

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240730001

保健食品中 O-丙基羟基伐地那非的快速 筛查、确证和定量测定

夏金涛^{1,2,3*}, 张莉^{1,2,3}, 吴婉琴^{1,2,3}, 朱晓玲^{1,2,3}, 蒋颖^{1,2,3}, 江丰^{1,2,3}

[1. 湖北省食品质量与安全检验检测研究院, 武汉 430075; 2. 国家市场监督管理总局重点实验室
(动物源性食品中重点化学危害物检测技术), 武汉 430075; 3. 湖北时珍实验室, 武汉 430065]

摘要: **目的** 利用高分辨质谱仪快速筛查壮阳类保健食品中的磷酸二酯酶 5 型抑制剂(phosphodiesterase type 5 inhibitors, PDE-5i), 确证其中发现的新型非法添加物并建立定量检测方法。**方法** 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪(ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF/MS)对 20 批次保健食品中的非法添加物进行日常非靶向筛查, 在 2 批次压片糖果中鉴别出一种新型伐地那非类似物。结合化合物的质谱裂解规律及核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance spectrometry, NMR)对未知物结构进行确证。采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱法(ultra performance liquid chromatography-coupled triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-MS/MS)建立了典型食品基质中未知物的定量检测方法。**结果** 未知物被确证为 O-丙基羟基伐地那非。该物质溶剂校准和基质匹配曲线在 2~100 ng/mL 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)大于 0.995, 检出限为 0.05 mg/kg, 定量限为 0.10 mg/kg。在固体饮料、压片糖果、果冻基质中 3 个水平加标回收率为 94.45%~104.16%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.70%~4.02%。采用该方法测得 2 批次阳性样品中 O-丙基羟基伐地那非的含量分别为 22.0 mg/kg、13.8 g/kg。**结论** 本方法适用于食品中那非类似物的快速筛查, 用于 O-丙基羟基伐地那非的定量检测高效、灵敏、准确。本研究为食品基质中非法添加物的系统性确证和定量研究提供了可供借鉴的参考模型。

关键词: 快速筛查; 结构确证; 定量测定; 非法添加物; O-丙基羟基伐地那非

Rapid screening, identification and quantitative determination of O-propyl hydroxyvaridenafil in dietary supplement

XIA Jin-Tao^{1,2,3*}, ZHANG Li^{1,2,3}, WU Wan-Qin^{1,2,3}, ZHU Xiao-Ling^{1,2,3},
JIANG Ying^{1,2,3}, JIANG Feng^{1,2,3}

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China; 2. Key Laboratory of Detection
Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Wuhan 430075, China;
3. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China)

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2022MK085)、国家重点研发计划项目(2023YFF1104700)、国家市场监督管理总局创新人才计划(青年拔尖人才)项目(QNBJ202330)

Fund: Supported by the Science and Technology Program of the State Administration for Market Regulation (2022MK085), the National Key Research and Development Program of China (2023YFF1104700), and the Science and Technology Innovative Talents Program of the State Administration for Market Regulation (QNBJ202330)

*通信作者: 夏金涛, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 2501820896@qq.com

*Corresponding author: XIA Jin-Tao, Ph.D, Engineer, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, No.8, Yaojian 2nd Road, East Lake High-tech Development, Wuhan 430075, China. E-mail: 2501820896@qq.com

ABSTRACT: Objective To rapid screen phosphodiesterase type 5 inhibitor (PDE-5i) in aphrodisiac dietary supplement with high-resolution mass spectrometer, identify the novel illegal additives found in those food matrices, and establish a quantitative detection method. **Methods** A new vardenafil analog was identified in 2 batches of pressed candies during routine non-targeted screening illegal additives in 20 batches of dietary supplement by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS). The structure of the unknown compound was identified by the combination of the fragmentation law of mass spectrum and nuclear magnetic resonance spectrum (NMR). A quantitative method for the determination of unknown compound in typical food matrices was developed by ultra performance liquid chromatography-coupled triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Results** The unknown compound was identified as O-propyl hydroxyvardenafil. Sufficient linearity (range 2–100 ng/mL) in matrix matched and solvent calibrations were obtained with correlation coefficient (r^2)>0.995. The limits of detection and quantification for the compounds were 0.05 mg/kg and 0.10 mg/kg, respectively. In solid beverages, pressed candies and jellies, recoveries of this compound were ranged from 94.45 to 104.16% with relative standard deviation (RSD) of 0.70%–4.02% in 3 different spiking levels. The content of O-propyl hydroxyvardenafil in 2 batches of positive real samples was 22 mg/kg and 13.8 g/kg, respectively. **Conclusion** This method is suitable for the rapid screening of nafil analogs in food matrices and its application to the quantitative determination of O-propyl hydroxyvardenafil is highly effective, sensitive and accurate. This study provides a reference model for the systematic identification and quantitative study of illegal additives in food matrices.

KEY WORDS: rapid screening; structural identification; quantitative determination; illegal additives; O-propyl hydroxyvardenafil

0 引言

西地那非、他达那非、伐地那非和阿伐那非是目前美国食药局认可,可作为治疗男性勃起功能障碍(erection dysfunction, ED)的 4 个原料药^[1]。同西地那非、他达那非和阿伐那非相比,伐地那非用量少、见效快、耐受性好、安全性高,基于此,伐地那非及其类似物常被非法添加到保健酒、压片糖果、软胶囊等食品基质中^[2-7]。作为治疗 ED 的处方药之一,虽然伐地那非的相对安全性高一些,但是作为药物的不良反应风险也是同样存在,按照《中华人民共和国食品安全法》第 50 条规定,其并不能为了达到治疗目的而被随意添加到食品中。为了打击向食品中违法添加壮阳类物质的行为,自 2009 年以来,我国监管部门颁布了一系列补充检验方法(BJS 201601《食品中那非类物质的测定》、BJS 201704《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 201805《食品中那非类物质的测定》等)用于涵盖 90 多种那非类衍生物的测定。这些方法的构建和实施为相关部门的监管提供了有效的检验依据。为了逃避监管,向食品中非法添加化合物的手段也在不断“转型升级”。如近年来,将向保健食品中添加的常规那非类化合物替换为功效母核保留的去甲哌嗪基丙基西地那非^[8]、N-苯基丙氧苯基卡巴地

那非^[9-10]、O-丙基伐地那非^[11-12]、N-环己基去甲基他达那非^[13]等的文献不断被报道。这些新型非法添加化合物是由常见的磷酸二酯酶 5 型抑制剂(phosphodiesterase type 5 inhibitors, PDE-5i)进行化学结构改造修饰而得到的衍生物,毒理药理学数据未知,被随意引入食品供应链后,可能对消费者造成健康危害。同时,这些物质不在国家补充检验方法覆盖的范围内,未有公开的制备方法和 CAS 号,缺乏相应的对照品和检验标准,因此隐蔽性强,给市场监管和执法带来了更大的挑战^[14-18]。

迄今为止,针对保健食品中新型非法添加物的确证有大量的文献报道^[10-12],但是对于新型非法添加物的筛查、确证、定量方法开发的全面性、系统性研究则报道的较少;同时,构建食品中新型非法添加化合物检测的事前预防能力支撑体系对于市场监管至关重要。本研究首先在自建高分辨质谱数据库的基础上,对那非及其类似物的质谱裂解规律进行了分析总结,找寻到了基于母核修饰的不同那非及其类似物的特征碎片离子;其次,对待检样品进行了高分辨质谱高通量非靶向筛查^[19-23],确认待检化合物是否在数据库中。若是已知化合物,则通过标准品比对进行确证;若是未知化合物则基于质谱分析通过核磁表征的方式进行结构解析;最后,利用标准品或对照品构建高效、灵敏、准确的质谱定量方法,用于实际案件的审查办

理中。在以上研究思路的指导下,本研究对稽查部门送检和网络平台购买的共 20 批次保健食品进行非靶向筛查,利用对伐地那非及其类似物的高分辨质谱裂解的规律性认识及核磁共振波谱解析鉴别出一种新型非法添加物—O-丙基羟基伐地那非。最后,利用提取纯化的对照品,建立了食品基质中 O-丙基羟基伐地那非的定量检测方法,为稽查办案提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

稽查部门送检和网络平台购买的保健食品,包含 9 批次压片糖果、6 批次固体饮料和 5 批次果冻;薄层层析硅胶板(Silica gel 60 F254, 德国 Merck 公司);柱层析硅胶(粒径 37~48 μm , 青岛海洋化工厂)。

伐地那非(纯度 99.7%)、伪伐地那非(纯度 99.0%)(中国食品药品检定研究院);羟基伐地那非、N-去乙基伐地那非、伐地那非 N-氧化物、伐地那非二聚体、N-去乙基-N-甲基伐地那非、伐地那非哌嗪酮、羟基硫伐地那非、那莫伐地那非、乙酰伐地那非、伐地那非乙酰基类似物、伐地那非去磺酰基杂质(纯度 98.0%, 天津阿尔塔科技有限公司);O-丙基伐地那非(纯度 99.0%)^[11]、对氧代伪伐地那非(纯度 98.6%)^[12](自制)。

乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司);甲酸(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司);乙酸乙酯、石油醚、三乙胺(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);氘代二甲亚砜(hexadeuterodimethylsulfoxide, DMSO- d_6 , 纯度 99%, 美国 Sigma-Aldrich 贸易有限公司);实验用水均为超纯水。

1.2 仪器与设备

Triple TOFTM 5600⁺高分辨液相色谱飞行时间质谱仪、TRIPLE QUADTM 5500-液相色谱串联质谱仪(配备 ExionLC 系列超高效液相色谱)(美国 AB Sciex 公司);ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm)(上海沃特世科技有限公司);AscendTM 600 MHz 全数字化超导核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司);核磁管(5 mm, 美国 Norell 公司);ME204 型电子分析天平(精度 0.1 mg, 瑞士 Mettler Toledo 公司);HEI VAP 旋转蒸发器(德国 Heidolph GmbH 公司);230 Volt 涡旋振荡器(美国 Talboys 公司);S 180 H 超声波清洗仪(德国 Elma 公司);Centrifuge5810 常温低速离心机(德国 Eppendorf 公司);CRV pro4 实验室旋片真空泵(上海 Welch 设备有限公司);ZF-20D 暗箱式紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品溶液制备

取样品适量,混匀,固体样品需研细,称取 1 g (精确

至 0.001 g),置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇水溶液(1:1, V/V,下同)适量,超声提取 15 min,冷却至室温,用甲醇水溶液定容至刻度,摇匀,离心 5 min,取上清液经有机相滤膜过滤,取续滤液,根据实际浓度用甲醇水溶液适当稀释,备用。

1.3.2 阳性样品中 O-丙基羟基伐地那非对照品制备

称取约 50 g 阳性样品于 500 mL 圆底烧瓶中,分 3 次总共加入 180 mL 甲醇对阳性样品中分析物进行提取,每次超声辅助提取 10 min,涡旋振荡 5 min,3700 r/min 离心 5 min 后,抽滤。下层滤液合并经旋蒸仪浓缩至约 10 mL 后,通过硅胶柱色谱纯化分析物,通过薄层层析硅胶板点样,于暗箱式紫外分析仪波长 254 nm 处确认分析物,收集产品,采集分析物的高效液相色谱图,通过紫外光谱图和液相色谱图确定分析物的纯度,富集,减压蒸发除去溶剂后真空干燥,得到 O-丙基羟基伐地那非对照品(纯度 98.8%)约 300 mg。对照品用于后续核磁共振波谱表征和定量方法开发。

1.3.3 O-丙基羟基伐地那非对照品及伐地那非类似物标准品溶液制备

标准储备液:准确称取 O-丙基羟基伐地那非对照品 10 mg 于 50 mL 具塞管中,用甲醇水溶液适量溶解,将溶液转移至 100 mL 容量瓶中定容至刻度,摇匀,配制成质量浓度约为 100 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备液。-4 $^{\circ}\text{C}$ 避光贮存,备用。

标准中间液:准确量取标准储备液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇水溶液定容至刻度,摇匀,配制成质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间工作液。-4 $^{\circ}\text{C}$ 避光贮存,备用。

系列标准工作液:分别准确量取标准中间液适量,用甲醇水溶液稀释定容至相应规格容量瓶中,摇匀,配制成质量浓度分别为 2、5、10、20、50 和 100 ng/mL 的系列标准工作液。临用现配。

按照制备 O-丙基羟基伐地那非对照品的方法制备 15 种伐地那非类似物供试液,根据仪器响应信号强度的差异选择合适的浓度进行高分辨质谱测试分析,用于建立伐地那非类似物质谱数据库。

1.3.4 仪器条件

(1)超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪的条件

超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC)条件: ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm), 流动相: 0.1%甲酸-水(A)和乙腈(B), 流速: 0.3 mL/min, 进样体积: 2 μL , 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。液相色谱梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 90% A; 1.0~15.0 min, 90% A~25% A; 15.0~17.0 min, 25% A; 17.0~17.1 min, 25% A~90% A; 17.1~20.0 min, 90% A。

四极杆-飞行时间质谱(quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, Q-TOF/MS)条件: 电喷雾离子源; 正离子模式; 电喷雾电压: 5500 V; 气帘气压力: 35 psi; 雾化气压力:

55 psi; 辅助气压力: 55 psi; 离子源温度: 500 °C; 全扫描一级质谱和二级质谱质量采集范围分别为 50~1000 Da, 100~1000 Da。

(2) 傅里叶变换核磁共振波谱条件

采用傅里叶变换核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance spectrometry, NMR)进行数据采集, 取 O-丙基羟基伐地那非对照品约 10 mg, 溶于 DMSO-d₆ 中, 以 DMSO 溶剂峰定标(δ_H 2.50, δ_C 39.52), ¹H 和 ¹³C NMR 的工作频率分别为 600.13 Hz 和 150.95 MHz, 实验温度为 25 °C, 谱宽分别为 9615.4 Hz 和 27173.9 Hz。异核单量子相关谱(HSQC)和异核多键相关谱(HMBC)实验分别采用 HSQCEDETGPSISP2.3 和 HMBCGPLPNDQF 标准脉冲程序。HSQC 的 F₂ 维(¹H)和 F₁ 维(¹³C)谱宽分别为 9615.4 Hz 和 27173.9 Hz, HMBC 的 F₂ 维(¹H)和 F₁ 维(¹³C)谱宽分别为 8771.9 Hz 和 27173.9 Hz; HSQC 和 HMBC 的采样数据点阵均为 t₂×t₁=1024×512, 累加次数均为 8。

(3) 超高效液相色谱-串联质谱仪条件

色谱条件除洗脱程序以外, 其他均与 1.3.4(1)保持一致。梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 90% A; 0.5~1.5 min, 90%~5% A; 1.5~3.0 min, 5% A; 3.0~3.1 min, 5%~90% A; 3.1~5.0 min, 90% A。质谱条件: 与 1.3.4(1)保持一致。其中定量离子对为 m/z 519.4/151.2, 定性离子对为 m/z 519.4/299.2。

1.3.5 标准曲线及基质效应

在质谱分析中, 基质效应(matrix effect, ME)影响着定量的灵敏度和准确性。研究采用基质提取液加标法评价体系的 ME^[24]。向空白基质样品中加入甲醇水溶液, 超声萃取, 得到基质提取液, 通过加标法制备加标质量浓度分别为 2、5、10、20、50、100 ng/mL 的溶液进行检测, 按式(1)计算 ME:

$$ME/\% = \left(\frac{k_2}{k_1} - 1 \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: k₁ 为溶液标准曲线斜率; k₂ 为基质标准曲线斜率。

通过计算基质标准曲线斜率和标准溶液曲线斜率之比, 来评价 ME 的程度。若 ME 为正值, 表示存在基质增强效应; ME 为负值, 表示存在基质抑制效应; |ME|≤20%, 表示 ME 较弱。

1.3.6 检出限和定量限

在固体饮料、压片糖果和果冻的空白基质样品中分别加入一定量的标准溶液, 按 1.3.2 项方法处理, 1.3.4(3)项方法采样, 稀释至 3 倍信噪比(signal to noise, S/N)得到检出限(limits of detection, LODs), 稀释至 10 倍 S/N 得到定量限(limits of quantification, LOQs)。

1.3.7 回收率和准确度

分别选取固体饮料、压片糖果和果冻的空白基质样品, 加入适量的标准工作液, 使加标质量浓度达到方法 1 倍定量限、2 倍定量限、10 倍定量限 3 个添加水平, 每个水平平行制备 6 份样, 按 1.3.4(3)项方法采样, 计算加样回收率

和准确度。

1.4 数据处理

采用 Analyst TF 1.8.1 进行质谱数据采集, LibraryView 进行质谱建库, PeakView[®] 2.2 进行定性数据分析, MultiQuant 3.0.2 进行定量数据分析。采用 TopSpin 3.5 进行核磁数据采集, Mestrenova 9.0 进行谱图分析; 采用 Origin 2021 及 ChemDraw 2014 绘制图谱。

2 结果与分析

2.1 伐地那非类化合物 UPLC-Q-TOF/MS 建库结果及质谱裂解规律解析

按 1.3.4(1)项方法采集 15 种伐地那非及其类似物的标准品或对照品质谱数据, 将伐地那非及其类似物的中/英文名称、CAS 号、分子式、保留时间、母离子、主要子离子信息整理建库如下表 1 所示。从表 1 的主要子离子信息和文献^[6,25-26]参考, 可以总结出伐地那非类化合物质谱裂解的一般规律: ①所有伐地那非及其类似物均具有 m/z 151.08 的特征碎片离子峰; ②除脱硫伐地那非以外, 所有伐地那非及其类似物均存在着芳环与磺酰胺或酰胺键之间的极性化学键断裂, 形成 m/z 312.15 (O-乙基)或 326.17 (O-丙基伐地那非)或 328.13(羟基硫代伐地那非)特征碎片离子; 以上特征碎片离子进一步发生芳基烷氧基醚键部分的断裂形成 m/z 284.12 阳离子自由基, 或在芳基烷氧基醚键断裂基础上发生氧化, 形成 m/z 299.11 特征碎片离子; ③ m/z 284.12 进一步发生极性键开环裂解, 形成质荷比为 151.08 的特征碎片离子。基于以上质谱数据库和质谱裂解规律分析, 简化了未知伐地那非衍生物的结构确证分析过程。

2.2 UPLC-Q-TOF/MS 非靶向筛查结果分析

按照 1.3.1 项方法对 20 批次保健食品进行前处理后, 基于 UPLC-Q-TOF/MS 采集提取液的质谱数据。经匹配比对未检出标准方法涵盖的 90 种那非类物质及自建谱库中的已知化合物。在 UPLC(图 1a)中保留时间为 7.098 min 处出现强的信号响应, 一级质谱图表明该位置处物质的准分子离子峰为 m/z 519.2380 ([M+H]⁺) (图 1b)。进一步分析碎片离子高分辨质谱图(图 1c)发现该物质具有伐地那非类物质的特征碎片离子 m/z 151.0858, 284.1258, 结合 2.1 项质谱裂解规律分析研究, 推测未知物为伐地那非类化合物。m/z 376.1070, 326.1736 为 O-丙代伐地那非的特征碎片^[26-27], 进一步表明未知物为 O-丙代伐地那非衍生物。未知物准分子离子峰 m/z 519.2380 比 O-丙代伐地那非 m/z 503.2466 多 15.9914, 表明未知物比 O-丙代伐地那非多一个氧原子, 结合质谱参数推测其可能的分子式为 C₂₄H₃₅N₆O₅S⁺。

表 1 15 种伐地那非及其类似物的基本信息
Table 1 Basic information of 15 kinds of vardenafil and its analogs

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	保留时间 /min	母离子质荷比 (m/z, Da)理论值	主要子离子质荷比(m/z, Da)实测值
伐地那非	vardenafil	224785-90-4	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	7.72	489.2279	489.2278, 312.1581, 299.1139, 284.1268, 151.0866
伪伐地那非	pseudovardenafil	224788-34-5	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	10.11	460.2013	460.2011, 312.1581, 299.1139, 284.1268, 256.0955, 151.0866
羟基伐地那非	hydroxyvardenafil	224785-98-2	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S	5.89	505.2228	505.2225, 312.1581, 299.1139, 151.0866
N-去乙基伐地那非	N-desethylvardenafil	448184-46-1	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	5.90	461.1966	461.1968, 312.1581, 299.1139, 284.1268, 151.0866
伐地那非氮氧化物	vardenafil N-oxide	448184-48-3	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S	6.13	505.2228	505.2239, 312.1581, 299.1139, 151.0866
伐地那非二聚体	vardenafil dimer	1255919-03-9	C ₃₈ H ₄₆ N ₁₀ O ₈ S ₂	10.26	835.3014	835.3011, 489.2300, 377.1298, 312.158, 299.1134, 283.1195, 151.0866
N-去乙基-N 甲基伐地那非	N-desethyl-N-methylvardenafil	224785-87-9	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	5.93	475.2122	475.2120, 376.1067, 312.1581, 299.1139, 284.1268, 151.0866
伐地那非氧代哌嗪	vardenafil oxopiperazine	448184-58-5	C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₅ S	7.36	475.1758	475.1760, 377.1300, 312.1581, 299.1139, 284.1268, 151.0866
羟基硫代伐地那非	hydroxythiovardenafil	912576-30-8	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S ₂	7.85	521.1999	521.2001, 328.135, 315.0910, 299.0961, 167.0638
那莫伐地那非	nomeovardenafil	358390-39-3	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄	6.68	357.1557	357.1565, 329.1244, 300.0853, 151.0866
乙酰伐地那非	acetyl vardenafil	1261351-28-3	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	6.60	467.2765	467.2770, 341.1608, 325.1295, 297.1346, 284.1268, 151.0866
伐地那非乙酰基类似物	vardenafil acetyl analogue	N/A	C ₂₄ H ₃₁ N ₅ O ₃	5.42	438.2500	438.2505, 353.1600, 341.1608, 325.1295, 297.1346, 151.0866
伐地那非去磺酰基杂质	vardenafil desulfonyl impurity	224789-21-3	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₂	12.32	313.1659	313.1654, 284.1265, 256.0960, 151.0858
对氧伐地那非	p-oxo-pseudovardenafil	224788-36-7	C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₅ S	8.07	462.1807	462.1807, 434.1496, 312.1570, 299.1132, 284.1259, 151.0854
O-丙基伐地那非	O-propyl vardenafil	2840532-32-1	C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₄ S	6.99	503.2446	503.2446, 376.1090, 326.1750, 299.1148, 284.1300, 151.0864

注: N/A 表示未查询到物质的 CAS 号信息。

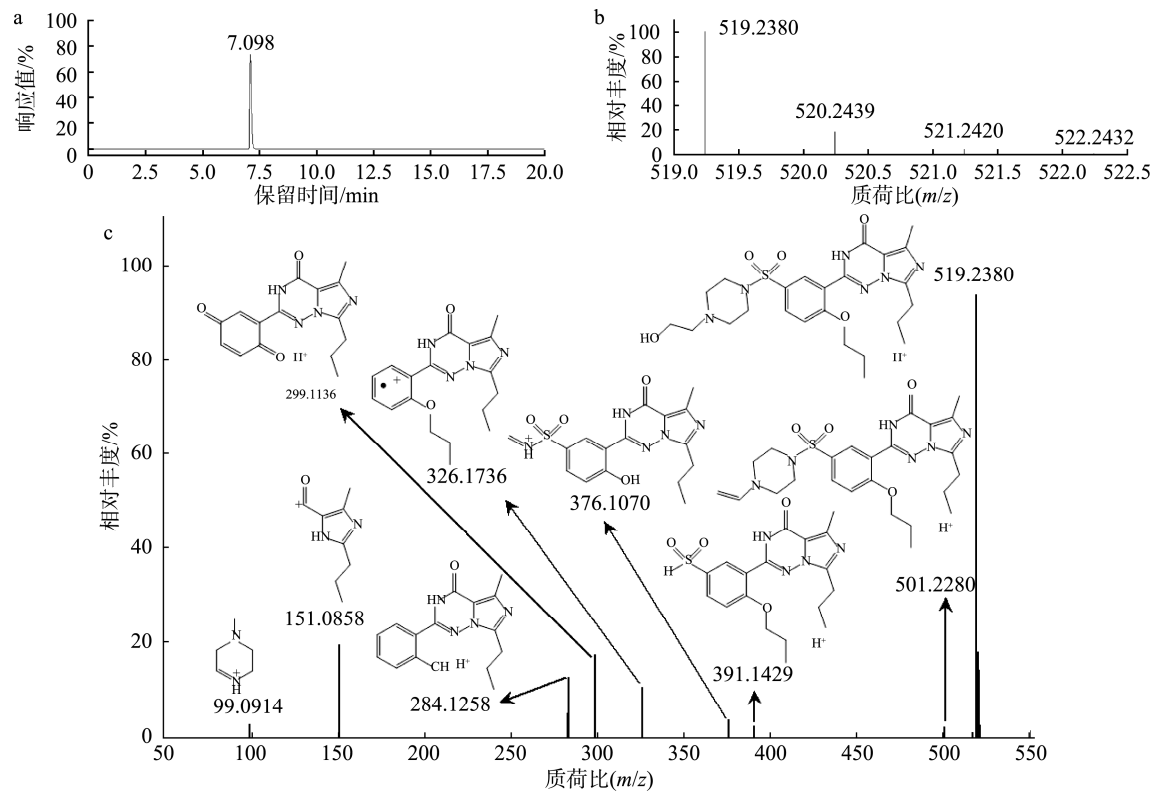


图 1 样品中伐地那非类似物的提取离子流图(a), 高分辨一级质谱图(b)和二级质谱图(c)
Fig.1 Extracted ion chromatogram (a), high resolution primary mass spectrum (b) and secondary mass spectrum (c) of vardenafil analog in the sample

2.3 NMR 结构确证分析

1.3.2 节所制备的可疑伐地那非类似物对照品的 ^1H NMR 谱(图 2a)显示 34 个质子信号; 其中 2 个活泼氢(宽峰)、2 个重叠甲基(三重峰)、1 个甲基(单峰)、12 个亚甲基(三重峰)、两对(共 8 个)对称亚甲基(单峰)、4 个亚甲基(多重峰)和 1 个 1,2,4-三取代苯环的质子信号。从 ^1H NMR 谱显示的化学位移和原子的裂分峰型和耦合常数可以确定分析物含有 2 个正丙基, 1 个甲基, 两对 2 个相连的亚甲基和 2 个活泼氢; 根据文献相关报道和实践经验, 两对(共 8 个)对称亚甲基归属为哌嗪环^[11,28]; 1 个活泼氢为酰胺活泼氢^[29-30], 1 个为羟基氢^[29-30]。 ^{13}C NMR 谱(图 2b)显示 22 个碳谱线, 其中芳基区和烷基区各为 11 个, 而哌嗪环结构对称, 2 对碳信号相互重叠, 与质谱分析所得分子式($\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$)吻合。进一步结合异核单量子相关谱(HSQC)和异核多键相关谱(HMBC)可以明确碳原子与氢原子之间的连接关系。综合质谱和核磁共振一维和二维谱结果, 确定该对照品为 O-丙基羟基伐地那非, 由 O-丙基伐地那非哌嗪环上的乙基被羟乙基取代而得到。O-丙基伐地那非(图 3a)和 O-丙基羟基伐地那非(图 3b)结构式见图 3。O-丙基伐地那非的 ^1H NMR、 ^{13}C

NMR 和 O-丙基羟基伐地那非的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT135、HSQC、HMBC 谱峰归属数据列于表 2。

2.4 UPLC-MS/MS 检测方法的建立

目前, 国内外现行食品安全国家标准及补充检验方法中未有 O-丙基羟基伐地那非的检测方案, 因此需要建立 O-丙基羟基伐地那非的定量测试方法, 明确样品中该物质的含量。

2.4.1 标准曲线及线性范围

按 1.3 项的实验方法, 以色谱峰面积为纵坐标, O-丙基羟基伐地那非质量浓度(ng/mL)为横坐标进行线性回归分析。在固体饮料、果冻、压片糖果 3 种食品基质中, 目标化合物的基质标准曲线和标准工作曲线及 ME 计算结果见表 3。结果显示 3 种基质均存在一定 ME, 固体饮料的 ME 相对较强, 但在允许范围内($|\text{ME}| \leq 20\%$), 当采用甲醇水溶液将空白基质稀释 50 倍后, 基质效应有所减弱。为了使用方便, 选择溶剂标准曲线进行批量食品基质的定量检测。需要说明的是, 方法建立时所用食品基质不能代表所有样品, 因此对于检出的阳性样品, 在前处理过程中可通过增加稀释过程降低 ME, 还可根据实际需要采用基质标准工作液进行定量。

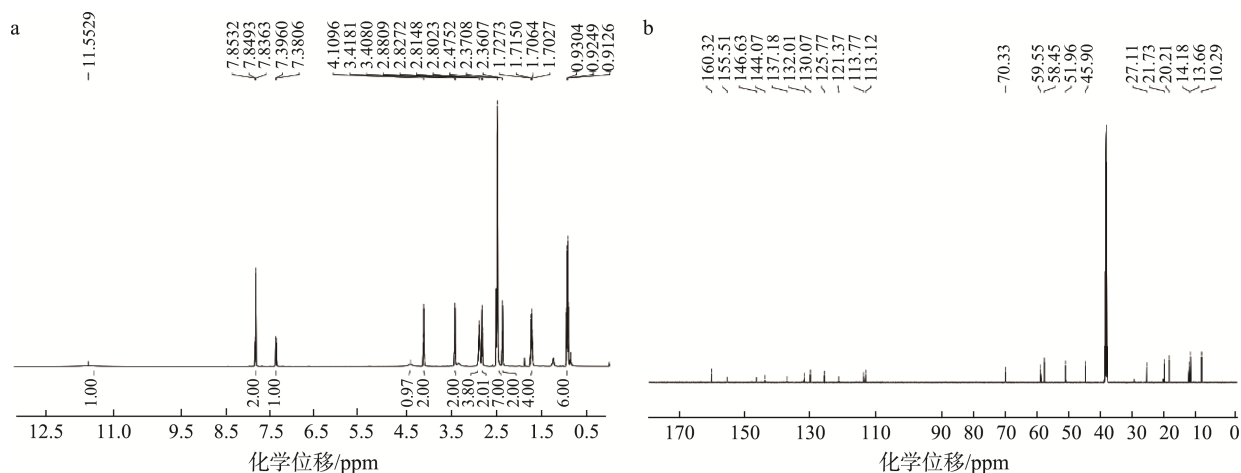


图 2 O-丙基羟基伐地那非的 ^1H NMR 谱(a)与 ^{13}C NMR 谱(b)
Fig.2 ^1H NMR (a) and ^{13}C NMR (b) spectra of O-propyl hydroxyvaridenafil

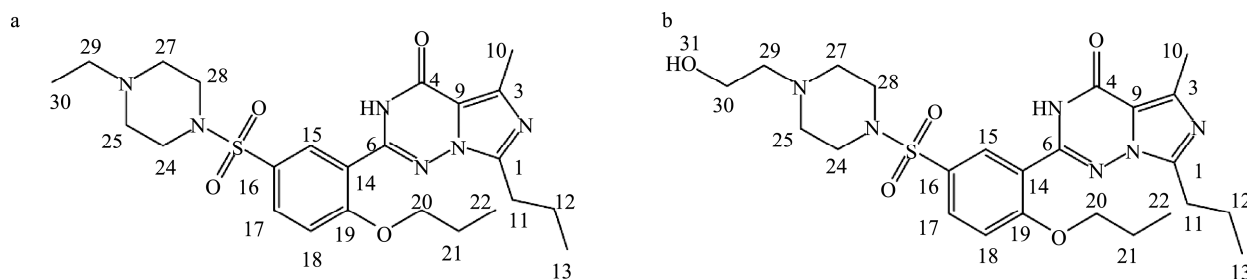


图 3 O-丙基伐地那非(a)和 O-丙基羟基伐地那非(b)的结构式
Fig.3 Structure of O-propyl varidenafil (a) and O-propyl hydroxyvaridenafil (b)

表 2 O-丙基伐地那非和 O-丙基羟基伐地那非的 NMR 数据归属
Table 2 NMR data assignment of O-propyl vardenafil and O-propyl hydroxyvardenafil

原子 编号	O-丙基伐地那非		O-丙基羟基伐地那非			
	¹ H (δ _H /ppm)	¹³ C (δ _C /ppm)	¹ H (δ _H /ppm)	¹³ C (δ _C /ppm)	HSQC	HMBC
1	/	144.41	/	144.07	/	H-11/H-12
3	/	137.63	/	137.18	/	H-10
4	/	155.05	/	155.51	/	H-10 (weak)
5	11.66 (1H, brs)	/	11.55 (1H, brs)	/	/	/
6	/	146.13	/	146.63	/	H-15/H-18 (weak)
9	/	113.68	/	113.77	/	H-10
10	2.48 (3H, s)	14.19	2.48 (3H, s)	14.18	H10-C10	/
11	2.82 (2H, t, <i>J</i> = 7.44 Hz)	27.13	2.81 (2H, t, <i>J</i> = 7.44 Hz)	27.11	H-11/C-11	H-12/H-13
12	1.74~1.69 (2H, m)	20.25	1.75~1.68 (2H, m)	21.73	H-12/C-12	H-11/H-13
13	0.94~0.90 (3H, m)	13.69	0.94~0.90 (3H, m)	10.29	H-13/C-13	H-11/H-12
14	/	121.01	/	121.37	/	H-18
15	7.86~7.83 (1H, m)	130.04	7.85~7.84 (1H, m)	130.07	H-15/C-15	H-17
16	/	125.97	/	125.77	/	H-18/H-15(weak)/H-17 (weak)
17	7.86~7.83 (1H, m)	132.18	7.85~7.84 (1H, m)	132.01	H-17/C-17	H-15
18	7.39 (1H, d, <i>J</i> = 8.76 Hz)	113.17	7.39 (1H, d, <i>J</i> = 9.24 Hz)	113.12	H-18/C-18	H-17 (weak)
19	/	160.35	/	160.32	/	H-17/H-18 (weak)/H-15/H-20
20	4.11 (2H, t, <i>J</i> = 6.30 Hz)	70.39	4.10 (2H, t, <i>J</i> = 6.30 Hz)	70.33	H-20/C-20	H-21/H-22
21	1.74~1.69 (2H, m)	21.76	1.75~1.68 (2H, m)	21.73	H-21/H-21	H-20/H-22
22	0.94~0.90 (3H, m)	10.31	0.94~0.90 (3H, m)	10.29	H-22/C-22	H-20/H-21
24/28	2.89 (4H, brs)	45.92	2.88 (4H, brs)	45.90	H-24/C-24, H-28/C-28	H-25/H-27
25/27	2.41 (4H, brs)	51.21	2.48 (4H, brs)	51.96	H-25/C-25 H-27/C-27	H-24/H-28
29	2.30 (2H, q, <i>J</i> = 7.14 Hz)	51.07	2.36 (2H, t, <i>J</i> = 6.06 Hz)	59.55	H-29/C-29	H-30
30	0.94~0.90 (3H, m)	11.85	3.42 (2H, t, <i>J</i> = 6.06 Hz)	58.45	H-30/C-30	H-29
31	/	/	4.41 (1H, brs)	/	/	/

注: /表示原子编号处的原子不存在相关的谱峰信号。

表 3 O-丙基羟基伐地那非在 3 种食品基质中的 MEs
Table 3 MEs of O-propyl hydroxyvardenafil in 3 kinds of food matrices

基质	斜率	相关系数(<i>r</i> ²)	MEs/%
甲醇-水	2.7555×10 ⁴	≥0.999	无
固体饮料	3.2331×10 ⁴	0.997	17.33
压片糖果	2.9436×10 ⁴	0.999	6.83
果冻	2.9048×10 ⁴	0.996	5.42

研究采用外标法对 O-丙基羟基伐地那非进行定量, 在 2~100 ng/mL 的质量浓度范围内, O-丙基羟基伐地那非线性关系良好, 线性方程为 $Y=2.7555\times10^4X+1.3585\times10^4$, 线性相关系数(*r*²)≥0.999, 可用于定量分析。

2.4.2 检出限和定量限

本方法采用信噪比法向空白基质中添加目标分析物,

以 *S/N* 为 3 时的添加浓度作为方法的 LOD, 以 *S/N* 为 10 时的添加浓度作为方法的 LOQ。经测试, O-丙基羟基伐地那非的 LOD 为 0.05 mg/kg, LOQ 为 0.10 mg/kg, 能够满足定量测定的需求。

2.4.3 回收率和准确度

O-丙基羟基伐地那非在固体饮料、压片糖果和果冻基质中 3 个水平加标回收率分别为 94.45%~98.92%、97.66%~104.16% 和 96.00%~102.30%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)分别为 0.70%~2.78%、1.28%~4.02%、2.24%~3.26%, 符合 GB 5009.295—2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》定量分析方法中目标物质量为 0.1 mg/kg~10 g/kg 内的重复性 RSDs≤10%的要求, 适用于固体饮料、压片糖果和果冻基质中 O-丙基羟基伐地那非的检测。方法的回收率和 RSDs 结果见表 4。准确度高, 精确度好, 满足实验要求。

表 4 3 种食品基质中 O-丙基羟基伐地那非的加标回收率及 RSDs(n=6)
Table 4 Spiking recoveries and RSDs of O-propyl hydroxyvaridenafil in 3 kinds of food matrices (n=6)

化合物	加标含量/(mg/kg)	固体饮料		果冻		压片糖果	
		回收率均值/%	RSDs/%	回收率均值%	RSDs/%	回收率均值/%	RSDs/%
O-丙基羟基伐地那非	0.1	98.92	2.78	99.95	2.91	104.16	4.02
	0.2	98.21	1.70	102.30	3.26	100.31	1.28
	1.0	94.45	0.70	96.00	2.24	97.66	2.42

2.4.4 样品测定

采用建立的 UPLC-MS/MS 检测方法测得 2 批次压片糖果阳性样品中 O-丙基羟基伐地那非的具体含量分别为 22.0 mg/kg、13.8 g/kg。该化合物在阳性样品中含量差异较大,说明避开国家现有标准和方法而使用的新型非法添加物在食品中随意添加的现象比较严重。进一步表明提高对此类物质的识别和确证,对于辅助稽查机构查处相关案件意义重大。

3 讨论与结论

本研究在自建质谱数据库及对质谱裂解规律认识的基础上,通过高分辨质谱筛查了宣称具有壮阳功效的保健食品中的那非类非法添加物,结合核磁共振波谱技术,解析和确证了新型未知化合物 O-丙基羟基伐地那非,并使用 UPLC-MS/MS 建立了食品基质中 O-丙基羟基伐地那非定量测定方法。方法准确度高,灵敏度好,可用于复杂保健食品基质中 O-丙基羟基伐地那非的快速筛查和测定。

本研究所建立的研究方法为食品基质中非法添加物的系统性确证和定量研究提供了重要的参考依据。然而,非靶向筛查技术是在对已知化合物质谱裂解规律的基础上发展起来的,由于缺乏系统全面的化学危害物高分辨质谱数据库,非靶向筛查分析技术在复杂样品中海量未知化合物的高通量筛查方面难以实现全面的识别。目前,虽有一些商业化的软件和质谱数据库能够用于辅助质谱筛查解析,但是不同仪器参数造成的谱图异质性、软件自动解析设置的难度等不足限制了质谱解析的应用。在 NMR 技术确证方面,复杂基质中未知物的前处理及纯化过程烦琐复杂;核磁谱图解析对于研究人员的经验要求高;因此通过一些途径获取标准品或对照品进行比对的方式能够更精确的解读未知物的分子结构。针对非法添加物的检测,常规检测方案存在着一些不足,推行“高分辨质谱非靶向广谱筛查+三重四极杆精准定量”的检测模式,发挥质谱质量分析器各自的优势,将达到提质增效的目的。

总体来说,化学危害物的非靶向筛查在技术方面尚有許多地方需要进一步加强研发,在海量数据分析、质谱/核磁解析的规范化和检测模式的创新方面还需要进一步探索,以应对新型化学危害物的分析检测需求。

参考文献

[1] KEE CL, GE XW, GILARD V, *et al.* A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147: 250–277.

[2] 陈燕, 严丽娟, 徐敦明, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测蒸馏酒及其配制酒中 90 种那非类物质[J]. *分析测试学报*, 2023, 42(5): 519–530.

CHEN Y, YAN LJ, XU DM, *et al.* Simultaneous determination of 90 nafils in distilled liquor and its products by QuEChERS/high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2023, 42(5): 519–530.

[3] BALAYSSAC S, DANOUN S, GILARD V, *et al.* The POWER saga from 2007 to 2022: An example of a sexual enhancement dietary supplement tainted by different adulterants and still on the market [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 227: 115283.

[4] LI CZ, WANG XZ, WU SM, *et al.* Separation and structural elucidation of a novel vardenafil analogue as an adulterant in a natural health care dietary supplement [J]. *Heliyon*, 2023, 9(4): e15428.

[5] 夏金涛, 吴婉琴, 江丰, 等. 压片糖果中一种新型伐地那非衍生物发现和确证[J]. *分析试验室*, 2024, 43(7): 1004–1010.

XIA JT, WU WQ, JIANG F, *et al.* Discovery and confirmation of a new type of vardenafil derivatives in pressed candy [J]. *Chin J Anal Lab*, 2024, 43(7): 1004–1010.

[6] JANKOVICS P, LOHNER S, DARCSI A, *et al.* Detection and structure elucidation of hydroxythiovaridenafil as an adulterant in a herbal dietary supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 74: 83–91.

[7] LEE HM, KIM CS, JANG YM, *et al.* Separation and structural elucidation of a novel analogue of vardenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54: 491–496.

[8] LEE JH, PARK HN, JUNG A, *et al.* Isolation and characterization of a novel sildenafil analogue adulterant, desmethylpiperazinyl propoxysildenafil, in a dietary supplement [J]. *Sci Just*, 2018, 58: 447–454.

[9] 夏金涛, 吴婉琴, 朱松松, 等. 固体饮料中一种新型卡巴地那非类似物的定性鉴别和定量分析[J]. *分析测试学报*, 2022, 41(5): 754–760.

XIA JT, WU WQ, ZHU SS, *et al.* Qualitative and quantitative identification of a new carbadenafil analogue in solid beverages [J]. *J Instrum Anal*, 2022, 41(5): 754–760.

[10] KEE CL, LOW MY, GE XW. Isolation and characterization of N-phenyl propoxyphenyl carbodenafil from an illegal coffee powder product [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 209: 114481.

[11] SUN J, YU H, ZHANG JX, *et al.* Isolation and identification of a novel

- varidenafil analogue, propoxy-varidenafil, found as an adulterant in a health supplement [J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e17253.
- [12] XIA JT, WU WQ, JIANG F, *et al.* A novel vardenafil analog in a healthcare product: Preparation, characterization, and quantification [J]. *Heliyon*, 2023, 9(9): e19456.
- [13] LIU JL, SUN J, WEI H, *et al.* Isolation and characterization of a novel tadalafil analogue adulterant, N-cyclohexyl nortadalafil, in a dietary supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 227: 115144.
- [14] 余晓琴, 刘美, 李澍才, 等. 新型食品非法添加挖掘及应对策略研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(9): 1357–1363.
- YU XQ, LIU M, LI SC, *et al.* Research on mining hidden rules of new unconventional illegal food addition and coping strategies [J]. *Chin J Food Hyg*, 2023, 35(9): 1357–1363.
- [15] 田明, 王玉伟, 冯军, 等. 保健食品及相关食品典型案例[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(1): 487–496.
- TIAN M, WANG YW, FENG J, *et al.* Typical case analysis of health food and related food [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2024, 24(1): 487–496.
- [16] 孙金全. 食品中非法添加药品企业特征分析及监管思路探究[J]. *现代食品*, 2021(21): 41–43.
- SUN JQ. Characteristic analysis of enterprises illegally adding drugs to food and research on supervision mode [J]. *Mod Food*, 2021(21): 41–43.
- [17] 曹进, 黄湘鹭, 张庆生, 等. 食品和保健食品中非法添加物筛查策略的建立[J]. *食品科学*, 2014, 35(19): 302–306.
- CAO J, HUANG XL, ZHANG QS, *et al.* Establishment of screening strategy for illegal additives in foods [J]. *Food Sci*, 2014, 35(19): 302–306.
- [18] ZHANG Y, XIAO CW, ZHONG GH, *et al.* Research on supervision status and countermeasures of health food management [J]. *Mod Food*, 2020(3): 49–52.
- [19] 宁霄, 张伟清, 王钢力, 等. 保健食品中非法添加药物的检测现状及筛查策略研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(5): 1876–1882.
- NING X, ZHANG WQ, WANG GL, *et al.* Detection status and screening strategy of illegally added drugs in healthy food [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(5): 1876–1882.
- [20] HU ZY, ZOU YX, MA Z, *et al.* Rapid screening and identification of targeted and non-targeted illegal added drugs in functional foods by MRSIT-HRMS based on NIST screening database [J]. *Food Chem*, 2024, 446: 138913.
- [21] 王凤怡, 侯雪, 杨晓凤, 等. 非靶向筛查技术在农产品质量安全中的最新研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(15): 156–163.
- WANG FY, HOU X, YANG XF, *et al.* Recent research progress of non-targeted screening technology in the quality and safety of agricultural products [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(15): 156–163.
- [22] 石培育, 宋娟, 蒋锡兰, 等. 高分辨质谱非靶向筛查分析方法在食品化学危害物监测中的研究进展[J/OL]. *食品科学*, 2024, 1–21. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20240523.1807.050.html>
- SHI PY, SONG J, JIANG XL, *et al.* Research progress in the analysis method of non-targeted screening by high resolution mass spectrometry for food chemical hazards monitoring [J/OL]. *Food Sci*, 2024, 1–21. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20240523.1807.050.html>
- [23] 张美娟. 基于液相色谱-质谱的化学战剂及其相关化合物的非靶向筛查策略及技术方法研究[D]. 北京: 军事科学院, 2020.
- ZHANG MJ. Untargeted screening strategies and technical methods for chemical warfare agents and their related chemicals using liquid chromatography-mass spectrometry [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2020.
- [24] 丁葵英, 许文娟, 郭礼强, 等. 液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中烟碱类化合物的基质效应研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(10): 2949–2954.
- DING KY, XU WJ, GUO LQ, *et al.* Matrix effects of neonicotinoid pesticides in vegetables with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(10): 2949–2954.
- [25] 于泓, 胡青, 孙健, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法定性筛查保健食品中西地那非及其相关功效类非法添加化合物[J]. *色谱*, 2018, 36(10): 1005–1017.
- YU H, HU Q, SUN J, *et al.* Qualitative analysis of illegally adulterated sildenafil and related compounds in dietary supplements by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(10): 1005–1017.
- [26] 饶雅琨, 王苑桃, 孙晓, 等. 食品中一种新型非法添加物 O-丙基伐地那非的快速筛查和定量测定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(6): 228–235.
- RAO YK, WANG YT, SUN X, *et al.* Rapid screening and quantitative determination of a new illegally added compound O-propyl vardenafil in foods [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(6): 228–235.
- [27] 刘雅婷, 郭予昕, 刘振强, 等. 食品中一种新型伐地那非结构类似物的筛查与定量测定[J]. *分析测试学报*, 2024, 42(11): 1488–1494.
- LIU YT, GUO YX, LIU ZQ, *et al.* Screening and quantitative determination of a new vardenafil analogue in foods [J]. *J Instrum Anal*, 2024, 42(11): 1488–1494.
- [28] 王珂. 保健食品中非法添加的新型 PDE5 抑制剂研究及 21 种 PDE5 抑制剂表面增强拉曼光谱数据库的建立[D]. 晋中: 山西中医药大学, 2020.
- WANG K. Study on new PDE5 inhibitors adulterated in health food and establishment of surface enhanced raman spectrum database including 21 PDE5 inhibitors [D]. Jinzhong: Shanxi University of Chinese Medicine, 2020.
- [29] CHOI DM, PARK S, YOON TH. Determination of analogs of sildenafil and vardenafil in foods by column liquid chromatography with a photodiode array detector, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2008, 91(3): 580–588.
- [30] GU YF, HU Q, SUN J, *et al.* Isolation and identification of a new sildenafil analogue, hydroxycarbodenafil, found as an adulterant in a health supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 185: 113222.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)

作者简介



夏金涛, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 2501820896@qq.com