

解吸附电晕束电离质谱法快速筛选保健食品中非法添加的 5 型磷酸二酯酶抑制剂

吴双¹ 王华¹ 朱慧果¹ 赵勇¹ 田青青¹ 孙文剑² 丁力² 陈波^{*1}

¹(湖南师范大学 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室, 长沙 410081)

²(岛津分析技术研发(上海)有限公司, 上海 201201)

摘 要 建立了解吸附电晕束离子源(DCBI)结合离子阱质谱快速检测保健食品中非法添加的 3 种磷酸二酯酶 5(PDE5)抑制剂(伐地那非、西地那非、他达拉非)的方法。采用一级质谱筛选,二级质谱确证,对样品中非法添加物进行定性鉴别;通过二级特征碎片离子进行半定量分析,并与传统高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)定量检测法对比。对 12 个市售保健品进行检测,DCBI-MS 定性检测结果与 HPLC-UV 检测结果一致,有 7 个样品检出他达拉非,3 个样品检出西地那非,1 个样品检出伐地那非。通过研究 3 种 PDE5 抑制剂的二级质谱裂解规律,推测一个样品中含有羟基豪莫西地那非。本方法快速准确,适用于大批量复杂基质样品中 PDE5 抑制剂的筛查。

关键词 解吸附电晕束离子化; 离子阱质谱; 高效液相色谱-紫外检测法; 磷酸二酯酶 5 抑制剂; 裂解机理

1 引言

5 型磷酸二酯酶(PDE5)抑制剂被广泛用于治疗男性勃起功能障碍(ED)等疾病。西地那非(Sildenafil)、伐地那非(Vardenafil)和他达拉非(Tadalafil)是美国食品药品监督管理局(FDA)已批准上市的 3 种 PDE5 抑制剂^[1]。近年来,不法厂商常将 PDE5 抑制剂加入到保健食品中,以达到用量小、见效快的目的;但长期服用添加此类药物的保健品所带来的副作用不容忽视^[2]。对 PDE5 抑制剂进行定性和定量检测多采用液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法^[3,4]等,这些方法测定前需对样品进行前处理,耗时较长,不适用于大批量实际商品筛选。另外,色谱法需要标准对照品才能根据保留时间进行定性分析,因而对 PDE5 抑制剂的结构改造物缺少快速有效的鉴定手段。

近年来,敞开式离子化(Ambient ionization)技术成为质谱技术的研究热点,且出现了多种类型的离子源^[5]。这些离子源无需样品预处理即可对复杂基体样品中的痕量待测物直接离子化,极大地提高了质谱分析效率,在食品、药品、环境、活体分析、代谢组学、以及生物组织质谱成像等领域具有广阔的应用前景^[6~9]。

解吸附电晕束离子化(DCBI)是一种新型敞开式直接离子化技术^[10,11]。此电离源可直接在大气压条件下将目标物解吸进入质谱分析。其基本原理是:中性或惰性气体(氮气或氦气)经放电产生亚稳态原子,在 DCBI 源的空心针/环电极结构形成可见的薄电晕束,快速将存在于气体、液体、固体或材料表面的化合物解吸并离子化。解吸电离后的目标物离子被导入质量分析器,实现样品的快速分析。该技术优势在于减免了复杂繁琐的样品前处理过程,并利用现代质谱的高质荷比分辨率对复杂未知样品中某种或某几种目标物进行筛选。该技术已成功应用于农药、兽药、爆炸物等领域的快速分析。

本研究以 12 种保健食品为供试样品,利用 DCBI-MS 对其中可能添加的 3 种 PDE5 抑制剂进行了定性及半定量分析,HPLC-UV 检测法进行对照分析。通过研究 3 种 PDE5 抑制剂的二级质谱裂解规律,初步鉴定出一个供试样品中含伐地那非结构改造物。即使没有标准品,DCBI-MS 法也对 PDE5 抑制剂改造物快速鉴别。

2011-11-17 收稿;2012-01-12 接受

本文系国家“863”课题(No. 2010AA023001),国家自然科学基金(No. 20927005),湖南省科技计划课题(No. 2010TT1001)资助项目
© 1994-2012, C. Chenpo@vip.sina.com Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Thermo Finnigan-LCQ 离子阱质谱(美国菲尼根公司),配 LCQ-tune 工作站,DCBI 离子源(自制);LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司),配 SPD-UV 检测器和 LCsolution 工作站。

伐地那非、西地那非和他达拉非标准品均购自中国药品生物制品检定所;乙腈、甲醇(HPLC 级,湖南化工研究院精细化工研究所)、超纯水(Millipore 公司);三乙胺、 H_3PO_4 、甘油均为国产分析纯。样品为市售保健食品。

2.2 实验条件

质谱条件:解吸附电晕束离子源(DCBI),氦气流速 0.6 L/min,电晕电压 3.5 kV,加热温度 180 $^{\circ}\text{C}$,正离子采集模式,进样量 5 μL 。

色谱条件:江申 Spherigel C_{18} 色谱柱(200 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相 A:0.05 mol/L 三乙胺(以 H_3PO_4 调至 pH 3),过 0.45 μm 滤膜,B:乙腈。梯度洗脱程序:0~10 min,70% A;10~15 min,70%~30% A;15~18 min,30% A;18~23 min,30%~70% A。流速 1.0 mL/min,进样量 20 μL 。

2.3 样品处理

(1) DCBI-MS 分析 片状固体样品直接固定于固体进样夹板;胶囊样品(少量)或液体样品(5 μL)置于玻片上,加 2 滴甘油混匀。处理后的样品均置于 DCBI 源的可见电晕束下进行质谱信号采集。

(2) HPLC-UV 分析 将胶囊内容物或片状样品研磨混匀,准确称取 0.0500 g 置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇 15 mL,超声提取 30 min,冷却至室温,以甲醇定容。准确移取 2.0 mL 液体样品,置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容。样品溶液过 0.45 μm 滤膜,备用。

3 结果与讨论

3.1 DCBI-MS 快速检测

利用 DCBI-MS 对伐地那非、西地那非和他达拉非进行单样检测时,定性分析非常迅速,可在 1 min 内完成,其选择离子流图和分子离子一级质谱图见图 1。

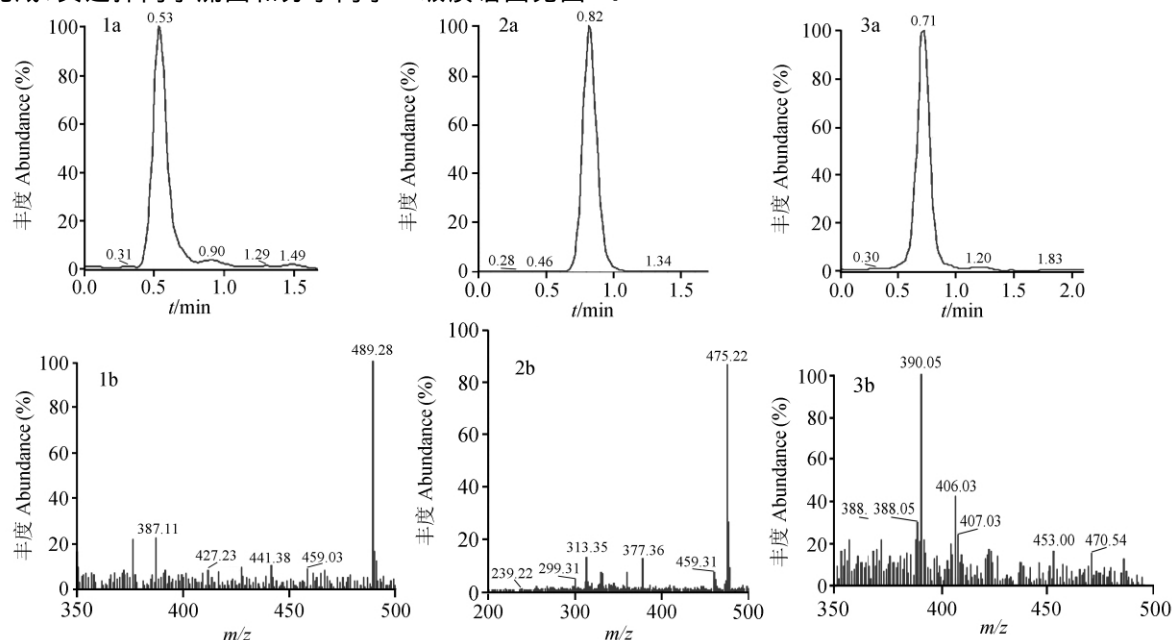


图 1 3 种 PDE5 抑制剂的选择离子流图(a)和分子离子质谱图(b)

Fig. 1 Selected ion chromatogram (IR) (a) and molecular ions mass spectra(b) of three phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors

1. Vardenafil; 2. Sildenafil; 3. Tadalafil.

3.2 DCBI-MS 二级质谱扫描确证与半定量分析

样品未经前处理,因而 DCBI 电离样品时的基质干扰和化学噪声不可避免。采用全扫描模式或选择离子模式分析时,可能产生假阳性结果。本实验通过一级质谱图筛选,二级质谱扫描对目标物进行确证。分别选择伐地那非 m/z 489,西地那非 m/z 475,他达拉非 m/z 390 为母离子,进行碰撞诱导裂解,获得相关化合物的二级离子谱图(MS/MS),如图 2。根据二级谱图中各个待测物的特征子离子,可对化合物进行进一步确证。PDE5 抑制剂伐地那非的裂解机理如图 3。

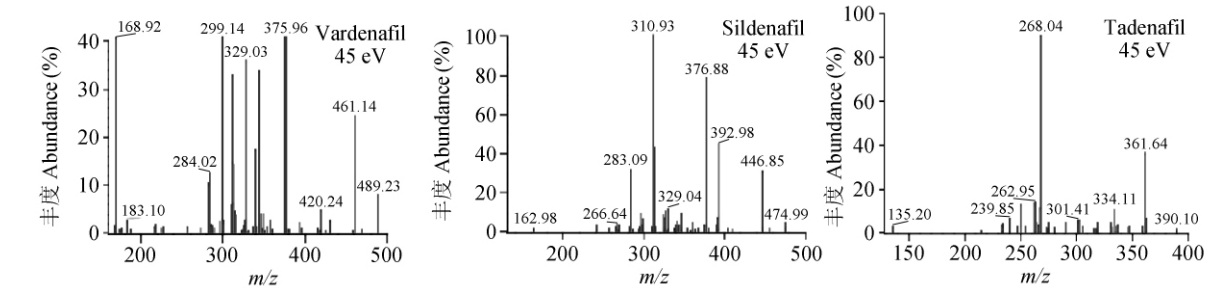


图 2 3 种 PDE5 抑制剂分子离子的二级质谱图
Fig.2 MS² spectra of molecular ions for three PDE5 inhibitors

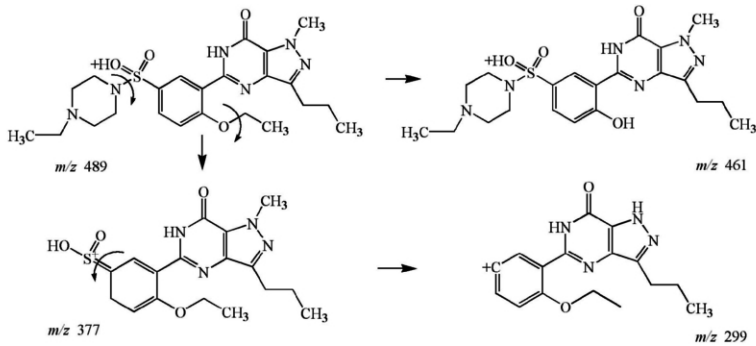


图 3 PDE5 抑制剂伐地那非的分子离子的二级质谱裂解机理
Fig.3 Fragmentation pathways of molecular ions for vardenafil

为了考察 DCBI 源的重现性与稳定性,以特征子离子 m/z 377(伐地那非), m/z 311(西地那非), m/z 268(他达拉非)进行定量分析。配制系列浓度标准溶液:伐地那非(5,10,25,50 和 100 mg/L)、西地那非(7.6,15.2,30.4,60.8 和 121.6 mg/L)、他达拉非(8,16,32,64 和 128 mg/L),分别选择 3 种物质的低、中、高浓度重复进样 5 次,对子离子色谱图积分,结果见表 1。尽管 DCBI 源定量检测的相对标准偏差较大,但其能够在合理的浓度范围内给出较可靠的定量值。因此,DCBI-MS 可作为一种半定量分析方法,为后续的精确定量分析提供参照依据。

表 1 DCBI-MS 方法的线性范围和检出限
Table 1 Calibration curves and detection limits for three PDE5 inhibitors by DCBI-MS

化合物名称 PDE5 inhibitors	线性范围 Liner ranges (mg/L)	线性方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficients	检出限 LOD (mg/L)	浓度 Concentration (mg/L)	RSD (%,n=5)
伐地那非 Vardenafil	10~125	Y=37544X+219752	0.9977	2.0	5	25.4
					25	23.3
					100	29.3
西地那非 Sildenafil	7.6~121.6	Y=33643X-138805	0.9960	1.5	7.6	24.5
					30.4	21.9
					121.6	25.4
他达拉非 Tadalafil	8~128	Y=10304X+342831	0.9965	2.0	8	20.8
					32	34.5
					128	24.9

3.3 HPLC-UV 检测法准确定量

配制伐地那非、西地那非、他达拉非的系列标准溶液(1.0,5.0,10.0,50.0 和 100.0 mg/L),按 2.2 节的液相色谱条件进行分析,分别选择 3 种物质的低、中、高浓度重复进样 5 次。对照品色谱图如图 4; HPLC-UV 定量检测结果见表 2。实验结果表明, HPLC-UV 法定量结果准确,线性范围宽,重现性好,灵敏度高,但相对 DCBI 方法耗时。

对比 DCBI-MS 与 HPLC-UV 检测结果可知, DCBI-MS 法检出限浓度比 HPLC-UV 高一个数量级。这是由于 DCBI-MS 分析中是将样品装载在玻片上,即使用甘油等高粘度基质减少样品在玻璃表面的扩散,高温敞开式进样的条件下样品仍易受到气流、进样路径、进样速度及环境温度等因素的影响。但 DCBI-MS 的快速定性使其在批量样品中违禁药物的筛查中具有很大优势。

3.4 样品检测

DCBI-MS 检测:利用一级质谱初筛,二级质谱确证对 12 个供试保健品进行检测。结果显示,其中 1 个

表 2 HPLC-UV 方法的线性范围和检出限

Table 2 Calibration curves and detection limits for 3 PDE5 inhibitors by HPLC-UV

化合物名称 PDE5 inhibitors	线性范围 Liner ranges (mg/L)	线性方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficients	检出限 LOD (mg/L)	浓度 Concentration (mg/L)	RSD (%,n=5)
伐地那非 Vardenafil	1.0~100	Y=11148X-1982.7	0.9999	0.2	1.0	2.4
					10.0	1.0
					50.0	1.8
西地那非 Sildenafil	1.0~100	Y=24766X-4931.6	0.9999	0.1	1.0	2.0
					10.0	1.8
					50.0	1.7
他达拉非 Tadalafil	1.0~100	Y=24176X+4883.9	0.9996	0.1	1.0	1.2
					10.0	1.4
					50.0	1.7

样品中含有伐地那非;3 个样品中含有西地那非;7 个样品中含有他达拉非。另一营养口服片中未检出上述 3 种 PDE5 抑制剂。分析其一级质谱, m/z 505 离子为最大丰度峰,检索疑为羟基豪莫西地那非。选择 m/z 505 为母离子进行碰撞诱导裂解,其二级质谱图如图 5。该化合物二级碎片中 4 个特征离子分别为 m/z 487, 461, 377 和 311,其中 m/z 487, 461 和 377 与伐地那非特征离子一致,可确证其为伐地那非结构衍生物——羟基豪莫西地那非(Hydroxyhomosildenafil)。

HPLC-UV 检测:12 个样品中除了疑似添加羟基豪莫西地那非的供试品,其它样品的色谱定性结果均与 DCBI-MS 结果一致。由于缺乏羟基豪莫西地那非标准品,无法通过 HPLC-UV 对其进行判定。因此,在没有标准品的情况下,DCBI-MS 比 HPLC-UV 检测更具速度优势。研究化合物的质谱裂解规律,有助于快速筛选保健食品中违禁添加的化学药品衍生物、中间产物及已报道的未见商品化的合成药

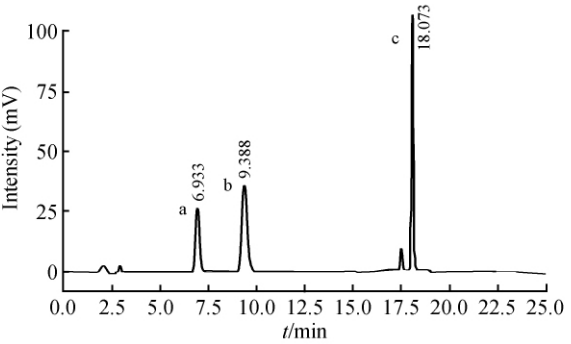


图 4 3 种标准品的 HPLC-UV 色谱图

Fig. 4 Chromatogram of 3 drugs by HPLC-UV at detection wavelength of 292 nm

a. Vardenafil; b. Sildenafil; c. Tadalafil.

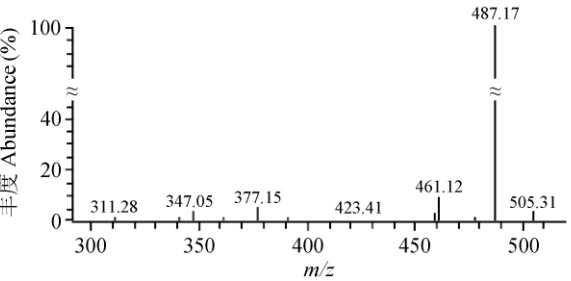


图 5 勃乐高级营养口服片中分子离子 m/z 505 的子离子谱图

Fig. 5 Product ion mass spectrum of m/z 505 for Bole tablet

DCBI-MS 在定性检测中快速且灵敏度高,但在精确定量方面仍需改进^[12]。可以预见,将 DCBI 离子化技术与小型质谱仪结合,用于现场分析,将成为未来发展的趋势,其商品化的仪器将具有强大的实用性和竞争性。

References

- 1 Gratz S R, Flurer C L, Wolnik K A. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2004**, 3(36): 525~533
- 2 Wespes E, Amar E, Hatzichristou D, Montorsi F, Pryor J, Vardi Y. *European Urology*, **2002**, 1(41): 1~5
- 3 CHEN Bo, ZHU Xiao-Lan, YAO Shou-Zhuo. *Chinese Journal of Food Hygiene*, **2004**, 16(2): 121~124
陈 波, 朱小兰, 姚守拙. *中国食品卫生杂志*, **2004**, 16(2): 121~124
- 4 ZHU Xu-Jiang, REN Shu-Ling, LIU Xia. *China Journal of Hospital Pharmacy*, **2010**, 30(6): 524~525
朱旭江, 任淑玲, 刘 霞. *中国医院药学杂志*, **2010**, 30(6): 524~525
- 5 CHEN Huan-Wen, HU Bin, ZHANG Xie. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(8): 1069~1088
陈焕文, 胡 斌, 张 燮. *分析化学*, **2010**, 38(8): 1069~1088
- 6 HE Jiu-Ming, LUO Zhi-Gang, LI Nong, ZHANG Rui-Ping, HE Jing-Jing, ZEPER Abliz. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(11): 1743~1747
贺玖明, 罗志刚, 李 农, 张瑞萍, 何菁菁, 再帕尔·阿不力孜. *分析化学*, **2011**, 39(11): 1743~1747
- 7 Ifa D R, Jackson A U, Paglia G, Cooks R G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 394(8): 1995~2008
- 8 Liu Y, Lin Z, Zhang S, Yang C, Zhang X. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 395(3): 591~599
- 9 He J, Tang F, Luo Z, Xu J, Zhang R, Wang X, Abliz Z. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2011**, 25: 843~850
- 10 Wang H, Sun W J, Zhang J S, Yang X H, Lin T, Ding L. *Analyst*, **2010**, 135: 688~695
- 11 Harris G A, Galhena A S, Fernandez F M. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(12): 4508~4538
- 12 Li X, Wang H, Sun W J, Ding L. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(22): 9188~9193

Rapid Determination of Illegally Added Phosphodiesterase 5 Inhibitors in Health Food by Desorption Corona Beam Ionization-Tandem Mass Spectrometry

WU Shuang¹, WANG Hua¹, ZHU Hui-Guo¹, ZHAO Yong¹,
TIAN Qing-Qing¹, SUN Wen-Jian², DING Li², CHEN Bo^{*1}

¹(Key Laboratory of Chemical Biology & Traditional Chinese Medicine Research,
Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

²(China and Shimadzu Research Laboratory (Shanghai) Company, Ltd., Shanghai 201201, China)

Abstract A rapid method using desorption corona beam ionization-ion trap mass spectrometry (DCBI-MS) was developed for the determination of three phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors, i. e., vardenafil, sildenafil, tadalafil in health food. The MS spectra and MS2 spectra of the inhibitors were used for prescreening and confirmation respectively. The characteristic ions of the PDE5 inhibitors were chosen for semi-quantitative. Precise quantification of the PDE5 inhibitors was carried out by high performance liquid chromatography-ultraviolet (HPLC-UV). Vardenafil, sildenafil and tadalafil were detected in one sample, three samples, and seven samples, respectively. These results were in accordance with those obtained by HPLC-UV. The fragmentation pathways of the PDE5 inhibitors were studied and based on it one sample was figured out to contain hydroxyhomosildenafil. The DCBI-MS method is rapid and accurate, which had more advantages to screen the illegally added PDE5 inhibitors in samples with complex matrix and the semiquantitative results could provide basis for HPLC analysis.

Keywords Desorption corona beam ionization; Ion trap mass spectrometry; High performance liquid chromatography-ultraviolet detection; Phosphodiesterase 5 inhibitors; Fragmentation pathways