

HPLC-MS/MS 法测定中成药中 9 种西地那非类药物

刘颖强 陈洪骏

肇庆市药品检验所, 广东省肇庆市, 526040;

摘要: 建立了超高效液相-串联质谱法对中成药中非法添加的 9 种西地那非类药物的检测方法。以乙腈为提取液, 采用超声液液萃取前处理, 在 MRM 模式模式下, 对涉案样品进行定性及定量检测, 分别在 5 批样品中检出西地那非, 含量为 0.5mg/丸、4.9mg/丸、7.1mg/粒、6.8mg/粒、9.3mg/丸, 3 批检出了他达拉非, 含量分别为 5.8mg/丸、8.5mg/粒、3.3mg/丸。该方法简便易行, 结果准确可靠。

关键词: 超高效液相串联质谱法; 中成药; 西地那非; 他达拉非

DOI: 10.69979/3041-0673.26.03.100

引言

为规范行业秩序, 打击此类非法添加行为, 近年来国家食品药品监督管理局连续颁布了多个补充检验方法和检验项目批准件, 涉及非法添加补肾壮阳类化学药物的 5 个国家标准中所收录的化学药物均为 5-型磷酸二酯酶抑制剂 (PDE5) 及其衍生物^[1-4]。上述方法用 HPLC 定量, 用 HPLC-MS 定性, 检测过程要用 HPLC 和 HPLC-MS 两种仪器进行 2 次检测, 比较耗时, 而且 HPLC-MS 的定性准确性相比 HPLC-MS/MS 较差。本研究采用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法, 建立了中成药中 9 种西地那非类药物的检测方法, 以期能够用于更快速、准确地测定中成药中西地那非类药物。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

XPE206DR 电子天平 (瑞士梅特勒公司); CPA225D 电子天平 (德国赛多利斯公司); Agilent1290 超高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); SCIEX QTRAP4500 三重四级杆质谱仪 (美国 AB 公司); 移液器 (德国 IKA 公司)。所有使用仪器均在检定有效期内。

西地那非标准品 (批号: 510068-202102, 含量: 100%)、那莫西地那非标准品 (批号: 520040-202102, 含量: 100%)、硫代艾地那非标准品 (批号: 520048-202002, 含量: 99.3%)、红地那非标准品 (批号: 520047-201802, 含量: 100%)、那红地那非标准品 (批号: 520039-201902, 含量: 100%)、伐地那非标准品 (批号: 510169-202001, 含量: 99.7%)、伪伐

地那非标准品 (批号: 520041-202202, 含量: 100%)、他达拉非标准品 (批号: 510070-202403, 含量: 99.9%)、氨基他达拉非标准品 (批号: 520042-202002, 含量: 99.5%), 9 种标准物质均为中检院提供。色谱级甲醇购自上海安谱实验科技股份有限公司; 乙酸、乙酸铵 (分析纯) 购自上海麦克林生化科技有限公司。

实验室用水经赛多利斯 comfort II 超纯水系统制得, 符合 GB/T6682-2008《实验室用水规格和试验方法》一级标准要求。

2 实验方法

2.1 仪器工作条件

色谱条件: Agilent Eclipse Plus C18 (100×2.1mm, 3.5 μm; SN: USUXK05486), 进样量为 5 μL, 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 40 °C, 流动相: A: 含 0.1% 乙酸的 20mmol/L 乙酸铵溶液, B: 甲醇。流动相梯度洗脱程序设置如表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.00	75	25
5	65	35
15	35	65
30	35	65
33	75	25

质谱条件: 离子源为电喷雾 (ESI) 离子源; 离子源温度为 550 °C; 检测模式为多离子反应监测模式 (MRM), 碰撞气为 9 psi; 气帘气为 30 psi; 雾化气为 55 psi; 雾化电压为 5500 V; 辅助加热气为 55 psi; 质谱参数如表 2。

表 2 9 种西地那非类药物的离子对及相关质谱参数

组分名称	Q1	Q3	驻留时间 (ms)	DP (V)	CE (V)
西地那非	475.1	57.9*	20	144	74.2
	475.1	283.1	20	144	78
那莫西地那非	460	283.1*	20	153	50
	460	299.1	20	153	50
硫代艾地那非	505	327.1*	20	147.1	44
	505	299.2	20	147.1	51.4
红地那非	467	324.9*	20	131	52.7
	467	353	20	131	40.9
那红地那非	453.1	325.1*	20	112	45
	453.1	353	20	112	38
伐地那非	489.3	150.8*	20	128	71.7
	489.3	312.1	20	128	51
伪伐地那非	460	150.9*	20	157	66.6
	460	311.9	20	157	49.9
他达拉非	389.9	268.1*	20	112.6	19.8
	389.9	135.3	20	112.6	36.7
氨基他达拉非	391.4	268.9*	20	111	16.1
	391.4	135.1	20	111	31

*为定量离子对

2.2 样品处理方法

若供试品为固体试剂,精密称取一次服用量,研细后转移至 50ml 量瓶中,加乙腈约 40ml,超声处理 15 分钟,冷却至室温,用乙腈定容至刻度,摇匀,过滤。若供试品为液体试剂,精密量取一次服用量至 50ml 量瓶中,加乙腈约 40ml,超声处理 15 分钟,冷却至室温,用乙腈定容至刻度,摇匀,过滤。若样品浓度太高,精密量取续滤液适量,用 50%乙腈稀释至浓度。

2.3 标准溶液的制备

2.3.1 混合标准储备液的制备

精确称取 9 种标准品各 3mg,置 20ml 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,即得。

2.3.2 系列标准溶液的制备

精确量取混合标准储备液 1ml,用 50%乙腈稀释至 100ml,分别精密量取此溶液 0.04ml、0.2ml、0.4ml、1ml、2ml,用 50%乙腈稀释至 10ml,即得 S₁、S₂、S₃、S₄、S₅ 溶液,其中各组分浓度分别为 6、30、60、150、300ng/mL。

2.4 线性关系、精密度和回收率

精密吸取 2.3.2 的系列标准溶液各 5 μl 注入液相色谱仪-串联质谱仪,记录色谱图,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表 3。

取浓度为 30ng/ml 的标准溶液连续进样 7 次,计算精密度。西地那非等 9 种药物的精密度均小于 5%。

为验证方法准确度,分别以 6ng/ml、150ng/ml 做加标回收实验,每个浓度水平重复 3 次,计算 RSD。西地那非等 9 种药物的平均回收率为 82.6%~103.8%,RSD 小于 5%。证明该方法准确、有效。

表 3 9 种西地那非类药物的线性范围、线性方程、相关系数、回收率及 RSD

名称	浓度范围 (ng/ml)	标准曲线	相关系数	检出限 (ng/ml)
西地那非	6~300	$y = 7561.3x + 2684.5$	0.99963	1.1
那莫西地那非	6~300	$y = 8400.2x + 12529.8$	0.99972	0.7
硫代艾地那非	6~300	$y = 3373.1x + 4379.1$	0.99915	1.4
红地那非	6~300	$y = 1236.1x + 2188.4$	0.99891	2.2
那红地那非	6~300	$y = 1330.6x + 2341.7$	0.99735	2.7
伐地那非	6~300	$y = 7932.1x + 9320.3$	0.99913	0.5
伪伐地那非	6~300	$y = 17945.4x + 22415$	0.99957	0.4
他达拉非	6~300	$y = 3549.8x + 2824.2$	0.99643	1.1
氨基他达拉非	6~300	$y = 1587.1x + 2824.2$	0.99986	3

2.5 样品测定分析

用 15 批涉案样品进行检测分析, 其中有 5 批检出了西地那非, 含量分别为 0.5mg/丸、4.9mg/丸、7.1mg/粒、6.8mg/粒、9.3mg/丸, 3 批检出了他达拉非, 含量分别为 5.8mg/丸、8.5mg/粒、3.3mg/丸。

3 结语

本研究建立了超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法, 筛查了 15 批涉案中成药中的 9 种西地那非类药物。该方法改进了质谱条件, 定性准确性增加, 增加了定量测定, 改进了流动相梯度, 检验时间大幅减少, 最终在 5 批样品中检出西地那非, 3 批样品中检出他达拉非。该研究结果可为中成药质量监管提供技术支持。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. BJS 2009030 补肾壮阳类中成药中 PDE5 型抑制剂的快速检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [2] 国家食品药品监督管理局. BJS 201710 保健食品中 75 种非法添加化学药物的检测[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [3] 国家食品药品监督管理局. BJS 201805 食品中那非物质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [4] 中华人民共和国海关总署. SN/T 5357-2021 出口保健食品中多种非法添加物的测定液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.