

LC-MS 检测金锁固精丸中非法添加的枸橼酸西地那非

任淑玲, 朱旭江(甘肃省药品检验所, 兰州 730000)

摘要: 目的 采用液质联用技术检测金锁固精丸中非法添加的枸橼酸西地那非。方法 选用 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 5 μm), 以乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液梯度洗脱, 对此制剂的提取液进行液质联用分析, 通过与对照品的色谱和质谱行为比较, 检测此制剂中枸橼酸西地那非成分。结果 在该金锁固精丸中检出枸橼酸西地那非。结论 本方法简便、灵敏、准确, 专属性强, 可分析检测此制剂中的枸橼酸西地那非。

关键词: 枸橼酸西地那非; 液质联用; 检测

中图分类号: R917.101; R286 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2010)04-0358-03

Determination of Sildenafil Citrate Illegally Mixed into Jinsuo Gujing Pills by LC-MS

REN Shuling, ZHU Xujiang(*Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To detect sildenafil citrate illegally mixed into Jinsuo Gujing pills by LC-MS. **METHODS** The sildenafil citrate of Jinsuo Gujing pills was analyzed through a C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 5 μm), using the mobile phase of acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate by gradient elution. **RESULTS** Sildenafil citrate were found in the drugs. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and accurate. It can be used to detect sildenafil citrate mixed into illegal drug. **KEY WORDS:** sildenafil citrate; LC-MS; determination

作者简介: 任淑玲, 女, 副主任药师 Tel: 13919842854 E-mail: rens11963@126.com

近年来,不法分子受利益驱使,在补肾壮阳类中成药及中药保健品中非法添加枸橼酸西地那非,夸大宣传疗效,高价销售药品,谋取高额非法利润,在临床中出现了严重不良反应,甚至导致死亡^[1]。

金锁固精丸为国家批准的纯中药制剂。它的功效为固肾涩精,由沙苑子、淫羊藿等十余味药组成,属补肾壮阳类中成药。在监督抽验中,按国家已发布补充检验方法和检验项目批件(简称补充方法)检验时,对枸橼酸西地那非的分离效果不是十分理想,原因可能是其化学成分非常复杂,加上不同制剂受处方与制作工艺(如粉碎、煎煮、蒸馏、添加辅料等)影响,使本身原有的成分在此条件下干扰被测成分。因此本试验对补充方法进行了改进,使其能够完全排除干扰,缩短试验时间,有效检测“金锁固精丸”中非法添加的枸橼酸西地那非^[2-3]。

1 仪器与试剂

美国 Waters 公司液相色谱/四极杆串联质谱联用仪 Alliance 2695-TQD 型,电喷雾离子化源(ESI),电子分析天平 AE163 型,枸橼酸西地那非对照品(中国药品生物制品检定所,含量:99.8%),甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为超纯水,金锁固精丸来自药店。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: C₁₈(2.1 mm×100 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 预柱 Guard Column(2 PK)(2.1 mm×10 mm, 5 μm); C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 乙腈(A)和 0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(B)为流动相,按下表梯度洗脱;流速为 0.2 mL·min⁻¹;进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱顺序

Tab 1 The sequence of gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~10	27	73
10~20	27~50	73~50
20~30	50~80	50~20
30~40	80	20
40~43	80~27	20~73
43~50	27	73

2.2 质谱条件

电喷雾离子化源(ESI); m/z 范围: 90~1 000; 毛细管电压为 3.5 kV; 毛细管脱溶剂气(N₂) 400 L·h⁻¹; 锥孔电压: 55 V; 锥孔反吹气 50 L·h⁻¹,

正离子检测。扫描方式采用全扫描一级质谱,选择离子二级全扫描质谱检测(MS/MS)。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取枸橼酸西地那非对照品 5 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 200 μg·mL⁻¹ 的储备液,再将储备液用 A-B (50:50)的溶液稀释得到 10 μg·mL⁻¹ 的标准溶液,在高效液相色谱串联质谱仪上测定。

2.4 样品溶液的制备

取本品 1 丸剪碎,混匀,取 0.5 g 精密称定,置锥形瓶中,精密加 A-B(50:50)的溶液 100 mL,称定重量,超声使溶解,直至溶液中无大颗粒状物质,放冷至室温,再称定重量,补充缺失溶剂,摇匀,离心,取上清液,过滤,滤液作为供试品溶液,在高效液相色谱串联质谱仪上测定。

3 结果

3.1 枸橼酸西地那非对照品的色谱及质谱行为

用正离子扫描方式对枸橼酸西地那非对照品进行 LC/MS 分析,其色谱保留时间为 11.98 min,见图 1;一级全扫描质谱得到准分子离子[M+H]⁺ 为 m/z 475.35;对 m/z 475.35 进行二级全扫描质谱分析,得到主要碎片离子有 m/z : 99.12, 283.46, 311.21, 见图 2。

3.2 样品溶液分析

在相同条件下,对样品溶液进行 LC-MS 分析,通过一级全扫描质谱检测到枸橼酸西地那非的准分子离子,其质荷比和液相色谱保留时间与枸橼酸西地那非对照品相同,对准分子做二级全扫描质谱分析,得到与对照完全一致的碎片离子,相应图谱见图 3。结合色谱保留时间、准分子离子和多级质谱裂解碎片 3 方面的信息,经与对照品的比较,可测得该金锁固精丸中含有的枸橼酸西地那非。

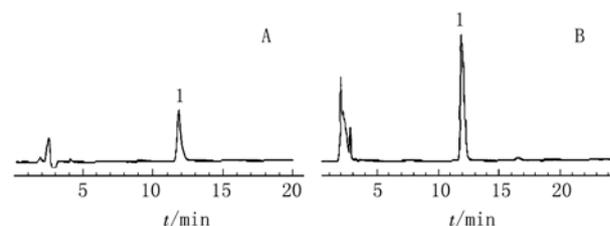


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-样品; 1-枸橼酸西地那非

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standards; B-sample; 1-sildenafil citrate

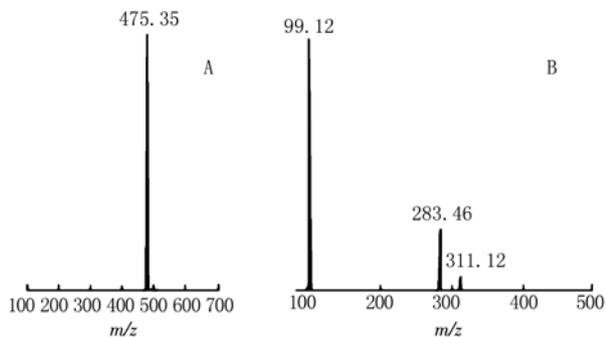


图2 枸橼酸西地那非对照品质谱图

A—一级质谱图；B—二级质谱图

Fig 2 The full scan spectra and ms/ms of sildenafil citrate(ESI+)

A—mass spectrogram; B—tandem mass spectrometry

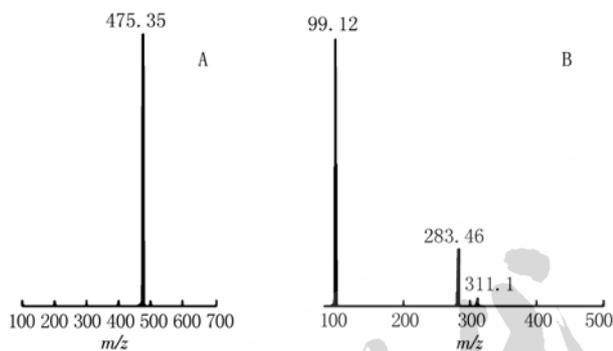


图3 样品质谱图

A—一级质谱图；B—二级质谱图

Fig 3 The full scan spectra and ms/ms of sample (ESI+)

A—mass spectrogram; B—tandem mass spectrometry

4 讨论

调整了梯度洗脱比例与流速($0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), 能使金锁固精丸中的枸橼酸西地那非分离达到要求。对两种色谱柱 $C_{18}(4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m})$, $C_{18}(2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}, 5 \mu\text{m})$ 进行比较, 在“2.1”条件下均能达到分离要求, 但前者时间较长, 因此选用后者色谱柱, 节约了时间, 降低了成本。

在临床上枸橼酸西地那非推荐剂量为: 首次剂量 50 mg, 性生活前 1 h 服用, 之后根据患者对药物反应情况调整用药剂量, 最大量为 100 mg。每周至少服用 1 次, 2 次服药隔时间不能少于 24 h。并且许多因素影响血浆中西地那非水平, 例如年龄、肝脏受损、药物等均可引起血浆中西地那非水平增高。超剂量服用、身体因素、药物配伍均可能增加不良事件发生率, 因此除了定性检测外, 有必要进行定量检测, 评价其非法制剂对患者身体的危害性。本试验测得线性相关系数为 0.999 6, 回收率为 99.6%, 精密度试验 RSD 为 1.4%, 证明改进后的方法可用于定量检测。

最低检出限: 取对照品溶液, 用乙腈-0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(50:50)的混合溶液不同比例稀释后测定, 以信噪比等于 3 计算, 结果枸橼酸西地那非的最低检出限为 $0.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

对标识为不同生产厂的 3 批样品进行测定, 结果 A 厂 1 批(批号: 20070814), 检出枸橼酸西地那非($19.3 \text{ mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)。B 厂 2 批(批号: 2008063, 20080738), 未检出。

REFERENCES

- [1] KANG J, LIU A N. Determination of sildenafil citrate added illegally mixed into traditional Chinese medicinal preparation for invigorant [J]. Pract Pharm Clin Rem(实用药物与临床), 2006, 9(3): 178-179.
- [2] ZHANG Q M, YIN H, HUANG H W, et al. Studies on the methods for determining sildenafil citrate illegally mixed in traditional Chinese medicine preparations [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2002, 22(4): 315-317.
- [3] ZHANG C Y, LI Z G, XU J L, et al. Qualitative and quantitative analysis of sildenafil citrate added illegally mixed into traditional Chinese medicinal preparation for invigorant by UPLC/MS/MS [J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2007, 17(10): 1741-1742, 1812.

收稿日期: 2009-06-01