高效液相色谱/质谱联用测定保健食品中的伐地那非

陈　稚[1]　肖　松[1]　陈　波[1]　姚守拙[1]　王竹天[2]　杨大进[2]　韩宏伟[2]
(1. 湖南师范大学,湖南　长沙　410081; 2. 中国疾控中心营养与食品安全所,北京　100021)

摘　要:为测定保健食品中伐地那非,建立了高效液相色谱质谱联用(HPLC - ES/MS)的测定方法。该方法以紫外定量,质谱定性。色谱条件为 RP - C_{18} 色谱柱,流动相:0.2 %甲酸水溶液 + 乙腈 = 65 + 35(体积分数);流速 1 ml/min;进样量 5 μl;检测波长 254 nm。质谱采用电喷雾正离子模式(ESI +),扫描范围为:200～700(m/z)。伐地那非在 3.6～450 μg/ml 范围内,浓度与峰面积呈良好的线性关系,定量检出限为 18 ng,最低检出限为 0.9 ng(S/N = 6)。本方法流动相简单,分析时间短且试样预处理简单,灵敏度高,借助质谱的定性能力,可大大提高方法可靠性和抗干扰能力,能准确快速地测定保健食品中的伐地那非。

关键词:色谱法,高压液相;光谱分析,质量;营养保健品;磷酸二酯水解酶类

Detection of vadenafil in health foods by high performance liquid chromatography/mass spectrometry

CHEN Zhi, XIAO Song, CHEN Bo, YAO Shou-zhuo, WANG Zhu-tian, YANG Da-jin, HAN Hong-wei
(Hunan Normal University, Hunan Changsha 410081, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography electrospray/mass spectrometry (HPLC - ES/MS) method was developed to detect vardenafil in health foods. The separation was completed on a RP - C_{18} column with 0.2 % formic acid aqueous solution-acetronitrile (65 + 35) as mobile phase. Elution was run at a flow rate of 1 ml/min and UV detection was performed at 254 nm. Good linearity between response (peak area) and concentration was shown in a concentration range of 3.6 ～ 450 μg/ml for vardenafil. The correlation coefficients of the calibration curves were better than 0.999 8 (n = 6). The limit of quantitation (LOQ) was 18 ng and the limit of detection (LOD) was 0.9 ng (S/N = 6). The method was sensitive, precise and highly reproducible.

Key word: Chromatography, High Pressure liquid; Spectrum Analysis, Mass; Dietary Supplement; Phosphoric Diester Hydrolases

伐地那非(Vardenafil)为选择性 5 - 磷酸二酯酶(PDE - 5)抑制剂,是继西地那非(Sildenafil)、他地那非(Tadalafil)之后第 3 个男性性功能障碍(非器质性)用药,由德国拜耳与葛兰素史克公司联合开发后于 2003 年 8 月在美国批准上市,商品名"力伟拉"(Levitra)[1,2]。与西地那非(伟哥)相比,伐地那非在分子结构上稍有改变,结构式见图 1。药效较西地那非和他地那非有所改良,具有用量少、起效时间快、作用持久、副作用小等优点[3]。主要不良反应有轻度到中度的头痛、胃部不适等,心血管患者禁止使用[4,5]。

虽然伐地那非上市不久,但现已发现一些不法厂商在某些抗疲劳保健食品中添加此种药物来增强效果以达到非法牟利的目的,而伐地那非作为处方药是被禁止添加到保健食品中的,这种行为严重威胁到服用者的身体健康和生命安全,因此有必要建立一种快速、准确检测伐地那非的方法。

本文建立的高效液相色谱/质谱联用的方法具

基金项目:国家"十五"重大专项(2001BA804A21);新药博士基金(2003AA2Z3515);湖南省杰出青年基金资助(03JJY1002)。
作者简介:陈稚　女　硕士生
通讯作者:陈波　男　教授　博士生导师

This work was supported by the Grant from National Science and Technology Program Funds, the New Drug Funds and the Outstanding youth of Science Funds of Hunan Province of China.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

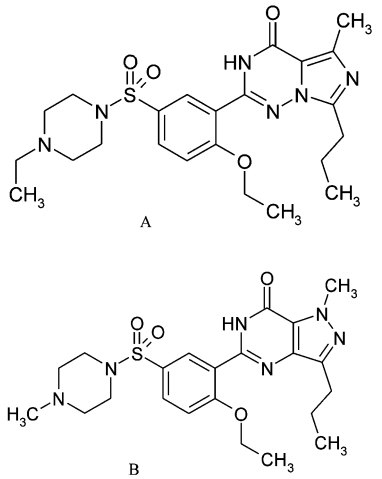


图 1　A: 伐地那非结构式　　B: 西地那非结构式

有快速、准确、抗干扰能力强的特点,能够对保健食品中的伐地那非进行准确检测。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　Waters 2695 分离单元(配有自动进样器)、Waters 2487 双波长检测器、Waters Micromass ZQ2000 质谱检测器(配有电喷雾电离源, ESI)、Waters Masslynx^{TM} 3.5 色谱管理系统、AL204 电子天平(上海梅特勒 - 托利多仪器有限公司)、GL - 20B 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

伐地那非标准对照品由本实验室制备(纯度 > 99 %);试样购自市场;乙腈、甲醇为色谱纯,上海陆都化学试剂厂;纯净水,杭州娃哈哈公司;甲酸为分析纯,上海三浦化工有限公司。

1.2　校正曲线的绘制　准确称取伐地那非 9.0 mg,甲醇超声溶解,定容于 10 ml 容量瓶,得储备液。分别移取此溶液 0.04、0.2、0.6、1.2、2.0、5.0 ml 于 10 ml 容量瓶,以甲醇定容至刻度,得到系列标准溶液,每个浓度的溶液分别进 5 μl,以紫外 254 nm 处的吸收峰面积对浓度作曲线,进行拟合,得到校正曲线。

1.3　样品的处理　液体样品处理　取 2 ml 液体样品,0.45 μm 尼龙膜过滤,滤液直接进色谱系统分析,进样量 5 μl。

固体样品处理　称取 0.040 g 样品,碾碎,加 100 ml 甲醇,超声溶解 20 min, 10 000 r/min 离心,得上清液,定容至 100 ml。上清液直接进色谱系统分析,进样量 5 μl。

1.4　实验条件　HPLC 条件　色谱柱 Spherigel C_{18} (5 μm, 250 mm ×4.6 mm)(大连江申分离科学技术公司),流动相:水溶液(含 0.2 %甲酸,体积分数) + 乙腈 = 65 + 35(体积分数)。进样前,柱子用流动相平衡 10 min,流速: 1 ml/min,检测波长:254 nm,柱温:30 ℃,进样体积为 5 μl。

MS 条件　用电喷雾离子化正离子采集模式(ESI +),m/z 范围:200～700(m/z),毛细管电压为 3.20 kV,萃取电压 4 V,锥孔电压 50 V,离子源温度 150 ℃,脱溶剂温度 200 ℃,脱溶剂气(N_2) 200 L/h,锥孔反吹气 50 L/h。进入质谱的流量由三通阀调为 0.2 ml/min。

2　结果和讨论

2.1　实验条件的选择　在不加改性剂的条件下,伐地那非的峰形不对称,拖尾严重。用盐类改性剂可以改善峰形,但不挥发性的盐类会造成质谱离子源的严重污染。在本文的方法中没有添加盐类改性剂,而是使用了甲酸,当在流动相中加入 0.2 %的甲酸以后,伐地那非的峰形比较对称,且对质谱仪器不造成危害。

伐地那非的化学结构较为稳定。在 20 V、30 V、40 V 锥孔电压的条件下,几乎得不到伐地那非的结构碎片信息,在 50 V 的条件下可以同时得到它的分子离子$[M + H]^+$和一定的碎片离子,而且离子总响应较好,所以在本方法中采用的锥孔电压为 50 V。

在本方法的实验条件下,伐地那非在 9.1 min 左右出峰,能够与试样中的其它成分很好分离。见图 2。图 3 中 m/z 489 伐地那非分子加氢后形成的分子离子$[M + H]^+$,m/z 312 为断裂苯环上 C—S 键后形成的碎片离子,283 为断裂 C—S 键,以及 C—O 键后形成的碎片离子。碎片离子 m/z 312 随着锥孔

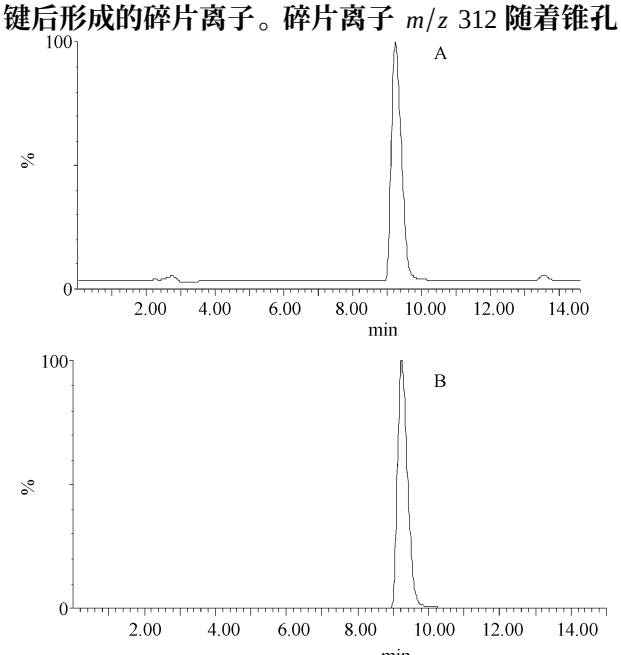


图 2　A: 伐地那非标准试样 254 nm 紫外色谱图
　　B: 伐地那非标准试样全扫描方式的色谱图

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

电压的升高而增多。

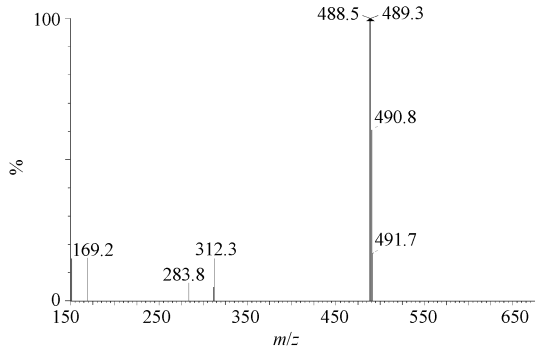


图 3　伐地那非质谱图

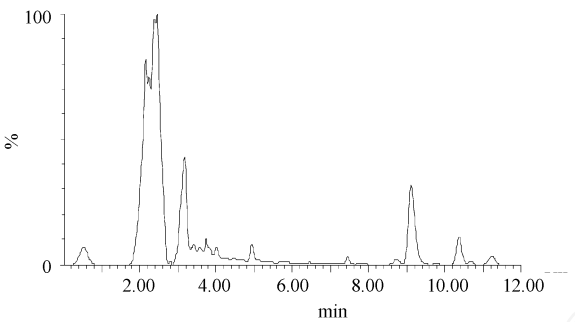


图 4　未加标准样品的检测试样 254 nm 紫外色谱图

2.2　线性和检测限　根据 1.3 所述绘制校正曲线，每个浓度标准品平行进 3 针，所得峰面积取平均值对浓度做校正曲线方程 $y = 7\,339.8x + 4\,750$，相关系数 $r = 0.999\,8$，将标准溶液逐渐稀释，求得被分析物的检测下限，检出限为 0.9 ng($S/N = 6$)。

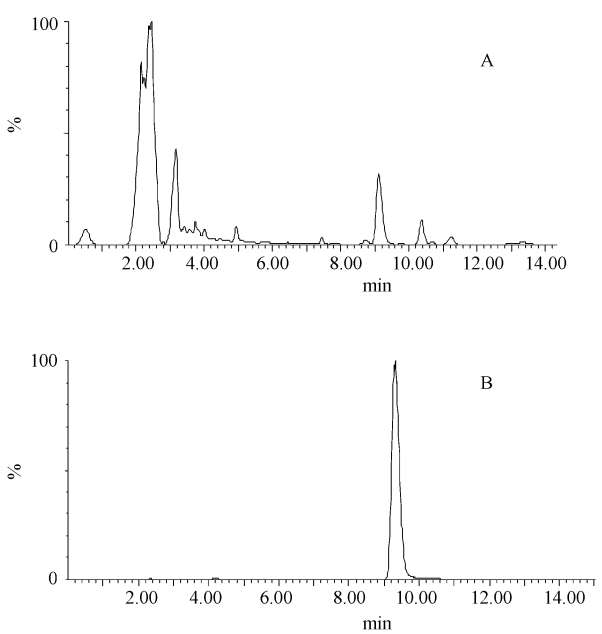
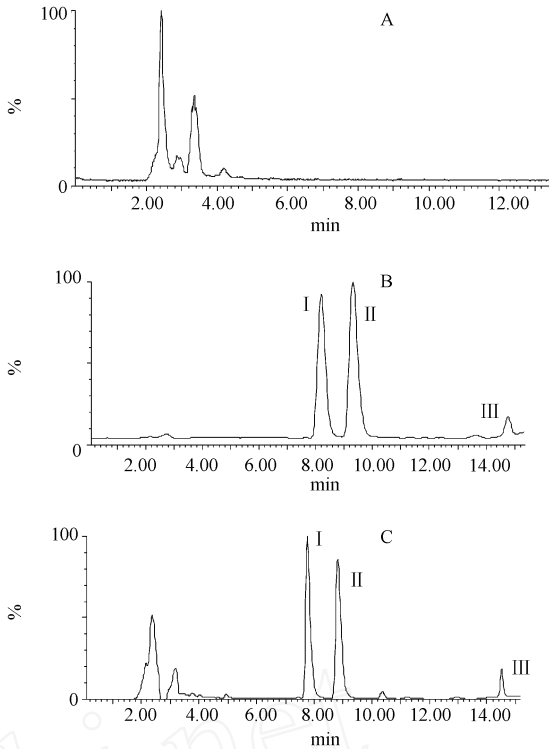


图 5　A：加标准样品后的检测试样 254 nm 紫外色谱图
B：加标准样品后检测试样用选择离子(SIR)489 记录的色谱图



Ⅰ. 西地那非(1 mg/ml)　Ⅱ. 伐地那非(1 mg/ml)
Ⅲ 他地那非(0.5 mg/ml)

图 6　A：空白样品 254 nm 紫外色谱图
B：3 种标准样品全扫描方式的色谱图
C：添加 3 种标准样品后的检测试样 254 nm 紫外色谱图

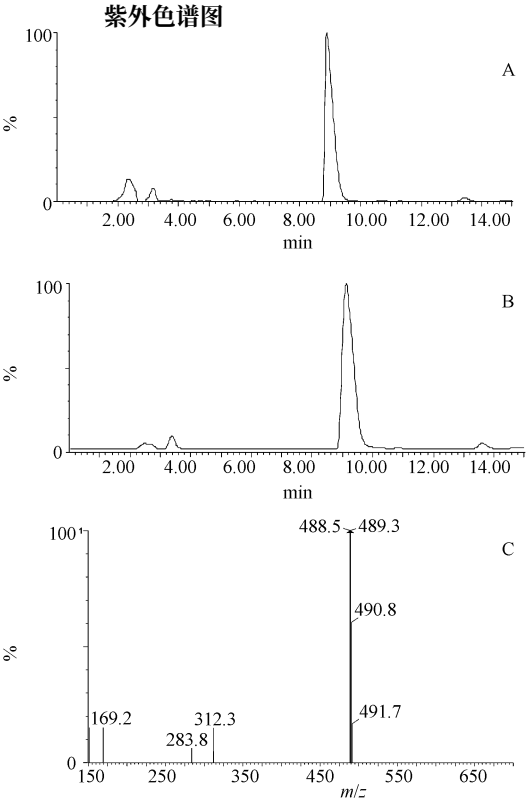


图 7　A：检测试样 254nm 紫外色谱图
B：检测试样全扫描方式的色谱图
C：检测试样质谱图

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

辣椒及其制品中苏丹红 1 号的 HPLC-MS/MS 检测方法

杨 强 李 刚 彭 涛 雍 炜 李建中 储晓刚
(中国检验检疫科学研究院,北京 100025)

摘 要:为快速检测食品中的苏丹红 1 号,建立了一种快速准确的苏丹红 1 号液质联用测定方法。样品用乙腈提取,稀释定容后用液相色谱 - 质谱联用法测定,对 HPLC-MS/MS 的测定条件进行了研究和优化。回收率在 90.5 %～110.0 %之间,多次测定的 *RSD* 在 1.3 %～7.2 %之间,该方法的最低检出限低于 10 pg。该方法简便、快速、准确、灵敏,可以满足食品中苏丹红 1 号检测的需要。

关键词:辣椒;苏丹红 1 号;色谱法,高压液相;光谱分析;质谱

Determination of Sudan I in foods by HPLC-MS/MS

YANG Qiang, LI Gang, PENG Tao, YONG Wei, LI Jian-zhong, CHU Xiao-gang
(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: A HPLC-MS/MS method has been developed for determining Sudan I in foods. The sample was extracted by acetonitrile, and the extract after dilution was analyzed by HPLC-MS/MS. This study optimized the analysis condition. The recovery was 90.5 %～110.0 %, with *RSD* of 1.3 %～7.2 %, and LOD was 10 pg. The method is fast, convenient, accurate and sensitive. The method can be used to detect Sudan I in foods.

Key word: CAPSICUM FRUTESCENS; Sudan I; Chromatography, High Pressure Liquid; Spectrum Analysis; Mass

2.3 **回收率实验** 在保健酒和固体制剂中添加一定浓度的标准品溶液做回收率实验,添加后保健酒和固体制剂中伐地那非的浓度分别为 0.2 mg/ml 和 0.2 mg/g。每个试样平行处理 5 份,按照试样测定方法进行分析,求算平均回收率。伐地那非在 2 种试样中的平均回收率分别为 98.9 %(*RSD* = 1.5 %),101.2 %(*RSD* = 1.1 %)。

2.4 **抗干扰实验** 检测 10 个酒样,酒样中采用的原料标称分别为:蛇鞭、牛鞭、玉米酒、米酒、枸杞、桂圆肉、西洋参、党参、人参,以上样品均按照 1.4 所述方法前处理,采用 1.5 所述色谱条件进行分析。实验过程中,原料成分未对检测目标造成干扰,图 4、图 5 分别为加样前后检测试样的 254 nm 紫外色谱图及加标准样品后的检测试样的选择离子(SIR) 489 记录的色谱图。对其它较流行的治疗性功能障碍药物如西地那非、他地那非也用本文所述色谱条件进行了分析,都不对目标峰产生干扰(见图 6)。

2.5 **试样测定** 按照"1.4"实验条件所述测定市场所购样品中伐地那非的含量,在一种保健酒中测出伐地那非含量为 0.32 mg/ml,图 7 为检测试样的紫外色谱图和全扫描方式的色谱图及质谱图。

参考文献

[1] 鲁敏,丁鼎乐. 男性性功能障碍的新一代治疗药—伐地那非[J]. 上海医药,2002,23:356-357.

[2] 马培奇. 勃起功能障碍治疗药物市场走势[J]. 药物进展,2004,28:288.

[3] Stark S, Sachase R, Stark A, et al. Erectile response on visual sexual stimulation after 20 mg or 40 mg Bay 38-9456 or placebo[J]. Eur Urol, 2000, 37 (S2): Abst15.

[4] 陈巧云,王楠,姚峰,等. 磷酸二酯酶 5 抑制剂治疗勃起功能障碍的疗效与安全性比较[J]. 中华男科学,2004,10:302-304.

[5] 张杰,杨吉伟,张炜. 伐地那非与勃起功能障碍[J]. 世界临床药物,2004,25:94-98.

[收稿日期:2005-04-20]

中图分类号:R15;TS218;O657.72 **文献标识码**:B **文章编号**:1004-8456(2005)06-0508-04

作者简介:杨强 男 硕士
通讯作者:储晓刚 男 博士 研究员

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net