

超高效液相色谱法测定露酒中的枸橼酸西地那非 Detection of Sildenafil Citrate in the Liqueur by Ultra Performance Liquid Chromatography

农 军, 吕仕军, 段玉林, 缪 璐, 咎川南, 陀雄信

NONG Jun, LV Shi-jun, DUAN Yu-lin, MIAO Lu, ZAN Chuan-nan, TUO Xiong-xin

(广西产品质量监督检验院, 广西南宁 530022)

(Guangxi Product Quality Supervision and Testing Institute, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:为了建立露酒中非法添加枸橼酸西地那非的一种快速、准确、灵敏高的专属性检测方法,采用反相超高效液相色谱法,以 C_{18} 柱(2.1mm×100mm, 1.7 μ m),柱温30℃,检测波长293.6nm,流动相为乙腈:水:冰醋酸:三乙胺(35:65:0.8:0.4;V/V),流速0.15ml/min的条件进行实验。结果枸橼酸西地那非在0.05~50 μ g/ml范围内线性关系良好,相关系数 $r=0.9998$,平均回收率为98.93%, $RSD=1.86\%$ 。建立的方法准确、可靠,可以用于露酒中枸橼酸西地那非的含量检测。

关键词:超高效液相色谱 枸橼酸西地那非 露酒

中图分类号:O657.72 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2010)03-0252-03

Abstract: In order to establish a quick, accurate, sensitive method for analysis of sildenafil citrate, which illegally added into the liqueur, reversed phase ultra performance liquid chromatography was used. The column was C_{18} 2.1 × 100mm. Column temperature was 30 C. The mobile phase was acetonitrile : water : acetic acid : triethylamine (35 : 65 : 0.8 : 0.4; V/V) with flow rate 0.15 ml/min and the detection wavelength was 293.6 nm. The linear range of the calibration curve of sildenafil citrate were 0.05~50 μ g/ml ($r=0.9998$). The mean rates of recovery was 98.93% and the relative standard deviations ($n=6$) was 1.86%. The method is accurate, reliable that can be used to determine sildenafil citrate in the liqueur.

Key words: ultra performance liquid chromatography, sildenafil citrate, liqueur

枸橼酸西地那非(Sildenafil citrate, 俗称“伟哥”)是人体海绵体中V型磷酸二酯酶的选择性抑制剂,为万艾可的主要活性药物成分,是美国食品及药品管理局(FDA)批准用于治疗男性性功能障碍的处方药^[1~3]。枸橼酸西地那非原料相对便宜,添加到露酒中可增强其抗疲劳的功能效果,因此有部分厂家违法添加。

枸橼酸西地那非是严禁在食品和保健品中添加的,其副作用会导致头晕、头痛、鼻塞和视觉异常等症状,对于心血管患者,有可能导致突然死亡^[4~10]。

因此,检测露酒中枸橼酸西地那非的含量对人体健康有着重要的意义。

目前露酒中的枸橼酸西地那非还没有相应的检测标准。本文首次采用超高效液相色谱法检测露酒中枸橼酸西地那非的含量。该方法具有快速、准确、灵敏度高的优点。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

主要仪器为 Waters UPLC 型超高效液相色谱仪(PDA)。主要试剂有:枸橼酸西地那非对照品(纯度在99.5%以上),甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯),冰醋酸(优级纯),三乙胺(化学纯),水(超级纯),露酒(市售,酒精度28%,生产日期2010040801)。

收稿日期:2010-06-06

作者简介:农 军(1966-),高级工程师,在读硕士研究生,主要从事化工、食品分析。

1.2 色谱条件

Waters 超高效液相色谱柱为 C₁₈柱(2.1mm×100mm,1.7μm),流动相为乙腈:水:冰醋酸:三乙胺(35:65:0.8:0.4;V/V)。检测波长 293.6nm,柱温 30℃,流速 0.15ml/min,进样量 5μl。

1.3 对照品溶液的配制

称取 0.0500g 的枸橼酸西地那非对照品,用甲醇:水=60:40(V/V)定容至 100ml,得浓度为 50μg/ml 的对照品溶液。取适量对照品溶液,分别用甲甲醇:水=60:40(V/V)稀释成 50μg/ml,125μg/ml,5μg/ml,1μg/ml,0.1μg/ml,0.05μg/ml 系列溶液。

1.4 样品处理

移取摇匀后的试样 5ml 至小烧杯中,在水浴中缓慢蒸至近干,加入 2ml 甲醇后超声萃取 3min,离心(4000~8000r/min)5min 后,经 0.45μm 滤膜过滤后备用。

2 结果与分析

2.1 样品前处理方法

露酒中含的多为糖类物质,糖类物质在甲醇中的溶解度较低,而枸橼酸西地那非完全溶于甲醇,所以可以直接用甲醇溶解处理后的样品,避免了过固相萃取柱的步骤^[11]。这样不但可以提高回收率,还可以降低检验成本,缩短检验时间,提高检测效率,便于在检测机构中推广使用。

2.2 检测波长的选择

取浓度为 50μg/ml 的枸橼酸西地那非标准溶液及露酒处理液,在 190~360nm 波长处扫描,在 228.4nm 和 293.6nm 处有吸收峰(图 1,图 2),因为在 293.6nm 吸收峰存在较少的干扰,其所得结果与文献^[4~6,12]也基本相符。故选用 293.6nm 为检测波长。

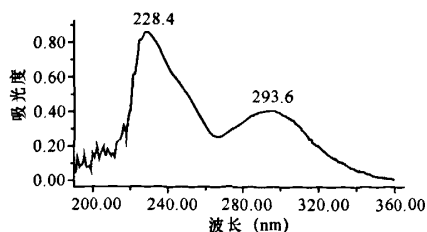


图 1 枸橼酸西地那非标准品的 2D 光谱

2.3 流动相的选择

在流动相中加入少量三乙胺是为了抑制或掩蔽固定相表面的游离硅醇基的活性,同时减少色谱峰

的拖尾,达到较好的分离效果^[4,12]。参考文献^[4,5,11,12]采用磷酸三乙胺(pH 值为 3.2)时,需要调节 pH 值,实际操作中比较麻烦。而参考采用文献^[6]所推荐的流动相,配置时不需调整 pH 值,操作简便,能达到较好的分离效果。我们在试验过程曾试用价格低廉的甲醇代替乙腈,但是发现目标产物出峰时间推后,而且峰型不太好(图 3),故本方法采用乙腈:水:冰醋酸:三乙胺=35:65:0.8:0.4(V:V:V:V)为流动相,被测组分出峰的保留时间为 3.569min(图 4)。

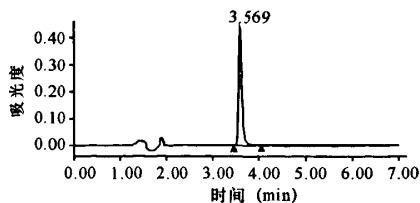


图 2 50.0μg/ml 枸橼酸西地那非在 293.6nm 处的 UPLC 色谱

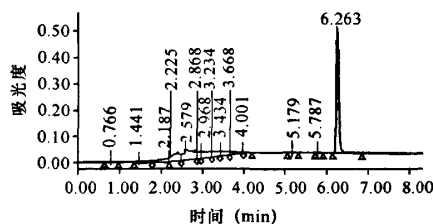


图 3 50.0μg/ml 枸橼酸西地那非标准液 UPLC 色谱(甲醇代替乙腈时的流动相)

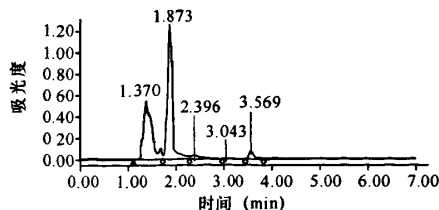


图 4 露酒中加标准对照品的 UPLC 色谱

2.4 线性关系及仪器检出限

取 50μg/ml,25μg/ml,5μg/ml,1μg/ml,0.1μg/ml,0.05μg/ml 系列溶液,分别进样 5μl,记录色谱峰峰面积,以峰面积与浓度作线性回归,得色谱条件下枸橼酸西地那非的线性回归方程为 $Y = 42869X - 94.73$, $r = 0.9998$ 。

图 5 结果表明,枸橼酸西地那非在 0.05~50μg/ml 浓度范围内色谱峰面积与浓度之间具有较好的线性关系,以信噪比为 3 时测得最低检出限量为 $6.98 \times 10^{-12} \mu\text{g}$ (响应值 $N = 2 \times 10^{-5}$,以峰面积为纵坐标,以枸橼酸西地那非的含量为横坐标得 Y

$= 8.6 \times 10^6 X - 94.73$, $b = 8.6 \times 10^6$, 检出限为 $3N/b$ 。不断地稀释对照品溶液, 当稀释到 0.5 ng/ml 时还有检测信号, 再向下稀释时信号不明显, 得出该方法的最低检出限为 0.5 ng/ml 。

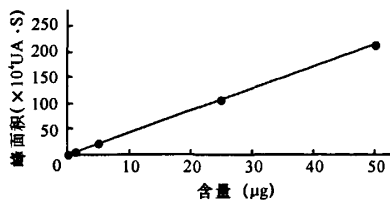


图5 枸橼酸西地那非的回归方程曲线

2.5 准确度实验

取浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液连续重复进样 6 次, 每次进 $5 \mu\text{l}$, 测得峰面积值的平均值为 2140979, $RSD = 0.34\%$ (表 1)。

表 1 准确度试验

样品编号	保留时间 (min)	峰面积 (UA · S)	平均峰面积 (UA · S)	RSD (%)
1	3.569	2145982	2140979	0.34
2	3.599	2138682		
3	3.589	2143276		
4	3.576	2129121		
5	3.538	2150131		
6	3.592	2138685		

2.6 加标回收率实验

取浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$ 的标液 1ml, 加入到 5ml 空白样品中, 在水浴中缓慢蒸至近干, 加入 5ml 甲醇后超声萃取 3min, 离心 ($4000 \sim 8000 \text{ r/min}$) 5min 后过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 平行测定 5 次, 得其标准平均回收率为 98.93% , $RSD = 1.86\%$ (表 2)。

表 2 回收率实验

样品	本底值	加标 (μg)	实测值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0	50	48.72	97.44	98.93	1.86
2	0	50	49.61	99.22		
3	0	50	48.43	96.86		
4	0	50	49.97	99.94		
5	0	50	50.63	101.26		

3 结束语

本实验采用超高效液相色谱作为露酒中枸橼酸

西地那非的最终检测方法, 所用的流动相简单, 分析时间短, 不需对样品进行复杂的预处理, 灵敏度高, 方法稳定可靠, 成本较低, 便于在食品检测机构中推广应用, 对露酒行业的监管能起到积极的作用。

参考文献:

- [1] Price D E, Gepi AS, Wareham K, et al. Sildenafil; Study of a novel oral treatment for erectile dysfunction in diabetic men[J]. Diabetic Med, 1998, 15: 821.
- [2] FDA. Center for drug evaluation and research[S]. Application Number 020895, 1998; 27.
- [3] 雷灼雨, 罗萍, 周渝南. 补肾壮阳药中非法加入西药“枸橼酸西地那非”的检出方法[J]. 中国药品标准, 2005, 6(5): 61-62.
- [4] 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]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1052-1054.
- [5] 韩采轩. 反相高效液相色谱法测定保健食品中的枸橼酸西地那非[J]. 中国热带医学, 2003, 3(1): 102-103.
- [6] 梁丽梅, 李桃. 高效液相色谱法测定脏鞭金丹、三肾丸中枸橼酸西地那非的含量[J]. 中药材, 2006, 29(11): 1247-1249.
- [7] 左海根, 占春瑞, 罗晓洪. 高效液相色谱-串联质谱法测定中药制剂中西地那非的含量[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(7): 541-544.
- [8] 潘恒亮, 赵士权, 黄徽, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中西地那非柠檬酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(2): 1971.
- [9] 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.
- [10] 张翠英, 李振国, 徐金玲, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定中成药中非法添加枸橼酸西地那非的研究[J]. 中成药, 2007, 29(9): 1315-1318.
- [11] 鲁杰, 扬大进, 方从容. 固相萃取-高效液相色谱法用于保健食品中违禁添加物枸橼酸西地那非的分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(9): 1565-1567.
- [12] 何彩, 仲岳桐, 姜杰, 等. 高效液相色谱法检测保健品中西地那非的方法研究[J]. 中国热带医学, 2008, 8(4): 656-658.

(责任编辑: 邓大玉)