

Research of the Method for the Determination of Lorcaserin in Food

Yalan Jiang, Fang Huang*, Huiqin Wu, Xiaolan Huang, Zhixin Zhu, Xin Deng, Huitai Luo, Xiaoshan Lin

Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology, China National Analytical Center (Guangzhou), Guangzhou Guangdong
Email: zzxdg@163.com

Received: Jul. 27th, 2018; accepted: Aug. 9th, 2018; published: Aug. 16th, 2018

Abstract

A method for the determination of Lorcaserin, a new weight-loss drug in food, using LC-MS was established in this paper. The conditions of HPLC and mass parameters were optimized. Lorcaserin was extracted with methanol, and then separated on a Thermo C18 (2.1 mm × 150 mm, 2 μm) column. Mixture of acetonitrile and water (containing 10 mmol/L ammonium acetate) was selected as mobile phase, and detected with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The flow rate of 0.25 mL/min with the column temperature was 30°C. Good linear calibration was obtained for 0.001 - 1 mg/L with correlation coefficient as 0.9994. The spiked recoveries were in the range of 81.8% to 93.3% (n = 6). While the relative standard deviations (RSDs) were less than 7%, the detection limit of Lorcaserin was 1.0 μg/L. The method was proved to be simple, efficient and accurate, and it could be applied to the detection of Lorcaserin in foods and Chinese patent medicine.

Keywords

Weight-Loss Drugs, Liquid Chromatography-Mass Spectrum (LC-MS/MS), Lorcaserin

食品中减肥药氯卡色林的测定方法研究

蒋娅兰, 黄芳*, 吴惠勤, 黄晓兰, 朱志鑫, 邓欣, 罗辉泰, 林晓珊

中国广州分析测试中心, 广东省分析测试技术公共实验室, 广东 广州
Email: zzxdg@163.com

收稿日期: 2018年7月27日; 录用日期: 2018年8月9日; 发布日期: 2018年8月16日

*通讯作者。

文章引用: 蒋娅兰, 黄芳, 吴惠勤, 黄晓兰, 朱志鑫, 邓欣, 罗辉泰, 林晓珊. 食品中减肥药氯卡色林的测定方法研究[J]. 食品与营养科学, 2018, 7(3): 217-224. DOI: 10.12677/hjfn.2018.73026

摘要

建立了一种液质联用测定食品中减肥药氯卡色林的方法。实验优化了液相色谱条件及质谱参数。样品经甲醇提取后,采用Thermo C18 (2.1 mm × 150 mm, 2 μm)色谱柱分离,流动相为乙腈-水(含有10 mmol/L乙酸铵)梯度洗脱,流速0.25 mL/min。柱温为30℃,采用正离子模式的电喷雾质谱检测,多反应选择离子检测(MRM)。氯卡色林在0.001~1 mg/L范围内线性良好,相关系数为0.9994。低、中、高3个添加水平的回收率在81.8%~93.3%之间,RSD小于7%,方法的检出限达到1.0 μg/L。另外采用高效液相色谱法考察了氯卡色林原料中的相关物质,发现不同样品相关物质差别较大。本方法简单、高效、准确,可用于食品及中成药中氯卡色林的测定。

关键词

减肥药,液相色谱-串联质谱,氯卡色林

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

氯卡色林作为一种减肥新药,2012年被批准在美国上市,是自1999年批准西布曲明之后由美国FDA批准的首个减肥药物[1],认为该药可有效降低肥胖和超重患者的体重、改善肥胖相关的代谢指标、且耐受性良好。而《英国医学杂志》刊发的文章则对美国食品与药品监督管理局(FDA)批准该减肥药在美国上市的决定发出质疑,称这些药已经被欧洲监管机构否决,在欧洲,所谓的减肥药无论对减肥有何种好处,都会因其具有副作用而被监管机构否决,不建议人们使用。氯卡色林的分子结构(见图1a)和减肥机理与减肥药西布曲明(结构见图1b)类似[2],都是选择性5-羟色胺和-受体激动剂,使用后使人产生饱胀感而减少对食物的摄取量从而达到减肥的目的。长期以来的研究表明,西布曲明存在加重心血管疾病的风险[3][4][5][6],因此,2010年10月国内禁止使用该药,那么类似功效的减肥药氯卡色林在我国能否被批准使用呢?目前尚且未知。

目前,氯卡色林在中国还未被批准上市,但是国内已有人合成出该成分,并且在市面上销售,厂家没有经过相关部门批准,已经将其添加在减肥类保健食品中,并且流入了市场。这些非法合成的氯卡色林存在纯度不够或相关杂质含量高的问题,目前还没有规范的质量控制手段,这样会给消费者带来很大的潜在危害。因此,急需建立一种测定保健食品中非法添加氯卡色林的检测方法,为打击这些违法行为提供强有力的技术支撑。氯卡色林的检测方法在国内尚未见报道,只有其疗效相关的报道[7],我们已经建立了西布曲明等多种减肥化学药的检测方法,在此基础上[8],针对氯卡色林的分子结构及化学性质,建立了氯卡色林液相色谱-串联质谱检测方法,并用高效液相色谱-紫外检测法研究了其原料的相关物质。该法快速、准确可靠,已经应用于常规检验。

2. 试验部分

2.1. 仪器与试剂

Agilent 1200LC/6410B MS 液相色谱/串联四极杆质谱联用仪; Sartorius BP2HD 电子天平(美国

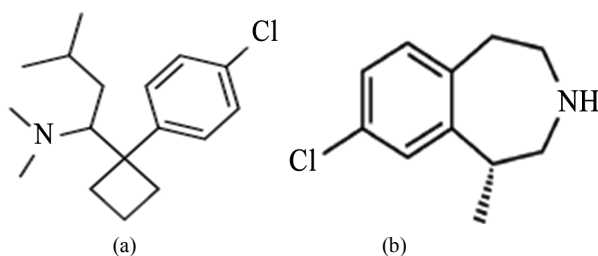


Figure 1. Chemical Structures of Sibutramine (a) and Lorcaserin (b)

图 1. 西布曲明 a (Sibutramine)和氯卡色林 b (Lorcaserin)的分子结构

公司), HS-3120 超声波清洗器。

对照品: 氯卡色林购自 Sigma 公司; 甲醇、乙腈为色谱纯试剂, 水为二次蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2.2. 标准溶液配制

精密称取氯卡色林标准品约 5 mg 于 100 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 得到浓度为 50 mg/L 左右的标准储备液, 临用时用甲醇稀释成浓度分别为 0.001 mg/L、0.005 mg/L、0.01 mg/L、0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.50 mg/L、1.0 mg/L 不同浓度的系列标准溶液。

2.3. 样品处理

减肥胶囊、减肥咖啡、减肥巧克力均为客户送检样品, 胶囊取内容物, 片剂去糖衣, 磨碎, 准确称取粉末约 1 g, 至于 50 ml 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 超声处理 10 min, 超声功率为 120 W, 频率为 40 HZ, 温度为室温, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 待测。

2.4. 测定方法

2.4.1. 液相条件

Thermo C18 (2.1 mm \times 150 mm, 2 μm) 色谱柱, 流动相: A 为乙腈, B 为 10 mmol/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱: 流动相 A 从 0 min 的 10% 递增至 5 min 的 70%, 流速 0.25 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进量 2 μL 。

2.4.2. 质谱条件

采用电喷雾(ESI)离子源, 正离子模式, 采用多反应监测(MRM)扫描方式, N_2 干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, N_2 干燥气流量为 9.0 L/min, 雾化气压力为 275.8 kPa, 电喷雾电压为 4000 V, 质谱分析参数见表 1。

2.4.3. 标准曲线

分别取标准储备液适量, 用甲醇配制浓度分别为 0.001 mg/L、0.005 mg/L、0.01 mg/L、0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.50 mg/L、1.0 mg/L 的标准工作液, 进液质联用仪分析。以定量离子的峰面积为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

3. 结果与讨论

3.1. 色谱条件的优化

试验分别对 Thermo C18、Thermo C8 和 Kromasil C18 三种不同型号的色谱柱进行了考察, 结果表明: 几种色谱柱均适合氯卡色林的分离。并且对比考察了 A: 乙腈-甲酸水溶液; B: 乙腈-乙酸铵水溶液; C: 甲醇-甲酸水溶液; D: 甲醇-乙酸铵水溶液四种流动相体系, 结果显示: 使用乙腈-乙酸铵体系, 氯卡

Table 1. HPLC-MS/MS parameters of Lorcaserin

表 1. 氯卡色林的质谱分析参数

组分	保留时间(min)	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(V)	源内碎裂电压(V)
氯卡色林 Lorcaserin	5.6	196	129*	16	100
			179	20	100

带*的表示定量离子。

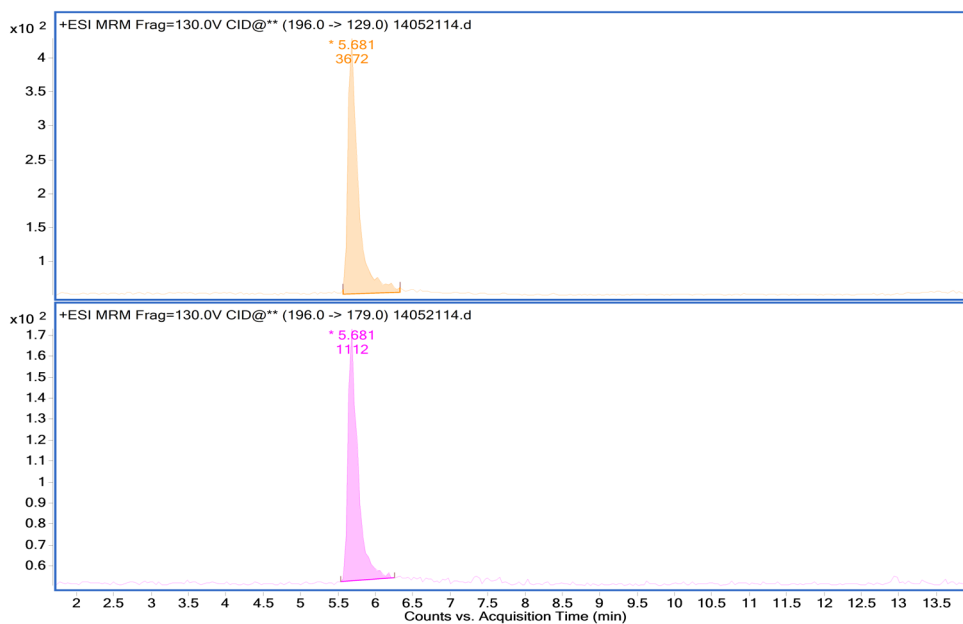


Figure 2. MRM Chromatogram of Lorcaserin

图 2. 氯卡色林的总离子流色谱图

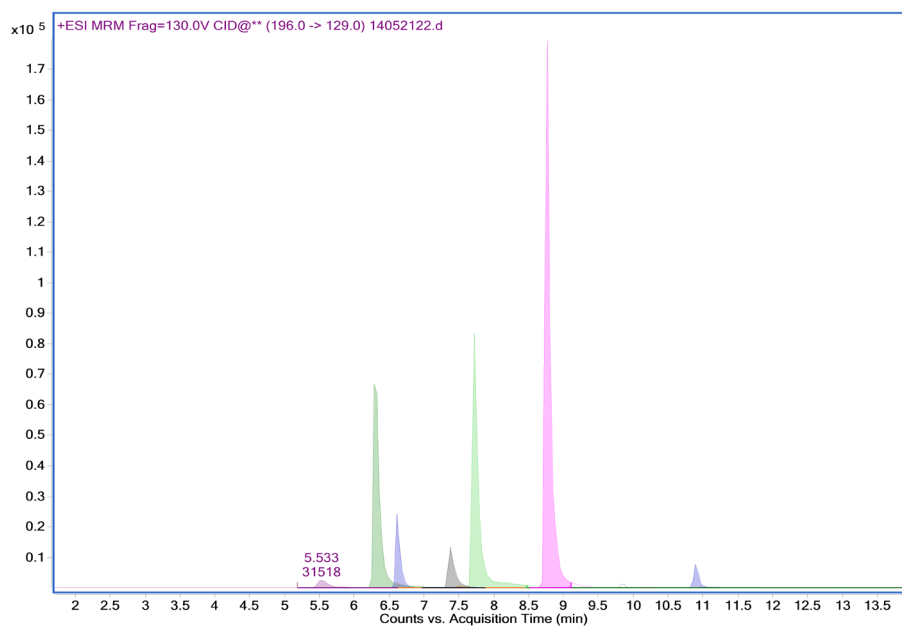


Figure 3. MRM Chromatogram of six compounds

图 3. 氯卡色林与其余 6 种减肥药物的总离子流色谱图

色林的灵敏度高、检测限低,检测下限能达到 0.001 mg/L;使用乙腈-甲酸体系时,检测下限只能达到 0.01 mg/L;综合以上各因素,确定氯卡色林的最佳色谱条件为: Thermo C18 色谱柱,乙腈-10 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相体系。在该条件下得到标准物质的总离子流图如图 2 所示。在此色谱条件下还可同时测定其它多种可能添加减肥化学药,而且分离良好不受干扰。见图 3。

3.2. 质谱条件的优化

由于氯卡色林分子结构中含有仲胺碱性基团,因此选用 ESI 正离子模式较为合适,氯卡色林的准分子离子峰为 m/z 196 (如图 4),在明确准分子离子峰后,再采用二级电离模式,对母离子进行碰撞诱导电离,得到二次碎片离子(如图 5)。然后选择离子丰度最高的离子作为定量离子,选择基线噪声低并且离子丰度较高的离子作为定性离子;最后逐个优化了最佳碰撞能量和碎裂电压,使选定的定量离子和定性离子这两个特征离子的丰度及丰度比达到最佳,优化后的参数见表 1 所示。

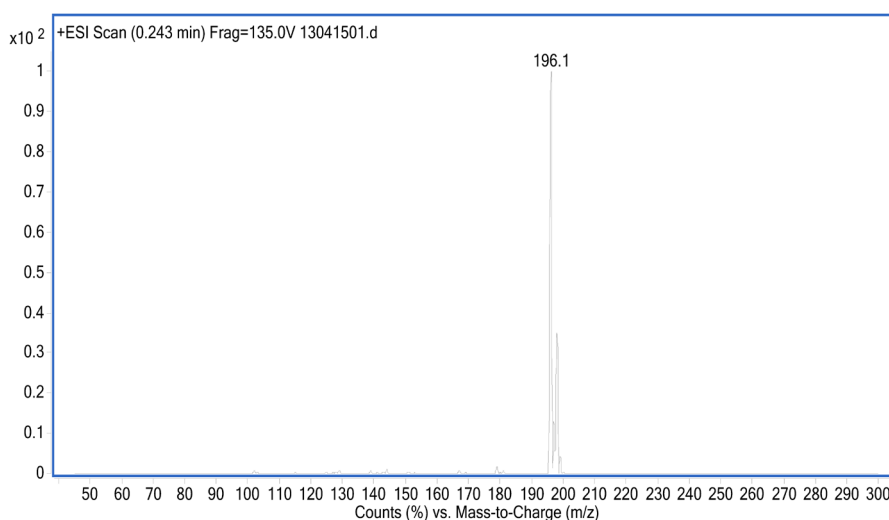


Figure 4. ESI/MS² spectrum of Lorcaserin

图 4. 氯卡色林的母离子质谱图

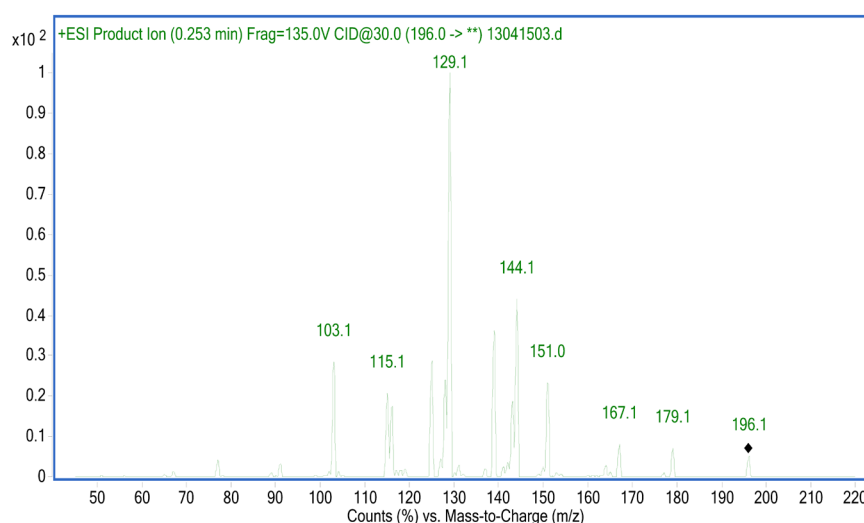


Figure 5. ESI/MS² spectrum of Lorcaserin

图 5. 氯卡色林的 ESI/MS² 质谱图

3.3. 样品前处理的优化及基质效应

本文采用的 LC-MS 法本身具有很高的选择性和较高的灵敏度, 所以只需要将样品中的氯卡色林完全溶解即可, 不需要过柱富集和去除杂质处理。减肥保健食品一般为中草药, 其基质较为复杂, 由于氯卡色林在甲醇, 乙腈中溶解度很好, 所以实验分别做了以甲醇、乙腈作为溶剂时的回收率实验, 结果显示, 以甲醇为溶剂超声提取时氯卡色林的回收率较高, 可达 90%以上, 故选择甲醇作为提取溶剂。另外, 经多次试验发现, 如果将提取溶液直接上机定量时具有一定的基质抑制效应, 因此, 我们采用基质加标法来解决基质效应的影响的问题, 由于 LC-MS 法只针对较低浓度的物质定量较准确, 而高浓度则需要稀释很多倍, 这样存在很大误差, 所以对于氯卡色林含量大于 0.1%的食品需要改用液相色谱紫外检测器来定量。

3.4. 氯卡色林的液相色谱法(HPLC)测定

对于含量较高的氯卡色林产品或原料, 采用 HPLC 定量更准确, 而氯卡色林的最大紫外吸收在 223~225 nm 附近, 因此紫外波长选用 223 nm, 对比了几种流动相体系, 最终选用甲醇-0.002 mol/L 硫酸水溶液, 色谱图如图 6 所示, 图 7 为某送检氯卡色林原料测定得到的色谱图, 从色谱图中可见明显的杂质峰, 说明该原料纯度不高。

3.5. 线性范围、检出限

将上述浓度为 1.0 mg/L、0.1 mg/L、0.05 mg/L、0.01 mg/L、0.005 mg/L、0.001 mg/L 的 6 种标准溶液在最优化条件下测定, 得到浓度与峰面积关系, 检出限为 0.001 mg/L, 线性回归方程为 $Y = 36850X + 28.29$ 相关系数 r 值为 0.9994。

3.6. 回收率和精密度

分别在减肥胶囊、减肥咖啡、减肥巧克力三种样品中添加高、中、低三种不同浓度标准溶液, 每个浓度重复做 3 次, 进行加回收率和精密度试验, 结果见表 2。取 3 次操作的平均值, 氯卡色林在 3 种不同添加浓度下的回收率范围都在 81.8%~93.3%之间, $RSD < 7\%$, 另外取标准溶液在一日内的不同时间点(共 6 个时间点, 间隔控制在 4 小时)测定和在不同日期(5 天内的同一时间)测定, 得到日内精密度均小于 5.0%, 日间精密度均小于 10%, 满足定量分析要求。

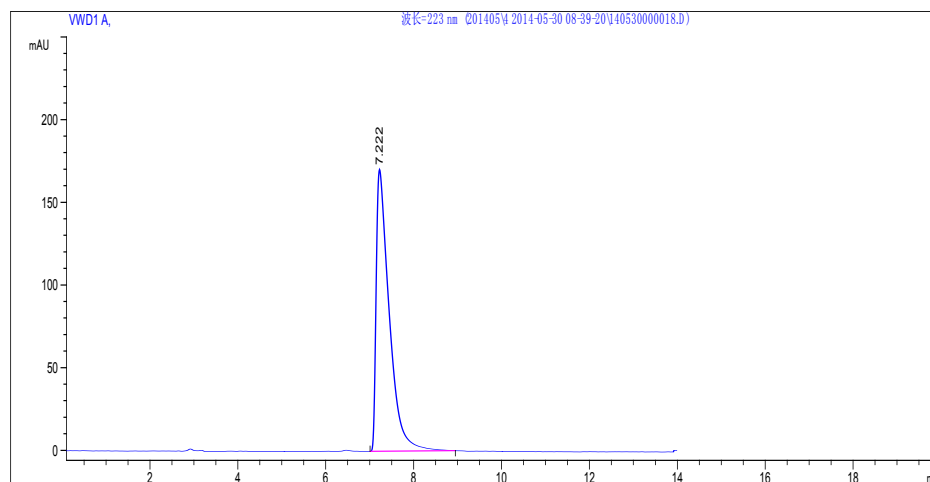


Figure 6. HPLC chromatogram of Lorcaserin
图 6. 氯卡色林标准品的 HPLC 色谱图

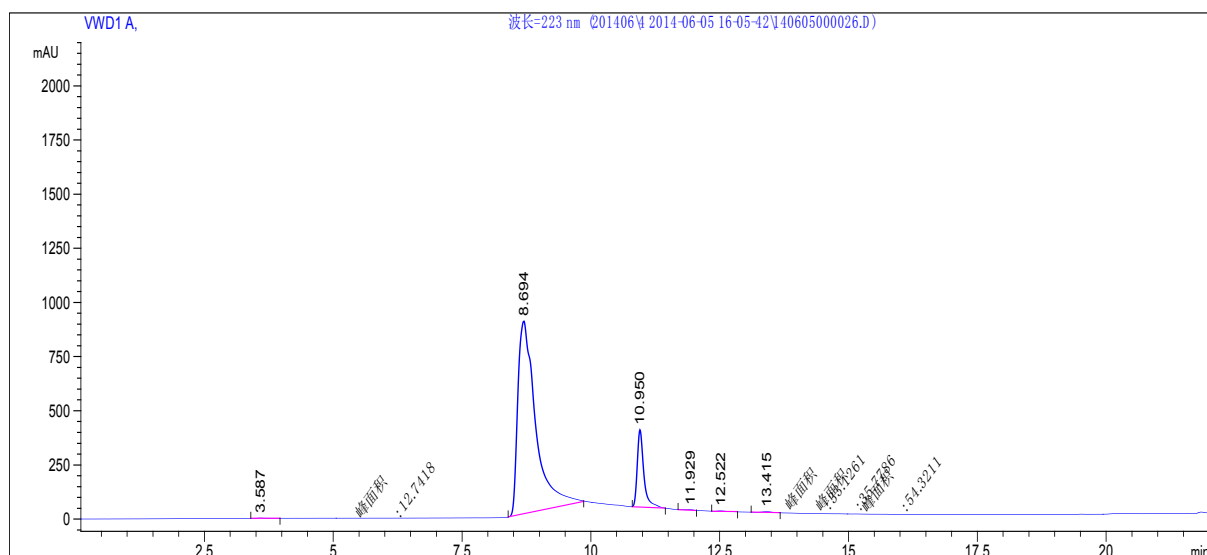


Figure 7. HPLC Chromatogram of Lorcaserin Raw Material Sample

图 7. 某个氯卡色林原料的 HPLC 色谱图

Table 2. Recovery of Lorcaserin with LC-MS/MS (n = 6)

表 2. LC-MS/MS 法测定氯卡色林的回收率(n = 6)

药物名称 Name	加入量 Added (mg/kg)	减肥胶囊 Weight-loss capsule		减肥咖啡 Weight-loss coffee		减肥巧克力 Weight-loss chocolate	
		回收率 Recovery (%)	RSD (%)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
氯卡色林 Lorcaserin	0.1	89.6	5.3	84.5	6.9	89.6	5.7
	0.5	93.3	5.6	83.3	6.5	88.3	6.5
	1.0	92.8	5.7	81.8	6.3	89.7	6.8

4. 结论

本文建立了食品中新型减肥药氯卡色林的液相色谱-串联质谱检测的方法, 该方法简单高效、灵敏度高、选择性好, 适用于保健食品中及其他中成药中氯卡色林的测定。该方法具有很好的实际应用价值, 已经应用于日常检测工作中。

基金项目

广东省科技计划项目(2012B040302007)。

参考文献

- [1] FDA 批准新减肥药上市[J]. 现代医院, 2012(S2): 63.
- [2] 裴振峨, 蔡皓东. 西布曲明的不良反应及其防治[J]. 药物不良反应杂志, 2006(4): 276-279.
- [3] 丁锦希, 傅凌宇, 孟立立, 等. 中美西布曲明上市后风险管理比较研究及其启示[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(14): 1561-1567.
- [4] 崔明霞, 李瑞莲, 李文广, 等. 小鼠代谢综合征模型的特征及西布曲明的治疗作用研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(5): 621-625.
- [5] 曾涛. 常用减肥药物的不良反应[J]. 中国药师, 2007(6): 599-601.
- [6] 陈光亮, 李莉, 严尚学, 等. 盐酸西布曲明对营养性肥胖大鼠的减肥作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003(1): 55-58.

- [7] 黄芳, 吴惠勤, 黄晓兰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健品中非法添加的六种减肥化学品[J]. 分析测试学报, 2013, 32(6): 699-704.
- [8] 石卫峰, 归成, 李晓宇, 等. 治疗肥胖的新药氯卡色林[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(2): 127-129 + 133.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-613X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjfn@hanspub.org