

MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2008, 110(2):183-186.

[14] Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) [EB/OL]. (2014-11-20) [2015-03-24]. http://fapas.com/.

实验技术与方法

电喷雾-离子迁移谱法快速筛查保健酒饮料中3种壮阳类药物

骆和东¹, 张璨雯², 李平³, 蔡伟鹏¹, 林志杰³

(1. 厦门市疾病预防控制中心, 福建 厦门 361021; 2. 集美大学生物与工程学院, 福建 厦门 361021; 3. 厦门鉴科检测技术有限公司, 福建 厦门 361006)

摘要:目的 建立电喷雾-离子迁移谱(ESI-IMS)快速筛查保健酒饮料中违法添加西地那非、硫代艾地那非和伐地那非3种壮阳类违禁药物的方法。方法 样品经乙腈超声提取,稀释放定容后直接测定。以ESI作为电离源,空气作为迁移气体,在正离子模式进行检测,基质外标法定量。结果 西地那非、伐地那非、硫代艾地那非分别在1.25~12.50、2.00~20.00、1.00~10.00 mg/L范围内线性关系良好,相关系数(r)均大于0.99,3种违禁药物的检测限分别为0.50、0.80、0.40 mg/L。平均回收率为93.33%~121.17%,相对标准偏差(RSD)为2.65%~10.00%,实际样品检测与气相色谱-质谱联用法确证结果一致。结论 该方法快速简便,结果准确可靠,适用于保健酒饮料中非法添加西地那非、硫代艾地那非和伐地那非3种壮阳类违禁药物的快速筛查。

关键词:离子迁移谱; 壮阳类药物; 保健酒; 违禁药物; 快速检测

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)03-0339-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.03.013

Ion mobility spectrometry for rapid screening of three anti-impotence illegal drugs in health care liquor

LUO He-dong, ZHANG Can-wen, LI Ping, CAI Wei-peng, LIN Zhi-jie

(Xiamen Center for Disease Control and Prevention, Fujian Xiamen 361021, China)

Abstract: Objective A method was developed for the rapid screening of sildenafil, vardenafil and thioildenafil in health liquor by electrospray ionization-ion mobility spectrometry (ESI-IMS). **Methods** The samples were extracted by ultrasound with 100% acetonitrile for 20 min and then the supernatant was diluted by 90% acetonitrile. The IMS was operated in the positive mode at ambient pressure using ESI as the ionization source and air as drift gas and the analytes were quantified by the matrix-matched external method. **Results** The calibration curves showed good linearity within the range of 1.25-12.50, 2.00-20.00, 1.00-10.00 mg/L for sildenafil, vardenafil and thioildenafil, respectively. The detection limits (LODs) of sildenafil, vardenafil, thioildenafil were 0.50, 0.80, 0.40 mg/L, respectively, and the recoveries were 93.33%-121.17% with the relative standard deviations (RSD , $n = 6$) of 2.65%-10.00%. The results were in accordance with LC-MS/MS. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, and can be applied as a screen method for the analysis of sildenafil, vardenafil and thioildenafil in health care liquor.

Key words: Electrospray ionization ion mobility spectrometry; anti-impotence drugs; health care liquor; forbidden drug; rapid detection

西地那非、伐地那非和硫代艾地那非均属于磷酸二酯酶抑制剂,可用于临床治疗男性功能障碍

等疾病,长期或超剂量服用此类药物易对心血管系统、神经系统、消化系统等造成严重损伤^[1],因此国家明令禁止添加到保健食品中。某些不法商人为了追求理想的治疗效果以达到非法盈利的目的,会在壮阳类保健食品中违法添加这类违禁药物。2014年8月山东省食品药品监督管理局在烟台某酒业生产的配制酒产品中检出含有西地那非等西药成分,

收稿日期:2016-01-12

基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2014D005)

作者简介:骆和东 男 主任技师 研究方向为食品卫生与安全

E-mail:luohedong@126.com

涉案货品价值190余万元^[2]。2014年广东省食品药品检验所对市场上收集的101批样品进行检测,结果发现7.9%的样品为违禁药物阳性,其中硫代艾地那非的添加现象普遍^[3]。2015年7月31日国家食品药品监管总局发布通告^[4],51家企业在69种保健酒、配制酒中违法添加西地那非等化学物质。因此建立一种快速、简便的筛查技术以检测壮阳类药物非法添加问题具有重要意义。

目前,国内外已有较多文献报道了检测保健食品中非法添加的违禁化学药物的方法,其中包括薄层色谱法^[5-6]、酶联免疫法^[7]、高效液相色谱法(HPLC)^[3,8]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[9-10]、胶束电毛细管色谱法^[11]等。这些方法或由于具有样品处理复杂、分析时间长、设备昂贵、操作繁琐等缺点而难以用于现场快速筛查。本研究利用电喷雾-离子迁移谱(ESI-IMS)分析速度快、操作简便、样品处理简单的特点,建立了保健酒饮料中非法添加西地那非、伐地那非和硫代艾地那非3种违禁化学物质的快速筛查方法,检测结果经液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)验证,本研究建立的方法可靠、数据准确,适用于市场中实际样品的测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

试验所用样品均购自厦门市的药店、超市或网络购买,共7份。

1.1.2 主要仪器与试剂

GA2100离子迁移谱系统[配有电喷雾离子源(ESI),美国Excellims]、Agilent 6460液相色谱-串联质谱仪(美国Agilent)、超声波清洗器、高速冷冻离心机、漩涡混合仪、震荡器。

甲醇、乙腈均为HPLC级,西地那非(CDFZ-S-0652)、伐地那非(CDFZ-V-054)和硫代艾地那非(CDFZ-S-0622)标准品均购自上海安普公司,试验用水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

样品混匀后准确移取10.00 ml于100 ml比色管中,加入50.00 ml纯乙腈溶液,漩涡混合仪上摇匀,超声波清洗器中超声处理20 min,用一次性针管吸取上清液适量,90%乙腈水溶液稀释5倍后,经0.22 μm微孔滤膜过滤,进行ESI-IMS测定。

1.2.2 标准溶液的配制和基质匹配标准曲线的绘制

标准溶液的配制:精确称取西地那非、伐地那非和硫代艾地那非3种标准物质各5.00 mg,分别

置于2.00 ml小口螺纹瓶中,加入1.0 ml乙腈超声溶解,配制成含量均为5.00 mg/ml的标准溶液,置于-4℃冰箱中保存。试验前取出,恢复至室温,分别量取3种标准溶液各100 μl,用乙腈稀释定容到5.0 ml,配制成100 μg/ml储备液,然后用90%乙腈水稀释配制成浓度分别为12.5 μg/ml(西地那非)、20 μg/ml(伐地那非)、10 μg/ml(硫代艾地那非)的混合标准溶液。

基质匹配标准曲线的绘制:取不含这3种化合物的保健酒饮料,按照1.2.1的方法处理,得到空白基质溶液。分别吸取0.25、0.20、0.40 ml的西地那非、伐地那非、硫代艾地那非标准储备液,用空白基质进行稀释,配制成西地那非、伐地那非、硫代艾地那非含量分别为25.00、20.00、40.00 mg/L的基质混合标准溶液,用空白基质溶液对该液逐级稀释,制得系列基质混合标准溶液。在优化的IMS条件下测定,以待测物的浓度C(mg/L)为横坐标(x),峰面积A为纵坐标(y),经回归处理,得标准曲线和相关系数(r)。

1.2.3 仪器条件

ESI-IMS检测条件:电喷雾离子源,正离子模式(ESI+);源电压1700 V,迁移管电压8500 V,进样口温度190℃,迁移管温度170℃,迁移气体为高纯空气,流量0.90 L/min。

LC-MS/MS检测条件:色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(4.6 mm×50 mm,1.8 μm);流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为25%乙腈水溶液。梯度洗脱条件:0~1.0 min,25% B;1.0~5.0 min,25%~70% B;5.0~6.0 min,70%~25% B;6.0~9.0 min,25% B。流速0.3 ml/min,进样体积5 μl,扫描方式为电喷雾正离子模式(ESI+),选择多反应检测(MRM)模式;干燥气温度325℃,干燥气流速12 L/min,鞘气温度300℃,鞘气流速12 L/min,毛细管电压4000 V,质谱参数见表1。

表1 质谱分析参数

化合物	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	碎裂电压 /V	碰撞电压 /V
西地那非	475.0	311.1	185	30
		283.1*	185	40
伐地那非	489.0	312.1	180	40
		151.1*	180	55
硫代艾地那非	505.0	299.0*	155	40
		113.1	155	30

注:*表示定量离子

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

保健食品中常用的西地那非、伐地那非和硫代

艾地那非提取溶剂有甲醇^[8,10]和乙腈^[3,6]。试验比较了甲醇、乙腈对提取效果的影响,发现乙腈作提取溶剂时,各目标化合物的响应值较高,基线平稳,信噪比更低,故选用乙腈为提取溶剂。试验还比较了不同浓度(60%、70%、80%、90%、100%)乙腈水溶液对目标化合物提取效果的影响,通过比较各浓度下3种物质检测的响应面积和响应强度发现,纯乙腈作为提取溶剂时,3种物质的平均回收率最高,故选择纯乙腈作为样品前处理的提取溶剂。

不同提取方式也会影响物质的提取效果,试验比较了超声、振荡提取时物质响应结果,发现在相同的条件下,超声的提取效果明显高于振荡。试验中还考察了不同超声时间(5、10、15、20、30 min)下3种化合物的响应值及平均回收率,发现超声20 min时各物质的响应值趋于稳定,回收率高。故试验中采用纯乙腈溶液超声20 min提取样品,提取液由90%乙腈水溶液稀释5倍以降低基质效应,0.22 μm滤膜过滤后,IMS测定。

2.2 基质效应

在ESI-IMS的分析中,由于待测物含有多种组分,会影响电喷雾接口的离子化效率,导致离子的增强或抑制,并影响分析结果的准确性。试验中考察了不同浓度的3个目标物在90%乙腈溶液和空白基质溶液中的响应值,根据基质效应(ME)的计算公式计算出基质效应的大小,见表2。

$$\text{基质效应(ME)} = \frac{\text{空白基质匹配溶液响应值}}{\text{90\%乙腈匹配溶液响应值}} \times 100\%$$

表2 3个目标化合物的基质效应(n=3)

Table 2 Matrix effect of IMS response to three compounds

化合物	浓度 /(mg/L)	90%乙腈 溶液稀释		空白基质		基质 效应 /%
		响应 值	RSD /%	响应 值	RSD /%	
西地那非	2.00	0.120	4.29	0.070	4.95	58.50
	5.00	0.308	2.70	0.180	8.18	58.38
硫代艾地那非	0.80	0.072	2.88	0.031	3.77	42.40
	2.00	0.199	1.01	0.076	2.75	38.02
伐地那非	2.00	0.107	1.42	0.033	3.03	30.84
	5.00	0.199	3.81	0.076	4.60	38.42

从表2可以看出,西地那非、硫代艾地那非和伐地那非的基质效应范围分别为58.38%~58.50%、38.02%~42.40%和30.84%~38.42%,表现为明显的基质抑制效应。因此试验中采用基质匹配标准曲线法进行定量。

2.3 IMS检测条件的优化

2.3.1 溶剂的选择

电喷雾离子源适于分析液态样品,但是液相的极性、挥发性、分子量等特性都会影响电喷雾离子源的热解析过程。本试验分别比较了不同浓度

(60%、70%、80%、90%、100%)的甲醇水溶液、乙腈水溶液对3种物质信号响应的的影响。以不同浓度的甲醇或乙腈水溶液作溶剂,配制西地那非、伐地那非、硫代艾地那非浓度分别为5、5、4 mg/L的混合标准溶液进样检测,平行3次测定,记录各溶剂中不同浓度下3种化合物的响应值,结果见表3、4。可以看出,选择甲醇作溶剂时,3种物质在纯甲醇溶液中响应值最高;选择乙腈作溶剂时,3种物质在90%乙腈水溶液中响应值更高。通过结果的比较,发现西地那非、伐地那非、硫代艾地那非在90%乙腈中响应值更好、基线更平稳,噪音较低。因此本试验最终选用90%的乙腈水溶液作ESI-IMS检测溶剂。

表3 3个目标化合物在不同浓度甲醇水溶液下的响应值

Table 3 Responses of three compounds under different concentrations of methanol aqueous solution

化合物	响应值				
	60%	70%	80%	90%	100%
西地那非	0.056	0.053	0.070	0.056	0.098
硫代艾地那非	0.120	0.113	0.126	0.129	0.161
伐地那非	0.051	0.053	0.059	0.054	0.099

表4 3个目标化合物在不同浓度乙腈水溶液下的响应值

Table 4 Responses of three compounds under different concentrations of acetonitrile aqueous solution

化合物	响应值				
	60%	70%	80%	90%	100%
西地那非	0.081	0.109	0.120	0.156	0.121
硫代艾地那非	0.139	0.165	0.182	0.180	0.179
伐地那非	0.029	0.106	0.103	0.141	0.109

2.3.2 正负离子工作模式的选择

由于物质自身的极性会影响其接受或失去电子的能力,即使同一种物质在正、负离子工作模式下,信号响应也会有很大差别。本试验考察了正、负离子工作模式对西地那非、伐地那非、硫代艾地那非信号响应的的影响。结果发现,3种物质仅在正离子模式下响应明显,负离子模式下均不响应。故选择正离子工作模式对西地那非、伐地那非、硫代艾地那非进行检测。

2.3.3 仪器条件的优化

电喷雾离子迁移谱中,源电压、进样口温度、迁移管温度和迁移气体流量等检测参数对待测物的响应灵敏度有一定的影响。试验中优化了这些参数,比较了西地那非、伐地那非、硫代艾地那非混合标准溶液在不同源电压(1 600、1 700、1 800、1 900、2 000 V)、进样口温度(160、170、180、190、200 ℃)、迁移管温度(160、170、180、190、200 ℃)和迁移气体流量下的响应值(见表5~8)。结果表明,在源电压1 700 V、进样口温度190 ℃、迁移管温度170 ℃、迁

移气体流量为 0.9 L/min 时响应值最大,基线平稳,图 1 显示了在此优化的条件下,18 ms 内实现了对西地那非、伐地那非、硫代艾地那非 3 种物质的响应分离的标准图谱。

表 5 3 个目标化合物在不同源电压下的响应值

Table 5 Responses of three compounds at different source voltages

化合物	响应值				
	1 600 V	1 700 V	1 800 V	1 900 V	2 000 V
西地那非	0.166	0.224	0.184	0.213	0.194
硫代艾地那非	0.135	0.149	0.135	0.134	0.084
伐地那非	0.147	0.179	0.155	0.175	0.140

表 6 3 个目标化合物在不同进样口温度下的响应值

Table 6 Responses of three compounds at different inlet temperatures

化合物	响应值				
	160 °C	170 °C	180 °C	190 °C	200 °C
西地那非	0.212	0.202	0.207	0.277	0.285
硫代艾地那非	0.108	0.162	0.143	0.197	0.194
伐地那非	0.165	0.135	0.162	0.218	0.220

表 7 3 个目标化合物在不同迁移管温度下的响应值

Table 7 Responses of three compounds at different drift tube temperatures

化合物	响应值				
	160 °C	170 °C	180 °C	190 °C	200 °C
西地那非	0.227	0.296	0.267	0.271	0.256
硫代艾地那非	0.186	0.193	0.169	0.184	0.146
伐地那非	0.184	0.242	0.200	0.208	0.196

表 9 3 种化合物的线性方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

Table 9 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantitation of the three compounds

化合物	标准曲线	线性范围 /(mg/L)	<i>r</i>	LOD /(mg/L)	LOQ /(mg/L)
西地那非	$y = 0.0111x + 0.0402$	1.25 ~ 12.50	0.992 5	0.50	1.25
伐地那非	$y = 0.0133x + 0.0048$	2.00 ~ 20.00	0.998 5	0.80	2.00
硫代艾地那非	$y = 0.0147x + 0.0328$	1.00 ~ 10.00	0.993 4	0.40	1.00

2.5 方法的回收率和精密度

准确吸取保健酒样品 10.0 ml, 添加低、中、高 3 个浓度水平的混合标准溶液, 按 1.2.1 提取后测定回收率。每个浓度平行测定 6 份, 计算相对标准偏差 (RSD), 结果见表 10。样品中各物质的平均回收率在 93.33% ~ 121.17% 之间, RSD 范围为 2.65% ~ 10.00%, 表明本方法准确性和精密度良好。

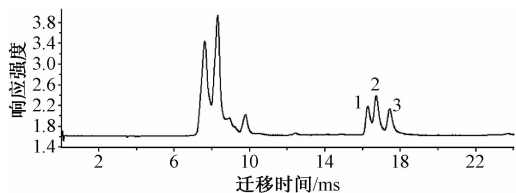
2.6 实际样品的检测

应用本研究建立的方法对市场上购买的保健酒饮料进行检测, 同时用 LC-MS/MS 方法进行确证, 在所检测的 7 份样品中, 从 1 份保健酒样中检出违禁药物西地那非, 见图 2, 其余均未检出。采用前述的 LC-MS/MS 方法进行验证, LC-MS/MS 和 ESI-IMS 检测的西地那非含量分别为 2.12 和

表 8 3 个目标化合物在不同迁移气体流量下的响应值

Table 8 Responses of three compounds at different drift gas flow rates

化合物	响应值					
	0.5 L/min	0.6 L/min	0.7 L/min	0.8 L/min	0.9 L/min	1.0 L/min
西地那非	0.257	0.253	0.252	0.263	0.268	0.237
硫代艾地那非	0.216	0.218	0.203	0.199	0.210	0.147
伐地那非	0.209	0.206	0.209	0.209	0.223	0.177



注: 1. 西地那非; 2. 硫代艾地那非; 3. 伐地那非

图 1 3 种目标物在优化条件下的色谱图

Figure 1 ESI-IMS chromatogram of three compounds under the optimal conditions

2.4 线性范围和检出限

按 1.2.2 配制系列基质混合标准溶液, 在优化的 IMS 检测条件下直接进样测定。以各待测物的浓度 C (mg/L) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 经回归处理, 得到标准曲线和相关系数。西地那非、伐地那非、硫代艾地那非分别在 1.25 ~ 12.50、2.00 ~ 20.00、1.00 ~ 10.00 mg/L 范围内线性关系良好, $r > 0.99$ 。以信噪比 (S/N) ≈ 3 时各化合物质量浓度为检出限 (LOD), 以 $S/N \approx 10$ 时各化合物的浓度为定量限 (LOQ), 结果见表 9。

表 10 空白基质中 3 种违禁化合物的加标平均回收率和精密度 ($n = 6$)

Table 10 Recoveries and relative standard deviations of three compounds spiked in blank matrix

化合物	添加水平/(mg/L)	平均回收率/%	RSD/%
西地那非	37.50	97.77	9.43
	120.00	121.17	2.65
	300.00	93.38	3.20
伐地那非	60.00	103.85	5.65
	120.00	110.53	4.54
	300.00	103.16	2.76
硫代艾地那非	30.00	102.63	10.00
	120.00	106.12	2.71
	240.00	93.33	3.31

2.55 mg/ml, 两种方法无明显差异, 说明本研究建立的方法有效、可靠。

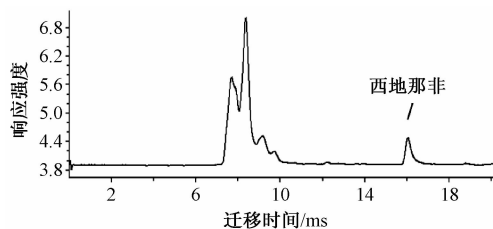


图2 保健酒样品 ESI-IMS 检测结果图

Figure 2 ESI-IMS chromatogram of the health care liquor samples

3 小结

目前市场上保健酒饮料中非法添加壮阳类违禁药物的现象严重,严重影响了消费者的健康。国内外已有文献^[8-11]报道了对壮阳类保健品中违禁药物的检测技术方法,这些常见的技术大多侧重于实验室内的检测,不适用于现场快速初筛。离子迁移谱作为新兴技术手段,具有分析速度快、适于现场快速初筛、可以同时进行定性定量分析的优点。本试验利用电喷雾离子迁移谱仪建立了同时检测壮阳类保健酒饮料中非法添加西地那非、伐地那非和硫代艾地那非等3种违禁化学药物的快速筛查方法。样品经简单的提取直接进样,采用基质匹配标准曲线法定量,通过 ESI-IMS 18 ms 左右就可以检出3种违禁添加物,方法经验证准确可靠,对于打击保健市场中的违法添加行为,加强市场监管提供了新的技术手段。

参考文献

[1] 陈亮,贾金铭,钟伟.3种磷酸二酯酶-5抑制剂不良反应比较与分析[J].中国医院用药评价与分析,2009,9(9):711-714.

- [2] 田洪顺.山东通报“百日行动”十大食品案件[N].医药经济报,2015-01-30(3).
- [3] 雷毅,黄艳婷,罗卓雅.高效液相色谱法测定壮阳类保健品中4种硫代西地那非类药物[J].理化检验,2014,50(5):530-535.
- [4] 国家食品药品监督管理总局.国家食品药品监督管理总局关于51家保健酒、配制酒企业69种产品违法添加行为的通告(2015年第45号)[Z].2015.
- [5] CAI Y, CAI T G, SHI Y, et al. Simultaneous determination of eight PDE5-IS potentially adulterated in herbal dietary supplements with TLC and HPLC-PDA-MS methods[J]. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2010, 33(13):1287-1306.
- [6] Sheshashena R T, Shiva R A, Sita D P. Quantitative determination of sildenafil citrate in herbal medicinal formulations by high-performance thin-layer chromatography[J]. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2006, 19(112):427-431.
- [7] 李瑞婷,陆建超,王弘,等.直接竞争酶联免疫吸附法用于糖浆类保健食品中西地那非检测的研究[J].食品工业科技, 2014, 35(24):84-88, 95.
- [8] 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, 25(2):451-453.
- [9] 陈吉汉,侯彩云,路勇,等.液相色谱-串联质谱法同时测定保健食品中4种违禁药物含量[J].食品安全质量检测学报, 2014, 5(7):2027-2032.
- [10] 李锦清,綦艳,酆明浩,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健品中3种违禁成分[J].现代食品科技, 2014, 30(11):246-250.
- [11] Nevado J J, Flores J R, Penalvo G C, et al. Determination of sildenafil citrate and its main metabolite by sample stacking with polarity switching using micellar electrokinetic chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 953(1):279-286.

· 请示批复 ·

食品药品监管总局办公厅关于酒曲有关问题的复函

食药监办食监一函[2016]82号

重庆市食品药品监督管理局:

你局《关于明确酒曲属性的请示》(渝食药监文[2015]50号)收悉。经商国家卫生计生委,现函复如下:依据《国家卫生计生委办公厅关于酒曲有关问题的复函》(国卫办食品函[2015]1191号),酒曲是我国酿酒行业传统糖化发酵剂、属于食品发酵用菌种。根据酒曲的制作原料、制作工艺以及在酿酒过程中的作用等,不需要在终产品标签中标示酒曲。

附件:国家卫生计生委办公厅关于酒曲有关问题的复函

食品药品监管总局办公厅

二〇一六年二月四日

(相关链接:<http://www.cqda.gov.cn/CL0018/29971.html>)