

# 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健品中三种违禁成分

李锦清, 綦艳, 邴明浩, 龙顺荣, 邱启东

(广东产品质量监督检验研究院, 广东顺德 528300)

**摘要:** 建立固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱/质谱法(SPE-UPLC-MS/MS)测定保健品中伐地那非、西地那非、他达那非的分析方法。试样经甲醇或盐酸溶液提取, HLB 固相萃取柱净化后, 以乙腈和 0.1% 甲酸水溶液作为流动相, C18 色谱柱分离, 采用电喷雾离子源, 正离子扫描多反应监测(MRM)模式进行检测。伐地那非、西地那非、他达那非在 10~200  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内呈良好线性关系, 相关系数( $r^2$ )均大于 0.99。空白样品加标回收率均大于 75%, 相对标准偏差小于 8%。胶囊样品中伐地那非、西地那非、他达那非的方法检出限分别为 10  $\mu\text{g/kg}$ 、10  $\mu\text{g/kg}$ 、20  $\mu\text{g/kg}$ ; 定量限分别为 40  $\mu\text{g/kg}$ 、40  $\mu\text{g/kg}$ 、80  $\mu\text{g/kg}$ 。口服液分别为 3  $\mu\text{g/L}$ 、3  $\mu\text{g/L}$ 、6  $\mu\text{g/L}$ , 定量限分别为 10  $\mu\text{g/L}$ 、10  $\mu\text{g/L}$ 、20  $\mu\text{g/L}$ 。研究了基质效应的影响, 样品基质对伐地那非、西地那非、他达那非的响应表现为抑制作用, 伐地那非受到抑制作用最明显。

**关键词:** UPLC-MS/MS 法; 保健品; 伐地那非; 西地那非; 他达那非; 基质效应

文章编号: 1673-9078(2014)11-246-250

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.043

## Simultaneous Determination of Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Health Foods by Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

LI Jin-qing, QI Yan, LI Ming-hao, LONG Shun-rong, QIU Qi-dong

(Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, Shunde 528300, China)

**Abstract:** A method was established for the determination of vardenafil, sildenafil, and tadalafil in health foods using solid-phase extraction-ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-UPLC-MS/MS). The sample was extracted by methanol or hydrochloric acid, and then purified by a hydrophilic/lipophilic balanced (HLB) SPE column. The target compounds were separated on a reversed phase column using a solution of acetonitrile and 0.1% formic acid in water as the mobile phase, and then detected by positive electrospray ionization under multiple reaction monitoring (MRM) mode. Good linearity of the calibration curves was achieved for three target compounds in the range of 10~200  $\mu\text{g/L}$ , with correlation coefficients ( $r^2$ ) greater than 0.99. The average recoveries of the blank matrix sample were all more than 75%, and the relative standard deviations (RSDs) were less than 8%. The limits of detection (LOD) for vardenafil, sildenafil, and tadalafil in the capsule form were 10  $\mu\text{g/kg}$ , 10  $\mu\text{g/kg}$ , and 20  $\mu\text{g/kg}$ , respectively. The limits of quantitation (LOQs) for vardenafil, sildenafil, and tadalafil in the capsule form were 40  $\mu\text{g/kg}$ , 40  $\mu\text{g/kg}$ , and 80  $\mu\text{g/kg}$ , respectively. For oral samples, the LODs were 3  $\mu\text{g/L}$ , 3  $\mu\text{g/L}$ , and 6  $\mu\text{g/L}$ , respectively; the LOQs were 10  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$ , and 20  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The sample matrix effects were also studied, which had a suppressive effect on the response of vardenafil, sildenafil, and tadalafil, and the most significant suppressive effect was found on vardenafil.

**Key words:** ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; health food; vardenafil; sildenafil; tadalafil; matrix effects

伐地那非、西地那非、他达那非都属于磷酸二酯

收稿日期: 2014-05-06

作者简介: 李锦清 (1981-), 男, 硕士研究生, 工程师, 研究方向: 食品检测技术研发

通讯作者: 綦艳 (1978-), 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向: 食品检测技术研发

酶 5 (PDE-5) 抑制剂, 均用于临床治疗男性性功能障碍的处方药, 被禁止添加到保健食品中。某些补肾壮阳的中药及保健食品的生产厂家为增强产品功效, 非法添加这三种药物, 以达到其宣传的治疗作用, 危害服用者的健康。目前, 伐地那非、西地那非、他达那非的检测方法有高效液相色谱法<sup>[1~3]</sup>、毛细管电泳法

[4]、液相色谱-串联质谱法<sup>[5-9]</sup>。由于保健食品成分复杂, 色谱杂峰多, 用高效液相色谱法和毛细管电泳法进行检测时存在定性困难等缺点, 液相色谱-串联质谱法定性能力强, 可大大提高方法可靠性和抗干扰能力, 准确快速地定性定量。

国内采用液相色谱-串联质谱法<sup>[10-12]</sup>检测保健品中伐地那非、西地那非、他达那非的文献报道较多, 其前处理方法一般采用直接提取, 不经过任何的净化处理, 直接用液相色谱-串联质谱仪检测, 也未发现对伐地那非、西地那非、他达那非受到基质效应影响的情况进行相关讨论的文献报道。我国出入境检验检疫行业标准 SN/T1951-2007<sup>[13]</sup>采用样品提取、稀释后直接进样检测的方法, 未经净化处理, 试样中糖类、色素等杂质容易损坏色谱柱和污染离子源, 甚至会引起基质效应 (Matrix Effects, ME), 影响定性和定量。样品净化方法主要有液液萃取法和固相萃取法, 液液萃取 (LLE) 法需要消耗大量有机试剂, 样品处理步骤复杂, 回收率和精密度不理想。固相萃取 (SPE) 法能有效的将分析物与干扰组分分离, 减少样品中杂质对仪器的污染, 降低背景噪音, 提高方法回收率, 提高检测灵敏度, 结果重现性好, 而且能显著减少有机试剂使用量, 与液液萃取相比具有更大的应用优势。因此, 在大量试验以及查阅相关文献的基础上, 通过比较 4 种固相萃取柱对样品的净化效果, 最终建立以 HLB 固相萃取柱净化, 超高效液相色谱-串联质谱/质谱法同时测定保健品食品中伐地那非、西地那非、他达那非的检测方法, 并对基质效应的影响进行了探讨, 采用空白基质补偿配制标准曲线的方法消除基质效应影响, 解决了基质效应影响准确定量的问题。

## 1 实验部分

### 1.1 主要实验仪器与试剂

UPLC-Xevo TQ 超高效液相色谱-串联质谱/质谱仪, 美国 Waters 公司; 超声波清洗机, 广州吉普超声波电子设备有限公司; 高速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; DT-502A 电子天平, 常熟市金羊砝码仪器有限公司; IKA MS3 漩涡混合器, 德国 IKA 公司; Strata-X、Strata-X-C SPE 柱, 60 mg/3 mL, 美国 Phenomenex 公司; Waters OASIS HLB SPE 柱, 60 mg/3 mL, Waters 公司; ProElut Melamine SPE 柱, 60 mg/3 mL, 迪马科技有限公司。固相萃取柱使用前均依次用 5 mL 甲醇、5 mL 超纯水活化。

伐地那非、西地那非柠檬酸盐、他达那非标准品 (纯度均为 $\geq 97\%$ , Dr. Ehrenstorfer GmbH); 乙腈 (色

谱纯), 美国 Sigma 公司; 甲酸 (优级纯), 德国 CNW 公司; 乙腈、甲醇 (分析纯), 天津市永大化学试剂有限公司; 氨水 (分析纯), 含量为 25%, 广州化学试剂有限公司; 实验用水为二级蒸馏超纯水; 氮气 (纯度大于 99.999%)。

### 1.2 标准溶液的配制

分别准确称取适量伐地那非、西地那非、他达那非标准品, 用甲醇溶解配制成浓度为 10 mg/L 的混合标准储备溶液, 于 4 °C 下保存。用空白基质溶液配制 10、20、50、100、150、200  $\mu\text{g/L}$  的混合标准工作溶液, 现配现用。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Plus C18 RRHD (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 流速: 0.20 mL/min; 柱温: 40 °C; 样品室温度: 15 °C; 进样体积: 10  $\mu\text{L}$ ; 流动相: A: 乙腈; B: 0.1% 甲酸水溶液。梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 15% A; 1.0~5.0 min, 15%~95% A, 保持 1 min; 6.0~6.1 min, 95%~15% A, 保持 2 min。

### 1.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 离子化方式: ESI (+); 检测模式: 多反应监测 (MRM) 模式; 源温度 150 °C; 毛细管电压 2.82 kV; 脱溶剂气温度: 500 °C; 脱溶剂气流量: 800 L/h; 碰撞气流量: 0.13 mL/min。其他参数见表 1。

表 1 伐地那非、西地那非、他达那非的保留时间及质谱检测参数

Table 1 Retention times and MS/MS parameters of vardenafil, sildenafil and tadalafil

分析物	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V
伐地那非	2.85	489.3	151.1*, 312.1	60, 60	45, 40
西地那非	3.07	475.2	100.1*, 311.2	60, 60	30, 31
他达那非	3.81	390.1	135.0, 268.1*	27, 19	15, 15

Note: \*Quantification ion-pair.

### 1.5 样品前处理

#### 1.5.1 提取

片剂、胶囊试样: 称取 1 g 试样 (精确至 0.01 g) 置于 25 mL 容量瓶中, 加入 20 mL 甲醇, 盖上盖混匀, 超声 30 min, 冷却至室温后, 用甲醇定容至刻度, 摇匀。取 1.0 mL 样液于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液定容后混匀, 待净化。

液体试样：准确移取 1.0 mL 试样置于 10 mL 容量瓶中，加入 8 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液，超声 30 min，定容至刻度，摇匀，待净化。

### 1.5.2 净化

将处理好的样液以小于 1 mL/min 的流速过 OASIS HLB SPE 柱净化，用 2 mL 水淋洗 SPE 柱，真空抽干，用甲醇+乙腈（1+1，体积比）洗脱，收集洗脱液，40 °C 氮气吹干，用 1.0 mL 0.1% 盐酸+甲醇（9+1，体积比）溶解，过 0.22 μm 水系膜，液相色谱-串联质谱测定。

### 1.6 基质效应<sup>[4]</sup>评价方法

采用提取后添加法考察基质效应，通过公式  $ME=B/A \times 100\%$ ，计算基质溶液中待测物的峰面积（B）与纯溶剂中待测物的峰面积（A）的比值来评价基质效应。当  $ME < 1$  时，存在基质抑制作用，其值越接近 1 基质抑制作用越小；当  $ME > 1$  时，存在基质增强作用；当  $ME = 1$  时，无基质效应。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件

选择 Agilent Eclipse Plus C18 RRHD（50 mm×2.1 mm，1.8 μm）作为分离色谱柱，以甲醇和 0.1% 甲酸-水溶液作为流动相时，伐地那非和西地那非的色谱峰重叠，分离效果差；乙腈和 0.1% 甲酸-水溶液作为流动相时，伐地那非、西地那非、他达那非获得良好的分离度，如图 1 所示。因此，选择乙腈和 0.1% 甲酸-水溶液作为流动相。

### 2.2 固相萃取柱的选择

表 2 4 种 SPE 柱对待测物的净化回收率和相对标准偏差（RSD）（n=3）

Table 2 Purification recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the analytes by four SPE columns (n=3)

分析物	回收率与相对标准偏差/%			
	HLB	Strata-X	Strata-X-C	ProElut Melamine
伐地那非	87.41 (5.61)	85.60 (5.13)	93.51 (8.12)	72.41 (7.84)
西地那非	107.21 (4.12)	90.61 (4.61)	62.22 (7.21)	60.90 (8.12)
他达那非	84.51 (4.34)	82.52 (7.62)	0	0

### 2.3 基质效应考察

分别用 HLB、Strata-X SPE 柱净化获得的空白基质溶液和 0.1 mol/L 盐酸+甲醇混合液（9+1，体积比）配制浓度均为 50 μg/L 伐地那非、西地那非、他达那非的混合标准溶液，平行测定 3 次。根据“1.6 基质效

应评价方法”进行基质效应评价，结果见表 3。由表 3 数据可知，样品经 SPE 柱净化后，伐地那非、西地那非、他达那非的测定均受到基质抑制作用，其中伐地那非受到基质抑制作用最大，其次是西地那非，他达那非最小。HLB 柱净化时目标物受基质抑制作用比 Strata-X 柱小，说明 HLB 柱净化效果更好。因此，选

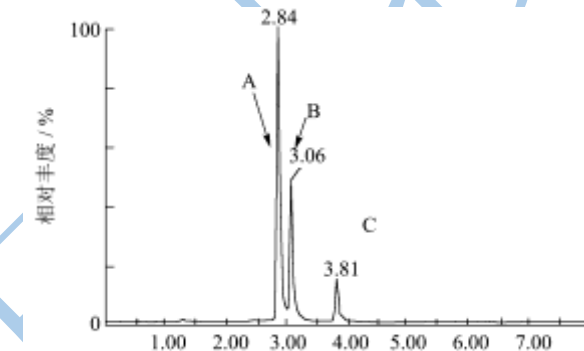


图 1 伐地那非(A)、西地那非(B)、他达那非(C)标准溶液的 TIC 图

Fig.1 TIC chromatogram of vardenafil(A), sildenafil(B) and tadalafil(C) standards

进一步考察洗脱液类型对洗脱效果的影响，分别用 5 mL 甲醇、乙腈、甲醇-乙腈混合液（1+1，体积比）进行洗脱，结果表明，甲醇-乙腈混合液的洗脱效果最好，回收率最高。

择 HLB 柱作为样品净化柱。

### 2.4 线性范围与检出限

采用空白基质溶液作为稀释液配制系列标准工作溶液的方法消除基质效应的影响。伐地那非、西地那非、他达那非标准溶液在 10~200  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内均呈良好线性关系, 相关系数 ( $r^2$ ) 分别为 0.998、0.995、0.998。以不含目标物的胶囊、口服液类保健品作为本底, 采用加标的方式考察方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。结果表明, 胶囊样品中伐地那非、西地那非、他达那非的检出限 ( $S/N \geq 3$ ) 分别为 10  $\mu\text{g/kg}$ 、10  $\mu\text{g/kg}$ 、20  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限 ( $S/N \geq 10$ ) 分别为 40  $\mu\text{g/kg}$ 、40  $\mu\text{g/kg}$ 、80  $\mu\text{g/kg}$ 。口服液类样品中伐地那非、西地那非、他达那非的检出限分别为 3  $\mu\text{g/L}$ 、3  $\mu\text{g/L}$ 、6  $\mu\text{g/L}$ , 定量限分别为 10  $\mu\text{g/L}$ 、10  $\mu\text{g/L}$ 、20  $\mu\text{g/L}$ 。

### 2.5 方法回收率与精密度

选择不含目标物的胶囊和口服液样品分别进行 3 个含量水平的加标回收试验。胶囊样品分别添加 250、500、1000  $\mu\text{g/kg}$ , 口服液分别添加 20、50、100  $\mu\text{g/L}$ , 按照本研究方法进行测定, 每个水平单独测定 6 次, 平均回收率及相对标准偏差列于表 4。由表 4 可知, 伐地那非、西地那非、他达那非的平均回收率均大于 75%, 相对标准偏差小于 8%, 具有较好的准确度和精密度。空白样品加标 (50  $\mu\text{g/L}$ ) 的提取离子色谱图, 见图 2。

表 3 HLB 和 Strata-X SPE 柱净化的基质效应

Table 3 Results of matrix effects using HLB and Strata-X SPE

分析物	基质效应 (ME, %)	
	HLB	Strata-X
伐地那非	61.51	13.41
西地那非	63.72	48.01
他达那非	82.82	52.12

表 4 回收率和精密度测定结果 (n=6)

Table 4 Recovery and precision results (n=6)

样品	分析物	加标量	回收率/%	相对标准偏差/%
胶囊	伐地那非	250,500,1000 ( $\mu\text{g/kg}$ )	80.21,83.50,87.41	7.01,6.11,5.10
	西地那非		90.21,101.10,102.21	6.30,4.82,4.71
	他达那非		76.11,82.50,86.31	6.20,5.51,4.82
口服液	伐地那非	20,50,100 ( $\mu\text{g/L}$ )	80.22,87.51,91.20	6.01,5.32,4.31
	西地那非		95.81,104.51,108.90	5.21,4.22,3.80
	他达那非		78.82,85.10,89.51	5.81,4.50,4.12

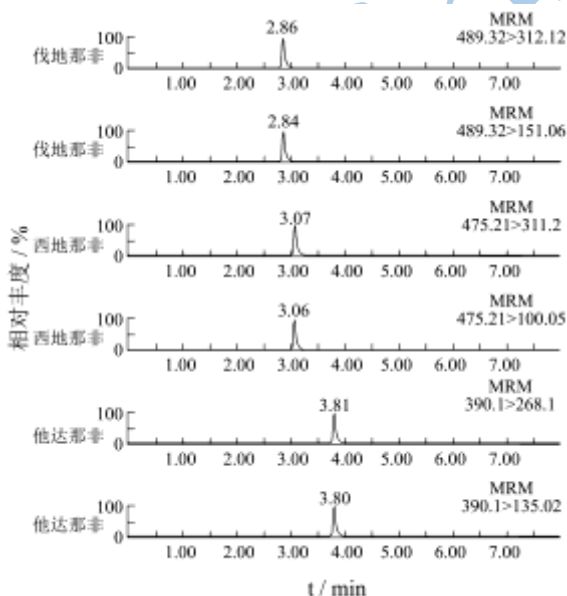


图 2 空白样品加标 50  $\mu\text{g/L}$  提取离子色谱图

Fig.2 Extracted ion chromatograms of spiked (50  $\mu\text{g/L}$ ) blank sample

### 2.6 实际样品检测

从市场购买胶囊、口服液类保健品共 10 种, 在优化条件下进行检测, 同时作质控样品。结果表明, 在上述样品中均为未检出伐地那非、西地那非、他达那非, 质控样品的回收率等指标均达到分析要求, 表明结果准确可靠。

## 3 结论

建立了固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱/质谱法测定保健品中伐地那非、西地那非、他达那非。通过不同固相萃取柱的净化效果比较发现 HLB 固相萃取柱净化效果最好, 回收率最高。伐地那非、西地那非、他达那非的准确定量受基质效应影响很大, 采用空白基质补偿法配制标准曲线能够消除基质效应影响, 提高定量的准确度。结果表明, 该方法前处理简单、回收率高、重复性好、定性定量准确可靠, 方法的各项技术指标均能满足日常检测要求。

## 参考文献

- [1] Tamiris A. Julio, Igor F. Zamara, Jerusa S. Garcia, et al. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC-UV [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2013, 111: 2037-2044
- [2] 蔡增轩,李刚,任一平.高效液相色谱法检测保健食品中的违禁药物[J].*中国食品卫生杂志*,2007,19(1):36-40  
CAI Zeng-xuan, LI Gang, REN Yi-ping. Determination of illegal medicines in health foods by high performance liquid chromatography [J]. *Chinses Journal of Food Hygiene*, 2007, 19(1): 36-40
- [3] 张朝辉,康绍英,许敏洁,等.液-液-液微萃取/高效液相色谱法测定人血浆中的西地那非和伐地那非 [J]. *色谱*,2005,23(4):358-361  
ZHANG Chao-hui, KANG Shao-ying, XU Min-jie, et al. Determination of sildenafil and vardenafil in human plasma by high performance liquid chromatography coupled with liquid-liquid-liquid micro-extraction [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2005, 23(4): 358-361
- [4] 李润镓,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(4):335-337  
LI Run-kai, BO Tao, LIU Wei-hu, et al. Determination of sildenafil in medicines for erectile dysfunction by capillary electrophoresis [J].*Chinese Journal of Chromatography*, 2002, 20(4): 335-337
- [5] Koutaro Hasegawa, Osamu Suzuki, Kunio Gonmori, et al. Simultaneous analysis of sildenafil, vardenafil, tadalafil, and their desalkyl metabolites in human whole blood and urine by isotope dilution LC-MS-MS [J]. *Forensic Toxicol*, 2012, 30: 25-32
- [6] Paweł D zygiel, Daniela Fraier. Simultaneous determination of pregabalin, sildenafil and its active metabolite in rat plasma utilising SPE followed by LC-MS-MS [J]. *Chromatographia*, 2011, 73: 1177-1182
- [7] Sooyeon Lee, So-young Kang, Dajeong Ji, et al. Quantitative LC-MS/MS method in urine for the detection of drugs used to reverse the effects of chemical castration [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405: 3185-3194
- [8] Yang Li, Jiangtao Hu, Ying Shi, et al. Simultaneous determination of seven adulterants in slimming functional foods by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Food Anal. Methods*, 2011, 4: 505-516
- [9] Joo Hyun Lee, Ju-Hee Oh, Young-Joo Lee. Simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for quantification of tadalafil in rat plasma: application to pharmacokinetic study in rats [J]. *Arch. Pharm. Res.*, 2013, 36: 457-463
- [10] 叶兰凤,叶晓娟,陈丽湘.高效液相色谱-串联质谱法测定保健食品中西地那非、他达拉非和伐地那非[J].*海峡药学*,2013,25(12):123-125  
YE Lan-feng, YE Xiao-juan, CHEN Li-xiang. Determination of sildenafil, tadalafil and vardenafil in health food by LC-MS/MS [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2013, 25(12): 123-125
- [11] 来国防,程宾,王梅.补肾壮阳类中药制剂中非法添加化学药物成分的检测[J].*中国药业*,2010,19(22):32-33  
LAI Guo-fang, CHENG Bin, WANG Mei. Determination of chemical components illegally added in traditional Chinese medicines for invigorating kidney and strengthening Yang [J]. *China Pharmaceuticals*, 2010, 19(22): 32-33
- [12] 肖丽和,郭晓鸥,高咏莉,等.液相色谱-质谱联用法检测壮阳制剂中非法掺入的伐地那非[J].*中国药业*, 2009, 18(23): 22-23  
XIAO Li-he, WU Xiao-ou, GAO Yong-li, et al. Detection of Pseudo-Vardenafil illegally added into anti-impotence preparations by LC-MS [J]. *China Pharmaceutical*, 2009, 18(23): 22-23
- [13] SN/T 1951-2007.进出口保健食品中伐地那非、西地那非、他达拉非的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S].中华人民共和国国家标准  
SN/T 1951-2007. Determination of vardenafil, sildenafil and tadalafil in health foods for import and export-LC-MS/MS method [S]. National Standards of the People's Republic of China
- [14] DHARMENDRA PATEL. Matrix effect in a view of lc-ms/ms: an overview [J]. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2011, 1(1): 559-564