

超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 顺式四氢吡啶和环己基去甲他达拉非

韦环, 刘珈伶*, 苏俞有

(广西-东盟食品检验检测中心, 南宁 530022)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定食品中非法添加2种新型他达拉非非法添加物含量的分析方法。**方法** 样品以甲醇为溶剂超声提取, 经Atlantis® T3色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)分离, 以0.1% (V/V)甲酸水溶液-甲醇作为流动相, 进行梯度洗脱。在电喷雾正离子模式下, 采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, 基质匹配曲线外标法定量。**结果** 顺式四氢吡啶、环己基去甲他达拉非在1~50 ng/mL范围内与峰面积均成良好的线性关系, 相关系数 r 均在0.999以上。顺式四氢吡啶和环己基去甲他达拉非的检出限均小于3 μg/kg, 定量限均小于10 μg/kg, 在饼干等4种基质中1、2、10 ng/mL 3个水平下加标回收率为66.1%~117.4%, 相对标准偏差均未超过10% ($n=6$)。**结论** 该方法准确、可靠, 可满足食品中顺式四氢吡啶、环己基去甲他达拉非的定量分析。

关键词: 环己基去甲他达拉非; 顺式四氢吡啶; 非法添加; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of tetrahydro- β -carboline and N-cyclohexyl nortadalafil in food with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WEI Huan, LIU Jia-Ling*, SU Yu-You

(Guangxi-Asean Food Inspection Center, Nanning 530022, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 2 kinds of new illegal tadalafil additives in food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The compound was extracted by methanol ultrasonic wave method. The extract was separated on an Atlantis® T3 column (150 mm×2.1 mm, 3 μm). After separation, gradient elution was carried out with 0.1% (V/V) formic acid aqueous solution methanol as the mobile phase and the samples were determined with electrospray ionization source under positive ion mode and multiple reaction monitoring (MRM) mode. External standard of the blank matrix-matched calibration curves was used for quantification. **Results** Tetrahydro- β -carboline and N-cyclohexyl nortadalafil had good linearity with the peak area in the range of 1–50 ng/mL, with the correlative coefficients over 0.999. The limits

基金项目: 2021年度广西壮族自治区市场监管局科技计划项目(GXSJKJ2021-1)

Fund: Supported by the Science and Technology Program Project of Guangxi Provincial Administration for Market Regulation in 2021 (GXSJKJ2021-1)

*通信作者: 刘珈伶, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全检验、天然产物化工。E-mail: jialingliu6@163.com

*Corresponding author: LIU Jia-Ling, Associate Chief Technician, No.42, Foziling Road, Qingxiu District, Nanning 530022, China. E-mail: jialingliu6@163.com

of detection of tetrahydro- β -carboline and N-cyclohexyl nortadalafil were all less than 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limits of quantitation were all less than 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In 4 kinds of substrates such as cookies, the recoveries were 66.1%-117.4% at the spiked levels of 1, 2, 10 ng/mL, with the relative standard deviations lower than 10% ($n=6$). **Conclusion** This method is accurate and reliable, which is suitable for the determination of tetrahydro- β -carboline and N-cyclohexyl nortadalafil illegally added into food.

KEY WORDS: N-cyclohexyl nortadalafil; tetrahydro- β -carboline; illegally added; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

近年来媒体曝光了多起食品及保健食品中非法添加化学药物的违法案件^[1-2]。非法添加的化学药物添加方式随意性大, 剂量不明确, 长期、超量服用极易引发中毒, 给人们的健康埋下了巨大的隐患^[3]。我国法律禁止在食品中添加食品添加剂以外的非食用化学物质, 监管部门对食品中非法添加违法行为向来严厉打击。食品和保健食品中常见的抗疲劳类非法添加物以选择性磷酸二酯酶 5 (phosphodiesterase-5, PDE-5) 抑制剂为主, 如西地那非、他达拉非、伐地那非, 以及以其为母核合成的衍生物^[4-7]。西地那非、他达拉非和伐地那非均为临床上治疗男性勃起功能障碍的处方药物, 须经过医生处方才能获得, 并且需要在医生的指导下使用^[8]。当服用较大剂量的上述药物时易引发心悸、潮红、头疼、视觉障碍等不良反应^[9], 尤其是心绞痛和心脏病患者、过敏人群以及正在服用任何形式硝酸盐类药物的患者, 必须禁用^[10-11]。因此, 消费者在不知情的情况下购买含有此类物质的食品或保健食品, 无限制地服用后将会产生严重后果甚至危及生命^[11]。

国内外已开发出多种方法检测食品和保健食品中那非类药物, 主要检测方法有紫外分光光度法 (ultraviolet spectroscopy, UV)^[12]、薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC)^[13]、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[14]、气相色谱-串联质谱法 (gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)^[15]、超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)^[7,16-18]、高效液相色谱-串联高分辨质谱法 (high performance liquid chromatography-tandem high resolution mass spectrometry, HPLC-HRMS)^[19-21] 等。其中 LC-MS/MS 法具有高灵敏度和高选择性, 是检测这些非法添加药物的常用方法和强有力的确证工具。PDE-5 抑制剂的结构中活性位点多, 易于进行结构修饰, 新发现的 PDE-5 抑制剂衍生物已经多达百种, 2018 年国家制定了包含 90 种那非类化合物的补充检验方法 BJS 201805 《食品中那非类物质的测定》, 应用了高效液相色谱-串联质谱法、超高效液相色谱-串联高分辨质谱法 2 种方法。在高压打击下, 不法分子转而添加以他达拉非为母体的结构改造物以期到达类似功效。这些结构修饰

物不在现行标准检测范围之内, 从而逃避监管^[22-25]。这些新型衍生物缺乏相关毒理药理学研究数据, 对人体的作用和危害还属于未知阶段。这就要求要不断地、及时地更新完善相关食品的非添加监管物质, 坚决打击此类违法添加非食用物质行为。近期本项目组在相关部门提供的食品原料中发现了 2 种在补充检验方法 BJS 201805 检测范围之外的新型非法添加物: 环己基去甲他达拉非^[26]和顺式四氢吡啶。环己基去甲他达拉非 (N-cyclohexyl nortadalafil, 化学名: 6-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-cyclohexyl-2,3,6,7,12,12-ahexahydro-1H-pyrido [1',2':1,6] pyrido [3,4-b] indole-1,4-dione, 化学结构如图 1(a) 所示), 为新型他达拉非衍生物, 国外仅有少量合成路线报道^[27], 国内尚未开展该物质的研究。顺式四氢吡啶 (tetrahydro- β -carboline, 化学名: (1R,3R)-methyl 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido [3,4-b] indole-3-carboxylate, 化学结构如图 1b 所示) 为他达拉非合成前体^[28], 与氯乙酰氯和甲胺依次反应后即可合成他达拉非, 国内外研究均侧重于顺式四氢吡啶合成他达拉非及其衍生物的合成反应^[28-30], 对其检测方法却鲜有报道。鉴于此, 本研究建立了 UPLC-MS/MS 法测定多种食品基质中这 2 种物质, 为食品中非法添加顺式四氢吡啶、环己基去甲他达拉非的定性定量分析提供技术参考, 也为进一步完善我国食品 (含保健食品) 非法添加数据库, 有力打击食品违法犯罪行为, 保障人民健康和食品安全提供技术支撑。

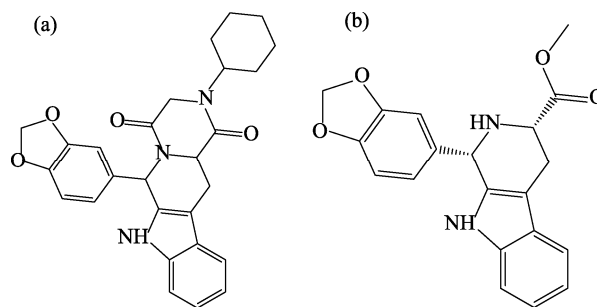


图 1 环己基去甲他达拉非(a)、顺式四氢吡啶(b)结构式
Fig.1 Structural formulas of N-cyclohexyl nortadalafil (a) and tetrahydro- β -carboline (b)

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Waters Xevo TQ-XS 超高效液相色谱-三重四极杆质

谱联用仪[配电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 美国沃特斯公司]; Sorvall ST 40R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KS-9986 医用超声波清洗器(宁波海曙科生超声设备有限公司); ML802 型分析天平[精度: 1 mg, 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司]; Milli-Q 超纯水器(美国密理博公司)。

1.2 材料与试剂

保健酒(500 mL/瓶)、牡蛎片(0.5 g/片)、硬胶囊(0.2 g/粒)、饼干(38 g/条)市售。

环己基去甲他达拉非(纯度: 100.0%)、顺式四氢吡啶盐酸盐(纯度: 98.8%)(加拿大 TLC PharmaChem 公司); 甲醇、甲酸(色谱纯, 美国默克集团); 实验用水为 Milli-Q 纯水仪制备的超纯水(电阻率 18.2 M Ω ·cm)。

1.3 标准溶液配制

1.3.1 标准储备液

分别精密称取环己基去甲他达拉非, 顺式四氢吡啶盐酸盐标准物质适量, 用甲醇溶解稀释, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 于 -20 °C 保存。

1.3.2 标准曲线溶液

分别准确吸取上述标准储备液, 用甲醇稀释, 配制系列标准工作溶液(质量浓度分别为 1、2、5、8、10、50 ng/mL), 临用新制。同时采用空白基质提取液配制相同质量浓度的基质混合标准工作溶液。

1.4 样品前处理

固体试样粉碎研磨, 准确称取样品 1.000 g(精确至 0.001 g), 于 50 mL 离心管中, 加入甲醇 50 mL, 密封称重, 振摇分散, 超声提取 20 min, 静置冷却至室温, 复称重, 以甲醇补重, 摇匀, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μ m 滤膜, 取续滤液上机待测。液体试样混匀后直接用 0.22 μ m 滤膜过滤, 取续滤液上机待测。

称取空白试样适量, 与样品同法处理, 制得空白基质提取液。

1.5 仪器条件

1.5.1 液相色谱条件

色谱柱: Atlantis[®] T3 (150 mm \times 2.1 mm, 3 μ m); 流动相: A 为 0.1% (V:V) 甲酸水溶液, B 为甲醇; 流速: 300 μ L/min; 柱温: 35 °C; 进样体积: 2 μ L; 梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 10% B; 2.0~10.0 min, 10%~100% B; 10.0~12.0 min, 100% B;

12.0~12.2 min, 100%~10% B; 12.2~14.0 min, 10% B; 。

1.5.2 质谱条件

离子源: (electrospray ionization, ESI+); 监测模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)。碰撞气: 高纯 He; 毛细管电压: 3.5 kV; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气(N₂)温度: 500 °C; 脱溶剂气流速: 1000 L/Hr; 锥孔反吹气流量: 150 L/Hr; 定性离子对、定量离子对及其他质谱参数见表 1。

2 结果与分析

2.1 样品前处理方法的优化

甲醇和乙腈是检测那非类物质的常用溶剂, 由于食品基质复杂, 固体样品不能完全溶解于有机溶剂, 超声以后溶剂损失, 采用指定体积称重, 超声后补重的方法定容。实验考察了甲醇、50% (V:V) 甲醇水溶液和乙腈 3 种体系作为溶剂时对阳性样品(目标物浓度: 环己基去甲他达拉非 962 mg/g, 顺式四氢吡啶 0.06 mg/g)和基质加标样品(两目标物浓度均为: 100 mg/kg)的提取效果, 结果显示, 50% 甲醇水溶液对阳性样品和基质加标样品的提取效果较差, 尤其对高浓度阳性样品溶解能力不足, 当提高有机溶剂比例, 提取率不断增大。甲醇和乙腈的提取效果相当, 但乙腈价格昂贵, 考虑到流动相采用甲醇作为有机相, 因此实验选择甲醇作为首次溶解的溶剂。当样品浓度过高时, 由于已经过甲醇的溶解稀释, 可采用 50% 甲醇水溶剂适当稀释, 从而降低样品基质效应。

2.2 色谱条件的优化

甲醇和乙腈是液质联用常用的有机流动相, 尽管乙腈的分析时间短, 基线小, 但由于食品样品基质较为复杂, 需要足够的保留时间以满足分离需要, 洗脱能力较低, 因此出峰时间较慢的甲醇选为有机相。本实验考察了以下 4 种水相体系: 0.1% (V:V) 甲酸水溶液、5 mmol/L 甲酸铵水溶液、10 mmol/L 甲酸铵水溶液和 0.1% (V:V) 甲酸水溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)对目标化合物的分离效果、峰形和响应的影响。结果显示, 不同的改性剂对目标化合物的影响都不是太大。目标化合物均采用正离子模式采集, 少量甲酸能促进目标物离子化; 而甲酸铵、乙酸铵虽然能修饰峰型, 但抑制了 [M+H]⁺ 的离子化效果。经考察, 目标物离子在本研究实验条件下的检测中拖尾并不严重, 为提高电离效率, 稳定离子故选择 0.1% 甲酸水作为水相。

表 1 顺式四氢吡啶、环己基去甲他达拉非的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of tetrahydro- β -carboline and N-cyclohexyl nortadalafil

	化合物名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能/eV	保留时间/min
1	顺式四氢吡啶	351.1	250.1, 264.1*	10,10	15,17	8.12
2	环己基去甲他达拉非	458.2	308.0, 336.2*	30,30	28,15	9.57

注: *为定量离子。

分别考察 Atlantis® T3 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)、Eclipse Plus C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.8 μm)、SB-C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm) 3 种 C₁₈ 耐酸性的色谱柱的分离效果, 结果表明, 目标化合物在 3 种 C₁₈ 柱上均能正常出峰, 且响应强度稳定。由于环己基去甲他达拉非含有极性环己基官能团, Atlantis® T3 色谱柱适用于保留和分析极性化合物, 以其为分析柱时, 峰形最好, 且能实现与 100% 水相兼容, 故将其作为本法分析柱。图 2 为一阳性样品中顺式四氢喹啉和环己基去甲他达拉非的 MRM 离子流色谱图, 可见各峰形区分度良好。

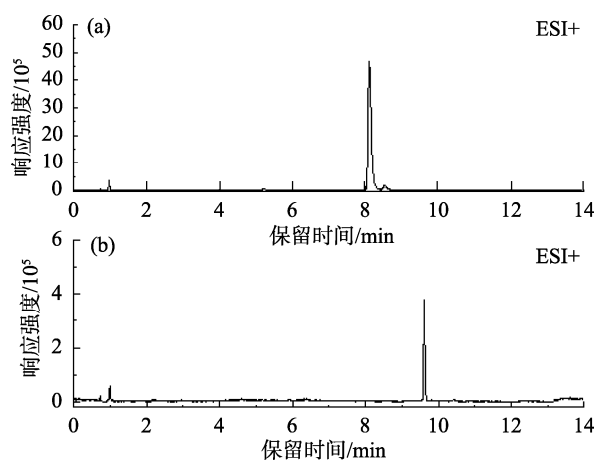


图 2 阳性样品中顺式四氢喹啉(a)和环己基去甲他达拉非(b)的 MRM 色谱图

Fig.2 MRM chromatograms of tetrahydro-β-carboline (a) and N-cyclohexyl nortadalafil (b) in a positive sample

2.3 质谱条件的优化

环己基去甲他达拉非是环己基取代了他达拉非中的甲基; 顺式四氢喹啉与氯乙酰氯和甲胺依次反应后即可合成他达拉非^[28]。以 2 种物质的标准溶液(质量浓度: 500 ng/mL)用针泵连续直接进样, 采用 ESI+和 ESI-模式分别扫描, 以确定电离模式。结果表明, 在负离子条件下环己基去甲他达拉非结构较为稳定不产生碎片离子, 采用正离子模式获得理想的碎片离子; 顺式四氢喹啉在正负离子

模式下均可电离, 但是正离子模式电离后的碎片离子明显强于负离子模式。因此实验采用正离子模式。进一步采用 MRM 多反应监测模式分别对毛细管电压、离子源温度、脱溶剂气温度、脱溶剂气流量、锥孔反吹气流速、锥孔电压、撞能量等质谱参数进行了优化, 以确定特征离子条件和化合物的离子对, 两目标分析物的子离子见图 3。以丰度比最高且基线平稳无干扰的两对离子作为监测离子对。

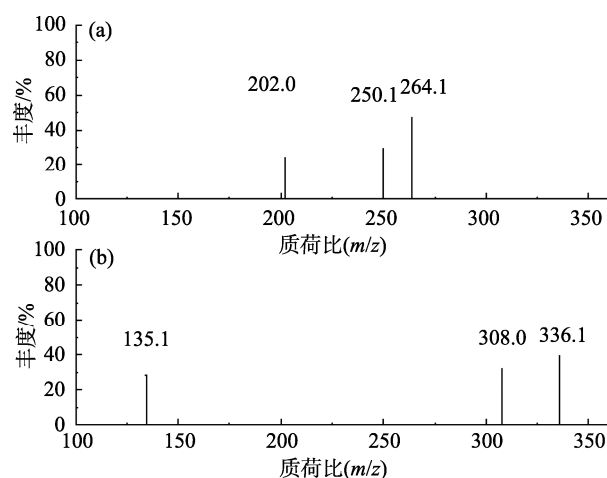


图 3 顺式四氢喹啉(a)和环己基去甲他达拉非(b)的多重反应监测质谱图

Fig.3 Mass spectrums of tetrahydro-β-carboline (a) and N-cyclohexyl nortadalafil (b) in MRM mode

2.4 基质效应和线性关系

基质效应(matrix effect, ME)是在痕量分析过程中普遍存在的样品中非目标物质的干扰现象, 常影响检测结果的准确性。实验选择常见的典型基质: 保健酒、胶囊剂、牡蛎片、饼干为考察对象, 在线性范围为 1~50 ng/mL 内, 以各组分的峰面积(Y)为纵坐标, 质量浓度(X, ng/mL)为横坐标作线性回归, 比较空白基质匹配曲线和甲醇溶剂配制曲线的差异, 其斜率之比即为 ME^[31], 当 ME 值等于或接近 100% 时, 表明不存在基质效应的影响; ME > 100% 时, 存在离子增强作用; ME < 100% 时, 存在离子抑制作用。结果如表 2 所示。

表 2 2 种化合物的回归方程、相关系数、基质效应、检出限及定量限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, matrix effects, limits of detection and limits of quantitation for 2 kinds of compounds

化合物名称	溶剂匹配曲线	<i>r</i>	空白基质	空白基质曲线	<i>r</i>	ME /%	检出限 / (μg/kg)	定量限 / (μg/kg)
顺式四氢喹啉	$Y=679111X+34744.4$	0.9998	药酒	$Y=644843X+68503.1$	0.9998	95.0	0.05	0.18
			硬胶囊	$Y=556602X-158533$	0.9997	82.0	0.10	0.32
			牡蛎片	$Y=443305X-28170.7$	0.9997	65.3	0.08	0.25
			饼干	$Y=644093X-284767$	0.9991	94.8	0.25	0.90
环己基去甲他达拉非	$Y=45070X+7219.03$	0.9995	药酒	$Y=44991.6X+834.074$	0.9992	99.8	0.50	1.80
			硬胶囊	$Y=33353X-17130.9$	0.9993	74.0	2.25	7.20
			牡蛎片	$Y=17640.8X+7401.82$	0.9994	39.1	1.20	4.00
			饼干	$Y=41314.3X-6471.31$	0.9998	91.7	0.80	2.75

由表2可见, 顺式四氢吡啶在4种基质中的ME值为65.3%~95.0%, 环己基去甲他达拉非在4种基质中的ME值为39.1%~99.8%, 二者在4种基质中基质效应差异较大($P<0.05$), 尤其是牡蛎片具有较大的离子抑制作用。说明检测方法存在较大基质效应, 因此选择空白基质溶液配制标准曲线溶液。在质量浓度为1~50 ng/mL范围内, 基质配制匹配曲线的线性关系均良好, 相关系数 r 均大于0.999。

2.5 检出限和定量限

空白基质分别加入一定量的标准溶液, 按样品同法制备后进样, 按3倍信噪比计算检出限, 以10倍信噪比计算定量限, 平行测定3次, 取平均值, 结果见表2。由表2可见, 在不同基质中, 顺式四氢吡啶的检出限为0.05~0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为0.18~0.90 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 环己基去甲他达拉非的检出限为0.50~2.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为1.80~7.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。均低于BJS 201805中其他90种那非类物质的检出限和定量限。

2.6 回收率与精密度

分别称取1.000 g空白样品于50 mL聚丙烯具塞离心管中, 分别加入3水平的2种化合物标准溶液(加入量: 50、100、500 ng), 其余按样品同法制备, 最终定容至50 mL。各水平平行测定6次, 计算平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。结果见表3。

由表3可见, 顺式四氢吡啶在4种基质中的回收率为

81.9%~117.4%, RSD为0.6%~4.6%; 环己基去甲他达拉非的回收率为66.1%~115.8%, RSD为0.5%~3.7%, 加标回收率在60%~120%范围内, RSD小于10%, 方法精密度较高。

以20 ng/mL混合标准曲线溶液于0、1、7、15 d进行测定, 每个时间段由2个不同人员平行测定3次, 结果表4所示。

结果显示, 双人测定顺式四氢吡啶的检测浓度范围19.4872~21.1670 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RSD为2.6%; 双人测定环己基去甲他达拉非的检测浓度范围19.3446~21.3492 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RSD为3.0%, 15 d内目标物结果稳定。说明该方法能满足2种物质定量分析的精密度和稳定性要求, 准确高, 重现性好。

2.7 实际样品检测

对市售的20批宣称有抗疲劳作用的食物(含保健食品)及5批次监管部门提供的原料样品按本法进行测定, 平行测定3次, 取平均值。样品类型涉及保健酒、牡蛎片(粉)、蛋白粉、饼干、胶囊、咖啡、糖果、饮料等。市售产品中均未检出目标物, 但5批次原料样品中2批次检出顺式四氢吡啶(约0.5 mg/g); 1批次检出91 mg/g顺式四氢吡啶, 1批次检出962 mg/g环己基去甲他达拉非和0.06 mg/g顺式四氢吡啶。本次检测结果显示, 监管部门现场发现大量未合成的四氢吡啶原料。在检测到的高浓度他达拉非甲基

表3 顺式四氢吡啶和环己基去甲他达拉非的平均回收率($n=6$)
Table 3 Average recoveries of tetrahydro- β -carboline and N-cyclohexyl nortadalafil ($n=6$)

化合物名称	加标水平/(ng/mL)	保健酒		胶囊		牡蛎片		饼干	
		平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
顺式四氢吡啶	1	81.9	4.6	103.6	3.8	109.7	1.8	117.4	0.6
	2	92.9	1.1	95.6	1.6	100.9	1.0	112.8	1.4
	10	104.5	1.1	95.7	3.1	100.6	1.8	97.3	3.7
环己基去甲他达拉非	1	87.3	2.1	115.8	1.5	66.1	3.0	111.9	3.2
	2	97.7	0.7	110.9	0.6	70.3	2.0	104.5	2.7
	10	106.1	0.5	105.0	1.0	88.1	1.2	98.7	3.7

表4 顺式四氢吡啶和环己基去甲他达拉非的中间精密度($n=3$)
Table 4 Intermediate precisions of tetrahydro- β -carboline and N-cyclohexyl nortadalafil ($n=3$)

化合物名称	人员	时间/d				平均值/%	RSD/%
		0	1	7	15		
顺式四氢吡啶($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1	19.7225	20.0118	19.4872	21.1670	20.18691	2.6
	2	20.4427	20.4477	20.0094	20.2070		
环己基去甲他达拉非($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1	20.8883	20.0982	19.9446	20.5644	20.34525	3.0
	2	20.1167	20.4560	19.3446	21.3492		

氯化物和环己基去甲他达拉非的原料中常伴随有低浓度顺式四氢唑啉, 这与其合成效率有关。顺式四氢唑啉的检出常常伴随着他达拉非及其衍生物的检出, 尽管检出量相对较低, 但可以合理地推测其犯罪事实, 也有助于通过这一物质去判断检测研究方向, 为相关物质的检测研究打开突破口。同时, 国内市场已出现纯度较高的环己基去甲他达拉非合成原料, 与处方药他达拉非的结构相似, 但对其药理和毒理方面信息知之甚少, 如毫无控制地添加到食品、药品中对公众健康将构成巨大的潜在威胁, 并具有极高的隐蔽性。

3 结论与讨论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法测定保健酒、胶囊、牡蛎片、饼干等食品、保健食品中 2 种新型非法添加化学物质—环己基去甲他达拉非和顺式四氢唑啉检测方法。以甲醇溶剂, 固体样品采用二次补重的方法, 保障了定容的准确性。选择耐酸性的 Atlantis®T3 柱提高了分离效率, 选择甲醇-0.1%(V:V)甲酸水溶液作为流动相保障了分离效果及稳定性。采用空白基质匹配曲线来补偿和消除质谱分析中存在的基质效应, 利用 MRM 监测模式提高了特征离子的选择性、抗干扰能力和专属性。本方法专属性高、灵敏度好, 可快速筛查确证食品(含保健食品)中非法添加的环己基去甲他达拉非和顺式四氢唑啉。由于此类新型化学物质极少开展药理和毒理研究, 对人体的健康危害无法预测, 必须建立相关检测和确证方法加以监控, 禁止此类物质在食品中添加。本方法的建立有力填补了相关领域检测方法空白, 堵住不法生产者逃避监管添加未知物的漏洞, 为推进检验检测技术与行政监管有机衔接, 以确保严打食品非法添加工作取得成效提供技术保障。

参考文献

- [1] 邓迎春, 郭旭光, 徐晓楠. 保健品中非法添加化学药品的研究概况[J]. 河南预防医学杂志, 2020, 31(6): 423-425.
DENG YC, GUO XG, XU XN. Research on progress for illegally added drugs in health food [J]. Henan J Prev Med, 2020, 31(6): 423-425.
- [2] 杜冰倩. 食品药品安全领域“两法”衔接问题研究—以壮阳保健品中违法添加“西地那非”成分案件为例[J]. 中国检察官, 2018, (20): 49-52.
DU BQ. Study on the connection of "Two Laws" in the field of food and drug safety-Taking the case of illegal addition of "sildenafil" in aphrodisiac health products as an example [J]. Chin Procurat, 2018, (20): 49-52.
- [3] 李建辉, 张朝晖, 王琳. 减肥保健食品中非法添加物检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 73-83.
LI JH, ZHANG CH, WANG L. Research progress of analysis of illegal additives in weight-reducing dietary supplements [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(5): 73-83.
- [4] 段琼, 马春艳, 封淑华. 保健酒及酒类制品中非法添加 PDE-5 抑制剂及其衍生物的监测及结果分析[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 277-282.
DUAN Q, MA CY, FANG SH. Investigation and analysis of the PDE-5 inhibitors and their analogues in tonic wines and wine products [J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(2): 277-282.
- [5] 李可, 郭常川, 石峰, 等. 补肾壮阳类中成药和保健品中添加 5 型磷酸二酯酶(PDE5)抑制剂及其类似物检测方法研究进展[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 566-574.
LI K, GUO CC, SHI F, et al. Research progress in determination technologies for adulterated phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors and their analogue in invigorant herbal medicines and dietary supplements [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(4): 566-574.
- [6] 丁德英, 刘伟, 吕狄亚. 中药保健品中非法添加磷酸二酯酶-5 抑制剂检测方法的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(2): 103-108.
DING DW, LIU W, LV DY. Research progress on the detection methods for illegal addition of PDE-5 inhibitors in botanical dietary supplements [J]. J Pharm Pract, 2019, 37(2): 103-108.
- [7] JEONG JH, LEE JH, KIM HJ, et al. LC-ESI-MS/MS analysis of phosphodiesterase-5 inhibitors and their analogues in foods and dietary supplements in Korea [J]. Food Addit Contam, 2016, 9(1): 1-8.
- [8] 陈砦, 张太健, 玄绪军, 等. EECp 联合小剂量 PDE5i 治疗有生育要求 ED 患者的临床分析[J]. 中国性科学, 2019, 28(11): 9-12.
CHEN T, ZHANG TJ, XUAN XJ, et al. Analysis of the effect of EECp joint with small dose PDE5i for erectile dysfunction patients with fertility demands [J]. Chin J Human Sex, 2019, 28(11): 9-12.
- [9] 姜睿, 吴邦财. PDE5 抑制剂治疗 ED 的不良反应及防治措施[J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(2): 99-103.
JIANG R, WU BC. Phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction: Adverse reactions and countermeasures [J]. Natl J Androl, 2016, 22(2): 99-103.
- [10] SHARMA K, KASS DA. Heart failure with preserved ejection fraction: Mechanisms, clinical features, and therapies [J]. Circ Res, 2014, 115(1): 79-96.
- [11] 姜辉, 戴玉田, 邓春华, 等. 枸橼酸西地那非(万艾可)20 周年临床应用中国专家共识[J]. 中国性科学, 2019, 28(7): 5-14.
JIANG H, DAI YT, DENG CH, et al. Chinese expert consensus on 20 years clinical application of sildenafil citrate (Viagra) [J]. Chin J Human Sex, 2019, 28(7): 5-14.
- [12] 廖晓玲, 曹仲文, 任雅瑾. 紫外分光光度法测定枸橼酸西地那非片含量[J]. 海军医学杂志, 2003, 24(1): 56-57.
LIAO XL, CAO ZW, REN YJ. Determination of sildenafil citrate tablets by ultraviolet spectrophotometry [J]. J Navy Med, 2003, 24(1): 56-57.
- [13] CAI Y, CAI TG, SHI Y, et al. Simultaneous determination of eight PDE5-IS potentially adulterated in herbal dietary supplements with TLC and HPLC-PDA-MS methods [J]. J Liquid Chromatogr Relat Technol, 2010, 33(13): 1287-1306.
- [14] FEJÓŠ I, NEUMAJER G, BÉNI S, et al. Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC-UV using sildenafil as a sole reference [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 98: 327-333.
- [15] LEE W, KIM HJ, LEE ME, et al. Reliable screening and classification of phosphodiesterase type 5 inhibitors in dietary supplements using gas chromatography/mass spectrometry combined with specific common ions [J]. J Chromatogr A, 2020, 1623: 461210.

- [16] 马俊美, 王敬, 孙文毅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定保健食品中90种那非类药物[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 307-313.
MA JM, WANG J, SUN WY, *et al.* Determination of 90 nafilis in health foods by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2020, 41(14): 307-313.
- [17] 农毅清, 刘珈伶, 袁光蔚, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品、保健食品中2-羟丙基去甲他达拉非[J]. 广西中医药大学学报, 2019, 22(1): 135-140.
NONG YQ, LIU JL, YUAN GW, *et al.* Determination of 2-hydroxypropyl nortadalafil in food and health-care food with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Guangxi Univ Chin Med, 2019, 22(1): 135-140.
- [18] LUDOVIT S, RADOSLAV H, MILAN H. Fast ultra-high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry method for determination of tadalafil drug substance and its impurities [J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(12): e4020.
- [19] JIRU M, STRANSKA-ZACHARIASOVA M, DZUMAN Z, *et al.* Analysis of phosphodiesterase type 5 inhibitors as possible adulterants of botanical-based dietary supplements: Extensive survey of preparations available at the Czech market [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 164: 713-724.
- [20] 于泓, 胡青, 张甦, 等. 补肾壮阳类中药及保健食品中31种5型磷酸二酯酶抑制剂的高分辨四级杆飞行时间质谱定性定量检测方法[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(15): 1312-1318.
YU H, HU Q, ZHANG S, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of 31 PDE-5 inhibitors in herbal products and dietary supplements by UPLC/Q-TOF-MS [J]. Chin Pharm J, 2013, 48(15): 1312-1318.
- [21] 王悦, 张筱, 杨丽蓉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品、保健食品中一种新型他达拉非衍生物[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 404-409.
WANG Y, ZHANG X, YANG LR, *et al.* Determination of a novel tadalafil derivatives added illegally into food and health products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(20): 404-409.
- [22] DOI T, TAKAHASHI K, YAMAZAKI M, *et al.* Characterization of a new illicit phosphodiesterase- type-5 inhibitor identified in the softgel shell of a dietary supplement [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 161(30): 61-65.
- [23] 冯睿, 于泓, 孙健, 等. 一种新型他达拉非衍生物分离和鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2710-2714.
FENG R, YU H, SUN J, *et al.* Isolation and identification of a new type of tadalafil analogue [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2710-2714.
- [24] LEE HC, LIN YL, HUANG YC, *et al.* Identification of a new tadalafil analogue, N-3-hydroxypropyl nortadalafil, in a supplement product [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 158: 257-261.
- [25] XU Y, KEE CL, GE X, *et al.* Isolation and characterization of a tadalafil analogue, N-cyclopentyl nortadalafil in health supplement [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 118(8): 235-241.
- [26] 刘珈伶, 戴向东, 陈小聪, 等. 一种食品中非法添加环己基去甲他达拉非的鉴定方法: 中国, CN111272919A[P]. 2020-06-12.
LIU JL, DAI XD, CHEN XC, *et al.* Method for identification of illegal addition of N-cyclohexyl nortadalafil in food: China, CN111272919A [P]. 2020-06-12.
- [27] DAUGAN A, GRONDIN P, RUAULT C, *et al.* The discovery of tadalafil: A novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2:2,3,6,7,12,12a-hexahydro pyrazino [1',2':1,6] pyrido[3,4-b] indole-1,4-dione analogues [J]. J Med Chem, 2003, 46(21): 4533-4542.
- [28] 姚亮元, 寇亮, 侯岳华, 等. 顺式四氢吡啶中间体及其合成方法和在制备他达拉非方面的应用: 中国, CN105541835B[P]. 2016-05-04.
YAO LY, XU L, HOU YH, *et al.* Synthesis method for tetrahydro- β -carboline intermediates and its applications in the preparation of tadalafil: China, CN105541835B [P]. 2016-05-04.
- [29] 高艳蓉, 唐文强, 仝红娟, 等. 他达拉非关键中间体(1R,3R)-1-(3,4-亚甲基二氧苯基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-甲酸甲酯盐酸盐的合成[J]. 精细化工中间体, 2019, 49(5): 22-25.
GAO YR, TANG WQ, TONG HJ, *et al.* Synthesis of key intermediate of tadalafil (1r,3r)-methyl 1-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) -2,3,4,9-tetrahydro-h-pyrido [3,4-b] indole-3-carboxylate hydrochloride [J]. Fine Chem Intermed, 2019, 49(5): 22-25.
- [30] DESHPANDE PB, BODA BB, SURTI SS, *et al.* Process for preparing tadalafil and its intermediate: US Patent, US7223863B2 [P]. 2007-05-29.
- [31] 苏萌, 艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(2): 511-515.
SU M, AI LF. Matrix effects and elimination methods of liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(2): 511-515.

(责任编辑: 李磅礴 于梦娇)

作者简介



韦环, 主管药师, 主要研究方向为食品检验与质量标准研究。
E-mail: 287167166i@qq.com



刘珈伶, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全检验、天然产物化工。
E-mail: jialingliu6@163.com