

附件

食品中伐地那非丙氧基羟乙基替代物的执法检验方法

1 范围

本方法规定了食品（含保健食品）中伐地那非丙氧基羟乙基替代物的液相色谱-串联质谱测定方法及液相色谱-串联高分辨质谱确证方法。

本方法适用于饮料、糖果、饼干及酒类等食品及保健食品的片剂、胶囊、软胶囊等剂型中伐地那非丙氧基羟乙基替代物的定性和定量测定。蜂蜜、蜜饯、丸剂、口服液、颗粒剂（冲剂）、粉剂、膏剂等其他类食品（含保健食品）经方法验证后可参照本方法检测。

2 原理

试样经甲醇超声提取，过滤后，滤液供液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

3 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。
- 3.1.2 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。
- 3.1.3 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ）。
- 3.1.4 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 0.1%甲酸水溶液：准确量取甲酸（3.1.2）1 mL，用水稀释至1000 mL，混匀。
- 3.2.2 甲醇水溶液（1+1）：将甲醇（3.1.4）与水等体积混合。

3.3 标准品

伐地那非丙氧基羟乙基替代物（又名：伐地那非杂质31、丙氧苯基羟基伐地那非）标准品纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。标准品中文名称、英文名称、CAS号及分子式等信息见附录A。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液的配制（200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

准确称取伐地那非丙氧基羟乙基替代物标准品（3.3）10 mg（精确至0.01 mg），用甲醇（3.1.4）溶解，转移至50 mL容量瓶中，用甲醇（3.1.4）定容至刻度，摇匀，配制成质量浓度为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下贮存，有效期3个月。

3.4.2 标准中间液的配制（1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

准确吸取标准储备液（3.4.1）0.25 mL于50 mL容量瓶中，用甲醇（3.1.4）定容至刻度，摇匀，

配制成质量浓度为1 µg/mL的标准中间液。-18 °C以下贮存，有效期1个月。

3.4.3 系列标准工作液的配制

分别准确吸取 20 µL、50 µL、100 µL、200 µL、500 µL 标准中间液（1 µg/mL）（3.4.2），置于一组 10mL 容量瓶中，用甲醇水溶液（1+1）（3.2.2）定容，摇匀，配制成 2 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L、50 µg/L 的系列标准工作液，或依仪器响应情况配制适当浓度的系列标准工作液，或根据需要采用空白基质提取液（5.1.4），配制适当浓度的基质匹配标准工作液。现用现配。

3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜：0.22 µm，有机相。

3.5.2 离心管：50 mL。

3.5.3 容量瓶：10 mL、50 mL。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-串联质谱仪，配有电喷雾离子源（ESI）。

4.2 液相色谱-串联高分辨质谱仪，配有电喷雾离子源（ESI）。

4.3 分析天平：感量分别为 0.001 g 和 0.01 mg。

4.4 离心机：转速≥4000 r/min。

4.5 超声波清洗仪：功率≥500 W，频率≥37 kHz。

5 分析步骤

5.1 试样处理

5.1.1 固态或半固态试样

取固态试样适量混匀，研细，或取半固态试样适量混匀，称取 1 g 试样（精确至 0.001 g）置于 50 mL 具塞离心管（3.5.2）中，加入 40 mL 甲醇（3.1.4），超声提取 15 min，冷却至室温，4 000 r/min 离心 5 min，上清液全部转移至 50 mL 容量瓶（3.5.3）中，用甲醇（3.1.4）定容至刻度，混匀。取适量上清液经微孔滤膜（3.5.1）过滤，待测定。当样品浓度过高时，根据实际浓度用甲醇水溶液（1+1）（3.2.2）适当稀释至标准曲线线性范围内上机。

5.1.2 液态试样

取试样适量摇匀，准确量取 1 g 试样（精确至 0.001 g）置于 50 mL 具塞离心管（3.5.2）中，加入 40 mL 甲醇（3.1.4），超声提取 15 min，冷却至室温，转移至 50 mL 容量瓶（3.5.3）中，用甲醇（3.1.4）定容至刻度，混匀。取适量上清液经微孔滤膜（3.5.1）过滤，待测定。当样品浓度过高时，根据实际浓度用甲醇水溶液（1+1）（3.2.2）适当稀释至标准曲线线性范围内上机。

5.1.3 油脂基质试样

取试样适量混匀，称取 1 g 试样（精确至 0.001 g）置于 50 mL 具塞离心管（3.5.2）中，加入 5 mL 乙酸乙酯（3.1.3），振摇，使其分散，加入 35 mL 甲醇（3.1.4），超声提取 15 min，冷却至室温，4 000 r/min 离心 5 min，上清液全部转移至 50 mL 容量瓶（3.5.3）中，用甲醇（3.1.4）定容至刻度，混匀。取适量上清液经微孔滤膜（3.5.1）过滤，待测。当样品浓度过高时，根据实际浓度用甲醇水溶液（1+1）（3.2.2）适当稀释至标准曲线线性范围内上机。

5.1.4 空白基质提取液

称取空白试样适量，与试样同法处理，制得空白基质提取液。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈色谱柱，50 mm×2.1 mm（内径），1.8 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：A相为0.1%甲酸水溶液（3.2.1），B相为乙腈（3.1.1），梯度洗脱条件见表1；

表1 液相色谱梯度洗脱条件

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|--------|---------|---------|
| 0.0 | 90 | 10 |
| 1.0 | 50 | 50 |
| 2.5 | 15 | 85 |
| 4.0 | 15 | 85 |
| 4.1 | 90 | 10 |
| 6.5 | 90 | 10 |

注：在有共流出成分影响目标化合物检测时，可参照食品补充检验方法BJS202405色谱条件设置流动相，使色谱峰尽可能与干扰成分分离。

- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：30 °C；
- e) 进样量：2 μL。

5.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 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：正离子扫描；
- d) 毛细管电压：3 500 V；
- e) 干燥气温度：300 °C；
- f) 干燥气流速：7 L/min；
- g) 鞘气流速：11 L/min；
- h) 鞘气温度：350 °C；
- i) 其他参考质谱参数见表2。

表2 其他参考质谱参数

| 化合物 | 扫描方式 | 母离子(m/z) | 子离子(m/z) | 碎裂电压/V | 碰撞能量/eV |
|-----------------------|------|----------|----------|--------|---------|
| 伐地那非丙 氧基羟乙基 替代物 | ESI+ | 519.2 | 151.0* | 160 | 42 |
| | | | 299.0 | | 38 |
| | | | 99.1 | | 42 |

注：当采用不同质谱仪器时，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

* 为定量离子。

5.3 标准曲线的制作

将质量浓度为 2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L 的系列标准工作液（3.4.3）分别注

入液相色谱-串联质谱仪中，测定相应的峰面积，以系列标准工作液中目标化合物的浓度为横坐标，以定量离子色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。伐地那非丙氧基羟乙基替代物的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图参见附录 B。

5.4 试样溶液的测定

5.4.1 定性测定

在相同试验条件下，试样中待测组分的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内；且试样中被测组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较，偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

| | | | | |
|-----------|-----|--------|--------|-----|
| 相对离子丰度(%) | >50 | >20~50 | >10~20 | ≤10 |
| 允许相对偏差(%) | ±20 | ±25 | ±30 | ±50 |

根据需求，可使用高效液相色谱-串联高分辨质谱仪对试样溶液中的目标峰进行定性确证（仪器条件参见附录 C）测定试样和浓度接近的伐地那非丙氧基羟乙基替代物标准工作液，记录试样和标准工作液中化合物的色谱峰保留时间及多级质谱图，当试样中检出与标准品色谱峰保留时间一致的色谱峰，并且与标准品母离子精确分子量误差不超过百万分之五，主要碎片离子精确分子量误差不超过百万分之十，即可确证试样中检出相应化合物。

5.4.2 定量测定

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中，得到相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中伐地那非丙氧基羟乙基替代物的浓度。

用标准工作曲线对试样进行定量，应使试样溶液被测组分的响应值在仪器测定的线性范围内，若被测物质含量超出标准曲线的测定范围，则应重新处理试样，适量减少称样量或适当稀释试样，使其上机浓度在线性范围内再进行定量。如使用基质匹配标准工作曲线定量，应同时用同等稀释倍数的空白基质提取液配制基质匹配标准工作液后测定。

5.5 空白试验

除不加试样外，完全按照上述操作步骤进行。

6 结果计算

试样中被测组分含量按式（1）计算：

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

式中：

- X ——试样中伐地那非丙氧基羟乙基替代物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- c ——试样溶液中伐地那非丙氧基羟乙基替代物的质量浓度，单位为微克每升（μg/L）；
- V ——试样溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；
- m ——试样取样的质量，单位为克（g）；
- 1000 ——换算系数；
- f ——稀释因子。

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3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 20%。

8 其他

当取样量为 1 g，定容体积为 50 mL 时，伐地那非丙氧基羟乙基替代物的检出限为 0.05 mg/kg，定量限为 0.10 mg/kg。

本方法在 0.1 mg/kg~1.0 mg/kg 添加浓度范围内，回收率为 80%~110%。

空白试验应无干扰。

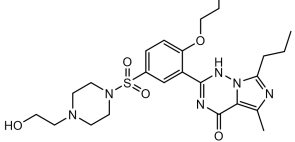
附录A

(规范性)

伐地那非丙氧基羟乙基替代物标准品的参考信息

伐地那非丙氧基羟乙基替代物的中文名称、英文名称、CAS号、化学结构式、分子式和相对分子质量见表A.1。

表 A.1 伐地那非丙氧基羟乙基替代物标准品的基本信息

| 中文名称 | 英文名称 | CAS号 | 化学结构式 | 分子式 | 相对分子质量 |
|---------------|----------------------------------|--------------|---|-----------------------|--------|
| 伐地那非丙氧基羟乙基替代物 | Propoxyphenyl hydroxyvardenafile | 1339092-18-0 |  The chemical structure shows a central pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-2(1H)-one core. It features a methyl group at the 5-position, a propoxy group at the 3-position, and a propoxyphenyl group at the 4-position. The propoxyphenyl group is attached to the benzene ring via an oxygen atom. The pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-2(1H)-one core is substituted with a piperazine ring at the 7-position, which has a 2-hydroxyethyl group attached to one of its nitrogen atoms. | $C_{24}H_{34}N_6O_5S$ | 518.63 |

附录 B

(资料性)

伐地那非丙氧基羟乙基替代物标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图

伐地那非丙氧基羟乙基替代物标准溶液 (20 $\mu\text{g/L}$) 的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图见图 B.1。

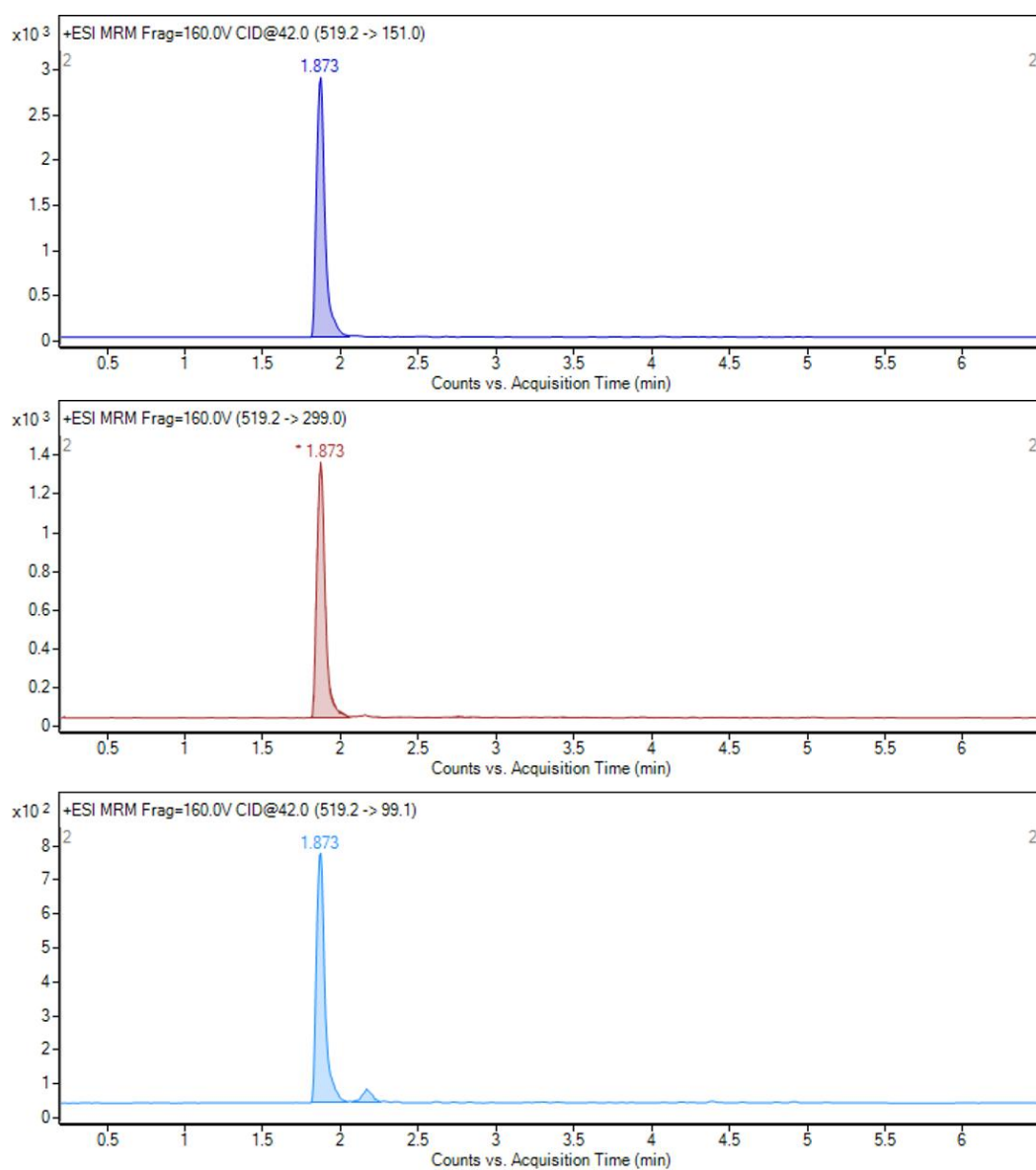


图 B.1 伐地那非丙氧基羟乙基替代物标准溶液 (20 $\mu\text{g/L}$) 的液相色谱-质谱/质谱多反应监测色谱图

附录 C

(资料性)

液相色谱-串联高分辨质谱法仪器参考条件以及质谱图

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈色谱柱, 150 mm×2.0 mm (内径), 1.8 μm, 或性能相当者;
- b) 流动相: A相为0.1%甲酸水溶液 (3.2.1), B相为甲醇 (3.1.4), 梯度洗脱条件见表C.1。

表C.1 液相色谱梯度洗脱条件

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|--------|---------|---------|
| 0.0 | 80 | 20 |
| 1.0 | 50 | 50 |
| 8.0 | 40 | 60 |
| 11.0 | 10 | 90 |
| 11.1 | 80 | 20 |
| 13.0 | 80 | 20 |

- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 柱温: 30 °C;
- e) 进样量: 5 μL。

质谱参考条件如下:

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI);
- b) 扫描方式: 正离子 Full MS/dd-MS² 模式;
- c) 毛细管电压: 3 500 V;
- d) 离子源温度: 320 °C;
- e) 辅助气流速: 15 arb;
- f) 鞘气流速: 50 arb。

其他质谱参考条件见表 C.2, 色谱图见图 C.1, 二级质谱图见图 C.2。

表 C.2 化合物准分子离子、碰撞能量及主要碎片离子

| 化合物 | 准分子离子 (<i>m/z</i>) | 碰撞能量/eV | 主要碎片离子 (<i>m/z</i>) |
|------------------|----------------------|---------|--|
| 伐地那非丙氧基苄基 替代物 | 519.23828 | 40 | 326.17322, 299.11371, 284.12650, 169.09717, 151.08662, 99.09219 |

注: 不同仪器在不同碰撞能量条件下, 主要碎片离子可能有所不同, 上述碎片离子仅供参考, 可根据实际情况, 选择响应信号强、碎片离子稳定且丰富的准分子离子进行检测和匹配。

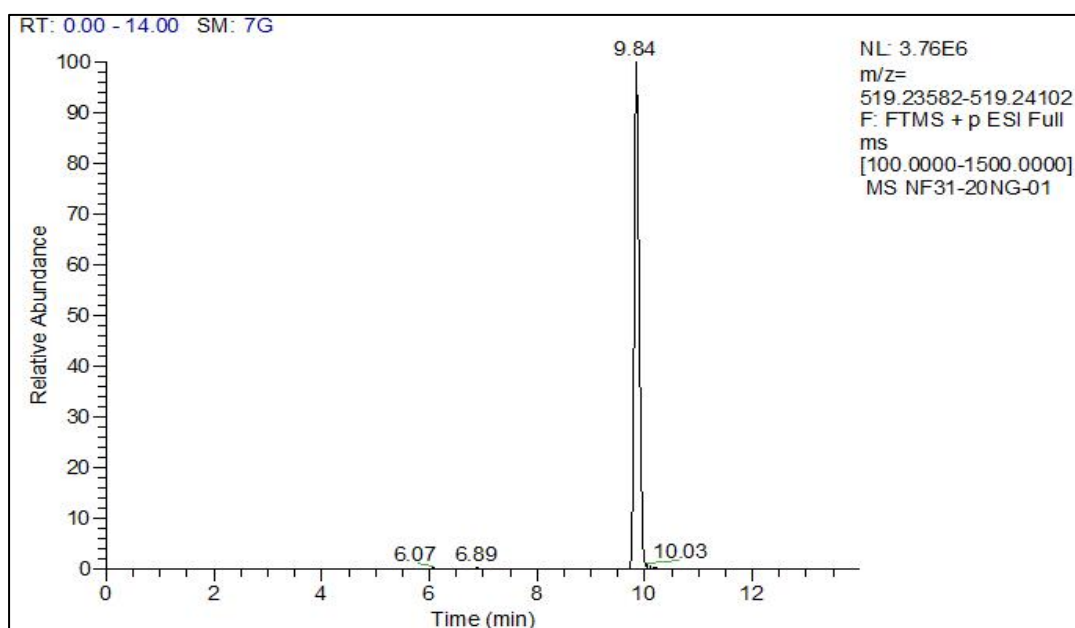


图 C.1 伐地那非丙氧基羟乙基替代物 (20 µg/L) 提取离子色谱图

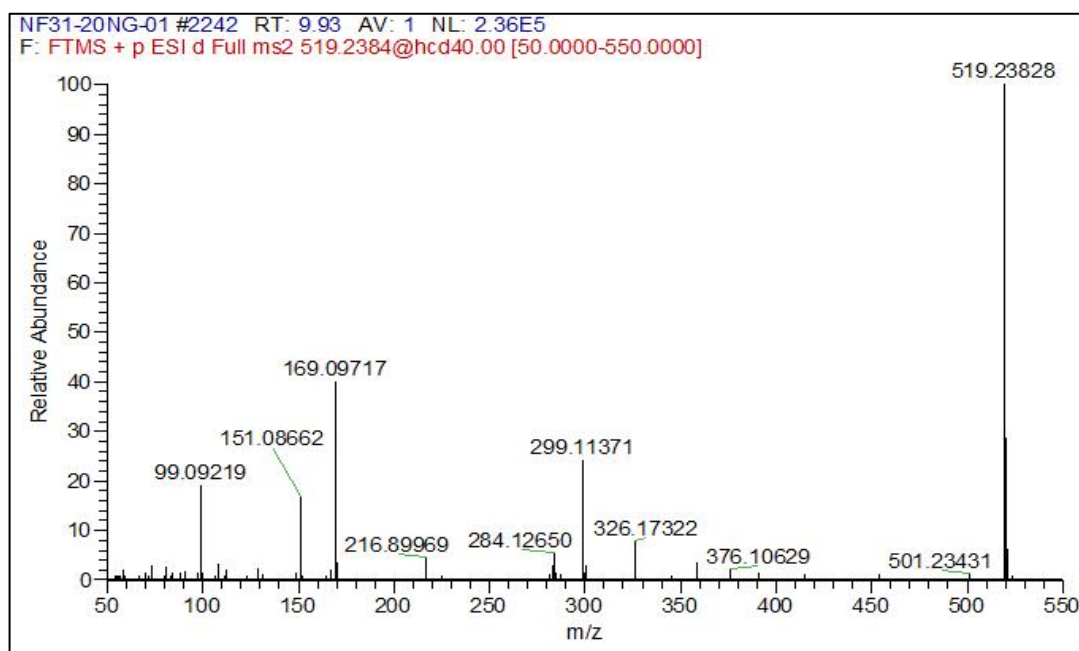


图 C.2 伐地那非丙氧基羟乙基替代物 (20 µg/L) 二级质谱图

本方法起草单位：中国肉类食品综合研究中心

本方法验证单位：中国计量科学研究院、成都市食品检验研究院、上海市食品药品检验研究院、广东省食品检验所（广东省酒类检测中心）、重庆市食品药品检验检测研究院

主要起草人：赵燕、王守伟、郭文萍、王娟强、郭超、赵文涛、董雨馨、李莹莹