

- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 20769—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 粮谷中 486 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 20770—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 牛奶和奶粉中伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 22968—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 茶叶中 448 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 23205—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 果蔬汁、果酒中 512 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 23206—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [10] 中华人民共和国农业部. 蔬菜中 334 种农药多残留的测定 气相色谱质谱法和液相色谱质谱法:NY/T 1379—2007[S]. 北京:中国农业出版社,2007.
- [11] 中华人民共和国农业部. 蔬菜中 2,4-D 等 13 种除草剂多残留的测定 液相色谱质谱法:NY/T 1434—2007[S]. 北京:中国农业出版社,2007.
- [12] 中华人民共和国农业部. 蔬菜及水果中多菌灵等 16 种农药残留测定 液相色谱-质谱-质谱联用法:NY/T 1453—2007[S]. 北京:中国农业出版社,2007.
- [13] 中华人民共和国农业部. 土壤中 9 种磺酰脲类除草剂残留量的测定 液相色谱-质谱法:NY/T 1616—2008[S]. 北京:中国农业出版社,2008.
- [14] 中华人民共和国农业部. 植物性食品中氨基甲酸酯类农药残留的测定 液相色谱-串联质谱法:NY/T 1679—2009[S]. 北京:中国农业出版社,2009.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口食品中杀线威等 12 种氨基甲酸酯类农药残留量的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法:SN/T 0134—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口食品中涕灭威、唑菌胺酯、腈菌脂等 65 种农药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法:SN/T 2150—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口食品中四唑嘧磺隆、甲基苯苏味安、醚磺隆等 45 种农药残留量的检测方法 高效液相色谱-质谱/质谱法:SN/T 2325—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口食品中氨基甲酸酯类农药残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法:SN/T 2560—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [19] 庞国芳. 世界常用农药色谱-质谱图集-液相色谱-四极杆-飞行时间质谱图集:第二卷[M]. 北京:化学工业出版社,2014.

## 实验技术与方法

# 纸喷雾离子化质谱法快速筛查保健食品中违禁添加的磷酸二酯酶 5 抑制剂

万萍,卢岳华,陈波

(湖南师范大学 植化单体开发与利用湖南省重点实验室,湖南 长沙 410081)

**摘要:**目的 建立纸喷雾离子化质谱(PSI-MS)法快速检测保健食品中 3 种非法添加的磷酸二酯酶 5(PDE5)抑制剂(西地那非、伐地那非和他达拉非)的方法。方法 利用 PSI-MS 法对样品中非法添加物进行初步定性鉴别,并通过内标法进行半定量分析。结果 24 种包括胶囊、片剂、丸剂、粉末、酒剂、糖浆及口服液等剂型在内的待测市售保健品的 PSI-MS 检测结果与 HPLC-UV 检测结果基本一致。各目标物在一定范围内线性关系良好,相关系数  $r^2$  均  $>0.99$ ,检出限均在  $1.0 \text{ mg/L}$  以下,相对标准偏差为  $20\% \sim 24\%$ 。结论 本方法快速、准确、专属性强,适用于大批量复杂基质样品中 PDE5 抑制剂的快速筛查。

**关键词:**纸喷雾离子化质谱;快速筛查;抗疲劳;保健食品;磷酸二酯酶 5 抑制剂;西地那非;伐地那非;他达拉非;违法添加物

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)04-0459-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.04.014

收稿日期:2017-06-07

作者简介:万萍 女 硕士生 研究方向为色谱化学方法 E-mail:wanning0903@sina.com

通信作者:卢岳华 男 教授 研究方向为中医学与中西医结合 E-mail:Lyh@hunnu.cn

## Rapid determination of phosphodiesterase 5 inhibitors in invigorative health food by paper spray ionization mass spectrometry method

WAN Ping, LU Yue-hua, CHEN Bo

(Key Laboratory of Phytochemical Research and Development of Hunan Province, Hunan Normal University, Hunan Changsha 410081, China)

**Abstract: Objective** A rapid method was constructed for detection of 3 kinds of phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors (sildenafil, vardenafil, tadalafil) in invigorative health food by paper spray ionization mass spectrometry (PSI-MS method).

**Methods** The characteristic ions of the PDE5 inhibitors could be used for preliminary identification and semiquantitative analysis with internal standard method using PSI-MS method. **Results** The 24 kinds of commercially available health-care products includes capsule, tablet, pill, powder, wine, syrup and liquid were tested. Results from PSI-MS were consistent with the HPLC-UV date. The calibration curves of PSI-MS has a good linearity in a given range. The linear coefficients of analytes were higher than 0.99. The LODs of 3 kinds of PDE5 inhibitors were lower than 1.0 mg/L. The RSDs of this method ranged from 20% to 24%. **Conclusion** The PSI-MS method was rapid, accurate and targeted, which is compliant for quickly screening the PDE5 inhibitors in large complex matrix samples.

**Key words:** Paper spray ionization mass spectrometry; rapid detection; invigorative; health food; phosphodiesterase 5 inhibitors; sildenafil; vardenafil; tadalafil; adulterant

磷酸二酯酶 5 (PDE5) 抑制剂即 5 型磷酸二酯酶抑制剂, 是一种抑制磷酸二酯酶活性的药物, 在男性勃起功能障碍等疾病中具有广泛应用。目前已经批准的 3 种 PDE5 抑制剂包括西地那非、盐酸伐地那非及他达拉非<sup>[1]</sup>。西地那非是由美国辉瑞公司研制生产的一种磷酸二酯酶抑制剂, 于 1998 年 4 月在美国以商品名“伟哥”上市, 后于中国以商品名“万艾可”上市<sup>[2]</sup>。伐地那非是近年国外获得批准用于治疗阳痿的 PDE5 抑制剂<sup>[3]</sup>。相对于前两种, 他达拉非的特点是具有长效性, 对内科合并症的阳痿患者具有更好的疗效<sup>[4-5]</sup>。由于 PDE5 抑制剂可以加快血流速度, 增强性功能, 因此常被一些不法厂商添加到抗疲劳保健食品中, 以达到用量小、见效快的目的。但是, 其毒副作用却是不容忽视的<sup>[6]</sup>, 已经报道的不良反应包括头痛、面部潮红、消化不良、视觉功能障碍、肌肉酸痛等, 长期服用对消费者的身体会造成严重伤害。目前, 有很多关于抗疲劳保健食品中违禁添加 PDE5 抑制剂的检测方法的报道, 大多采用了高效液相色谱法<sup>[7]</sup>以及高效液相色谱-质谱联用法<sup>[8-9]</sup>。这些方法在测定前, 需要复杂的前处理过程, 耗时较长, 不适用于实际产品的大批量检测。

纸喷雾离子化 (paper spray ionization) 作为一种新型敞开式离子化技术<sup>[10-12]</sup>, 具有快速、高效等特点。该技术是将液体试剂滴加在纤维素或半纤维素组成的纸基质表面, 利用高电压在纸尖端产生电喷雾, 使化合物离子化, 从而实现原位、在线检测。该技术已被广泛应用于不同样品/标本, 如尿液、血液、食品等复杂基质样品/标本的分析。

本试验利用纸喷雾离子化质谱 (PSI-MS) 技术, 对市售 24 种男性抗疲劳保健食品中 3 种常见违禁添加的 PDE5 抑制剂西地那非、伐地那非和他达拉非进行了快速定性及半定量分析, 并且以高效液相色谱-紫外定量检测 (HPLC-UV) 法进行了对照分析。结果表明, PSI-MS 技术能快速、准确定性分析保健食品中非法添加的西地那非、伐地那非和他达拉非, 该方法的半定量结果与 HPLC-UV 结果一致, 证明了此方法在样品定量分析中具有一定的准确性。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 样品

抗疲劳保健食品样品均购于保健品市场 (含实体店和网络店), 包括胶囊、片剂、丸剂、粉末、酒剂、糖浆及口服液等剂型, 共 24 份样品, 其中 7 份样品购自长沙市保健食品实体商店, 17 份样品从网络店购得。

##### 1.1.2 主要仪器与试剂

Thermo Finnigan-LCQ 离子阱质谱 (配 LCQ-tune 工作站, 美国菲尼根)、LC-20A 高效液相色谱仪 (配 SPD-UV 检测器和 LC solution 工作站, 日本岛津)、离心机、超声波清洗器、纯水实验室自制 (Milli-Q 纯水系统)。

喷雾纸 (三级, 美国 Waterman), 3 种 PDE5 抑制剂标准品 (西地那非、伐地那非、他达拉非, 色谱级,  $\geq 99\%$ ) 和西布曲明标准品 (色谱级,  $\geq 99\%$ ) 均购自中国药检所, 甲醇、乙腈均为色谱纯, 三乙胺、磷酸均为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 标准溶液的制备

精确称取西地那非、伐地那非、他达拉非和西布曲明标准品适量,分别置于4个10 ml容量瓶中,加入8 ml甲醇,超声5 min,冷却至室温,用甲醇定容至刻度,摇匀,得其浓度分别为1 000、1 100、1 120、1 200 mg/L,备用。西布曲明作为内标物。

### 1.2.2 样品前处理

将片状样品研磨混匀,胶囊内容物直接倒出,精密称取0.500 g置于50 ml容量瓶中,加甲醇30 ml超声提取30 min,冷却至室温,后用甲醇定容至刻度,摇匀后,离心分离(10 000 r/min,10 min),取上清液,摇匀,备用。液体样品精密量取10.0 ml,置于50 ml容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,备用。

### 1.2.3 仪器条件

色谱:江申 Spherigel C<sub>18</sub> 色谱柱(200 mm × 4.6 mm,5 μm),柱温30 ℃,检测波长292 nm。流动相A为0.05 mol/L三乙胺水溶液(磷酸调pH=3),过0.45 μm滤膜;流动相B为乙腈。流动相B梯度洗脱程序:0~10 min,30%;10~15 min,30%升至70%;15~18 min,70%;18~23 min,70%降至30%。流速1.0 ml/min,进样体积20 μl。

质谱:正离子采集模式,纸喷雾电压+3.5 kV,毛细管温度200 ℃,进样量20 μl,三角形滤纸(底长4 mm,高10 mm,尖端角度10°),距离锥孔1.0 cm处进行喷雾。

### 1.2.4 回收率试验

称取3份不含此类违禁添加物的某样品5.00 g,分别置于3个50 ml容量瓶中,分别加入低、中、高三个水平的他达拉非标准液(8.0、48、112 mg/L),按照1.2.2对样品进行预处理,进行质谱分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 试验条件的优化

#### 2.1.1 纸三角尖端角度的优化

纸三角尖端的角度是影响喷雾好坏程度的一个重要因素,试验探究发现当纸尖端剪为圆弧状时,无法观察到纸喷雾现象,而尖端具有一定角度时可以明显观测到纸喷雾现象。此处考察了在其他条件一致,三角形尖端分别为10°、30°、90°和120°时西地那非、伐地那非、他达拉非和西布曲明混合标准液(浓度均为100 mg/L)的质谱分析结果。如图1所示,当纸三角尖端的角度为120°时,没有观察到明显的喷雾现象;当逐渐降低角度为90°时,出现喷雾现象,但不稳定;当角度减小到30°时,出现稳定喷雾现象,但离子丰度不高;继续降低角度

到10°,喷雾现象良好,离子丰度较高,信号稳定而且持续,所以选择10°为最佳角度。

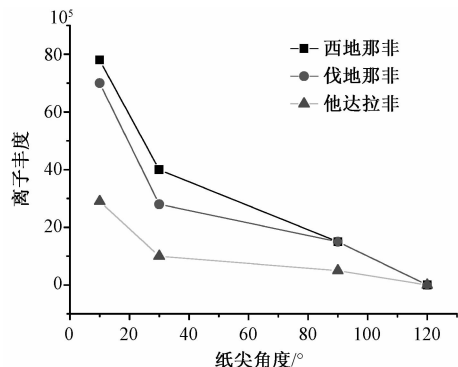


图1 纸尖角度对离子丰度的影响

Figure 1 Effect of the paper tip on the ion abundance

#### 2.1.2 喷雾电压的优化

喷雾电压的高低对纸的毛细作用有很大影响,一般情况下,喷雾电压越高,分析物在纸上的毛细作用越强,离子化效率越好,而且越稳定,但是过高的喷雾电压又会增加其他杂质信号的强度,所以选择一个合适的喷雾电压至关重要。本试验以3种PDE5抑制剂标准品(10 mg/L)混合物为分析目标物,选择+1.5、+2.0、+2.5、+3.0、+3.5、+4.0 kV六个电压为变量条件,其他试验条件保持一致,结果如图2所示。可以看出分析物的离子丰度随着电压增加呈上升趋势,当电压低于+3.0 kV时,离子丰度较低,质谱响应不好;当电压达到+4.0 kV时,离子丰度反而有所下降;此外,随着电压的增加,杂质离子的响应也有所增加。所以,试验选择+3.5 kV为最佳电压。

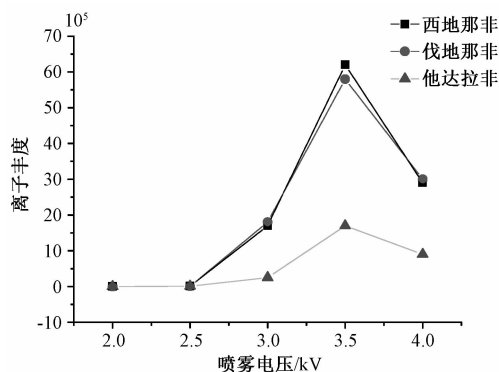


图2 离子丰度随喷雾电压的变化

Figure 2 Variation of ion abundance with spray voltage

### 2.2 PSI-MS法对PDE5抑制剂的半定量分析以及与HPLC-UV法结果的比较

#### 2.2.1 PSI-MS半定量分析

为了考察PSI-MS的准确性,精密量取西地那非、伐地那非及他达拉非的标准溶液,加甲醇稀释成一系列标准溶液:西地那非(5.0、20.0、40.0、

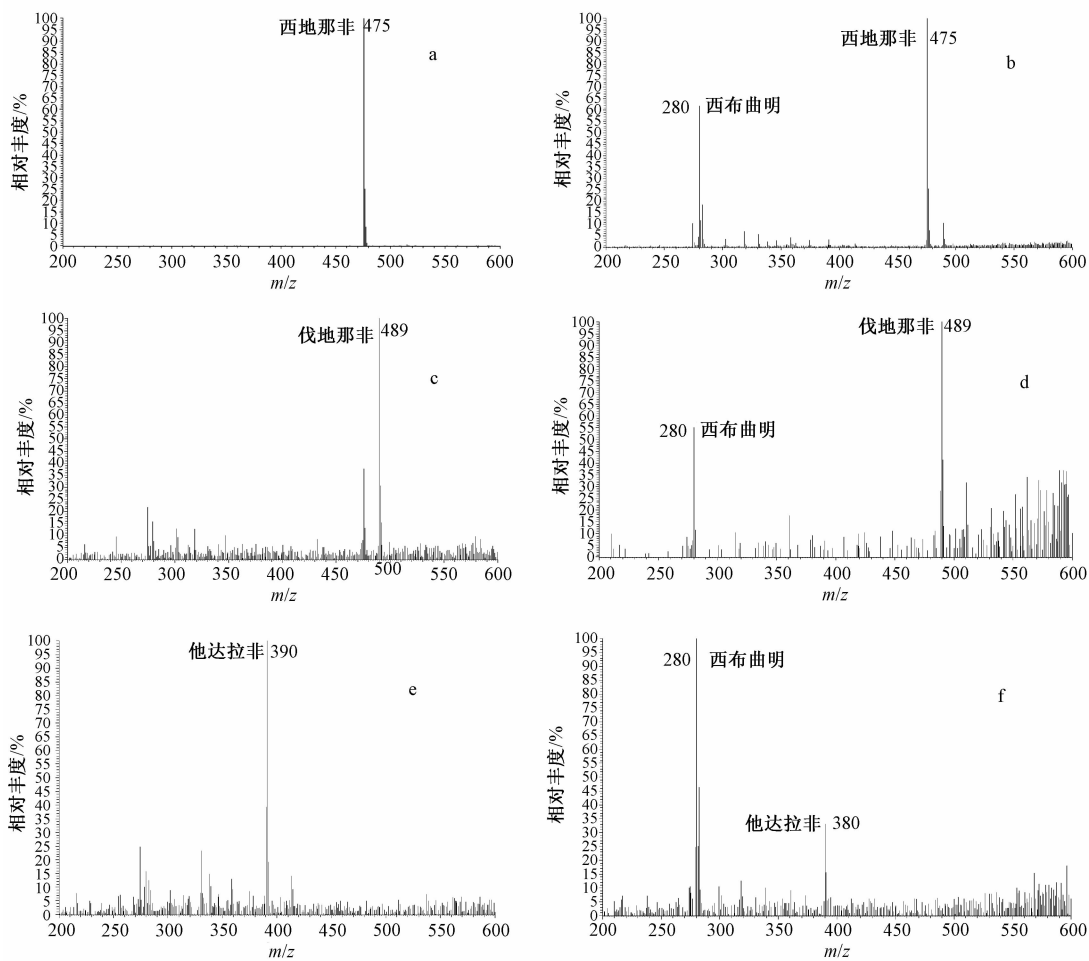
80.0、100.0 mg/L)、伐地那非(5.5、22.0、44.0、88.0、110.0 mg/L)、他达拉非(8.0、24.0、48.0、96.0、112.0 mg/L),以西布曲明作为内标物,3种目标物及其加入内标物后得到质谱图。以目标物浓

度为横坐标,目标物与内标物的信号强度比为纵坐标作标准曲线,结果见表1。可见,PSI-MS法是种快速准确的半定量方法,能为后续的精确定量分析提供可靠依据。质谱图见图3。

表1 PSI-MS法和HPLC-UV法的线性范围和检出限( $n=6$ )

Table 1 Calibration curves and detection limits for three PDE5 inhibitors by PSI-MS and HPLC-UV

物质	方法	线性范围/(mg/L)	线性方程	相关系数	检出限/(mg/L)	浓度/(mg/L)	RSD/%
西地那非	PSI-MS	5.0 ~ 100.0	$y = 0.0832x - 0.2384$	0.993 7	0.2	50	20
	HPLC-UV	1.0 ~ 100.0	$y = 12783x - 2894.5$	0.999 7	0.1		
伐地那非	PSI-MS	5.5 ~ 110.0	$y = 0.0716x - 0.0854$	0.997 9	0.2	55	24
	HPLC-UV	1.1 ~ 110.0	$y = 26744x - 4668.3$	0.999 8	0.1		
他达拉非	PSI-MS	8.0 ~ 112.0	$y = 0.0124x - 0.1054$	0.991 0	1.0	56	21
	HPLC-UV	1.6 ~ 112.0	$y = 24674x + 2889.3$	0.999 6	0.2		



注:a为西地那非(10.0 mg/L);b为西地那非(10.0 mg/L) + 西布曲明(2.0 mg/L);c为伐地那非(11.0 mg/L);d为伐地那非(11.0 mg/L) + 西布曲明(2.0 mg/L);e为他达拉非(16.0 mg/L);f为他达拉非(16.0 mg/L) + 西布曲明(2.0 mg/L)

图3 3种目标物及其加入内标物的质谱图

Figure 3 Mass spectra of 3 kinds of objects and their internal standard

### 2.2.2 HPLC-UV法准确定量

精密量取西地那非、伐地那非及他达拉非的标准溶液,加色谱甲醇稀释成一系列标准溶液:西地那非(1.0、10.0、40.0、80.0、100.0 mg/L)、伐地那非(1.1、11.0、44.0、88.0、110.0 mg/L)、他达拉非(1.6、16.0、64.0、96.0、112.0 mg/L)。利用液相色谱进行分析,对照品色谱图见图4,以目标物的浓度和峰面积分别

为横坐标和纵坐标,作标准曲线(见表1)。由表1可知,HPLC-UV法定量结果准确,重现性好,灵敏度高,但相对PSI-MS法耗时。由中间浓度的RSD值可见,PSI-MS法的精密度不及HPLC-UV法。

### 2.2.3 回收率

对1种不含此类违禁添加成分的样品进行加标回收试验,每组加标浓度做3组平行,每份样品连续

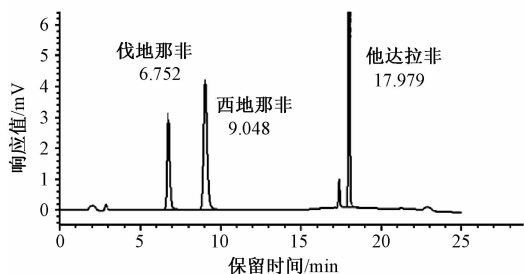


图 4 3 种 PDE5 抑制剂标准品的 HPLC-UV 色谱图

Figure 4 Chromatogram of the 3 drugs by HPLC-UV

分析 3 次,结果见表 2,加标回收率在 84.16% ~ 102.70% 之间,表明本方法加标回收率较高。

表 2 他达拉非的回收率试验结果

Table 2 Results of recovery

加标量/(mg/100 g)	测定值/(mg/100 g)	平均回收率/%
50	51.35	102.70
100	96.18	96.18
150	126.24	84.16

### 2.3 对实际样品的筛查与定量

为检验 PSI-MS 技术的实用性,本试验快速检测了 24 种市售抗疲劳保健食品。其中包括胶囊、片剂、丸剂、酒剂、糖浆及口服液等剂型。对待测样品进行纸喷雾分析的同时,利用 HPLC-UV 方法进行平行试验。测得 19 份样品呈阳性,其中 7 份检出含有他达拉非,8 份检出含有西地那非,4 份检出含有伐地那非,另有 5 份结果呈阴性。HPLC-UV 法定量测定结果与 PSI-MS 半定量测定结果基本一致,HPLC-UV 法检出限更低,精密度更高,但是前处理过程繁杂,耗时较长,不利于市场大批量食品的快速检测,而 PSI-MS 技术正好弥补了这一不足。结果见表 3。

表 3 市场样品测定结果 (n=6)

Table 3 Determination results of samples from markets

样品	非法添加物	PSI-MS		HPLC-UV	
		含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%
胶囊 A	西地那非	3.101	11.28	5.218	7.60
胶囊 B	西地那非	5.418	10.54	8.311	5.80
胶囊 C	他达拉非	0.780 6	25.63	1.917	2.17
胶囊 D	伐地那非	0.119 4	13.38	0.265 5	2.90
胶囊 E	他达拉非	0.792 0	22.86	1.129	6.86
片剂 A	他达拉非	3.727	14.39	6.113	5.81
片剂 B	西地那非	0.630 2	19.87	2.050	3.32
片剂 C	西地那非	0.035 14	12.23	0.084 14	6.04
片剂 D	西地那非	0.037 23	25.37	0.803 1	3.18
片剂 E	西地那非	4.211	14.32	5.944	5.23
丸剂 A	西地那非	26.96	17.85	30.11	3.66
丸剂 B	他达拉非	5.665	19.32	5.733	6.04
丸剂 C	他达拉非	5.540	10.62	8.233	5.81
粉末	他达拉非	0.878 6	9.93	1.272	4.20
酒剂 A	伐地那非	0.055 67	15.11	0.104 3	7.61
酒剂 B	伐地那非	0.042 38	13.90	0.092 22	2.29
酒剂 C	他达拉非	0.2741	11.87	0.385 4	4.55
糖浆	伐地那非	0.021 40	15.37	0.233 0	3.41
口服液	西地那非	0.014 73	25.05	0.1552	3.83

### 3 小结

本试验采用 PSI-MS 法对市售抗疲劳保健食品中的违禁添加剂进行快速筛查与半定量研究。西地那非、伐地那非和他达拉非这 3 种 PDE5 抑制剂被检出。对 24 种市售抗疲劳保健食品进行快速筛选检测,有 19 份样品检出含有违禁添加物。PSI-MS 法不仅实现了快速筛选分析,而且完成了半定量分析。与传统 HPLC-UV 法的比较结果表明 PSI-MS 法半定量分析结果较准确,可以成为市场上保健食品或相关产品中违禁添加物筛查的有力工具,并使产品的大批量现场快速普查得以实现。

### 参考文献

- [1] GRATZ S R, FLURER C L, WOLNIK K A. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 36(3):525-533.
- [2] 王怀鹏,蒲小勇.西地那非的起效时间和维持时间的研究进展[J].中华男科学杂志,2005,11(5):392-395.
- [3] 朱积川,姜辉.伐地那非治疗勃起功能障碍的有效性和安全性[J].中华男科学杂志,2004,10(9):704-710.
- [4] 蒲小勇,王行环,王怀鹏,等.三种 PDE5 抑制剂的药代动力学,起效时间和维持时间[J].中国男科学杂志,2007,21(8):60-63.
- [5] 白志明,刘振湘.口服药物治疗男性勃起功能障碍的进展[J].国外医学:泌尿系统分册,2000,20(6):283-285.
- [6] 吴双,王华,朱慧果,等.解析附电晕束电离质谱法快速筛选保健食品中非法添加的 5 型磷酸二酯酶抑制剂[J].分析化学,2012,40(7):1081-1085.
- [7] 张剑,罗进,耿萌辉,等.反相高效液相色谱法同时测定壮阳类保健品中达泊西汀和 4 种 PDE5 抑制剂[J].理化检验:化学分册,2014,50(3):323-326.
- [8] 杨洋,李珍.补肾壮阳类保健品中 7 种非法添加成分的检测[J].北方药学,2015,12(3):12-13.
- [9] ZHU X, XIAO S, CHEN B, et al. Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1066(1):89-95.
- [10] 张智平,刘晓宁,郑亚君.常压电离源-纸喷雾电离技术及应用[J].分析化学,2014,42(1):145-152.
- [11] 周旋.反应纸喷雾质谱在生物样品分析中的应用研究[D].安徽:中国科学技术大学,2015.
- [12] ZHENG Y J, ZHANG X L, YANG H J, et al. Facile preparation of paper substrates coated with different materials and their applications in paper spray mass spectrometry[J]. Analytical Methods, 2015, 7(13):5381-5386.