

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10种西地那非类 非法添加

LCMSMS-013

摘要：本文针对抗疲劳类保健品中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。8种组分标准曲线的相关系数为0.999以上，另2种在0.99以上；对定量检出限浓度基质加标溶液进行精密实验，得到12份溶液分别进样，保留时间和峰面积相对标准偏差分别在0.034%~0.218%和4.000%~12.603%之间，方法精密良好。方法定量限为0.4 $\mu\text{g/g}$ ~ 4.0 $\mu\text{g/g}$ 之间。

关键词：保健品 非法添加 西地那非 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

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质。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检。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10种西地那非类非法添加的方法，供相关人员参考。

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

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS 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

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

离子源： ESI(+)

加热模块温度： 400

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： 2 ms

碰撞气： 氩气

MRM参数： 见表2

表2 三重四极杆离子对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	去甲基西地那非	461.20	85.20	-23.0	-40.0	-18.0
			283.10*	-23.0	-35.0	-19.0
2	二甲基西地那非	489.00	113.20	-24.0	-30.0	-24.0
			99.20*	-24.0	-35.0	-19.0
3	羟基好猫西地那非	505.20	99.20	-26.0	-40.0	-21.0
			112.10*	-26.0	-30.0	-22.0
4	西地那非	475.00	100.20	-23.0	-30.0	-19.0
			283.10*	-23.0	-40.0	-20.0
5	好猫西地那非	489.20	113.20	-25.0	-35.0	-23.0
			99.20*	-24.0	-35.0	-19.0
6	格列奇特	324.10	127.15	-16.0	-20.0	-13.0
			110.15*	-16.0	-20.0	-11.0

7	硫代二甲基西地那非	505.10	99.15	-26.0	-35.0	-21.0
			113.15*	-26.0	-35.0	-23.0
8	羟基硫代好猫西地那非	521.10	99.15	-26.0	-45.0	-19.0
			129.15*	-26.0	-35.0	-25.0
9	硫基西地那非	491.20	100.20	-25.0	-30.0	-19.0
			299.10*	-25.0	-40.0	-22.0
10	那猫西地那非	460.10	283.10	-23.0	-40.0	-20.0
			299.10*	-23.0	-35.0	-21.0
11	硫基好猫西地那非	505.10	99.20	-26.0	-45.0	-20.0
			113.20*	-26.0	-30.0	-23.0

注：*表示定性离子，格列奇特为内标

1.3 样品制备

标准溶液配制：

分别精密称取羟基好猫西地那非、硫基二甲基西地那非、二甲基西地那非、好猫西地那非对照品2 mg精确到0.01 mg；枸橼酸西地那非准确称取2.81 mg(相当于西地那非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 µg/mL的标准储备溶液。

分别精密称取羟基硫代好猫西地那非、去甲基西地那非、硫基西地那非、那猫西地那非、硫基好猫西地那非、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 µg/mL的标准储备溶液。

工作溶液由上述储备溶液以80%甲醇溶液按一定比例稀释得到。最终配成：(1)羟基好猫西地那非、西地那非、硫基二甲基西地那非、二甲基西地那非、好猫西地那非浓度为4、10、20、40、100、200、400、800 ng/mL，1 µg/mL的系列标准溶液。(2)羟基硫代好猫西地那非、去甲基西地那非、硫基西地那非、那猫西地那非、硫基好猫西地那非8、20、40、80、200、400、800 ng/mL，1.6、2 µg/mL的系列标准溶液。

样品前处理方法：

分别称取12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，分别加入5 µg/mL内标溶液20 µL后，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。

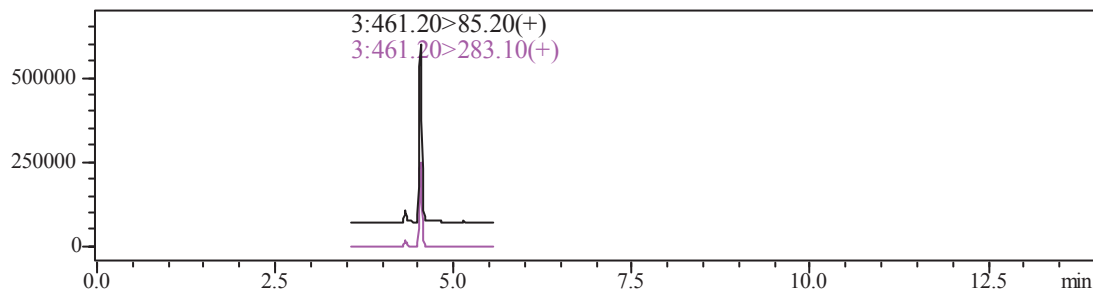
结果讨论

2.1 标准样品的MRM色谱图

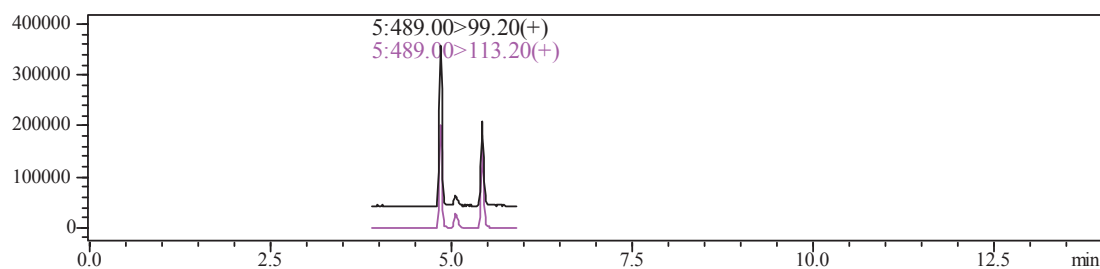
■ 结果讨论

2.1 标准样品的MRM色谱图

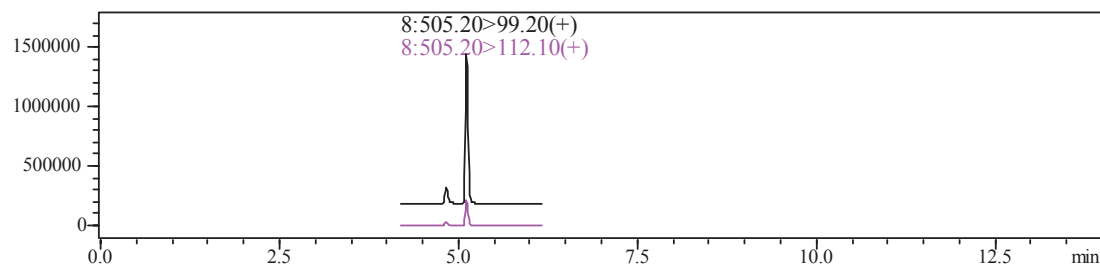
1、1 $\mu\text{g/mL}$ N-去甲基西地那非



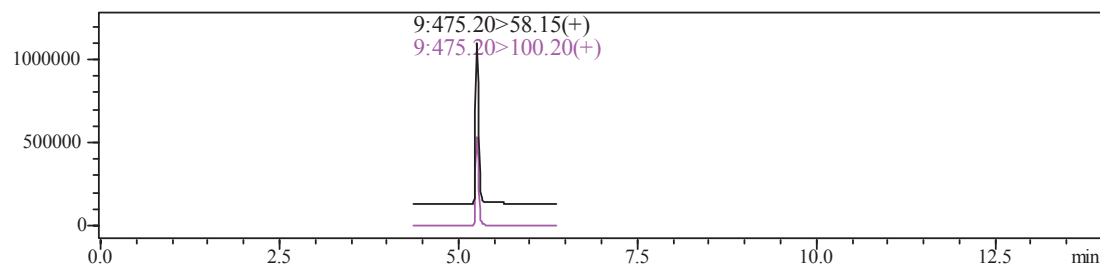
2、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 二甲基西地那非



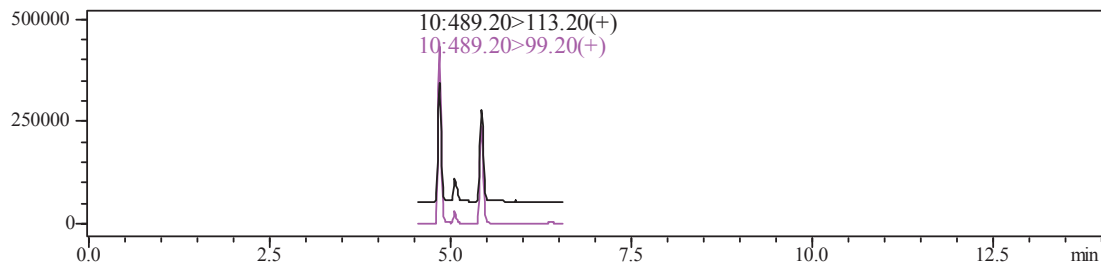
3、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 羟基好猫西地那非



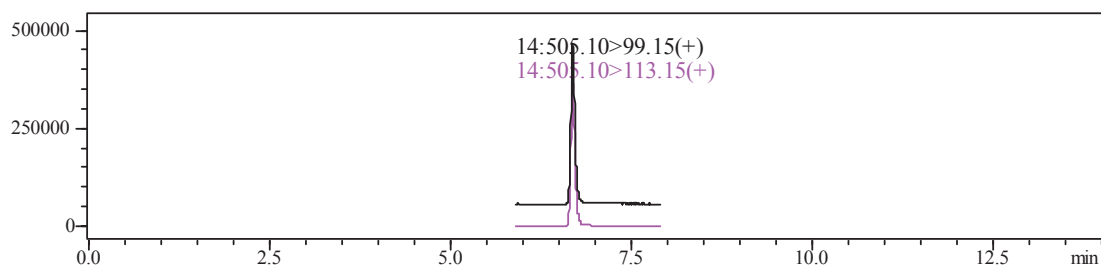
4、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 西地那非



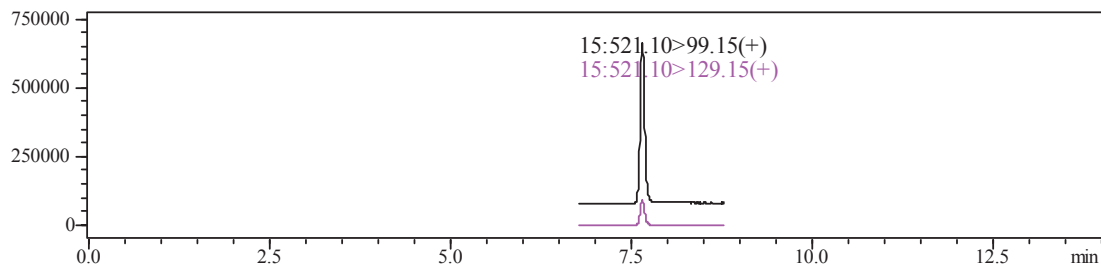
5、0.5 µg/mL好猫西地那非



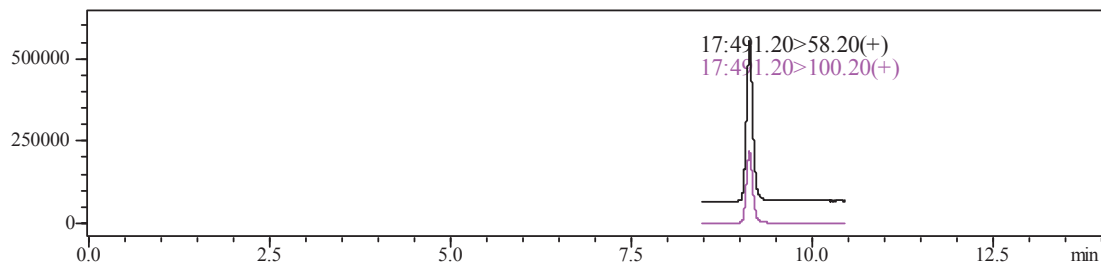
6、0.5 µg/mL硫代二甲基西地那非



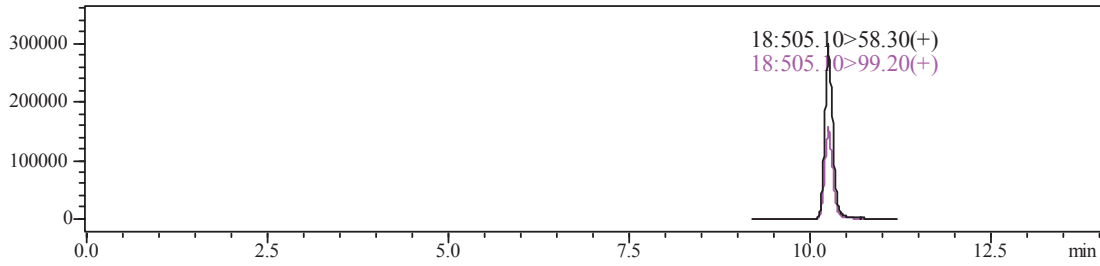
7、1 µg/mL羟基硫代好猫西地那非



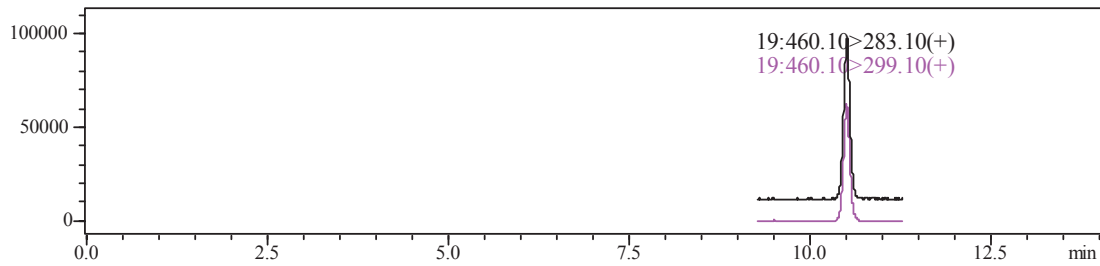
8、1 µg/mL硫基西地那非



9、1 μg/mL 硫基好猫西地那非

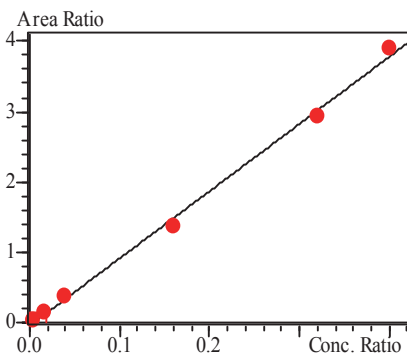


10、1 μg/mL 那猫西地那非

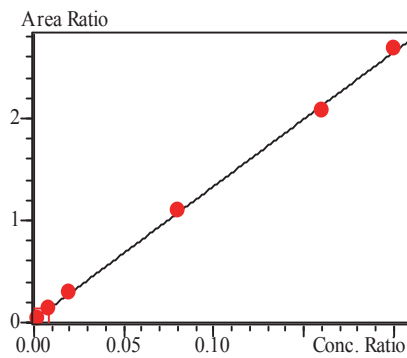


2.2 线性关系

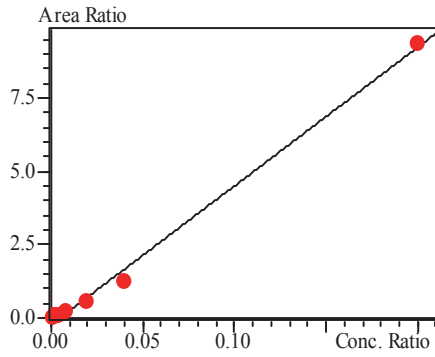
将1.3部分的标准工作液按1.2中的分析条件进行测定，以格列奇特为内标物，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线。所得校准曲线线性关系良好，10种西地那非类有8种的线性相关系数大于0.999。



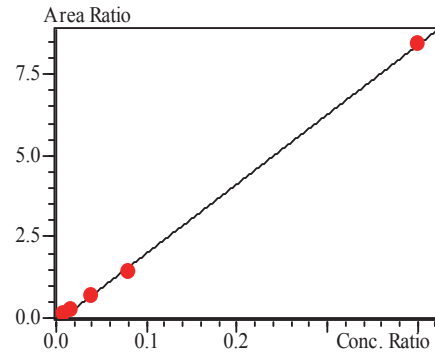
N-去甲基西地那非, $Y = (9.56234)X + (-0.0443543)$
 $R=0.9986$



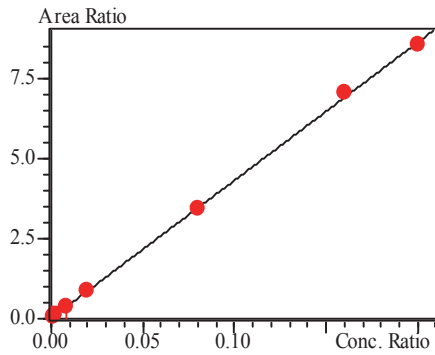
二甲基西地那非, $Y = (13.12)X + (0.0235184)$
 $R=0.9996$



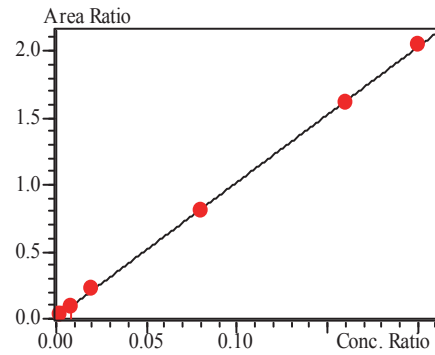
羟基好猫西地那非 $Y = (47.319)X + (-0.223636)$
R=0.9978



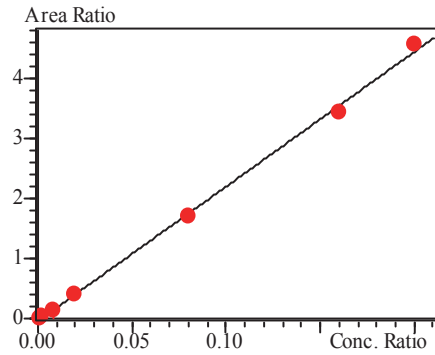
硫基西地那非, $Y = (21.3593)X + (-0.147992)$
R=0.9997



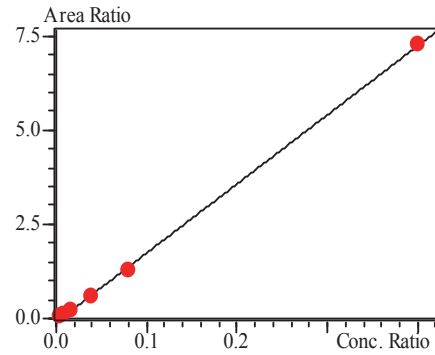
西地那非, $Y = (43.0576)X + (0.011666)$
R=0.9998



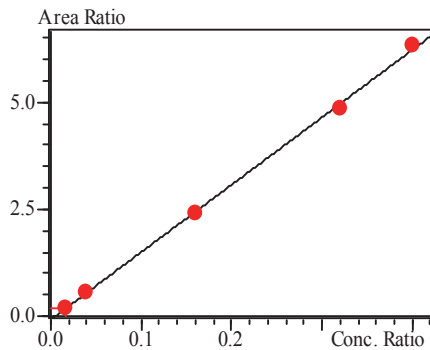
好猫西地那非, $Y = (10.0914)X + (0.01023)$
R=0.9999



硫代二甲基西地那非, $Y = (22.5015)X + (-0.0461142)$
R=0.9992

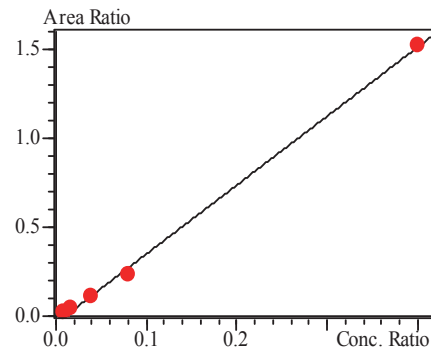


羟基硫代好猫西地那非 $Y = (18.3356)X + (-0.0953574)$
R=0.9997



磺基好猫西地那非 $Y = (15.7576)X + (-0.0794382)$

$R=0.9996$



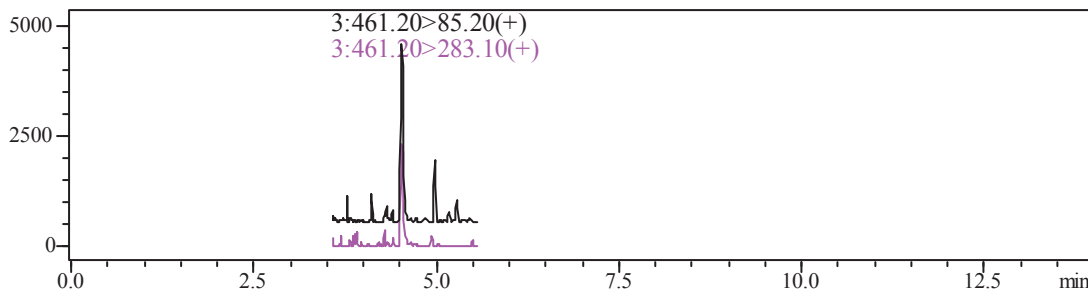
那猫西地那非, $Y = (3.88236)X + (-0.0378209)$

$R=0.9991$

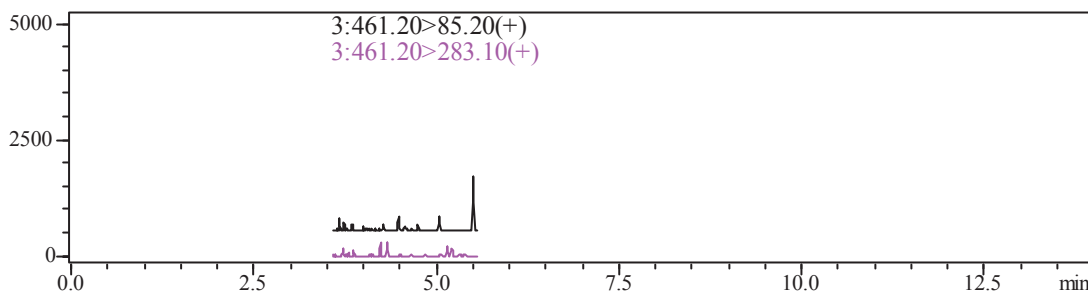
2.3 灵敏度实验

10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色谱图及空白基质对照色谱图如下：

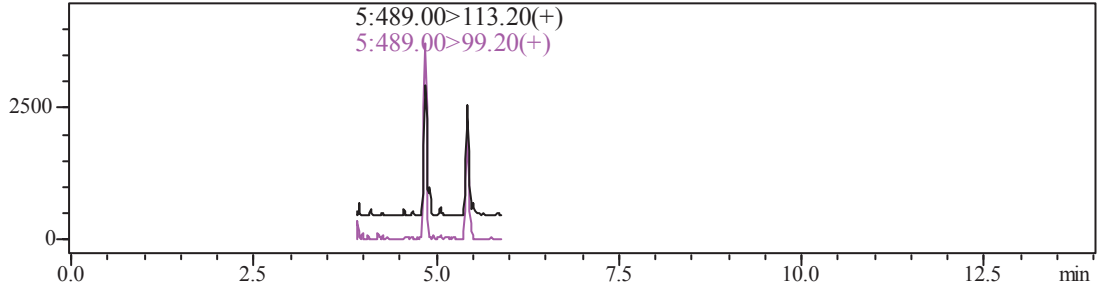
1、2.0 μg/g N-去甲基西地那非基质加标：



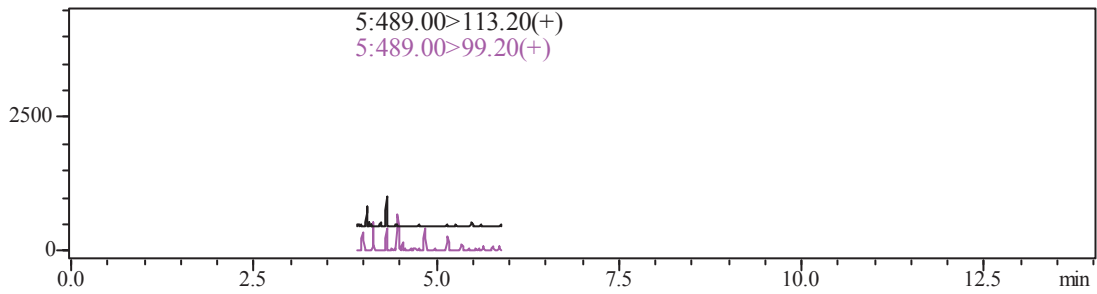
N-去甲基西地那非基质空白：



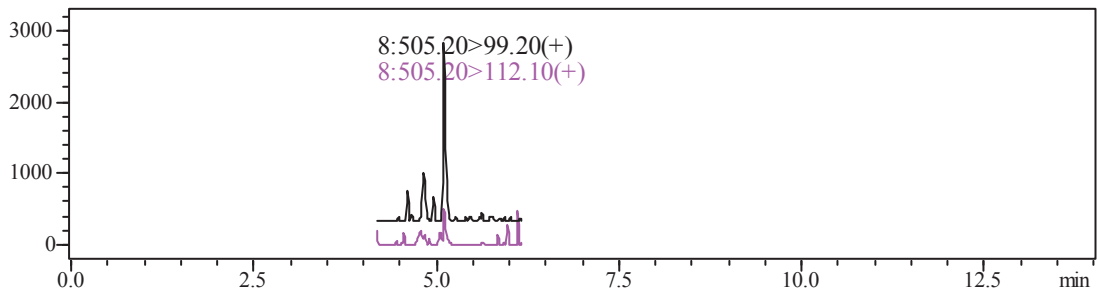
2、1.0 µg/g二甲基西地那非基质加标：



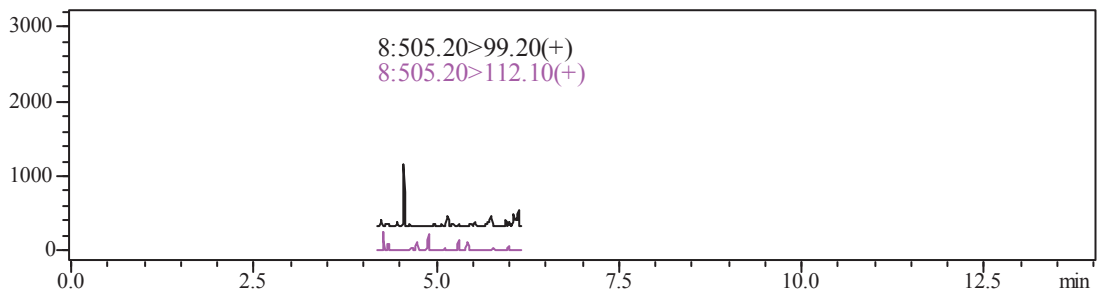
二甲基西地那非基质空白：



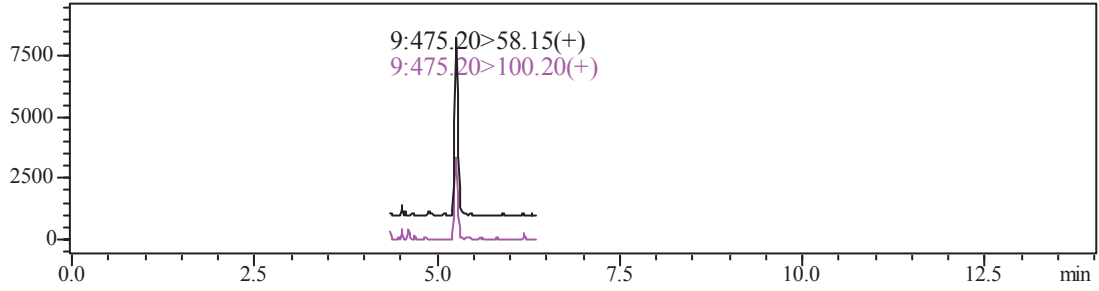
3、0.4 µg/g羟基好猫西地那非基质加标：



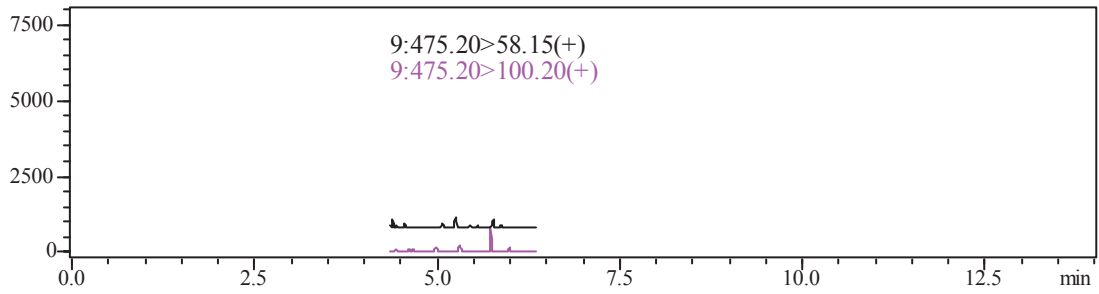
羟基好猫西地那非基质空白：



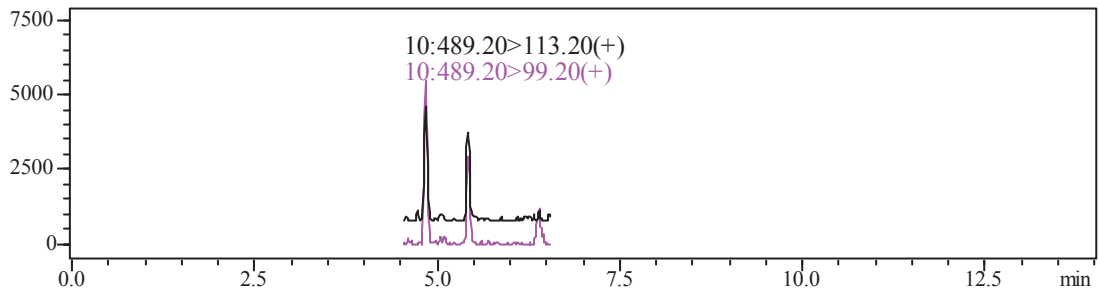
4、0.4 μg/g西地那非基质加标：



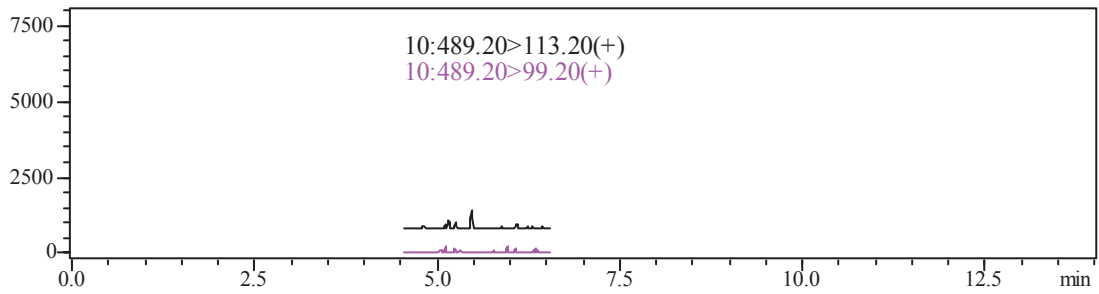
西地那非基质空白：



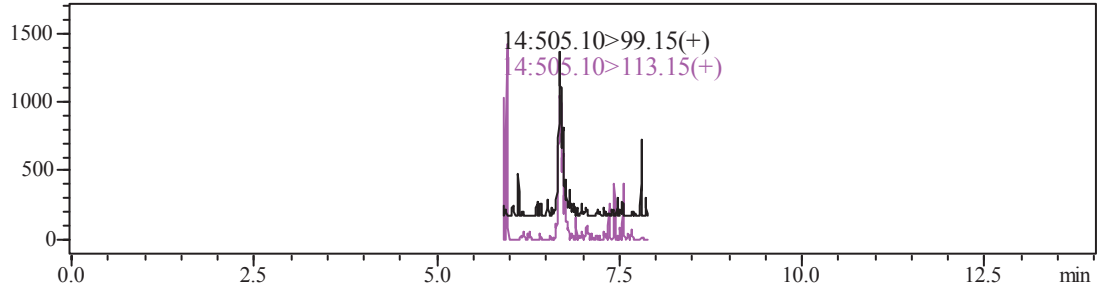
5、0.9 μg/g好猫西地那非基质加标：



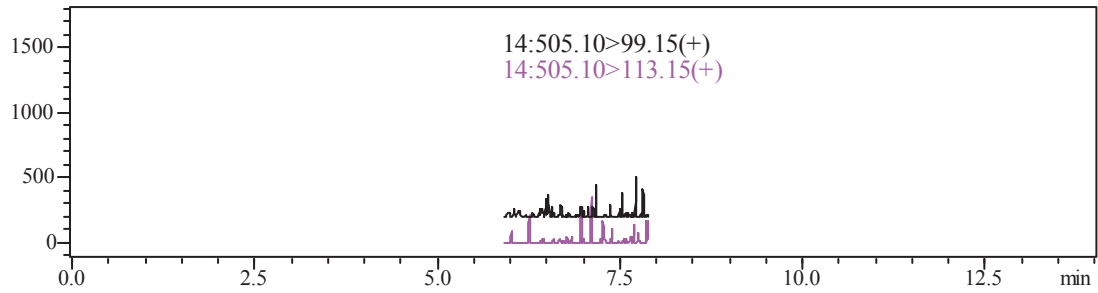
好猫西地那非基质空白：



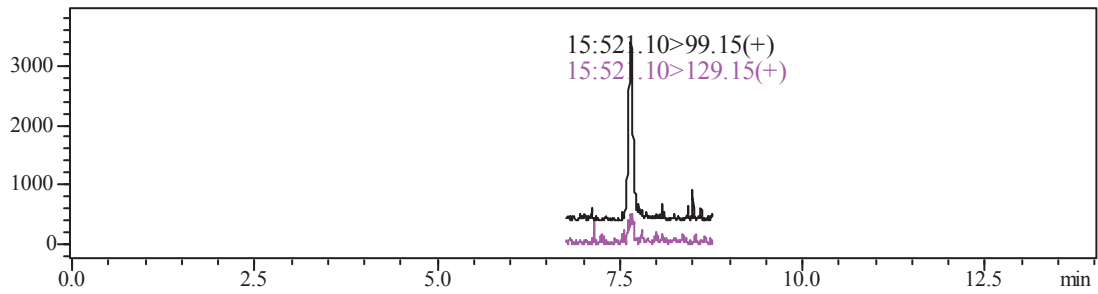
6、0.4 μg/g 硫代二甲基西地那非基质加标:



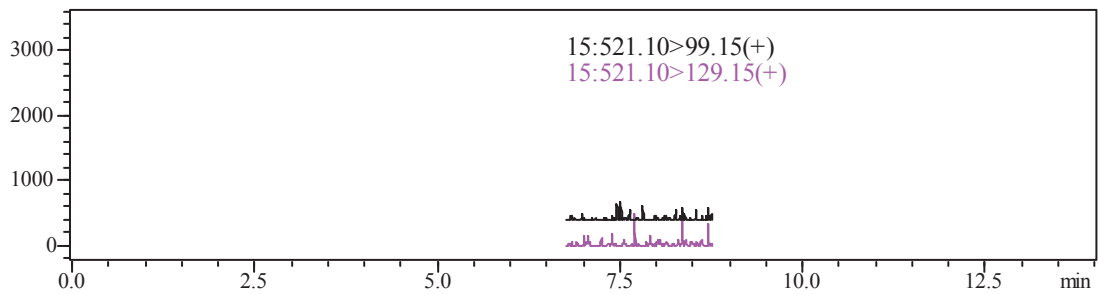
硫代二甲基西地那非基质空白:



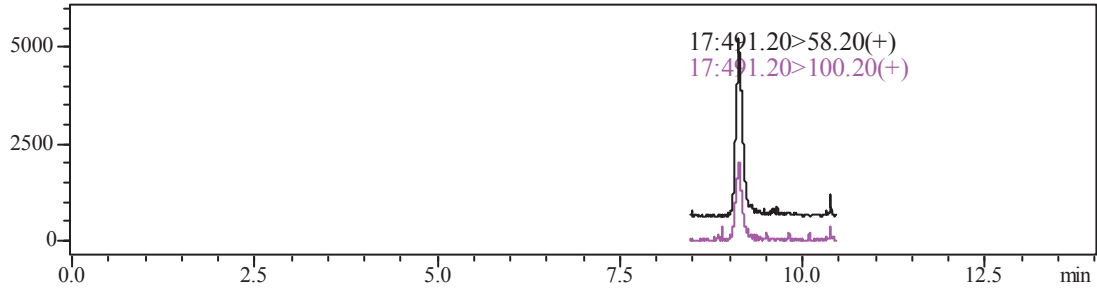
7、1.9 μg/g 羟基硫代好猫西地那非基质加标:



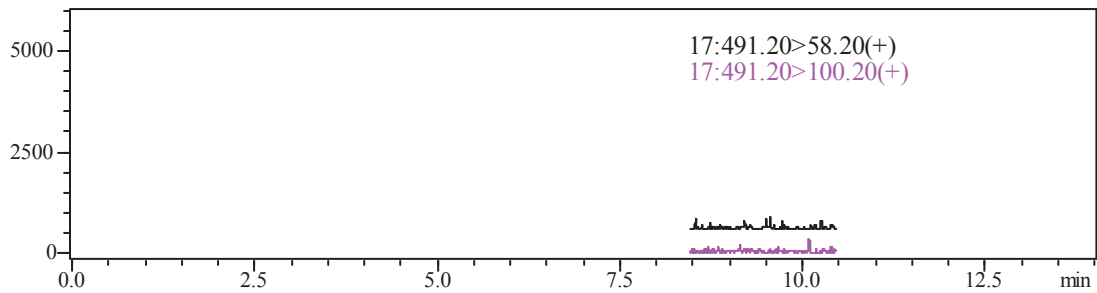
羟基硫代好猫西地那非基质空白:



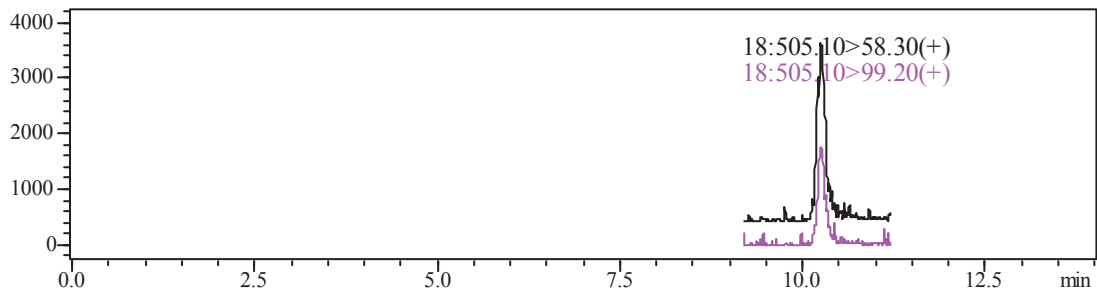
8、4.0 µg/g 硫基西地那非基质加标:



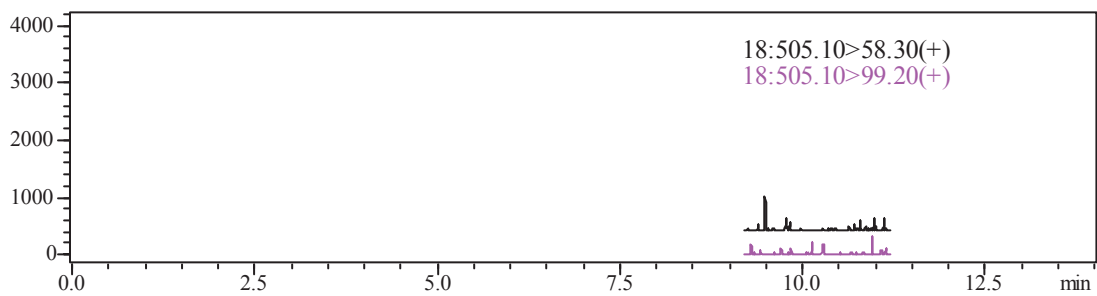
硫基西地那非基质空白:



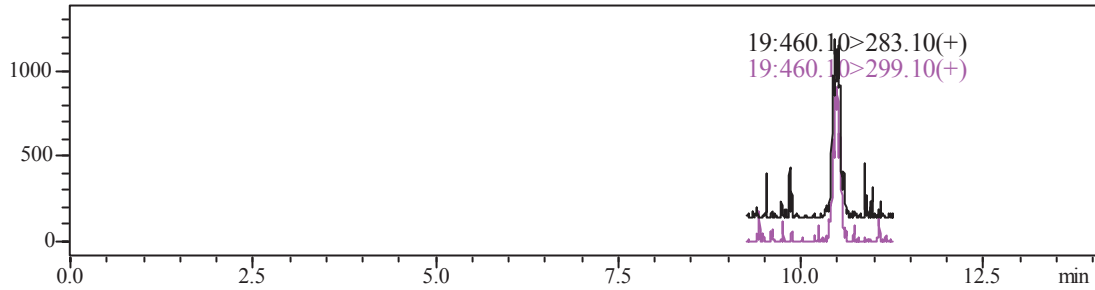
9、4.0 µg/g 硫基好猫西地那非基质加标:



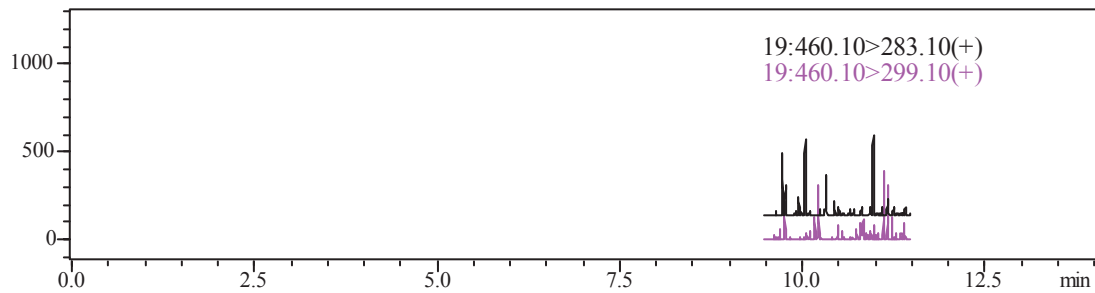
硫基好猫西地那非基质空白:



10、3.9 $\mu\text{g/g}$ 那猫西地那非基质加标:



那猫西地那非基质空白:



2.4 精密度试验

对LOQ基质加标溶液12份分别测定,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4.000%~12.603%和0.034%~0.218%之间,方法精密度良好。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果(n=12)

No.	N-去甲基西地那非		二甲基西地那非		羟基好猫西地那非	
	Area (RSD%)	R.T (RSD%)	Area (RSD%)	R.T (RSD%)	Area (RSD%)	R.T (RSD%)
1	11,506	4.531	10,327	4.844	22,237	10.261
2	12,495	4.529	10,990	4.842	22,267	10.263
3	11,164	4.528	11,371	4.841	23,073	10.244
4	11,381	4.532	10,767	4.846	26,156	10.234
5	12,420	4.532	10,483	4.846	22,593	10.242
6	11,740	4.531	10,583	4.844	21,640	10.254
7	11,901	4.532	10,129	4.845	24,045	10.280
8	12,392	4.530	10,173	4.843	22,494	10.254
9	12,553	4.529	11,189	4.842	22,197	10.231
10	12,445	4.529	12,028	4.843	19,678	10.253
11	12,291	4.532	9,307	4.846	21,722	10.267
12	12,674	4.529	9,723	4.845	17,283	10.259
Average	12,080	4.530	10,589	4.844	22,115	10.254
%RSD	4.000	0.036	7.027	0.036	9.741	0.135

No.	西地那非		好猫西地那非		那猫西地那非	
	Area (RSD%)	R.T (RSD%)	Area (RSD%)	R.T (RSD%)	Area (RSD%)	R.T (RSD%)
1	18,753	5.262	8,428	5.429	7,801	10.482
2	17,356	5.258	10,246	5.426	8,204	10.471
3	17,637	5.263	8,509	5.428	6,756	10.489
4	16,387	5.264	9,636	5.427	7,026	10.483
5	16,335	5.261	9,577	5.425	6,703	10.486
6	17,661	5.261	8,902	5.424	8,122	10.493
7	18,357	5.264	9,628	5.425	5,180	10.465
8	18,246	5.260	8,826	5.427	6,977	10.457
9	18,414	5.259	11,409	5.423	7,077	10.492
10	17,118	5.261	9,401	5.425	6,625	10.485
11	18,552	5.263	10,161	5.43	6,435	10.486
12	16,475	5.262	9,408	5.427	8,282	10.486
Average	17,608	5.261	9,511	5.426	7,099	10.481
%RSD	4.999	0.034	8.761	0.037	12.603	0.105

No.	硫基西地那非		硫基好猫西地那非		硫代二甲基西地那非	
	Area (RSD%)	R.T (RSD%)	Area (RSD%)	R.T (RSD%)	Area (RSD%)	R.T (RSD%)
1	29,033	9.125	22,237	10.261	3,814	6.701
2	28,197	9.137	22,267	10.263	4,454	6.682
3	28,343	9.127	23,073	10.244	3,908	6.698
4	26,897	9.134	26,156	10.234	4,345	6.693
5	27,739	9.122	22,593	10.242	4,038	6.693
6	27,463	9.118	21,640	10.254	3,911	6.700
7	25,130	9.132	24,045	10.280	2,969	6.700
8	26,726	9.139	22,494	10.254	3,613	6.696
9	26,361	9.125	22,197	10.231	3,484	6.698
10	28,261	9.122	19,678	10.253	3,407	6.650
11	26,901	9.126	21,722	10.267	4,013	6.702
12	26,170	9.128	17,283	10.259	3,805	6.684
Average	27,269	9.128	22,115	10.254	3,813	6.691
%RSD	4.069	0.069	9.741	0.135	10.691	0.218

No.	羟基硫代好猫西地那非	
	Area (RSD%)	R.T (RSD%)
1	13,756	7.653
2	13,981	7.640
3	13,655	7.647
4	14,040	7.643
5	13,271	7.640
6	11,947	7.649
7	12,312	7.642
8	13,517	7.643
9	13,428	7.650
10	11,885	7.645
11	12,618	7.648
12	12,374	7.642
Average	13,065	7.645
%RSD	6.053	0.056

■ 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10种西地那非类非法添加的方法。该方法线性范围宽，8种组分校准曲线的相关系数均在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西地那非类非法添加的检测要求。