

高效液相色谱/质谱联用测定保健食品中的西地那非和西力士

陈波¹ 朱小兰¹ 姚守拙¹ 王竹天² 杨大进² 韩宏伟²

(1. 湖南师范大学化学研究所, 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:目的 以紫外定量、质谱定性, 测定保健食品的违禁成分西地那非、西力士。方法 高效液相色谱/电喷雾质谱联用, 色谱柱: RP-C₁₈柱; 流动相: 0.5%甲酸 + 甲醇和 0.5%甲酸 + 水梯度淋洗; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 292 nm; 质谱扫描范围(m/z): 150~550 amu。结果 西地那非和西力士在一定的质量范围内呈良好的线性, RSD 小于 2%, 平均回收率分别为 96.9% 和 97.7%。结论 方法具有高的灵敏度、精确度和特异性, 能对保健食品中所添加的违禁药物西地那非、西力士进行准确的定性和定量检测。

关键词: 色谱法, 高压液相; 光谱分析, 质量; 营养保健品

Analysis of sildenafil and cialis in health foods by high performance liquid chromatography/mass spectrometry

Chen Bo, et al.

(Chemical Research Institute of Hunan Normal University, Hunan Changsha 410081, China)

Abstract: A simple method employing mass spectrum for identification and photodiode array detector for determination was established for the analysis of sildenafil and cialis in health food. The separation was carried on a reverse phase C₁₈ column with two mobile phase system. Good linearity between peak areas and analyte concentrations was obtained with relative coefficient better than 0.999. The recoveries for sildenafil and cialis were 96.9% and 97.7% respectively. The developed method was quite sensitive, precise, and showed good reproducibility.

Key Words: Chromatography, High Pressure Liquid; Spectrum Analysis, Mass; Dietary Supplements

西地那非柠檬酸盐 (Sildenafil Citrate, 俗称“伟哥”) 是美国食品及药物管理局 (FDA) 批准用于治疗男性功能障碍的口服药,^[1] 西力士 (Cialis) 是第二代磷酸二酯酶 (PDE - 5) 选择性抑制剂,^[2] 药效更快、更久, 已在欧洲批准上市,^[3] 图 1 为这两种物质的结构式。但此类药物必须在医生的指导下服用, 如过量服用会引起头痛、消化不良,^[1] 颜色分辨下降等不良反应,^[4] 对于心血管患者, 有可能导致突然死亡。^[5]

目前, 一些不法厂商在一些性保健品内加入此类药物, 严重威胁到服用者的健康, 所以有必要建立一个能对这两种物质快速鉴定并且准确定量的方法。对于西地那非的测定, 通用的方法为高效液相

色谱法,^[6-9] 李润锴等人报道了用毛细管电泳测定西地那非的方法,^[1] 但是同时测定两种物质的方法尚未见报道。

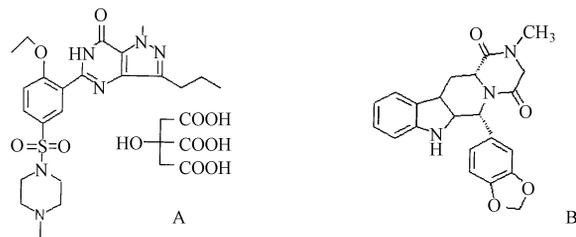


图 1 西地那非 (A) 和西力士 (B) 的结构式

本文建立的高效液相色谱/二极管阵列/质谱联用的方法具有快速、抗干扰的特点, 能对保健食品中

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA804A21, 2001BA804A18 - 13)。

作者简介: 陈波 男 教授

This work was supported by the Grant from National Science and Technology Program Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2001BA804A21, 2001BA804A18 - 13)

的西地那非和西力士进行准确的定性和定量测定。

1 材料与方法

1.1 仪器 Waters 2695 分离单元(配有自动进样器), Waters 996 二极管阵列检测器(PAD), Waters Micromass ZQ2000 质谱检测器(配有电喷雾电离源, ESI), Waters MasslynxTM 5 色谱管理系统(Waters, 美国)。

1.2 试剂和样品 西地那非和西力士标准品由药用原料在本实验室纯化制备而得(>99%, HPLC), 样品购自市场; 甲醇(色谱纯, 上海路都化学试剂厂); 纯净水(杭州娃哈哈公司); 甲酸、乙酸乙酯(分析纯, 上海三浦化工有限公司)。

1.3 校正曲线的绘制 西地那非和西力士储备液的浓度分别为 0.200 mg/mL(甲醇溶液)和 0.26 mg/mL(乙酸乙酯溶液), 准确移取上述标准液各 5 mL 于 10 mL 容量瓶, 混匀, 以甲醇+乙酸乙酯混合溶剂(1+1)定容。分别移取此混合溶液 0.2、0.6、1.2、2.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶, 以甲醇+乙酸乙酯混合溶剂(1+1)定容至刻度, 得到系列标准溶液, 每个浓度的溶液分别进 10 μ L, 以紫外 292 nm 处的吸收峰面积对浓度作曲线, 进行拟合, 得到两种物质的校正曲线。

1.4 试样的处理

保健酒的处理 取 1 mL 保健酒, 用甲醇+乙酸乙酯混合溶剂(1+1)定容到 25 mL 容量瓶, 取 1 mL 过 0.45 μ m 膜, 滤液直接进色谱系统分析, 进样量为 10 μ L。

固体制剂的处理 将固体制剂碾碎, 过 20 目筛, 称取 1 g, 用 10 mL 甲醇+乙酸乙酯混合溶剂(1+1)超声提取 5 min, 离心后取出上清液, 残渣再用 10 mL 混合溶剂提取 1 次, 合并提取液, 再用混合溶剂将提取液定容于 25 mL 容量瓶, 取 1 mL 提取液过 0.45 μ m 膜, 滤液直接进色谱系统分析, 进样量为 10 μ L。

1.5 实验条件

HPLC 条件 色谱柱 Spherigel C₁₈ (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm)(大连江申分离科学技术公司), 流动相 A: 0.5% 甲酸+甲醇, B: 0.5% 甲酸+水, 进行梯度洗脱, 梯度条件为在 15 min 内 A 由 60% 呈线性变到 75%, 进样前, 柱子用初始流动相平衡 10 min, 分析完一个样以后, 用 100% 甲醇冲洗色谱柱; 流速 1 mL/min; 检测波长 292 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样体积为 10 μ L。

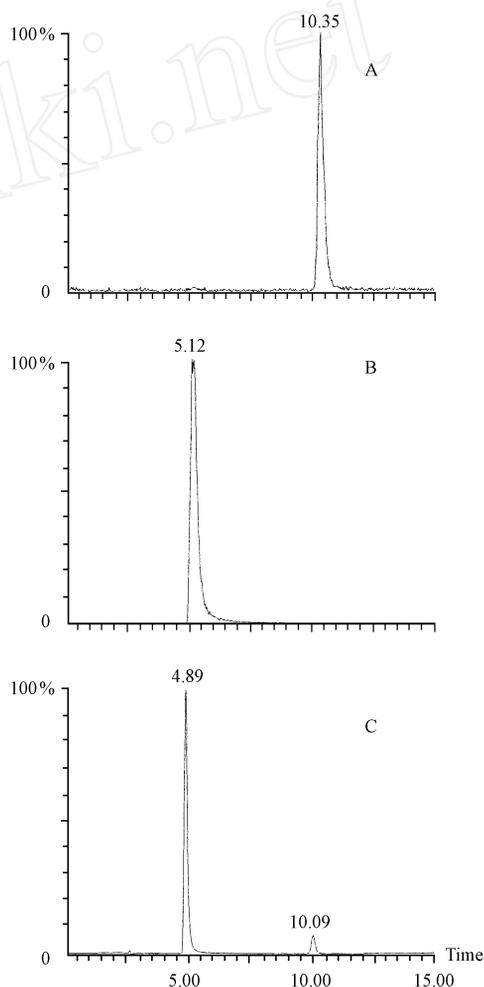
MS 条件 用电喷雾离子化正离子采集模式(ESI⁺), m/z 范围 150~550 amu, 毛细管电压为

3.0 kV, 萃取电压 4 V, 离子源温度 105 $^{\circ}$ C, 脱溶剂温度 250 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气(N₂) 250 L/h, 锥孔反吹气 40 L/h。锥孔电压的设置: 在扫描模式中设为 30 V, 在选择离子模式中, 对于西地那非和西力士分别设为 40 V 和 30 V。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, 西地那非的峰形很不对称, 而且展宽严重, 在已报道的分析西地那非方法中, 大都采用了盐类改性剂,^[6,7] 此类改性剂在色谱分离中有利于改善西地那非的峰形, 但是由于它的不挥发性, 会造成对质谱离子源的污染。当在流动相中加入 0.5% 的甲酸以后, 西地那非的峰形比较对称, 且对质谱不造成危害。

由于西地那非与西力士结构上的差异, 在电离中承受的电压不一样, 西地那非在 40 V 的电压下给出以分子离子为主的质谱图, 而在此电压下, 在西力



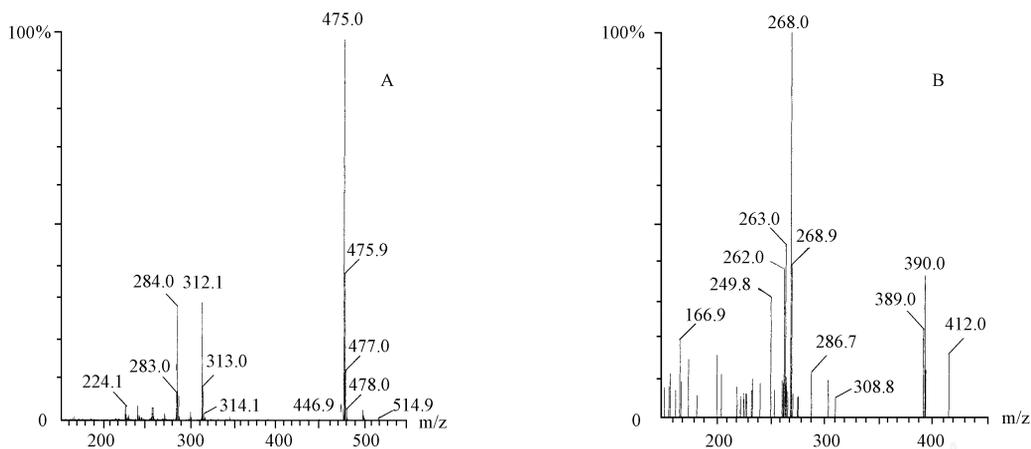
A. 用选择离子(SIR) 390 记录的西力士的色谱图。B. 用选择离子(SIR) 475 记录的西地那非的色谱图。C. 以 292 nm 为检测波长记录的西地那非和西力士的色谱图, 实验条件见“1.5”。

图 2 标准品的色谱图

士的质谱图中,分子离子的信号很弱,而电压很低时,总的响应比较差,所以在扫描离子模式中,锥孔电压设为 30 V,而在选择离子模式中,给西地那非与西力士以不同的锥孔电压,分别为 40 V 和 30 V。

在给定的实验条件下,西地那非和西力士达到了很好的分离,而且能在 12 min 内完成,分析时间短,见图 2。图 3 给出了西地那非和西力士的质谱

图,图 3(A)中 m/z 475 是西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,284 为断裂 C-S 键以及 C-O 键后形成的碎片离子。图 3(B)中 m/z 390 是西力士的氢化分子离子, m/z 412 是钠化离子,碎片离子 m/z 268 的强度随着锥孔电压的升高加大,同时 m/z 390 减少。



质谱条件见“1.5”

图 3 西地那非(A)和西力士(B)的质谱图,

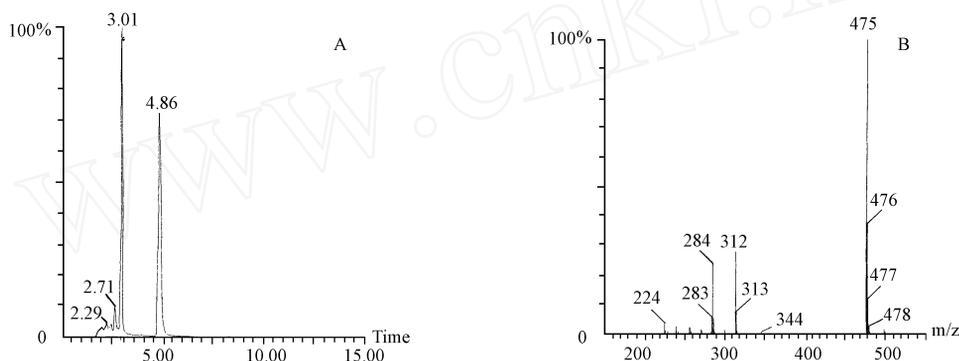


图 4 以 292 nm 为检测波长记录的某保健酒的色谱图(A)和西地那非全扫描的质谱图(B)

2.2 线性和检测限 根据“1.3”所述绘制校正曲线,每个浓度平行进 3 针,所得结果见表 1,将标准溶液逐渐稀释,以信噪比(S/N)为 3 时的进样量作为检出限,求得两个被分析物的检测下限。

表 1 线性范围、相关系数、检测限

化合物	线性范围 ng	线性方程	相关系数 r	检测限 ng
西地那非	20 ~ 1000	$y = 1137x - 451$	0.9998	0.035
西力士	26 ~ 1300	$y = 109.5x - 30.7$	0.9998	0.68

2.3 回收率实验 对保健酒和固体制剂按 1 mg/mL 和 1 mg/g 的含量作标准加入回收实验。每个样品平行处理 5 份,按照试样测定的方法进行分析,求算平均回收率,求得西地那非和西力士在两个试样中的平均回收率分别为 96.9% ($RSD = 1.2\%$, $n = 5$),

97.7% ($RSD = 1.6\%$, $n = 5$)。

2.4 试样测定 按照“1.5”所述测定市场所购样品中西地那非和西力士的含量,在一个保健酒中测出其加有西地那非,含量高达 2.33 mg/mL,图 4 为样品的色谱图和质谱图。

3 结论 本方法所采用的流动相简单,分析时间短,且不需对样品进行复杂的预处理,灵敏度高,借助质谱的定性能力,可大大提高方法的特异性,防止出现假阳性结果,能快速准确地测定保健食品中的西地那非和西力士。

参考文献:

[1] 李润锴,薄涛,刘虎威,等.毛细管电泳法测定性保健品

- 中的西地那非[J]. 色谱, 2002, 20:335—337.
- [2] Porst H. IC351 (tadalafil, Cialis): update on clinical experience[J]. Int J Impot Res, 2002, Suppl 1:57—64.
- [3] Kuan J, Brock G. Selective phosphodiesterase type 5 inhibition using tadalafil for the treatment of erectile dysfunction [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2002, 11:1605—1613.
- [4] McCulley TJ, Luu J K, Marmor M F, et al. Effects of sildenafil citrate (Viagra) on choroidal congestion [J]. Ophthalmologica, 2002, 216:455—458.
- [5] Feenstra J, van Drie-Pierik R J, Lacle C F, et al. Acute myocardial infarction associated with sildenafil [J]. Lancet, 1998, 352:957—958.
- [6] 杨德忠, 黄惠宏. HPLC 法测定枸橼酸西地那非片的含量[J]. 解放军药化学学报, 2002, 18: 235—236.
- [7] 缪玉山, 厉伟兰, 倪桃, 等. HPLC 测定枸橼酸西地那非片中西地那非及其有关物质的含量[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32:273—275.
- [8] 潘恒亮, 赵士权, 黄徽, 等. 高效液相色谱法测定保健品中西地那非柠檬酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12:197.
- [9] Tracqui A, Ludes B. HPLC-MS for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in biological fluids. Application to the salivary excretion of sildenafil after oral intake [J]. J Anal Toxicol, 2003, 27:88—94.

[收稿日期:2003-10-22]

中图分类号:R15;O657.63;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2004)02-0121-04

卫生部关于保健食品良好生产规范审查方法和评价准则有关问题的复函

卫法监函[2003]282号

黑龙江省卫生厅:

你厅《关于 保健食品良好生产规范审查方法和评价准则 执行过程中有关问题的请示》(黑卫法监发[2003]645号)收悉。经研究,现答复如下:

根据《中华人民共和国食品卫生法》第八条第(四)款、第(六)款和《保健食品良好生产规范》(GB 17405—1998)第7.3.2款的规定,为防止食品、药品间的交叉污染,生产保健食品与药品不能使用同一生产线,且保健食品与药品的生产加工车间也应严格分开,存放保健食品原料、半成品、成品的库房也应与药品的相分离,不能使用同一库房。

专此函复。

附件:黑龙江省卫生厅《关于 保健食品良好生产规范审查方法和评价准则 执行过程中有关问题的请示》

中华人民共和国卫生部
二 三年十一月二十七日

黑龙江省卫生厅文件

黑卫法监发[2003]645号

关于《保健食品良好生产规范审查方法和评价准则》执行过程中有关问题的请示

卫生部:

我省在执行卫生部文件《卫生部关于印发保健食品良好生产规范审查方法与评价准则的通知》(卫法监发[2003]77号文件)过程中,遇到如下问题需请示:

药品生产企业加工生产保健食品,生产保健食品与药品是否可以使用同一条生产线。存放保健食品的原料、半成品、成品与药品是否可以使用同一库房。

以上请示,请批复。

黑龙江省卫生厅
二 三年十月十一日