

中成药保健食品中西地那非的液质联用确证方法研究

梁 祈^{1,2}

(1. 南方医科大学南方医学院药学部, 广东 广州 510515; 2. 广东省药品检验所研究室, 广东 广州 510180)

摘要: 通过提高去簇电压 (declustering potential) 的方式促使西地那非准分子离子在进入 Q_1 前发生碰撞诱导解离, 产生一级碎片离子, 然后采用三重四极杆质谱仪的 MS^2 模式对其中丰度较大的碎片离子进行质谱分析, 从而获得 ESI- MS^3 碎片离子信息, 并以此探讨西地那非主要裂解途径, 确定裂解产生的 4 个主要碎片离子。在此基础上建立液相色谱-质谱多反应监测模式, 测定这 4 个碎片离子的色谱峰, 建立的确证方法有较高的检测灵敏度, 测定结果清晰、明确、易于判定, 具有超过规定要求的 4 个鉴别点, 完全能满足成分复杂的中成药和保健食品样品添加西地那非的确证检验。

关键词: 西地那非; 液相色谱-电喷雾离子化质谱; 确证方法

中图分类号: O 657. 63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2008)05-295-06

Verification Method for Sildenafil in Chinese Traditional Patented Medical Preparations and Dietary Supplements by LC-MS/MS

LIANG Qi

(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Guangdong Provincial Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

Abstract: With the declustering potential increasing, the collision-induced dissociation of the quasi-molecular ions of sildenafil took place before the ions enter Q_1 , and the primary fragment ions were generated. With the fragment ions as precursor ions respectively, information of the ESI- MS^3 ions was acquired by mass-spectrum analysis in MS^2 mode with a tandem mass spectrometer, and the fragmentation behavior of sildenafil was discussed. The 4 main fragment ions generated in the fragmentation were confirmed. Based on the determination of these 4 ions, a method of liquid chromatography coupled with electrospray ionization-multi-reaction monitoring was established for the verification of sildenafil. The method has a highly sensitivity, and the results are clear and easy to make a judgement. Having more than 4 identification points required in an official document, the method fully meets the requirement for the verification of sildenafil added in Chinese traditional patented medicinal preparation and dietary supplements.

Key words: sildenafil; liquid chromatography-electronic spray ionization mass mass (LC-ESI-MS/MS); verification method

枸橼酸西地那非 (sildenafil citrate) 化学名称为: 1-(4-乙氧基-3-[5-(6,7-二氢-1-甲基-7-氧代-3-丙基-1H-吡唑并[4,3d]嘧啶)]苯磺酰)-4-甲基哌嗪枸橼酸盐, 分子式为 $C_{22}H_{30}N_6O_4S \cdot C_6H_8O_7$, 结构式示于图 1, 商品名称为 Viagra, 俗称“伟哥”, 是美国辉瑞制药公司新开发的治疗男性勃起功能不良 (erectile dysfunction, 简称 ED) 的一种药物。自 1997 年 3 月由美国食品与药品管理局 (FDA) 批准上市以来, 应用证实该药疗效确切。

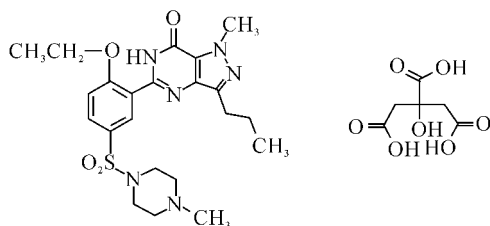


图 1 枸橼酸西地那非结构式

Fig. 1 The structure of the sildenafil citrate

然而, 在西地那非的使用过程中发现其可导致卧位低血压, 若同时服用硝酸酯类或含硝酸根的药物, 效果更为明显, 严重者可引起心肌梗死甚至死亡。近年来, 一些造假分子利用人们普遍对中药无毒、无副作用的认识误区, 在补肾壮阳类中药制剂和保健食品中大量非法添加枸橼酸西地那非。由于制造工艺不规范, 使得假药的含量均匀性很差, 有些含量远远超过安全剂量范围, 加上使用者不知实情, 因此给消费者带来巨大危害。

针对补肾壮阳类中成药和保健食品中非法添加西地那非的检测, 已有试剂反应快速检测法^[1]、薄层色谱法和高效液相色谱法^[2-3]。确证方法有国家食品药品监督管理局补充检验方法 200609 (简称补法)^[4], 该方法采用液质联用法比较供试品的高效液相色谱峰与西地那非对照品色谱峰保留时间以及对应色谱峰的一级质谱及二级质谱 (质量扫描范围 m/z 100~1 000) 是否一致, 以确证供试品中是否含有西地那非。由于该方法质量扫描范围宽, 致使灵敏度低, 供试品中西地那非含量低时二级质谱中有些碎片离子

峰缺失, 使结果判断困难。另外, 中成药和保健食品的成分复杂, 方法灵敏度低, 这就要求样品溶液高浓度进样, 导致样品对色谱柱和离子源产生较大的污染。

本工作通过提高去簇电压的方式促使西地那非准分子离子在进入 Q_1 前发生碰撞诱导解离, 产生一级碎片离子, 以这些碎片离子为前体离子, 在碰撞池进一步碎裂产生二级碎片, 即可获得三级质谱, 依据三级质谱推导出枸橼酸西地那非母核的质谱裂解途径。本方法是串联四极杆质谱仪获得多一级质谱创新技术, 对增强三重四极杆质谱仪检测功能, 应用于化合物质谱裂解途径研究具有重要意义。

本工作通过分析和讨论西地那非的质谱碎裂行为, 并在对其碎片进行较为细致的解析基础上, 拟建立多反应监测 (MRM) 模式进行测定西地那非的确证方法。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

HPLC-MS/MS 联用仪: 1100-API 3000, 配有自动进样器、电喷雾电离 (ESI) 源、Analyst 1.4 工作站; 高速离心机: E-HITACHI CR-21。

1.2 主要材料与试剂

枸橼酸西地那非 (纯度为 98.7%, 批号: 00151-QCS-18); 辉瑞制药有限公司产品; 甲醇、乙腈、乙酸、乙酸铵等为色谱纯; 润邦牌玖玖胶囊 (批号: 2006/08/18); 国家药品食品监督管理局补肾壮阳类中成药添加西地那非专项监督抽样检品。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 UG120 C_{18} 不锈钢色谱柱 (2.0 mm×150 mm, 5 μ m); 日本资生堂产品; 色谱保护柱 C_{18} (2.0 mm×4 mm, 5 μ m); 美国菲罗门产品; 流动相 (1): V (乙腈): V (甲醇): V (0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液) = 10: 55: 35; 流动相 (2): V (乙腈): V (甲醇): V (0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液, 0.1% 甲酸) = 10: 55: 35; 流动相 (3): V (乙腈): V (甲醇): V (0.2% 三乙胺溶液) = 40: 30: 30; 流速: 0.250 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μ L。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子化源; 正离子检测方式; 离子源喷射电压: 5.5 kV; 离子源温度: 400 °C; 离子喷雾气流速: 800 mL · min⁻¹。

MRM 质谱条件(1): MRM 扫描方式; 相对碰撞能分别为(m/z 475.0~311.3)42%, (m/z 475.0~299.1)53%, (m/z 475.0~283.3)53%, (m/z 475.0~255.1)66%。

MRM 质谱条件(2): MRM 扫描方式; 相对碰撞能分别为(m/z 475.0~311.3)36%, (m/z 475.0~299.1)45%, (m/z 475.0~283.3)45%, (m/z 475.0~255.1)50%。

1.4 枸橼酸西地那非标准溶液的配制

称取 6.51 mg 枸橼酸西地那非对照品, 加流动相溶解并稀释至每 1 mL 含西地那非 0.914 μg, 摇匀, 作为对照品溶液。

1.5 供试品溶液的配备

取样品研细, 精密称取约 0.3 g, 置于 50 mL 容量瓶中, 加上述流动相适量, 超声 10 min 使其溶解, 放置冷却至室温, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。放置过夜, 取上清液适量, 高速离心(10 000 r · min⁻¹), 精密吸取上清液 200 μL, 置于 10 mL 容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀即可。

2 结果与讨论

2.1 提高去簇电压以获得多一级碎片离子信息

使用三重四极杆质谱仪, 尝试通过提高去簇电压(declustering potential, DP)以获得多一级碎片离子信息, 进而更好地分析西地那非的质谱碎裂行为。去簇电压是加在锥体到预四极杆(Q₀)的电压, 目的是使进入锥体后的离子簇在飞行到 Q₀ 过程中进一步分裂, 最后产生单个带电荷的质子化离子(如[M+H]⁺)。合适的 DP 值取决于化合物的性质, 对于小分子化合物(相对分子质量小于 400~500), 其合适的 DP 一般小于 120 V。当继续升高 DP 时, 准分子离子飞行速度提高, 准分子离子与该区域中相对静态的粒子碰撞。在非弹性碰撞过程中, 准分子离子的平动能部分转变为热力学能。依据所转换的能量大小, 准分子离子被不同程度地活化, 进而发生各种碎裂反应, 产生多个初级碎片离子, 即发生第一次的碰撞诱导解离^[5]。然后以初级碎片离子为前体离子在 Q₁ 通过, 进入 Q₂ 进行第二次的碰撞诱导解离, 产生二级碎片离子, 在 Q₃ 进行检测, 从而完成了 ESI-MS³ 的测定, 使串联

三重四极杆获得多一级的碎片离子信息。

2.2 西地那非的质谱行为分析

采用电喷雾离子化单级(Q₁)模式对西地那非进行质谱分析, 正离子检测模式下取 DP=100 V 的测定结果, 示于图 1, 可看到有较强的准分子离子峰(m/z 475, [M+H]⁺), 而负离子检测模式下则未检测到准分子离子[M-H]⁻, 这与西地那非的性质有关。在西地那非结构中, 吡唑环、嘧啶环以及哌嗪环中的氮原子有孤对电子, 有较强的供电子能力, 易与 H⁺ 结合而形成准分子离子[M+H]⁺, 因而有较强的信号。从图 2 中还可以看到, 西地那非的聚合离子([2M+H]⁺, m/z 949)以及([M+Na]⁺, m/z 497)和([M+K]⁺, m/z 513)的信号均有一定强度。

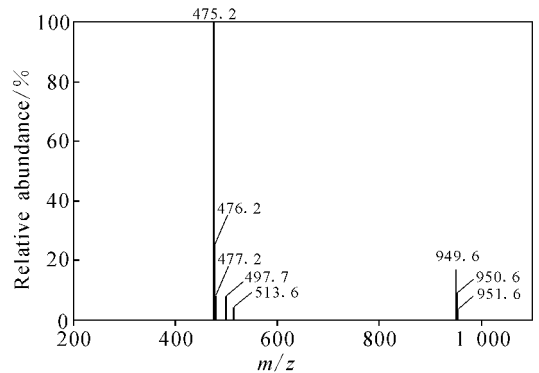


图 2 西地那非 ESI-MS 谱图(DP=100)

Fig. 2 ESI-MS of sildenafil (DP=100)

采用电喷雾离子化二级(MS²)模式对西地那非进行质谱分析, 正离子检测模式下以准分子离子为前体离子(m/z 475), 取 DP=100 V, MS/MS 的相对碰撞能为 53%, 测定结果示于图 3, 主要得到 4 种碎片离子, 分别为 A 离子(m/z 299)、B 离子(m/z 311)、C 离子(m/z 283)和 D 离子(m/z 255)。当提高 DP 值(DP=180 V)时, 采用 Q₁ 模式对西地那非进行质谱分析, 结果示于图 4, 同样可得到这 4 种离子。

采用 DP=180 V 分别对以上 4 种离子以 MS² 模式进行质谱分析, 正离子检测结果列于表 1, 以进一步分析西地那非的质谱行为特征。

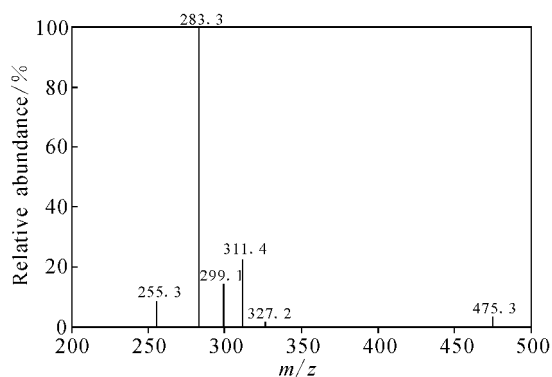
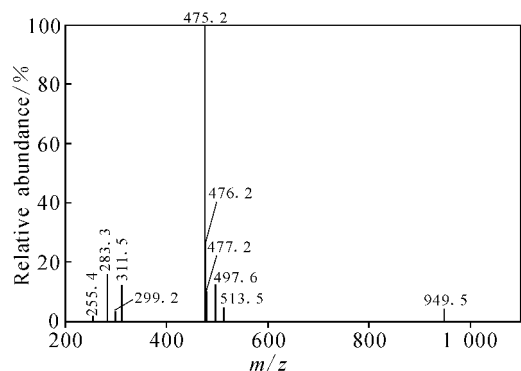
图 3 西地那非 ESI-MS² 谱图 (DP=100)Fig. 3 ESI-MS² of sildenafil (DP=100)

图 4 西地那非 ESI-MS 谱图 (DP=180)

Fig. 4 ESI-MS of sildenafil (DP=180)

表 1 西地那非多级质谱信息

Table 1 ESI-MSⁿ ($n=1\sim 3$) of sildenafil

分子质量	MS [M+H] ⁺	MS ² m/z	MS ³ m/z (相对丰度/%)
474	475	311	311(15), 283(100), 255(28)
		299	299(100), 166(35)
		283	283(100), 255(32)
		255	255(100), 226(42), 211(32), 136(32)

2.3 西地那非质谱行为的特征

依据获得的西地那非 ESI-MSⁿ ($n=1\sim 3$) 多级质谱信息以及结构特征, 对其裂解途径作以下分析。途径 A: 首先, 磺酰基上的一个氧重排到苯环的邻位, 成一个四元环结构, 这时 S 原子带一对孤对电子。然后, 苯环 C—S 之间的键断裂, 接着 O—S 键断裂, 形成过渡离子 A₀ (m/z

327)。过渡离子 A₀ 丰度较低, 仅为基峰的 2% (见图 3), 提示该离子相对不稳定, 它将失去一个 CO 中性分子形成较为稳定的 A 离子 (m/z 299)。Wang 等^[6] 采用持续非共振辐射碰撞诱导解离 (SORI-CID) 的条件, 对磺胺甲恶唑类似的重排和裂解做了深入地研究。途径 B: 裂解机制为磺酰基 S—C 键的电荷诱导, 消除而得到 B 离子 (m/z 311)。途径 C: B 离子通过碰撞诱导解离反应, 失去一中性分子乙烯形成 C 离子 (m/z 283)。途径 D: C 离子通过碰撞诱导解离反应, 失去一个中性分子 CO 形成 D 离子 (m/z 255)。碎片 A、B、C、D 的裂解机制示于图 5。

2.4 西地那非确证方法的建立

对于化合物确证方法建立的指导原则, 目前的官方文件仅见于欧共体 2002 年 8 月 12 日的会议决议《关于分析方法评价和结果诠释》^[7]。依照该决议, 采用液相色谱-质谱分析方法确证化合物时, 需要获得不少于 3~4 个鉴别点 (identification points)。也就是, 采用 LC-MS/MS 方法检测 1 个母离子及其 2 个子离子, 与对照物质溶液测定结果比较, 供试品溶液色谱峰有相同的保留时间以及质谱中相对于基峰的离子强度 (最大允许限度范围列于表 2) 具有 4 个鉴别点, 这样化合物就获得确证。

表 2 几种质谱技术进行化合物确证
相对离子强度的最大允许范围

Table 2 Maximum permitted tolerances for relative ion intensities using a range of mass spectrometric techniques

相对离子强度/%	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ
> 50%	± 20%
> 20%~50%	± 25%
> 10%~20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

由前面的分析, 采用 MS² 模式对西地那非进行质谱检测可检测到 4 个稳定的碎片离子, 其离子丰度较大, 因此, 可经液相色谱与干扰物质分离后, 以多反应监测 (MRM) 模式测定这 4 个离子。通过比较对照品溶液与供试品溶液离子色谱峰的保留时间及质谱中各离子相对基峰的强度百分数而获得超过 4 个鉴别点, 因而满足确证要求。

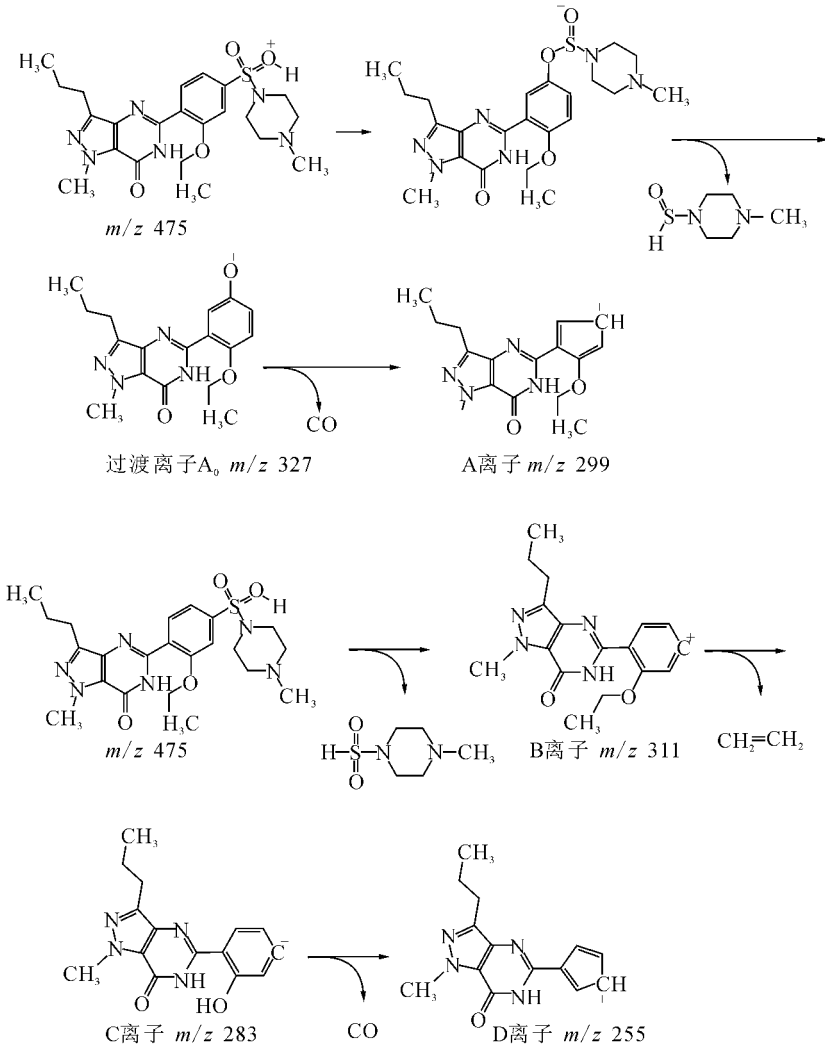


图 5 碎片 A、B、C、D 的裂解机制

Fig. 5 The proposed formation pathways of fragments A, B, C and D

对照品溶液及供试品溶液按 1.4 和 1.5 中的方法制备,检测条件见 1.3,考察不同的色谱条件和质谱条件对测定的影响,测定结果列于表 3。

对照品溶液和供试品溶液多次测定结果显示,采用 LC-MRM 测定各离子的峰面积或峰高与基峰比较的相对强度有很好的精密度和一致性,按峰面积的方式比按峰高的方式得出的结果精密度更高,而这正是西地那非液相色谱行为的反映,由串联在质谱检测之前的 UV 检测器测定结果可作为佐证。尽管如此,采用峰面积和峰高方式得出对照品溶液与供试品溶液对应离子与基峰比较的相对强度的一致性却无差异。这

是因为峰高方式各测定值的离散度虽稍大,但其统计结果是趋于恒定的,因此,确证方法以按峰面积和峰高方式测定均可。

表 3 还显示,富质子气氛的方法 2 较中性缓冲盐溶液的方法 1 有略高的灵敏度,而缺质子气氛的方法 3 的灵敏度整整下降了两个数量级,这显然是质子气氛影响 $[M+H]^+$ 离子形成的结果,然而各离子与基峰的相对强度趋于恒定值。改变质谱条件(如相对碰撞能)会改变离子的峰高和峰面积,但各离子与基峰的相对强度趋于各自的恒定值。因此,均不影响该化合物的确证,但方法 3 测定灵敏度太低,是不可取的。

表 3 西地那非的 LC-MRM 测定结果
Table 3 The determination results of sildenafil by LC-MRM

方法	样品	保留时间 /min	C 离子(基峰离子, 475/283)		B 离子(475/311)		A 离子(475/299)		D 离子(475/255)	
			峰面积 / $\times 10^6$	峰高 / $\times 10^4$	峰面积 相对强 度/%	峰高相 对强度 /%	峰面积 相对强 度/%	峰高相 对强度 /%	峰面积 相对强 度/%	峰高相 对强度 /%
1	对照品溶液 Ave	8.05	1.67	4.70	71.85	72.62	17.03	17.60	17.16	17.27
流动相(1)+	RSD(% , n=4)		0.83	2.62	0.53	4.90	0.40	5.18	2.00	4.27
MRM 条件(1)	供试品溶液 Ave	8.05	1.49	4.29	71.94	71.92	17.18	17.59	17.16	17.18
	RSD(% , n=4)		0.61	2.27	0.52	3.88	0.84	3.97	0.84	4.36
2	对照品溶液 Ave	3.92	1.89	9.10	72.78	71.51	16.95	16.94	17.66	17.68
流动相(2)+	RSD(% , n=4)		1.60	2.22	0.97	0.93	0.80	3.42	0.75	2.50
MRM 条件(1)	供试品溶液 Ave	3.92	1.68	0.81	71.94	71.92	17.18	17.59	17.16	17.18
	RSD(% , n=4)		0.77	2.18	0.52	3.88	0.84	3.97	0.84	4.36
3	对照品溶液 Ave	3.23	0.014 7	0.084 3	69.38	70.38	16.96	17.41	17.89	17.20
流动相(3)+	RSD(% , n=4)		2.001 3	5.72	1.75	6.62	2.02	1.92	1.97	6.69
MRM 条件(1)	供试品溶液 Ave	3.23	0.013 1	0.076 9	69.52	70.56	16.95	17.44	17.48	17.37
	RSD(% , n=4)		1.69	4.78	1.09	5.90	1.01	5.18	1.40	4.25
4	对照品溶液 Ave	8.04	1.21	3.36	73.44	72.42	21.44	22.15	9.17	9.18
流动相(1)+	RSD(% , n=4)		1.65	2.37	0.76	1.96	1.66	2.02	2.65	3.51
MRM 条件(2)	供试品溶液 Ave	8.05	1.08	3.00	73.38	72.87	21.46	22.20	9.15	9.20
	RSD(% , n=4)		0.76	1.13	0.61	1.29	2.56	3.10	0.87	4.34

2.5 与补充检验方法 2006009 的比较

两种方法按上述仪器条件测定样品(添加枸橼酸西地那非的中成药),并都以西地那非准分子离子(m/z 475)为前体离子,本方法的信噪比(S/N 约为 2 200)优于补法(S/N 约为 260)近 10 倍。并且当将供试品溶液进一步稀释,按补法测定的总离子色谱峰低于 10 000 时,质谱中有些碎片离子峰缺失,使结果难以判断;而按本法测定各离子色谱峰峰形及与基峰比较的相对强度无明显变化。这是由于补法在 m/z 100~1 000 范围内扫描检测,有很大部分检测数据是无用的,而本法只检测关注的 4 个离子,检测有效数据的效率要高得多。

此外,采用全扫描方式得到的质谱图是一次扫描的结果,具有某种程度上的偶然性,而本法测定各离子色谱峰面积则是多次扫描积分的结果,具有统计意义,更能精确地反映各离子的相对强度,获得较补法高得多的有效信息量。

因此,在对成分复杂的中成药和保健食品样品进行成分确证时,为减少基体对色谱和质谱系

统的污染,本法可采用低于补法要求 10 倍以上浓度的供试品溶液测定,而结果清晰、明确、易于判断。

2.6 结论

化合物色谱峰保留时间以及各离子与基峰的相对强度取决于待分析化合物的内在性质,具有极高的专属性,通过检测不少于 2 个离子对,化合物可获得确证。本工作通过分析待确证化合物质谱行为,找出质谱中丰度较大的碎片离子,建立液相色谱-质谱多反应监测模式测定多个碎片离子的化合物确证方法。由于仅测定几个特征离子,且每个离子都可获得最优条件检测,建立的确证方法检测有效数据的效率高,使得检测灵敏度相应提高,同时结果清晰、明确、易于判断。本方法未见用于化合物确证检测的报道,对采用色谱-串联质谱联用建立化合物确证方法有示范作用,可应用于司法鉴定等检验,建立灵敏、有效和可靠的化合物确证方法。

(下转第 320 页)

- [56] SUZUKI K T, OHTA Y, SUZUKI N. Availability and metabolism of ^{77}Se -methylseleninic acid compared simultaneously with those of three related selenocompounds[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 217: 51-62.
- [57] SUZUKI K T, DOI C, SUZUKI N. Metabolism of ^{76}Se -methylselenocysteine compared with that of ^{77}Se -selenomethionine and ^{82}Se -selenite[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 217:185-195.
- [58] KÁPOLNA E, SHAH M, CARUSO J A, et al. Selenium speciation studies in Se-enriched chives by HPLC-ICP-MS[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101:1 398-1 406.
- [59] 铁梅, 方禹之, 孙铁彪, 等. HPLC-ICP-MS 联用技术在富硒金针菇硒的形态分析中的应用[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(4): 635-639.
- [60] HUERTA V D, REYES L H, MARCHANTE-GAY Y J M, et al. Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS[J]. *J Anal At Spectrom*, 2003, 18:1 243-1 247.
- [61] GOENAGA-INFANTE H. CCQM-P86: Total selenium and selenomethionine in pharmaceutical supplements[C]. Paris, 2006.
- [62] RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ P, MARCHANTE-GAY Y J M, ALONSO J I G, et al. Isotope dilution analysis for elemental speciation; a tutorial review [J]. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2005, 60(2):151-207.
- [63] ALEXANDER J F, KYSER T K K, DON C, et al. Fabrication of solid calibration standards by a sol-gel process and use in laser ablation ICPMS [J]. *J Anal At Spectrom*, 2008,23:244-248.
- [64] TASTET L, SCHAUMLÖFFEL D, LOBINSKI R. ICP-MS-assisted proteomics approach to the identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast [J]. *J Anal At Spectrom*, 2008,23:309-317.

=====

(上接第 300 页)

参考文献:

- [1] 朱炳辉, 林生文, 梁 祈. 药品、保健品和食品中枸橼酸西地那非掺杂的测定方法: 中国, ZL 2004 10026583.1[P]. 2006-09-13.
- [2] 张启明, 尹 华, 黄海伟, 等. 检查中药中非法掺入枸橼酸西地那非的方法研究[J]. *药物分析杂志*, 2002, 22(4): 315-317.
- [3] GRATZ S R, FLURER C L, WOLNIK K A. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36: 525-533.
- [4] 中国药品生物制品检定所. 液质联用(HPLC/MS/MS)分析鉴定西地那非和他达拉非的补充检验方法[S]. 国家食品药品监督管理局, 2006.
- [5] 陈耀祖, 涂亚平. 有机质谱原理及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 92-94.
- [6] WANG H Y, ZHANG X, GUO Y L, et al. Sulfonamide bond cleavage in benzenesulfonamides and rearrangement of the resulting p-aminophenyl-sulfonyl cations; application to a 2-pyrimidinyl-oxo-benzylaminobenzenesulfonamide herbicide [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19: 1 696-1 702.
- [7] Official Journal of the European Communities. Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results[C]. 2002.