



doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2014.03.001

# 高效液相色谱-离子阱飞行时间串联质谱法快速 筛查保健食品中非法添加的磷酸二酯酶-5 抑制剂及其类似物

王美玲<sup>1</sup>, 曾乐<sup>2</sup>, 颜鸿飞<sup>1</sup>, 李拥军<sup>1</sup>, 戴华<sup>1\*</sup>

(1. 湖南出入境检验检疫局技术中心, 湖南长沙 410004; 2. 湖南师范大学 化学化工学院, 湖南长沙 410081)

**摘要:** 采用离子阱飞行时间串联质谱(LC-MS-IT-TOF)技术对保健食品中非法添加的西地那非、他达拉非和红地那非等28种磷酸二酯酶-5抑制剂(PDE-5)及其类似物进行快速筛查和确证。建立了此28种化合物的精确分子质量数和多级质谱碎片离子数据库。样品经甲醇超声提取,以C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)分离,乙腈-0.1%乙酸为流动相梯度洗脱。结果显示,28种化合物的筛查检出限为0.2~7.0 μg/L,定量下限为0.04~1.18 mg/kg(胶囊样品)和0.007~0.235 mg/L(口服液)。以定量下限浓度为加标水平的平均回收率为31.0%~114.0%,相对标准偏差(RSD)为2.5%~14.9%。利用精确质量数匹配和自建标准谱库检索,实现快速筛查;结合保留时间、同位素丰度和多级特征碎片离子对目标化合物进行确证。该方法具有简便、快速、准确、灵敏度高等优点,适用于保健食品中非法添加的磷酸二酯酶-5抑制剂(PDE-5)及其类似物的高通量筛查和定性鉴定。根据裂解规律的归纳总结,还可应用于其未知衍生物及结构类似物的分子式预测和结构推导。

**关键词:** 保健食品; 磷酸二酯酶-5抑制剂; 类似物; 筛查; 离子阱飞行时间串联质谱

**中图分类号:** O657.63; TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2014)03-0239-09

## Rapid Screening and Confirmation of Illegally Added Phosphodiesterase - 5 Inhibitors and Analogues in Health Foods by Liquid Chromatography - Ion Trap - Time of Flight Tandem Mass Spectrometry

WANG Mei-ling<sup>1</sup>, ZENG Le<sup>2</sup>, YAN Hong-fei<sup>1</sup>, LI Yong-jun<sup>1</sup>, DAI Hua<sup>1\*</sup>

(1. Inspection and Quarantine Technology Center, Hunan Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract:** A method was developed for the screening and confirmation of 28 illegally added phosphodiesterase - 5 inhibitors (PDE - 5) including sildenafil, tadalafil, vardenafil and analogues in health foods by liquid chromatography - ion trap - time of flight tandem mass spectrometry (LC - MS - IT - TOF). The accurate mass and multiple-stage mass spectrometry databases of 28 compounds were established. The analytes in samples were extracted with methanol and separated on a C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) by gradient elution using acetonitrile - 0.1% acetic acid as mobile phase. The results showed that the limits of detection (LOD, S/N ≥ 3) were in the range of 0.2 - 7.0 μg/L. The limits of quantitation (LOQ, S/N ≥ 10) were in the ranges of 0.04 - 1.18 mg/kg for capsule and 0.007 - 0.235 mg/L for oral solution, respectively. The method validation was carried out by LOQ levels, and the recoveries were in the range of 31.0% - 114.0% with relative standard deviations (RSDs) of 2.5% - 14.9%. The screening of analytes was performed by precision mass matching and library searching. The retention time, isotopic abundance and multiple-stage ion mass spectra were employed for

收稿日期: 2013-12-27; 修回日期: 2014-01-14

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD33B02)

\* 通讯作者: 戴华, 研究员, 研究方向: 食品中农兽药残留的检测, Tel: 0731-85627803, E-mail: ddaihua@yeah.net

the confirmation. This method is simple, rapid, credible and sensitive, and could be applied in the simultaneous screening and identification for illegally added PDE-5 and analogues in health foods. Moreover, the ion fragmentation patterns of these drugs could be exploited to predict the chemical formulas and structures of the unknown derivatives and structural analogs of phosphodiesterase-5 inhibitors.

**Key words:** health food; phosphodiesterase-5 inhibitor; analogue; screening; liquid chromatography-ion trap-time of flight tandem mass spectrometry (LC-MS-IT-TOF)

目前市场上壮阳、补肾、抗疲劳类保健食品中非法添加西地那非、伐地那非、他达拉非等磷酸二酯酶-5抑制剂(PDE-5)及其类似物的现象非常普遍。磷酸二酯酶-5抑制剂是一种抑制磷酸二酯酶活性的药物,被广泛用于治疗男性勃起功能障碍等疾病。非法添加的PDE-5药物除了常见的西地那非和他达拉非等药物外,还不断发现有新的结构类似物出现<sup>[1-4]</sup>。一些厂家已由原来添加PDE-5药物改为添加其同系物或其它经过简单修饰的类似物,以逃避药品监督检验。这些类似物由磷酸二酯酶-5抑制剂治疗药物分子进行化学修饰、改变部分官能团而得到,虽有疗效,但分子量和分子结构与原药物不同。对于众多的PDE-5抑制剂结构类似物,因未经国家药品监督管理部门批准,缺乏药理和毒性试验数据,服用后的不良反应难预料,对消费者身心健康危害程度更大,必须加强监管和筛查。

近年来,有关壮阳、抗疲劳等保健食品中非法添加化学药品的检测方法已有很多报道,主要有免疫学快速检测方法、薄层色谱法、毛细管电泳法、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)等<sup>[5-11]</sup>。这些方法通常只针对已知目标物的分析,在无标准品和无法在短时间内优化方法的情况下,难以实现快速检测。而PDE-5抑制剂结构改造物多为未知物,很难购得相应的对照品,给检测工作造成了很大的困难。目前还缺乏一种快速而有效的检测方法,易造成非法添加药物漏检、未检出等假阴性现象,逃脱药品监管。非法添加药物的衍生物是目前保健食品质量安全方面的严重问题。因此,建立全面、准确、快速的筛查技术成为保健食品安全中至关重要的问题。

近年发展起来的离子阱飞行时间串联质谱(LC-MS-IT-TOF)兼具离子阱和高分辨飞行时间质谱的检测能力,能够进行分子量的精确测定,同时还能提供多级质谱碎片离子信息,配合全自动筛选应用软件能实现对大量数据文件的高通量数据分析,使化合物的筛查和确证更加简便化。通过精确质量数的检索匹配及多级特征碎片离子确证,还可对未知化合物实现快速筛查与鉴定,已在食品非法添加物、农药残留筛查以及天然药物活性成分鉴别领域得到了广泛应用<sup>[12-14]</sup>。

本研究采用高效液相色谱-离子阱飞行时间串联质谱仪建立了保健食品中非法添加的PDE-5抑制剂及类似物的筛选及确证分析方法。在自建筛选化合物标准数据库的基础上,利用谱库进行精确质量数检索和多级碎片离子确证,并据此推测未知衍生物的结构。一次进样完成多种成分的筛查,为中成药和保健品中非法添加的PDE-5抑制剂及类似物的监督普查提供了快速、准确、有效的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱/离子阱-飞行时间/串联质谱仪(日本岛津公司),包括高效液相色谱系统,LC-20AD流动相输送泵,SIL-20AC自动进样器,DGU-20A3脱气装置,SPD-M20A二极管检测器。LCMS solution V 3.6工作站。BRANSON超声波清洗器。Sigma 1-15P高速离心机。

28种标准品购于加拿大TLC PharmaChem公司;甲醇、乙腈为色谱纯(德国Merck公司);其余试剂均为分析纯,实验用水为超纯水(美国Millipore超纯水仪制备)。分别称取10.0 mg上述标准品,置于10 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容配制成1.0 g/L的标准储备液,转入棕色样品瓶中,-20℃下保存。实验中用甲醇稀释上述标准储备液,配制成不同浓度的混合标准溶液,于4℃下保存。

样品制备:片剂或药丸,研细,混匀;胶囊,倾出内容物连同胶囊壳捣碎,混匀;液体样品,将样品充分混匀,作为试样。

### 1.2 样品前处理

固体试样:称取1 g试样(精确至0.001 g)置于25 mL容量瓶中,加入20 mL甲醇,超声提取20

min, 放冷至室温, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 静置片刻, 取 0.5 mL 上清液, 用甲醇-水(1:1)混合溶液稀释至 1.0 mL, 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜后, 上机供测试。

液体试样: 移取 10 mL 液体试样于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜后, 上机供测试。

### 1.3 色谱-质谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 柱(3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm); 流动相 A 为 0.1% 乙酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~8 min, 5%~20% B; 8~26 min, 20%~50% B; 26~30 min, 50%~100% B, 30~31 min, 100%~5% B, 31.1~35 min, 5% B。柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 254 nm。

离子源: ESI, 正负离子同时扫描; 扫描范围:  $m/z$  100~1 000; 加热模块温度: 200  $^{\circ}\text{C}$ ; CDL 温度: 200  $^{\circ}\text{C}$ ; 雾化气流速: 1.5 L/min; 干燥气流速: 10 L/min; 离子源电压: 正离子模式 4.5 kV, 负离子模式 -3.5 kV; 检测器电压: 1.7 kV; 质量数校准方法: 自动调谐优化电压, 外标法校准质量数。高分辨数据筛查软件为 Met ID solution。分子式预测软件为 Shimadzu Formula Predictor。

### 1.4 筛查数据库的建立

建立 28 种磷酸二酯酶-5 抑制剂及其类似物的筛查数据库, 包含药物的名称、分子式、结构式、精确分子量、离子加合物类型、保留时间及多级碎片离子等信息。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱-质谱条件的优化

本研究的化合物同时含有多个同分异构体(如伪伐地那非和那莫西地那非, 羟基伐地那非和羟基豪莫西地那非, 豪莫西地那非、伐地那非和二甲基西地那非等)。同分异构体的精确分子量相同, 定性筛查时可根据多级碎片离子的不同而加以区分。但定量分析时, 为了避免相互干扰, 必须实现有效分离。考察了甲醇-水、乙腈-水混合溶剂体系作为流动相对目标化合物的色谱行为和离子化程度的影响。结果表明, 使用乙腈-水体系作流动相时, 大部分化合物的响应值大于用甲醇-水作流动相时的响应值。实验还进一步考察了 0.1% 乙酸、0.1% 甲酸、5 mmol/L 甲酸铵、5 mmol/L 乙酸铵等挥发性试剂加入到流动相对灵敏度的影响。结果显示, 正离子模式下流动相中加入酸, 可显著提高离子化效率和灵敏度; 但 0.1% 甲酸溶液不适用于同分异构体的分离(如羟基伐地那非和羟基豪莫西地那非)。采用 5 mmol/L 乙酸铵或甲酸铵-乙腈作流动相时, 各组分的分离效果均较好, 但离子化效率下降。而加入 0.1% 乙酸时, 大部分化合物可获得较高的离子化效率和灵敏度, 这与大部分化合物含有 N 的碱性基团, 在酸性条件下有利于离子化有关。因此本实验采用 0.1% 乙酸-乙腈作为流动相进行梯度洗脱。

### 2.2 精确质量数、质量误差及多级碎片离子

28 种违禁药物的精确质量数、分子式、质量误差及多级碎片离子见表 1。除 Xanthoantrafil 外所有化合物的质量精度均不大于 5 ppm。对同分异构体即精确分子质量数相同的化合物, 经液相分离后可通过保留时间和特征碎片离子进行区分。如硫代二甲基西地那非和硫代豪莫西地那非的分子式均为 C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> ( $m/z$  = 505.205 0), 保留时间分别为 23.14 min 和 23.29 min, 两者保留时间很接近。但硫代二甲基西地那非的特征碎片离子为  $m/z$  448.147 3、393.104 2、327.127 1、299.094 6、271.098 7; 硫代豪莫西地那非的特征碎片离子为  $m/z$  477.175 6、421.139 1、393.107 3、355.158 7、327.127 1、299.096 6、271.101 3。可通过比较特征碎片离子对其进行区分。

表 1 28 种化合物的分子式、CAS 号、精确质量数、质量误差以及质谱碎片离子  
Table 1 Formula, CAS number, accurate mass data, mass error and MS fragmentation data  
of 28 target compounds

Class	Compound	Formula	CAS No.	Theory mass ( $m/z$ )	Real mass ( $m/z$ )	Mass error (ppm)	Major fragment ion( $m/z$ )	Common fragment
1	Vardenafil (伐地那非)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	224785-91-5	489.227 9	489.226 9	-2.0	461.196 1, 377.127 3, 312.161 4, 299.116 8, 284.128 4, 151.089 7	377, 312, 299, 284, 151

(续表1)

Class	Compound	Formula	CAS No.	Theory mass ( <i>m/z</i> )	Real mass ( <i>m/z</i> )	Mass error (ppm)	Major fragment ion( <i>m/z</i> )	Common fragment	
2	N-Desethyl vardenafil (N-去乙伐地那非)	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	448184-46-1	461.196 6	461.194 8	-3.9	377.125 9, 312.159 3, 299.114 1, 284.128 0, 151.086 6	377, 312, 299, 284, 151	
	Hydroxyvardeafil (羟基伐地那非)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	224785-98-2	505.222 8	505.222 0	-1.6	487.212 6, 377.127 7, 312.157 3, 299.114 3, 284.127 4, 151.085 4	377, 312, 299, 284, 151	
	Pseudovarnafil (伪伐地那非)	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	224788-34-5	460.201 3	460.200 4	-2.0	377.127 0, 329.160 5, 312.156 2, 299.113 1, 284.126 1, 151.085 4	377, 312, 299, 284, 151	
	Sildenafil (西地那非)	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	139755-83-2	475.212 2	475.212 3	0.2	377.127 7, 331.085 7, 311.150 4, 283.119 3	377, 331, 311, 283	
	Homosildenafil (豪莫西地那非)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	642928-07-2	489.227 9	489.227 4	-1.0	461.198 9, 377.128 2, 331.089 1, 311.1506, 283.117 5	377, 331, 311, 283	
	Hydroxyhomosildenafil (羟基豪莫西地那非)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	139755-85-4	505.222 8	505.222 1	-1.4	487.216 4, 377.126 2, 331.087 1, 311.151 8, 283.116 3	377, 331, 311, 283	
	Dimethyl sildenafil (二甲基西地那非)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>		489.227 9	489.228 1	0.4	432.169 1, 377.126 6, 331.086 9, 311.151 7, 283.117 1	377, 331, 311, 283	
	Norneosildenafil (那莫西地那非)	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	371959-09-0	460.201 3	460.199 6	-3.7	432.170 7, 377.129 2, 331.089 3, 311.150 0, 299.114 4, 283.116 9	377, 331, 311, 283	
	Thiosildenafil (硫代西地那非)	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	479073-79-5	491.189 4	491.188 8	-1.2	407.121 3, 341.141 3, 327.132 7, 313.111, 299.096 0, 271.101 4	327, 299, 271	
	Thiodimethylsildenafil (硫代二甲基西地那非)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	856190-47-1	505.205 0	505.205 3	0.6	448.147 3, 393.104 2, 327.127 1, 299.094 6, 271.098 7	327, 299, 271	
	Thiohomosildenafil (硫代豪莫西地那非)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	79073-80-8	505.205 0	505.207 4	4.8	477.175 6, 421.139 1, 393.107 3, 355.158 7, 327.127 1, 299.096 6, 271.101 3	393, 327, 299, 271	
	Hydroxythiohomosildenafil (羟基硫代豪莫西地那非)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	479073-82-0	521.199 9	521.200 2	0.6	503.192 7, 477.177 5, 461.201 1, 393.104 7, 354.150 3, 327.128 4, 299.100 3	393, 327, 299	
	Sildenafil analogue I	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>		535.215 6	535.216 8	2.2	517.204 4, 475.212 5, 327.129 1, 299.103 7, 283.119 2	327, 299, 283	
	3	Tadalafil (他达那非)	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	171596-29-5	390.144 8	390.143 8	-2.6	361.141 4, 268.111 4, 262.083 4, 250.084 1, 135.043 4	268, 262, 135
		Aminotadalafil (氨基他达那非)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	385769-84-6	391.140 1	391.137 8	5.9	362.134 0, 269.098 3, 262.084 7, 250.085 2, 135.044 6	269, 262, 135
Chloropretadalafil		C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	171489-59-1	427.105 5	427.108 3	6.6	395.083 1, 349.116 2, 262.085 5, 135.045 3	262, 135	
4	Acetildenafil (红地那非)	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	831217-01-7	467.276 5	467.274 8	-3.6	449.268 3, 420.225 6, 353.163 0, 339.180 7, 325.122 6, 311.127 0	353, 339, 325, 311	
	Hydroxyacetildenafil (羟基红地那非)	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	147676-56-0	483.271 4	483.271 6	0.4	465.264 5, 437.249 9, 353.161 0, 339.160 4, 325.136 8, 311.125 4	353, 339, 325, 311	
	Nor-acetildenafil (那红地那非)	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	949091-38-7	453.260 9	453.260 4	-1.1	353.160 9, 339.160 2, 325.121 3, 311.129 2, 166.098 3	353, 339, 325, 311	

(续表 1)

Class	Compound	Formula	CAS No.	Theory mass ( $m/z$ )	Real mass ( $m/z$ )	Mass error (ppm)	Major fragment ion ( $m/z$ )	Common fragment
	Carbodenafil	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		453.260 9	453.260 6	-0.7	382.185 4, 339.144 4, 311.118 6	339, 311
	Piperiacetildenafil	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	147676-50-4	438.250 0	438.249 2	-1.8	353.160 8, 325.131 8, 297.136 0	353, 325
5	Avanafil (阿伐那非)	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	330784-47-9	484.185 8	484.184 2	-3.3	375.122 8, 357.112 1, 233.101 3, 155.024 8	
	Mirodenafil (米罗那非)	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	862189-95-5	532.258 8	532.256 6	-4.1	514.245 2, 404.162 3, 362.118 0, 344.104 6, 339.194 8, 297.148 3	
	Xanthoanthrafil*	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	247568-68-9	388.151 4	388.149 3	-5.4	358.141 9, 298.059 2, 195.079 2, 165.070 6	
	Yohimbine (育亨宾)	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146-48-5	355.201 6	355.199 9	-4.8	224.126 8, 212.126 0, 144.079 9	
	Udenafil (乌地那非)	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	268203-93-6	517.259 6	517.261 1	2.9	474.222 8, 432.172 9, 418.156 5, 325.168 3, 299.109 1, 283.120 6	
	Gendenafil	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	147676-66-2	355.176 5	355.177 9	3.9	327.145 6, 285.136 7, 256.092 3, 166.096 8	

1. vardenafil analogues(伐地那非类), 2. sildenafil analogues(西地那非类), 3. tadalafil analogues(他达那非类), 4. acetildenafil analogues(红地那非类), 5. other(其他); \* ESI<sup>-</sup> for this compound, ESI<sup>+</sup> for the others

### 2.3 质谱裂解规律

西地那非的主要碎片离子为  $m/z$  377、311、283, 由于西地那非磺酰基团有两个 O, 有很强的吸电子作用, 造成 N—S 键和 C—S 键不稳定, 容易发生断裂。结合其结构可以推断西地那非的裂解机制为, 磺酰基 N—S 键首先发生断裂, 得到  $m/z$  377 的碎片。而后发生断裂的为 C—S 键, 脱去中性碎片 H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, 得到  $m/z$  为 311 的碎片。第三步裂解为苯环烷氧基脱去质量数为 28 的 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 烷基自由基碎片, 得到  $m/z$  283 的碎片。从表 1 中可观察到西地那非类似物(如豪莫西地那非、羟基豪莫西地那非和二甲基西地那非等)与西地那非具有相同的母环, 只是个别位置取代基不同。多级质谱中均出现相同特征碎片离子( $m/z$  377、311、283)。根据文献[4, 15-18]报道的西地那非的裂解途径可推导出西地那非类似物的质谱裂解规律(见图 1A)。西地那非吡唑并嘧啶环上的 O 被 S 取代, 得到硫代西地那非, 其准分子离子峰比西地那非的准分子离子峰大 16 amu, 同时其多级特征碎片离子( $m/z$  393、327、299)均比西地那非的特征碎片离子大 16 amu, 与其准分子离子峰差值相同, 说明脱去的碎片为它们结构中相同的部分, 硫代西地那非及类似物与西地那非的裂解方式相同。伐地那非与西地那非类似, 即首先发生断裂的是磺酰基 N—S 键, 得到  $m/z$  377 的碎片。然后 C—S 键断裂, 得到  $m/z$  312 的碎片。第三步裂解是苯环烷氧基脱去质量数为 28 的 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 烷基自由基碎片, 得到  $m/z$  284 的碎片<sup>[4,17-18]</sup>, 质谱裂解规律见图 1B。他达那非及类似物的共同特征碎片离子为  $m/z$  268、262、135, 质谱裂解规律见图 1C, 其中离子丰度较高的  $m/z$  268 是脱去胡椒环得到的碎片离子,  $m/z$  135 是胡椒环的碎片离子。另一特征离子  $m/z$  262 是通过 Diels - Alder 反应丢失甲基哌嗪二酮得到的碎片。同理, 根据表 1 中红地那非及类似物的共同特征碎片离子可推导出其裂解规律<sup>[4,18]</sup>(见图 1D)。

### 2.4 定性筛查及确证

实际样品检测时, 所获得的高分辨质谱数据, 由 Met ID solution 筛查软件按精确质量数进行自动快速定性筛查, 疑为阳性结果, 则根据保留时间及多级特征碎片离子进行确证。对样品中未知化合物进行定性分析时, 首先根据精确质量数, 运用分子式预测软件推测其可能的元素组成以及化学式和饱和度, 然后通过多级质谱功能, 分析其特征碎片离子, 并与西地那非及类似物( $m/z$  377、311、283)、伐地那非及类似物( $m/z$  377、312、299、284、151)、他达那非及类似物( $m/z$  268、262、135)和红地那非及类似物( $m/z$  353、339、311)等各种磷酸二酯酶-5 抑制剂裂解过程中产生的共同特征碎片离子

相比较, 推导出可能的结构式及质谱裂解途径。图 2~3 分别为阳性样品的提取离子流图和多级质谱图。从而实现了在无标准品的情况下, 对保健品中磷酸二酯酶-5 抑制剂及其类似物的筛查和确证。

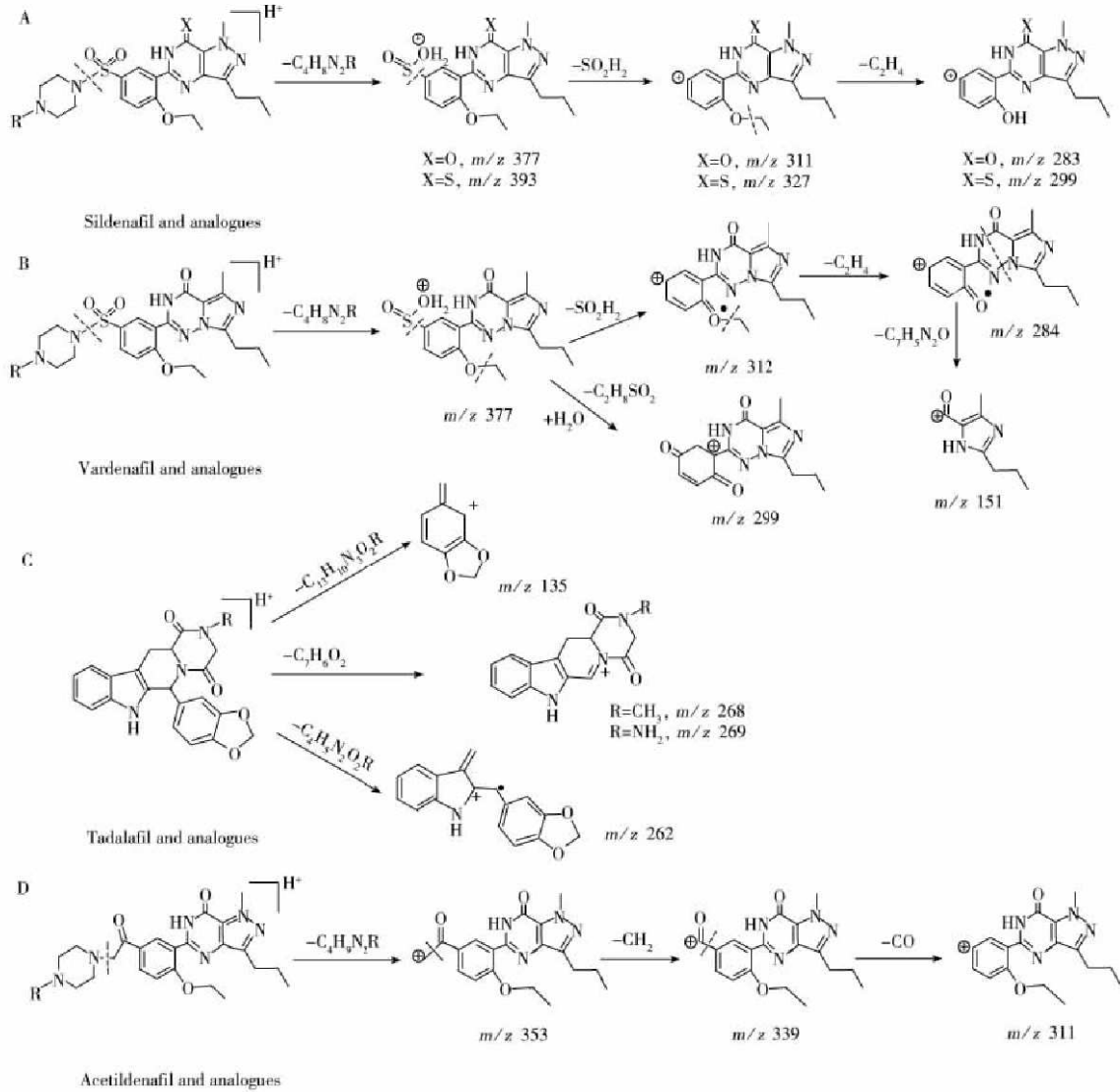


图 1 不同种类磷酸二酯酶-5 抑制剂及其类似物形成共同碎片离子的裂解途径  
Fig. 1 Summary of proposed fragmentation pathways for formation of common fragments from various PDE-5 analogues

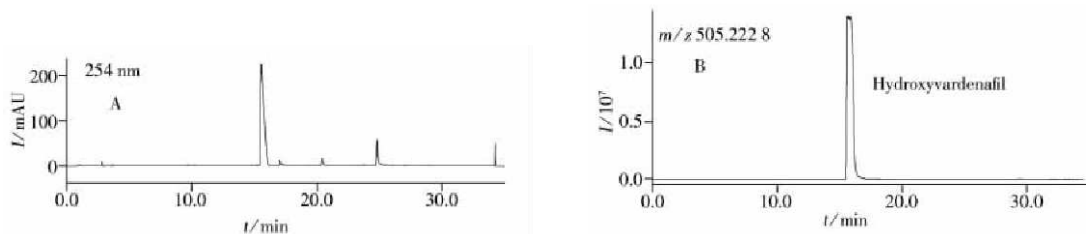


图 2 阳性样品的 HPLC/UV 色谱图(A)及提取离子流图(B)  
Fig. 2 HPLC/UV chromatogram(A) and extracted ion chromatogram(B) of a positive sample

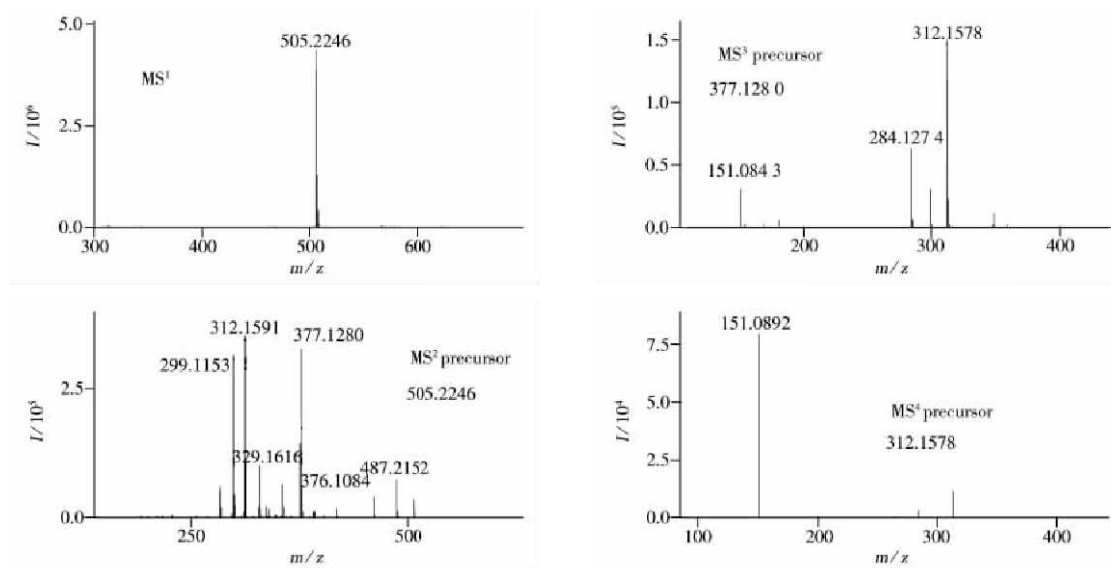


图3 羟基伐地那非的多级质谱图(正离子模式)

Fig. 3  $MS^{1-4}$  spectra of hydroxyvaridenafil(positive scan mode)

## 2.5 线性范围、检出限及定量下限

配制系列不同浓度 PDE-5 的混合标准溶液在优化条件下进行测定,以各组分的峰面积对其质量浓度绘制标准曲线,求得线性回归方程和相关系数,外标法定量。以 3 倍仪器检测信噪比( $S/N=3$ )计算各化合物的定性筛查检出限(LOD)。结果表明,28 种化合物的 LOD 为 0.2~7.0  $\mu\text{g/L}$ 。以 10 倍信噪比( $S/N\geq 10$ )对应的空白样品添加质量浓度作为方法的定量下限(LOQ),经样品添加实验确定胶囊样品中 28 种化合物的定量下限为 0.04~1.18  $\text{mg/kg}$ ;口服液中 28 种化合物的定量下限为 0.007~0.235  $\text{mg/L}$ ,实验结果见表 2。

表 2 28 种磷酸二酯酶-5 抑制剂的保留时间、线性范围、相关系数、检出限、定量下限、回收率及相对标准偏差

Table 2 Retention times, linear ranges, correlation coefficients( $r$ ), limits of detection(LOD), limits of quantitation(LOQ), average recoveries and RSDs of 28 compounds related to PDE-5 and their analogues

No.	Compound	Retention time(min)	Linear range $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$r$	LOD $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Capsule				Oral solution	
						LOQ $w/(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1})$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	LOQ $\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
1	Yohimbine	13.16	1.0~50	0.999	0.5	0.10	86.2	5.3	0.020	89.6	9.1
2	Carbodenafil	14.42	1.0~50	0.998	0.5	0.10	47.9	2.5	0.020	66.9	8.9
3	Hydroxyacetildenafil	14.93	1.0~50	0.998	3.0	0.50	31.0	3.3	0.100	75.4	9.1
4	Nor-acetildenafil	15.23	1.0~50	0.997	1.0	0.18	60.0	10.1	0.035	83.2	6.0
5	N-Desethyl vardenafil	15.64	5.0~100	0.992	3.0	0.50	33.4	11.2	0.100	70.9	8.1
6	Acetildenafil	15.68	1.0~100	0.997	2.0	0.35	81.1	10.7	0.070	81.1	12.2
7	Hydroxyvaridenafil	15.69	5.0~100	0.995	3.0	0.50	68.1	4.9	0.100	85.0	4.5
8	Vardenafil	16.09	5.0~200	0.996	2.5	0.43	89.6	6.1	0.085	80.8	3.8
9	Piperiacetildenafil	16.55	1.0~100	0.996	2.0	0.35	77.2	3.1	0.070	89.4	9.2
10	Hydroxyhomosildenafil	16.99	1.0~100	0.999	0.5	0.10	73.5	7.9	0.020	84.2	4.6
11	Sildenafil	17.14	1.0~50	0.999	1.0	0.18	77.4	3.2	0.035	86.6	7.3
12	Homosildenafil	17.52	0.5~25	0.999	1.0	0.18	73.4	9.4	0.035	63.6	6.7
13	Avanafil	17.81	1.0~50	0.993	0.5	0.10	92.7	14.1	0.020	85.5	6.4
14	Dimethyl sildenafil	17.82	1.0~100	0.996	1.0	0.18	80.8	5.0	0.035	90.1	6.6
15	Udenafil	18.46	1.0~50	0.996	1.0	0.18	82.1	11.5	0.035	77.8	12.1
16	Mirodenafil	21.35	2.0~100	0.997	2.0	0.35	114.0	8.4	0.070	74.4	5.7
17	Xanthoanthrafil	21.69	2.0~200	0.997	5.0	0.85	85.2	11.2	0.170	101.8	10.3
18	Hydroxythiohomosildenafil	22.50	2.5~100	0.995	1.0	0.18	66.3	9.8	0.035	75.0	6.7
19	Aminotadalafil	22.55	1.0~100	0.998	1.0	0.18	67.1	8.8	0.035	107.2	8.9
20	Thiosildenafil	22.79	1.0~100	0.995	1.0	0.18	107.0	10.7	0.035	97.2	8.4

(续表 2)

No.	Compound	Retention time (min)	Linear range $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$r$	LOD $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Capsule			Oral solution		
						LOQ $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	LOQ $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
21	Thiodimethyl sildenafil	23.14	1.0~100	0.997	1.0	0.18	97.2	10.2	0.035	82.1	7.9
22	Thiohomosildenafil	23.29	1.0~100	0.999	1.0	0.18	62.1	8.9	0.035	86.5	10.3
23	Sildenafil analogue I	24.26	2.5~100	0.999	2.5	0.43	87.3	9.6	0.085	80.1	9.9
24	Tadalafil	25.27	5.0~200	0.999	2.0	0.33	111.5	14.9	0.065	89.9	6.3
25	Chloropretadalafil	26.18	5.0~200	0.989	7.0	1.18	49.4	11.6	0.235	82.0	13.5
26	Gendenafil	29.89	0.5~25	0.993	0.5	0.10	86.5	12.4	0.020	85.0	11.4
27	Pseudovarnafil	30.49	0.2~10	0.998	0.2	0.04	90.5	8.5	0.007	92.3	7.1
28	Norneosildenafil	31.79	0.5~25	0.997	0.5	0.10	84.6	6.8	0.020	74.7	2.9

## 2.6 方法的回收率与相对标准偏差

选不含各类待测药物的胶囊样品和口服液样品, 进行 LOQ 浓度水平的加标回收实验, 平行测定 6 次, 计算回收率和相对标准偏差。结果表明, 方法的平均回收率为 31.0%~114.0%, 其中羟基红地那非、N-去乙基伐地那非、Chloropretadalafil 和 Carbodenafil 由于基质抑制效应较强, 回收率相对偏低(小于 50%), 而其它物质的回收率为 60%~120%, 相对标准偏差为 2.5%~14.9% (表 2)。

## 2.7 实际样品的测定

应用本方法对市售的壮阳、补肾和抗疲劳类保健食品(片剂、药丸、胶囊、口服液)共 45 份样品进行筛查。阳性样品检测结果见表 3。

表 3 实际样品测定结果  
Table 3 Detected results of real sample

Sample	Number of detections	Compound detected
Tablet(片剂), capsule(胶囊), pill(药丸), health wine(保健酒)	7	Sildenafil(西地那非): 0.84 mg/kg~780 mg/g
Tablet(片剂), capsule(胶囊), pill(药丸)	7	Tadalafil(他达那非): 13.4 mg/kg~26.1 mg/g
Oral liquid(口服液)	1	Yohimbine(育鸿宾): 0.76 mg/mL
Tablet(片剂)	1	Acetildenafil(红地那非): 3.06 mg/g; Carbodenafil: 0.21 mg/g
Capsule(胶囊)	1	Tadalafil(他达那非): 6.24 mg/g; Hydroxyacetildenafil(羟基红地那非): 65.4 mg/kg
Capsule(胶囊)	1	Vardenafil(伐地那非): 7 mg/kg; Hydroxyvardenafil(羟基伐地那非): 6.29 mg/g
Pill(药丸)	1	Sildenafil(西地那非): 570 mg/g; Homosildenafil(豪莫西地那非): 41.1 mg/kg
Capsule(胶囊)	1	Tadalafil(他达那非): 7.76 mg/g; Homosildenafil(豪莫西地那非): 10.2 mg/kg
Capsule(胶囊)	1	Vardenafil(伐地那非): 16.8 mg/g; Hydroxyvardenafil(羟基伐地那非): 0.437 mg/g
Capsule(胶囊)	1	Sildenafil(西地那非): 542 mg/g; N-Desethyl vardenafil(N-去乙基伐地那非): 1.8 mg/g; Hydroxyhomosildenafil(羟基豪莫西地那非): 48.5 mg/kg

## 3 结 论

本文建立了保健食品中磷酸二酯酶-5 抑制剂及其类似物的液相色谱-离子阱-飞行时间串联质谱筛查与确证方法。该方法操作简便快速、筛查范围广、灵敏度高、选择性好。通过谱库检索、分子式预测以及多级碎片离子质谱图鉴定, 可对已知以及未知化合物进行检测, 并根据碎片离子信息, 推断其裂解规律。在不使用标准品或对照品的情况下即可得到准确可靠的结果。适用于食品、药品中常用磷酸二酯酶-5 抑制剂及其类似物以及非法添加的磷酸二酯酶-5 抑制剂类似物的快速筛查与鉴定。

### 参考文献:

- [1] Singh S, Prasad B, Savaliya A A, Shah R P, Gohil V M, Kaur A. *Trends Anal. Chem.*, **2009**, 28(1): 13-28.
- [2] Venhuis B J, Kaste D D. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 69: 196-208.
- [3] Vaysse J, Gilard V, Balayssac S, Zedde C, Martino R, Martino M M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 59: 58-66.
- [4] Alp M, Cos M, Kun, Goker H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2013**, 72: 155-158.
- [5] Guo J B, Xu Y. *J. Food Sci. Biotechnol.* (郭杰标, 许杨. 食品与生物技术学报), **2010**, 29(3): 331-335.

- [6] Patel D N, Li L, Kee C L, Ge X, Low M Y, Koh H L. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2013**, May 6. pii: S0731-7085 (13)00191-X.
- [7] Pang X X, Lü H C, Zhang Y H, Wang J Z. *Chin. J. Hosp. Pharm.* (庞小雄, 吕华冲, 张怡红, 王建壮. 中国医院药学杂志), **2008**, 28(8): 673-674.
- [8] Li R K, Bo T, Liu H W, Li K A. *Chin. J. Chromatogr.* (李润锴, 薄涛, 刘虎威, 李克安. 色谱), **2002**, 4: 335-337.
- [9] Wang Z L, Zhang J L, Zhang Y N. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (王占良, 张建丽, 张亦农. 质谱学报), **2009**, 30(5): 278-281.
- [10] Shen Z W, Tang H B, Li Q, Duan J R. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (沈志武, 唐宏兵, 李群, 段晋仁. 理化检验: 化学分册), **2008**, 44(6): 540-542.
- [11] Huang F, Wu H Q, Huang X L, Deng X, Luo H T, Zhu Z X, Lin X S. *J. Instrum. Anal.* (黄芳, 吴惠勤, 黄晓兰, 邓欣, 罗辉泰, 朱志鑫, 林晓珊. 分析测试学报), **2013**, 32(6): 699-704.
- [12] Xu J, Duan J J, Xue C H, Feng T Y, Dong P, Sugawara T, Hirata T. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59(22): 12246-12253.
- [13] Sun B X, Guo D H, Ding Z P, Ji F, Dong J C, Yao J T. *J. Instrum. Anal.* (孙碧霞, 郭德华, 丁卓平, 冀峰, 董吉川, 姚劲挺. 分析测试学报), **2010**, 29(10): 1017-1024.
- [14] Huang L Y, Zhang X B, Chen X Z, Wang J, Cao H, Liu M F. *J. Instrum. Anal.* (黄丽英, 张晓波, 陈小珍, 王瑾, 曹慧, 刘敏芳. 分析测试学报), **2013**, 32(6): 687-692.
- [15] Dong X, Zhang W, Lü D Y, Zhao J X, Lou Z Y. *Chin. J. Pharm. Anal.* (董昕, 张薇, 吕狄亚, 赵靖霞, 姜子洋. 药物分析杂志), **2009**, 29(11): 1909-1916.
- [16] Xiang Z M, Zhang L, Zhu M, Zheng C. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* (向智敏, 张骊, 祝明, 郑成. 中国现代应用药学), **2010**, 27(2): 167-171.
- [17] Patterson R, Mabe P, Mitchell E N, Cory W. *Forensic Sci. Int.*, **2012**, 222: 83-88.
- [18] Gao Q, Zhang J, Guo H Z, Dai H, Che B Q, Wang Z B. *Chin. Pharm. J.* (高青, 张结, 郭洪祝, 戴红, 车宝泉, 王志斌. 中国药学杂志), **2008**, 43(2): 142-146.

## 科学家研发出超坚固轻质材料

德国研究人员研发出一种坚固的微结构轻质材料, 单位质量承重能力超过高强度钢。

卡尔斯鲁厄理工学院的研究人员受到骨头与蜂窝启发, 研发出这种多孔和非实心的壳体结构轻质材料, 坚固且不易破裂。据介绍, 这种材料的内部结构与木屋相似, 具有水平、垂直、对角支撑等特征, 而“横梁”的长度不足 10  $\mu\text{m}$ 。生产这种微结构材料需使用 3D 激光光刻技术。

研究人员指出, 这种轻质材料的密度小于水, 抗压强度为 280 MPa, 承重能力超过骨头、实心钢或铝。这一最新研究成果已发表在美国《国家科学院院刊》上。

微结构材料常用于绝缘设计或减震器, 而多孔材料在化工方面常用于过滤。

(信息来源: 新华网)