

保健酒及酒类制品中非法添加 PDE-5 抑制剂及其衍生物的监测及结果分析*

段琼, 马春艳, 封淑华**

(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要 目的: 对保健酒及酒类制品中非法添加磷酸二酯酶(PDE-5)抑制剂及其衍生物进行监测, 并对监测结果进行分析讨论。**方法:** 参照“国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件(编号 2009030)方法。LC-MS/MS 法条件: 采用 Shim-pack XR-ODS(100 mm×2.0 mm, 2.2 μm)色谱柱, 以 0.1% 乙酸的 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱(0~8 min, 27%B; 8~18 min, 27%B→80%B, 18~20 min, 80%B), 流速 0.3 mL·min⁻¹; 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子扫描模式, 一级质谱全扫描范围为 *m/z* 100~1 000, 二级质谱全扫描范围为 *m/z* 40~1 000。HPLC 法条件: 采用 Inertsil ODS-SP C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)色谱柱, 以 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(A)-甲醇(B)-乙腈(C)为流动相, 梯度洗脱(0~15 min, 10%B→25%B; 15~25 min, 25%B→55%B; 25~35 min, 55%B, 保持 15%C), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为室温, 二极管阵列检测器, 扫描范围为 200~400 nm。**结果:** 64 批次样品中 12 批次检测到 PDE-5 抑制剂及其衍生物, 其中检出批件中涉及的西地那非、伐地那非、氨基他达拉非和羟基豪莫西地那非 4 种非法添加成分。另外检出 5 种批件中未涉及的 PDE-5 抑制剂衍生物, 为丙氧基苯基艾地那非、丙氧基苯基硫代艾地那非、艾地那非和羟基硫代豪莫西地那非, 且有一种未见报道的新型 PDE-5 抑制剂衍生物(暂无命名)。**结论:** 保健酒及酒类制品中检出非法添加 PDE-5 抑制剂及其衍生物, 需建立快速有效的针对新型 PDE-5 衍生物的监测方法, 并加强对相关销售渠道的监管, 保障人民生命健康。

关键词: 保健酒及酒类制品; PDE-5 抑制剂及其衍生物; 丙氧基苯基艾地那非; 丙氧基苯基硫代艾地那非; 艾地那非; 羟基硫代豪莫西地那非; 新型艾地那非衍生物; 非法添加; 监测

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)00-0277-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.02.13

Investigation and analysis of the PDE-5 inhibitors and their analogues in tonic wines and wine products*

DUAN Qiong, MA Chun-yan, FENG Shu-hua**

(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Objective: To supervise the PDE-5 inhibitors and analogues in tonic wines and wine products and then analyze the result. **Methods:** The supplement standard of the drugs from SFDA (No. 2009030) was taken as reference.

* 河北省食品药品监督管理局 2014 年度食品药品安全科技项目重点项目(ZD2014006)

** 通信作者 Tel: (0311) 89892090; E-mail: shuhua08@sina.com

第一作者 Tel: (0311) 85212009-8082; E-mail: qiong907@sohu.com

LC-MS/MS analysis was carried out on a Shim-pack XR-ODS column (100 mm × 2.0 mm, 2.2 μm) with mobile phase at a flow rate of 0.3 mL · min⁻¹. The mobile phase consisted of 10 mmol · L⁻¹ ammonium acetate containing 0.1% acetic acid (A) and acetonitrile (B), and the ratios of B were 0–8 min, 27%B; 8–18 min, 27%B → 80%B, and 18–20 min, 80%B. ESI in positive electrospray ion was used with the 100–1 000 MS and 40–1 000 MS/MS scan ranges. HPLC analysis was carried out on an Inertsil ODS-SP C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The mobile phase consisted of 10 mmol · L⁻¹ ammonium acetate (A), methanol (B) and acetonitrile (C), and the ratios of B were 0–15 min, 10%B → 25%B; 15–25 min, 25%B → 55%B, 25–35 min, 55%B and the ratio of C was kept at 15%. The column temperature was room temperature, and the DAD scan range was from 200 to 400 nm. **Results:** The PDE-5 inhibitors and analogues were found in about 12 batches among a total of 64 batches of samples. Except for sildenafil, vardenafil, aminotadalafil and hydroxyhomosildenafil reported in the document, five new PDE-5 inhibitor analogues were detected, including propoxyphenyl aildenafil, propoxyphenyl thioaildenafil, aildenafil and hydroxyhomosildenafil, which are not mentioned in the document, among which there was a new compound never being reported before. **Conclusion:** PDE-5 inhibitors and analogues were inspected in tonic wines and wine products. There is a need to set up effective and rapid detection methods for new PDE-5 inhibitor analogues, and strengthen the supervision to protect the health of people.

Keywords: tonic wines and wine products; PDE-5 inhibitors and analogues; propoxyphenyl aildenafil; propoxyphenyl thioaildenafil; aildenafil; hydroxyhomosildenafil; a new kind of aildenafil analogues; illegal added; supervision

在中国,药用酒及酒类制品具有悠久的历史。《周礼·天官酒人》中就有“酒掌王齐三酒,祭祀则其<供>奉之”的描述^[1]。随着工业化的发展,酒的品种越来越多,生产者将酒与人参、鹿茸、海马、海参等中药及动、植物相结合,制成声称具有缓解体力疲劳功能的保健酒及酒类制品。在日常检测工作中,发现一些不法商家利用人们对于缓解疲劳、壮阳等方面的需求,将西地那非等 PDE-5 抑制剂及其衍生物添加于声称具有相关功能的保健酒及酒类制品中。

PDE-5 抑制剂即 5 型磷酸二酯酶抑制剂,为选择性抑制降解环磷酸鸟苷(cGMP)特异的 5 型磷酸二酯酶(PDE-5),保存并增强 cGMP 舒张阴茎海绵体作用,使阴茎勃起。临床应用于治疗男性功能障碍。代表性药物如西地那非、他达拉非和伐地那非。但该类药物的心血管等不良反应也屡见报道^[2-3]。不法分子为宣传产品疗效,在补肾壮阳类中成药和缓解体力疲劳类保健食品中非法添加 PDE-5 抑制剂。针对这种情况,国家局针对补肾壮阳类中成药及抗疲劳、免疫调节类保健食品颁布了“药品检验补充检验方法和检验项目批准件补充检验方法(编号 2009030)”的检测方法^[4],检测西地那非、伐地那非、他达拉非、那红地那非、红地那非、羟基豪莫西地

那非、豪莫西地那非、氨基他达拉非、硫代艾地那非、伪伐地那非和那莫西地那非等 11 种非法添加成分。但近来出现添加多种新型 PDE-5 抑制剂及其衍生物的趋势,相继报道的有 nitroso-prodenafil、丙氧基苯基硫代艾地那非、丙氧基苯基艾地那非、propoxyphenyl hydroxyethylthiosildenafil、isonitrosopropdenafil、dithiodesethylcarbodenafil、norchodenafil、dithio-desmethycarbodenafil 和丙氧基苯基硫代羟基豪莫西地那非等^[5-10]。

本文参照“药品检验补充检验方法和检验项目批准件补充检验方法(编号 2009030)”,对从市场上采购到的保健酒及酒类制品 52 个品种 64 批次样品进行检测,结果 12 批次保健酒或酒类制品检测到 PDE-5 抑制剂及其衍生物,检出率为 19%。其中检出批件中涉及的西地那非、伐地那非、氨基他达拉非、羟基豪莫西地那非,另外检出 5 种批件中未涉及的 PDE-5 抑制剂衍生物丙氧基苯基艾地那非、丙氧基苯基硫代艾地那非、艾地那非、羟基硫代豪莫西地那非,且有一种未见报道的新型 PDE-5 抑制剂衍生物。现报道如下。

1 实验材料

1.1 样品采集

主要购自本省 11 个地级市的零售单位、批发单

位和生产企业,共 52 个品种 64 批次样品。其产地涉及 13 个省、市、自治区。样品来源见表 1。

表 1 样品来源表

Tab. 1 Sources of the samples

样品来源 (resources of the samples)	批次 (batches)	所占比例 (proportion)/%
零售单位 (retail)	57	89
批发单位 (wholesaler)	4	6
生产单位 (producer)	3	5

1.2 对照品来源

那红地那非、红地那非、伐地那非、羟基豪莫西地那非、西地那非、豪莫西地那非、氨基他达拉非、他达拉非、硫代艾地那非、伪伐地那非和那莫西地那非的对照品均购自加拿大 TLC PHARMACHEM 公司,纯度大于 99%。

1.3 仪器与试剂

AB SCIEX Triple TOF™ 5600+ 质谱仪(配备岛津 LC-30AD 超高效液相色谱仪), Thermo Dionex U-3000 高效液相色谱仪。配备岛津 Shim-pack XR-ODS 色谱柱(100 mm × 2.0 mm, 2.2 μm)和岛津 Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。

乙腈、甲醇、乙酸为色谱纯,乙酸铵纯度 ≥ 99.99%, 试验用水去离子水, LC-MS/MS 校准液(APCI positive calibration solution, SCIEX 公司提供)。

2 实验部分

2.1 检测方法

参照国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件(批准件编号 2009030)(简称补充检验方法批件 2009030)中的液质联用色谱条件进行定性检查并确认,阳性样品使用高效液相色谱仪外标一点法对其所含成分进行含量测定,以 mg · 瓶⁻¹ 为计算单位。

2.2 仪器条件

2.2.1 LC-MS/MS 条件 色谱柱: 岛津 Shim-pack XR-ODS(100 mm × 2.0 mm, 2.2 μm); 流动相: 0.1% 乙酸的 10 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0~8 min, 27%B; 8~18 min, 27%B → 80%B; 18~20 min, 80%B); 流速: 0.3 mL · min⁻¹。质谱条

件: 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子扫描, 一级质谱全扫描的扫描范围 m/z 100~1 000, 二级质谱全扫描的扫描范围 m/z 40~1 000; 离子源参数: 雾化气为高纯氮气, GS1 为 380 Pa, GS2 为 380 Pa, CUR GAS 为 207 Pa, 离子源温度 550 °C, 电喷雾电压 5 500 V, 去簇电压 80 V, 碰撞能量 24 V。CDS 自动校准(APCI positive calibration solution, SCIEX 公司提供)。

2.2.2 HPLC 条件 色谱柱: 岛津 Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 柱温: 室温; 流动相: 10 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液(A) - 甲醇(B) - 乙腈(C), 梯度洗脱(0~15 min, 10%B → 25%B; 15~25 min, 25%B → 55%B; 25~35 min, 55%B, 保持 15% C); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 二极管阵列检测器扫描范围: 200~400 nm。

2.3 样品处理方法

补充检验方法批件 2009030 中, 供试品溶液为取样品 1 次服用量进行提取及测定。但部分保健酒或酒类样品未明确 1 次服用量, 且样品为乙醇溶液, 无需提取制备, 故对取样方法进行简化, 直接进样或稀释、浓缩后进样。

2.3.1 LC-MS/MS 供试品溶液制备 精密量取 1 mL 样品于 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 供定性检查。

2.3.2 HPLC 供试品溶液制备 将样品用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即为 HPLC 供试品溶液。对于含量较低的供试品, 采取适当浓缩, 即精密量取 50 mL 样品于蒸发皿中, 置沸水浴中浓缩至 5 mL 以下, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 供定量检查。

3 结果

3.1 PDE-5 抑制剂及其衍生物检出率及含量

在 64 批次样品中, 12 批次保健酒及酒类制品中检测到 PDE-5 抑制剂及其衍生物, 检出率为 19%。所检出的成分包括西地那非、伐地那非、氨基他达拉非、羟基豪莫西地那非、丙氧基苯基艾地那非(propoxyphenyl aildenafil)、丙氧基苯基硫代艾地那非(propoxyphenyl thioaildenafil)、艾地那非、羟基硫代豪莫西地那非和一种新型艾地那非衍生物。非法添加频次较高的化合物为西地那非、伐地那非还同时存在混合添加 2~3 种成分的情况。在编号 s-27、s-29 的样品中不仅检测到补充

检验方法批件 2009030 中的西地那非、伐地那非和羟基豪莫西地那非,还分别检测到批件中未涉及的艾地那非和羟基硫代豪莫西地那非。结果见表 2。

表 2 非法添加 PDE-5 抑制剂及其衍生物检测结果

Tab. 2 Detection results of the illegal addition of PDE-5 inhibitors and analogues

样品 编号 (No.)	检测结果 (result)	标示净含量 / (mL·瓶 ⁻¹) (packing suttle /mL per bottle)	含量 (mg·瓶 ⁻¹) (content/ /mg per bottle)
s-16	丙氧基苯基艾地那非 (propoxyphenyl aildenafil)	125	/
	丙氧基苯基硫代艾地那非 (propoxyphenyl thioaildenafil)		
	新型艾地那非衍生物 (a new kind of aildenafil)		
s-18	西地那非 (sildenafil)	125	0.04
s-21	氨基他达拉非 (amino tadalafil)	100	14
s-25	西地那非 (sildenafil)	125	0.1
	西地那非 (sildenafil)		6.5
s-27	伐地那非 (vardenafil)	125	0.4
	艾地那非 (aildenafil)		/
s-29	羟基豪莫西地那非 (hydroxyhomosildenafil)	135	5
	羟基硫代豪莫西地那非 (hydroxythiohomosildenafil)		/
s-32	西地那非 (sildenafil)	500	0.1
	伐地那非 (vardenafil)		0.2
s-35	西地那非 (sildenafil)	600	1.6
	伐地那非 (vardenafil)		0.9
	羟基豪莫西地那非 (hydroxyhomosildenafil)		12.2
s-60	西地那非 (sildenafil)	125	0.4
s-61	西地那非 (sildenafil)	125	20.8
s-62	西地那非 (sildenafil)	125	0.2
s-63	西地那非 (sildenafil)	125	0.2

3.2 补充检验方法批件 2009030 未涉及的 PDE-5 抑制剂衍生物结构确认

在检测编号 s-16、s-27 及 s-29 样品时,发现有 5 种化合物其二级质谱碎片与已知的西地那非的二级质谱碎片具有一定的相似性,其具有 m/z 99、 m/z 283、 m/z 299 和 m/z 311 等西地那非的二级特征碎片(如图 1、图 2),推测这 5 种化合物为 PDE-5 抑制剂衍生物。后经查阅大量文献,并将实验所得到的紫外图谱、精确质量数、二级质谱图碎片及 NMR 数据同文献比较,确定其中 4 种为丙氧基苯基艾地那非、丙氧基苯基硫代艾地那非、艾地那非和羟基硫代豪莫西地那非^[11-13]。对从 s-16 样品制备分离得到的新型 PDE-5 抑制剂衍生物,通过对其紫外图谱、红外图谱、精确质量数、二级质谱图碎片及 NMR 数据分析,确定其结构为嘧啶酮环上 6 位 N 上的活泼 H 被乙基取代的丙氧基苯基硫代艾地那非衍生物,为一种新型艾地那非衍生物,分子式为 $C_{26}H_{38}N_6O_4S$ ^[14]。结构如图 3。

4 讨论及结论

在此次监测中发现,批件中使用液相色谱与 DAD 检测器联用作为初筛,其灵敏度的局限性导致含量低的阳性样品漏检情况的发生。同时由于样品基质的干扰,导致部分样品呈现假阳性。采用液相色谱与质谱联用作为样品初筛,可避免阳性样品漏检及错检,并在发现新型添加物方面有一定优势。保健酒及酒类制品中 PDE-5 抑制剂及其衍生物添加种类多,此次发现的有西地那非、伐地那非、氨基他达拉非、羟基豪莫西地那非、丙氧基苯基艾地那非、丙氧基苯基硫代艾地那非、艾地那非、羟基硫代豪莫西地那非和一种新型艾地那非衍生物。

PDE-5 抑制剂及其衍生物的非添加成分从以往单独添加西地那非、他达拉非等成分,到组合添加多种 PDE-5 抑制剂及其衍生物;含量差异从几十纳克到几十毫克;从添加已知成分,到添加结构修饰的新型衍生物。PDE-5 抑制剂及其衍生物非法添加方法方式及组成越来越复杂,为监测工作增加了难度。

消费者以强身健体为目的,购买相关保健酒及酒类制品,却摄入不同剂量的 PDE-5 抑制剂衍生物,其危害严重。产品中非法添加 PDE-5 抑制剂及其衍生物的添加形式多种多样,而检测方法相对滞后,因此急需相关快速高效的检测方法建立。

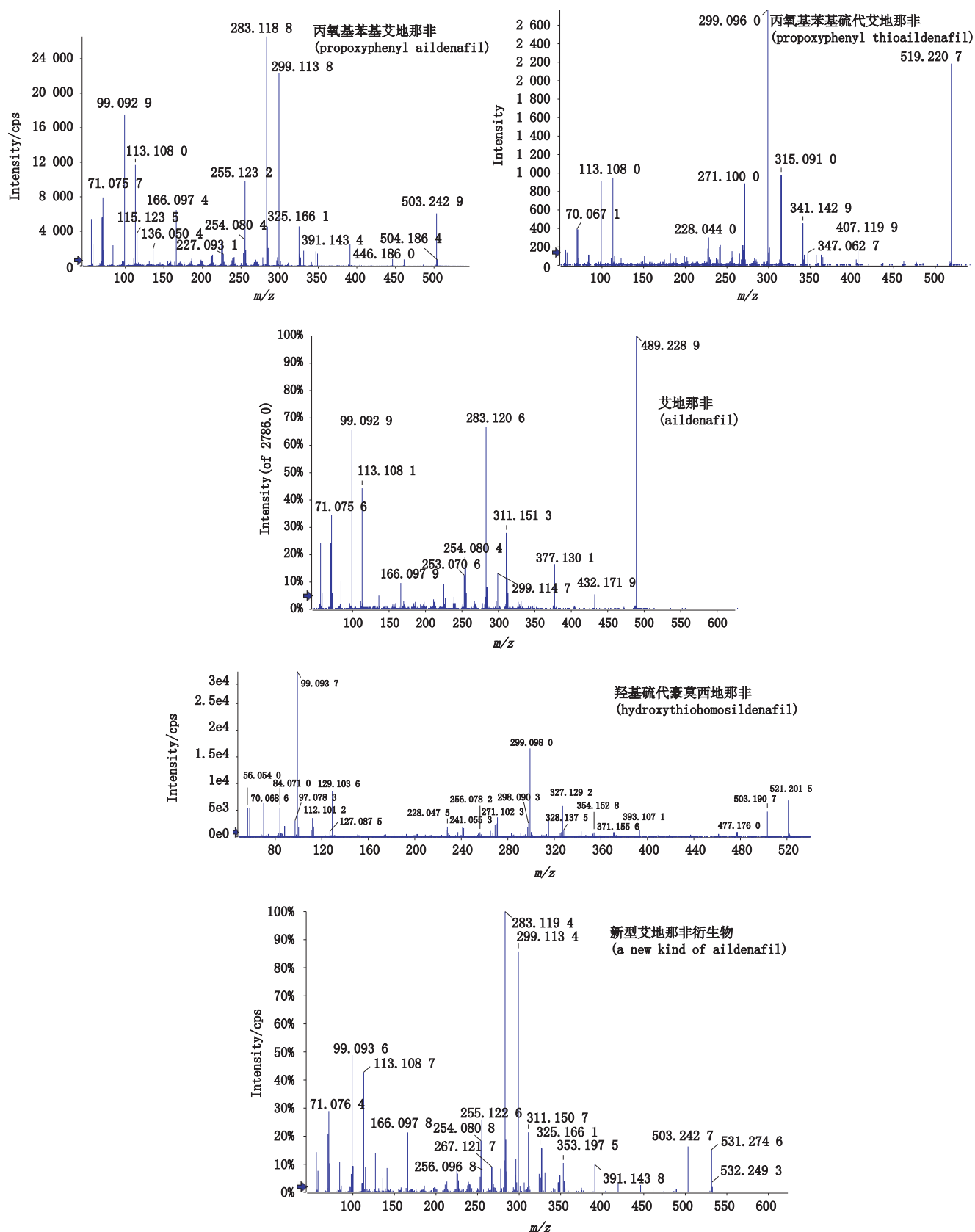


图1 所检测到的5种PDE-5抑制剂衍生物的二级质谱碎片

Fig.1 MS^2 spectra of 5 kinds of PDE-5 inhibitor analogues

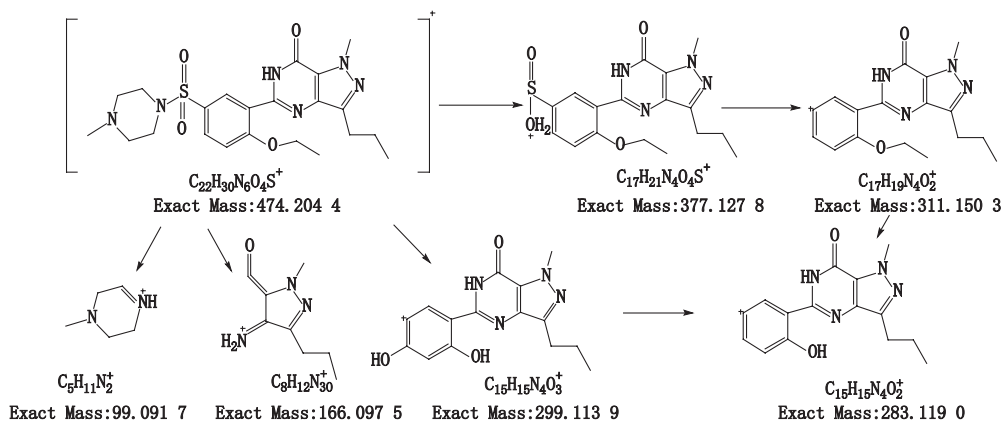


图2 西地那非裂解规律

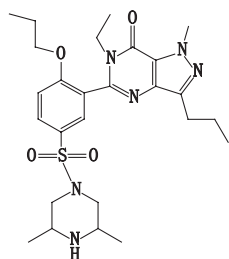
Fig. 2 MS² fragmentation pattern of sildenafil

图3 新型艾地那非衍生物的分子结构

Fig. 3 Molecular structure of the new aildenafil analogue

参考文献

- [1] 万晓芳,肖平. 酒的历史沿革、药理作用及其古今医疗用途[J]. 中医药信息, 1998, 4: 23
WAN XF, XIAO P. The historical development pharmacological action and medicinal uses of the wine[J]. Inf Tradit Chin Med, 1998, 4: 23
- [2] 吴俊芳,壮阳药西地那非的药理研究和临床应用[J]. 国外医学药学分册, 2000, 27(2): 84
WU JF. The pharmacological action and medicinal uses of sildenafil[J]. Foreign Med Sci Sect Pharm, 2000, 27(2): 84
- [3] 高存阁,葛京平. 西地那非治疗勃起功能障碍的现状[J]. 中华男科学, 2002, 8(4): 302
GAO CG, GE JP. The situation of sildenafil in the treatment of men with erectile dysfunction[J]. Natl J Androl, 2002, 8(4): 302
- [4] 国家食品药品监督管理局 药品检验补充检验方法和检验项目批准件补充检验方法(编号 2009030)[S]. 2009
The Supplement Standard of the Drugs from SFDA(No.2009030)[S]. 2009
- [5] VENHUIS BJ, ZOMER G, HAMZIINK M, *et al.* The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: a Viagra with a pop[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54: 735
- [6] LIAO YC, LAI KC, LEE HC, *et al.* Isolation and identification of new sildenafil Analogues from dietary supplements[J]. J Food Drug Anal, 2013, 21(1): 40
- [7] SCHRAMEK N, WOLLEIN Y, EISENREICH W. Identification of new synthetic PDE-5 inhibitors analogues found as minor components in a dietary supplement[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 96: 45
- [8] GE XW, LI L, KOH HL, *et al.* Identification of a new sildenafil analogue in a health supplement[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56: 491
- [9] 吴燕,李华龙,米亚娟. 中药及保健食品中新型 PDE₅ 抑制剂的检测研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(1): 117
WU Y, LI HL, MI YX. Study on the detection of new PDE₅ inhibitor in traditional Chinese medicine and health food[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(1): 117
- [10] 于泓,胡青,张魁,等. 补肾壮阳类中药剂保健食品中 31 种 5 型磷酸二酯酶抑制剂的高分辨四极杆飞行时间质谱定性定量检测方法[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(15): 1312
YU H, HU Q, ZHANG S, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of 31 PDE-5 inhibitors in herbal products and dietary supplements by UPLC/Q-TOF-MS[J]. Chin Pharm J, 2013, 48(15): 1312
- [11] 雷毅,黄艳婷,罗卓雅. 高效液相色谱法测定壮阳保健品中 4 种硫代西地那非类药物[J]. 理化检验-化学分册, 2014, 50(5): 530
LEI Y, HUANG YT, LUO ZY. HPLC determination of 4 thiosildenafil's in sexual promotion health-care nitritives[J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2014, 50(5): 530
- [12] 邓鲲鹏,罗卓雅,雷毅. 补肾壮阳类健康产品中艾地那非的检测方法研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(18): 1441
DENG KP, LUO ZY, LEI Y. Detection of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor aildenafil in health care products for promoting sexual function[J]. Chin Pharm J, 2011, 46(18): 1441
- [13] KEEA CL, GEA XW, KOH HL, *et al.* Isolation and characterization of propoxyphenyl linked sildenafil and thiosildenafil analogues in health supplements[J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 70: 265
- [14] 马春艳,段琼,封淑华. 一种新型 PDE-5 抑制剂衍生物的发现及结构鉴定[J]. 分析测试学报, 2016, 35(5): 551
MA CY, DUAN Q, FENG SH. Discovery and structure identification of a new phosphodiesterase-5 inhibitor derivative[J]. J Instrum Anal, 2016, 35(5): 551

(本文于 2016 年 2 月 3 日收到)