

液相色谱-质谱联用法检测保健品中非法掺入的硫代伐地那非

帅放文^{1,2}, 王向峰¹, 雷玉萍¹, 肖江¹, 汪修意^{1*}

(1. 湖南省药用辅料工程技术研究中心有限公司, 长沙 410000; 2. 湖南尔康制药股份有限公司, 长沙 410000)

摘要: 目的 建立保健品中非法掺入硫代伐地那非的液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)检测方法。方法 保健品样品经甲醇超声提取得提取液, 用液相色谱-串联四极杆质谱进行分析, 根据相对分子量、液相色谱保留时间、色谱峰面积等, 对保健品中非法掺入的硫代伐地那非进行定性以及定量分析。结果 在 10~200 μg/mL 浓度范围内, 硫代伐地那非浓度与峰面积呈良好线性关系, $r^2=0.998$, 精密度和稳定性良好, 加样平均回收率为 99.9%, RSD 为 0.613%, 方法准确可靠, 专属性强, 并测得某市售保健品中硫代伐地那非的含量为 0.34%。结论 液相色谱-质谱联用法专属性强, 灵敏度高, 可作为检测保健品中非法掺入硫代伐地那非的有效方法。

关键词: 硫代伐地那非; 5型磷酸二酯酶; 液相色谱-质谱联用; 核磁共振

Detection of illegally added thiovardenafil in healthcare foods by liquid chromatography-mass spectrometry

SHUAI Fang-Wen^{1,2}, WANG Xiang-Feng¹, LEI Yu-Ping¹, XIAO Jiang¹, WANG Xiu-Yi^{1*}

(1. Hunan Pharmaceutical Excipients Engineering Research Center Co., Ltd, Changsha 410000, China;

2. Hunan Er-Kang Pharmaceutical Co., Ltd, Changsha 410000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) method for the identification of illegally added thiovardenafil in healthcare foods. **Methods** Thiovardenafil in healthcare food was extracted with methyl and then analyzed by HPLC-MS. Qualitative and quantitative analysis were conducted according to relative molecular weight, retention time and peak area. **Results** Good linear correlation were detected in the range of 10 to 200 μg/mL ($r^2=0.998$, $n=5$). The average recovery rate was 99.9%, and RSD was 0.613% ($n=6$). The content of thiovardenafil in a market sample was 0.34%. **Conclusion** The method is selective and sensitive, which can be used to detect thiovardenafil illegally added in healthcare food supplements.

KEY WORDS: thiovardenafil; ipophodiesterase 5; liquid chromatography-mass spectrometry; nuclear magnetic resonance

1 引言

伐地那非^[1-2](vardenafil)为高选择性 5-磷酸二酯

酶(PDE-5)抑制类药物, 是美国食品和药品管理局(FDA)继枸橼酸西地那非(sildenafil)、他达那非(tadalafil)之后批准的第三个治疗男性性功能障碍的

*通讯作者: 汪修意,硕士, 主要研究方向为天然产物分离。E-mail: wangxiuyi 2011 @ 126.com

*Corresponding author: WANG Xiu-Yi, Master, Hunan Er-Kang Pharmaceutical Co., Ltd, National Liuyang Economic and Technological Development Zone (Changsha National Industrial Base), No.167 Kangping Road , Changsha 410000, China. E-mail: wangxiuyi2011@126.com

药物, 具有用量少、起效时间快、副作用小、作用时间长等优点^[3~6], 2003 年 8 月美国 FDA 批准其盐酸盐上市。目前市场上某些补肾壮阳以及抗疲劳等保健品生产厂家为增加产品的功效, 非法向产品中添加伐地那非、西地那非、他达那非等违禁成分^[7~12], 为了逃避打击和检查, 有的甚至添加它们的类似物, 隐蔽性更强, 危害性更大。已有研究报道, 在补肾壮阳及抗疲劳保健品中已发现非法掺有伪伐地那非^[13]、羟基硫代伐地那非^[14]等类似物, 国家食品药品监督管理局确证了西地那非、豪莫西地那非、羟基豪莫西地那非、那莫西地那非、氨基他达那非等 11 种类似物的检测方法, 但至今还未见硫代伐地那非的相关报道。长期服用该类掺有违禁成分的保健品, 会出现头痛、胃部不适、恶心、呕吐等不良反应, 严重者可危害心血管疾病患者的生命安全。本文建立了硫代伐地那非的液相-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)检测法, 并对某市售保健品中非法掺入的硫代伐地那非进行了检测, 该方法能够快速、准确地对硫代伐地那非进行定性定量检测, 方法专属性强。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

仪器: Brucker-400 核磁共振仪(美国 Bruker 公司), LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津), AB SCIEX 3200Q Trap 高效液相质谱联用仪(美国应用生物系统公司), 超纯水机(中沃 ZWG-R), 天平: XS205 分析天平(梅特勒托利多公司, 美国 & 瑞士)。试剂: 色谱甲醇(默克试剂), 超纯水, 对照品: 实验室自主研制。

2.2 方法

2.2.1 色谱条件与质谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (4.6mm×250 mm, 0.5 μm); 流动相为甲醇: 水(*V*:*V*)=90:10; 流速为 0.5 mL/min; 柱温为 25 ℃, 进样量 10 uL。质谱装配: 电喷雾电离源(ESI):300~700 amu; 毛细管电压: 3.0 kV; 脱溶剂气(N₂): 350 L/h; 锥孔反吹气 50L/h; 锥孔电压: 30 kV; 一级扫描碰撞能量: 进口 50 V, 碰撞能量 2 V, 出口 50 V。

2.2.2 对照品溶液的配制

精密称取硫代伐地那非对照品适量, 加甲醇溶

解并制成每 1 mL 中含 0.2 mg 硫代伐地那非的溶液, 即得对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备

精密称取粉碎均匀的保健品样品 1000 mg 置于 100 mL 锥形瓶中, 加 50 mL 甲醇溶解, 超声处理 15 min, 过滤, 用甲醇定容至 100 mL 容量瓶, 即得供试品溶液。

3 结果与分析

3.1 硫代伐地那非的定性鉴定

3.1.1 质谱分析

将自行研制的对照品溶于甲醇, 在离子源为 ESI 条件下进行 MS 鉴定, ESI-MS 有 *m/z*: 505.4 [M+H]⁺、527.4 [M+Na]⁺ 等离子峰, 表明该物质的相对分子量为 504.4, 与硫代伐地那非的分子量一致。

3.1.2 HPLC 分析

将自行研制的对照品溶液用液相色谱仪(岛津 LC-20AT)进行检测, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (4.6mm × 250 mm, 0.5 μm), 甲醇: 水(*V*:*V*)=90:10 为流动相, 流速为 0.5 mL/min, 柱温: 25 ℃, 检测波长为 225 nm, 进样量为 10 μL, 检测得物质出峰时间为 9.602 min, 经液相面积归一化得化合物纯度约为 95.59%。

3.1.3 核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)分析

将自行研制的对照品溶于氘代二甲亚砜(DMSO-*d*₆), 进行核磁检测, 核磁数据经 MestReNova 软件解析得, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 12.71 (br s, 1H), 7.88 -7.85(s, 2H), 7.40-7.37 (m, 1H), 4.25-4.20 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 2.90-2.83(q, *J* = 6.8 Hz, 4H), 2.70 (t, 3H), 2.51-2.49(s, 4H), 2.42(t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.32-2.30(s, 2H), 1.77-1.71(m, 2H), 1.34-1.31(t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.94-0.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H); ¹³CNMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 160.98(s), 153.64(s), 152.33(s), 147.32(s), 134.27(s), 132.02(s), 130.57(s), 129.53(s), 127.65(s), 114.87(s), 65.73(s), 51.97(s), 51.53(s), 51.11(s), 45.13(s), 45.92(s), 28.97(s), 19.99(s), 15.82(s), 26.29(s), 13.56(s), 14.58(s), 12.08(s)。与 Scifinder 数据库中报道一致。综合以上质谱、核磁信息, 鉴定此合成产物为硫代伐地那非, 分子式为 C₂₃H₃₂N₆O₃S₂, 结构式如图 2 所示。

3.2 线性关系考察

精密量取硫代伐地那非对照品储备液 1、4、8、12、16 mL 置于 20 mL 的容量瓶中, 用甲醇稀释定容

至刻度线, 摆匀。分别进样 10 μL 进行测定, 记录色谱图和峰面积, 以硫代伐地那非浓度为横坐标, 各浓度峰面积(A)的平均值为纵坐标, 计算线性回归方程, 结果见表 1。

得线性回归方程为: $Y=3\times10^7X + 2\times10^9$, $r^2=0.998$, 结果表明硫代伐地那非在浓度为 10 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈良好线性关系, 并测得其定量限($S/N=10$)为 5.0 ng/mL , 检测限($S/N=3$)为 1.0 ng/mL 。对照品溶液和甲醇空白的总离子流图如图 3、图 4 所示, 色谱峰的质谱图如图 5 所示。

3.3 稳定性试验

精密量取 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 取 10 μL 进样进行 HPLC-MS 检测, 记录色谱图及峰面积, 考察溶液的稳定性, 结果见表 2。

结果表明, 样品溶液在 0~12 h 内峰面积无明显变化, 峰面积 RSD 为 0.529%, 溶液在 12 h 内稳定。

3.4 精密度试验

精密吸取 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液 10 μL 注入 HPLC-MS 中检测, 重复测定 6 次, 记录每次色谱图和峰面积, 结果见表 3, 结果表明溶液的精密度良好。

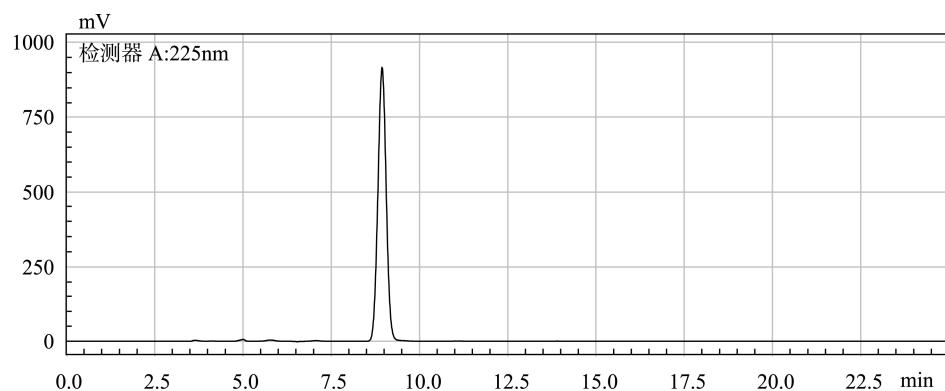


图 1 硫代伐地那非液相色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of thiovardenafil

表 1 线性关系考察($n=5$)
Table 1 Standard curve of thiovardenafil ($n=5$)

浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	10	40	80	120	160	200
峰面积	1.881×10^9	2.789×10^9	3.791×10^9	5.208×10^9	6.295×10^9	7.721×10^9

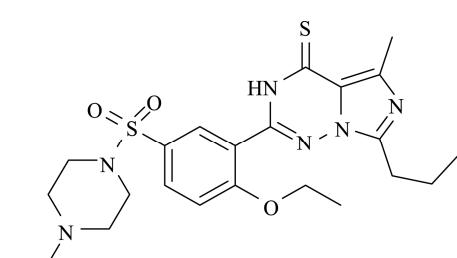


图 2 硫代伐地那非结构式
Fig. 2 The chemical structure of thiovardenafil

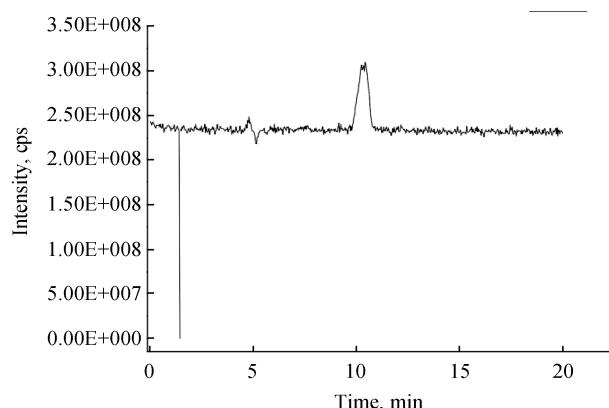


图 3 标准溶液的总离子流图
Fig. 3 TIC chromatogram of standard solution

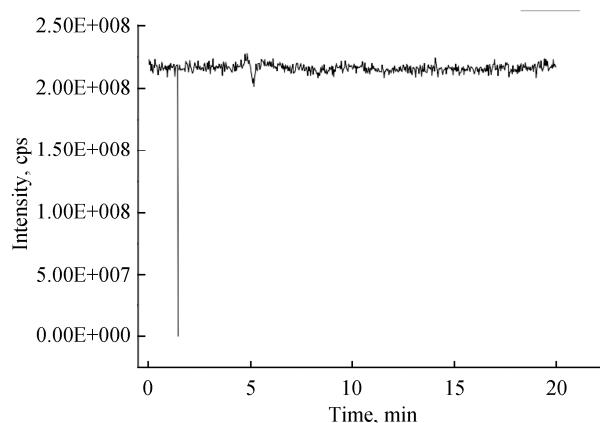


图4 空白溶液的总离子流图
Fig. 4 TIC chromatogram of methanol solution

3.5 重复性试验

精密称取保健品样品 1000 mg, 按照供试品溶液制备方法制备溶液, 取 10 μ L 按照 HPLC-MS 色谱条件进样, 连续 5 次, 记录色谱图和峰面积, 结果见表 4。结果表明, 供试品溶液连续进样 5 次的 RSD% 均小于 1.0%, 重复性良好, 符合高效液相质谱联用法测定含量的要求。

3.6 重现性试验

精密称取保健品样品 1000 mg, 5 份, 按照供试品溶液制备方法制备溶液, 取 10 μ L 按照 HPLC-MS 色谱条件进样, 记录色谱图和峰面积, 结果见表 5。结果表明, 5 份供试品溶液的 RSD% 均小于 1.0%, 重现性良好, 符合高效液相质谱联用法测定要求。

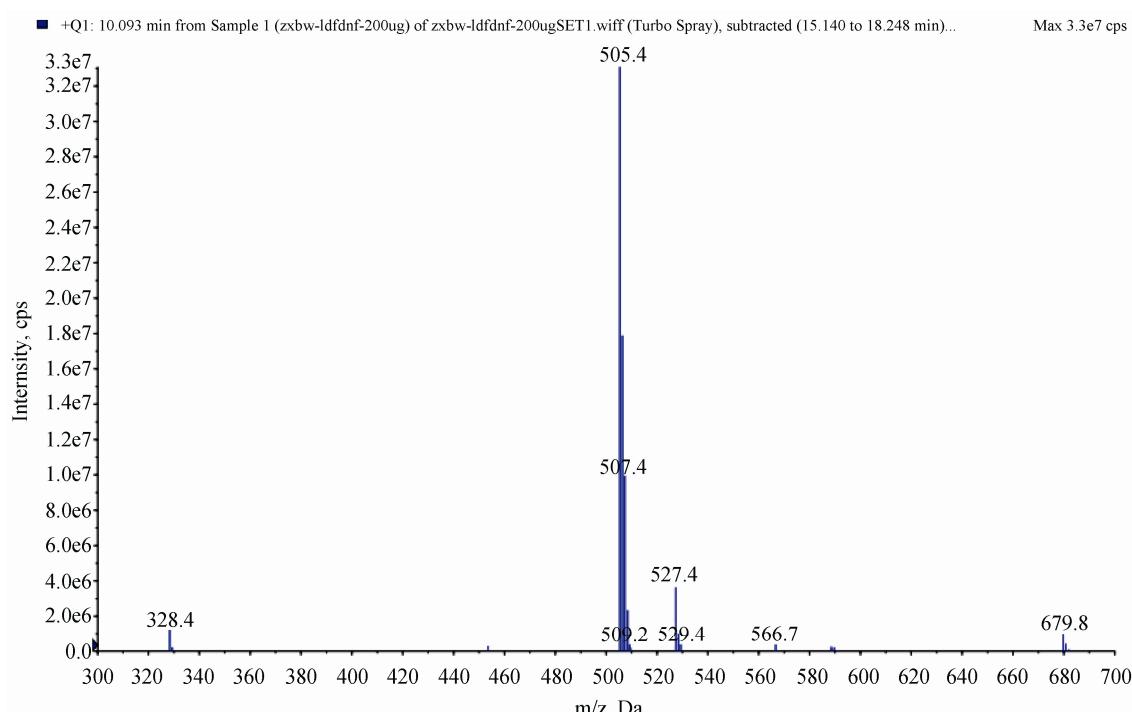


图5 硫代伐地那非色谱峰的质谱图
Fig. 5 MS spectra of the thiavardenafil

表2 溶液的稳定性试验
Table 2 Results of the stability test

时间(h)	0	2	4	6	8	10	12
峰面积	3.775×10^9	3.772×10^9	3.801×10^9	3.785×10^9	3.819×10^9	3.823×10^9	3.795×10^9
峰面积 RSD					0.529%		

表 3 溶液精密度试验
Table 3 Results of the precision test

次数	1	2	3	4	5
峰面积	3.782×10^9	3.789×10^9	3.796×10^9	3.779×10^9	3.813×10^9
峰面积 RSD			0.381%		

表 4 溶液重复性试验
Table 4 Results of the repeatability test

次数	1	2	3	4	5
峰面积	3.017×10^9	3.029×10^9	3.013×10^9	3.022×10^9	3.028×10^9
峰面积 RSD			0.229%		

表 5 溶液重现性试验
Table 5 Results of the reproducibility test

次数	1	2	3	4	5
峰面积	3.020×10^9	3.027×10^9	3.029×10^9	3.019×10^9	3.024×10^9
峰面积 RSD			0.143%		

表 6 样品回收率试验
Table 6 Results of the recovery experiment

编号	样品加标量(mg)	实际测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1a	3.59	3.57	99.44		
1b	3.59	3.55	98.88		
2a	3.80	3.81	100.26		
2b	3.80	3.80	100.00	99.89	0.61
3a	4.01	4.02	100.25		
3b	4.01	4.03	100.50		

表 7 含量测定结果
Table 7 Results of the content detection

批次	1	2	3	4	5	6
含量(%)	0.33	0.35	0.32	0.34	0.36	0.34

3.7 加样回收试验

精密称取保健品样品 1000.00 mg 3 份, 然后分别精密量取 1、2、3 mL 的硫代伐地那非标准物质储备液, 按照供试品溶液制备方法制备溶液, 用甲醇定容至 100 mL 容量瓶, 摆匀。取 10 μL 按照 HPLC-MS 色谱条件进样测定样品中硫代伐地那非的含量及回收率。试验结果见表 6, 测得硫代伐地那

非的平均回收率为 99.89%, 相对标准偏差为 0.61%。表明该方法准确度良好, 符合液相质谱联用对含量测定的要求。

3.8 含量测定

精密称取保健品样品 1000.00 mg, 按“供试品溶液的制备”项方法制备 6 批供试品溶液, 进行含量测定, 结果见表 7。

4 结 论

本文通过质谱、核磁共振等技术手段对硫代伐地那非进行了定性鉴定，同时建立了硫代伐地那非的HPLC-MS 检测方法，结果表明硫代伐地那非在浓度为 10~200 μg/mL 范围内呈现良好线性关系，线性方程为: $Y=3\times10^7X+2\times10^9$, 相关系数 $r^2=0.998$, 并最终测得保健品中硫代伐地那非的含量为 0.34%。HPLC-MS 检测方法具有良好的灵敏度和抗干扰能力，方法的建立为硫代伐地那非的鉴别分析，以及补肾壮阳、抗疲劳等保健品中硫代伐地那非的检测分析提供技术依据。

参考文献

- [1] 陈稚, 肖松, 陈波, 等. 高效液相色谱/质谱联用测定保健食品中的伐地那非[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(6): 508~511.
Chen Y, Xiao S, Chen B, et al. Detection of vardenafil in health foods by high performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2005, 17(6): 508~511.
- [2] Fan YF, Zhang R, Jiang X, et al. The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil reduces oxidative stress while reversing pulmonary arterial hypertension [J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(3): 395~403.
- [3] Vidal DTR, Augelli MA, Lago CLD. Determination of sildenafil and vardenafil by capillary zone electrophoresis using capacitively coupled contactless conductivity detection [J]. Anal Meth, 2013, 5(8): 2041~2045.
- [4] Liatsikos E, Kyriazis I, Neuhaus J, et al. Direct effects of vardenafil on the ureter: in vitro investigation and potential clinical applications of intraluminal administration [J]. J Endourol, 2013, 27(11): 1400~1404.
- [5] Kyriazis I, Kagadis GC, Kallidonis P, et al. PDE5 inhibition against acute renal ischemia reperfusion injury in rats: does vardenafil offer protection? [J]. World J Urol, 2013, 31(3): 597~602.
- [6] 李锐, 陈国彪. UPLC-Q-TOF-MS 法快速检测补肾壮阳类中成药中 11 个 PDE5 型抑制剂类药物[J]. 药物分析杂志, 2014, (5):879~884.
Li R, Chen GB. Simultaneous determination of 11 phosphodiesterase - 5 inhibitors added illegally in Chinese medicine preparations for invigorants by UPLC - Q - TOF - MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, (5):879~884.
- [7] 马云云, 谭金峰, 徐玉女, 等. 液相色谱-高分辨质谱法测定壮阳类保健品中非法添加物 [J]. 理化检验 - 化学分册, 2015, 51(3):325~330
Ma YY, Tan JF, Xu JY, et al. LC-HRMS Determination of Illegal Additives in Impotence Health Product [J]. PTCA (Part B: Chem Anal), 2015, 51(3): 325~330
- [8] 王一红, 冯家力, 潘振球, 等. 液相色谱-质谱-质谱方法同时测定抗疲劳保健食品中伐地那非、西地那非、他达那非[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(8):727~729.
Wang YH, Feng JL, Pan ZQ, et al. Simultaneous detection of vardenafil sildenafil, cialis in anti- fatigue health care products by LC-MS/MS [J]. Chin J Prev Med, 2009, 43(8): 727~729.
- [9] Lake ST, Altman PM, Vaisman J, et al. Validated LC-MS/MS assay for the quantitative determination of vardenafil in human plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2009, 24(8): 846~851.
- [10] 李锦清, 禹艳, 郑明浩, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健品中三种违禁成分[J]. 现代食品科技, 2014, 30(11): 246~250.
Li JQ, Zhuan Y, Li MH, et al. Simultaneous Determination of Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Health Foods by Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry [J]. Mod Food Sci Tech, 2014, 30(11): 246~250.
- [11] AboulEnein HY, Ghanem A, Hoenen H. Determination of vardenafil in pharmaceutical formulation by HPLC using conventional C 18 and monolithic silica columns [J]. J Liq Chromatogr R T, 2005, 28(4): 593~604.
- [12] 邢俊波, 曹红, 张炯, 等. 高效液相色谱法同时测定补肾壮阳类中成药及保健食品中非法添加 7 种化药成分[J]. 时珍国医国药, 2014, (2): 451~453.
Xing JB, Cao H, Zhang J, et al. Simultaneous determination of 7 illegal components illegally added in traditional Chinese medicine and health food by HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Rese, 2014, (2): 451~453.
- [13] 肖丽和, 邬晓鸥, 高咏莉, 等. 液相色谱-质谱联用法检测壮阳制剂中非法掺入的伪伐地那非[J]. 中国药业, 2009, 18(23): 22~23.
Xiao LH, Wu XO, Gao YL, et al. Detection of pseudo-vardenafil illegally added into anti-impotence preparations by LC-MS [J]. Chin Pharm, 2009, 18(23): 22~23.
- [14] Péter J, Szilvia L, András D, et al. Detection and structure elucidation of hydroxythiovardenafil as an adulterant in a herbal dietary supplement [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 74(4): 83~91.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



帅放文, 博士, 主要研究方向为药物
研究。
E-mail: 461848994@qq.com



汪修意, 硕士, 主要研究方向为天然
产物分离。
E-mail: wangxiuyi2011@126.com



“食品加工中的安全控制”专题征稿函

食品安全问题一直是公众最关心的话题之一。而且随着发展已经出现了很多食品安全事件, 自 2015 年 10 月 1 日起实施的新《食品安全法》也从“加大处罚力度、特殊食品特殊对待、监管网络食品交易”等方面对食品安全实行了更加严格的管控, 食品在加工中的安全控制是食品安全的重要环节。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品加工中的安全控制”专题, 由西北农林科技大学岳田利教授担任主编, 岳教授现任西北农林科技大学食品科学与工程学院院长, 兼任现任国务院学位委员会食品科学与工程学科评议组成员, 国家杨凌农业综合试验工程技术研究中心主任, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(杨凌)主任, 农业部食品质量监督检验测试中心(杨凌)常务副主任, 农业部植物 DUS 测试中心(杨凌)常务副主任。农业部农产品质量安全专家组成员, 国家食品药品监督管理总局餐饮食品安全专家组成员等职。专题主要围绕食品加工全链条中安全危害因子的来源识别与过程节点的存在状态解析(微生物污染, 毒素污染, 植物源农药残留, 动物源兽药残留, 植物激素, 过量添加剂等)、加工全链条中有毒有害物质的控制方法、加工全链条的安全控制体系及系统解决方案等或您认为本领域有意义的问题展开讨论, 计划在 2016 年 3 月出版。

本刊编辑部和岳田利教授欢迎各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2016 年 2 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoods@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部