

# 高效液相色谱法检测保健品中西地那非的含量的 不确定度评定

戴欣<sup>1,2</sup>, 李媛媛<sup>1</sup>, 王伟<sup>1\*</sup>, 吴桐<sup>1,2</sup>, 刘文竹<sup>1,2</sup>, 郭金萍<sup>1,2</sup>, 李喆<sup>1,2</sup>

(1. 吉林省食品检验所, 长春 130103; 2. 吉林省安信食品技术服务有限责任公司, 长春 130033)

**摘要:** **目的** 评定高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC)检测保健品中西地那非的含量的不确定度。**方法** 以保健品中西地那非非法添加为例, 采用高效液相色谱对样品进行定性筛查, 定量分析, 并对定量结果分析不确定度来源, 计算测量结果的相对扩展不确定度。**结果** 当保健品中西地那非含量为14.0 mg/g, 在95%的置信区间下, 其结果的扩展不确定度为0.36 mg ( $k=2$ )。**结论** 在影响检测结果的各分量中, 标准溶液配制过程引入的不确定度对结果影响较大。

**关键词:** 高效液相色谱法; 西地那非; 保健品; 不确定度

## Uncertainty evaluation for determination sildenafil in health products by high performance liquid chromatography

DAI Xin<sup>1,2</sup>, LI Yuan-Yuan<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1\*</sup>, WU Tong<sup>1,2</sup>, LIU Wen-Zhu<sup>1,2</sup>, GUO Jin-Ping<sup>1,2</sup>, LI Zhe<sup>1,2</sup>

(1. Jilin Institute for Food Control, Changchun 130103; 2. Jilin Anxin Food Technology Service Co., Ltd., Changchun 130033, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the uncertainty of determination of sildenafil in health products by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Taking the illegal addition of sildenafil in health care products as an example, qualitative screening and quantitative analysis were performed by HPLC. The source of uncertainty was analyzed for quantitative results, and the relative extended uncertainty of the measurement results was calculated. **Results** When the content of sildenafil was 14.0 mg/g, the extended uncertainty of the results was 0.36 mg at the 95% confidence interval ( $k=2$ ). **Conclusion** Among the components affecting the test results, the uncertainty introduced by the standard solution preparation process has a greater impact on the results.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography; sildenafil; health product; uncertainty

## 1 引言

随着中国经济和社会的发展, 人民越来越关注健康和养生问题, 保健食品的开发顺应了这个需求, 给人民带来了益处。但随着商业竞争的加剧和人们对保健功效作用的看重, 不良生产企业向保健食品中非法添加药物

的行为愈演愈烈。枸橼酸西地那非(sildenafil citrate)俗称“伟哥”, 可用于治疗阴茎勃起功能障碍, 长期服用可能导致性功能减退或器官萎缩。也是目前生产的抗疲劳类保健食品中非法添加化学药品最常见的成分, 严重危害老百姓的生命健康<sup>[1-4]</sup>。而不确定度数值的大小, 反应出测量水平的高低, 直接影响到产品合格判定<sup>[5]</sup>, 因此检测或

\*通讯作者: 王伟, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 31575572@qq.com

\*Corresponding author: WANG Wei, Master, Senior Engineer, Jilin Institute for Food Control, No.2699, Yiju Road, Changchun 130103, China. E-mail: 31575572@qq.com

校准实验室把测量不确定度评定作为一项日常质量监督或质量控制的手段。

本研究以西地那非为例,参考《国家食药监局药品检验补充检验方法和检验项目》(批准件编号 2009030)<sup>[6]</sup>,通过高效液相色谱仪对样品进行定性和定量分析<sup>[7-10]</sup>,然后对结果不确定度进行评价并对各个不确定度分量进行评估,查找影响不确定度的因素,最终给出测量结果的置信区间和置信水平<sup>[11-15]</sup>。为规范日常检测保健品中的非法添加检验,提高检测结果的可靠性、准确性提供参考,为保健品检验合格评定准确性、可靠性提供真实、有效的依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); MSU-125P 型电子天平( $d=0.01$  mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

枸橼酸西地那非对照品(纯度 98%, 加拿大 TRC 公司); 甲醇、乙腈(色谱级, 美国天地试剂有限公司); 乙酸铵(优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 水为纯净水; 其他试剂均为分析纯。

保健品: 桦甸市公安局。

### 2.2 标准溶液制备

取西地那非对照品 4.61 mg, 精密称定, 置 5 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密移取 0.5 mL 分别精密量取对照品储备液用流动相稀释定容至 10 mL 制成浓度为 45.2 mg/L 对照品溶液。

### 2.3 样品溶液制备

将样品研细、混匀后称取一次服用量约 0.8 g, 置于 50 mL 容量瓶中, 加入乙腈 40 mL, 超声处理 15 min, 冷却至室温, 用乙腈稀释至刻度。并用流动相将样品浓度稀释至与对照品浓度相当后摇匀、过滤、备用。

### 2.4 仪器条件

色谱柱: Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.1% 乙酸的 -0.02 mol/L 乙酸铵溶液; B 为甲醇; C 为乙腈; 梯度洗脱见表 1; 流速: 0.8 mL/min, 检测波长为 230 nm, 进样量: 10 μL。

### 2.5 数学模型的建立

$$X = \frac{C \times V}{m}$$

其中:  $X$  西地那非含量, mg/kg;  $C$  试样浓度, mg/L;  $V$  试样定容体积, mL;  $m$  试样质量, g。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 The gradient elution mode

时间 /min	A: 0.1%乙酸的-0.02 mol/L 乙酸铵溶液/%	B: 甲醇 /%	C: 乙腈 /%
0.00	75	10	15
15.00	60	25	15
30.00	40	45	15
45.00	40	45	15
50.00	30	55	15
55.00	30	55	15
55.01	15	70	15
60.00	15	70	15
60.01	75	10	15
65.00	75	10	15

### 2.6 不确定来源分析

根据分析方法的数学模型, 不确定度来源主要包括: 测量溶液浓度的不确定度  $u_{\text{rel}}(C)$ ; 试样定容体积的不确定度  $u_{\text{rel}}(V)$ ; 试样称样质量的不确定度  $u_{\text{rel}}(w)$ 。

## 3 结果与分析

### 3.1 定量结果的不确定度分析

本次试验对供试品重复测量 2 次, 称样量分别为 0.7257、0.8361 g, 样品试液浓度为 20.36915、23.29044 mg/L。样品中西地那非含量为 14.0 mg/kg。

由于本次试验采用了外标一点法, 由标准曲线拟合过程中引入的相对标准不确定度可忽略不计。

### 3.2 标准溶液引入的不确定度

#### 1) 对照品的不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$

对照品西地那非由 TRC 提供, 纯度为 98%, 暂假定其纯度为  $98\% \pm 0.05\%$ 。视为矩形分布( $k=\sqrt{3}$ ), 测对照品纯度引起的不确定度:  $u_{\text{rel}}(\rho) = 0.05\% / \sqrt{3} = 0.00029$ 。

称量对照品 4.61 mg, 天平的检定证书给出最大允许误差为  $\pm 0.05$  mg。假定为矩形分布换算成标准不确定度为:

$$0.050 \text{ mg} / \sqrt{3} / 4.61 \text{ mg} = 0.00626。$$

由于标准品称量采用减重法称量, 每个结果均需称量 2 次。故称量对照品的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m) = \sqrt{2 \times 0.00626^2} = 0.00885。$$

对照品储备液配制是需要用到 5 mL 容量瓶。JJG 196-2006《常用玻璃量器》<sup>[16]</sup>规定, 20 °C 时 5 mL 容量瓶(A 级)的容量允差为  $\pm 0.020$  mL, 按矩形分布, 取  $k=\sqrt{3}$ 。

由玻璃量器引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(5) = 0.020 / \sqrt{3} / 5 = 0.00231。$$

该容量瓶在 20 °C 校准, 而实验室的温度为 (20±5) °C, 水的体积膨胀系数为  $2.1 \times 10^{-4} \text{ °C}^{-1}$ , 按矩形分布, 则环境温度引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(t) = 5 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3} = 0.000606。$$

合成对照品储备液配置过程的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(u_0) = \sqrt{0.00231^2 + 0.000606^2} = 0.00239 = 0.00239。$$

由对照品纯度、称量和定容引起的不确定度合成对照品储备液的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(u_0) = \sqrt{0.00029^2 + 0.00885^2 + 0.00239^2} = 0.00917。$$

2) 标准溶液配制引入的相对不确定度  $u_{\text{rel}}(V_0)$

准用的玻璃量具均为 A 级, 按照国家计量检定规程 JJG-196-2006<sup>[16]</sup> 的要求, 均有相应的允许偏差, 按照玻璃器皿的相对不确定度分量(表 2), 按照器具检定证书计算的相对不确定度分量(表 3), 计算得到 45.2 μg/mL 对照品溶液配置过程移入的不确定度为

$$u_{\text{rel}}(V_0) = \sqrt{0.00130^2 + 0.00580^2} = 0.00594。$$

### 3.3 样品称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(w)$

对样品称量引入的不确定度主要来源于电子天平校准不确定度, 天平的检定证书给出最大允许误差为 ±0.5 mg。假定为矩形分布, 换算成不确定度为:  $0.50 \text{ mg} / \sqrt{3} = 0.2887 \text{ mg}$ 。由样品称量 2 次, 分别为 0.7257、0.8361 g, 引起的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(w_1) = \frac{0.2887}{0.7257 \times 1000} = 0.000398;$$

$$u_{\text{rel}}(w_2) = \frac{0.2887}{0.8361 \times 1000} = 0.000345;$$

则样品称量引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(w) = \sqrt{\frac{u_{\text{rel}}^2(w_1) + u_{\text{rel}}^2(w_2)}{2}} = 0.000372。$$

### 3.4 样品定容、稀释过程引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$

样品溶液配置、稀释时使用的 50 mL 容量瓶, 1 mL 移液枪, 10 mL 容量瓶, 为级, 按照矩形分布处理,  $k = \sqrt{3}$ , 由此估算玻璃容器引入的相对不确定度:

$$u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{0.00084^2 + 0.00130^2 + 0.00580^2} = 0.00600。$$

### 3.5 高效液相色谱仪检定证书给出的扩展不确定度 $u_{\text{rel}}(A)$

Agilent 1260 高效液相色谱仪检定证书给出的定量测定重复性为相对标准偏差为 0.33% ( $n=6$ ), 则  $u_{\text{rel}}(A) = 0.33\% / \sqrt{6} = 0.0135$ 。该标准偏差是随机测量, 属 A 类不确定度。

### 3.6 合成标准不确定度及扩展不确定度的计算

综上所述, 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定保健品中西地那非含量的各相对标准不确定度分量见表 4。

将上述不确定度合成得到合成相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(c) + u_{\text{rel}}^2(w) + u_{\text{rel}}^2(V) + \dots} = \sqrt{0.011^2 + 0.0037^2 + 0.00600^2} = 0.013。$$

### 3.7 扩展不确定度及结果表述

对于大多数测量采用包含因子  $k=2$  衡量, 此时对应的置信概率为 95%, 则西地那非含量的扩展不确定度为:

$$U = 2 \times X \times u_{\text{rel}}(X) = 2 \times 14 \times 0.013 = 0.36 \text{ mg}。$$

参考《国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件》(批准件编号 2009030)<sup>[6]</sup> 对某保健品中的西地那非含量测定, 测定结果为 (14.0±0.4) mg/g,  $k=2$ 。

表 2 玻璃器皿的相对不确定度分量

Table 2 Relative uncertainty components of glassware

玻璃量具	最大允差/mL	量具校准引起的相对标准不确定度	温度变化引起的相对标准不确定度	合成相对标准不确定度
5 mL 量瓶	±0.020	0.002310	0.000606	0.00239
10 mL 量瓶	±0.020	0.001155	0.000606	0.00130
50 mL 量瓶	±0.050	0.000577	0.000606	0.00084

表 3 器具检定证书计算的相对不确定度分量

Table 3 Relative uncertainty components of instruments

器具(使用体积)	最大允差/μL	器具校准引起的相对标准不确定度	温度变化引起的相对标准不确定度	合成相对标准不确定度
1 mL 移液枪(0.5 mL)	±5	0.00577	0.000606	0.00580
1 mL 移液枪(1.0 mL)	±10	0.00577	0.000606	0.00580

表4 相对标准不确定度  
Table 4 Relative standard uncertainty

分量	不确定度来源	分布	类型	相对标准不确定度
$u_{rel}(c)$	对照品纯度	矩形	B	0.00029
	天平允差	矩形	B	0.00885
	配制对照品储备溶液	矩形	B	0.00239
	配制对照品溶液的玻璃量器允差	矩形	B	0.00594
	HPLC 进样重复性	正态	A	0.00135
$u_{rel}(w)$	供试品称量	矩形	B	0.00037
$u_{rel}(V)$	供试品系数定容	矩形	B	0.00600

## 4 结论

保健食品中非法添加的定性和定量分析,一直是保健食品检验工作的重点和难点。本文评定高效液相色谱测量保健品中的不确定度,结果表明此方法不确定来源主要是称量、标准溶液配制和进样的重复性。因此在日常检测工作中,要注意操作的规范性,定期检查称量仪器,选择准确度高的玻璃仪器,做平行实验,以此保证实验的准确性。

## 参考文献

- [1] 张翠英,李振国,徐金铃,等. UPLC/MS/MS 法检测补肾壮阳类中成药中非法添加枸橼酸西地那非的定性定量研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, (10): 1741-1812.  
Zhang CY, Li ZG, Xu JL, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of sildenafil citrate illegally mixed into traditional Chinese medicinal preparation for invigorant by UPLC/MS/MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, (10): 1741-1812.
- [2] Patel DN, Li L, Kee CL, *et al.* Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: analytical techniques and challenges [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 87(6): 176-190.
- [3] Francesco S, Shaantanu D, Tarek AH, *et al.* Phosphodiesterase type 5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction: Pharmacology and clinical impact of the sildenafil citrate dispersible tablet formulation [J]. Clin Ther, 2017, 39(2): 370-377.
- [4] Ali K, Marwa MK, Amany MG, *et al.* Ameliorative effects of sildenafil and/or febuxostat on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 805(7): 118-124.
- [5] 曹玲,吴嫣艳,张好琳,等. 高效液相色谱法测定保健食品中西地那非的不确定度评定[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 890-893.  
Cao L, Wu YY, Zhang YL, *et al.* Evaluation of uncertainty for determination of sildenafil citrate added in health products by HPLC [J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(7): 890-893.
- [6] 2009030 国家食药监局药品检验补充检验方法和检验项目[Z]. 2009030 Supplementary inspection methods and items for drug inspection of China food and drug administration [Z].
- [7] Marco S, Debora P, Daniela P, *et al.* Development and validation of an ultra performance liquid chromatography tandem mass method for sildenafil and N-desmethyl sildenafil plasma determination and quantification [J]. J Chromatogr B, 2015, 1001(9): 35-40.
- [8] 李绍辉,吴寒秋,许秀丽,等. 超高效液相色谱串联质谱法检测玛咖产品中非法添加西地那非[J]. 食品工业科技, 2016, 37(11): 310-313.  
Li SH, Wu HQ, Xu XL, *et al.* Detection of sildenafil illegally added in maca products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(11): 310-313.
- [9] 张书文,王银,韩圣谦. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定露酒中伐地那非、西地那非和他达拉非含量[J]. 化学分析计量, 2016, 25(1): 44-46.  
Zhang SW, Wang K, Han SQ. Determination of vardenafil-sildenafil and tadalafil in liqueur by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 25(1): 44-46.
- [10] 张翠英,李振国,徐金铃,等. UPLC/MS/MS 法检测补肾壮阳类中成药中非法添加枸橼酸西地那非的定性定量研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1741-1742.  
Zhang CY, Li ZG, Xu JL, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of sildenafil citrate illegally mixed into traditional Chinese medicinal preparation for invigorant by UPLC/MS/MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(10): 1741-1742.
- [11] 王朝晖,赵宏冰,蒋晓煌,等. 15 种壮阳类保健品中西地那非和他达拉非的含量分析[J]. 中国药师, 2012, 15(6): 895-896.  
Wang ZH, Zhao HB, Jiang XH, *et al.* Content analysis of sildenafil and tadalafil in 15 aphrodisiac health products [J]. China Pharm, 2012, 15(6): 895-896.
- [12] 邓鲲鹏,罗卓雅,雷毅. 补肾壮阳类健康产品中艾地那非的检测方法研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(18): 1441-1444.  
Deng KP, Luo ZY, Lei Y. Detection of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, aildenafil, in health care products for promoting sexual function [J]. Chin J Pharm, 2011, 46(18): 1441-1444.
- [13] 黄朝辉,蔡丹丹,陈仲益. 保健食品中非法添加西地那非类似物的分析鉴定[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 694-698.  
Huang ZH, Cai DD, Chen ZY. Analysis and identification of illegally added sildenafil analogue in health food [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(4): 694-698.

- [14] 张丽媛, 颜琳琦, 周明昊, 等. 高效液相色谱-串联质谱检测保健酒中非法添加物艾地那非[J]. 食品科学, 2016, 37(14): 198-202.  
Zhang LY, Yan LQ, Zhou MH, *et al.* Determination of aildenafil illegally added in health wine by high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2016, 37(14): 198-202.
- [15] CNAS-GL 006-2018 化学分析中不确定度的评估指南[S].  
CNAS-GL 006-2018 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [16] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].  
JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



戴欣, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: 22066177@qq.com



王伟, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: 31575572@qq.com

---

## “食品风味物质研究”专题征稿函

食品不仅是维持人体生命活动所必需的各种营养物质和能量的最主要来源, 而且以其色、香、味、质地及口感给人们以愉悦的感官享受。随着食品工业和食品科学技术的不断发展, 民众对食品品质和卫生要求也越来越高。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品风味物质研究”专题, 本专题将围绕食品风味物质的分析与鉴定、风味物质的形成、典型食品风味、食品风味质量控制、风味物质感官分析研究或您认为本领域有意义的问题进行论述。本专题计划在 2019 年 6 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编吴永宁研究员及专题主编上海交通大学刘源教授特别邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2019 年 5 月 10 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)(注明专题文章)

E-mail: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)(注明专题文章)

《食品安全质量检测学报》编辑部