

# 抗疲劳类保健食品中 12种化药成分的液相快速筛查

颜伟华, 宋剑锋\*, 程 闯, 郑 明, 王笑笑, 方一超  
(衢州市食品药品检验研究院, 浙江衢州 324002)

**摘要:**采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法,建立保健食品中12种化药成分的液相快速筛查方法。色谱条件:Agilent ZOBAX SB-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以乙腈、磷酸三乙胺溶液(取7 mL三乙胺用水稀释至1000 mL,用磷酸调pH至2.8±0.05)为二元梯度洗脱流动相,流速1.0 mL/min,柱温18℃,检测为波长230 nm。结果表明,12种抗疲劳化药成分在相应的浓度范围内,峰面积和进样量有良好的线性关系( $r \geq 0.999$ )。检出限在4.02~9.17 ng之间,回收率在98.69%~109.07%之间,RSD在0.20%~2.46%之间。应用本方法从38批样品中检出1批非法添加化药成分西地那非。本法简单快速准确,精密度好,适用于基层药检机构,可以用于抗疲劳类保健食品中12种化药非法添加的快速筛查。

**关键词:**抗疲劳类化药,保健食品,HPLC-DAD,快速筛查

## Rapid screening of 12 anti-fatigue agents in health care products by HPLC

YAN Wei-hua, SONG Jian-feng\*, CHENG Chuang, ZHENG Ming, WANG Xiao-xiao, FANG Yi-chao

(Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou 324002, China)

**Abstract:** A high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) method was established for detection the simultaneous determination of 12 kinds anti-fatigue agents, which were illegally added in health care products. The sample were separated on Agilent ZOBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), gradient eluted with mixture of acetonitrile and phosphoric acid-triethylamine (7 mL triethylamine, dilute with water to 1000 mL, with phosphoric acid to regulate pH to 2.8±0.05) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 18℃ and the detection wavelength was set at 230 nm. Results showed that good linearity was obtained for 12 kinds anti-fatigue agents in 12 components in a wide range and correlation was greater than 0.999. The LOD was from 4.02 to 9.17 ng. The recovery rate was from 98.69% to 109.07% and RSD was from 0.20% to 2.46%. Using this method, 1 batch of illegally added chemicals were detected from 38 batches of samples. This method was simple and precise, it can provide a reliable way for detecting 12 Anti-fatigue agents in health care products.

**Key words:** anti-fatigue agents; health care products; HPLC-DAD; rapid drug testing

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)21-0299-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.053

西地那非等PDE5型抑制剂类药物的主要功效为治疗男性勃起功能障碍疾病。由于其特殊用途,一些不法商贩为了赚取高额利润,在抗疲劳类保健食品中非法添加PDE5型抑制剂。此类药物为处方药,服用时具有一定的禁忌和副作用,高血压、冠心病、脑血栓等患者在不知情的情况下使用此类产品,容易引起严重的药物不良反应甚至死亡<sup>[1-2]</sup>。为此,国家药监局发布了2006009、2008016、2009030共三个补充检验方法批件<sup>[3-5]</sup>。2006009和2008016分别

检测2种和8种成分,2009030检测11种,但其中羟基豪莫西地那非、西地那非和豪莫西地那非三种成分的分离度<sup>[6]</sup>难以达到1.5以上,且使用液-质色谱检测器检测。液-质色谱测定抗疲劳类保健食品中的化药成分,由于仪器设备和维护费昂贵,在地市食品药品检验机构无法普及<sup>[7-9]</sup>;HPLC测定报导较多,但测定品种局限<sup>[10-11]</sup>,经实际应用发现部分PDE5型抑制剂类药物保留时间非常接近,分离效果差,易发生假阳性、本底干扰等问题。二极管阵列检测器

收稿日期:2015-01-23

作者简介:颜伟华(1986-),女,硕士研究生,助理工程师,研究方向:食品检测与分析,E-mail:weihuawww@163.com。

\*通讯作者:宋剑锋(1974-),男,本科,副主任中药师,研究方向:中药材质量控制与检测,E-mail:13567082896@163.com。

基金项目:浙江省衢州市重点实验室项目(衢市科发高[2015]8号);衢州市115人才项目(衢市人社专[2013]146号)。

(DNA)是一种基于光电二极管阵列技术的新型检测器。使用二极管阵列检测器,可以对色谱峰进行光谱扫描、峰纯度鉴定等定性分析<sup>[12-14]</sup>,可以有效地解决PDE5型抑制剂类药物在检测过程中常出现的假阳性问题。此外,DAD在方法研究中可以快速选择最佳检测波长,在多组分混合物分析中可以编辑波长程序。由于具有这些明显优势,二极管阵列检测器在化药分析中有着良好的应用前景。

本实验选用液相色谱,利用DAD专属检测器,通过对流动相的组成、pH和柱温等进行实验优化,最终确定色谱条件。考虑到不法商贩为了达到明显疗效的目的,一般添加化药成分的量都较大,远高于液相的定量限,结合二极管阵列检测器的独特优势,故本实验仅考察了HPLC-DAD的方法学。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

对照品那红地那非(批号1591-080A3)、羟基豪莫西地那非(批号1441-048A6)、豪莫西地那非(批号1220-030A3)、二甲基西地那非(批号1215-003A2)、氨基他达拉非(批号1638-004A2)、他达拉非(批号1156-051A1)、那莫西地那非(批号1646-055A2)加拿大TLC公司;红地那非(批号C0802052)、西地那非(批号C0802055)西班牙Valencia,GM公司;伐地那非(批号11320-035A1)、硫代艾地那非(批号1-JMS-114-1)、伪伐地那非(批号1217-011A2)上海安谱科学仪器有限公司。

供试品为衢州市食品药品检验研究院在专项监督工作中从衢州市本级及各县(市、区)各大医院和药店的抽样,共30个品种38批。乙腈为色谱纯。其他化学试剂为分析纯,水为自制超纯水。

Agilent 1260 高效液相色谱仪(配有G1311C泵、G1329B型自动进样器、G1316A型柱温箱、G4212B DAD检测器、B.03.02[341]LC 3D系统化学工作站)安捷伦公司;Xp205电子天平Mettler toledo公司;KQ5200E型超声波清洗器昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 参考《国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件》<sup>[3-5]</sup>,通过对流动相的组成、pH和柱温等进行实验优化,最终确定色谱条件。色谱柱:Agilent ZOBAX SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);二元流动相:C相为乙腈;D相为0.05 mol/L磷酸三乙胺溶液(取7 mL三乙胺用水稀释至1000 mL,用磷酸调pH至2.8±0.05)。梯度洗脱,流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温:18℃;进样量:10 μL;检测器:DAD检测器;检测波长:230 nm;以色谱峰的保留时间定性,并以DAD紫外吸收光谱图(200~400 nm)辅助定性。

#### 1.2.2 溶液制备

1.2.2.1 对照品溶液的制备 那红地那非23.25 mg,红地那非13.26 mg,伐地那非14.33 mg,羟基豪莫西地那非17.33 mg,西地那非23.98 mg,豪莫西地那非12.37 mg,二甲基西地那非15.03 mg,氨基他达拉非

19.91 mg,他达拉非21.43 mg,硫代艾地那非9.75 mg,伪伐地那非14.50 mg,那莫西地那非16.33 mg置25 mL量瓶中,用乙腈溶解,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理15 min,冷却至室温,稀释至刻度,摇匀,即得标准品储备溶液。精密量取适量,用流动相D稀释成每1 mL约含50 μg的混合对照品溶液。

表1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 The gradient program of mobile phase

时间(min)	流动相 C(%)	流动相 D(%)
0~7	23→27	77→73
7~15	27→30	73→70
15~30	30→40	70→60
30~40	40→80	60→20
40~45	80	20
45~53	80→23	20→77
53~60	23	77

1.2.2.2 供试品溶液的制备 若供试品为固体制剂,精密称取一次服用量,研细,置50 mL容量瓶中,加乙腈40 mL,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)15 min,冷至室温,用乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过;若供试品为液体制剂,精密量取一次服用量,置50 mL容量瓶中,加乙腈约40 mL,振摇3 min,用乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过。精密量取续滤液适量,用流动相D稀释至与对照品溶液浓度相当,摇匀,滤过,即得。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱分析条件的选择

2.1.1 流动相的选择 C相选择不同比例的甲醇、乙腈进行系统适应性实验,D相选择不同浓度的磷酸三乙胺溶液,用磷酸调不同pH,结果表明C相为纯乙腈、D相为0.05 mol/L磷酸三乙胺溶液(取7 mL三乙胺用水稀释至1000 mL,用磷酸调pH至2.8±0.05)最为理想。D相pH过低,羟基豪莫西地那非和西地那非达不到分离效果;pH过高,伐地那非、羟基豪莫西地那非、西地那非和豪莫西地那非的分离度达不到要求。

2.1.2 柱温 柱温过高,氨基他达拉非峰变形,且其他峰分离度下降。柱温太低,柱子压力太大,结果表明,柱温18℃左右,分离效果较好,且柱压在可承受范围。

2.1.3 检测波长 利用二极管阵列检测器记录光谱图,观察混合对照溶液的3D光谱图,表明上述色谱条件下,230 nm波长处的信号值响应较强,且分离度较好,因此选择230 nm作为检测波长。

2.1.4 提取溶剂 12种抗疲劳类化药都溶于乙腈,选用乙腈超声15 min提取基本完全,但需用流动相D稀释后进样,否则容易产生溶剂效应,分离度达不到要求。

### 2.2 系统适用性实验

取混合对照品溶液,在1.2.1项色谱条件下分析,12种常见的抗疲劳类药得到了良好的分离,分离度均大于1.6,如图1所示。根据混合对照品出峰保留

表2 12种抗疲劳类化药成分的回归曲线

Table 2 The standard curve of 12 kinds anti-fatigue agents

名称	线性方程	线性范围( $\mu\text{g}$ )	$r$
那红地那非(Nor-acetildenafil)	$y = 2213.6x + 4.138$	0.047~1.88	1.000
红地那非(Hongdenafil)	$y = 1633.9x + 0.4336$	0.02652~1.0608	1.000
伐地那非(Vardenafil)	$y = 3177.0615x + 8.1329$	0.02866~1.1464	1.000
羟基豪莫西地那非(Hydroxyhomosildenafil)	$y = 2249.0834x + 2.6715$	0.03466~1.3864	1.000
西地那非(Sildenafil)	$y = 2089.8165x - 1.0875$	0.04796~1.9184	1.000
豪莫西地那非(Homosildenafil)	$y = 3432.3x - 8.4181$	0.02474~0.9896	1.000
二甲基西地那非(Dimethyl Sildenafil)	$y = 3373.3x + 0.516$	0.03006~1.2024	1.000
氨基他达拉非(Aminotadalafil)	$y = 5068.8x - 19.455$	0.03982~1.5928	1.000
他地那非(Tadalafil)	$y = 4340.9x - 27.589$	0.04286~1.7144	1.000
硫代艾地那非(Thioaildenafil)	$y = 2390.1x - 5.9588$	0.0195~0.78	1.000
伪伐地那非(Pseudovardenafil)	$y = 3448.1x + 20.057$	0.029~1.16	0.999
那莫西地那非(Norneosildenafil)	$y = 886.4317x - 2.0360$	0.03266~1.3064	1.000

时间和单个对照品保留时间,可以确定其色谱峰流出顺序依次是:那红地那非(7.182 min)、红地那非(7.804 min)、伐地那非(8.766 min)、羟基豪莫西地那非(11.969 min)、西地那非(12.418 min)、豪莫西地那非(13.326 min)、二甲基西地那非(14.503 min)、氨基他达拉非(22.952.09 min)、他达拉非(29.017 min)、硫代艾地那非(30.605 min)、伪伐地那非(38.094 min)、那莫西地那非(41.667 min)。

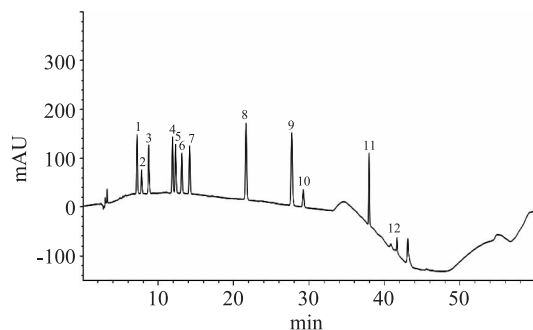


图1 对照品色谱图

Fig. 1 Reference Chromatogram

注:1-那红地那非;2-红地那非;3-伐地那非;4-羟基豪莫西地那非;5-西地那非;6-豪莫西地那非;7-二甲基西地那非;8-氨基他达拉非;9-他达拉非;10-硫代艾地那非;11-伪伐地那非;12-那莫西地那非。

### 2.3 线性关系的考察

精密吸取 1.2.2.1 项下的对照品标准储备液 0.5、1.0、2.0 mL 分别置 100 mL 和 10 mL 量瓶中,用流动相 D 稀释至刻度,按 1.2.1 项色谱条件进样分析,记录色谱峰面积。以进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标(X),峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线结果见表 2。

### 2.4 精密度实验

取 1.2.2.1 项下的混合对照品溶液,重复进样 6 次,记录色谱图,各成分峰面积的 RSD 为 0.23%~1.43%,色谱峰保留时间一致,表明精密度较好。

### 2.5 稳定性实验

取 1.2.2.1 项下的混合对照品溶液,于配制后 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 测定,各组分色谱峰的保留时间和

峰面积均无明显变化, RSD 均小于 1.5%, 稳定性较好。

### 2.6 检出限和定量限

取 1.2.2.1 项下的对照品溶液,以不同比例稀释后测定,信噪比(S/N)为 3 作为最低检出限(LOD),信噪比(S/N)为 10 作为定量限(LOQ),12 种化学组分的检出限和定量限结果见表 3。

表3 12种抗疲劳类化药成分的检出限和定量限

Table 3 The LOD and LOQ of 12 kinds anti-fatigue agents

名称	LOD (ng)	LOQ (ng)
那红地那非(Nor-acetildenafil)	7.75	22.15
红地那非(Hongdenafil)	6.26	18.52
伐地那非(Vardenafil)	4.78	13.93
羟基豪莫西地那非(Hydroxyhomosildenafil)	5.28	16.33
西地那非(Sildenafil)	7.69	23.89
豪莫西地那非(Homosildenafil)	4.02	12.57
二甲基西地那非(Dimethyl Sildenafil)	5.21	16.03
氨基他达拉非(Aminotadalafil)	6.74	18.71
他地那非(Tadalafil)	7.04	21.23
硫代艾地那非(Thioaildenafil)	9.17	29.25
伪伐地那非(Pseudovardenafil)	4.83	15.10
那莫西地那非(Norneosildenafil)	8.63	24.99

### 2.7 回收率实验

取阴性样品,研细,分别精密加入 12 种对照品,按 1.2.2.2 项的方法,平行制备 6 份,测定,结果见表 4,回收率在 98.69%~109.07%之间, RSD 在 0.20%~2.46%之间,结果较好。

### 2.8 样品测定

用本文建立的方法,对市场上 30 个品种 38 批次不同剂型的抗疲劳类保健食品同时进行检测,37 批次均未检出,其中有 1 批检出峰的保留时间与西地那非对照品溶液峰相同,进一步比较两者的 DAD 光谱图(图 2),图谱相似度达 99.9%,因此初步判定该保健食品中可能添加了西地那非,含量为 14.3 mg/g。

表4 12种抗疲劳类化药成分的回收率

Table 4 The recovery rate of 12 kinds of anti-fatigue agents

名称	1	2	3	4	5	6	平均值(%)	RSD(%)
那红地那非	101.68	102.74	102.45	102.16	102.06	102.26	102.22	0.35
红地那非	102.60	103.98	102.83	103.29	103.75	103.75	103.37	0.54
伐地那非	103.22	102.89	103.00	102.89	103.99	103.55	103.26	0.42
羟基豪莫西地那非	102.83	103.80	103.09	103.00	103.45	103.00	103.20	0.35
西地那非	103.27	103.47	103.07	102.87	103.27	103.27	103.21	0.20
豪莫西地那非	101.92	102.98	101.92	102.50	101.80	101.56	102.11	0.51
二甲基西地那非	105.08	105.86	106.06	105.37	105.57	105.96	105.65	0.36
氨基他达拉非	100.50	99.06	100.30	99.71	99.51	98.91	99.66	0.64
他地那非	97.89	99.27	99.08	97.24	102.54	96.14	98.69	2.25
硫代艾地那非	105.55	104.70	107.91	108.13	109.20	106.20	106.95	1.62
伪伐地那非	108.52	109.42	108.82	107.52	110.11	110.01	109.07	0.90
那莫西地那非	98.80	100.87	101.91	100.53	96.04	102.95	100.18	2.46

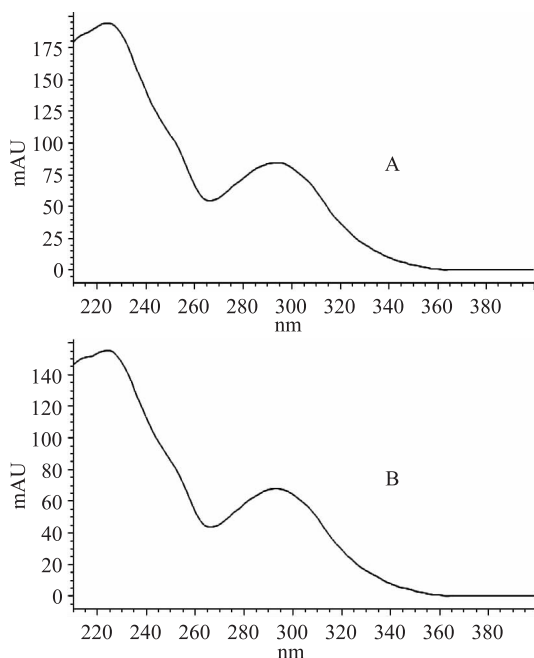


图2 DAD扫描图谱

Fig.2 DAD scanning map

注:A:阳性样;B:西地那非对照品。

### 3 结论

本实验建立了用 HPLC-DAD 法同时检测抗疲劳类保健食品中 12 种化药成分的液相快速筛查方法。12 种抗疲劳类化药成分在相应的浓度范围内,峰面积和进样量有良好的线性关系( $r \geq 0.999$ )。检出限在 4.02~9.17 ng 之间,定量限在 12.57~29.25 ng 之间,回收率在 98.69%~109.07% 之间,RSD 在 0.20%~2.46% 之间。精密度实验的 RSD 为 0.23%~1.43%,48 h 内稳定性实验的 RSD 均小于 1.5%。12 种抗疲劳类化药成分的分离度均大于 1.6,实现了同时分离与专属性鉴别。利用该方法快速筛查了市场上 30 个品种 38 批次抗疲劳类保健食品,通过比较样品的色谱图与紫外光谱图,初步判定某种保健品中非法添加有疑似西地那非的成分,可进一步采用 HPLC-MS 等方法进行结构确证。本方法操作快速准确,

成本相对较低,易在基层食品药品检测机构推广。

### 参考文献

- [1] 岳琳,谭有能,粟芳.中成药中非法添加化学药物的种类、危害、原因和对策[J].全科护理,2012,10(5):1406.
- [2] 黄国平.中成药中非法添加西药的防范措施[J].临床合理用药,2011,4(11):107.
- [3] 国家药品监督管理局国家药品标准.[S]补肾壮阳类.液质联用(HPLC/MS/MS)分析鉴定西地那非和他达拉非的补充检测方法,批准件编号 2006009.
- [4] 国家药品监督管理局国家药品标准.[S]补肾壮阳类.中成药中西地那非及其类似物的检测方法,批准件编号 2008016.
- [5] 国家药品监督管理局国家药品标准.[S]补肾壮阳类.中成药中 PDE5 型抑制剂的快速检测方法,批准件编号 2009029.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:附录 37.
- [7] 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,2013,12:123-125.
- [8] Gao Q,Zhang Z,Guo H Z,et al.Study on PDE5 inhibitors and its unknown derivatives in traditional Chinese medicine and health food discovered[J].Chin Pharm J,2008,43(2):142-146.
- [9] Sacre P Y,Deconinck E,Chiap P,et al.Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines[J].J Chromatogr A,2011,1218(37):6439-6447.
- [10] Mans D J,Callahan R J,Dunn J D,et al.Rapid-screening detection of acetildenafil,sildenafil and avanafil by ion mobility spectrometry[J].J Pharm Biomed Anal,2012,75:153-157.
- [11] 沈志武,唐宏兵,李群,等.高效液相色谱法测定保健食品中他达拉非、西地那非、伐地那非违禁药物含量[J].理化检验(化学分册),2008,6(44):540-542.
- [12] 鲁琳,高燕红,李少霞,等.高效液相色谱-二极管阵列检测法测定保健食品中枸橼酸西地那非的研究[J].中国卫生检

# 炭黑氨基柱净化-HPLC-ICP-MS测定 黄酒中铬价态及含量

宋伟华,董文洪,胡贝贞,林环宇

(绍兴出入境检验检疫局综合技术服务中心,浙江绍兴 312000)

**摘要:**建立了一种测定黄酒中Cr(III)、Cr(VI)的高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱分析方法。黄酒经炭黑氨基柱净化,超纯水洗脱,色谱条件为:Dionex AS11-HC 阴离子预柱(4 mm×50 mm×9 μm);以60 mmol/L(pH9.0)硝酸铵作为流动相,流量为1.5 mL/min;以电感耦合等离子体质谱进行定性和定量分析。结果表明:在0~20 μg/L范围内Cr(III)、Cr(VI)线性良好,相关系数 $R^2$ 均在0.998以上;添加回收率在81.2%~94.8%之间,相对标准偏差为1.7%~4.1%;定量限分别为0.12 μg/L和0.18 μg/L。本方法简单快速,适用于黄酒中铬形态残留的分析检测,并利用该方法对不同年份、不同企业及不同类型的黄酒进行了检测,发现绍兴地区的黄酒中的铬主要以Cr(III)形态存在。

**关键词:**高效液相色谱,炭黑氨基柱净化,电感耦合等离子体质谱,铬形态,黄酒

## Determination of chromium species and content in rice wine by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

SONG Wei-hua, DONG Wen-hong, HU Bei-zhen, LIN Huan-yu

(Comprehensive Technologic Service Center of Shaoxing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shaoxing 312000, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) method was developed for determination of Cr(III), Cr(VI) in rice wine. The wine sample was purified with Carb-NH<sub>2</sub> SPE column, eluted with ultra-pure water and then separated on a Dionex AS11-HC (4 mm×50 mm×9 μm) column using 60 mmol/L ammonium nitrate (pH9.0) at 1.5 mL/min as mobile phase. Identification and quantification were achieved by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). It showed good linear correlation between 0 and 20 μg/L with correlation coefficients better than 0.998. The average recoveries of Cr(III) and Cr(VI) ranged from 81.2% to 94.8% at different spiked level and the relative standard deviations ranged from 1.7% to 4.1%. The quantification limits of Cr(III) and Cr(VI) were 0.12 μg/L and 0.18 μg/L respectively. The method was suited for determination of chromium species in rice wine. Shaoxing rice wines of different kind and different age from different manufacturers were determined using the established method, results showed that Cr(III) was the main specie.

**Key words:** high performance liquid chromatography; carbon black amino column; inductively coupled plasma mass spectrometry; chromium species; rice wine

中图分类号: TS207

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)21-0303-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.054

据统计,我国约有十分之一的耕地被重金属污染,形势非常严峻<sup>[1]</sup>。因此,对环境、食品以及水资源中的重金属含量进行监测至关重要的。本实验通过

日常检测发现黄酒中总铬的含量在9.2~31.7 μg/L。环境中的铬主要以两种价态形式存在,维持人体生命的必需元素Cr(III)和具有高毒、强致癌性的Cr

收稿日期: 2015-01-23

作者简介: 宋伟华(1982-),女,硕士研究生,工程师,从事食品工业品检测工作, E-mail: zcswh@sx.ziq.gov.cn。

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究(分析测试)项目(2013C37095)。

验杂志, 2005, 15(9): 1052-1053.

[13] 王骏, 胡梅, 张卉, 等. 二极管阵列检测器在食品分析中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2008(8): 154-157.

[14] 洪群发, 张庆合, 李彤, 等. 高效液相色谱仪的研制与技术开发——新型二极管阵列检测器[J]. 现代科学仪器, 2002(4): 15-18.