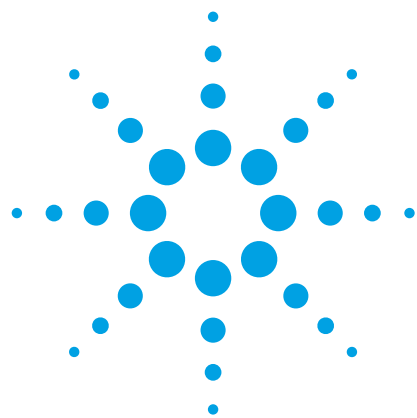




勃起功能障碍膳食补充剂中掺假物痕量分析的样品前处理

应用简报

食品检测和农业

作者

Derick Lucas
安捷伦科技公司

前言

膳食补充剂行业以每年 5.5% 的速度快速增长，2012 年仅美国地区的年销售额就达到将近 56 亿美元 [1]。这很大程度上是由于消费者健康意识都在提高，他们希望通过服用各种产品达到养生的目的，包括从干植物性药物到添加了维生素、矿物质和天然成分的功能饮料。膳食补充剂的审查也越来越严格，FDA 等监管机构实施了现行良好生产质量管理规范 (cGMP) 以确保消费品的安全与可靠。随着膳食补充剂越来越受到人们的青睐，供应商为了寻求更大的利润，生产了大量含伪劣、受污染材料的产品，甚至在产品中添加药物 [2,3]。勃起功能障碍 (ED) 补充剂就属于这类产品，可通过添加 PDE-5 抑制剂药物（例如西地那非（万艾可）、他达拉非（西力士）、伐地那非（艾力达）及其数量日益增长的衍生物）进行造假 [4]。

检测这些基质中的目标分析物困难重重，不仅仅因为它们的化学成分复杂，同时检测过程中还需要消除化学干扰、减少仪器污染，并且考虑基质效应。这些问题与 ED 补充剂存在密切的关联性，而这类补充剂可能含有单一植物萃取物或包括铁青树碱、高丽参、肉桂、银杏、冬虫夏草等在内的混合成分。因此，在测定低浓度化学掺杂物时，需要进行有效且全面的样品前处理。本文将研究在使用 LC/MS/MS 仪器对 PDE-5 抑制剂和化学掺假物进行痕量分析时，ED 补充剂充分的样品前处理过程对于基质去除的重要性。



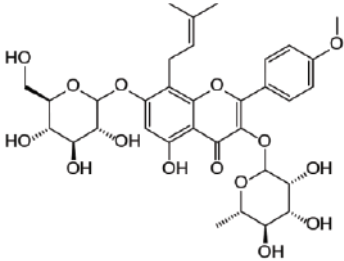
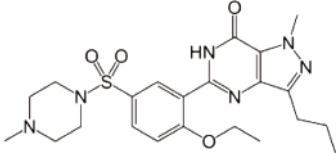
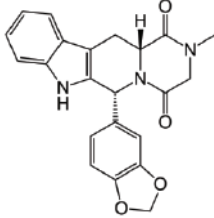
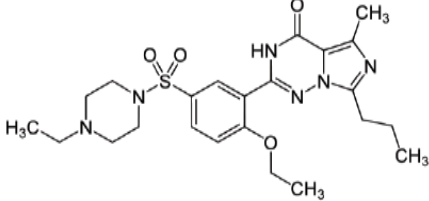
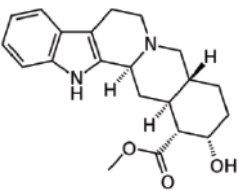
Agilent Technologies

材料与方法

甲醇和乙腈均为 LC/MS 级试剂，经过 Milli-Q 反渗透净化器对水进行过滤。氢氧化铵、磷酸、甲酸和乙酸为分析级试剂。标准品购自 VWR International LLC 和西格玛奥德里奇公司，以纯固态形式存

在，称取 10 mg 溶解于甲醇，需要时可稀释制成工作标准液。样品购自当地的膳食补充剂分销商，以片剂和胶囊形式存在。将整瓶产品倒入 Robot Coupe 食品加工机内混匀，确保样品更具代表性。分析物的化学结构和特性见表 1。

表 1. 分析物的化学结构与特性

名称	结构	LogP*	pKa*
淫羊藿苷		0.81	11.8
西地那非		1.65	5.97
他达拉非		1.64	15.21
伐地那非		1.33	6.21
育亨宾		2.10	7.65

*Chemaxon 软件测得的数值

表 4 列出了各种化合物及其 MS/MS 参数。

液相色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 100 mm, 2.7 μ m
(部件号 695775-902), Agilent Poroshell 120 EC-C18,
2.1 x 5 mm, 2.7 μ m 保护柱 (部件号 821725-911)

洗脱液: A, H₂O + 0.1% 甲酸
B, 甲醇 + 0.1% 甲酸

进样量: 10 μ L

流速: 0.4 mL/min

梯度程序: 0 至 0.5 min 为 10% B, 0.5 至 9.0 min 由 10% B 增加至
80% B

仪器: Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 6410 三重四
极杆质谱仪

质谱条件

气体温度: 300 $^{\circ}$ C

气体流速: 8 L/min

雾化器压力: 35 psi

毛细管电压: 3500 V

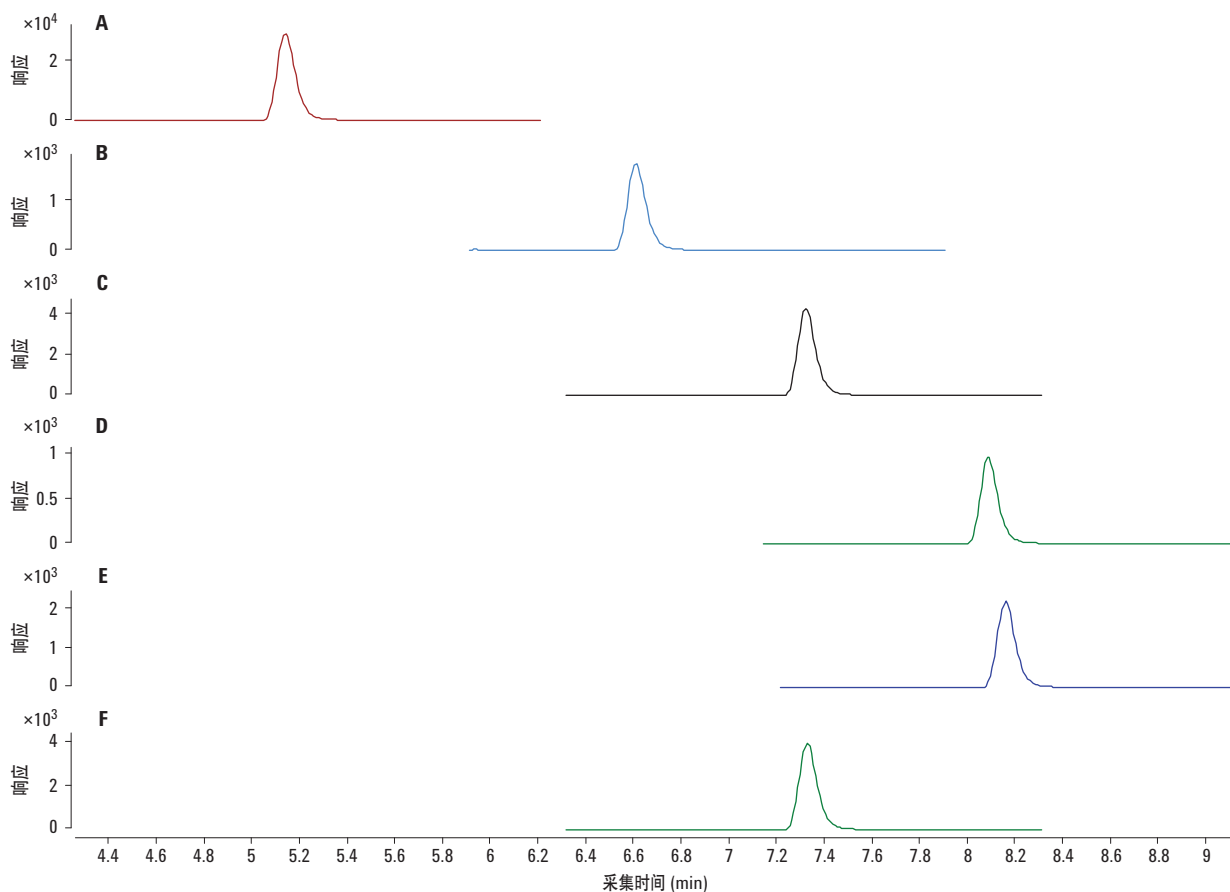


图 1. 50 ng/g A) 育亨宾、B) 伐地那非、C) 西地那非、D) 淫羊藿苷、E) 他达拉非, 以及 F) 西地那非-d8 (内标) 的主要离子对的 MRM 色谱图

样品前处理（改进的 QuEChERS）

第一种样品前处理方法采用适用于分析肉类中药物残留的 Agilent Bond Elut QuEChERS 分散 SPE（部件号 5982-4956）和块状炭（部件号 5982-4482）（图 2）。

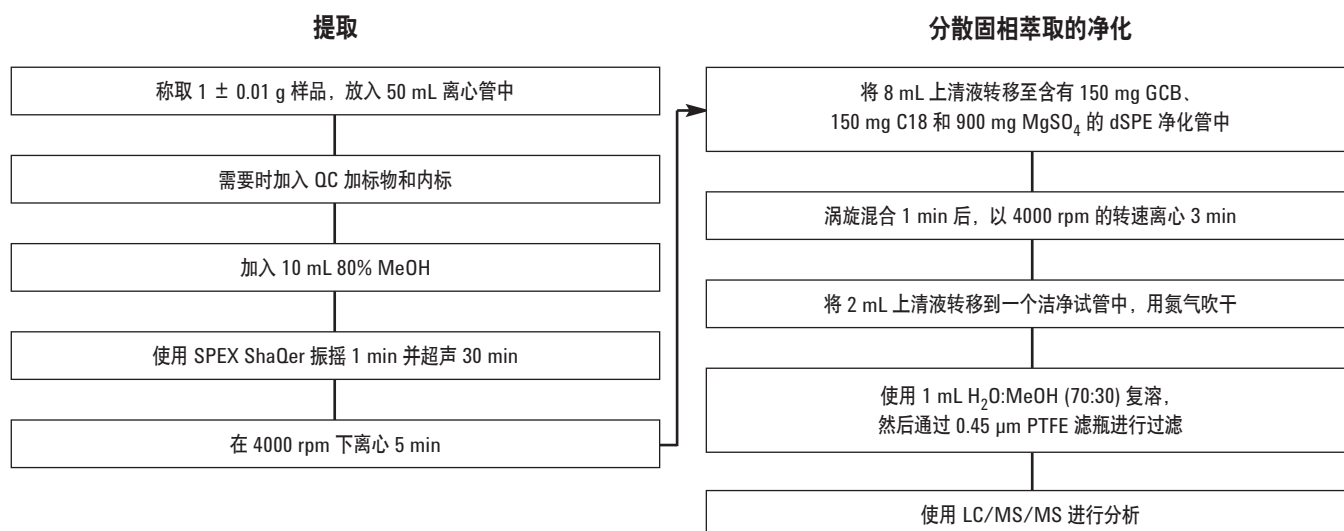


图 2. QuEChERS 样品前处理工作流程

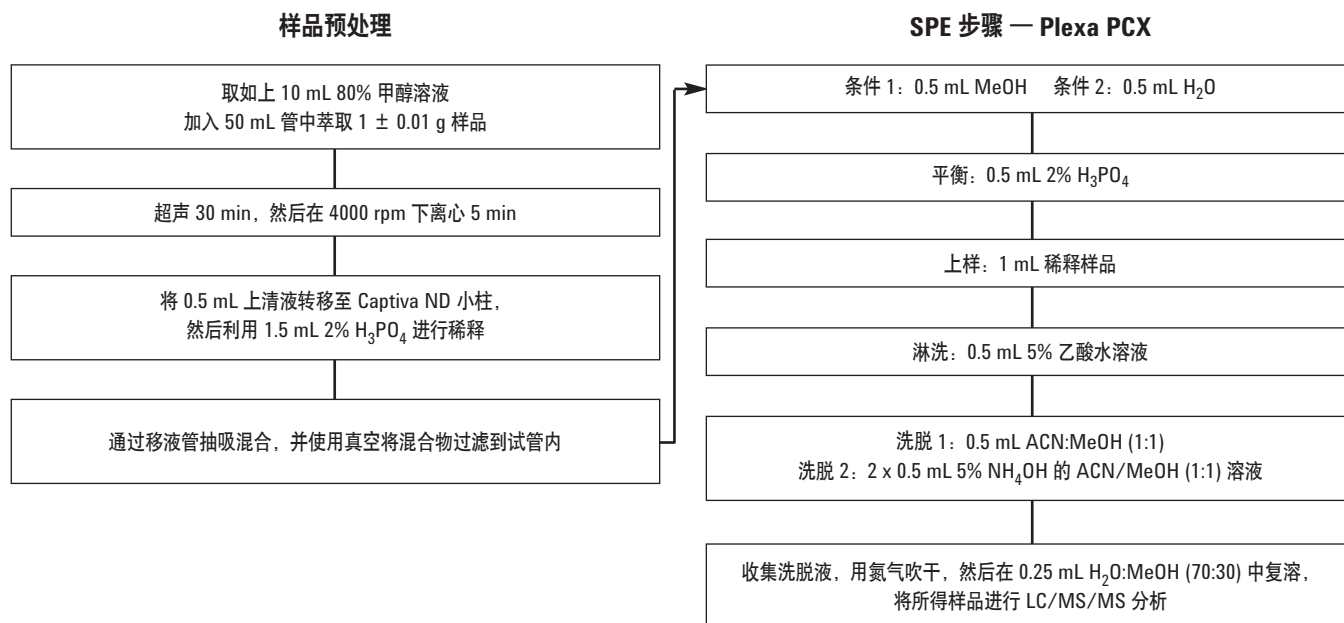


图 3. Agilent Bond Elut Plexa PCX 的样品前处理工作流程

结果和讨论

由于其化学成分非常复杂，因此植物性膳食补充剂被公认为“脏”样品。虽然在分析韩国红高丽参方面 QuEChERS 具有极佳的性能，但它在其他方面还谈不上是很好的样品前处理方法，当分析多种成分的基质时，即使搭配高灵敏、高选择性的串联质谱，它也无法实现较低的检测限。为了对这些基质进行有效分析，我们选择具有更高的分析物特异性的 Bond Elut Plexa PCX，净化更加彻底，并且能够实现多成分 ED 补充剂的出色分析。通过定量分析来验证样品前处理方法在分析物回收率和重现性方面的性能。

过去通常使用 QuEChERS 对水果和蔬菜样品中的农药残留物进行分析，而现今该方法在许多非传统的分析物和基质分析中也越来越受到青睐。QuEChERS 的易用性、快速和模块化步骤使其成为一种分析 PDE-5 抑制剂的样品前处理方法。本研究采用 80% 甲醇萃取物对 QuEChERS 加以改进，不添加盐。净化时，将石墨化碳

黑 (GCB) 加入适用于分析肉类中药物残留的 Bond Elut QuEChERS 分散固相萃取试剂盒，以便于去除色素以及其他干扰化合物。QuEChERS 在分析高丽参补充剂时能够提供出色的回收率和重现性，如表 2 所示。然而使用 QuEChERS 分析含有多种成分的样品时，由于无法检测其中的大部分化合物，所以此方法的性能大大降低。

经过优化，Bond Elut Plexa PCX 可用于分析 QuEChERS 不适宜分析的基质，其选择依据是分析物的 pKa。目标分析物经磷酸处理后形成阳离子类化合物，从而能够与 SPE 柱的固定相发生较强的相互作用。使用氢氧化铵进行洗脱，使目标分析物去质子化，从而改变它们对固定相的亲和力。随着离子交换技术选择性的提高，样品的净化程度也相应提高。如表 3 所示，除淫羊藿苷外，其他分析物的各项分析结果都非常理想。通过比较空白基质与加标 20 ppb 的清洁样品提取物发现样品清洁度有所提高，如图 4 所示。

表 2. 使用 QuEChERS 方法测定韩国红人参中分析物的回收率、重现性和线性 (n = 3)

分析物	20 ppb		50 ppb		100 ppb		R ²
	回收率 %	% RSD	回收率 %	% RSD	回收率 %	% RSD	
西地那非	84.1	4.4	91.4	7.4	103.6	3.7	0.9998
伐地那非	58.5	15.6	80.5	16.6	95.9	11.1	0.9996
他达拉非	80.2	10.4	85.5	10.6	103.5	4.5	0.9982
淫羊藿苷	103.5	5.5	111.8	8.9	127.5	6.4	0.9971
育亨宾	99.1	5.5	105.8	6.0	115.2	3.4	0.9995

表 3. 使用 Plexa PCX 测定复杂 ED 补充剂的回收率、重现性和线性 (n = 3)

分析物	20 ppb		50 ppb		100 ppb		R ²
	回收率 %	% RSD	回收率 %	% RSD	回收率 %	% RSD	
西地那非	87.1	1.0	85.9	2.8	84.1	1.4	0.9999
伐地那非	83.8	6.4	83.3	6.1	84.0	4.7	0.9999
他达拉非	76.0	6.0	80.1	5.6	87.4	3.6	0.9974
淫羊藿苷	43.6	7.8	51.7	20.1	110.8	28.1	0.9994
育亨宾	84.6	1.8	81.7	3.0	82.7	2.1	0.9967

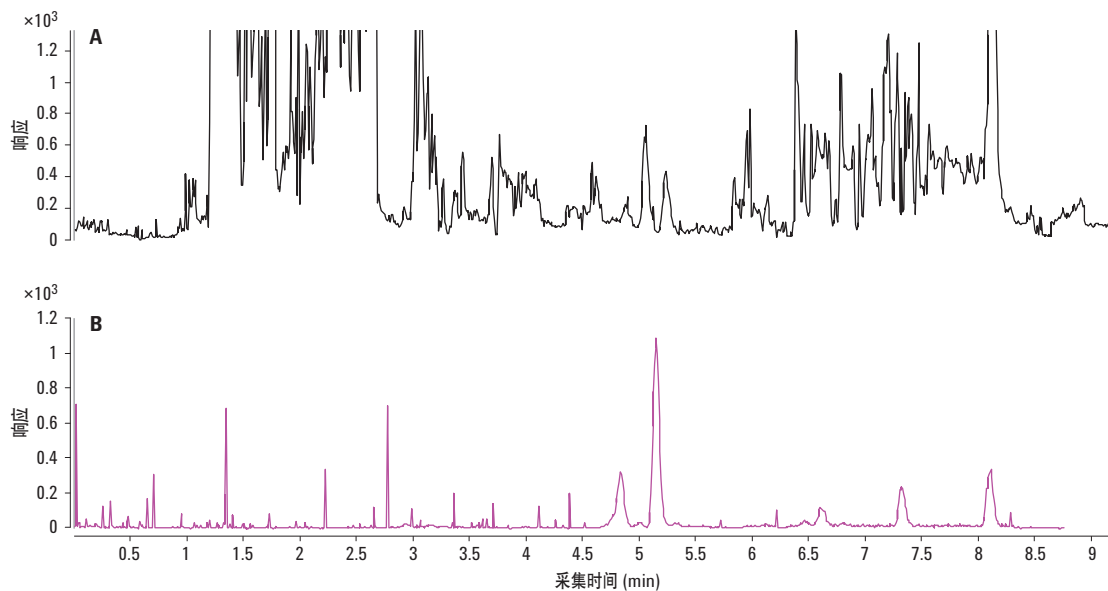


图 4. 未净化的 ED 补充剂空白 (A) 与使用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 净化后加标 20 ppb 的样品 (B) 的 MRM 总离子流色谱图

结论

采用两种样品前处理技术，通过 LC/MS/MS 分析勃起功能障碍膳食补充剂中的掺杂物西地那非、伐地那非、他达拉非、淫羊藿苷和育亨宾。这些基质的复杂性存在巨大差别，因为它们可能含有单一成分或多种成分，并以单一胶囊或片剂的形式存在。虽然只需要对 QuEChERS 进行适度的方法开发，但它不能充分净化样品，因此无法有效测定复杂基质中的低浓度分析物。基于萃取柱 SPE 的高选择性，可为这些复杂的样品提供更加洁净的萃取物，从而在分析这些低浓度分析物时实现极佳的性能。虽然所选的分析物仅代表不断增加的 PDE-5 药物衍生物库的母化合物，但本研究提供了制备好的化学品，可供直接使用或根据需要进行修改以适应较大的分析物列表。样品前处理选择过程可应用于复杂性不同的其他基质，并且可根据不同的分析物进行定制，以实现更高的样品洁净度和方法性能。

参考文献

1. M. Blumenthal, A. Lindstrom, C. Ooyen, M. E. Lynch. *HerbalGram*, **99**, 60 (2013).
2. M. Nicoletti. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 2 (2012).
3. P. A. Cohen, J. C. Travis, B. J. Venhuls. *Drug Test Anal.* (2013).
4. F. Song, A. El-Demerdash, S-J. S. H. Lee. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **70**, 40 (2012).

获取更多的信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

附录

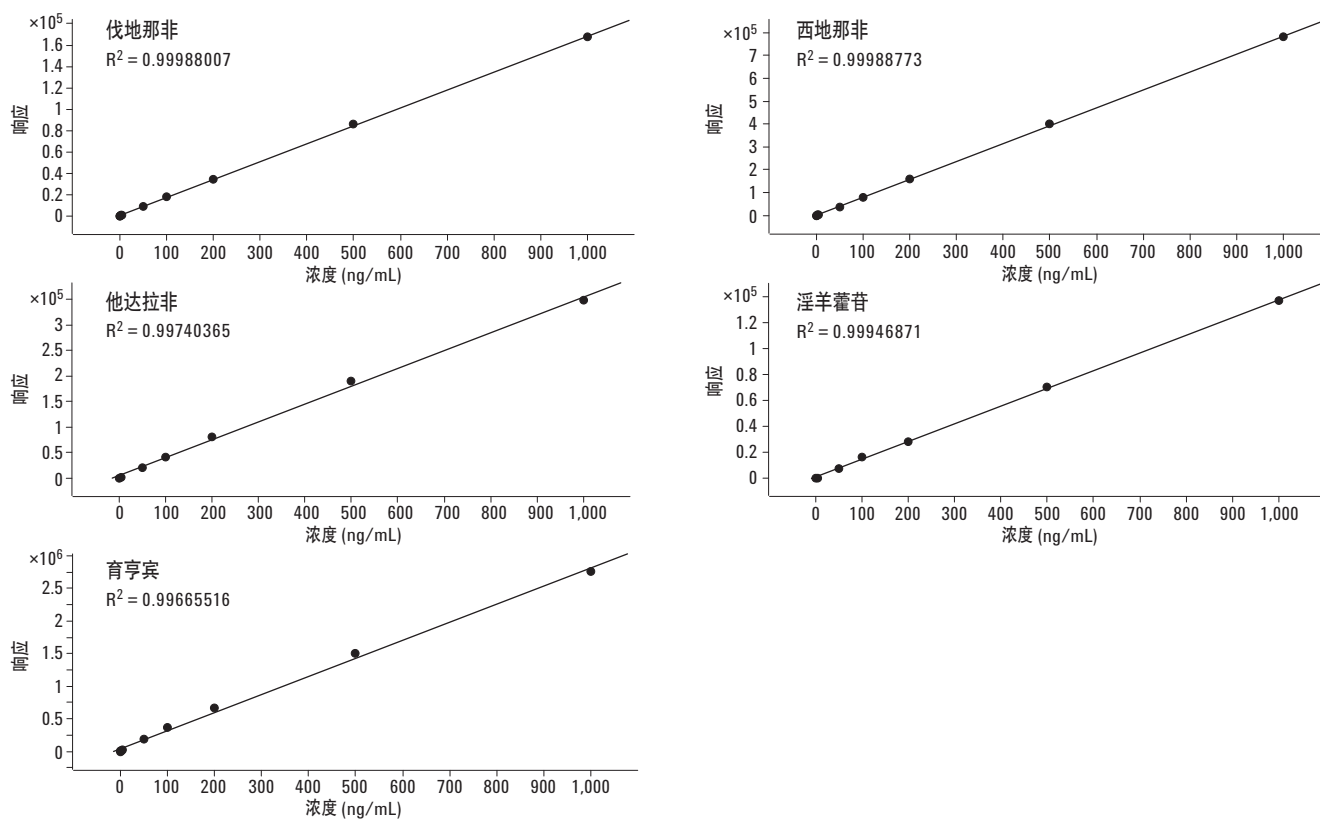


图 5. 使用 1 至 1000 ppb 伐地那非、西地那非、他达拉非、淫羊藿苷和育亨宾生成的校准曲线

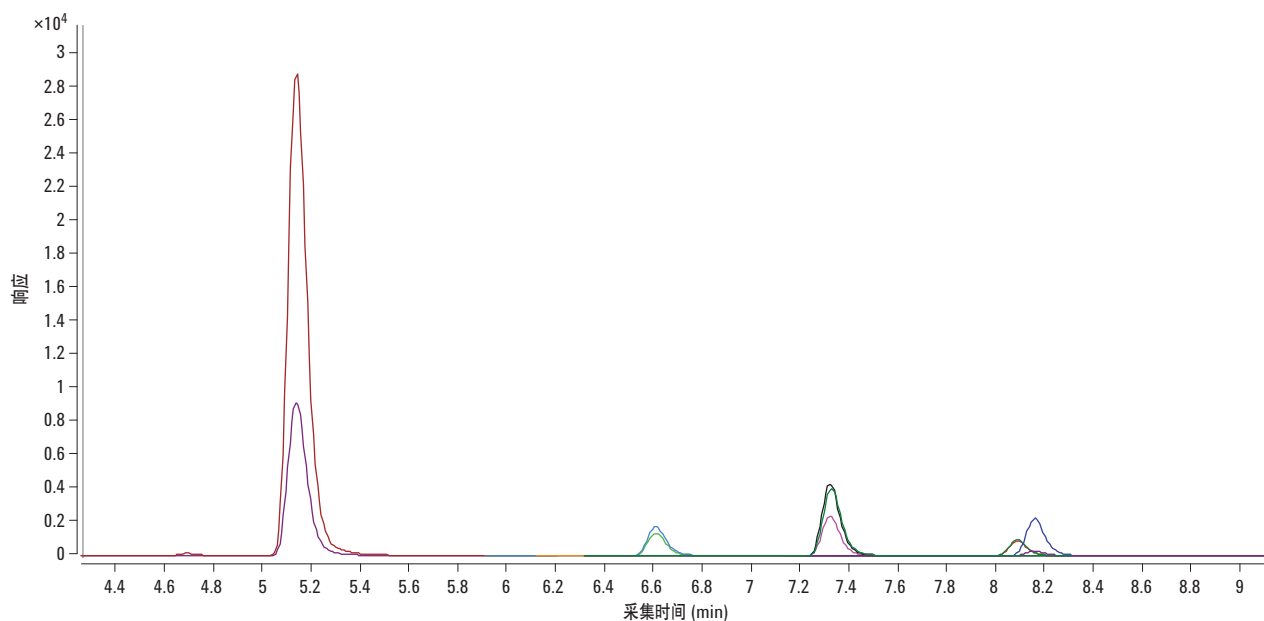


图 6. 50 ppb 分析物主要离子对和次要离子对的 MRM 叠加色谱图

表 4. 分析物 MS 参数和保留时间

分析物	MRM 1, 碰撞能量 (V)	MRM 2, 碰撞能量 (V)	裂解电压 (V)	T _R (min)
育亨宾	354.9 > 143.9 (25)	354.9 > 211.9 (20)	175	5.138
伐地那非	489.0 > 151.0 (30)	489.0 > 311.8 (40)	135	6.610
西地那非	475.0 > 57.7 (50)	475.0 > 100.0 (30)	135	7.317
西地那非-d8	483.4 > 108.0 (30)	--	135	7.324
淫羊藿苷	676.9 > 368.6 (20)	676.9 > 530.6 (10)	125	8.082
他达拉非	390.0 > 268.0 (5)	390.0 > 135.0 (10)	135	8.154

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本资料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的直接或间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014

2014 年 2 月 3 日，中国印刷

5991-3638CHCN



Agilent Technologies