

基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法同时快速测定 保健食品中的降压物质

曾 羲^{1,2}, 赵甜甜³, 刘春生¹, 戚 平¹, 钱振杰¹, 曹霞飞¹, 王 宇^{1,2*}, 周庆琼¹, 汪 宁¹

(¹广州市食品检验所 广州 511400

²华南农业大学食品学院 广东省食品质量安全重点实验室 广州 510642

³广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所 广州 510610)

摘要 建立了基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)同时快速筛查测定盐酸可乐定(HCD)、阿替洛尔(ANL)和利血平(RSP)等 3 种降压物质的方法。对比了不同点样方式、激光强度对 3 种药物信号强度的影响等因素,并进行方法学验证。结果表明,以 α -氨基-4-羟基肉桂酸(HCCA)为基质,采用混合点样法,反射线性正离子模式下选择激光强度为 60%进行 MALDI-TOF MS 检测时,3 个目标物的质谱信号稳定,强度高,响应重复性好。方法学验证结果表明,3 种小分子降压物质在 10~100 ng/mL 线性范围内线性好,相关系数(r) ≥ 0.99 ,方法的筛查限(LOI)为 0.005~0.25 $\mu\text{g/g}$,在液体、固体和半固体 3 种保健食品基质中的加标回收率为 67.56%~104.70%,相对标准偏差(RSDs)为 0.43%~10.51%($n=3$)。该方法灵敏度好,准确性高,精密度优,抗干扰能力强,有机溶剂消耗少,节能环保,尤其适用于大批量、多批次保健食品中降压物质的检测,填补了传统基质分析筛查保健食品中小分子非法添加物的空白。

关键词 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS); α -氨基-4-羟基肉桂酸(HCCA); 保健食品; 降压物质
文章编号 1009-7848(2023)02-0288-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.028

近些年,我国保健食品市场份额逐年攀升,保健食品行业涉及非法添加的化学药物主要有辅助降血压类、抗疲劳类、减肥类、提高免疫力类和辅助降血脂类^[1]。我国的高血压患者已超 2 亿,作为社会常见疾病之一,辅助降血压类保健食品也倍受消费者青睐,其中可能添加的化学药物主要涉及血管紧张素转化酶抑制剂(如卡托普利、阿替洛尔)、中枢神经和交感神经抑制剂(如盐酸可乐定、利血平)和 β -受体阻滞剂(如美托洛尔)等^[2]。已报道且常添加的降压物质包括盐酸可乐定、阿替洛尔、利血平、卡托普利、硝苯地平、氢氯噻嗪、哌唑嗪等^[3-4]。长期服用高剂量添加降压物质的保健食

品虽然可以实现快速降低血压的功效,但是会造成血压剧烈波动,对产品强烈依赖,损害肝肾和停药严重反弹等危害^[5]。

保健食品中非法添加降压物质的检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)法^[6]、液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)法^[7]、液相色谱-四级杆-静电轨道阱高分辨质谱(HPLC Q-Orbitrap HRMS)法^[8]、表面增强拉曼光谱(SERS)法^[9]等。其中,HPLC 法分离效率高、重复性好^[10],HPLC-MS 法灵敏度高和强特异性^[11],现阶段这两种方法应用广泛;HPLC Q-Orbitrap HRMS 法可实现比 HPLC-MS 法更高灵敏度的定性、定量检测;SERS 法操作简便,对实验人员的要求不高。上述方法前处理复杂,检测过程耗时长,基质效应显著^[12],且需消耗大量的试验耗材和有机试剂,不适合多批次、大批量保健食品中非法添加降压物质的筛查。

基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术具有灵敏度高,可高效精确判断分子质量,无需对样品进行分离就可直接点靶上机,样品和溶剂量消耗少,测定时间短等优势^[13-14],广泛应用于生物学、医学和化学领域,包括小分子药物^[15]、寡糖^[16]、脂质^[17]、多肽和蛋白质^[18-19]

收稿日期: 2022-02-18

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A1515010659,2023A1515012605);广东省自然科学基金项目(2019B1515210025);广东省药品监督管理局科技创新项目(2019TDB04);广东省食品质量与安全重点实验室开放基金课题(2021KF003);广州市市场监督管理局科技计划项目(2020kj51)

第一作者: 曾羲,女,硕士,工程师

通信作者: 王宇 E-mail: xxwangyu@163.com

和聚合物^[20]等。MALDI-TOF MS 的软电离方式能很好地保存小分子的完整性、分辨率高,在小分子分析筛查、鉴定方面存在巨大的潜力与优势^[21]。虽然传统基质在质谱的低分子质量(<500 u)区域会产生较多基质碎片,但是在部分低分子质量区域并没有干扰,仍可实现对部分小分子化合物的检测。张培等^[22]利用传统基质 HCCA 和 SA 实现了对孔雀石绿的定性、定量快速分析,样品分析时间仅需 5 s 即可获得定量结果,说明传统基质在小分子化合物的检测领域还有很大的开发空间。本研究基于 MALDI-TOF MS 法的优势以 HCCA 为基质,研究盐酸可乐定、阿替洛尔和利血平等 3 种降压效果明显、原料价格低廉的非法添加物的快速筛查方法,旨在填补 MALDI-TOF MS 法传统基质在保健食品中小分子非法添加物定性、定量分析上的空白,减少单个样品的筛查时间,用于大批量样品的筛查和阳性样品的精准定量,为保健食品行业的健康有序发展提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

21 批保健食品均购于网络; 甲醇(色谱纯级), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), 德国 Bruker 公司; 盐酸可乐定标准品(HCD, 批号:100071-201607)、阿替洛尔标准品(ANL, 批号:100117-201606)、利血平标准品(RSP, 批号:100041-202015), 中国食品药品检定研究院提供; 本试验用水均由 Milli-Q 超纯水制备系统制得, 美国 Millipore 公司。

1.2 仪器与设备

MS205DU 电子天平, 上海梅特勒-托利多国际贸易有限公司; ultraflex extreme MALDI-TOF MS 仪(配有 flexAnalysis 3.4 数据分析系统)、384 孔 ground steel 靶板, 德国 Bruker 公司; 2600TH 超声清洗仪, 上海安谱科学仪器有限公司; M3 7610-33CN 涡旋混合仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Allegra X-30R 高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司。

1.3 标准溶液和基质配制

1.3.1 标准溶液的配制

分别准确称取各标准品 10.00 mg, 用甲醇振荡溶解并定容于 10 mL 容量瓶中, 得到质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 于 -18 °C 避光贮存。分别精密量取上述储备液 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 得到 10 μ g/mL 的混合标准溶液。临用时将上述混合标准溶液用甲醇-水(1:1, 体积比)液稀释至 100 ng/mL, 分别移取适量 100 ng/mL 混合标准溶液配制成质量浓度为 10, 20, 40, 60, 80 ng/mL 和 100 ng/mL 的标准曲线。以同样方法配制 100 ng/mL 盐酸可乐定(HCD)、阿替洛尔(ANL)、利血平(RSP)单个标准溶液。

1.3.2 基质的配制

称取 4.0 mg HCCA 基质于离心管中, 加入甲醇-水(1:1, 体积比), 配成质量浓度为 4.0 mg/mL 的 HCCA 基质溶液, 超声溶解 10 min。

1.4 样品前处理

在前期研究^[7]基础上稍作修改, 即固体或半固体样品研细混匀、液体样品摇匀后, 准确称取 0.2000 g 样品于 10 mL 比色管中, 加入甲醇-水(1:1, 体积比)溶液定容, 超声提取 10 min, 固体和半固体样品经 8 000 r/min 离心 3 min 后取上清液备用, 液体样品可直接上机测定。加标样品在称量后分别加入对应质量浓度(即 0.75, 2.0 μ g/g 和 4.0 μ g/g)的混合标准溶液, 再进行定容提取操作, 每个样品重复测定 3 次。

1.5 点样与 MALDI-TOF MS 分析条件

1.5.1 点样方式

基质结晶质谱信号不稳定、响应重复性差和甜点效应是影响 MALDI-TOF MS 定量分析测定的关键问题, 不同基质与不同样品生成的结晶不同, 产生的问题也不尽相同^[21]。本试验将 100 ng/mL 的混合标准溶液作为样品、以 HCCA 为基质, 考察双铺法 a、双铺法 b、混合法和三明治法等 4 种不同的点样方式, 解决样品与 HCCA 基质混合所得结晶不均造成质谱信号不稳定及响应重复性差的问题。

1.5.1.1 双铺法 a

先移取 1 μ L 样品于 384 孔 ground 靶板上, 自然挥干后, 再移取 1 μ L 基质覆盖, 自然挥干待测。

1.5.1.2 双铺法 b

先移取 1 μ L 基质于 384 孔 ground 靶板上, 自然挥干后, 再移取 1 μ L 样品覆盖, 自然挥干待测。

1.5.1.3 混合法 取 2 μL 样品和 2 μL 基质混合均匀后,取 2 μL 混合物直接于 384 孔 ground 靶板上点样,自然挥干待测。

1.5.1.4 三明治法 取 0.5 μL 基质溶液于 384 孔 ground 靶板上,自然挥干后,取 1 μL 样品覆盖基质,自然挥干后,再取 0.5 μL 基质溶液挥干待测。

1.5.2 MALDI-TOF MS 条件 点靶光源:氮气激光;离子源:电喷雾电离(ESI)源;波长:337 nm;检测模式:反射线性正离子模式;采集范围:160~3 580 u;激光强度为:60%;光谱响应强度叠加次数均为 20 次,利用仪器配置的 flex Control 软件对质谱图进行质量轴的质荷比(m/z)进行标记和默认平滑处理,并用 flexAnalysis 3.4 软件分析原始数据,根据叠加所得目标物对应离子的峰面积换算成对应标准曲线中盐酸可乐定、阿替洛尔和利血平的含量。

2 结果与分析

2.1 质谱裂解规律的研究

3 种降压物质的单个标准溶液响应效果和质谱裂解规律,均与溶剂空白的 HCCA 基质进行比较,结果如图 1 所示。

MALDI-TOF MS 对目标物离子化形式通常有 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 等 3 种^[23],由图 1 可以看出,3 种降压物质质谱峰的离子化形式均为 $[M+H]^+$,即分别为 $[HCD+H]^+$ (m/z 229.913)、 $[ANL+H]^+$ (m/z 267.099) 和 $[RSP+H]^+$ (m/z 609.355),与 Manka 等^[23]报道的 MALDI-TOF MS 带电裂解规律一致。虽然 HCCA 空白基质在质荷比(m/z)160~450 u 范围内存在较多碎片,但是其在 3 种降压物质对应的质荷比(m/z)处干扰很小,即 HCCA 空白基质在对应质荷比处的信噪比(S/N)小于 3,故可忽略基质的影响,可利用 HCCA 作为 3 种降压物质的分析测定基质。

2.2 点样方式的考察

不同点样方式对应的样品与基质结晶在质谱仪高倍放大镜下的光学图像见图 2,从样品与基质的结晶来看,混合法最均匀,其次为双铺法,最后为三明治法。通过对每个样品进行反射线性正离子模式采集 20 次叠加得到的质谱图来看,混合点样法随机采集的 20 次质谱信号均较稳定、重复

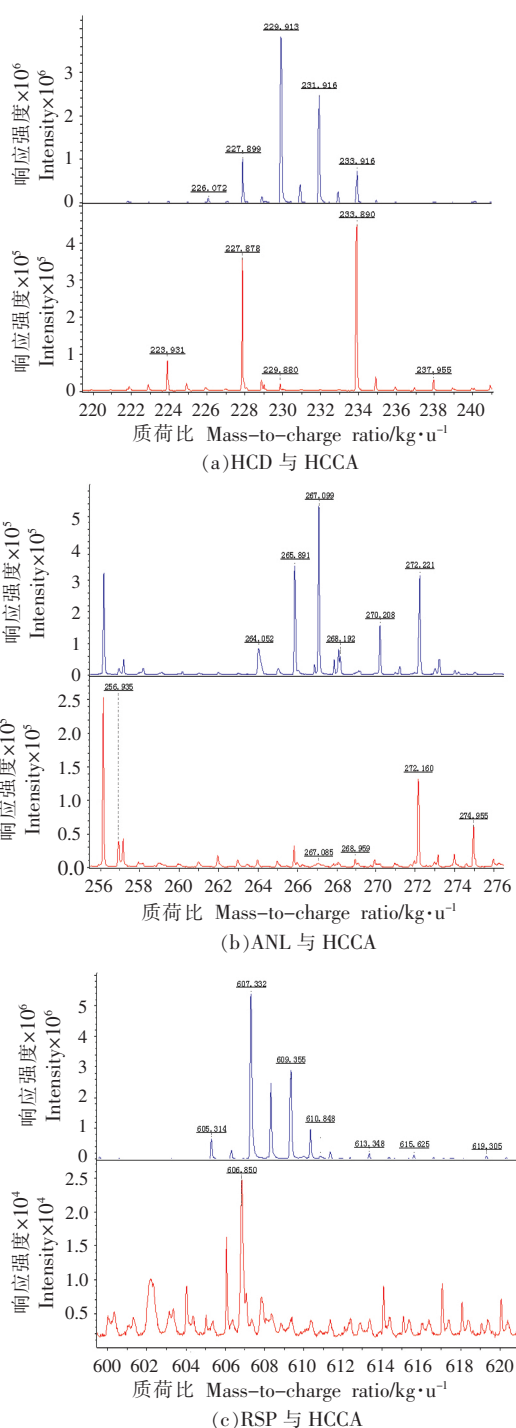


图 1 3 种降压物质与对应空白基质的 MALDI-TOF 质谱图

性好且没有甜点效应;双铺法叠加得到响应强度与混合点样法相当,无甜点效应,但质谱信号稳定性和重复性劣于混合点样法,且先点样品再点基

质和先点基质再点样品对 MALDI-TOF MS 叠加响应强度基本无影响;三明治法产生的质谱信号虽强于其它 2 种方法,但质谱信号的稳定性和重复性不佳,且会出现部分甜点效应。因此,综合考虑试验操作方便快捷、甜点效应、质谱信号重复性、稳定性和定量分析等因素,选用法作为本研究的点样方式。

2.3 激光强度的选择

HCCA 基质与 100 ng/mL 的 3 种降压物质混合标准溶液形成的结晶在 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 等 9 种激光能量强度的 MALDI-TOF-MS 响应效果如图 3 所示。

从图 3 可以看出,激光能量强度为 10%~60% 时,随着激光能量强度的增加,3 种化合物与 HCCA 形成的共结晶质谱响应强度从 10^5 增加到 10^6 ,说明激光能量强度对质谱峰信号影响较大;当激光强度超过 60% 时,HCD 和 RSP 的质谱响应强度增加较慢,ANL 的质谱响应强度甚至略有降低。一般而言,质谱峰叠加强度在 10^5 即可认为响应良好,且过高的激光强度不利于离子源的维护。因此,选用 60% 的激光强度作为 MALDI-TOF MS 对 3 种降压物质的定性定量研究分析。

2.4 方法学评价

2.4.1 筛查限及线性范围 按 1.3 节中方法配制混合标准曲线,以 3 个降压物质叠加所得目标离子峰面积(y)对应的质量浓度(x , ng/mL)分别绘制标准曲线,线性范围和相关系数见表 1。本研究的筛查限^[24](Limit of identification, LOI)为仪器测定标准溶液的最低质量浓度($S/N \geq 3$)对阴性样品提取液加标试验后,验证所得实际加标样品最低质量浓度($S/N \geq 3$),结果如表 1 所示。从表 1 可以看出,3 种小分子降压物质在线性范围内相关系数(r) ≥ 0.99 ,说明线性良好,能满足筛查测

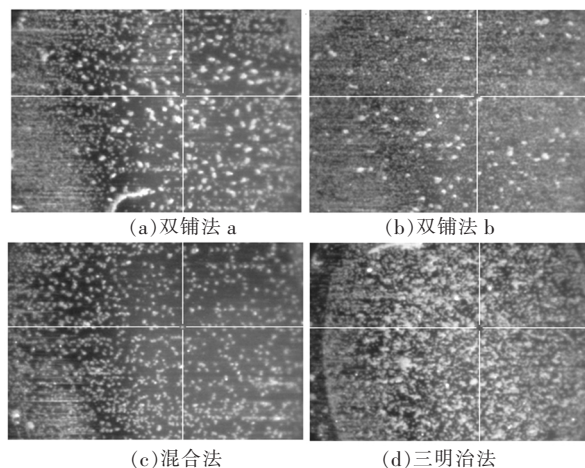


图 2 4 种点样方式形成的 HCCA 与样品共结晶在质谱仪高倍放大镜下的光学图像

Fig.2 Images of HCCA and sample crystal formed by 4 kinds of spotting approaches under the high magnification lens in the mass spectrometer

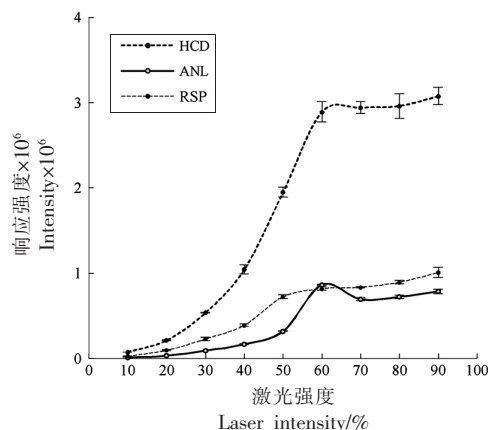


图 3 9 种激光能量强度的 HCCA 与样品共结晶响应强度比较 ($n=3$)

Fig.3 Comparison of response intensity on HCCA and sample crystal formed by 9 different laser energy intensities ($n=3$)

表 1 3 种降压物质在 3 种阴性样品中线性范围、相关系数和筛查下限

Table 1 Linear range, correlation coefficients (r) and limit of identification (LOI) of 3 anti-hypertensive substances on 3 negative samples

化合物名称	线性范围/ng·mL ⁻¹	r	LOI/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		
			液体	固体	半固体
HCD	10~100	0.9980	0.005	0.025	0.0075
ANL	10~100	0.9936	0.050	0.250	0.0500
RSP	10~100	0.9926	0.005	0.025	0.0150

定要求;3种样品中的 LOI 范围为 0.005~0.25 $\mu\text{g}/\text{g}$, LOI 值从低到高依次为 RSP、HCD、ANL;同种降压物质比较,液体样品的 LOI 值最低,其次为半固体样品,最高为固体样品。

2.4.2 加标回收试验及精密度 3种阴性样品外

标法定量的回收率结果见表 2。结果表明,采用传统基质 HCCA 作为 MALDI-TOF MS 测定 3 种降压物质的加标回收率 67.56%~104.70%,相对标准偏差(RSDs)为 0.43%~10.51%,说明本试验方法可满足定量分析测定要求。

表 2 3种降压物质在低、中、高 3个水平下的加标回收率和相对标准偏差($n=3$)

Table 2 Spiked recoveries and relative standard deviations of 3 anti-hypertensive substances on low, medium and high levers ($n=3$)

化合物 名称	加标水平/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	液体		固体		半固体	
		加标回收率/%	RSDs/%	加标回收率/%	RSDs/%	加标回收率/%	RSDs/%
HCD	0.75	69.41	1.86	86.65	4.86	96.10	4.27
	2.00	70.12	0.98	86.59	8.00	87.20	3.30
	4.00	84.09	0.43	95.76	6.33	91.99	2.10
ANL	0.75	78.87	0.65	78.44	10.51	79.55	5.36
	2.00	72.24	2.97	91.73	5.03	91.25	3.08
	4.00	82.73	1.08	96.73	2.08	95.96	1.97
RSP	0.75	67.56	2.69	99.08	3.44	96.69	1.14
	2.00	74.02	0.94	94.04	4.33	93.81	3.05
	4.00	84.01	1.78	104.70	2.41	96.60	1.91

2.5 实际样品检测

应用本研究方法检测 21 种市售保健食品,包括口服液、保健酒等液体,片剂、硬胶囊等固体,软胶囊等半固体,通过对比实际样品在对应目标物质荷比的峰响应强度,进行定性分析筛查,结果发现,有 1 种样品添加了盐酸可乐定,含量为(10.79 \pm 0.95) $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

3 结论

本研究建立了传统基质 HCCA 作为基质,应用 MALDI-TOF MS 软电离分析技术快速定性、定量检测保健食品中添加了 3 种降压物质的方法,填补了传统基质对小分子化合物分析测定保健食品非法添加药物的空白。该方法不仅灵敏度高、筛查结果准确、精密度好,且抵抗样品干扰的能力强、无需复杂前处理、流动相和色谱柱,每个样品经仪器分析仅需 0.3 s 即获得筛查结果,且靶板可重复使用,可满足应急抽检、日常检验等大批量、多批次保健食品中降压物质的筛查检测,一次最多可检测 384 个样品。

MALDI-TOF MS 在小分子分析测定方面存

在巨大优势,可为保健食品非法添加物的风险评估提供快速、准确和极其高效的筛查方法,然而目前的基质难以实现对所有非法添加物的分析筛查,因此,开发广谱性、适用所有小分子分析筛查的基质是接下来的重点研究方向。

参 考 文 献

- [1] ŽUNTAR I, KRIVOHAVEK A, KOSIĆ-VUKŠIĆ J, et al. Pharmacological and toxicological health risk of food (herbal) supplements adulterated with erectile dysfunction medications[J]. *Current Nutrition & Food Ence*, 2018, 24: 9-15.
- [2] 陈东洋, 张昊, 冯家力, 等. 保健食品中违禁药物检验技术研究进展[J]. *色谱*, 2020, 38(8): 880-890.
CHEN D Y, ZHANG H, FENG J L, et al. Advances in technologies for determination of illegal drugs in health food[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020, 38(8): 880-890.
- [3] 郭艳娟. 中成药非法添加化学药物研究进展[J]. *天津药学*, 2014, 26(4): 52-55.
GUO Y J. Advances in research for determination of

- illegal drugs in herbal supplements[J]. *Tianjin Pharmacy*, 2014, 26(4): 52-55.
- [4] 黄宝斌, 许明哲, 杨青云, 等. 中成药和中药材添加化学物质补充检验方法分析[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(9): 1701-1708.
- HUANG B B, XU M Z, YANG Q Y, et al. Review of the approved supplementary testing methods and items on identifying adulterated chemical substances in traditional Chinese medicine preparations and herbal medicines[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2014, 34(9): 1701-1708.
- [5] 黎亮星, 赖彩云, 郑艾妮, 等. 微乳液相色谱法同时测定降压中成药及保健品中添加的 10 种化学药物[J]. *色谱*, 2017, 35(2): 203-210.
- LI L X, LAI C Y, ZHENG A N, et al. Simultaneously determination of 10 spiked chemical drugs in antihypertensive herbs preparations and health foods by microemulsion liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35(2): 203-210.
- [6] 倪赞, 张崇生, 谢循策. 亚 3 μm 填料核壳色谱柱结合 HPLC-DAD 法快速测定降压类中成药及保健食品中添加的 34 种化学药物[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(5): 895-903.
- NI Z, ZHANG C S, XIE X C. Rapid determination of 34 chemicals drugs in anti-hypertensive Chinese patent medicines and healthy foods by HPLC-DAD coupled with sub-3 μm particle fused-core column[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2019, 39(5): 895-903.
- [7] 曾羲, 戚平, 汪宁, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定口服液保健食品中非法添加的降压和壮阳抗疲劳类药物[J]. *农产品加工*, 2020, 9: 55-58.
- ZENG X, QI P, WANG N, et al. Simultaneous determination of antihypertensive and aphrodisiac medicines illegally added in oral liquid health products by HPLC-MS/MS[J]. *Farm Products Processing*, 2020, 9: 55-58.
- [8] 赵孔祥, 柴铭骏, 宋旭, 等. 液相色谱-四级杆-静电轨道阱高分辨质谱法测定保健食品中降压类药物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(11): 3481-3487.
- ZHAO K X, CHAI M J, SONG X, et al. Determination of antihypertensive drugs in health food by liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(11): 3481-3487.
- [9] 周亚红, 吴国萍, 黄嘉婕. 纳米银表面增强拉曼光谱法测定保健食品中非法添加的 4 种地平类降压药物[J]. *理化检验(化学分册)*, 2020, 56(3): 302-307.
- ZHOU Y H, WU G P, HUANG J J. Determination of four dipping anti-hypertensive drugs illegally added in healthcare foodstuffs by nano-silver surface enhanced raman spectroscopy[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2020, 56(3): 302-307.
- [10] ZHONG Y Q, SUN C J, XIONG J Y, et al. Simultaneous determination of eight adulterants in weight management supplements and herbs by HPLC-DAD and LC-MS/MS[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2017, 40(12): 640-648.
- [11] 胡胜杰, 李优, 周莹, 等. QuEChERS 法结合液相色谱-串联质谱测定保健食品中 50 种非食用添加剂[J]. *色谱*, 2019, 37(7): 701-711.
- HU S J, LI Y, ZHOU Y, et al. Determination of 50 non-edible additives in health food using the QuEChERS method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(7): 701-711.
- [12] 王宇, 曾羲, 钱振杰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定安神类保健食品中的巴比妥[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(12): 4991-4997.
- WANG Y, ZENG X, QIAN Z J, et al. Rapid determination of barbital residues in sedative-hypnotic health products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(12): 4991-4997.
- [13] NEUS J M, ROSA H H, PILAR C F. Stabilization of formaldehyde into polysimethylsiloxane composite: Application to the *in situ* determination of illicit drugs[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(10): 2141-2418.
- [14] CHOU C H, CEN H P, HSIAO H H. Rapid analysis of ketamine with in-house antibody conjugated boronic acid modified silver chip on MALDI-TOF MS measurement[J]. *Talanta*, 2021, 226: 122115.
- [15] BLINCOE W D, LIN S S, DREHER S D, et al. Practical guide on MALDI-TOF MS method development for high throughput profiling of pharmaceutically relevant, small molecule chemical reactions[J]. *Tetrahedron*, 2020, 36(11): 131434.

- [16] HUANG C C, YAN J Y, ZHAN L P, et al. Linkage and sequence analysis of neutral oligosaccharides by negative-ion MALDI tandem mass spectrometry with laser-induced dissociation[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 4(8): 67-77.
- [17] 苗楠, 张宇, 张建业, 等. 3,4-二氨基苯基苯甲酮在基质辅助激光解吸离子化质谱分析磷脂中的应用[J]. *分析化学*, 2011, 39(5): 605-610.
MIAO N, ZHANG Y, ZHANG J Y, et al. Matrix of 3,4-diaminobenzophenone for analysis of phospholipids by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 39(5): 605-610.
- [18] 李大鹏, 谢光珊, 谢佩斯, 等. 两性离子双功能化超亲水金属有机框架纳米复合材料的制备及其用于糖肽的选择性富集[J]. *色谱*, 2021, 39(3): 205-210.
LI D P, XIE G S, XIE P S, et al. Synthesis of zwitterionic dual-functional metal-organic framework nanocomposite with ultra-hydrophilicity for selective enrichment of glycopeptides [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(3): 205-210.
- [19] WANG W, KALUZA A, NOUTA J, et al. High-throughput glycopeptide profiling of prostate-specific antigen form seminal plasma by MALDI-MS[J]. *Talanta*, 2021, 222: 121495.
- [20] LIANG Q L, SHERWOOD J, MACHER T, et al. Citric acid capped iron oxide nanoparticles as an effective MALDI Matrix for polymers [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28(3): 409-418.
- [21] 李鹏. 基于介孔沸石材料新型 MALDI 基质研究及其在小分子化合物定量分析的应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
LI P. Development of new zeolite matrix for MALDI-TOF-MS and its application to quantitative analysis of small particles[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural, 2019.
- [22] 张培, 陈丹. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱快速定量有机小分子化合物应用研究[J]. *中国药业*, 2020, 29(17): 80-82.
ZHANG P, CHEN D. Rapid determination of small molecule compound by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *China Pharmaceuticals*, 2020, 29(17): 80-82.
- [23] MANKA M F, LAURA H, HARTMUT S. MALDI mass spectrometry in medical research and diagnostic routine laboratories [J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2016, 10(4): 96-109.
- [24] PÉRIAT A, BIERI S, MOTTIER N. SWATCH-MS screening strategy for the determination of food dyes in spices by UPLC-HRMS [J]. *Food Chemistry: X*, 2019, 1: 100009.

Simultaneously Analysis of Anti-hypertensive Substances by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Dietary Supplements

Zeng Xi^{1,2}, Zhao Tiantian³, Liu Chunsheng¹, Qi Ping¹, Qian Zhenjie¹, Cao Xiafei¹, Wang Yu^{1,2*},
Zhou Qingqiong¹, Wang Ning¹

¹Guangzhou Institute for Food Control, Guangzhou 511400

²College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, Guangzhou 510642

³Sericulture & Agri-food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610)

Abstract A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method was set up for simultaneously screening and analysis of 3 kinds of anti-hypertensive substances which is clonidine hydrochloride (HCD), atenolol (ANL) and reserpine (RSP) in dietary supplements. The different spotting approaches and laser power intensities of 3 kinds of anti-hypertensive substances were compared, and the methodology validation experiments were also completed. As a result, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) was used as matrix, and samples were spotted by mixed approach under the reflect linear positive mode and laser power of 60%. Under the optimal condition of MALDI-TOF MS, the 3 objectives could obtain stable signals, high intensities and well-repeated mass spectrometrics.

The results of method validation showed that the linear relationship was excellent among 10 to 100 ng/mL, and the regression coefficients (r) were all above 0.99. The limit of identification (LOI) were between 0.005 to 0.25 $\mu\text{g/g}$, and the recoveries were in the range of 67.56%–104.70% among liquid, solid and half-solid dietary supplements samples, while the relative standard deviations (RSDs) were ranged from 0.43% to 10.51% ($n=3$). This method occupied with high sensitivity, accuracy precision, anti-interference ability, low chemical solvents and environmental friendly, which could satisfy multitudinous batches of dietary supplement samples. Meanwhile, this method filled a gap of traditional matrix used in MALDI-TOF MS to screen and analyze small molecule compounds in dietary supplements.

Keywords matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA); dietary supplements; anti-hypertensive substances