

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

曲晓宇*,董雷,张四喜,陶婵娜,张欣(吉林大学第一医院药剂科,长春 130021)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3129-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.20

摘要 目的:建立检测抗疲劳药物及保健品中非法添加的7种壮阳类化学药物的方法。方法:采用高效液相色谱-质谱串联(HPLC-MS/MS)法。色谱柱:Acclaim 120 C₁₈,流动相:甲醇-0.01 mol/L醋酸铵溶液(35:65, V/V),流速:0.2 ml/min,选择正离子多反应监测扫描方式检测,离子通道分别为质荷比(*m/z*)475.2→100.1(枸橼酸西地那非)、*m/z* 489.5→151.1(伐地那非)、*m/z* 467.4→111.1(红地那非)、*m/z* 453.0→112.9(那红地那非)、*m/z* 489.6→283.3(豪莫西地那非)、*m/z* 505.4→487.3(羟基豪莫西地那非)、*m/z* 355.3→144.1(育亨宾)。结果:枸橼酸西地那非、伐地那非、红地那非、那红地那非、豪莫西地那非、羟基豪莫西地那非与育亨宾的检测质量浓度的线性范围分别为2.0~200.0(*r*=0.999 2)、0.5~100.0(*r*=0.999 6)、1.0~100.0(*r*=0.999 5)、1.0~100.0(*r*=0.999 9)、2.0~200.0(*r*=0.999 9)、0.5~100.0(*r*=0.999 6)、1.0~100.0 ng/ml(*r*=0.999 2),检测限分别为2.0、0.5、1.0、1.0、2.0、0.5、1.0 ng/ml,平均回收率分别为98.1%、99.0%、97.8%、100.3%、99.6%、98.4%、97.5%,RSD均<4%(*n*=6)。结论:本方法能够快速、准确地检测出抗疲劳药物及保健品中非法添加的7种壮阳类化学药物。

关键词 高效液相色谱-质谱串联法;壮阳类化学药物;非法添加;抗疲劳药物;保健品

Simultaneous Detection of 7 Illegal Added Anti-impotence Medicines in Anti-fatigue Preparations and Health Care Products by HPLC-MS/MS

QU Xiao-yu, DONG Lei, ZHANG Si-xi, TAO Li-na, ZHANG Xin (Dept. of Pharmacy, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of 7 illegal added anti-impotence medicines in anti-fatigue preparations and health care products. METHODS: HPLC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on Acclaim 120 C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.01 mol/L ammonium acetate (35:65, V/V) at the flow rate of 0.2 ml/min. The mass transition pairs of *m/z* 475.2→100.1 (sildenafil citrate), *m/z* 489.5→151.1 (varidenafil), *m/z* 467.4→111.1 (hongdenafil), *m/z* 453.0→112.9 (nor-acetylsildenafil), *m/z* 489.6→283.3 (homosildenafil), *m/z* 505.4→487.3 (hydroxyhomosildenafil), *m/z* 355.3→144.1 (yuhimbine) were used to detect the 7 kinds anti-impotence preparations under positive ion multiple reaction monitoring mode. RESULTS: The linear ranges were 2.0-200.0 ng/ml for sildenafil citrate (*r*=0.999 2), 0.5-100.0 ng/ml for varidenafil (*r*=0.999 6), 1.0-100.0 ng/ml for hongdenafil (*r*=0.999 5), 1.0-100.0 ng/ml for nor-acetylsildenafil (*r*=0.999 9), 2.0-200.0 ng/ml for homosildenafil (*r*=0.999 9), 0.5-100.0 ng/ml for hydroxyhomosildenafil (*r*=0.999 6) and 1.0-100.0 ng/ml for yuhimbine (*r*=0.999 2). The lowest limits of detection were 2.0 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1.0 ng/ml, 1.0 ng/ml, 2.0 ng/ml, 0.5 ng/ml and 1.0 ng/ml, respectively. Average recoveries were 98.1%, 99.0%, 97.8%, 100.3%, 99.6%, 98.4% and 97.5% (RSD<4%, *n*=6). CONCLUSIONS: The method is quick and accurate for the determination of 7 illegal added anti-impotence medicines in anti-fatigue preparations and health care products.

KEY WORDS HPLC-MS/MS; Anti-impotence medicines; Illegal adding; Anti-fatigue preparations; Health care products

近年来抗疲劳类药物及保健品日益流行,但在该类保健品中非法添加壮阳类化学药物的现象愈加严重,尤以大量添加治疗临床勃起功能障碍(ED)的化学药物最为普遍。在不知情的情况下服用存在这些非法添加化学成分的药品会出现头晕、昏晕、青光眼等症状,造成对肾、心脏、心血管功能的严重损害。如果长期服用还会导致使用者勃起不倒,伤及阴部肌肉组织,甚至加重阳痿,严重者可变为永久性阳痿^[1]。笔者通过建立高效液相色谱-质谱串联(HPLC-MS/MS)法,同时对目前市场所售抗疲劳药物及保健品中非法添加的7种壮阳类化学药物包括枸橼酸西地那非(Sildenafil citrate, 1)、伐地那非(Varidenafil, 2)、红地那非(Hongdenafil, 3)、那红地那非(Nor-acetylsildenafil, 4)、豪莫西地那非(Homosildenafil, 5)、羟基豪莫西地那非(Hydroxyhomosildenafil, 6)、育亨宾(Yuhimbine, 7)进行检

测。本方法兼具液相色谱的分离能力强、高分辨,质谱的高灵敏度及专属性^[1],能够同时快速、准确地对这7种非法添加物质进行定性定量检测^[2-4]。

1 材料

1.1 仪器

4000 Q Trap 三重四级杆质谱仪(美国应用生物系统公司);1100型液相色谱仪,包括四元泵、在线脱气仪、自动进样器(美国安捷伦公司);AL204电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ5200超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

待测物1、3、5、6对照品(加拿大TRC公司,批号:S435001、A161600、H615150、H942840),2、4对照品(上海安谱公司,批号:CDFZ-V-054、CDFZ-S-0615),7对照品(美国Sigma公司,批号:Y3125),所有对照品纯度均>98%;13种抗疲劳药物及保健品均购于药店;甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸

*药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0431-88782573。
E-mail:quxiaoyuhaha@163.com

为优级纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Acclaim 120 C₁₈(150 mm×2.1 mm, 3 μm);流动相:甲醇-0.01 mol/L醋酸铵溶液(冰醋酸调pH 3.5)(35:65, V/V),流速:0.2 ml/min;柱温:室温;进样量:20 μl。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI)正离子模式;多反应监测(MRM)扫描模式;喷雾电压:5.5 kV;离子源温度:550 °C;气帘气(CUR):20 psi;雾化气(GS1):35 psi;辅助加热气(GS2):40 psi;碰撞气(CAD):9 psi。7种壮阳类化学药物的定性离子、定量离子、去簇电压及碰撞能量见表1(*为定量离子)。7种壮阳类化学药物的液相色谱图见图1。

表1 7种壮阳类化学药物的母离子、子离子、解簇电压及碰撞能量

Tab 1 Parent ion, daughter ion, cluster-removing voltage and collision energy of 7 kinds of anti-impotence medicines

待测物	母离子 m/z	子离子 m/z	解簇电压, V	碰撞能量, eV
1	475.2	100.1*	50	30
		283.1	50	40
2	489.5	151.1*	100	60
		312.4	100	60
3	467.4	111.1*	125	41
		127.2	125	43
4	453.0	112.9*	110	42
		97.1	110	45
5	489.6	283.3*	125	53
		311.4	125	45
6	505.4	487.3*	135	34
		99.2	135	63
7	355.3	144.1*	100	45
		212.2	100	33

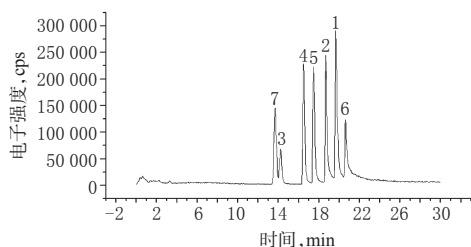


图1 7种壮阳类化学药物的液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of 7 kinds of anti-impotence medicines

2.3 专属性试验

取经预先测定,不含7种待测物的保健品样品(保健品空白样品),按照“2.5”项下方法制备成空白供试品溶液,进样测定;同时在保健品空白样品中添加质量浓度均为0.1 μg/ml的7种待测物对照品溶液,进样测定。结果表明,保健品中其他成分不干扰上述7种待测物的测定。

2.4 对照品贮备液的制备

取7种待测物的对照品各约10 mg,精确称重至0.1 mg,分别置于100 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得各对照品贮备液。

2.5 供试品溶液的制备

2.5.1 液体供试品:准确吸取13种抗疲劳药物及保健品中的液体剂剂0.25 ml,置于25 ml具塞试管中,用甲醇定容至25

ml,混匀,经0.22 μm微孔滤膜过滤,取滤液待测。

2.5.2 固体供试品:准确称取13种抗疲劳药物及保健品中的固体制剂细粉(片剂去除包衣后粉碎研细,胶囊去除囊壳取内容物研细)约0.25 g,置于25 ml具塞试管中,加入约15 ml甲醇,超声溶解10 min,用甲醇定容至25 ml,经0.22 μm微孔滤膜过滤,取滤液待测。

2.6 线性关系与检测限考察

取7种待测物的对照品贮备液适量,用甲醇逐步稀释,进样测定,以峰面积(y)为纵坐标、待测物的质量浓度(x)为横坐标,进行回归分析。以信噪比为3,计算各待测物的检测限。线性关系与检测限考察结果见表2。

表2 线性关系与检测限考察结果

Tab 2 Results of linear relationship and detection limit

待测物	线性方程	r	线性范围, ng/ml	检测限, ng/ml
1	$y=4.93 \times 10^5 x + 3.71 \times 10^4$	0.999 2	2.0~200.0	2.0
2	$y=1.51 \times 10^5 x + 1.21 \times 10^5$	0.999 6	0.5~100.0	0.5
3	$y=3.66 \times 10^5 x - 6.09 \times 10^5$	0.999 5	1.0~100.0	1.0
4	$y=2.44 \times 10^5 x + 4.68 \times 10^4$	0.999 9	1.0~100.0	1.0
5	$y=3.83 \times 10^5 x - 2.09 \times 10^4$	0.999 9	2.0~200.0	2.0
6	$y=4.96 \times 10^5 x - 2.42 \times 10^4$	0.999 6	0.5~100.0	0.5
7	$y=2.35 \times 10^5 x + 3.65 \times 10^4$	0.999 2	0.1~100.0	0.1

2.7 精密度试验

取“2.6”项下稀释后的7种待测物的对照品溶液,连续进样6次,记录峰面积。结果,待测物1、2、3、4、5、6、7峰面积的RSD分别为1.4%、2.0%、1.7%、1.5%、1.1%、1.5%、2.2%,表明本方法精密度良好。

2.8 重复性试验

精密称取待测样品,按照“2.5”项下方法制备成供试品溶液,共6份,进样测定。结果,样品中待测物1、2、3、4、5、6、7的平均RSD分别为0.8%、1.7%、1.3%、1.7%、0.8%、0.8%、1.1%,表明本方法重复性较好。

2.9 稳定性试验

将“2.4”项下7种待测物对照品贮备液用甲醇适当稀释后制得0.1 μg/ml的对照品溶液,于室温放置0、4、8、12、24、48 h后进样分析,记录峰面积。结果,待测物1、2、3、4、5、6、7对照品溶液的RSD分别为1.0%、1.1%、0.8%、1.1%、1.2%、1.1%、0.8%,表明7种待测物室温放置48 h稳定性均较好。

2.10 回收率试验

取“2.3”项下不含7种待测物的保健品空白样品,加入7种待测物对照品溶液,平行进样测定6次,计算回收率。结果表明,待测物1、2、3、4、5、6、7的平均回收率分别为98.1%、99.0%、97.8%、100.3%、99.6%、98.4%、97.5%,RSD分别为0.9%、1.6%、3.1%、2.3%、2.1%、1.8%、2.8%。

2.11 样品测定

取13种抗疲劳药物及保健品各适量,按“2.5”项下方法制成供试品溶液,进样测定,与7种壮阳类化学药物1、2、3、4、5、6、7的色谱峰和质荷比进行比较。结果,市售13种抗疲劳药物及保健品中含壮阳类化学药物的有6种,其中检出含待测物1的有4种,含待测物2的有1种,含待测物1和2的有1种。

3 讨论

根据市场调查发现,当前抗疲劳药物及保健品添加壮阳类化学物质的现象非常普遍。目前国家有关部门颁布的该类药物检测方法仅限于待测物1、待测物2和他达拉非3种有国家食品药品监督管理局(SFDA)批准文号的药物。但近年

激光散射法测定阿苯达唑脂质体粒度的研究[△]

陈春燕^{1*}, 赵军², 陈蓓², 高惠静², 王建华^{2#} (1.新疆医科大学, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830054)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3131-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.21

摘要 目的: 确定激光散射法测定阿苯达唑脂质体粒度的最佳条件。方法: 结合透射电镜的测量结果, 与不加分散剂样品进行对比, 考察加入聚山梨酯80作为分散剂及分散体系的其他因素对激光散射法测定阿苯达唑脂质体粒度的影响。结果: 激光散射法测定不加分散剂样品的平均粒度为(663.5±93.0) nm, 而按照最佳分散条件即10%聚山梨酯80-阿苯达唑脂质体体积配比为4:1、0.9%氯化钠溶液稀释20倍时测定其平均粒度为(240.6±2.8) nm, 同时透射电镜法测量样品的平均粒度为226.5 nm ($P>0.05$)。结论: 激光散射法测定阿苯达唑脂质体粒径时加入聚山梨酯80能改善脂质体团聚现象, 在最佳分散条件下能获得与透射电镜基本一致的测定结果, 同时不影响脂质体结构。该法稳定、快速、简便、重现性好, 可用于阿苯达唑脂质体粒度测定。

关键词 阿苯达唑脂质体; 粒度; 激光散射法; 透射电镜; 聚山梨酯80

Determination of Particle Size of Albendazole Liposome by Laser Scattering Method

CHEN Chun-yan¹, ZHAO Jun², CHEN Bei², GAO Hui-jing², WANG Jian-hua² (1.Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To confirm the best condition for the determination of particle size of Albendazole (ABZ) liposome by laser scattering method. **METHODS:** Combined with the results by transmission electron microscopy and contrasted with the sample without dispersant, the influence of polysorbate 80 as dispersant and other factors of dispersed system on the determination of particle size of ABZ liposome by laser scattering method were investigated. **RESULTS:** The average particle size of samples without dispersant by laser scattering method was (663.5±93.0) nm; that of samples was (240.6±2.8) nm under optimum dispersing condition: i.e. the volume ratio 10% polysorbate 80 to ABZ liposome was 4:1, and was diluted by 0.9% sodium chloride for 20 times; that of samples was 226.5 nm by transmission electron microscopy ($P>0.05$). **CONCLUSIONS:** Polysorbate 80 is able to solve the agglomeration when laser scattering method is used for the determination of particle size of ABZ liposome. It's close to the result by transmission electron microscopy under optimum dispersing condition and doesn't affect the structure of the liposome. The method is stable, rapid, simple and reproducible for the determination of particle size of ABZ liposome.

KEY WORDS Albendazole liposome; Particle size; Laser scattering method; Transmission electron microscopy; Polysorbate 80

来发现添加其他新出现的壮阳类药物的情况越来越常见, 这些药物安全性无法得到保证且没有相关的检验检测方法与法规, 是不法分子钻监督检验漏洞的新手段。由于中药及保健品中成分较为复杂, 存在众多干扰物质, 单纯采用HPLC法较难将待测物质与干扰物质完全分离, 灵敏度与特异性相对较低, 从而影响检测的准确性。而气相色谱-质谱联用法使用固相萃取法进行样品预处理, 操作繁琐, 所需时间长, 有机溶剂使用量大且分析时间长。本试验建立的HPLC-MS/MS法能够通过一次检测同时对非法添加的7种壮阳类物质进行定性与

定量检测, 不仅检验操作简单、快速, 且灵敏度与专属性高。

参考文献

- [1] 颜杰, 刘志强, 程振田. 中成药及中药保健食品中非法添加化学药品现状与对策[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(9): 716.
- [2] 王一红, 冯家力, 潘振球, 等. 液相色谱-质谱-质谱方法同时测定抗疲劳保健食品中伐地那非、西地那非、他达那非[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 8(43): 727.
- [3] 王朝晖, 赵宏冰, 蒋晓煌, 等. 15种壮阳类保健品中西地那非和他达那非的含量分析[J]. 中国药师, 2012, 6(15): 895.
- [4] 高青, 张喆, 郭洪祝, 等. 中药及保健品中PDE5抑制剂监测方法研究及未知衍生物的发现[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(2): 142.

(收稿日期: 2013-01-04 修回日期: 2013-02-03)

△ 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目资助(No. 2007AA021805); 新疆医科大学第一附属医院药学专项基金资助(No. 2012YX03)

* 硕士研究生。研究方向: 药物新剂型和新制剂。电话: 0991-4363438。E-mail: cindychen218@163.com

通信作者: 主任药师, 副教授, 硕士。研究方向: 临床药理学、药物新剂型和新制剂。电话: 0991-4363293。E-mail: jhw716@163.com