

UPLC-MS/MS 法测定抗疲劳类保健食品中非法添加的 9 种壮阳类化学药物

蒋丽萍¹, 屠婕红², 徐宏祥¹, 傅应华^{2*}

1. 嘉兴市食品药品检验检测院, 浙江 嘉兴 314050

2. 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001

摘要: **目的** 建立一种用于快速准确检测抗疲劳类保健食品中非法添加 9 种壮阳类化学药物(甲磺酸酚妥拉明、甲睾酮、司坦唑醇、达那唑、他达拉非、枸橼酸西地那非、爱地那非、伐地那非、硫代艾地那非)的方法。**方法** 采用 UPLC-MS/MS 法, 以 Waters Acquity BEH-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)为色谱柱, 以 0.1%甲酸甲醇溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱: 0~5 min, 50% A; 5~7 min, 50%~90% A; 7~9 min, 90%~100% A; 9~10 min, 100%~50% A; 体积流量 0.2 mL/min, 进样量 5 μL, 柱温 40 ℃。选择 ESI 离子源、正离子扫描、多反应监测(MRM)模式测定 9 种临床常用的化学药物, 通过比较 MRM 通道中样品峰与对照品峰的分子离子峰、二级碎片离子峰、色谱保留时间等信息确定添加的化学药物, 并根据外标法以质谱峰面积计算添加药物的准确含量。**结果** 在相应色谱及质谱条件下, 9 种化学药物甲磺酸酚妥拉明、甲睾酮、司坦唑醇、达那唑、他达拉非、枸橼酸西地那非、爱地那非、伐地那非、硫代艾地那非的分离度良好, 方法检测限(LOD)均在 0.1~0.3 ng/g, 定量限(LOQ)均在 0.3~0.9 ng/g, 标准加样回收率均在 88.4%~116.3%。68 批抗疲劳类保健食品中检出 41 批添加了化学药, 阳性率为 60.3%; 样品中检出了枸橼酸西地那非、他达拉非、爱地那非、硫代艾地那非。**结论** 本法简便、准确, 灵敏度高, 可作为抗疲劳类保健食品中非法添加化学药物的定性定量检测方法。

关键词: UPLC-MS/MS; 化学药物; 保健食品; 非法添加; 甲磺酸酚妥拉明; 甲睾酮; 司坦唑醇; 达那唑; 他达拉非; 枸橼酸西地那非; 爱地那非; 伐地那非; 硫代艾地那非

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)15-2238-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.15.011

Determination of nine chemicals illegally added into antifatigue health foods by UPLC-MS/MS

JIANG Li-ping¹, TU Jie-hong², XU Hong-xiang¹, FU Ying-hua²

1. Jiaxing Institute for Food and Drug Control, Jiaxing 314050, China

2. Medical College of Jiaxing University, Jiaxing 314001, China

Abstract: Objective To establish an accurate method for the determination of nine chemical drugs (phentolamine mesylate, methyltestosterone, stanozolol, danazol, tadalafil, sildenafil citrate, aildenafil, vardenafil, and thioaildenafil) which were illegally added into the antifatigue health foods. **Methods** The UPLC-MS/MS method was adopted. The samples were extracted with methanol by ultrasonic processing and separated on a Waters Acquity BEH-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column with 0.1% formic acid methanol (A) and 0.1% formic acid water (B) as the mobile phase by gradient elution (0—5 min, 50% A; 5—7 min, 50%—90% A; 7—9 min, 90%—100% A; 9—10 min, 100%—50% A) at a flow rate of 0.2 mL/min. The injection volume was 5 μL. The column temperature was 40 ℃. The positive-ion (ESI⁺) source and MRM mode were used to separate and quantitatively determine the chemicals. The obtained molecular ions, fragment ions, and retention time for MRM channels were used to identify the nine kinds of drugs by comparing with those of reference substances. The obtained peak areas were used to determine the accurate content of the nine chemicals in the antifatigue health foods. **Results** A good resolution of the nine kinds of chemical drugs, including phentolamine mesylate, methyltestosterone, stanozolol, danazol, tadalafil, sildenafil citrate, aildenafil, vardenafil, and thioaildenafil, was obtained under this UPLC and MS/MS conditions. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were in the ranges of 0.1—0.3 ng/g

收稿日期: 2015-03-12

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划资助项目(2013C37103); “十二五”浙江省高校重点学科(药理学)资助项目

作者简介: 蒋丽萍(1981—), 女, 主管药师, 研究方向为药物分析。Tel: (0573)83388083 E-mail: 632865175@qq.com

*通信作者 傅应华, 教授, 研究方向为药物制剂与质量控制。Tel: (0573)83643848 E-mail: yaoji6217@sohu.com

and 0.3—0.9 ng/g. The standard addition recoveries were in the range of 88.4%—116.3%. There were 68 batches of antifatigue health foods, among which 41 batches were added with the chemicals with positive rate of 60.3%. The sildenafil citrate, tadalafil, aildenafil, and hioaildenafil were detected in samples. **Conclusion** The method is simple, accurate, and has high sensitivity, which can be used for the qualitative and quantitative determination of illegally added chemical drugs in the antifatigue health foods.

Key words: UPLC-MS/MS; chemical drugs; health foods; illegally added; phentolamine mesylate; methyltestosterone; stanozolol; danazol; tadalafil; sildenafil citrate; aildenafil; vardenafil; thioaildenafil

近年来,人们对自身的保健越来越重视,市场上标示各种功能的保健食品鱼龙混杂,不法分子公然制假售假,为了使原本不具有治疗作用的保健品达到某一种疗效,在保健食品中添加各种化学药物,欺骗消费者,以获取高额利润^[1]。在标示具有抗疲劳功能的保健食品中常添加的壮阳类化学药物有 2 大类,一类是环磷酸鸟苷(cGMP)特异性磷酸二酯酶 5(PDE5)型抑制剂,它是一种治疗男性功能障碍(ED)的药物,代表性药物主要有枸橼酸西地那非(品牌名:万艾可,俗称伟哥)、他达拉非(品牌名:西力士 cialis)、伐地那非(品牌名:艾力达)、爱地那非、硫代艾地那非等;另一类是蛋白同化制剂,是合成代谢类药物,具有促进蛋白质合成和减少氨基酸分解的特征,可促进肌肉增生,提高动作力度和增强男性的性特征,代表性药物主要有甲睾酮、司坦唑醇、达那唑等。在保健食品中非法添加化学药物随意性大,剂量不准确,标签上又未作说明,往往导致消费者长期、超量服用引起毒性反应,严重甚至危及生命。

国家食品药品监督管理局曾颁布了一个针对补肾壮阳类中成药中非法添加西药的《药品检验补充方法和检验项目批准件》(批准件编号 2009030),适用于补肾壮阳类中成药及抗疲劳类、免疫调节类保健食品中测定非法添加那红地那非等 11 种 PDE5 型抑制剂及其衍生物,初筛方法包括传统的物理化学鉴别和 TLC 定性鉴别;确证方法包括 HPLC 的初步确证和液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术的最终确证^[2-4]。随着仪器的快速更新和发展,需要不断研究并建立一种高灵敏度、高准确度、高通量和低成本检测非法添加壮阳类化学药物的方法。

目前对抗疲劳类保健食品中非法添加化学药物的检测方法主要是 HPLC 法^[5-6]和液质联用法^[7-14]。本实验收集了临床上最常用的 9 种壮阳类化学药物,采用 UPLC-MS/MS 方法,建立了以多离子反应监测(MRM)模式定性定量测定抗疲劳类保健食品中非法添加化学药物的方法,该方法将非标检测中的初筛与确证方法结合起来,可大大提高初筛的

广泛性和确证的准确性,并可同时进行添加物的定性和定量,一次进样可在 10 min 内同时准确检测出胶囊剂、片剂、丸剂等 3 种剂型中添加的 9 种壮阳类化学药物,为进一步规范保健食品市场提供强大的技术支撑。

1 仪器与材料

Acquity UPLC 型超高效液相色谱仪、Quattro Premiere XE 型三重四极杆串联质谱仪、电喷雾离子化源(ESI)、MassLynx 数据处理系统,美国 Waters 公司;XS105DU 型电子天平,梅特-托利多有限公司;USC-502 型超声波清洗器,上海波龙电子有限公司;Mili-Q 超纯水器,美国密理博公司。

甲磺酸酚妥拉明(批号 100110-200602,质量分数 99.9%)、甲睾酮(批号 100172-200503,质量分数>99.0%)、司坦唑醇(批号 100209-200602,质量分数>99.0%)、达那唑(批号 100126-200402,质量分数>99.0%)、他达拉非(批号 20120901,质量分数>99.0%)以上对照品均购自中国食品药品检定研究院;枸橼酸西地那非(批号 1305-007A1,质量分数>99.0%)与硫代艾地那非(批号 1214-006A3,质量分数>99.0%)均购自加拿大 TLC 公司;爱地那非(批号 s0269c,质量分数>99.0%)与伐地那非(批号 s0270c,质量分数>99.0%)均购自美国 Sigma 公司。以上对照品均为供定量测定用。试剂甲醇(德国 Merck 公司)、甲酸(美国 Tedia 公司)均为色谱纯,其余试剂均为国产分析纯,水为超纯水。

实测样品主要来自嘉兴市、县食品药品监督管理局及公安机关抽检的办案样品。

2 方法与结果

2.1 UPLC 色谱条件

Waters BEH-C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)为色谱柱;以 0.1%甲酸甲醇溶液为流动相 A,以 0.1%甲酸水溶液为流动相 B,梯度洗脱程序:0~5 min, 50% A;5~7 min, 50%~90% A;7~9 min, 90%~100% A;9~10 min, 100%~50% A。体积流量 0.2 mL/min;进样量 5 μL;柱温为 40 ℃。

2.2 MS/MS 条件

电喷雾离子化 (ESI) 正离子模式检测; 毛细管电压 3.0 kV; 二级锥孔电压 (extractor) 3 V; 六级杆透镜电压 (RF Len): 0 V; 离子源温度 110 °C; 脱溶剂气温度 (desolvation temp) 350 °C; 脱溶剂

气流量 600 L/h; 锥孔反吹气流量 50 L/h; 碰撞气流 0.18 mL/min; 碰撞室压力为 0.319 Pa; 选择 MRM 采集碎片离子信号。各物质的色谱保留时间、准分子离子质量数、定性定量离子碎片质量数及其采集参数见表 1。

表 1 9 种壮阳类化学药物的质谱采集参数

Table 1 LC-MS/MS parameters for nine kinds of antifatigue chemicals

t_R /min	药品成分	电离模式	母离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	定性离子 (m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
2.18	甲磺酸酚妥拉明	ESI ⁺	282.2	211.9	90.5	30	20, 40
2.63	伐地那非	ESI ⁺	489.3	151.0	312.2	55	45, 38
2.88	枸橼酸西地那非	ESI ⁺	475.3	100.1	283.2	50	30, 40
3.09	爱地那非	ESI ⁺	489.4	282.9	312.2	50	40, 40
3.62	他达拉非	ESI ⁺	390.1	267.9	134.6	22	25 15
4.70	硫代艾地那非	ESI ⁺	505.2	98.7	299.0	50	36, 40
5.04	甲睾酮	ESI ⁺	303.2	96.5	108.5	35	25, 25
5.21	司坦唑醇	ESI ⁺	329.3	106.9	120.9	55	45, 38
5.72	达那唑	ESI ⁺	338.3	90.5	147.6	38	50, 25

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 精密称取上述 9 种对照品各 10 mg 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 用含 0.1% 甲酸的甲醇 6 mL 超声溶解, 放冷后加甲醇定容至 10 mL, 配制质量浓度均为 1 mg/mL 的贮备液, 置 4 °C 冷藏备用。取上述贮备液适量, 分别用初始流动相稀释成含甲磺酸酚妥拉明、甲睾酮、司坦唑醇、达那唑、爱地那非、硫代艾地那非质量浓度分别为 5、10、25、50、100、200、400 mg/mL; 他达拉非、枸橼酸西地那非、伐地那非质量浓度分别为 10、25、50、100、200、400 mg/mL 的混合对照品溶液。其中甲磺酸酚妥拉明与枸橼酸西地那非为与酸成盐的形态, 定量计算以甲磺酸或枸橼酸盐计。

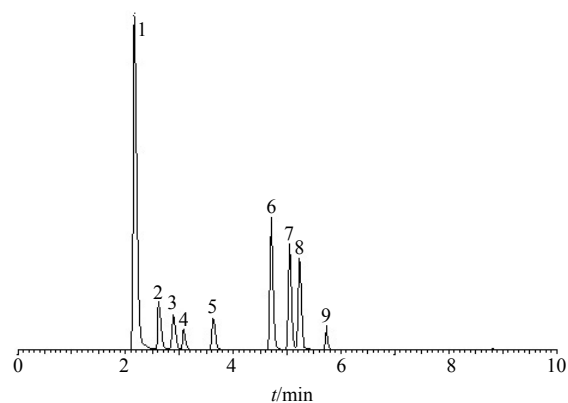
2.3.2 供试品溶液的制备 每个品种取 10 个胶囊样品的内容物, 混匀; 或取 10 片片剂及丸剂样品, 置研钵中碾磨均匀成粉末状。再分别精密称取 1 次服用量, 置 50 mL 量瓶中, 加 0.1% 甲酸的甲醇 30 mL, 超声溶解 20 min, 放冷至室温, 用同一溶剂稀释至刻度, 摇匀后初滤, 再经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品贮备液。精密量取贮备液适量, 用初始流动相逐步稀释至使待测物质量浓度与对照品溶液质量浓度相近的溶液, 作为供试品溶液。

2.3.3 阴性样品溶液 取具有代表性的胶囊剂 (海狗肾宝胶囊、康富来脑轻松胶囊)、片剂 (汤臣倍健

螺旋藻片、雄博牌玛咖片) 和丸剂 (源生堂牌海狗人参丸、三十六味帝皇丸) 3 种剂型阴性样品各 2 份, 按上述方法分别制成胶囊剂、片剂和丸剂的混合空白基质粉末, 分别精密称取 1.0 g, 置于 50 mL 量瓶中与供试品溶液同法制成 3 种剂型的阴性样品溶液。

2.4 9 种化学药物的色谱及质谱特性

在 MRM 模式下测定 9 种化学药物的定性和定量离子对色谱图, 共 18 个离子监测通道。各物质采集的总离子流图见图 1, MRM 定量离子对色谱图见



1-甲磺酸酚妥拉明 2-伐地那非 3-枸橼酸西地那非 4-爱地那非
5-他达拉非 6-硫代艾地那非 7-甲睾酮 8-司坦唑醇 9-达那唑
1-phenolamine mesylate 2-ardenafil 3-sildenafil citrate 4-aildenafil
5-tadalafil 6-thioaildenafil 7-methyltestosterone 8-stanozolol 9-danazol

图 1 9 种壮阳类化学药物的总离子流色谱图

Fig. 1 TIC of nine chemical drugs

图 2。从图 1 可看出,在给定的色谱质谱条件下,9 种壮阳类化学药物的总离子流分离良好。从图 2 可以看出,9 个 MRM 定量离子对通道内色谱峰峰形对称,通道之间互不干扰,定量准确度好。

为了保证定量分析的准确度,对质谱扫描条件

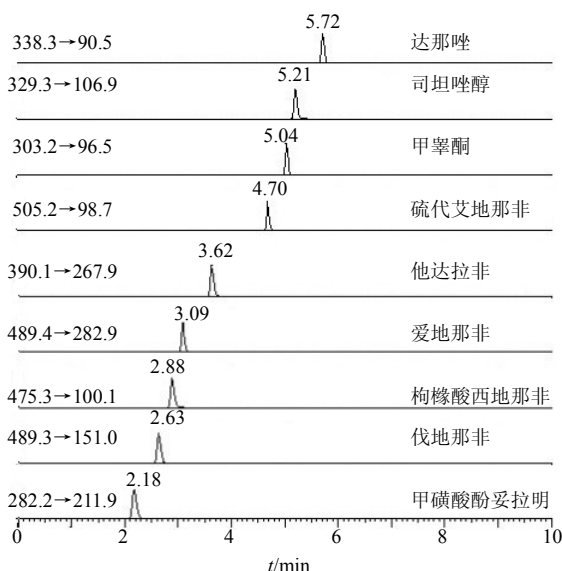


图 2 9 种化学药对照品定量离子对的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of quantitative ion pairs of reference substances of nine chemicals

进行了优化,满足质谱定量对色谱流出峰采集 15 个点以上的要求。

2.5 专属性考察

取“2.3.3”项下阴性样品溶液各 5 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样,按“2.2”项下质谱条件采集图谱,得到 3 种阴性样品溶液的 MRM 色谱图,18 个通道中均未见有干扰 9 种目标物成分的色谱峰。结果表明,上述 3 种剂型中所含的中药成分均不干扰目标物的测定,方法专属性好。

2.6 线性关系考察与检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 试验

取“2.3.1”项下混合对照品溶液,按“2.1”和“2.2”项下色谱、质谱条件进样测定,以各组分定量离子对的峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 绘制标准曲线,得回归方程和相关系数 (r),见表 2。结果表明,9 种化学药物在 5~400 ng/mL 或者 10~400 ng/mL 线性关系良好, r 均在 0.990 5~1.000。

取阴性样品 (海狗肾宝胶囊) 适量,置 50 mL 量瓶中,按 1.0 mg/g 的添加量加入混合对照品溶液,按“2.3.2”项下供试品溶液同法经逐步稀释后进样,以信噪比为 3 时计算各化学药的 LOD 和信噪比为 10 时计算各化学药的 LOQ,结果见表 2,结果表明

表 2 9 种壮阳类化学药的线性方程、相关系数、回收率及 LOD、LOQ

Table 2 Linear equation, r , linear range, recovery rates, LOD, and LOQ for nine kinds of antifatigue chemicals

药品	线性方程	r	线性范围/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率/%	LOD/ $(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$	LOQ/ $(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$
甲磺酸酚妥拉明	$Y=5\,319.8X+50\,808.2$	0.997 8	5~400	94.2~113.6	0.1	0.3
伐地那非	$Y=141.8X-243.4$	0.999 4	10~400	93.8~102.3	0.2	0.6
枸橼酸西地那非	$Y=679.4X+11\,922.5$	0.999 0	10~400	100.1~110.1	0.3	0.9
爱地那非	$Y=284.9X-7.55$	0.999 6	5~400	103.5~112.0	0.1	0.3
他达拉非	$Y=607.2X+326.7$	0.991 4	10~400	102.1~115.0	0.2	0.6
硫代艾地那非	$Y=1\,690.5X-1\,610.6$	1.000 0	5~400	91.2~105.2	0.3	0.9
甲睾酮	$Y=1\,537.3X+39\,346.4$	0.990 5	5~400	88.4~116.3	0.2	0.5
司坦唑醇	$Y=1\,032.9X+13\,960.1$	0.996 4	5~400	95.4~116.3	0.3	0.7
达那唑	$Y=539.8X+13\,309.7$	0.991 4	5~400	93.1~115.9	0.3	0.8

LOQ 均在 0.5 ng/g 以下,表明方法具有较高的灵敏度,完全能满足非法添加的检测要求。

2.7 进样精密度试验

取质量浓度均为 200 ng/mL 的混合对照品溶液 5 μL ,按“2.1”和“2.2”项下色谱、质谱条件进样测定,连续测定 6 次,计算甲磺酸酚妥拉明、伐地那非、枸橼酸西地那非、爱地那非、他达拉非、硫代艾地那非、甲睾酮、司坦唑醇、达那唑定量离子

对质谱峰面积的 RSD 分别为 2.3%、6.7%、2.8%、2.3%、7.2%、2.5%、3.2%、1.7%、4.6%,均在 1.7%~7.2%,表明方法的精密度良好。

2.8 重复性试验

精密称取未检出 9 种化学药的阴性胶囊剂样品 (海狗肾宝胶囊) 1 次服用量,共 6 份,分别精密加入对照品贮备液适量,使含各种化学药质量浓度均为 1.0 mg/g ,按“2.3.2”项下方法进行提取制成质

量浓度均为 200 ng/mL 的溶液, 作为供试品溶液, 按“2.1”和“2.2”项下色谱、质谱条件进样测定, 计算各成分的量及其 RSD。结果甲磺酸酚妥拉明、甲睾酮、司坦唑醇、达那唑、爱地那非、硫代艾地那非、他达拉非、枸橼酸西地那非、伐地那非的平均质量分数分别为 1.05、1.03、1.06、1.02、1.07、0.98、1.02、1.04、1.01 mg/g; RSD 分别为 3.8%、4.1%、2.9%、5.2%、3.3%、3.0%、6.2%、2.6%、5.8%, 表明该方法重复性较好。

2.9 溶液稳定性试验

取“2.8”项下供试品溶液, 在配制后避光放置 0、2、4、6、8、12 h, 依法测定。根据上述 9 种化学药的定量离子对色谱峰面积计算其 RSD 分别为 2.8%、5.6%、2.95%、3.2%、5.7%、2.4%、3.8%、1.6%、5.5%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验

精密称取不含 9 种化学药的阴性胶囊剂样品(海狗肾宝胶囊、金日牌美国洋参胶囊)、片剂样品(雄博牌玛咖片、汤臣倍健螺旋藻片)和丸剂样品(源生堂牌海狗人参丸)的混合样品各 9 份, 每份称取 0.5 g, 各分 3 组, 分别置于 100 mL 量瓶中, 同“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 分别进行 1.0、2.0、4.0 mg/g 3 个添加水平的回收率试验, 结果见表 2。结果表明, 9 种化学药的加样回收率中各质量浓度的

平均回收率均在 88.4%~116.3%, 符合测定要求。

2.11 精密度的试验

日内精密度和日间精密度均采用添加水平为 1.0 mg/g 的空白样品, 日内精密度由重复试验 6 次测定得到, 日间精密度连续 3 d 重复取样测定得到。结果, 日内精密度 RSD 控制在 2.1%~5.2%; 日间精密度 RSD 控制在 2.8%~6.9%, 表明方法精密度良好。

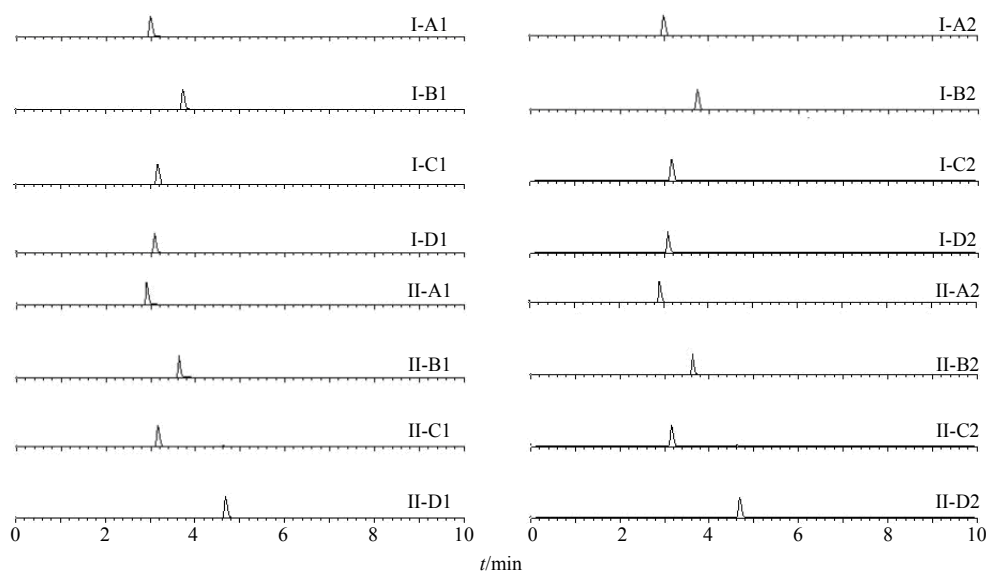
2.12 样品测定

本次研究共收集抗疲劳类保健食品 68 批次, 取各品种样品, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”和“2.2”项下色谱、质谱条件分别进样测定, 根据定量监测离子对的色谱峰面积, 采用外标法计算样品中各化学药的量。共检测抗疲劳类保健食品 68 批次(包括胶囊、片剂、丸剂等不同基质类型)。结果表明, 68 批抗疲劳类保健食品中检出 41 批添加了化学药, 阳性率为 60.3%, 典型样品的 MRM 色谱图见图 3。样品中检出了枸橼酸西地那非、他达拉非、爱地那非、硫代艾地那非。样品信息及检出成分见表 3。

3 讨论

3.1 色谱质谱条件优化

在 Waters Acquity UPLC BEH 的 C₈、C₁₈、T₃ 3 种色谱柱上, 采用 0.1% 甲酸甲醇溶液-0.1% 甲酸水



A1-475.3→100.1 A2-475.3→283.2 B1-390.1→267.9 B2-390.1→134.6 C1-489.4→282.9 C2-489.4→312.2 D1-505.2→98.7 D2-505.2→299.0

图3 对照品(I)及样品(II)溶液中枸橼酸西地那非(A)、他达拉非(B)、爱地那非(C)、硫代艾地那非(D)的MRM定量(1)、定性(2)离子对色谱图

Fig. 3 Ion pairs chromatograms of MRM quantitative (1) and qualitative (2) for sildenafil citrate (A), tadalafil (B), aildenafil (C), and thioaildenafil (D) in solution of reference substances (I) and samples (II)

表 3 样品信息及检出成分 (n = 3)

Table 3 Sample information and detected components (n = 3)

样品名称	规格	批准文号	批号或生产日期	标示生产厂家	检出药物量
雄博牌玛咖片	0.1 g	无	14062801	安徽福来生物医药有限公司	未检出
黄金海岸玛咖压片糖果	无	无	20140716	广东省阳春市信德科技发展有限公司	未检出
康雀玛咖片	0.5 g	无	C078/062/A13	cantrust life cience crop	未检出
三十六味帝皇丸	无	藏卫食健字 (2007) 第 068 号	2014-03-05	西藏康丽生物工程有限公司	未检出
金奥力牌辅酶 Q10 软胶囊	0.3 g	国食健字 G20110661	14062801	委托方: 威海紫光科技园有限公司; 受托方: 威海紫光生物科技开发有限公司	未检出
源生堂牌海狗人参丸	0.32 g	国食健字 G20040972	599001410	委托生产单位: 海南正康药业有限公司; 受托生产商: 荣成百合生物技术有限公司	未检出
斯特龙牌西洋参胶囊	500 mg	国食健字 G20100501	20140701	福建斯特龙生物药业有限公司	未检出
海狗肾宝胶囊	0.6 g	港商标注号: 1998/0795	无	美国 STRONG LIFE 国际集团有限公司授权香港宝福堂生物医药有限公司生产	未检出
铁皮石斛西洋参颗粒	3 g	国食健字 G20060770	KD001	香港康富来国际企业有限公司属下广东康富来药业有限公司	未检出
金日牌美国洋参胶囊	0.5 g	卫食健字[1997]第 535 号	20140803A	金日制药 (中国) 有限公司	未检出
汤臣倍健螺旋藻片	600 mg	国食健字 G20050108	20140407A	汤臣倍健股份有限公司	未检出
百合康牌蛋白粉	无	国食健字 G2011062	201446315	荣成百合生物技术有限公司	未检出
百合康牌苦瓜洋参软胶囊	0.5 g	国食健字 G20100623	541044307	荣成百合生物技术有限公司	未检出
康富来脑轻松胶囊	20 mg	卫食健字 (1998) 第 388 号	KD003	香港康富来国际企业有限公司属下广东康富来药业有限公司	未检出
二度春片	980 mg	港卫食准字 (2011) 第 028 号	2012-05-08	北京春运通科技发展有限公司	枸橼酸西地那非 130.0 mg/片
二度春软胶囊	0.5 g	卫食健字[2001]第 0284 号	2012-02-28	北京春运通科技发展有限公司	枸橼酸西地那非 128.9 mg/粒
肾白金精制软胶囊	800 mg	藏卫食准字 (2004) 第 26 号	2014-03-18	拉萨雪域保健品有限公司	枸橼酸西地那非 62.0 mg/粒
虫草肾肽胶囊	0.5 g	冀卫食字 (2007) 第 130403267001	2013-10-12	河北邯郸滏荣制药有限公司	枸橼酸西地那非 82.9 mg/粒
美国红牛王片	无	藏卫食字: 2003 第 026 号	2014-04-02	西藏拉萨市力龙生物制品公司	枸橼酸西地那非 226.1 mg/片
鹿茸肾宝胶囊	2 000 mg	无	2014-01-01	香港凯旋门生物有限公司	枸橼酸西地那非 134.7 mg/粒
鹿血片	980 mg	未标示	2014-01-16	西藏恒康生物工程有限公司	枸橼酸西地那非 148.5 mg/片
金功夫胶囊	4 800 mg	国食健字 G20060562	2014-03-16	香港天仕力生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 145.5 mg/粒
虫草王胶囊	580 mg	港卫食准字 (2008) 第 01017 号	2013-01-10	香港康力保健品有限公司	枸橼酸西地那非 98.4 mg/粒
速勃延时 999 胶囊	500 mg	无	2014-01-22	香港天龙生物科技 (国际) 集团公司	枸橼酸西地那非 48.2 mg/粒
虫草补肾王胶囊	990 mg	无	无	西藏天龙生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 82.4 mg/粒
德国黑蚂蚁生精片	2 000 mg	无	2013-06-05	香港天龙生物科技 (国际) 集团公司	枸橼酸西地那非 260.1 mg/片
万爱可胶囊	2 800 mg	食健字 (2004) 第 0468 号	2014-01-08	杜邦香港生物有限公司	枸橼酸西地那非 248.5 mg/粒, 他达拉非 41.9 mg/粒
美国奥康复胶囊	无	无	2014-03-08	杜邦香港生物有限公司	枸橼酸西地那非 192.6 mg/粒
鹿茸肾宝胶囊	2 000 mg	无	2014-03-01	香港凯旋门生物有限公司	枸橼酸西地那非 48.9 mg/粒
金牌伟哥胶囊	800 mg	无	2014-08-16	中国西藏宏泰生物保健品有限公司	枸橼酸西地那非 221.3 mg/粒
极品袋鼠精胶囊	880 mg	无	2014-02-03	香港新马生物科技 (国际) 集团公司	枸橼酸西地那非 148.1 mg/粒
金虎鞭片	584 mg	粤卫特食准字 (2010) 第 01009 号	无	广州梦之美生物保健有限公司	枸橼酸西地那非 134.7 mg/片
男根宝胶囊	450 mg	藏卫食准字 (2005) 第 0018 号	2012-07-01	西藏威龙生物工程有限公司	枸橼酸西地那非 96.4 mg/粒
极品海狗胶囊	300 mg	港卫食进字 (2008) 第 0178	2013-08-01	香港威信生物技术公司	枸橼酸西地那非 235.8 mg/粒, 他达拉非 20.6 mg/粒

续表 3

样品名称	规格	批准文号	批号或生产日期	标示生产厂家	检出药物量
极品海狗胶囊	300 mg	港卫食进字(2008)第0178号	20130102	香港威信生物技术公司	枸橼酸西地那非 302.0 mg/粒, 他达拉非 29.8 mg/粒
德国黑蚂蚁生精片	250 mg	无	2013-02-18	香港天龙生物科技(国际)集团公司	枸橼酸西地那非 142.5 mg/片
艾力达胶囊	200 mg	无	无	中美合资威尔康制药有限公司	枸橼酸西地那非 176.5 mg/粒
金枪不倒胶囊	980 mg	藏卫食准字(2009)第015号	2014-02-15	西藏顺昌保健品有限公司	枸橼酸西地那非 139.4 mg/粒
Vigour800片	800 mg	无	03R012A	美国辉瑞生物研究所	枸橼酸西地那非 107.3 mg/片
神力源酒	500 mL	无	2012-09-24	烟台鑫达酒业有限责任公司	枸橼酸西地那非 0.4 mg/mL, 爱地那非 0.3 mg/mL
剑圣养生酒	250 mL	无	2012-07-13	西藏剑圣生物制药制品开发有限公司授权 四川省东圣酒业股份有限公司生产	硫代爱地那非 0.3 mg/mL, 爱地那非 0.1 mg/mL
海狗肾宝丸	无	无	2012-02-18	贵州鸿康生物技术有限公司	枸橼酸西地那非 0.5 mg/g, 他达拉非 0.04 mg/g
金秋葵牌黄秋葵咀嚼片	500 mg	无	140501	湖北汇丰医药科技有限公司	未检出
极品海狗胶囊	300 mg	港卫食进字(2008)第0178号	20130801	香港威信生物技术公司	枸橼酸西地那非 203.1 mg/粒, 他达拉非 15.0 mg/粒
速效金伟哥胶囊	250 mg	港卫食准字(2011)第038号	2012-10-15	香港人和堂生物有限公司	枸橼酸西地那非 84.6 mg/粒
蚁力神胶囊	250 mg	无	2013-03-01	美国蚁力神生物工程经贸公司	枸橼酸西地那非 172.9 mg/粒
强肾海狗胶囊	无	无	2012-07-09	香港和生源生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 135.1 mg/粒
强肾海狗胶囊	无	无	2013-02-20	香港和生源生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 145.1 mg/粒
强力肾雄康泰胶囊	400 mg	无	20140722	成都市博康生物药业有限公司	枸橼酸西地那非 119.6 mg/粒
脑白金胶囊、口服液	0.25 g、250 mL	卫食健字(1997)第723号	140714	无锡健特药业有限公司	未检出
绿色经典螺旋藻片	0.25 g	国食健字 G20060434	501021306	委托生产商: 西哥玛(福建)生物科技有限公司 受托生产商: 荣成百合生物技术有限公司	未检出
乳尔牌牛初乳冻干粉胶囊	100 mg	国食健字 G20050723	20140101	委托企业: 哈尔滨康普乳品有限公司; 受托企 业: 黑龙江康普生物科技有限公司	未检出
威士雅虫草菌丝体胶囊	300 mg	卫食健字(1998)第478号	20140615	广东威士雅保健品有限公司	未检出
虫草藏鞭宝胶囊	250 mg	藏卫食准字(2009)第065号	20130402	西藏力龙生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 129.8 mg/粒
蚁力神生精胶囊	6 800 mg	无	2013-01-02	香港瑞达生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 94.4 mg/粒
速硬100持久胶囊	9 800 mg	港卫食准字(2009)第156号	2013-01-09	香港起龙生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 62.7 mg/粒
虫草养生酒	500 mL	卫食健字[1998]第272号	2014-03-01	出品企业: 海口天方天然保健品有限公司; 受委托 生产企业: 三九企业集团兰考葡萄酒业有限公司	未检出
硬到底胶囊	6 800 mg	国食健字 G20070012	2013-07-18	香港金康国际生物药业科技有限公司	枸橼酸西地那非 103.4 mg/粒
威士雅牌氨基酸胶囊	0.4 g	卫食健字(2002)第0594号	20140515	广东威士雅保健品有限公司	未检出
森山铁皮枫斗	0.4 g	卫食健字[2002]第0082号	20140701	浙江森宇药业有限公司	未检出
虫草藏鞭宝胶囊	990 mg	藏卫食准字(2009)第065号	20130402	西藏力龙生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 129.8 mg/粒
鸿春酒	38%	无	2014-12-08	江苏鸿春酒业有限公司	硫代爱地那非 0.5 mg/mL, 爱地那非 0.2 mg/mL
斯特龙牌西洋参胶囊	500 mg	国食健字 G20100501	20140701	福建斯特龙生物药业有限公司	未检出
玛咖片(玛咖粉压片糖果)	0.5 g	无	20140504	广州市雅博生物科技有限公司	未检出
雪域藏宝胶囊	9 900 mg	无	2014-06-10	西藏唐古拉巨龙生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 121.8 mg/粒
金伟VGA胶囊	3 000 mg	无	无	上海端姿生物科技有限公司	枸橼酸西地那非 143.2 mg/粒
维妥立螺旋藻咀嚼片	0.28 g	国食健字 G20120029	GJ130201101	广东仙乐制药有限公司	未检出
鹿鞭牡蛎复合片(压片糖果)	715 mg	SB/T103472008	2014-04-27	东营信康生物科技有限公司	未检出

溶液、甲醇溶液-10 mmol/L 乙酸铵溶液、0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液、乙腈溶液-10 mmol/L 乙酸铵溶液等4个流动相体系,分别考察了对9种壮阳类化学药物的色谱分离效果和质谱响应的因素。试验结果表明, C_{18} 柱显著优于 C_8 与 T_3 柱;甲醇比乙腈更有利于各组分之间的分离,添加甲酸可提高质谱的响应值和各组分的分离度,结果以0.1%甲酸甲醇溶液-0.1%甲酸水溶液的流动相体系为佳。在有机相与水相中均添加甲酸为佳,添加量均以0.1%为宜,可保证9种壮阳类化学药物具有最佳的色谱分离度和最高的质谱响应值。对梯度洗脱程序进行了优化,分3个时间段使有机相从初始的50%变为100%,保证各组分得到良好的分离。

3.2 测定模式选择

上述9种药物的分子结构中均含有N基团,采用ESI电离,在正离子模式下,通过对一级锥孔电压的调谐,可获得各组分最佳的 $[M+H]^+$ 分子离子峰响应值。再分别对二级质谱碰撞室能量的调谐优化,选择丰度比最大且稳定的2个碎片离子,构成一组定性和定量离子对。采用MRM测定,具有极高的灵敏度和选择性。而且MRM具有再次分离功能,对色谱不能完全分离的2个色谱峰,在MRM下可以达到完全分离,通道之间不干扰,定量结果准确,可满足具有较复杂基质的中成药及保健品的快速检测。

3.3 加样回收率结果分析

本法采用胶囊剂、片剂、丸剂3种剂型阴性样品加标进行回收率试验以考察方法准确性。考虑到不同剂型的基质对本底以及回收率可能造成不同的影响,选取具有代表性的未检出上述9种化学药的保健品配制混合空白基质,分别制成胶囊剂、片剂、丸剂3种剂型的空白基质,分别进行加样回收率试验。结果表明,胶囊剂、片剂、丸剂3种剂型的加样回收率没有明显差别,各成分回收率均在80%~120%,表明方法准确性好。

3.4 小结

选择9种壮阳类药物作为目标物,采用UPLC-MS/MS多离子反应监测模式建立了一个操作简便、适用范围广、灵敏度高、准确、快速的高通量检测平台。一次进样即可获得18个通道采集的质谱信息,方法将快速初筛和准确定量统一结合,提高了

抗疲劳类保健食品中非法添加物检测工作的效率。该方法不仅适用于胶囊剂、片剂、丸剂样品中9种壮阳类化学药物的准确检测,也适用于其他剂型保健食品和中成药样品的快速初筛。

参考文献

- [1] 符江,荆文光,章军,等. 中药中非法添加问题研究现状与分析[J]. 中草药, 2014, 45(3): 437-442.
- [2] 丁宝月,屠婕红,薛磊冰,等. UPLC-MS/MS法快速测定降压类中成药及保健食品中非法添加34种化学药的研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 688-696.
- [3] 黄宝斌,许明哲,杨青云,等. 中成药和中药材添加化学物质补充检验方法分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1701-1708.
- [4] 朱健,裘一婧,沈国芳. UPLC-MS/MS法快速检测减肥类保健品中13种非法添加化学成分[J]. 中草药, 2014, 45(4): 509-515.
- [5] 邓鲲鹏,罗卓雅,雷毅. 补肾壮阳类健康产品中艾地那非的检测方法研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(18): 1441-1444.
- [6] 戚亮,崔琳. HPLC法测定枸橼酸西地那非的含量[J]. 黑龙江医药, 2013, 26(5): 755-757.
- [7] 邢俊波,曹红,张炯,等. 高效液相色谱法同时测定补肾壮阳类中成药及保健食品中非法添加7种化药成分[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 451-453.
- [8] 曲晓宇,董雷,张四喜,等. HPLC-MS/MS法同时检测抗疲劳药物及保健品中非法添加的7种壮阳类化学药物[J]. 中国药房, 2013, 24(33): 3129-3130.
- [9] 刘畅,夏晶,胡青,等. LC/MSⁿ法检测补肾壮阳类中成药和保健食品中非法添加5种性功能类化学[J]. 中成药, 2009, 31(9): 1371-1374.
- [10] 高咏莉,郭晓鸥,肖丽和,等. HPLC-MS/MS法测定补肾壮阳类药品或保健品中非法添加羟基豪莫西地那非的研究[J]. 中成药, 2009, 31(7): 1058-1061.
- [11] 陈安珍,王尊文,杨钊,等. UPLC-MS/MS检测补肾壮阳类中成药及保健品中非法添加的化学药[J]. 中成药, 2009, 31(11): 1712-1714.
- [12] 刘莉,周世玉,程龙琼. 补肾壮阳类中成药中西地那非等的快速检测[J]. 医药导报, 2012, 4(31): 507-509.
- [13] 于泓,胡青,张延,等. 补肾壮阳类中药及保健食品中31种5型磷酸二酯酶抑制剂的高分辨四级杆飞行时间质谱定性定量检测方法[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(15): 1312-1318.
- [14] 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.