

## 附件

### 食品中去甲基他达拉非和硫代西地那非的测定

#### 高效液相色谱—串联质谱法

BJS 201704

#### 1. 范围

本标准规定了食品（含保健食品）基质中去甲基他达拉非和硫代西地那非的高效液相色谱—串联质谱测定方法。

本标准适用于酒、牡蛎粉等食品（含保健食品）中去甲基他达拉非和硫代西地那非的测定。其他低糖、低脂、低蛋白类基质可参照本方法定性检测。

#### 2. 原理

试样经甲醇超声提取，过滤后，滤液供高效液相色谱—串联质谱测定，外标法定量。

#### 3. 试剂和材料

注：水为GB/T 6682规定的一级水。

##### 3.1 试剂

3.1.1 乙腈（ $C_2H_3N$ ）：色谱纯。

3.1.2 甲酸（ $HCOOH$ ）：色谱纯。

3.1.3 甲醇（ $CH_3OH$ ）：分析纯。

##### 3.2 试剂配制

3.2.1 0.1%甲酸水溶液：取甲酸 1mL 用水稀释至 1000mL。

3.2.2 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸 1mL 用乙腈稀释至 1000mL。

##### 3.3 标准品

去甲基他达拉非、硫代西地那非对照品或标准物质的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量见附录 A 表 A.1，纯度 $\geq 98\%$ 。

### 3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液（500  $\mu\text{g/mL}$ ）：分别精密称取去甲基他达拉非、硫代西地那非（3.3）各 10.0 mg，用甲醇溶解并稀释至 20mL，摇匀，制成浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  标准储备液，-20 $^{\circ}\text{C}$  保存，保存期 1 个月。

3.4.2 混合标准中间工作液（1  $\mu\text{g/mL}$ ）：分别准确吸取去甲基他达拉非、硫代西地那非标准储备液（500  $\mu\text{g/mL}$ ）（3.4.1）各 0.1 mL，用甲醇稀释至 50mL，摇匀，制成 1  $\mu\text{g/mL}$  的混合标准中间工作液，-20 $^{\circ}\text{C}$  保存，保存期 1 个月。

3.4.3 混合标准工作溶液：分别吸取混合标准中间工作液（1  $\mu\text{g/mL}$ ）（3.4.2）0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、1.0 mL、2.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，作为系列混合标准工作溶液 S1—S5，浓度依次为各化合物 10  $\mu\text{g/L}$ 、20  $\mu\text{g/L}$ 、40  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 、200  $\mu\text{g/L}$ ，临用新制或依仪器响应情况配制适当浓度的混合标准工作溶液。

## 4. 仪器和设备

4.1 高效液相色谱—串联质谱仪，配有电喷雾（ESI）离子源。

4.2 天平：感量分别为 0.1mg 和 1mg。

4.3 超声波发生器。

## 5. 分析步骤

### 5.1 试样制备

#### 5.1.1 固态试样

取适量混匀，研细，称取 1g 试样（精确至 0.01 g）于具塞试管中，加入甲醇 10mL，密塞，称重，超声提取 10min，放冷，再次称重，用甲醇补足减失的重量，摇匀，用滤膜（0.22 $\mu\text{m}$ ，有机相型）过滤，取续滤液，根据实际浓度适当稀释至标准曲线线性范围内，备用。

#### 5.1.2 液态试样

取适量摇匀，吸取 1.0 mL 于具塞试管中，加入甲醇 9mL，密塞，称重，超声提取 10min，放冷，再次称重，用甲醇补足减失的重量，摇匀，用滤膜（0.22 $\mu\text{m}$ ，有机相型）过滤，取续滤液，根据实际浓度适当稀释至标准曲线线性范围内，备用。

#### 5.1.3 空白试验

不加试样按试样同法处理，制得空白溶液。称取与试样等量的空白基质试样，按试样同法处理，制得空白基质试样溶液，备用。

## 5.2 仪器参考条件

### 5.2.1 色谱条件

- a) 色谱柱: Waters CORTECS T3 (2.1×100 mm, 2.7 μm), 或性能相当者。
- b) 流动相: A 为 0.1%甲酸水溶液 (3.2.1), B 为 0.1%甲酸乙腈溶液 (3.2.2), 梯度洗脱程序见表 1。
- c) 流速: 300 μL/min。
- d) 柱温: 30°C。
- e) 进样量: 1μL。

表 1 梯度洗脱程序表

梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
1	90	10
4	60	40
7	10	90
9	10	90
9.1	90	10
12	90	10

注: 在有共流出成分影响目标化合物检测时, 可以适当调节流动相比例, 使尽可能与干扰成分分离, 减少干扰。

### 5.2.2 质谱条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI 源)。
- b) 检测方式: 多反应离子监测 (MRM)。
- c) 干燥气、雾化气、鞘气、碰撞气等均为高纯氮气或其他合适气体, 使用前应调节相应参数使质谱灵敏度达到检测要求, 毛细管电压、干燥气温度、鞘气温度、鞘气流量、喷嘴电压、碰撞能量、碎裂电压等参数应优化至最佳灵敏度, 监测离子对和定量离子对等信息详见附录 B。

## 5.3 定性测定

按照高效液相色谱—串联质谱条件测定试样和标准工作溶液, 记录试样和标准溶液中各化合物的色谱保留时间, 当试样中检出与某标准品质量色谱峰保留时间一致的色谱峰 (变化范围在 ±2.5% 之内), 并且试样色谱图中所选择的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比的偏差不超过表 2 规定的范围, 可以确定试样中检出相应化合物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (k)	k>50%	50%≥k>20%	20%≥k>10%	k≤10%
允许的最大偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

## 5.4 定量测定

### 5.4.1 标准曲线的制作

将混合标准工作溶液 (3.4.3) 分别按仪器参考条件 (5.2) 进行测定, 得到相应的标准溶液的色谱峰面积。以混合标准工作溶液的浓度为横坐标, 以色谱峰的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。必要时可用空白基质试样溶液 (5.1.3) 配制基质混合标准工作溶液绘制标准曲线。

### 5.4.2 试样溶液的测定

将试样溶液 (5.1) 按仪器参考条件 (5.2) 进行测定, 得到相应的样品溶液的色谱峰面积。根据标准曲线得到待测液中组分的浓度, 平行测定次数不少于两次。

对照品色谱图参见附录 C。

## 6 分析结果的表述

将液相色谱—质谱测得浓度代入下式计算含量:

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1000} \times K \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$X$  — 试样中各待测物的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

$c$  — 从标准曲线中读出的供试品溶液中各待测物的浓度, 单位为微克每升 (μg/L);

$V$  — 样液最终定容体积, 单位为毫升 (mL);

$m$  — 试样溶液所代表的质量, 单位为克 (g);

$K$  — 稀释倍数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示, 结果保留三位有效数字。

## 7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

## 8 其他

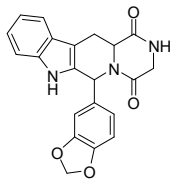
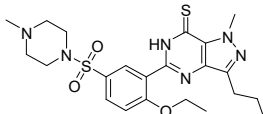
当称样量为 1g 或 1mL，定容体积为 10mL 时，本方法中去甲基他达拉非和硫代西地那非的检出限均为 50 $\mu$ g/kg 或 50 $\mu$ g/L，定量限均为 100 $\mu$ g/kg 或 100 $\mu$ g/L。

空白试验应无干扰。

## 附录A

### 化合物相关信息

表A.1化合物中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量、结构式

序号	中文名称	英文名称	CAS号	分子式	分子量	结构式
1	去甲基他达拉非	Nortadalafil	171596-36-4	$C_{21}H_{17}N_3O_4$	375.38	
2	硫代西地那非	Thiosildenafil	479073-79-5	$C_{22}H_{30}N_6O_3S_2$	490.64	

## 附录B

### 质谱参考条件

质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源(ESI)；
- b) 检测方式：多反应监测 (MRM)；
- c) 扫描方式：正离子模式；
- d) 毛细管电压：正离子模式：4000V；
- e) 离子源温度：200℃；
- f) 干燥气流量：12L/min；
- g) 雾化气压力：25psi；
- h) 鞘气温度：250℃；鞘气(N<sub>2</sub>)流量：10L/min；
- i) 喷嘴电压：正离子模式：500V；
- j) 其他质谱参数见表 B.1。

表 B.1 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

序号	化合物名称	电离方式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(V)	保留时间(min)
1	去甲基他达拉非	ESI+	376.1	254.0*	13	5.42
				261.9	33	
2	硫代西地那非	ESI+	491.2	299.0*	41	5.72
				341.0	33	

\* 定量离子对。

## 附录C

### 标准色谱图

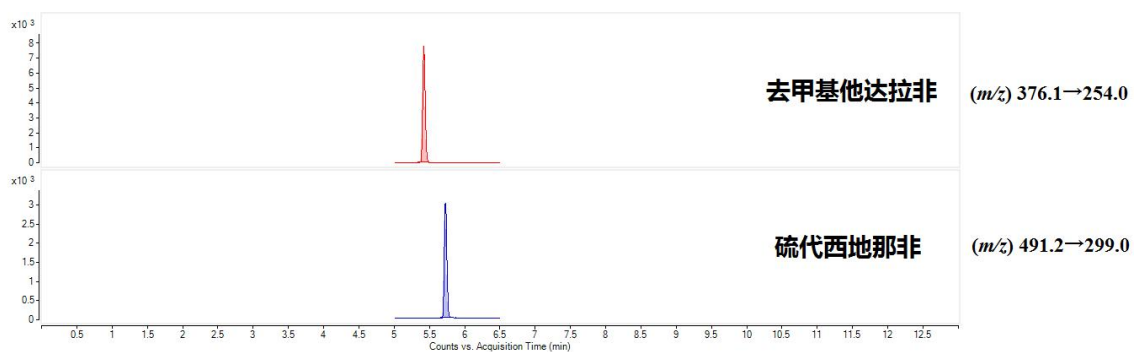


图 C.1 去甲基他达拉非和磺代西地那非对照品的提取离子(定量)色谱图

本方法负责起草单位：上海市食品药品检验所。

验证单位：中国食品药品检定研究院、四川省食品药品检验检测院。

主要起草人：胡青，孙健，金绍明，余晓琴，闵宇航，高文超。