention time	食欲抑制剂 Synthetic anorexics	保留时间 Retention time (min)	相对保留时间 Relative retention time
PHE	3.343	0.371	PDM	7.140	0.793
FEN	4.227	0.470	AFP	7.586	0.843
CPT	5.748	0.639	BPT	11.641	1.294
PHM	6.891	0.766	CBZ	12.730	1.415

3.3 GC/MSD 确证分析

8 种合成食欲抑制剂标样的总离子流图如图 2, 其保留时间及质谱特征碎片离子见表 2。根据样品中可疑峰浓度的高低, 提取液作适当的浓缩或稀释后进 GC/MSD 分析, 根据可疑峰的保留时间及质谱信息, 对照标准品的数据, 确定是否为该化合物。

3.4 工作曲线

用微量取样器移取浓度为 1.0 g/L 的食欲抑制剂标液各 0、10、50、100 μ L 于 10 mL Pyrex 试管中, 加入 5 mL 水, 同 3.5.1 处理后进气相色谱分析。以相对峰面积 y 对含量 x 作图, PHE、FEN、CPT、PHM、PDM、AFP、BPT 及 CBZ 的工作曲线分别为:

$y = 11.893x + 0.0814$, $y = 13.611x + 0.2195$, $y = 17.957x - 0.2089$, $y = 7.2431x - 0.043$, $y = 5.4368x - 0.3279$, $y = 9.4683 - 0.1018$, $y = 10.384x - 0.2225$ 和 $y = 11.833x - 0.2042$, 线性相关系数均在 0.999 以上。

3.5 不同基质样品的回收率

取不同基质的模拟样各适量 (溶液 2.0 mL, 片剂、胶囊及茶 0.2 g, 饼干 0.5 g), 分别加入 8 种合成食欲抑制剂各 10 μ g, 按 2.4.3 处理并测定其含量, 计算回收率如表 3。

3.6 精密度及检出限考察

按选定方法对各合成食欲抑制剂含量均为 4.0 mg/L 的同一样品提取液平行测定 8 次, 其相对峰

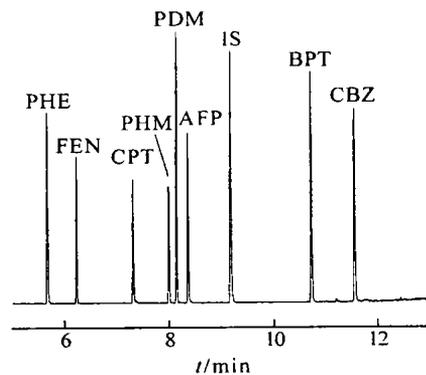


图 2 8 种合成食欲抑制剂的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of a mixture of 8 synthetic anorexics

面积的标准偏差(RSD%)为:PHE 1.53, FEN 1.68, CPT 1.83, PHM 1.86, PDM 2.01, AFP 1.29, BPT 2.65, CBZ 3.48。8种合成食欲抑制剂在所选基质中的检出限均 $< 100 \mu\text{g/L}$;其中,BPT和FEN在片剂、饼干等干扰少的基质中,检出限可达 $20 \mu\text{g/L}$ 。

表2 食欲抑制剂在GC/MSD中的保留时间、相对保留时间及特征质谱碎片离子

Table 2 The retention times, relative retention times and the fragment ions of 8 synthetic anorexics in gas chromatography/mass selective detection (GC/MSD)

食欲抑制剂 Synthetic anorexics	保留时间 Retention time (min)	相对保留时间 Relative retention time	特征碎片离子及相对丰度 Characteristic fragment ions and their relative abundance (%)
PHE	5.667	0.618	58(100) 91(14) 134(6)
FEN	6.233	0.679	72(100) 44(21) 159(13) 216(3) 230(1)
CPT	7.317	0.797	58(100) 125(8) 89(6) 168(5)
PHM	7.997	0.872	71(100) 56(39) 177(15) 105(13)
PDM	8.144	0.888	57(100) 85(79) 191(16) 105(11)
AFP	8.363	0.911	100(100) 77(9) 72(7) 56(4)
BPT	10.717	1.168	91(23) 148(94) 65(10)
CBZ	11.549	1.259	168(100) 125(94) 127(31) 91(23) 65(7)

表3 食欲抑制剂在不同基质样品中的回收率(%)

Table 3 Recoveries of 8 synthetic anorexics from different sample matrixes

基质 Matrix	PHE	FEN	CPT	PHM	PDM	AFP	BPT	CBZ
口服液 Oral liquid	101.7	104.8	103.0	105.0	98.4	101.9	105.3	106.6
片剂 Tablet	103.4	107.7	104.4	105.2	101.0	95.9	95.3	103.2
胶囊 Capsule	103.0	100.0	100.5	100.2	99.8	97.9	84.5	90.5
茶 Tea	98.1	83.0	97.3	97.3	99.3	83.7	80.2	80.1
饼干 Cookies	101.3	102.2	103.6	97.9	101.2	100.9	95.5	98.9

3.7 样品分析

采用本法,对两种可疑含有合成食欲抑制剂的市售减肥保健品进行了实际测定,结果发现二者均含有芬氟拉明(色谱图见图1,质谱图未给出),含量分别为 $7.4 \mu\text{g/片}$ 和 5.3mg/胶囊 。

References

- 1 Qian Xiaoping(钱小平), Zhao Yuanzheng(赵远征), Sun Liyuan(孙丽媛). *Chinese Journal of Chromatogr.* (色谱), **1998**, 16(6): 548~549
- 2 Kaddoumi A, Nakashima M N, Nakashima K. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **2001**, 763(1-2): 79~90
- 3 Kaddoumi A, Kubota A, Nakashima M N, Takahashi M, Nakashima K. *Biomed. Chromatogr.*, **2001**, 15(6): 378~388
- 4 Bogusz M J, Kruger K D, Maier R D. *J. Anal. Toxicol.*, **2000**, 24(2): 77~84
- 5 Wu J T, Zeng H, Deng Y, Unger S E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15(13): 1113~1119
- 6 Palmer R B, Kim N H, Dasgupta A. *Ther. Drug Monit.*, **2000**, 22(4): 418~422
- 7 Valentine J L, Middleton R. *J. Anal. Toxicol.*, **2000**, 24(3): 211~222
- 8 Namera A, Yashiki M, Liu J, Okajima K, Hara K, Imamura T, Kojima T. *Forensic Sci. Int.*, **2000**, 109(3): 215~223
- 9 Ku Y R, Chang Y S, Wen K C, Ho L K. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 848(1-2): 537~543
- 10 Wang Guoquan(汪国权), Wang Hong(王宏). *Shanghai Journal of Preventive Medicine* (上海预防医学杂志), **1998**, 10(9): 390~392

Analysis of 8 Synthetic Anorexics in Adulterated Weight-reducing Tonic

Wang Shan, Mi Jiebo, Chang Wenbao*

(Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering, Department of Chemical Biology,
College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Deng Jing, Lu Jianghai, Cui Kairong, Zhang Changjiu, Wu Moutian

(China Doping Control Center, Beijing 100029)

Abstract Eight synthetic anorexics, fenfluramine (FEN), phentermine (PHE), benzphentermine (BPT), chlorphentermine (CPT), clobenzorex (CBZ), phendimetrazine (PDM), phenmetrazine (PHM), and amfepramone (AFP), which can be found as adulterants in traditional Chinese tonic for losing body weight, were assayed simultaneously by gas chromatography/nitrogen phosphorous detector (GC/NPD) and gas chromatography/mass selective detector (GC/MSD). Sample preparation and recoveries of the synthetic anorexics from tonic of different matrixes were studied. Detection limits were lower than 100 $\mu\text{g/L}$ for all the 8 synthetic anorexics in different matrixes. The method was applied to 2 real samples purchased from Chinese market, and fenfluramine was found in both of the samples.

Keywords Tonic, synthetic anorexics, gas chromatography/nitrogen phosphorous detector, gas chromatography/mass selective detector

(Received 25 February 2003; accepted 30 June 2003)

欢迎订阅《分析化学》(2004 年)

邮发代号 12 - 6

本刊承办广告业务

《分析化学》(ISSN 0253 - 3820, CODEN FHHHDT, CN 22 - 1125/O6)是中国科学院和中国化学会共同主办的专业性学术期刊,主要报道我国分析化学创新性研究成果,反映国内外分析化学学科前沿和进展。刊物设有研究报告、研究简报、评述与进展、仪器装置与实验技术、来稿摘登等栏目。读者对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大专院校师生。本刊也是有关图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《分析化学》目前是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊,1999 年荣获首届国家期刊奖,2000 年获中国科学院优秀期刊奖特别奖,2001 年入选“中国期刊方阵”高知名度、高学术水平的“双高”期刊,2002 年又荣获第二届国家期刊奖和第三届中国科协优秀科技期刊奖。论文已被包括美、英、日、俄等国内外近 30 种刊物和检索系统收录。根据中国科技信息研究所历年来发布的“中国科技期刊引证报告”获悉,本刊被引频次和影响因子均居中国科技期刊排序前列,1999 年和 2000 年被引频次和影响因子均居国内化学期刊第一名,2001 年被引频次和影响因子分别居化学期刊第二名和第三名。多年来,本刊逐年被选入美国权威文摘《化学文摘》(CA)摘引量最大的 1000 种期刊(简称“CA 千种表”)中,并居我国入选“CA 千种表”期刊的前列。从 1999 年第 27 卷第一期开始被美国科学信息研究所(Institute for Scientific Information)正式收入《科学引文索引扩大版》(Science Citation Index-Expanded, SCIE, also known as SciSearch),同时还被收入《Research Alert》和《Chemistry Citation Index》等 ISI 系列。本刊是我国发行量、报道容量和国内外影响较大的科技学术期刊之一。

本刊为月刊,每期 128 页(大 16 开),由科学出版社出版。国内单价 9.00 元,全年 108.00 元。邮发代号 12 - 6,全国各地邮局订阅,国外代号 M336,中国国际书店订购,漏订读者,可与编辑部联系。

编辑部地址:长春市人民大街 5625 号 邮政编码:130022 电话:(0431)5262017/5262018

传真:(0431)5262018 E-mail:fxhx@ciac.jl.cn/fxhx@ciac.ac.cn