

基于 UPLC-Q-TOF MS 技术结合 UNIFI 软件快速 筛查中药中非法添加调节性功能化合物

廖 敏, 王影超, 陈 琪, 姜 莲, 王海宁

(贵州省食品药品检验所, 贵州 贵阳 550081)

摘要: 本研究采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF MS)技术结合 UNIFI 软件, 建立了一种快速、准确检测中药中非法添加调节性功能化合物的方法。根据中药剂型的不同选择相应的样品制备方法, 使用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱; 在电喷雾离子源正离子模式下, 使用 MS^E 模式采集数据。通过 UNIFI 软件建立靶向筛查数据库, 并参考欧盟 SANTE/11312/2021 指南设定筛查条件, 实现检测结果的自动化筛查。结果表明, 本方法能够在 12 min 内快速筛查 31 种目标化合物, 检出限为 0.25~15.00 mg/kg(或 mg/L)。在对 20 批次补肾壮阳类中药样品的检测中发现, 7 批次样品存在非法添加, 其中 4 批次样品检出标准检测方法以外的化合物。该方法具有快速、准确、覆盖范围广且可灵活扩展的优点, 可为中药中非法添加物的监管提供技术支持。

关键词: 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF MS); UNIFI 软件; 中药; 非法添加; 调节性功能化合物; 快速筛查

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)03-0370-10

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0134

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0134

Rapid Screening of Illegal Addition of Compounds Regulating Sexual Function in Traditional Chinese Medicine Based on UPLC-Q-TOF MS Technique Combined with UNIFI Software

LIAO Min, WANG Ying-chao, CHEN Qi, JIANG Lian, WANG Hai-ning

(Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang 550081, China)

Abstract: In recent years, the illegal addition of male sexual function-regulating compounds in traditional Chinese medicine (TCM) has attracted widespread attention. These illegally added compounds may have specific pharmacological and toxic side effects, which can endanger lives when taken with other related therapeutic drugs. In 2009, National Medical Products Administration of China established a standard detection method for illegal sexual function-regulating compounds in TCM. However, this method has limits of long detection time, low qualitative accuracy, and narrow detection range, making it inadequate for regulatory requirements. In this study, a method of ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS) combined with UNIFI software was developed for detecting illegally added compounds used to treat premature ejaculation (PE) and erectile dysfunction (ED) in TCM. Sample preparation

methods were selected according to different TCM formulations. Chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid solution with gradient elution at a column temperature of 30 °C. Data acquisition was conducted in MS^E mode under positive electrospray ionization with a mass scan range of *m/z* 50-1 200. A targeted screening database for illegal additives was constructed in UNIFI software based on chromatographic retention time, precise mass of parent ions and fragment ions of reference standards. Screening conditions were set according to EU SANTE/11312/2021 guidelines, and automated screening and analysis of detection results were achieved through the UNIFI software. Compared with the standard detection method, this method reduces the detection time from 160 min to 12 min, and expands the detection range from 11 ED treatment compounds to 31 compounds, including 11 new ED-treating compounds and 9 PE-treating compounds. The limits of detection are 0.25 to 15.00 mg/kg (or mg/L). In the detection of 20 batches of kidney-tonifying and yang-strengthening TCM samples, illegal additions are found in 7 batches, with 4 batches containing compounds beyond the scope of the standard detection method. This method has advantages of rapid detection, high accuracy, broad detection range, and flexible expansion capability, which can provide more robust technical support for regulatory oversight of illegal additions in TCM.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS); UNIFI software; traditional Chinese medicine; illegal addition; compounds regulating sexual function; rapid screening

中药中非法添加的化合物可能具有特定的药理及毒副作用,若消费者同时服用其他相关治疗药物,可能引起药理及毒副作用叠加,从而危及生命安全^[1]。早泄 (premature ejaculation, PE) 和勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 是男性最常见的 2 种性健康问题^[2]。部分生产经营者利用消费者对传统中药的信任,在中药中非法添加调节性功能的化合物,并以“纯中药”“无添加”等虚假宣传误导消费者。

针对中药中非法添加调节性功能化合物的问题,国家药品监督管理部门于 2009 年制定并发布了标准检测方法^[3]。但随着检测技术的进步和监管要求的日益严格,该方法存在以下局限性: 1) 检测时间长。标准检测方法需依次经理化鉴别、高效液相色谱初定性、质谱确证 3 个步骤,最快 160 min 才能得到检测结果; 2) 定性准确性低。中药基质复杂,标准检测方法使用低分辨三重四极杆质谱进行化合物确证,无法实现精确分子质量测定,影响定性准确性^[4-5]; 3) 检测范围窄。标准检测方法仅覆盖 11 种常见的治疗 ED 的 5 型磷酸二酯酶 (PDE-5) 抑制剂,部分生产者为了规避监管添加了方法中未覆盖的化合物,导致经分子结构改造的新型 PDE-5 抑制剂不断

出现。此外,标准检测方法尚未包含治疗 PE 的药物。因此,有必要开发一种高效、精准且覆盖面广的中药中非法添加调节性功能化合物的检测方法。

超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF MS) 具有灵敏度高、选择性好,且能区分同分异构体等优点^[6]。UNIFI 软件具有强大的数据分析及扩展功能^[7]。本研究采用 UPLC-Q-TOF MS 技术结合 UNIFI 软件,建立 31 种调节性功能化合物的靶向筛查方法,以期对监管中药的非法添加提供技术支持。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

ACQUITY 超高效液相色谱仪、Waters G2-Q-TOF 质谱仪、UNIFI 软件: 美国 Waters 公司产品; 电子天平: 梅特勒托利多科技(中国)有限公司产品; JM-30D-40 型液晶单频超声波清洗仪器: 深圳市洁盟清洗设备有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

西地那非 (批号 510068-202102)、豪莫西地那非 (批号 520046-202002)、那莫西地那非 (批号 520040-202102)、硫代艾地那非 (批号 520048-

202002)、红地那非(批号 520047-201802)、那红地那非(批号 520039-201902)、伐地那非(批号 510169-202001)、伪伐地那非(批号 520041-201401)、他达拉非(批号 510170-202403)、氨基他达拉非(批号 520042-202002)、盐酸普鲁卡因(批号 100424-201603)、利多卡因(批号 100342-202006)、盐酸丁卡因(批号 100456-200301)、盐酸达克罗宁(批号 100423-201102)、盐酸舍曲林(批号 100702-202103):纯度均大于96%,中国食品药品检定研究院产品;二甲基西地那非(批号 2423620S-WJ-01)、羟基硫代豪莫西地那非(批号 2423678S-WJ-01):纯度均大于98%,中国标准药物集团有限公司产品;羟基豪莫西地那非(批号 D0054025)、硫代豪莫西地那非(批号 C0055811)、*N*-去乙基伐地那非(批号 D0047394)、丙胺卡因(批号 F0058079)、苯唑卡因(批号 F0057642)、盐酸达泊西汀(批号 G0090213):纯度均大于95%,北京曼哈格生物科技有限公司产品;*N*-去甲基西地那非(批号 G23080228):纯度94%,坛墨质检标准物质中心产品;硫代西地那非(批号 ALT802829)、苯丙代卡巴地那非(批号 S119891)、阿伐那非(批号 FS1608405)、去甲基他达拉非(批号 FS1620685)、二乙氨基前他达拉非(批号 FS1634384)、二丙氨基前他达拉非(批号 S118801)、育亨宾(批号 FS1618433):纯度均大于97%,天津阿尔塔科技有限公司产品。

亮氨酸脑啡肽(leucine enkephalin, LE):上海麦克林生化科技有限公司产品;甲醇(分析纯):天津市科密欧化学试剂有限公司产品;乙腈、甲酸:均为质谱级,赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品;水为超纯水。

1.3 实验条件

1.3.1 样品制备 固体或半固体样品:取适量样品,混匀,研细,精密称定1 g(如果样品为大蜜丸,精密称定2 g剪碎的大蜜丸,然后精密加入等量硅藻土,充分混匀后研细,再精密称定2 g样品),置于具塞锥形瓶中;精密加入50 mL甲醇,称定质量,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)20 min,放冷;再称定质量,用甲醇补足失重,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

液体样品:取适量样品,混匀,精密量取1 mL样品于50 mL量瓶中,加适量甲醇,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)10 min后取出,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

油脂基质(软胶囊)样品:取适量样品(内容物),混匀,精密称定1 g样品,置于具塞锥形瓶中,然后精密加入5 mL乙酸乙酯,振摇,使其分散;再精密加入45 mL甲醇,称定质量,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)20 min,放冷;再称定质量,用甲醇补足失重,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

1.3.2 对照品溶液的制备 取适量的西地那非等31种对照品,精密称定,分别加入甲醇溶解,配制成500 mg/L单一对照品储备液。分别取适量的单一对照品储备液,加入甲醇制得500 μg/L单一对照品溶液以及500 μg/L混合对照品溶液。

1.3.3 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),柱温30 °C,流速0.3 mL/min;流动相:A为0.1%甲酸水溶液,B为乙腈;梯度洗脱:0~6.5 min(88%~45%A),6.5~8.0 min(45%~30%A),8.0~10.0 min(30%~2%A),10.0~10.1 min(2%~88%A),10.1~12.0 min(88%A);进样量1 μL。

1.3.4 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源正离子模式,分析模式sensitivity,毛细管电压2.50 kV,锥孔电压4.0 V,离子源温度120 °C,脱溶剂温度450 °C,锥孔气流速30 L/h,脱溶剂气流速800 L/h;MS^E采集模式,质量扫描范围 m/z 50~1 200,扫描时间0.5 s,低碰撞关闭,高碰撞能量范围15~30 V;样品采集时,LE以5 μL/min同步进样进行质量轴实时校正。

1.3.5 UNIFI软件建立靶向筛查数据库 从ChemSpider或PubChem官网下载西地那非等31种化合物结构的文件(.mol格式),包含分子结构、相对分子质量等基本信息,将其导入UNIFI软件,建立包含化合物结构信息的初始数据库。随后,取1.3.2节配制的500 μg/L单一对照品溶液,按1.3.3和1.3.4节实验条件分析,获取包含保留时间、一级质谱、二级质谱碎片离子信息的数据文件(.raw格式),导入初始数据库中,建立完整的靶向筛查数据库。该数据库整合了化合物的结构信息、相对分子质量、色谱保留时间以及质谱特征信息。

1.3.6 定性筛查条件的设置 质谱在正离子模式下检测,选择[M+H]⁺和[M+Na]⁺作为加合物离子,其与碎片离子的质量匹配容差设定为 5.0×10^{-6} ,并对待测化合物的所有同位素峰进行筛查分析;色谱分析中,保留时间的允许偏差设定为±0.3 min。

2 结果与讨论

2.1 31种调节性功能化合物的靶向数据筛查库

本研究采用UPLC-Q-TOF MS技术结合UNIFI软件,建立了31种调节性功能化合物的靶向筛查方法,检测的化合物包括治疗ED的22种口服PDE-5抑制剂、治疗PE的3种口服药及6种外用药物。在正离子模式下,31种调节性功能化合物的总离子流图示于图1,靶向数据库详细信息列于表1。

2.2 检出限

本研究采用直观法测定检出限。选取8种具有补肾壮阳功能的中药作为空白基质,添加不同浓度的混合标准溶液,按1.3.1节方法处理加标样品。每个浓度水平重复测定6次,将符合1.3.6节定性筛查条件的最低质量浓度确定为检出限。结果表明,31种化合物的检出限范围为0.25~15.00 mg/kg(或mg/L),列于表2。

2.3 筛查思路及样品筛查结果对比

2.3.1 UPLC-Q-TOF MS技术结合UNIFI软件筛查思路 以本文所述的实验方法构建31种化合物的靶向数据筛查库。按1.3.1节,根据待测样品的剂型采用适宜的前处理方法;按1.3.3和1.3.4节条件处理后,获得样品的色谱-质谱数据;将该数据导入预建立的靶向筛查数据库中,参考欧盟《食品和饲料中农药残留分析的方法验证和质量控制程序》^[8](SANTE/11312/2021指南)设定筛查参数(即1.3.6节)。UNIFI软件将检出峰信息与数据库中化合物信息进行多维匹配,包括保留时间、精确质量和特征碎片离子谱图等,最终得到化合物的定性筛查结果,筛查思

路示于图2。

2.3.2 样品筛查结果对比 应用本方法和标准检测方法对20批市售补肾壮阳类中药进行检测。结果表明,采用本方法检出3批次样品中含有治疗ED的化合物,与标准检测方法的结果一致,验证了本方法的准确性和可靠性。此外,本方法还在4批次样品中检出治疗PE的化合物,是标准检测方法未能覆盖的检测范围。本方法与标准检测方法的检测结果列于表3。

以样品10为例阐述本方法的筛查过程:将样品10进样后获得的色谱-质谱数据文件(.raw格式)导入UNIFI软件进行定性筛查分析。色谱分析结果表明,待测化合物的保留时间为6.40 min,数据库中他达拉非对照品的保留时间为6.39 min,二者偏差为0.01 min,在设定的保留时间容许范围(± 0.3 min)之内。质谱分析结果表明,待测化合物的准分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 390.1449,主要特征碎片离子为 m/z 169.0759和268.1080。将实测值与数据库中他达拉非的理论分子离子(m/z 390.1454 $[M+H]^+$)及特征碎片离子(m/z 169.0760、268.1081)进行比对,质量偏差分别为 1.2816×10^{-6} 、 0.5915×10^{-6} 和 0.3730×10^{-6} ,均在设定的质量容差范围(5.0×10^{-6})之内。因此,确认样品10中含有他达拉非,示于图3。

2.4 设定筛查条件

鉴于我国尚未制定针对中药中非法添加化合物的高分辨质谱筛查指南,本研究参考了欧盟《食品和饲料中农药残留分析的方法验证和质量控制程序》(SANTE/11312/2021)中关于高分辨质谱筛查结果鉴定的相关规定。根据该指南,化

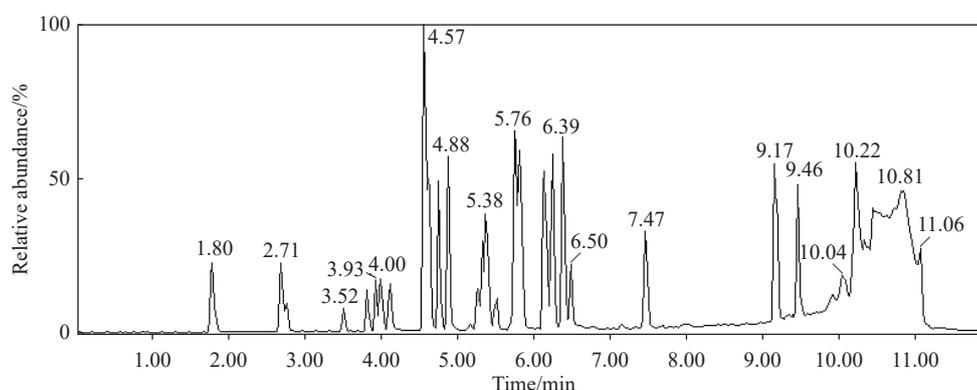


图1 31种调节性功能化合物的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of 31 compounds regulating sexual function

表 1 31 种调节性功能化合物的信息
Table 1 Information of 31 compounds regulating sexual function

序号 No.	化合物名称 Compound name	疾病类型 Disease type	CAS号 CAS number	分子式 Formula	保留时间 Retention time/ min	前体离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>)
1	西地那非	ED	139755-83-2	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	4.66	475.2127	312.1581, 284.1189
2	二甲基西地那非	ED	1416130-63-6	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	4.90	489.2284	312.1581, 284.1268
3	豪莫西地那非	ED	642928-07-2	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	4.78	489.2284	284.1268, 312.1581
4	羟基豪莫西地那非	ED	139755-85-4	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S	4.60	505.2233	284.1189, 312.1581
5	硫代西地那非	ED	479073-79-5	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₃ S ₂	6.27	491.1899	328.1352, 300.1039
6	羟基硫代豪莫西地那非	ED	479073-82-0	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S ₂	6.16	521.2004	300.1039, 328.1352
7	N-去甲基西地那非	ED	139755-82-1	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	4.61	461.1971	312.1581, 284.1268
8	硫代豪莫西地那非	ED	479073-80-8	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂	6.43	505.2055	328.1352, 300.1039
9	那莫西地那非	ED	371959-09-0	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	9.18	460.2018	311.1503, 283.1190
10	苯丙代卡巴地那非	ED	2711006-61-8	C ₂₉ H ₃₄ N ₆ O ₃	9.47	515.2770	311.1139, 353.1608
11	硫代艾地那非	ED	856190-47-1	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂	6.51	505.2055	328.1352, 113.1073
12	红地那非	ED	831217-01-7	C ₂₃ H ₃₄ N ₆ O ₃	4.13	467.2770	220.1206, 297.1346
13	那红地那非	ED	949091-38-7	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃	4.01	453.2614	297.1346, 311.1503
14	伐地那非	ED	224785-90-4	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	3.95	489.2284	312.1581, 151.0866
15	伪伐地那非	ED	224788-34-5	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	7.48	460.2018	151.0866, 312.1581
16	N-去乙基伐地那非	ED	448184-46-1	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	3.82	461.1971	312.1581, 284.1268
17	阿伐那非	ED	330784-47-9	C ₂₃ H ₂₆ ClN ₇ O ₃	4.61	484.1864	375.1218, 221.1033
18	他达拉非	ED	171596-29-5	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	6.39	390.1454	268.1081, 169.0760
19	氨基他达拉非	ED	385769-84-6	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₄	5.74	391.1406	169.0760, 269.1033
20	去甲基他达拉非	ED	171596-36-4	C ₂₁ H ₁₇ N ₃ O ₄	5.85	376.1297	169.0760, 254.0924
21	二乙氨基前他达拉非	ED	1588526-67-3	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₅	5.52	464.2185	264.1019, 334.1074
22	二丙氨基前他达拉非	ED	NA	C ₂₈ H ₃₃ N ₃ O ₅	6.19	492.2498	114.1277, 334.1074
23	盐酸普鲁卡因	外用PE	51-05-8	C ₁₃ H ₂₁ ClN ₂ O ₂	1.82	237.1603	120.0444, 100.1121
24	利多卡因	外用PE	137-58-6	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	2.73	235.1810	134.0948, 162.0902
25	丙胺卡因	外用PE	721-50-6	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O	2.80	221.1654	136.0757
26	盐酸丁卡因	外用PE	136-47-0	C ₁₅ H ₂₅ ClN ₂ O ₂	4.63	265.1916	176.1070, 120.0444
27	苯唑卡因	外用PE	94-09-7	C ₉ H ₁₁ NO ₂	5.28	166.0868	138.0550, 120.0444
28	盐酸达克罗宁	外用PE	536-43-6	C ₁₈ H ₂₈ ClNO ₂	5.42	290.2120	114.0913
29	育亨宾	口服PE	65-19-0	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₃	3.52	355.2021	144.0808, 212.1281
30	盐酸达泊西汀	口服PE	129938-20-1	C ₂₁ H ₂₄ ClNO	5.79	306.1858	157.0648, 183.0804
31	盐酸舍曲林	口服PE	79559-97-0	C ₁₇ H ₁₈ Cl ₃ N	5.86	306.0816	129.0699, 275.0389

化合物的确证需同时满足以下 3 个条件: 1) 样品至少检测出 2 个特征离子, 其中必须包含 1 个碎片离子, 且离子匹配容差不大于 5×10^{-6} ; 2) 信噪比 (*S/N*) ≥ 3 ; 3) 绝对保留时间偏差不超过 0.1 min。

离子匹配容差, 即质量准确度, 一般情况用相对误差表示, 离子匹配容差 = $(M_{\text{理论}} - M_{\text{测量}}) / M_{\text{测量}}$ 。该参数与待测化合物的分子质量密切相关, 即分子质量较大的化合物通常可获得较高的质量准

表2 31种调节性功能化合物的检出限
Table 2 Limit of detections of 31 compounds regulating sexual function

化合物名称 Component name	片剂 Tablet/ (mg/kg)	胶囊剂 Capsule/ (mg/kg)	丸剂 Pill/ (mg/kg)	粉剂 Powder/ (mg/kg)	酒剂 Medicated liquor/ (mg/L)	口服液 Oral solution/ (mg/L)	软胶囊 Soft capsule/ (mg/kg)	软膏 Ointment/ (mg/kg)
盐酸普鲁卡因	0.25	1.25	0.50	0.25	0.25	0.50	0.25	0.25
利多卡因	0.25	5.00	0.25	0.50	0.50	0.50	1.25	5.00
丙胺卡因	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.50	0.25
育亨宾	0.25	0.25	0.50	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
N-去乙伐地那非	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50	1.25	0.50	0.25
伐地那非	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.50	0.25	0.25
那红地那非	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
红地那非	0.25	0.50	0.25	0.25	0.50	0.25	0.25	0.25
羟基豪莫西地那非	0.50	0.50	1.25	0.50	0.25	1.25	0.25	0.25
N-去甲基西地那非	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50	1.25	0.50	0.25
阿伐那非	0.25	0.25	0.25	0.25	1.25	0.25	0.25	0.25
盐酸丁卡因	0.50	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50	1.25	0.50
西地那非	0.25	1.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.50	0.50
豪莫西地那非	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.50	0.50	0.25
二甲基西地那非	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	15.00
苯唑卡因	0.25	0.50	0.50	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50
盐酸达克罗宁	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	15.00
二乙氨基前他达拉非	0.25	0.25	0.25	0.50	0.25	0.50	0.25	0.25
氨基他达拉非	0.50	0.50	15.00	5.00	5.00	1.25	15.00	5.00
达泊西汀盐酸盐	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.50	0.25	15.00
去甲基他达拉非	15.00	1.25	5.00	0.50	1.25	1.25	5.00	1.25
盐酸舍曲林	5.00	5.00	15.00	15.00	5.00	15.00	15.00	15.00
羟基硫代豪莫西地那非	0.50	15.00	0.50	15.00	15.00	5.00	5.00	15.00
二丙氨基前他达拉非	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	15.00
硫代西地那非	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	5.00	15.00	15.00
他达拉非	0.50	1.25	0.50	15.00	0.50	1.25	1.25	0.50
硫代豪莫西地那非	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	0.50	15.00	0.50
硫代艾地那非	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	5.00	15.00	15.00
伪伐地那非	15.00	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	15.00
那莫西地那非	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
苯丙代卡巴地那非	0.50	0.50	0.50	0.25	0.50	0.25	0.25	0.25

确度,而分子质量较小的化合物在相同波动条件下会产生较大误差。因此, SANTE/11312/2021规定,当 m/z 值小于 200 时,应采用绝对误差表示离子匹配容差,且其值应小于 1 mu。

基质效应指样品中除目标分析物外其他成分对待测物测定值的影响^[9-10]。基质效应不仅影

响测量准确度,还使色谱峰保留行为发生改变,引起保留时间漂移,导致待测样品与靶向数据库中的保留时间形成偏差。因此,本方法将绝对保留时间允许漂移的范围设定为 0.3 min^[11]。

2.5 构建非法添加化合物动态筛查体系

本研究借助 UNIFI 软件与 ChemSpider 在线

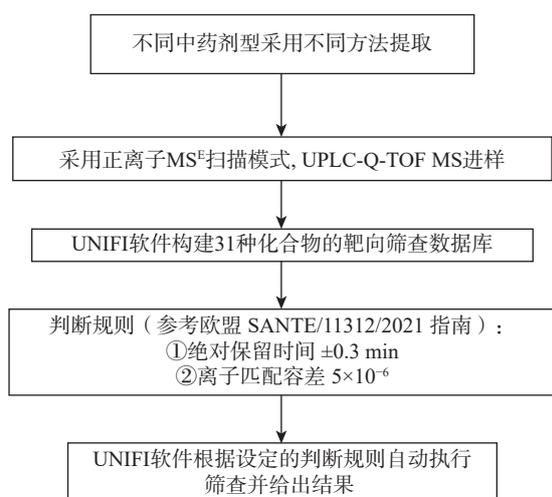


图2 UPLC-Q-TOF MS 技术结合 UNIFI 软件的
筛查思路

Fig. 2 Screening strategy of UPLC-Q-TOF MS
combined with UNIFI software

数据库^[12](该数据库整合了超过 500 个数据源, 约 6 700 万种化合物信息)对接优势, 当发现疑

似化合物时, 可借助在线数据库对其进行初步筛查, 再结合对照品进一步验证, 最终构建具有动态更新能力的非法添加化合物筛查体系, 及时发现标准检测方法以外的非法添加化合物。

2.6 根据构效关系及裂解规律辅助新型化合物的识别

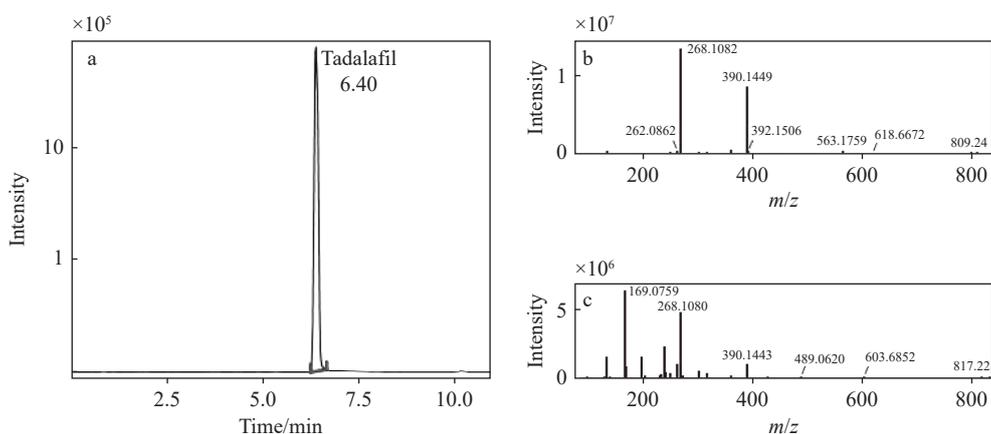
根据构效关系可将药物分为非特异性结构药物和特异性结构药物^[13]。治疗 ED 的 PDE-5 抑制剂是特异性结构药物, 可通过对基本母核的修饰产生大量新型化合物, 这一特性被不法生产者利用, 导致市场上出现大量未经批准的新型 PDE-5 抑制剂^[14-15], 其中以西地那非母核结构改造的新型化合物尤为普遍。因此, 深入研究西地那非母核结构特征及其可修饰位点、掌握其质谱裂解规律, 对于鉴定新型化合物具有重要意义。在本研究检测的 31 种调节性功能化合物中, 有 9 种是以西地那非母核为基础衍生的化合物, 示于图 4。

西地那非的基本母核结构为吡唑并嘧啶酮,

表3 20 批样品检测结果

Table 3 Detection results of 20 batches of sample

序号 No.	样品名称 Sample name	本方法 Research method	标准检测方法 Standard detection method
1	肾宝片	未检出	未检出
2	金刚片	未检出	未检出
3	补肾强身胶囊	未检出	未检出
4	三宝胶囊	未检出	未检出
5	补肾壮阳药	西地那非	西地那非
6	金匮肾气丸	未检出	未检出
7	海狗丸	未检出	未检出
8	龟鹿补肾丸	未检出	未检出
9	苗王肾宝粉	西地那非	西地那非
10	大力丸	他达拉非	他达拉非
11	补肾药粉	未检出	未检出
12	益肾壮阳膏	未检出	未检出
13	印甲神露外用延时喷剂	丁卡因	—
14	99神油外用喷剂	利多卡因、丁卡因	—
15	神久油喷雾剂	丁卡因	—
16	龙勃神油延时喷剂	未检出	未检出
17	仓井男士外用喷剂	利多卡因、丁卡因	—
18	补肾药酒	未检出	未检出
19	肾宝口服液	未检出	未检出
20	六味地黄软胶囊	未检出	未检出



注: a. 色谱筛查结果; b. 一级质谱图; c. 二级质谱图

图3 样品10的筛查结果

Fig. 3 Screening result of sample 10

该化合物的构效关系表明: 1位N原子上的甲基取代基对PDE-5的选择性起关键作用; 3位正丙基与受体形成疏水性作用, 是维持药物活性和选择性的必需基团; 5位苯环取代基对活性至关重要, 其空间构象与cGMP磷酸结合位点相对应; 2'位乙氧基是保持活性的关键官能团; 5'位引入极性基团可提高化合物的水溶性, 从而改善其口服生物利用度^[14]。

西地那非类新型化合物需在保证药效(基本母核)的基础上进行修饰与改良, 即上述1、3、

5和2'位与活性相关的基团不变, 多通过改变5'位基团或将6位酰基转变成磺酰基得到。在质谱裂解中, 容易发生2种断裂: 一种是5'位取代基的单独断裂; 另一种是5'位取代基与2'位乙氧基的同时断裂。当发生5'位取代基断裂时, 可观察到 m/z 311或327特征离子峰; 当5'位取代基和2'位乙氧基同时断裂时, 则可观察到 m/z 283或299特征离子峰, 示于图5。此裂解规律对于西地那非类新型化合物的识别具有一定的参考价值。

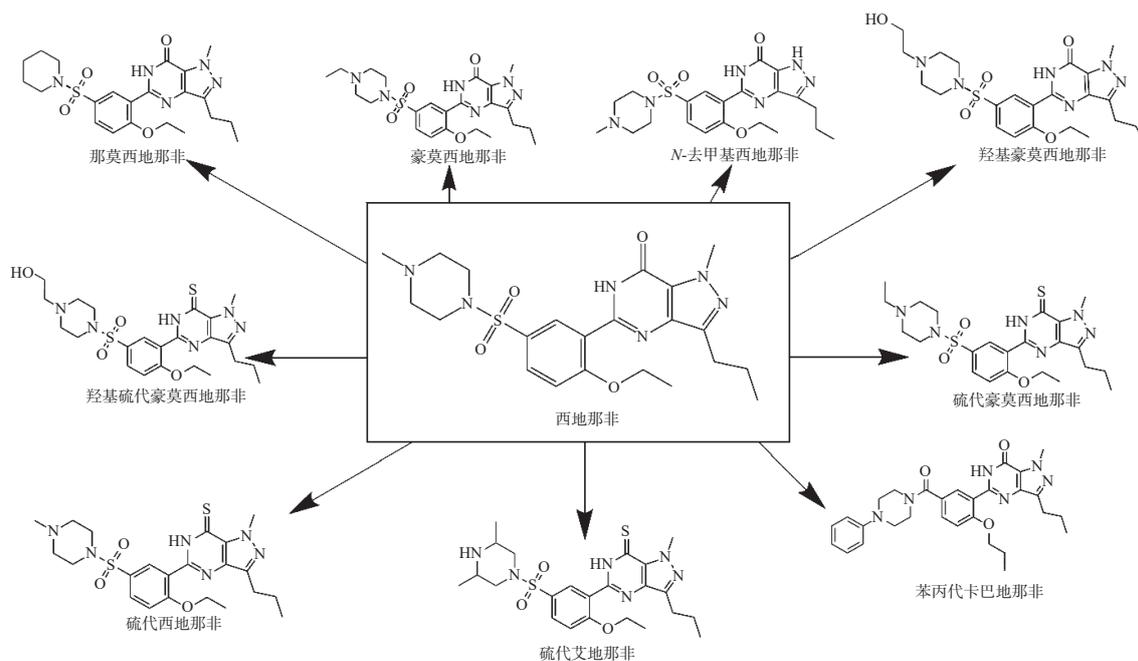
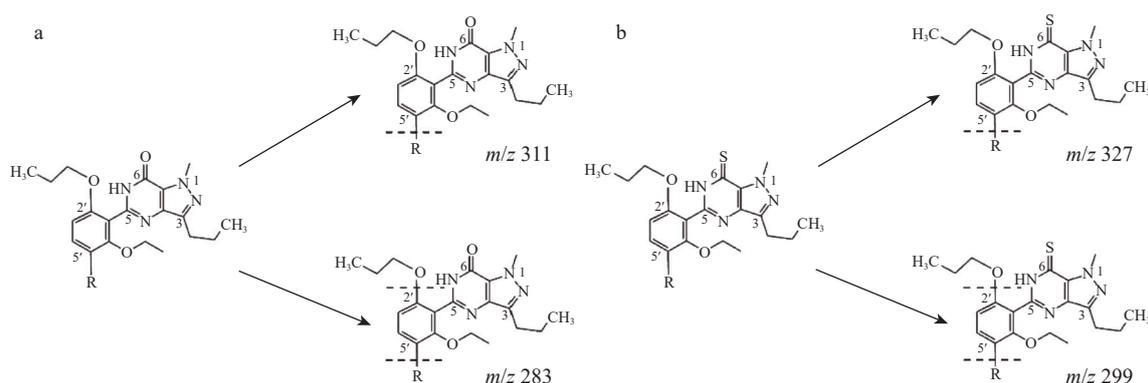


图4 西地那非类衍生物结构

Fig. 4 Structures of sildenafil analogues



注: a.西地那非; b.硫代西地那非

图5 西地那非类裂解途径

Fig. 5 Fragmentation pathways of sildenafil analogues

3 结论

本研究综合男性性功能疾病特点、相关治疗药物药理特性及中药中非法添加调节性功能化合物的趋势,通过UPLC-Q-TOF MS技术结合UNIFI软件,建立了12 min快速筛查31种调节性功能化合物的靶向筛查方法。本方法具有快速、准确、覆盖范围广且可灵活扩展的优点,可为中药中非法添加物的监管提供有力的技术支持。

参考文献:

- [1] 胡青, 孙健, 季申. 中药和食品中非法添加化学药品新趋势及监管对策[J]. 中国食品药品监管, 2022(3): 88-95. HU Qing, SUN Jian, JI Shen. Illegally added chemicals in traditional Chinese medicines and foods: new trends and regulatory countermeasures[J]. China Food & Drug Administration Magazine, 2022(3): 88-95(in Chinese).
- [2] 符庭波, 田官强, 程量, 张喜荣, 梁培禾. 浅析与男性性功能障碍相关的疾病及诊疗[J]. 保健医学研究与实践, 2018, 15(3): 93-96. FU Tingbo, TIAN Guanqiang, CHENG Liang, ZHANG Xirong, LIANG Peihe. Analysis of diseases related to male sexual dysfunction and their diagnosis and treatment[J]. Health Medicine Research and Practice, 2018, 15(3): 93-96(in Chinese).
- [3] 2009030 补肾壮阳类中成药[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2009.
- [4] 周建良, 周哲, 陈碧莲, 马临科. UHPLC/LTQ Orbitrap MS法解析一种未知西地那非衍生物[J]. 质谱学报, 2016, 37(5): 422-430. ZHOU Jianliang, ZHOU Zhe, CHEN Bilian, MA Linke.

Identification of an unknown derivative of sildenafil by UHPLC/LTQ Orbitrap MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2016, 37(5): 422-430(in Chinese).

- [5] 洪云鹤, 刘艳, 崔风云, 许秀丽, 方恩华, 张经华, 张峰, 张宝善. 头孢噻呋及去吠喃甲酰基头孢噻呋的四极杆轨道阱串联质谱分析及其在肉鸡体内的残留规律研究[J]. 质谱学报, 2017, 38(5): 526-533. HONG Yunhe, LIU Yan, CUI Fengyun, XU Xiuli, FANG Enhua, ZHANG Jinghua, ZHANG Feng, ZHANG Baoshan. Determination of ceftiofur & des-furoyl ceftiofur residue and the elimination analysis in chicken using liquid chromatography quadrupole-Orbitrap hybrid mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2017, 38(5): 526-533(in Chinese).
- [6] 姚倩, 陈赟, 商娟, 袁晓昀, 陈影, 顾潇, 居文政, 邹建东, 卢苏, 许美娟. 基于HPLC-Q-TOF/MS和网络药理学的清心滋肾方防治绝经综合征潜在药效物质基础和作用机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(5): 481-497. YAO Qian, CHEN Yun, SHANG Juan, XI Xiaoyun, CHEN Ying, GU Xiao, JU Wenzheng, ZOU Jiandong, LU Su, XU Meijuan. Investigation of potential pharmacodynamic substances and mechanism of Qingxin-zishen prescription decoction in treatment of menopause syndrome based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2022, 27(5): 481-497(in Chinese).
- [7] 车爽. UPLC-Q-TOF-MS联合UNIFI技术在中药分析领域的应用进展[J]. 天津药学, 2022, 34(3): 67-74. CHE Shuang. Application progress of UPLC-Q-TOF-MS combined with UNIFI technology in the field of tradi-

- tional Chinese medicine analysis [J]. Tianjin Pharmacy, 2022, 34(3): 67-74(in Chinese).
- [8] SANTE/11312/2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed[S]. Directorate-General for Health and Food Safety, European Union, 2021.
- [9] Evaluation of Commutability of Processed Samples. 4th ed. CLSI guideline EP14[S]. Wayne: PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.
- [10] 刘路, 顾丽群, 吴瑞, 姚赛, 申流柱. 液相色谱串联质谱分析蔬菜中 10 种农药残留的基质效应[J]. 现代农业科技, 2023(17): 113-115.
LIU Lu, GU Liqun, WU Rui, YAO Sai, SHEN Liuzhu. Matrix effects of 10 pesticide residues in vegetables by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2023(17): 113-115(in Chinese).
- [11] 章璐幸, 黄朝辉, 罗淑青, 曹琳, 谢莹, 钱江. 应用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法建立谷物中 18 种真菌毒素非靶向筛查数据库及确证方法[J]. 色谱, 2023, 41(1): 66-75.
ZHANG Luxing, HUANG Zhaohui, LUO Shuqing, CAO Lin, XIE Ying, QIAN Jiang. Establishment of non-targeted screening database and confirmation method for 18 mycotoxins in grains using ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(1): 66-75(in Chinese).
- [12] 陈秀娟, 吴鸣. 学科领域科研数据知识库调研与分析——以化学领域为例[J]. 图书情报工作, 2015, 59(9): 111-118, 147.
CHEN Xiujuan, WU Ming. Investigation and research on the disciplinary research data repositories: taking the example of chemistry disciplinary[J]. Library and Information Service, 2015, 59(9): 111-118, 147(in Chinese).
- [13] 杨炳川, 鱼江. 药物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2017.
- [14] 李可, 郭常川, 石峰, 曾苏, 姜玮. 补肾壮阳类中药和保健品中添加 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 Ke, GUO Changchuan, SHI Feng, ZENG Su, JIANG Wei. 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 (in Chinese).
- [15] 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]. 太原: 山西中医药大学, 2020.
(收稿日期: 2024-08-05; 修回日期: 2024-12-07)