

高效液相色谱同时检测补肾壮阳类保健品及中成药中非法添加的14种化学药物

李榕¹, 朱斌¹, 耿昭^{2*}, 张文波^{1*}, 刘隆兴¹

(1. 巴中市产品质量检验检测中心, 四川巴中 636000) (2. 四川省药品检验研究院(四川省医疗器械检测中心), 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 四川成都 611731)

摘要: 应用高效液相色谱-光电二极管阵列检测法(HPLC-PDA), 建立了检测补肾壮阳类保健品和中成药中非法添加的14种化学药物的方法, 涵盖补充检验方法中的11种5-型磷酸二酯酶抑制剂和典型的3种5-羟色胺再摄取抑制。样品经乙腈超声提取后, 采用Agilent 5 HC-C18(2)色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-甲醇-乙酸铵溶液(pH值分别为5.0和7.0)为流动相, 进行梯度洗脱, 流速1.0 mL/min, 柱温30 ℃, 进样量10 μL, PDA检测器在190~400 nm范围内扫描, 254、238 nm监测, 外标法定量。检测的阳性样品以UPLC-MS/MS进行确证, ESI源, 正离子模式, MRM扫描。结果表明, 14种化学药物均能够完全分离, 在考察的质量浓度范围内线性关系良好($r>0.9999$), 低、中、高3个目标物浓度的平均回收率($n=9$)为99.9%~101.0%, 相对标准偏差均小于2%, 检测限为0.016~0.201 μg/mL。91批样品中共检出阳性样品7批, 非法添加药物3种。通过UPLC-MS/MS均能够得到确证。该方法操作简便、专属性强、结果准确、灵敏度高, 适用于日常监管检验。

关键词: 高效液相色谱; 5-型磷酸二酯酶抑制剂; 5-羟色胺再摄取抑制; 非法添加; 补肾壮阳

文章编号: 1673-9078(2025)01-320-330

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1554

Simultaneous Measurement of 14 Unauthorized Chemical Drugs in Sexual Enhancement Products and Chinese Patent Medicines using High Performance Liquid Chromatography

LI Rong¹, ZHU Bin¹, GENG Zhao^{2*}, ZHANG Wenbo^{1*}, LIU Longxing¹

(1. Bazhong Product Inspection and Testing Center, Bazhong 636000, China)

(2. Sichuan Institute for Drug Control (Sichuan Testing Center of Medical Devices), NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation for Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611731, China)

引文格式:

李榕,朱斌,耿昭,等.紫高效液相色谱同时检测补肾壮阳类保健品及中成药中非法添加的14种化学药物[J].现代食品科技,2025,41(1):320-330.

LI Rong, ZHU Bin, GENG Zhao, et al. Simultaneous measurement of 14 unauthorized chemical drugs in sexual enhancement products and chinese patent medicines using high performance liquid chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 320-330.

收稿日期: 2023-12-26

基金项目: 四川省药品监督管理局药品科技项目(2023005)

作者简介: 李榕(1989-), 女, 硕士研究生, 工程师, 研究方向: 食品与药品检验检测, E-mail: lirong6082@163.com

通讯作者: 耿昭(1986-), 男, 博士, 副主任中药师, 研究方向: 中药民族药安全检测与质量评价研究, E-mail: gengzhao713@hotmail.com;

共同通讯作者: 张文波(1985-), 男, 工程师, 研究方向: 食品与药品检验检测, E-mail: zhangwb19@163.com

Abstract: A high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) method was established for detecting 14 chemical drugs illegally added to health products and Chinese patent medicines for sexual enhancement. The detected compounds comprised 11 phosphodiesterase inhibitors that met the supplementary test criteria, as well as three typical serotonin reuptake inhibitors. The samples were extracted with acetonitrile and then separated using an Agilent 5 HC-C18(2) chromatographic column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) through gradient elution with a mobile phase consisting of acetonitrile, methanol, ammonium, and acetate. The mobile phase pH was 5.0 and 7.0, flow velocity was 1.0 mL/min, column temperature was 30 °C, sample size was 10 μL, PDA detector scanning range was 190–400 nm, monitoring was conducted at 254 and 238 nm, and the compounds were quantified using an external standard. The separation of 14 chemical drugs was adequate, the linear relationship was good within a certain concentration range, and the correlation coefficient r was >0.9999 . The average recoveries ($n = 9$) of low, medium, and high concentrations were 99.9%–101.0% with RSD $<2\%$, and the detection limit was 0.016–0.201 μg/mL. A total of seven positive samples were detected in 91 batches of marketed products; the addition of three compounds was illegal. The method is simple, accurate, specific, and sensitive; therefore, it is suitable for daily supervision and inspection.

Key words: high performance liquid chromatography; PDE5; SSRIs; illegal addition; sexual enhancement

近年来,随着生活节奏的加快和生活压力的逐渐增大,越来越多人面临性功能减退、易疲劳的困扰,因此,改善阳虚、缓解疲劳类保健食品及中成药的市场需求日益增长^[1]。然而,一些不良商家为了增加销量,利用某些化学药物功能性强、见效快的特点,将其违法添加至保健品和中成药中以提高疗效,谋取非法暴利^[2,3]。消费者在不知情的情况下长期服用此类产品,可能引发如头痛、消化不良、视力障碍、突发性耳聋等多种不良反应,尤其对合并心血管系统疾病和糖尿病的患者存在严重健康隐患^[4-6]。

为规范行业秩序,打击此类非法添加行为,近年来国家食品药品监督管理局连续颁布了多个补充检验方法和检验项目批准件,涉及非法添加补肾壮阳类化学药物的5个国家标准中所收录的化学药物均为5-型磷酸二酯酶抑制剂(PDE5)及其衍生物^[7-11]。但值得注意的是,临床上常用于补肾壮阳的药物并不限于PDE5,例如盐酸达泊西汀、盐酸舍曲林、盐酸氟西汀三种5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)可使突触间隙5-羟色胺含量增加,提高射精阈值、延缓射精,也是临床上常用的补肾壮阳、提高性功能的药物^[12-14]。然而,针对补肾壮阳功能的产品,现行的国家标准中均未涉及SSRIs,文献也鲜有报道。同时,不法分子的造假行为也越来越隐蔽,通过添加检测标准涵盖范围以外的具有相同功效的药物以躲避监管,此类现象国内外均有报道^[15-17]。因此,鉴于现有检测标准中筛查的药物种类尚不全面,有必要根据药物的功效和市场监测

的反馈情况,扩充补肾壮阳功能的化学物的筛查范围,开发出同时检测多种化学物的高通量检测方法,实现最大范围的应检尽检。

目前,高效液相色谱法^[18,19]和高效液相色谱-串联质谱法等^[20]常用于非法添加药物的检测。液相色谱-串联质谱法虽灵敏度高、分辨率好,但存在较强的基质效应,并且离子源易污染,因此对前处理要求高,通常需要单独的样品净化过程^[21]。此外,其操作复杂,仪器价格昂贵,检测和维护成本大,难实现基层推广^[22]。谭丽容等^[23]建立了超高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定改善阳虚的20种非法添加药物的分析方法。该方法虽仪器分析时间短,但基质效应明显,样品前处理复杂、耗时,并且所检测物质不涉及SSRIs。黄芳等^[17]利用四极杆静电场轨道阱质谱检测了112种抗疲劳类非法添加药物,但所检测物质也仅涉及一种SSRIs,并且同样存在基质干扰大,操作繁琐的问题。此外,大部分化学药的线性范围仅为1~50 μg/L,对于高浓度的检出值需要多次稀释,易引入不确定度因子。高效液相色谱-光电二极管阵列检测法(HPLC-PDA)通过峰保留时间和紫外特征光谱图,可同时对多组分进行定性、定量分析。该方法具有分离效能好、定量准确、普适性强,且操作简便、维护成本低,易于在基层检验机构推广^[24-26]。雷毅等^[27]、程燕等^[28]、林芳等^[29]均采用高效液相色谱建立了检测多种补肾壮阳化学药物的方法。通过色谱条件的优化获得了比补充检验方法2009030所提出的更短的分析时间和更好的分离效果,但雷毅

等^[27]的方法仍使用较为复杂的流动相体系,而程燕等^[28]和林芳等^[29]的方法线性范围较窄。更重要的是,三种方法也均未涉及 SSRIs。由此,尚未有研究较全面的覆盖 PDE5 和 SSRIs 这两类典型的补肾壮阳类化学药物。

综上,为了完善非法添加补肾壮阳药物的检测种类,并且创建一个简便准确的 HPLC 方法,本研究以补充检验方法 2009030 中的 11 种 PDE5 (那红地那非、红地那非、硫代艾地那非、西地那非、豪莫西地那非、那莫西地那非、氨基他达拉非、枸橼酸羟基豪莫西地那非、伐地那非、伪伐地那非)和 3 种典型的 SSRIs (盐酸达泊西汀、盐酸舍曲林、盐酸氟西汀)为研究对象,建立了 HPLC-PDA 的定性定量分析方法。该方法可为政府监管以及检测机构提供技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

标准物质:那红地那非(纯度:96.5%)、红地那非(纯度:100.0%)、硫代艾地那非(纯度:99.3%)、西地那非(纯度:100%)、豪莫西地那非(纯度:99.7%)、那莫西地那非(纯度:99.4%)、氨基他达拉非(纯度:99.5%)、他达拉非(纯度:99.8%)、枸橼酸羟基豪莫西地那非(纯度:98.8%)、盐酸氟西汀(纯度:99.8%)、伐地那非(纯度:99.7%)、盐酸舍曲林(纯度:99.9%)、伪伐地那非(纯度:100%),购自中国食品药品检定研究院;盐酸达泊西汀(纯度:99.02%),购自 Hong Kong Institute of Standard Substance。

试剂:乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯),Sigma 公司;乙酸铵(色谱纯),西亚化学工业有限公司;三乙胺(色谱纯)、冰醋酸(色谱纯),科密欧化学试剂有限公司;实验室用水为超纯水。

实验样品:检测样品中的保健品为保健食品风险监测工作中,稽查到的声称具有抗疲劳或补肾壮阳功能的可疑产品,共 81 批,中成药为市购产品,共 10 批。样品类型涉及胶囊剂、丸剂、片剂、口服液、保健酒。

1.2 仪器与设备

Shimadzu LC-2050C 3D 高效液相色谱仪(配有 PDA 检测器),日本岛津公司;Agilent 1290 超高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Agilent 6420A

串联三重四级杆质谱仪,美国安捷伦公司;Mettler Toledo XSE205 电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司;JP-060S 超声仪,深圳市洁盟清洗设备有限公司;Eppendorf 5430R 高速冷冻离心机,德国艾本德公司;SevenMultiPH 测量仪,瑞士梅特勒-托利多公司;ULPHW-IV 型超纯水仪,四川优普超纯水科技有限公司。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件

色谱条件 I 用于那红地那非、红地那非、西地那非、豪莫西地那非、盐酸达泊西汀、硫代艾地那非、那莫西地那非的筛查。色谱柱:Agilent HC-C18 (2) 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈,流动相 B 为甲醇,流动相 C 为 10 mmol/L 乙酸铵溶液(含有体积分数 0.1% 三乙胺,用冰醋酸调 pH 值至 5.0),流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,柱温 30 °C,进样体积 10 μL,梯度洗脱程序见表 1。

色谱条件 II 用于氨基他达拉非、他达拉非、枸橼酸羟基豪莫西地那非、盐酸氟西汀、伐地那非、盐酸舍曲林、伪伐地那非的筛查。色谱柱:Agilent HC-C18 (2) 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈,流动相 B 为甲醇,流动相 C 为 10 mmol/L 乙酸铵溶液(含有体积分数 0.1% 三乙胺,用冰醋酸调 pH 值至 7.0),流速 1.0 mL/min,检测波长 238 nm,柱温 30 °C,进样体积 10 μL,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase gradient elution procedures

时间/min	A/%	B/%	C/%
0	10	5	90
8	30	5	70
16	37	5	63
23	37	5	63
23.1	41	5	59
28	41	5	59
50	60	5	40
65	60	5	40

1.3.2 标准溶液配制

用乙腈制备那红地那非、红地那非、西地那非、豪莫西地那非、盐酸达泊西汀、硫代艾地那非、那莫西地那非混合对照品储备液 I,各化合物的质量浓度为 400 μg/mL。从混合对照品储备液 I 中分别取 0.125、0.25、0.5、1、2、5、10 mL,用

乙腈稀释至 10 mL, 得到系列混合标准溶液 I: s1、s2、s3、s4、s5、s6、s7。用乙腈制备氨基他达拉非、他达拉非、枸橼酸羟基豪莫西地那非、盐酸氟西汀、伐地那非、盐酸舍曲林、伪伐地那非混合储备液 II, 各化合物的质量浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 。从混合对照品储备液 II 中分别取 0.1、0.2、0.4、1、2、5、10 mL, 用乙腈稀释至 10 mL, 得到系列混合标准溶液 II: q1、q2、q3、q4、q5、q6、q7。系列混合标准溶液用于测定 14 种化合物的线性关系。

1.3.3 样品前处理

液体样品: 取 100 mL 待测样品, 充分混匀。精密量取混匀试样 10 mL, 加入乙腈 30 mL 超声提取 15 min 后, 冷却至室温, 用乙腈定容至 50 mL。摇匀后在转速 7 000 r/min, 温度 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔有机滤膜过滤, 滤液作为供试品溶液。

胶囊样品: 取 10 次口服剂量的待测样品, 将整粒胶囊研碎并混匀。精密称取相当于 1 次服用量的试样, 加入乙腈 30 mL 超声提取 15 min, 后续操作步骤同液体试样。

其他固体样品: 取 10 次口服剂量的待测样品, 粉碎研细, 充分混匀, 精密称取相当于 1 次服用量的试样, 加入乙腈 30 mL 超声提取 15 min, 后续操作步骤同液体试样。

1.3.4 阴性样品溶液配制

经检测不含上述 14 种补肾壮阳类药物的样品, 按 1.3.3 供试品溶液配制方法, 制得阴性样品溶液。

1.3.5 定性分析

采集 14 个标准物质在 190~400 nm 波长处的光谱, 根据各标准物质的紫外特征吸收光谱图建立光谱库, 当检测到样品有与标准物质保留时间一致的色谱峰时, 即与该标准物质进行光谱匹配度, 相似度达 99% 以上, 且峰纯度较高 (纯度值为正值) 时, 可初步判断此样品中添加了该药物。在初步判定为阳性的样品中加入检出的非法添加成分的标准物质溶液, 若样品中疑似峰与标准物质色谱峰能完全重合, 并且疑似峰紫外吸收特征谱图不发生变化, 则确证是阳性样品。

1.3.6 定量分析

配制检出成分的标准物质溶液, 使标准物质色谱峰面积与阳性样品中检出成分峰面积接近, 以外标法计算阳性样品中检出成分的含量。

1.3.7 质谱验证

为验证本方法的可靠性, 以检出的 7 批阳性样品为例, 进行质谱确证。

色谱条件: 色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm); 流速 0.2 mL/min; 进样体积 1 μL ; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相 A- 甲醇, 流动相 B- 体积分数为 1% 甲酸; 梯度洗脱程序: 0~10 min (50%A), 10~13 min (50% \rightarrow 90% A), 13~15.5 min (90% A), 15.5~16.5 min (90% \rightarrow 44% A)。

质谱条件: 电喷雾电离正离子模式 (ESI+); 多重反应监测扫描 (MRM); 干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流量 8.5 L/min; 雾化器压力 40 psi; 毛细管电压 4 kV。母离子、子离子、碰撞能量等见表 2。

表 2 西地那非、他达拉非、盐酸达泊西汀 MRM 参数
Table 2 The MRM parameters of the Sildenafil, Tadalafil, Dapoxetine hydrochloride

检测化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	裂解电压/V	碰撞能量/eV
西地那非	475.2	283.1/100.1*	172	29/40
他达拉非	390.1	268.1*/169.1	121	8/40
盐酸达泊西汀	306.2	157*/127	105	26/62
盐酸氟西汀	310.1	148.1/44.1*	88	2/9
盐酸舍曲林	306.1	275.1/159*	82	8/32

注: * 为定量离子。

1.4 数据统计分析

采用 Microsoft Excel 2016 进行数据处理, 计算平均值和相对标准偏差 (RSD); 采用 Origin 2021 绘制色谱图。

2 结果与分析

2.1 前处理方法的确定

根据工作经验和查阅文献得出, 非法添加药物的剂量高低不等, 部分不法商家为增加隐蔽性, 采用少量或微量添加方式, 以减小非法添加药物的浓度, 逃避检测。但为了保证“疗效”, 通常会加大产品的一次性服用剂量。因此, 本实验在供试品溶液制备时以一次性服用量为单次取样量, 以保证足够的检测浓度, 避免假阴性情况出现。此外值得注意的是, 某些不法商家会将化学药物涂于胶囊壳上或添加至胶囊壳中, 以增加隐蔽性, 所以对胶囊类保健食品和中成药, 测定时, 需将胶囊壳与内容物一同进行前处理, 以避免漏检。

2.2 分组的确定

由于 14 个目标化合物的 pK_a 值差异很大, 使用单一的色谱条件难以同时分析目标化合物。因此, 本实验在色谱条件优化的过程中, 将目标化合物分为两组。将那红地那非、红地那非、西地那非、豪莫西地那非、盐酸达泊西汀、硫代艾地那非、那莫西地那非, 使用色谱条件 I 分离, 设定为 I 组; 将氨基他达拉非、他达拉非、枸橼酸羟基豪莫西地那非、盐酸氟西汀、伐地那非、盐酸舍曲林和伪伐地那非, 使用色谱条件 II 分离, 设定为 II 组。

2.3 色谱条件的建立

2.3.1 色谱柱的选择

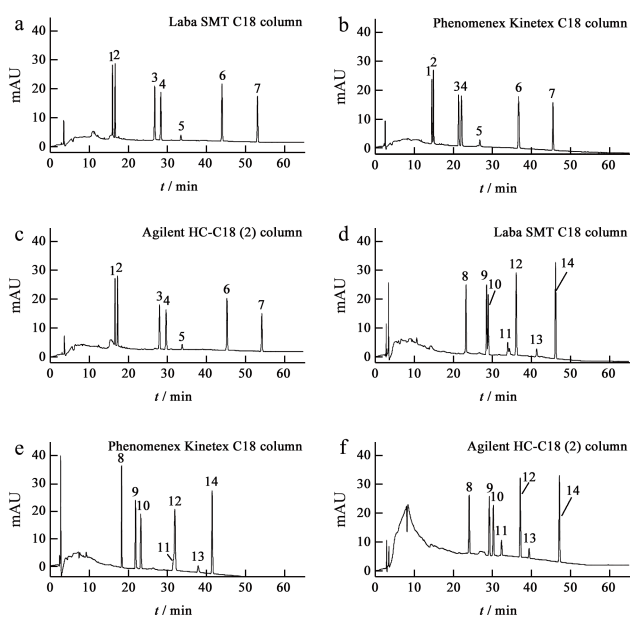


图 1 14 个目标化合物在不同色谱柱上的色谱图

Fig.1 The chromatograms of the 14 compounds determined by different chromatographic columns

注: a~c 为色谱条件 I, d~f 为色谱条件 II。1- 那红地那非; 2- 红地那非; 3- 西地那非; 4- 豪莫西地那非; 5- 盐酸达泊西汀; 6- 硫代艾地那非; 7- 那莫西地那非; 8- 氨基他达拉非; 9- 他达拉非; 10- 枸橼酸羟基豪莫西地那非; 11- 盐酸氟西汀; 12- 伐地那非; 13- 盐酸舍曲林; 14- 伪伐地那非, 下同。

本实验选用了 3 种的 C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 分别是 Phenomenex Kinetex C18 柱、Laba SMT C18 柱和 Agilent HC-C18 (2) 柱, 考察了它们对 14 种目标化合物的分离度和峰形的影响, 如图 1 所示。结果显示, 3 种色谱柱因硅胶键合类型和碳载量存在差异, 所以分离效果也有所

不同, 使用 Agilent HC-C18 (2) 柱时, 14 种化合物均能实现基线分离, 并且呈现较好的峰形。因此, 本实验确定选用 Agilent HC-C18 (2) 色谱柱进行后续检测。

2.3.2 流动相的确定

参考国家食品药品监督管理局发布的药品补充检验方法^[7,8], 采用的流动相 A 为磷酸三乙胺溶液 (取三乙胺 7 mL 用水稀释至 1 000 mL, 用磷酸调节 pH 值至 2.8) - 甲醇 - 乙腈 (60:20:20, V/V/V), 流动相 B 为磷酸三乙胺溶液 - 甲醇 - 乙腈 (8:46:46, V/V/V), 进行梯度洗脱, 流动相组成比较复杂, 并且西地那非和羟基豪莫西地那非分离度差, 影响定量的准确性。程燕等^[28]、林芳等^[29]通过对流动相组成的优化, 均以更简单的流动相系统获得了更好的分离效果, 本实验在前人研究的基础上稍作修改, 同样建立了简单的流动相体系, 选取乙腈和甲醇作为有机相, 以 10 mmol/L 的乙酸铵缓冲液 (含有体积分数 0.1% 三乙胺) 作为水相。通过不断摸索流动相梯度洗脱程序, 最终在此新流动相系统中 14 个化合物的分离度均达 2.5 以上, 分离效果较好, 结果见图 1。

流动相的 pH 值会直接影响化合物在其中的存在形式, 可能全部以分子状态存在或者全部以离子状态存在或同时以两种形式存在, 从而改变化合物在色谱柱上的保留行为, 进而影响化合物的分离效果。本实验涉及到的 14 个化合物的 pK_a 值范围跨度较大, 部分化合物受 pH 值影响明显, 因此继续考察本实验最适宜的 pH 条件。由于 I 组 7 个化合物的 pK_a 均在 9 以下, 考虑在酸性条件下进行分离, 考察了 pH 值为 3.0、4.5、5.0、5.5 时 7 个化合物的分离效果。如图 2 和表 3 所示, 在以上 pH 条件下 I 组的 7 个化合物都具有较大的分离度, 表明在此流动相体系下 I 组的 7 个化合物对 pH 值的可接受范围较大, 具有较好的可操作性。但综合对比 7 个化合物的分离度, 当 pH 值为 5.0 时, 各物质中最小分离度值最大, 因此推荐 I 组的最适 pH 值为 5.0。对于 II 组的 7 个化合物考察 pH 值为 5.5、6.5、7.0、7.5 时各物质的分离效果。由图 2 和表 3 所示可知, 当 pH 值为 5.5 时, 他达拉非和枸橼酸羟基豪莫西地那非无法达到基线分离, 伐地那非分离度也较差。当调整 pH 值大于 6.5 时, 7 种物质都能实现有效分离, 其中当 pH 值为 7.0 和 7.5 时, 各化合物出峰时间分

布更均匀^[27,28]。部分PDE5的分离效果受流动相酸度值影响较大,需通过调整流动相的pH值以获得有效分离。此外,考虑到一般碱性环境易破坏色谱柱硅胶结构的稳定,导致柱效降低,使用寿命缩短,因此本实验以流动相的pH值7.0作为分离II组化合物的最佳pH条件。

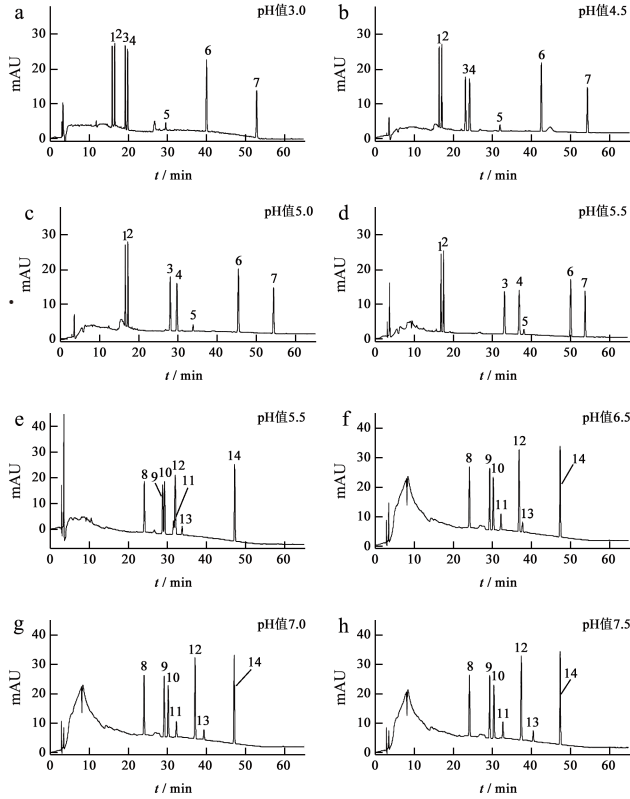


图2 14个目标化合物在不同pH条件下的色谱图

Fig.2 The chromatograms of the 14 compounds determined by different pH

注: a~d为色谱条件I, e~h为色谱条件II。

2.3.3 柱温的选择

不同的柱温会影响化合物在色谱柱上保留的强弱和色谱柱的柱效,从而影响化合物的分离效果。为获得最佳的色谱柱温度,本研究考察了25、30、35℃下14个目标化合物的分离情况。由图3可知,柱温在25℃时,他达拉非和枸橼酸羟基豪莫西地那非的色谱峰完全重合。当温度在30℃及以上时,14个化合物均得到有效分离,并且各化合物具有更尖锐的峰形。因此,推荐30℃作为分离14种补肾壮阳类化学药物的色谱柱温度。

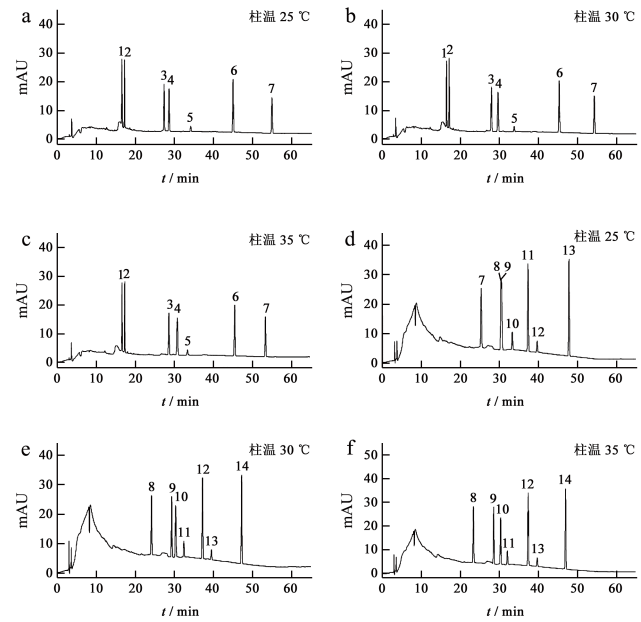


图3 不同柱温下14个目标化合物的色谱图

Fig.3 The chromatograms of the 14 compounds determined at different column temperatures

注: a~c为色谱条件I, d~f为色谱条件II。

表3 不同pH值条件下14个化合物的分离度

Table 3 The separation degree of 14 compounds determined at different pH value

pH 值	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3.5	—	2.9	11.6	2.5	31.9	29.8	35.0	—	—	—	—	—	—	—
4.5	—	3.1	21.1	2.9	19.6	27.6	31.1	—	—	—	—	—	—	—
5.0	—	3.1	36.9	4.3	10.1	29.0	22.4	—	—	—	—	—	—	—
5.5	—	2.9	46.9	8.6	2.8	27.6	8.8	—	12.9	1.3	5.8	1.0	4.2	36.3
6.5	—	—	—	—	—	—	—	—	14.2	2.5	5.1	12.0	2.2	25.7
7.0	—	—	—	—	—	—	—	—	14.1	2.8	5.4	12.5	5.8	20.5
7.5	—	—	—	—	—	—	—	—	14.1	2.9	5.9	12.4	8.0	18.5

注: 1-那红地那非; 2-红地那非; 3-西地那非; 4-豪莫西地那非; 5-盐酸达泊西汀; 6-硫代艾地那非; 7-那莫西地那非; 8-氨基他达拉非; 9-他达拉非; 10-枸橼酸羟基豪莫西地那非; 11-盐酸氟西汀; 12-伐地那非; 13-盐酸舍曲林; 14-伪伐地那非。—表示无数据。

2.3.4 检测波长的选择

采用光电二极管阵列检测器 (PDA) 对 14 种补肾壮阳类化学药物在 190~400 nm 波段进行了紫外光谱扫描。谱图显示, I 组 7 个目标化合物的最大吸收波长位于 234~280 nm 之间, 在 254 nm 处各化合物均有较强的紫外吸收和较大的信噪比。因此, 本研究将 254 nm 确定为 I 组的最佳检测波长。II 组 7 个目标化合物的最大吸收波长位于 225~236 nm 之间, 但当检测波长小于 238 nm 时, 流动相有较强的紫外吸收, 基线噪音干扰较大, 各化合物的信噪比相对较低。随着检测波长的增大, 基线噪音干扰逐渐减小。综合考虑各化合物的信号响应和信噪比, 本研究将 238 nm 确定为 II 组的最适检测波长。

综上, 最终确定了 1.3.1 的色谱条件。

2.4 方法学验证

参照中国药典 2020 年版第四部中的分析方法验证指导原则^[30]对本研究所采用方法的专属性、线性、检出限、定量限、回收率、精密度等参数进行考察。

2.4.1 专属性试验

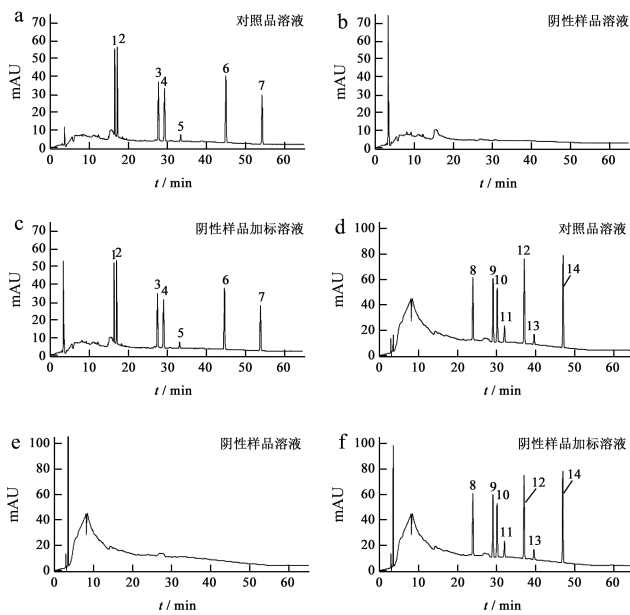


图 4 混合对照品溶液、阴性样品溶液、阴性样品加标溶液的色谱图

Fig.4 HPLC chromatograms of mixed reference solution, negative sample control solution and negative spiked solution

注: a~c 为色谱条件 I, d~f 为色谱条件 II。

专属性实验是指在可能存在其他成分下, 采用的方法能正确测定出被测物的特性, 专属性强特指被测物的特性明显。结果如图 4 所示, 阴性样品加标溶液与混合对照品溶液中各目标物质出峰时间一致, 并且阴性样品的杂质色谱峰与 14 种补肾壮阳化学药的色谱峰没有保留时间上的重叠, 此外还可以通过 PDA 谱图排除基质效应对检测的干扰。因此, 本研究所用的方法具有良好的专属性。

2.4.2 线性关系考察、检测限和定量限

采用 HPLC-PDA 分别对混合对照品系列溶液 I 和混合对照品系列溶液 II 进行分析, 以质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 并建立线性回归方程。结果如表 4 所示, 14 种补肾壮阳类化学药物在所考察的质量浓度范围内均呈现出良好的线性关系, 所有相关系数 (r) 均大于 0.9999。将对照品溶液进行逐级稀释, 并以信噪比 $R_{SN} \geq 3$ 和 $R_{SN} \geq 10$ 时的质量浓度分别作为检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。各种药物的 LOD 和 LOQ 见表 4。对于 14 种化学药物, 临床推荐的单次最小服用剂量为 10~50 mg, 如按本实验方法制备供试品溶液, 各化合物的质量浓度在 200~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 而本研究中各化合物的定量限为 0.05~0.71 $\mu\text{g/mL}$ 。对比可知, 起效所需要的最低质量浓度均在各药物定量限的 1 000 倍以上, 因此本方法能完全满足 14 个非法添加化学药的定性定量检测的灵敏度要求。

2.4.3 回收率试验

取不含 14 种补肾壮阳类化学药物的阴性样品约一次服用量, 共 9 份, 分 3 组, 每组 3 份。分别向每组样本中加入不同体积的混合对照品储备液 I 或混合对照品储备液 II, 制备成低、中、高三个水平质量浓度的阴性样品加标溶液, 质量浓度范围分别在 1.3.2 节中的 s3 (20 $\mu\text{g/mL}$)、s4 (40 $\mu\text{g/mL}$)、s5 (80 $\mu\text{g/mL}$) 和 q3 (10 $\mu\text{g/mL}$)、q4 (25 $\mu\text{g/mL}$)、q5 (50 $\mu\text{g/mL}$) 水平上。对各加标溶液进行分析, 计算各加标溶液中 14 种补肾壮阳类化学药物的加标回收率和相对标准偏差 (RSD)。如表 5 所示, 14 种化合物的回收率均在 97.8%~102.8% 之间, RSD 均小于 2% ($n=3$ 或 $n=9$), 表明本研究所用方法的准确性良好, 能够满足实际样品测定的定量要求。

表 4 标准曲线、线性范围、检测限和定量限

Table 3 The regression equations, linear ranges, LODs and LOQs

化合物	线性范围 /($\mu\text{g/mL}$)	回归方程	r	LOD/ $(\mu\text{g/mL})$	LOQ/ $(\mu\text{g/mL})$
那红地那非	5~400	$y=16\ 990.8x-4\ 215.74$	1.000 0	0.03	0.08
红地那非	5~400	$y=17\ 376.3x-1\ 470.48$	1.000 0	0.02	0.05
西地那非	5~400	$y=18\ 214.5x+11\ 067.7$	1.000 0	0.03	0.09
豪莫西地那非	5~400	$y=19\ 524.4x+10\ 195.7$	1.000 0	0.03	0.09
盐酸达泊西汀	5~400	$y=2\ 334.77x-276.120$	1.000 0	0.24	0.71
硫代艾地那非	5~400	$y=24\ 375.6x+2\ 584.75$	1.000 0	0.03	0.09
那莫西地那非	5~400	$y=17\ 733.3x+8\ 325.58$	1.000 0	0.03	0.09
氨基他达拉非	2.5~250	$y=20\ 801.6x+26\ 122.6$	0.999 9	0.03	0.08
他达拉非	2.5~250	$y=20\ 580.9x+24\ 776.1$	0.999 9	0.03	0.08
枸橼酸羟基豪莫西地那非	2.5~250	$y=20\ 595.0x+18\ 148.2$	0.999 9	0.04	0.12
盐酸氟西汀	2.5~250	$y=4\ 372.10x+4\ 917.38$	0.999 9	0.08	0.26
伐地那非	2.5~250	$y=33\ 220.6x+28\ 317.2$	0.999 9	0.03	0.08
盐酸舍曲林	2.5~250	$y=2\ 610.58x+2\ 116.40$	0.999 9	0.25	0.70
伪伐地那非	2.5~250	$y=34\ 387.3x+30\ 095.9$	0.999 9	0.02	0.07

表 5 回收率试验结果

Table 4 The results of recovery test

化合物	加标质量浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	平均回收率/%		RSD/%	
		$(n=3)$		$(n=9)$	
那红地那非	20	99.7	0.31	100.3	1.61
	40	102.4	0.54		
	80	98.7	0.47		
红地那非	20	99.8	0.23	100.3	1.47
	40	102.3	0.54		
	80	98.9	0.43		
西地那非	20	100.1	0.27	100.0	1.70
	40	101.9	0.56		
	80	97.9	0.37		
豪莫西地那非	20	100.1	0.14	99.9	1.69
	40	101.9	0.53		
	80	97.8	0.36		
盐酸达泊西汀	20	100.2	0.43	100.7	1.52
	40	102.8	0.46		
	80	99.2	0.40		
硫代艾地那非	20	99.8	0.23	100.2	1.42
	40	102.1	0.47		
	80	98.7	0.37		

续表 5

化合物	加标质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均回收率/%		RSD/%	
		(n=3)		(n=9)	
那莫西地那非	20	100.4	0.22		
	40	102.3	0.49	100.3	1.7
	80	98.1	0.39		
氨基他达拉非	10	100.6	0.77		
	25	99.4	0.51	100.4	0.91
	50	101.2	0.49		
他达拉非	10	101.4	0.58		
	25	99.0	0.46	100.5	1.15
	50	101.2	0.53		
枸橼酸羟基豪莫西地那非	10	101.5	0.61		
	25	100.4	1.28	101.0	0.83
	50	101.1	0.55		
盐酸氟西汀	10	98.9	0.64		
	25	99.8	0.77	100.3	1.44
	50	102.1	0.46		
伐地那非	10	101.3	0.62		
	25	99.1	0.57	100.6	1.12
	50	101.2	0.56		
盐酸舍曲林	10	99.5	1.17		
	25	98.9	0.35	100.0	1.32
	50	101.5	0.81		
伪伐地那非	10	101.4	0.66		
	25	99.1	0.46	100.5	1.13
	50	101.2	0.56		

2.4.4 精密度试验

仪器精密度：吸取同一回收率试验中的阴性样品加标溶液，混合对照品 I 组中的加标质量浓度在 s4 (40 $\mu\text{g/mL}$) 水平上，混合对照品 II 组的加标质量浓度在 q4 (25 $\mu\text{g/mL}$) 水平上。连续测定 6 次，记录 14 个目标组分峰面积，并计算 *RSD*。结果显示，14 个化合物的色谱峰峰面积的 *RSD* ($n=6$) 均低于 2%，说明仪器具有良好的精密度。

日内精密度和日间精密度：分别将混合储备液 I、II 稀释成 3 个质量浓度水平，质量浓度范围分别在 1.3.2 节中的 s1 (5 $\mu\text{g/mL}$)、s4 (40 $\mu\text{g/mL}$)、

s7 (400 $\mu\text{g/mL}$) 和 q1 (2.5 $\mu\text{g/mL}$)、q4 (25 $\mu\text{g/mL}$)、q7 (250 $\mu\text{g/mL}$) 水平上，每 4 h 测定一次，连续 24 h，作为日内精密度试验；每 12 h 测定一次，连续 3 d，作为日间精密度试验，计算各组分的峰面积 *RSD*。结果如表 6 所示，表明本研究所用的方法具有良好的精密度。

2.4.5 重复性试验

取同一批号非法添加的阳性样品，独立制备 6 份供试品溶液进行分析，以外标法分别计算含量，并计算 *RSD* 值。6 份供试品含量的 *RSD* ($n=6$) 为 1.1%，表明该方法重复性良好。

表 6 日内精密度和日间精密度的

Table 5 The results of intra-day and inter-day precision

化合物	加标质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	精密度的 ($n=6$) $RSD/\%$	
		日内	日间
那红地那非	5	0.35	0.54
	40	0.29	0.99
	400	0.34	1.18
红地那非	5	0.26	0.68
	40	0.27	1.09
	400	0.54	1.20
西地那非	5	0.44	0.89
	40	0.31	1.00
	400	0.28	0.82
豪莫西地那非	5	0.39	0.82
	40	0.35	1.07
	400	0.27	0.78
盐酸达泊西汀	5	0.95	1.92
	40	0.37	1.18
	400	0.21	0.57
硫代艾地那非	5	0.41	0.59
	40	0.25	1.00
	400	0.19	1.24
那莫西地那非	5	0.49	1.82
	40	0.32	1.16
	400	0.22	0.76
氨基他达拉非	2.5	0.31	0.77
	25	0.13	0.52
	250	0.19	1.17
他达拉非	2.5	0.47	0.98
	25	0.13	0.62
	250	0.20	1.19
枸橼酸羟基豪莫西地那非	2.5	0.28	1.03
	25	0.25	0.65
	250	0.24	1.06
盐酸氟西汀	2.5	0.65	0.39
	25	0.25	0.53
	250	0.22	1.24
伐地那非	2.5	0.26	1.03
	25	0.16	0.60
	250	0.25	1.09
盐酸舍曲林	2.5	0.55	1.02
	25	0.24	0.49
	250	0.20	0.97
伪伐地那非	2.5	0.45	1.03
	25	0.17	0.54
	250	0.20	1.17

2.5 实际样品检测

采用本方法对 91 批样品进行检测分析, 结果在 10 批市购中成药中均未检出非法添加药物, 在 81 批保健品中共检出 7 批阳性样品, 3 种非法添加药物。在 1 批片剂中检出西地那非 (1.71 mg/g)、1 批丸剂中检出西地那非 (22.94 mg/g)、2 批胶囊剂中检出他达拉非 (4.88、8.79 mg/g)、2 批片剂中检出盐酸达泊西汀 (25.46、17.33 mg/g)、1 批胶囊剂中同时检出西地那非 (18.88 mg/g) 和他达拉非 (16.25 mg/g)。其中, 他达拉非 72 h 内推荐服用剂量为 10 mg, 最大不超过 20 mg, 且不宜连续每日服用, 按照该阳性样品说明书推荐服用量计算, 每次摄入他地那非 33.30 mg, 超过临床使用剂量 3 倍。对上述阳性样品采用 UPLC-MS/MS 检测, 样品中母离子和 2 对子离子均有检出, 离子丰度比符合要求, 均得到确证, 检测结果与使用本研究的 HPLC 方法一致, 表明本方法结果准确可靠。从检验结果可知, 中成药样品均未检出非法添加药物, 其原因可能与样品均采购自正规药店和样本量不充分有关。中成药属于特殊商品其质量直接关系用药安全, 因此对中成药中是否含有非法添加药物的检验具有十分重要的意义。保健品的阳性检出率为 8.6%, 检出率较高的原因可能是样品均来自稽查的可疑产品, 但任可看出补肾壮阳类保健品中非法添加现象依然存在。并且检测出 1 种 SSRIs, 表明扩充其非法添加药物的筛查范围具有十分重要的现实意义, 可进一步加强对保健食品质量安全的监管。此外, 非法添加药物剂量差异较大, 尤其是多物质、超剂量的添加具有严重的安全隐患, 因此需进一步加强对补肾壮阳类保健品的监查力度。

3 结论

本研究建立了一种检测保健食品和中成药中 14 种常见的补肾壮阳类化学药物的高效液相色谱-光电二极管阵列检测方法。涵盖了补充检验方法 2009030 中 11 种 PDE5 和检测标准以外的 3 种典型的 SSRIs。相比于补充检验方法 2009030, 本研究通过色谱条件的优化, 简化了流动相体系, 并得到更好的分离效果。此外, 通过方法学验证, 以及质谱确证, 证明了该方法灵敏度、精密度和准确度等参数均能完全满足实际检测的需要。将该方法用于 91 批实际样品检测, 在其中检测出 2 种 PDE5, 1 种 SSRIs, 其添加量从微量到超量不等。综上, 本方法准确性高、操作简单、适用性广, 可及时有效应用于保健食品和中成药监管

中,为基层市场监管提供强有力的技术支持,对保障食品和药品安全具有较强的现实意义。

参考文献

- [1] COSMIN G P, FRANCESCO F, AMERIGO V, et al. Dietary supplements for erectile dysfunction: analysis of marketed products, systematic review, meta-analysis and rational use [J]. *Nutrients*, 2023, 15(17): 3677.
- [2] 余晓琴,刘美,李澍才,等.新型食品中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.
- [3] PAN W, XIAO H Y, LI H Z, et al. Terahertz spectroscopic detection of antifatigue illegal additives in health care product matrices [J]. *Applied Optics*, 2022, 61(33): 9904-9910.
- [4] 陈亚昆,门鹏,王攀.基于FAERS数据库的4种磷酸二酯酶5抑制剂安全性分析[J].*中国药物警戒*,2023,20(6):691-696.
- [5] JASON L L, NATHAN M S, BEHZADA, et al. Adverse reactions of PDE5 inhibitors: an analysis of the world health organization pharmacovigilance database [J]. *Andrology*, 2023, 11(7): 1408-1417.
- [6] HANG Y Y, GAO J J, GAO P, et al. A comprehensive assessment of genetic variation in serotonin transporter gene (*5-HTTLPR+rs25531*) and the response to dapoxetine in Chinese patients with premature ejaculation [J]. *Andrologia*, 2021, 53(8): 14141.
- [7] BJS 2008016,补肾壮阳类中成药中西地那非及其类似物的检测[S].
- [8] BJS 2009030,补肾壮阳类中成药中PDE5型抑制剂的快速检测方法[S].
- [9] BJS 201710,保健食品中75种非法添加化学药物的检测[S].
- [10] BJS 201805,食品中那非物质的测定[S].
- [11] SN/T 5357-2021,出口保健食品中多种非法添加物的测定液相色谱-质谱/质谱法[S].
- [12] VIEIRALVES R R, FAVORITO L A. Dapoxetine and premature ejaculation [J]. *International Brazilian Journal of Urology*, 2023, 49(4): 511-514.
- [13] LI J C, LIAO Z D, XU Z L, et al. Clinical value of penile sympathetic skin response to assess the efficacy of sertraline in the treatment of patients with sympathetic hyperexcitability in primary premature ejaculation [J]. *Sexual Medicine*, 2023, 11(1): qfac012.
- [14] LIU Q S, GAO H, HUANG Y Y, et al. Comparison of fluoxetine with other selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of premature ejaculation: a systematic review and meta-analysis [J]. *Andrologia*, 2022, 54(8): e14500.
- [15] WANG X, ZHAO J J, ZHANG Q, et al. A chemometric strategy for accurately identifying illegal additive compounds in health foods by using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry [J]. *Analytical Methods*, 2021, 13(14): 1731-1739.
- [16] MA M H, ZHANG J N, MA X L, et al. Using UHPLC-HRMS-based comprehensive strategy to efficiently and accurately screen and identify illegal additives in health-care foods [J]. *Food Research International*, 2023, 170: 113015.
- [17] 黄芳,邓欣,张秋炎,等.超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱法快速筛查测定抗疲劳类保健食品中112种化
- 学药[J].*分析测试学报*,2023,42(10):1221-1232.
- [18] XIE X, ZHANG Y, YUE Z, et al. Multi-fingerprint profiling analysis for screening and quantification of illegal adulterated antidiabetics in a functional food using HPLC coupled to diode array detection/fluorescence detection [J]. *Microchemical Journal*, 2019, 149: 103995.
- [19] CUI X, WANG Q, GUO M, et al. Selective analysis of progesterone in cosmetic samples based on molecularly imprinted solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2023, 61(10): 995-1004.
- [20] XU D M, LAI G Y, CHEN Y, et al. Simultaneous determination of 21 illegally added compounds in health foods by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. *Se Pu*, 2019, 37(7): 778-785.
- [21] WU Z Q, JIANG X Q, YANG Y Q, et al. Amphiphilic polymers facilitated solid phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for direct extraction and analysis of zearalenone and zearalanone in corn juice samples [J]. *Journal of Separation Science*, 2023, 46(14): e2300112.
- [22] PENG S, CHAO W, LEI X, et al. Simultaneous determination of eight phenolic acids in rapeseed by accelerated solvent extraction-solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Analytical Methods*, 2022, 15(10): 2625-2632.
- [23] 谭丽容,程敏,林伟斌,等.串联固相萃取超高效液相色谱三重四极杆质谱法同时测定用于改善阳虚和/或缓解疲劳类的20种保健品非法添加物[J].*食品安全质量检测学报*,2019,10(21):7418-7426.
- [24] HASSAN Y AA, AYAD M F, HUSSEIN L A, et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) with DAD detection for the determination of relatively non polar fungicides in orange samples [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 193: 109196.
- [25] BOUMLASY S E, MANGRAVITI D, ARENA K, et al. Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in three samples of shrimp waste (*Parapenaeus longirostris*) by high performance liquid chromatography coupled photo-diode array and mass spectrometry detection [J]. *Natural Product Research*, 2023, 193: 1-8.
- [26] AKRAM S, SULTANA B, ASI M R, et al. Salting-out assisted liquid-liquid microextraction and reverse-phase chromatographic quantification of two neonicotinoid insecticides from fruits and vegetables [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2023, 61(9): 875-884.
- [27] 雷毅,黄艳婷,陈林,等.高效液相色谱法同时快速测定壮阳类保健品中的18种非法添加物[J].*理化检验(化学分册)*,2016,52(3):249-254.
- [28] 程燕,谭顺中,姜登军.超高效液相色谱法同时测定功能性饮品和抗疲劳类保健食品中非法添加的11种化学物质[J].*食品安全质量检测学报*,2018,9(15):4078-4084.
- [29] 林芳,李涛,耿庆光,等.超高效液相色谱-二极管阵列检测器法快速测定保健食品中违法添加的14种性功能药物[J].*食品科学*,2014,35(4):163-169.
- [30] 9101分析方法验证指导原则[S].