

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种伐地那非类非法添加

LCMSMS-014

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。4种组分标准曲线的相关系数为0.999以上；对LOQ浓度基质加标溶液进行精密度实验，基质加标峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在7.478%~12.151%和0.032%~0.074%之间，仪器精密度良好。

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伐地那非类检测方法，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×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 II 2.0 mm×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°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	去乙酰伐地那非	461.00	151.05	-23.0	-40.0	-15.0
			312.05*	-23.0	-40.0	-22.0
2	羟基伐地那非	505.20	151.05	-26.0	-50.0	-16.0
			99.20*	-26.0	-40.0	-21.0
3	伐地那非	489.20	151.15	-25.0	-45.0	-16.0
			312.20*	-25.0	-40.0	-22.0
4	格列奇特	324.10	127.15	-16.0	-20.0	-13.0
			110.15*	-16.0	-20.0	-11.0
5	伪伐地那非	460.20	151.10	-17.0	-45.0	-30.0
			312.15*	-23.0	-40.0	-22.0

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:

分别精密称取乙基伐地那非、羟基伐地那非、伐地那非、伪伐地那非对照品2 mg [精确到0.01 mg, 其中盐酸伐地那非精确称取2.15 mg(相当于伐地那非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 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液。

分别精密量取上述4种伐地那非类违禁化学成分储备液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10 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品储备液。混合对照品浓储备溶液以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: 4、10、20、40、100、200、400、800 ng/mL, 1 $\mu\text{g/mL}$ 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, 用甲醇补足缺失的重量。取样品溶液50 μL , 分别加入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。

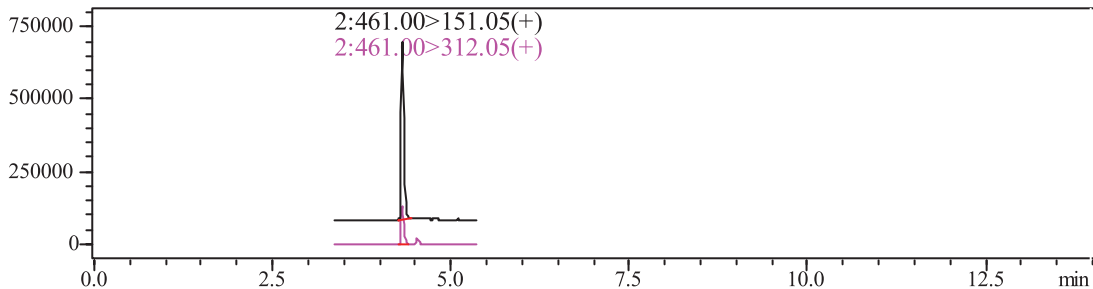
溶液标曲的配制方法:

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。

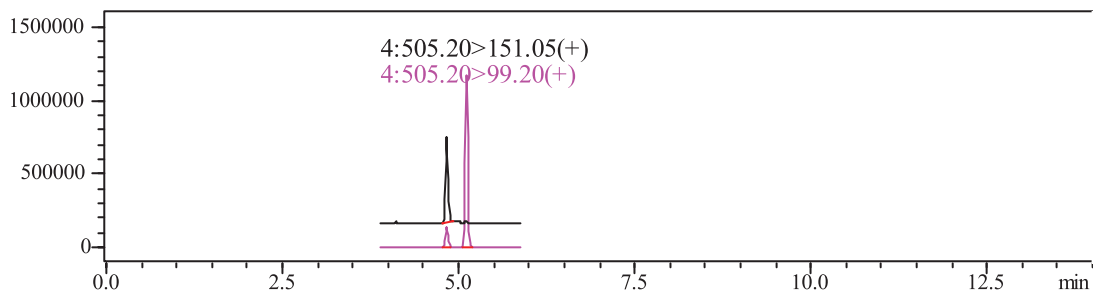
结果讨论

2.1 标准样品的MRM色谱图

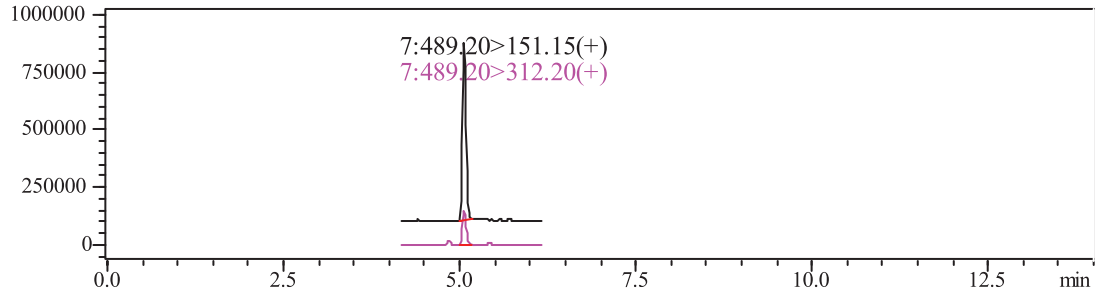
1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 去乙基伐地那非



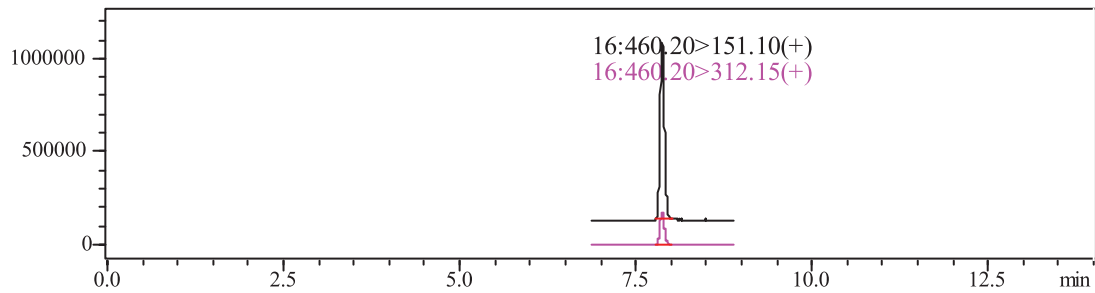
2、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 羟基伐地那非



3、0.5 μg/mL伐地那非

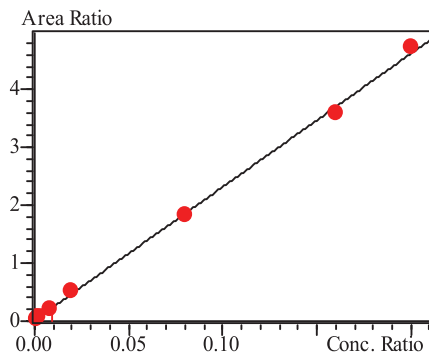


4、0.5 μg/mL伪伐地那非

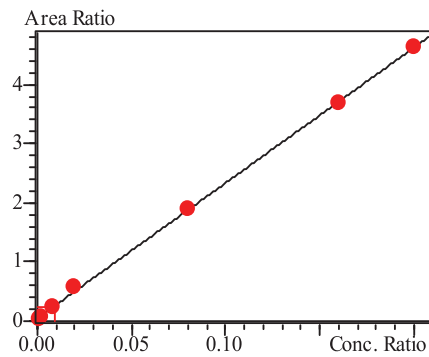


2.2线性关系

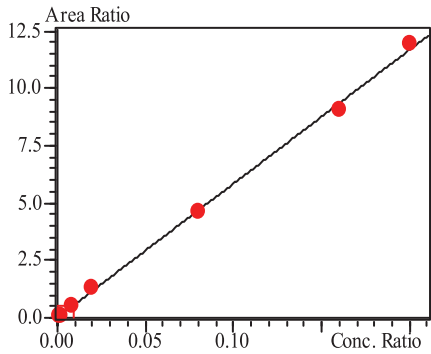
将1.3部分的六浓度标准工作液2、5、10、50、100、200 ng/mL按1.2中的分析条件进行测定，以格列奇特为内标物，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线。所得校准曲线线性关系良好，4种伐地那非线性相关系数均大于0.999。



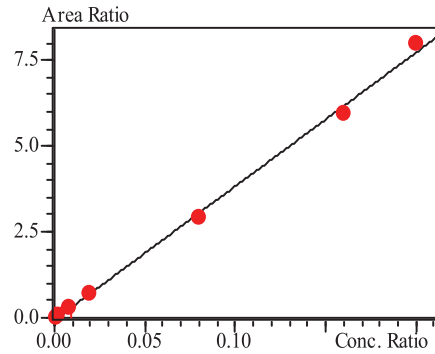
去乙酰基伐地那非, $Y = (23.0089)X + (0.0171359)$
 $R=0.9993$



羟基伐地那非, $Y = (22.8477)X + (0.049665)$
 $R=0.9998$



伪伐地那非, $Y = (58.3348)X + (0.0160524)$
 $R=0.9995$

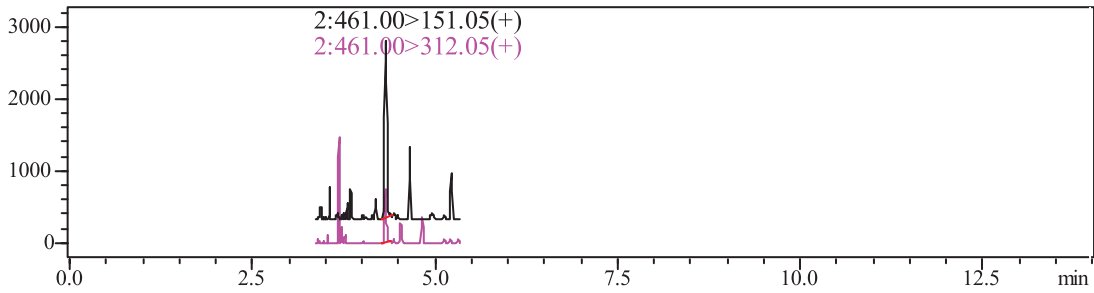


伐地那非 $Y = (38.9278)X + (-0.0648331)$
 $R=0.9991$

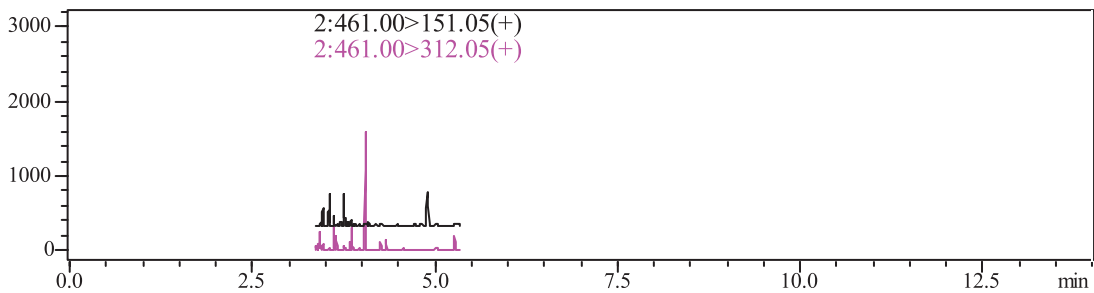
2.3 灵敏度实验

4种伐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：

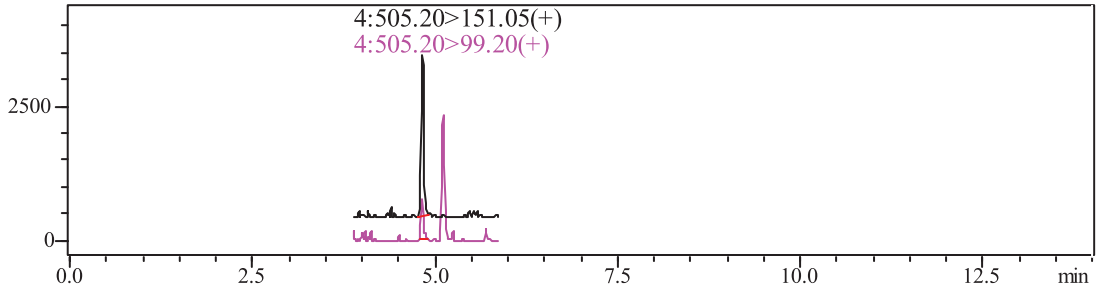
1、0.4 μg/g去乙酰伐地那非基质加标:



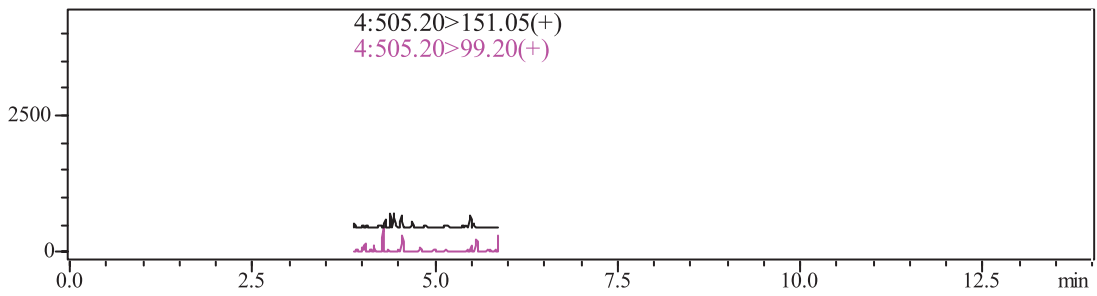
去乙酰伐地那非基质空白:



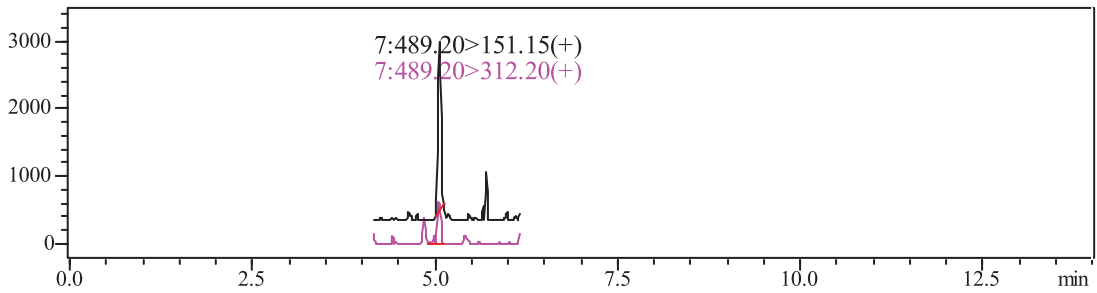
2、0.4 μg/g羟基伐地那非基质加标:



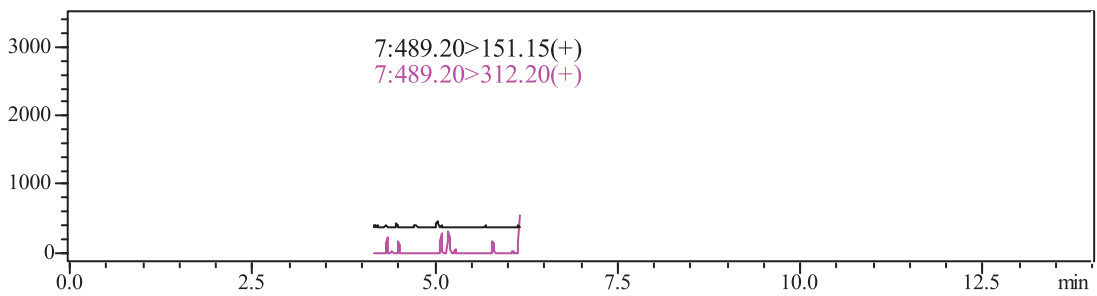
羟基伐地那非基质空白:



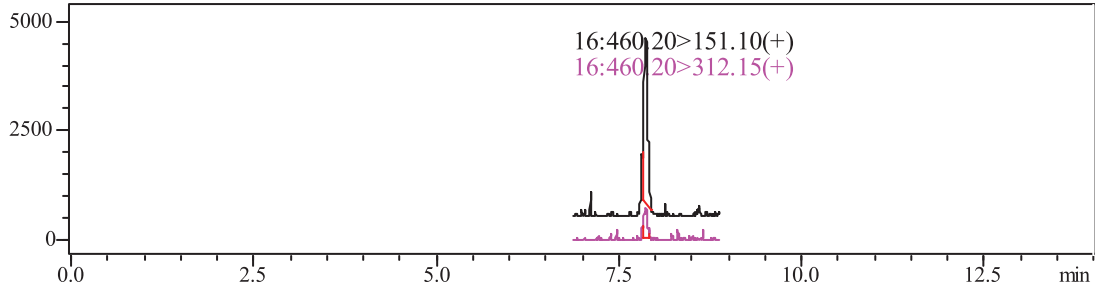
3、0.4 μg/g伐地那非基质加标:



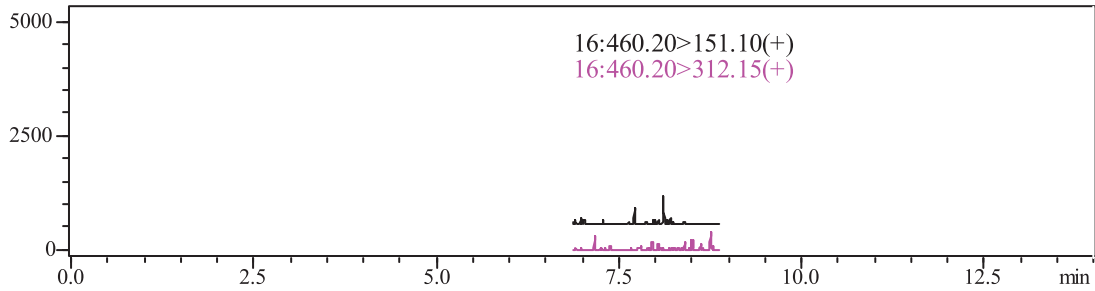
伐地那非基质空白:



4、0.4 μg/g伐地地那非基质加标:



伐地地那非基质空白:



2.4精密度实验

按照2.3实验配置检出限浓度溶液混标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7.478%~12.151%和0.032%~0.074%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.	去乙基伐地那非		羟基伐地那非		伐地那非	
	Area	R.T (min)	Area	R.T (min)	Area	R.T (min)
1	6,728	4.326	6,052	4.828	8,883	5.060
2	7,444	4.317	7,447	4.823	9,176	5.056
3	6,852	4.319	5,708	4.824	8,793	5.055
4	6,771	4.324	6,628	4.826	9,767	5.060
5	7,377	4.318	7,045	4.822	7,865	5.058
6	6,435	4.318	6,772	4.826	9,575	5.054
7	7,573	4.320	6,988	4.826	8,888	5.058
8	6,550	4.320	6,577	4.825	7,118	5.057
9	5,613	4.319	7,247	4.824	8,462	5.058
10	7,560	4.326	7,140	4.824	8,817	5.058
11	7,293	4.319	6,977	4.825	7,386	5.062
12	6,803	4.318	6,426	4.825	6,416	5.057
Average	6,917	4.320	6,750	4.825	8,429	5.058
%RSD	8.288	0.074	7.478	0.032	12.151	0.044

No.	伪伐地那非	
	Area	R.T (min)
1	16,423	7.868
2	14,857	7.860
3	14,536	7.866
4	15,910	7.858
5	16,404	7.868
6	16,427	7.861
7	15,781	7.872
8	16,621	7.867
9	16,335	7.853
10	15,783	7.860
11	15,957	7.858
12	15,783	7.864
Average	15,902	7.863
%RSD	4.026	0.068

■ 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种伐地那非类非法添加的方法。该方法线性范围宽，4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伐地那非类非法添加的检测要求。