

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定抗疲劳保健食品中4种他达那非类非法添加

LCMSMS-015

摘要：本文针对抗疲劳类保健品中他达那非类非法添加的药物建立了液相色谱LC-30A串联三重四极质谱LCMS-8030的检测方法。样品经提取后，用超高效液相色谱LC-30A快速分离，三重四极杆质谱仪LCMS-8030进行定量分析。2种组分标准曲线的相关系数为0.999以上；对LOQ基质加标溶液进行精密度实验，连续12次进样峰面积和保留时间相对标准偏差分别在1.774%~11.517%和0.016%~0.057%之间，仪器精密度良好。方法定量限为0.4 $\mu\text{g/g}$ ~ 20 $\mu\text{g/g}$ 之间。

关键词：保健品 非法添加 抗疲劳 超高效液相色谱 三重四级杆质谱

保健品的全称是保健食品，不允许添加药物，但是一些企业为了突出产品的功能，擅自在保健食品中添加违禁物品。保健品中非法添加的各种违禁成分，消费者在不知情的情况下服用，极易造成滥用，还可能导致产生药物依赖性。由于保健食品、中药保健品的特殊性，国家食品药品监督管理局在2011年5月25日颁布了关于严厉打击保健食品化妆品非法添加行为的通知。重点对宣称改善睡眠、辅助降血糖、缓解体力疲劳、减肥等功能的保健食品，宣称美白、祛痘、去皱、抗衰老功能的护肤产品，祛斑、育发、染发等特殊用途化妆品，以及洗浴类产品等进行抽验。保健食品中易非法添加的物质、组分及检测依据(第一批)中明确列出抗疲劳类保健品包括伐地那非、西地那非及他达拉非类非法添加组分。本文利用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用，建立了快速准确测定抗疲劳保健品中4种他达那非类组分的方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A与三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用系统。具体配置为LC-30AD \times 2输液泵，DGU-20A₅在线脱气机，SIL-30AC自动进样器，CTO-30AC柱温箱，CBM-20A系统控制器，LCMS-8030三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41色谱工作站。

1.2 分析条件

分析仪器：LC-30A

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm \times 100 mm, 2.2 μm

流动相：A - 0.01%乙酸，12 mM甲酸铵水溶液；B - 乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B初始浓度为15%，时间程序见表1。

表 1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 1.00 | Pumps | Pump B Conc. | 15 |
| 3.00 | Pumps | Pump B Conc. | 30 |
| 5.00 | Pumps | Pump B Conc. | 50 |
| 10.00 | Pumps | Pump B Conc. | 50 |
| 12.00 | Pumps | Pump B Conc. | 60 |
| 12.10 | Pumps | Pump B Conc. | 100 |
| 14.00 | Pumps | Pump B Conc. | 100 |
| 14.10 | Pumps | Pump B Conc. | 15 |
| 18.00 | Controller | Stop | 15 |

质谱条件

分析仪器: LCMS-8030

脱溶剂管温度: 250°C

离子源: ESI(+)

加热模块温度: 400°C

离子源接口电压: 4.5 kV

扫描模式: 多反应监测(MRM)

雾化气: 氮气 3.0 L/min

驻留时间: 30 ms

干燥气: 氮气 15 L/min

延迟时间: 3 ms

碰撞气: 氩气

MRM参数: 见表2

表 2 三重四级杆离子对及相关电压参数设定表

| No. | Name | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | Q1 Pre Bias (V) | CE (V) | Q1 Pre Bias (V) |
|-----|-----------------|------------------------|----------------------|-----------------|--------|-----------------|
| 1 | 盐酸育亨宾 | 355.20 | 144.20 | -18.0 | -35.0 | -15.0 |
| | | | 212.10* | -18.0 | -25.0 | -15.0 |
| 2 | 氨基他达拉非 | 391.10 | 169.10 | -19.0 | -35.0 | -11.0 |
| | | | 135.00* | -20.0 | -20.0 | -27.0 |
| 3 | 他达拉非 | 390.10 | 135.008 | -20.0 | -20.0 | -29.0 |
| | | | 169.10* | -20.0 | -35.0 | -23.0 |
| 4 | Xanthoanotrafil | 390.00 | 151.10 | -19.0 | -15.0 | -16.0 |
| | | | 107.00* | -19.0 | -50.0 | -20.0 |
| 5 | 格列奇特 | 324.10 | 127.15 | -16.0 | -20.0 | -13.0 |
| | | | 110.15* | -16.0 | -20.0 | -11.0 |

注: *表示定性离子, 格列奇特为内标物

1.3 样品制备

标准溶液配制:

分别精密称取育亨宾、Xanthoanthrafil对照品各2 mg [精确到0.01 mg, 其中, 盐酸育亨宾称取2.20 mg(相当于育亨宾2 mg)], 置10 mL量瓶中, 加甲醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 的育亨宾、Xanthoanthrafil的标准储备溶液。

精密称取他达拉非对照品2 mg(精确到0.01 mg), 置5 mL量瓶中, 加甲醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为400 $\mu\text{g/mL}$ 的他达拉非的标准储备溶液。

精密称取氨基他达拉非对照品4 mg(精确到0.01 mg), 置1 mL量瓶中, 加甲醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为4000 $\mu\text{g/mL}$ 的氨基他达拉非的标准储备溶液。

分别精密量取4种他达拉非类抗疲劳违禁化学成分浓储备液0.5 mL, 置10 mL容量瓶中, 加入80%甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得育亨宾、Xanthoanthrafil 10 $\mu\text{g/mL}$, 他达拉非20 $\mu\text{g/mL}$, 氨基他达拉非200 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品浓储备液。混合对照品储备溶液以80%甲醇溶液按一定比例稀释, 得系列浓度的对照品工作溶液。最终配成: (1)育亨宾、Xanthoanthrafil为4、10、20、40、100、200、400、800、1000 ng/mL的系列标准溶液。(2)他达拉非浓度为8、20、40、80、200、400、800、1600、2000 ng/mL的系列标准溶液。(3)氨基他达拉非80、200、400、800 ng/mL, 2、4、8、16、20 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。

样品前处理方法:

分别称取6种空白样品每份约0.2 g(精确至1 mg)于10 mL塑料离心管中, 加入5 mL甲醇后, 称重。涡旋60 s后, 超声15 min, 放冷后, 再称重, 用甲醇补足减失的重量。取样品溶液50 μL , 加入5 $\mu\text{g/mL}$ 内标溶液20 μL , 加甲醇稀释至0.4 mL, 涡旋30 s后, 13000转离心10 min。取上清液转入液相小瓶中。

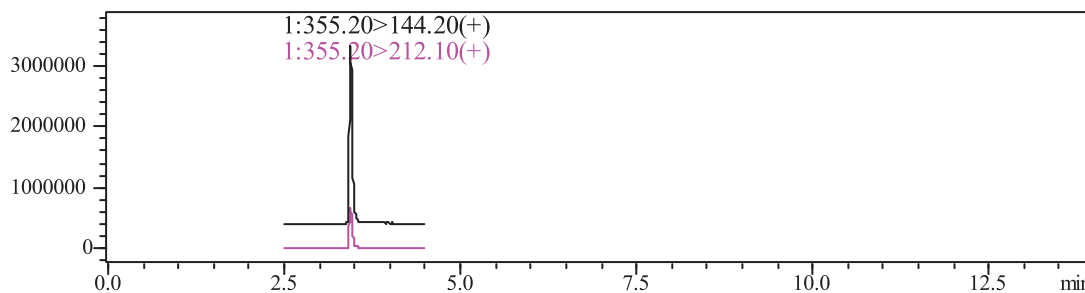
溶液标曲的配制方法:

取上述标液各0.1 mL, 加入0.1 mL 100 ng/mL内标溶液, 涡旋30 s后, 13000转离心10 min。取上清液转入液相小瓶中。

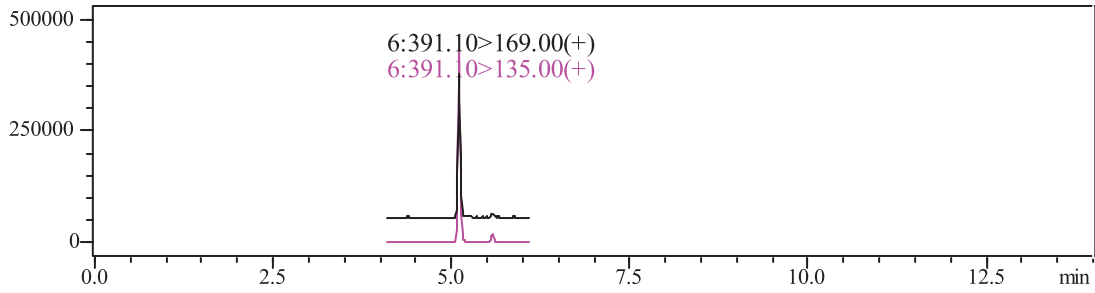
2. 结果讨论

2.1 标准样品的MRM色谱图

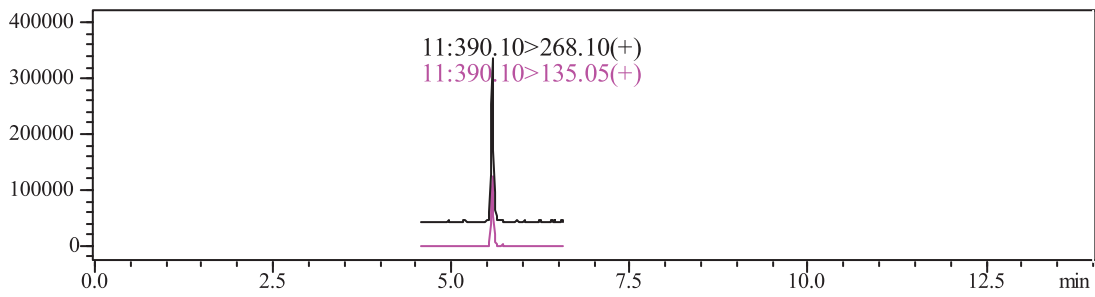
1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 育亨宾:



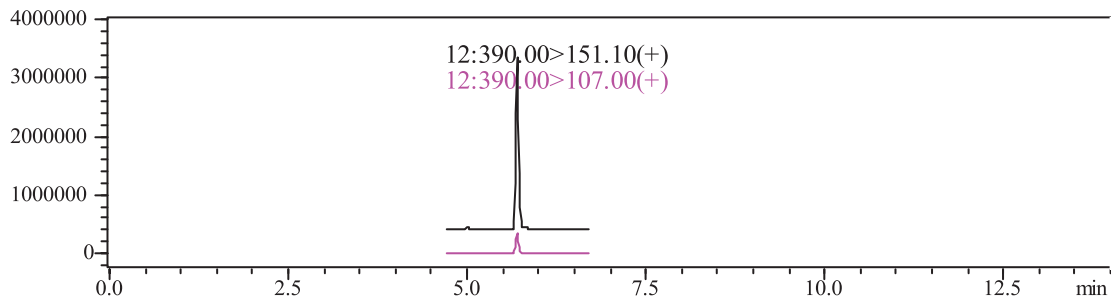
2、10 µg/mL氨基他达那非

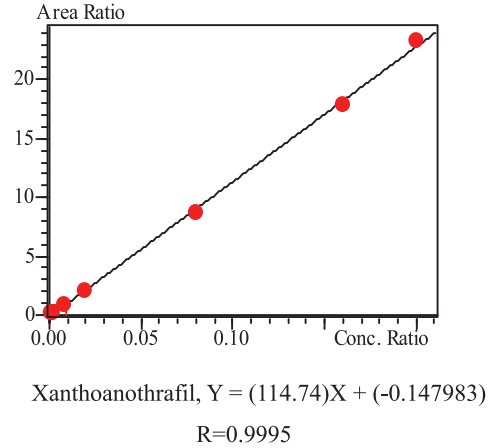
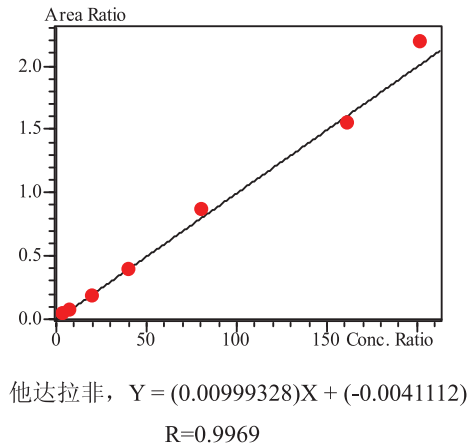
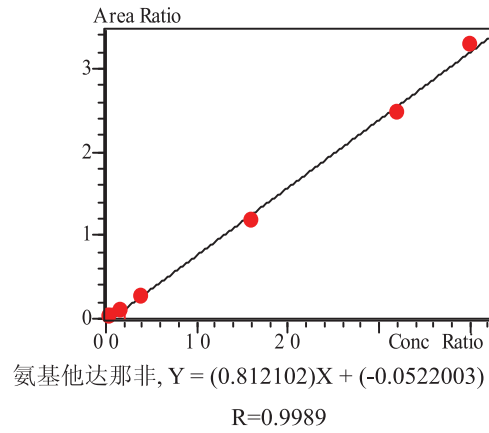
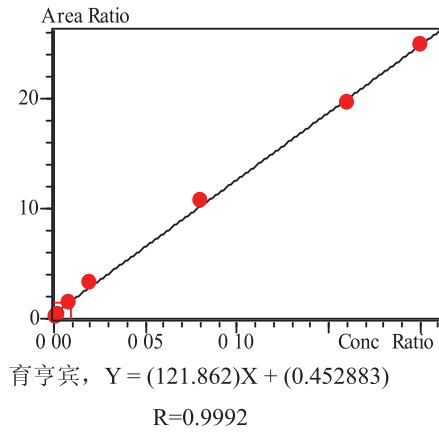


3、1 µg/mL他达那非



4、0.5 µg/mL Xanthoanotrafil

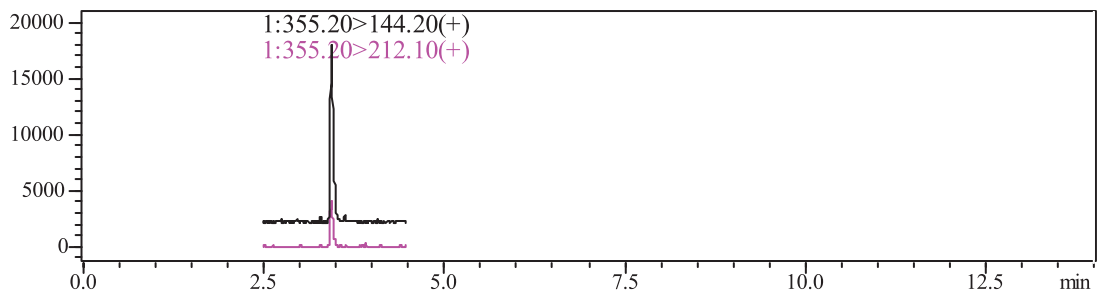




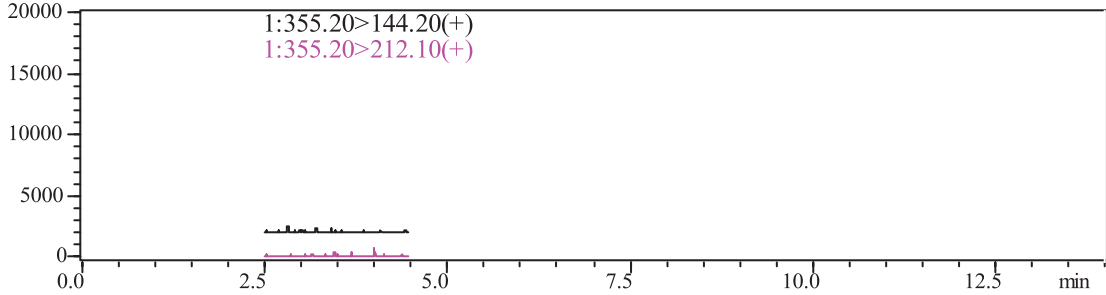
2.3 灵敏度实验

4种西地那非类组分的定量检出限各不相同, 每种组分对应的基质加标检出限色谱图及基质空白对照色谱图如下:

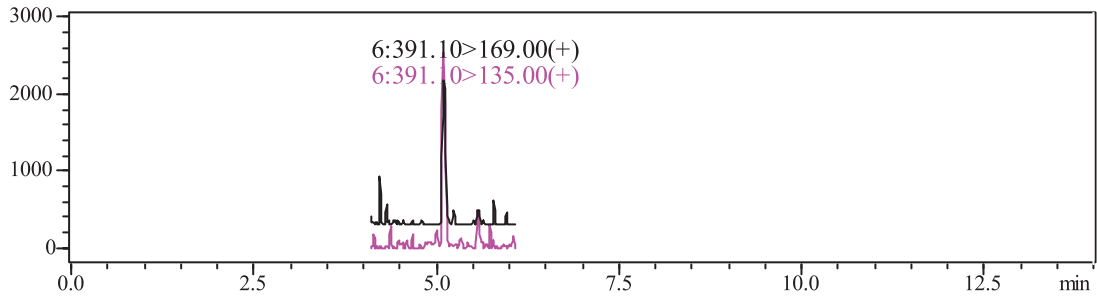
1、0.4 μg/g 育亨宾基质加标:



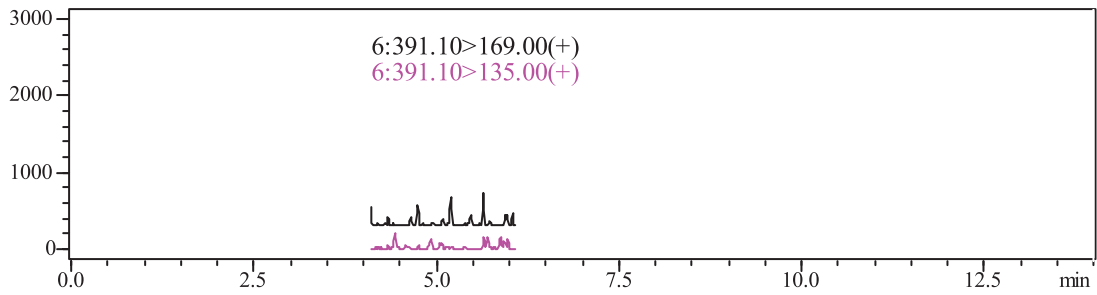
育亨宾基质空白:



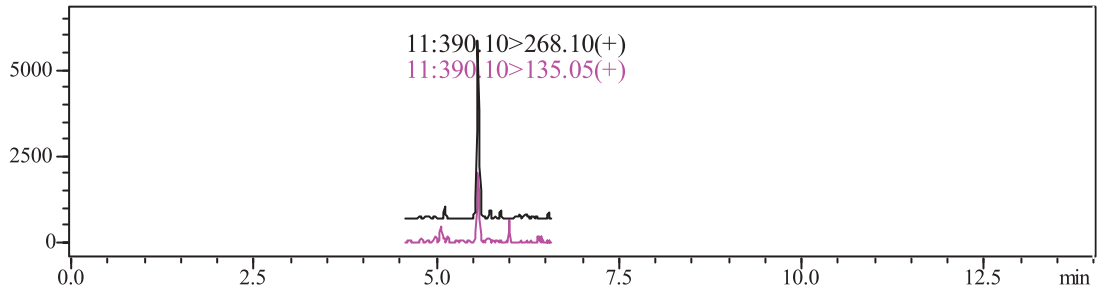
2、20.0 µg/g氨基他达那非基质加标:



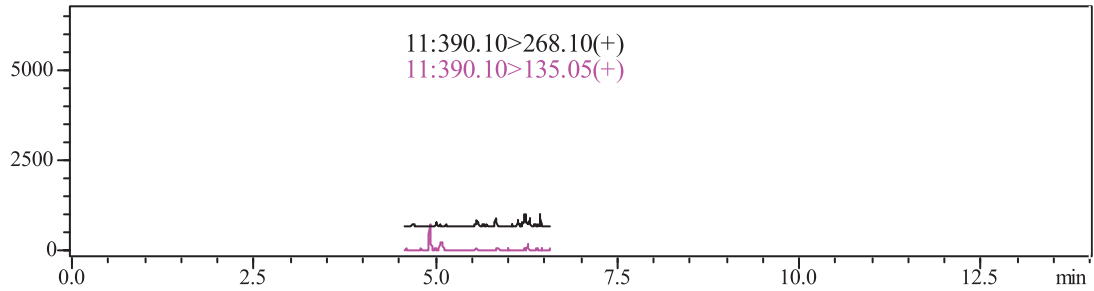
氨基他达那非基质空白:



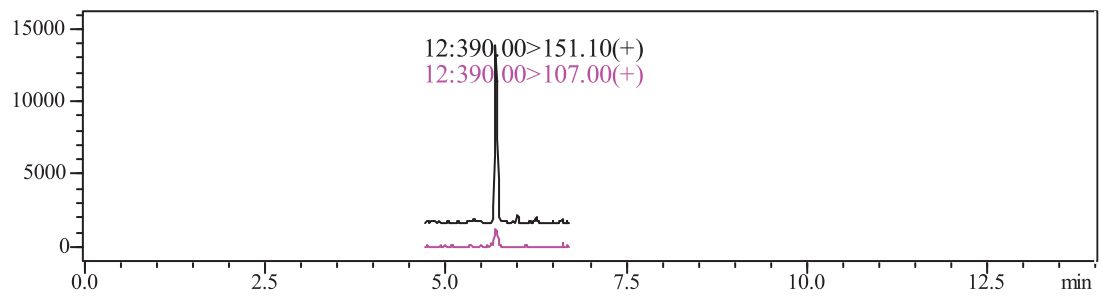
3、4.0 µg/g他达那非基质加标:



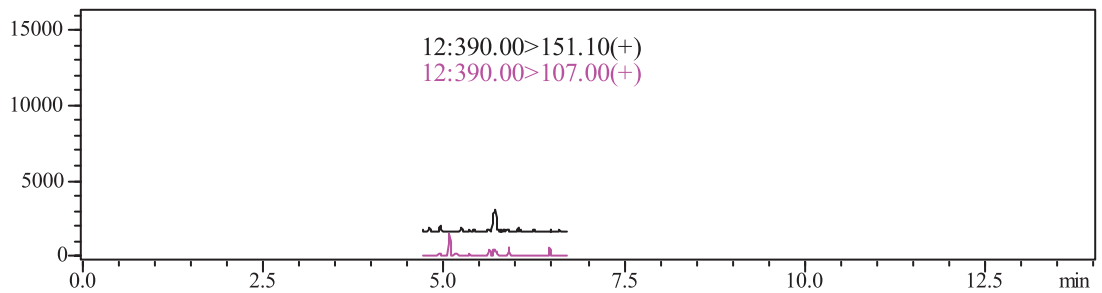
他达那非基质空白:



4、0.4 $\mu\text{g/g}$ Xanthoanotrafil 基质加标:



Xanthoanotrafil 基质空白:



2.3精密度实验

对LOQ浓度基质加标溶液12份测定12次，考察方法精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表3所示。结果显示：12个基质加标峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在1.774%~11.517%和0.016%~0.057%之间，方法精密度良好。

| No. | 育亨宾 | | 氨基他达那非 | |
|---------|--------|-----------|--------|-----------|
| | Area | R.T (min) | Area | R.T (min) |
| 1 | 43,531 | 3.431 | 7,444 | 5.099 |
| 2 | 44,662 | 3.432 | 8,100 | 5.100 |
| 3 | 43,978 | 3.433 | 8,345 | 5.104 |
| 4 | 44,418 | 3.436 | 7,529 | 5.096 |
| 5 | 45,562 | 3.435 | 9,748 | 5.096 |
| 6 | 46,177 | 3.434 | 7,676 | 5.096 |
| 7 | 44,369 | 3.432 | 9,231 | 5.101 |
| 8 | 45,369 | 3.433 | 8,925 | 5.103 |
| 9 | 44,665 | 3.430 | 8,891 | 5.097 |
| 10 | 45,279 | 3.435 | 10,606 | 5.095 |
| 11 | 45,692 | 3.435 | 8,059 | 5.100 |
| 12 | 44,106 | 3.434 | 7,709 | 5.099 |
| Average | 44,817 | 3.433 | 8,522 | 5.099 |
| %RSD | 1.774 | 0.055 | 11.517 | 0.057 |

| No. | 他达那非 | | Xanthoanotrafil | |
|---------|--------|-----------|-----------------|-----------|
| | Area | R.T (min) | Area | R.T (min) |
| 1 | 15,154 | 5.564 | 31,359 | 5.697 |
| 2 | 14,099 | 5.57 | 32,955 | 5.697 |
| 3 | 14,834 | 5.567 | 29,088 | 5.696 |
| 4 | 11,040 | 5.575 | 29,584 | 5.697 |
| 5 | 14,725 | 5.566 | 29,767 | 5.696 |
| 6 | 11,730 | 5.57 | 30,618 | 5.695 |
| 7 | 14,174 | 5.568 | 32,970 | 5.695 |
| 8 | 14,024 | 5.566 | 33,890 | 5.695 |
| 9 | 16,915 | 5.57 | 32,939 | 5.696 |
| 10 | 13,506 | 5.571 | 30,787 | 5.695 |
| 11 | 15,450 | 5.572 | 30,639 | 5.698 |
| 12 | 13,187 | 5.566 | 30,371 | 5.696 |
| Average | 14,070 | 5.569 | 31,247 | 5.696 |
| %RSD | 11.330 | 0.056 | 5.023 | 0.016 |

结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用测定抗疲劳保健食品中4种他达那非类非法添加的方法。该方法线性范围宽，2种组分校准曲线的相关系数在0.999以上。岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪可以满足抗疲劳保健食品中他达那非类非法添加的检测要求。