DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251201003
引用格式: 夏金涛, 朱松松, 吴婉琴, 等. 高分辨质谱“诊断离子”结合核磁共振表征检测食品中伐地那非药品去-N-乙基衍生物[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(7): 38–46.
XIA JT, ZHU SS, WU WQ, *et al*. Determination of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug in foods based on high-resolution mass spectrometry “diagnostic ion” coupled with nuclear magnetic resonance characterization [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(7): 38–46. (in Chinese with English abstract).

高分辨质谱“诊断离子”结合核磁共振表征检测食品中伐地那非药品去-N-乙基衍生物

夏金涛[1,2,3*], 朱松松[1,2,3], 吴婉琴[1,2,3], 江 丰[1,2,3]

[1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430075; 2. 国家市场监督管理总局重点实验室(动物源性食品中重点化学危害物检测技术), 武汉 430075; 3. 湖北时珍实验室, 武汉 430065]

摘 要: 目的 建立一种基于高分辨质谱“诊断离子”策略结合核磁共振波谱法分析的食品中伐地那非药品去-N-乙基衍生物的分析方法。**方法** 待测样品经甲醇水溶液溶解, 超声提取后, 注入高分辨质谱采样, 分析确定未知物的那非类型。阳性样品中的未知物经提取、富集、净化、浓缩后, 进行核磁共振波谱表征。采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(ultra performance liquid chromatography-coupled triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-MS/MS)定量检测食品基质中的伐地那非衍生物。**结果** 未知物经核磁共振波谱表征被确证为伐地那非药品去-N-乙基衍生物。UPLC-MS/MS 分析表明: 伐地那非药品去-N-乙基衍生物在 4 种基质中的质谱响应在 2~100 ng/mL 质量浓度范围内线性良好, 4 个加标浓度下的平均回收率为 74.07%~110.05%, 相对标准偏差为 0.36%~5.09%。检出限(S/N=3)和定量限(S/N=10)分别为 0.05 mg/kg 和 0.10 mg/kg。采用本方法对 50 批次样品进行测定, 在 5 批次样品中检出伐地那非药品去-N-乙基衍生物, 含量为 722~1548 mg/kg。**结论** 该方法无需复杂样品前处理、灵敏度高、准确度好, 经 6 家检验检测机构复验, 可满足常规实验室检测食品中伐地那非药品去-N-乙基衍生物的要求。

关键词: 高分辨质谱“诊断离子”; 核磁波谱; 非靶向筛查; 伐地那非衍生物; 定量检测

Determination of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug in foods based on high-resolution mass spectrometry “diagnostic ion” coupled with nuclear magnetic resonance characterization

XIA Jin-Tao[1,2,3*], ZHU Song-Song[1,2,3], WU Wan-Qin[1,2,3], JIANG Feng[1,2,3]

(1. *Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test*, *Wuhan* 430075, *China*; 2. *Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food*, *State Administration for Market Regulation*, *Wuhan* 430075, *China*; 3. *Hubei Shizhen Laboratory*, *Wuhan* 430065, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for detecting of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug

收稿日期: 2025-12-01
基金项目: 湖北省自然科学基金联合基金项目(2025AFD726); 国家市场监督管理总局科技计划项目(2024MK085)
第一作者/*通信作者: 夏金涛(1991—), 男, 博士, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 2501820896@qq.com

in foods by high-resolution mass spectrometry “diagnostic ion” coupled with nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Methods** The samples to be tested were dissolved in methanol/H_2O, extracted by ultrasound and injected into high-resolution mass spectrometry to analyze and determine the nafil-type of the unknown compound. After extraction, enrichment, purification and concentration of the targeted analyte in the positive sample, it was identified through nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis. A quantitative method for detecting of vardenafil derivative in foodstuffs was developed by ultra performance liquid chromatography-coupled triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Results** The unknown compound was characterized as de-N-ethyl derivative of vardenafil drug. UPLC-MS/MS analysis showed that the mass spectrometric response of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug in 4 kinds of food matrix were well linear in the mass concentration range of 2–100 ng/mL. The spiking average recovery rate in 4 kinds of food matrix were ranged from 74.07%–110.05% with relative standard deviations of 0.36%–5.09% in 4 different concentrations. The limits of detection (S/N=3) and limits of quantitation (S/N=10) was 0.05 mg/kg and 0.10 mg/kg, respectively. This method was developed and employed to screen 50 batches of samples and de-N-ethyl derivative of vardenafil drug was detected in 5 batches of samples along with a content between 722 mg/kg to 1548 mg/kg. **Conclusion** The established detection method does not require complex sample pretreatment, and has high sensitivity and good accuracy, which can meet the requirements for detecting de-N-ethyl derivative of vardenafil drug in food in routine laboratory tests after being re-examined by 6 inspection and testing institutions.

KEY WORDS: high-resolution mass spectrometry “diagnostic ion”; nuclear magnetic resonance spectroscopy; noN-targeted screening; vardenafil derivatives; quantitative determination

0　引　言

以西地那非(俗称“伟哥”)、伐地那非、他达拉非等为代表的选择性 5 型磷酸二酯酶(type 5 phosphodiesterase, PDE 5)抑制剂在临床上主要用于治疗男性勃起功能障碍[1−3]。由于 PDE 5 功效显著, 近年来, 其在以“功能性食品”名义宣称具有补肾壮阳功效的酒类[4]、压片糖果[5]、咖啡[6−7]、中成药[8]等食品基质[9−10]中时常被检出。有研究表明, 长期或不当摄入含那非类物质的食品或药品可能会造成心脑血管系统、神经系统、消化系统损伤或产生药物相互作用的不良反应[11−13]。为严厉打击向食品中非法添加那非类非食用物质的行为, 国家市场监督管理总局印发了《市场监管总局办公厅关于打击食品中非法添加那非、拉非类物质及其系列衍生物违法行为的意见》, 并在 2025 年发布了新的食品补充检验方法 BJS 202405《食品中西地那非、他达拉非等化合物的测定》, 作为食品中非法添加那非的执法检验方法和依据; 随后, 市场监管部门会同国家卫生健康委发布联合公告, 将那非类、拉非类两类物质纳入食品中可能添加的非食用物质名录。尽管如此, 基于利益的驱使, 将母核结构进行修饰而形成的新型非法添加那非类化合物的数量依然庞大[10,14], 反映出市场监管的复杂性和长期性。

食品中各物质种类/极性不一、含量差异巨大, 现有的标准/方法针对的靶向分析物数量有限, 迫切需要开发高通量非靶向的方法为食品安全监管提供技术支撑。高分辨质谱法具有扫描范围宽, 分辨率高, 质量准确度和灵敏度好的优点, 可实现对多种物质的筛查和定性, 在食品中有机化合物靶向/非靶向筛查领域展现出巨大的应用潜力[15−17]。近年来, 基于高分辨质谱数据库、“诊断离子”、质量亏损或中性丢失、分子网络[18]及代谢组学[19]等研究思路已在有机化合物的靶向/非靶向筛查及识别方面取得了长足的进展。然而, 随着分析目的和分析要求的提高, 协同使用多种分析策略[20], 成为了保障样品高效分析的发展趋势。2022 年, LIANG 等[21]构建了包含 3710 种兽药及其相应代谢物的质谱数据库, 研究、归纳了它们共有的“诊断离子”质谱碎裂特征, 基于“诊断离子”及智能检索程序, 开发了针对复杂食品基质中已知/未知兽药及其代谢物的非靶向筛查方法。近期, XUE 等[22]通过高分辨液相色谱-串联质谱法结合代谢组学分析策略进行兽药残留非靶向筛查分析, 克服了传统方法无法识别数据库以外残留兽药的缺点。2024 年, ZHUANG 等[23]通过氮规则过滤、改进的质量亏损过滤、“诊断离子”和基于特征的分子网络综合策略, 实现了草药中甾体生物碱的快速筛选和系统表征。2025 年, CHEN 等[24]基于“诊断离子”的非靶向筛查策略, 通过人工智能模型获得了数十万种已知与潜在的芬太尼类物质结构, 根据物质的取代模式和特征碎片构建了产物的数据库; 结合筛查候选物的同位素分布相似性和色谱峰特征, 验证了候选物为芬太尼类物质的可能性。

虽然基于高分辨质谱联合多种分析策略的研究方法已在复杂体系中化合物的筛查方面广泛应用, 在已知/未知物的高效识别和精准确证方面依然需要进一步开发。本研究基于那非类化合物的结构特征, 在自建数据库的基础上, 充分运用“诊断离子”策略和核磁共振波谱表征技术,

确证了数批次阳性食品基质中一种非法添加新型伐地那非类化合物, 将其命名为伐地那非药品去-N-乙基衍生物。同时, 基于食品基质对该物质进行了提取和纯化, 并将其作为参考样品用于检验检测方法的开发中。数据库及文本检索显示伐地那非药品去-N-乙基衍生物在现有补充检验方法监管以外, 也鲜见报道该物质在食品中的非法添加。作为 BJS 202405 的有效补充, 本研究为食品中非法添加伐地那非药品去-N-乙基衍生物的检测提供了配套检测方案, 在打击食品违法添加行为、保护消费者健康、维护市场秩序方面实用性强, 同时为疑似那非成分的识别、确证和检测提供了有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

伐地那非药品去-N-乙基衍生物(纯度 99.2%, 自制); N-去乙基伐地那非(纯度 98%, 天津阿尔塔科技有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merk 公司); 甲酸(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 乙酸乙酯、石油醚、三乙胺(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氘代氯仿($CDCl_3$, D 纯度 99%, 美国 Sigma-Aldrich 有限公司); 实验用水均为超纯水。

50 批次以“功能性食品”名义宣称具有补肾壮阳功效的压片糖果(20 批次)、固体饮料(15 批次)、咖啡(10 批次)和配制酒(5 批次)来自于网络上对不同省份的抽样、省稽查局委托送样及日常监测抽样。

1.2 仪器与设备

Triple TOF™ 5600$^+$高分辨液质联用仪(美国 AB Sciex 公司); ACQUITY TQD 三重四极杆-液相色谱-串联质谱联用仪、WATERS ACQUITY UPLC® BEH C_{18}色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司); Ascend™ 600 MHz 全数字化超导核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司); HEI VAP 旋转蒸发仪(德国 Heidolph GmbH 公司); 230 Volt 涡旋振荡器(美国 Talboys 公司); S180H 超声波清洗仪(德国 Elma 公司); ME204E 电子天平(精度 1 mg, 瑞士梅特勒-托利多科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 待检样液的制备

取待检样品适量, 混匀, 固体样品需研细, 液体样品需混匀。称取 1 g (精确至 0.001 g)样品置于 50 mL 比色管中, 加入 40 mL 甲醇水溶液(1:1, *V*:*V*, 下同), 超声提取 15 min, 放冷至室温, 用甲醇水溶液(1:1)定容至刻度。涡旋 1 min, 离心 5 min, 取上清液经有机相滤膜过滤; 续滤液根据实际浓度用甲醇水溶液(1:1)稀释至定量线性范围内, 备用。

1.3.2 对照品的制备

称取阳性食品样品基质约 100 g 于 500 mL 圆底烧瓶中, 分 3 次总共加入 300 mL 甲醇水溶液(9:1), 超声辅助提取 10 min, 振荡 5 min, 用硅藻土过滤。下层液体经旋蒸仪浓缩至约 40 mL 后, 用 100 mL 乙酸乙酯分 3 次萃取; 萃取液经浓缩后, 通过硅胶柱色谱提纯目标物, 收集产品, 真空干燥, 得到伐地那非药品去-N-乙基衍生物(色谱纯, 纯度 99.2%)标准品 52.5 mg。

1.3.3 标准溶液的配制

标准品储备液(200 μg/mL): 精密称取伐地那非药品去-N-乙基衍生物 10 mg(精确至 0.1 mg)用适量甲醇水溶液溶解, 转移至 50 mL 容量瓶中, 并稀释定容至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 200 μg/mL 标准储备液。–18 ℃避光贮存, 有效期 3 个月。

标准品中间工作溶液(1 μg/mL): 准确吸取标准储备液(200 μg/mL) 0.1 mL 置于 20 mL 容量瓶中, 用适量甲醇水溶液定容, 摇匀, 配制成质量浓度为 1 μg/mL 的标准中间工作溶液。–18 ℃避光贮存, 有效期 3 个月。

系列标准品工作溶液: 分别准确吸取 20、50、100、200、500、1000 μL 标准中间工作溶液(1 μg/mL), 置于一组 10 mL 容量瓶中, 加甲醇水溶液定容, 摇匀, 配制成质量浓度分别为 2、5、10、20、50、100 ng/mL 的系列标准工作溶液, 现用现配。

1.4 仪器条件

1.4.1 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪条件

超高效液相色谱仪条件: WATERS ACQUITY UPLC® BEH C_{18}色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相: 0.1%甲酸-水(A)和乙腈(B), 流速: 0.3 mL/min, 进样体积: 2 μL, 柱温: 35 ℃。液相色谱梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 90% A; 1.0~15.0 min, 90%~25% A; 15.0~17.0 min, 25% A; 17.0~17.1 min, 25%~90% A; 17.1~20.0 min, 90% A。

四极杆-飞行时间质谱条件: 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI); 正离子模式; 电喷雾电压(ionspray voltage, IS): 5500 V (ESI+); 气帘气压力(curtain gas pressure, CUR): 35 psi; 雾化气压力(gas pressure 1, GS1): 55 psi; 辅助气压力(gas pressure 2, GS2): 55 psi; 离子源温度(ion source temperature, TEM): 500 ℃; 全扫描一级质谱(mass scan, MS)和二级质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)质量采集范围分别为 50~1000 Da, 100~1000 Da。

1.4.2 傅立叶变换核磁共振波谱条件

傅立叶变换核磁共振(Fourier transform nuclear magnetic resonance, FT-NMR)波谱条件: 取伐地那非药品去-N-乙基衍生物约 10 mg, 溶于 $CDCl_3$中, 以 $CHCl_3$ (δ_H 7.26, δ_C 77.0)峰定标, 核磁共振氢谱(^{1}H nuclear magnetic resonance spectra, ^{1}H NMR)和核磁共振碳谱(^{13}C nuclear magnetic resonance spectra, ^{13}C NMR)的工作频率分别为 600.13 MHz 和 150.95 MHz, 实验温度为 25 ℃, 谱宽分别为 6001.3 Hz 和 27171.0 Hz。异核单量子相关谱(heteronuclear single quantum correlation, HSQC)和异核多键相关谱(heteronuclear multiple-bond correlation, HMBC)

实验分别采用 HSQCEDETGPSISP2.3 和 HMBCGPLPNDQF 标准脉冲程序。HSQC 和 HMBC 的 F_2 维(^{1}H)和 F_1 维(^{13}C)谱宽均分别为 6001.3 Hz 和 27171.0 Hz, 采样数据点阵均为 t_2×t_1=1024×512, 累加次数均为 8。

1.4.3　超高效液相色谱-串联质谱条件

色谱条件: 进样体积: 5 μL, 梯度洗脱: 0~0.8 min, 95% A; 0.8~2.5 min, 95%~5% A; 2.5~3.5 min, 5% A; 3.5~3.6 min, 5%~95% A; 3.6~5.0 min, 95% A。其他均与 1.4.1 保持一致。

质谱条件: 扫描模式: 正离子模式; 检测方式: 多反应监测(multi-reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 2010 V; 离子源温度: 150 ℃; 脱溶剂气温度: 450 ℃; 脱溶剂气流量: 650 L/h。定量离子对为 *m/z* 448.2/151.1, 定性离子对为 *m/z* 448.2/312.2。

1.5　数据处理

采用 Analyst TF 1.8.1 进行质谱数据采集, Library View 进行质谱建库, PeakView® 2.2 进行定性数据分析, Masslynx V4.1 软件进行采样、数据处理分析。采用 Topspin 3.5 进行核磁数据采集, Mestrenova 9.0 进行谱图分析; 采用 Origin 2021 及 ChemDraw 2014 绘制图谱。

2　结果与分析

2.1　那非类化合物质谱裂解规律解析

通过自建数据库及参考文献[25–31], 对食品中常见添加的西地那非[25]、伐地那非[26–30]和他达拉非[31]类化合物的质谱裂解规律进行了归纳总结, 找出共性“诊断离子”, 从而为食品中此类非法添加物的筛查提供依据和线索。

2.1.1　西地那非及其衍生物

西地那非及其衍生物有 4 个主要碎片离子(图 1a): 磺酰胺部分和苯基嘌呤环之间经电荷诱导 C-S 键裂解得到 *m/z* 311.1503, 进一步发生中性丢失脱乙烯得到高丰度碎片离子 *m/z* 283.1190, *m/z* 283.1190 可被氧化得到 *m/z* 299.1139 或中性丢失一分子 CO 得到热力学稳定的 *m/z* 255.1240 碎片。对于在功效基团苯基嘌呤环上进行的取代, 可依据主要碎片同时增加或缺失的质荷比信息, 推测功效基团上取代基的增加或减少。如与西地那非相比, 异丁基西地那非增加了一个亚甲基, 会成对出现 *m/z* 325.1659、313.1295、297.1346 碎片; 硫代西地那非因以硫羰基替代了羰基, 会出现 *m/z* 327.1274、*m/z* 299.0961 碎片。

2.1.2　伐地那非及其衍生物

在前期研究[29]中, 已对伐地那非的主要特征碎片 *m/z* 377.1278、312.1581、284.1268、299.1139、151.0866(图 1b)进行了总结, 此处不再赘述。

2.1.3　他达拉非及其衍生物

他达那非的质谱裂解主要有 4 条途径(图 2)。(1) C-6 位、C-12a 位与 N-5 位, C-1 位与 N-2 位之间断裂脱 $C_3H_7ON_2$ 形成 *m/z* 302.0812 的碎片, 随即发生分子内脱羰形成 *m/z* 274.0863 碎片; (2) C-6 位与 C-6a、N-5 位之间断裂脱 $C_7H_5O_2$ 自由基形成 *m/z* 268.1081 碎片, *m/z* 268.1081 进一步发生分子内脱羰得到 *m/z* 240.1131 碎片, *m/z* 240.1131 进一步发生酰胺 C-N 键和极性 C-N 键断裂形成 *m/z* 169.0760; (3) 哌啶环发生逆 DA 反应形成响应强度最大的 *m/z* 262.0863, 继续发生亚甲基丢失形成 *m/z* 250.0863; (4) *m/z* 390.1448 发生中性丢失或二级碎片进一步发生碎裂形成 *m/z* 135.0441。

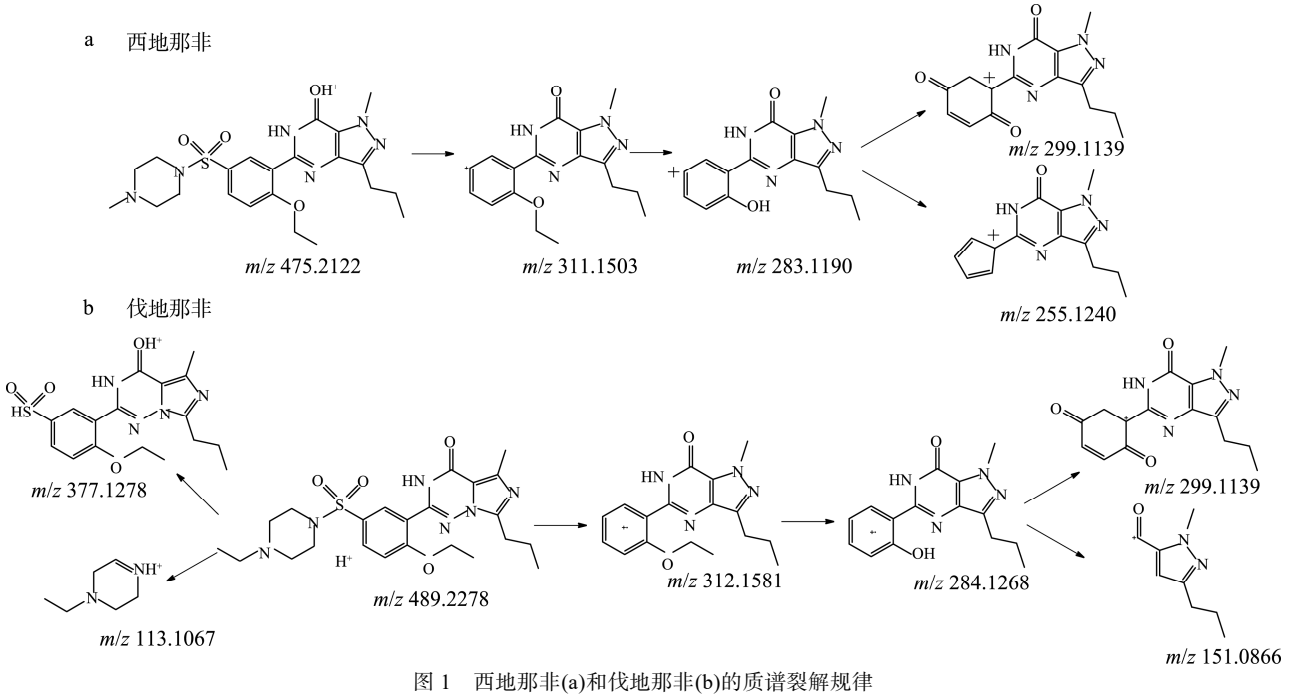


图 1　西地那非(a)和伐地那非(b)的质谱裂解规律

Fig.1　Mass spectrometry fragmentation rules of sildenafil (a) and vardenafil (b)

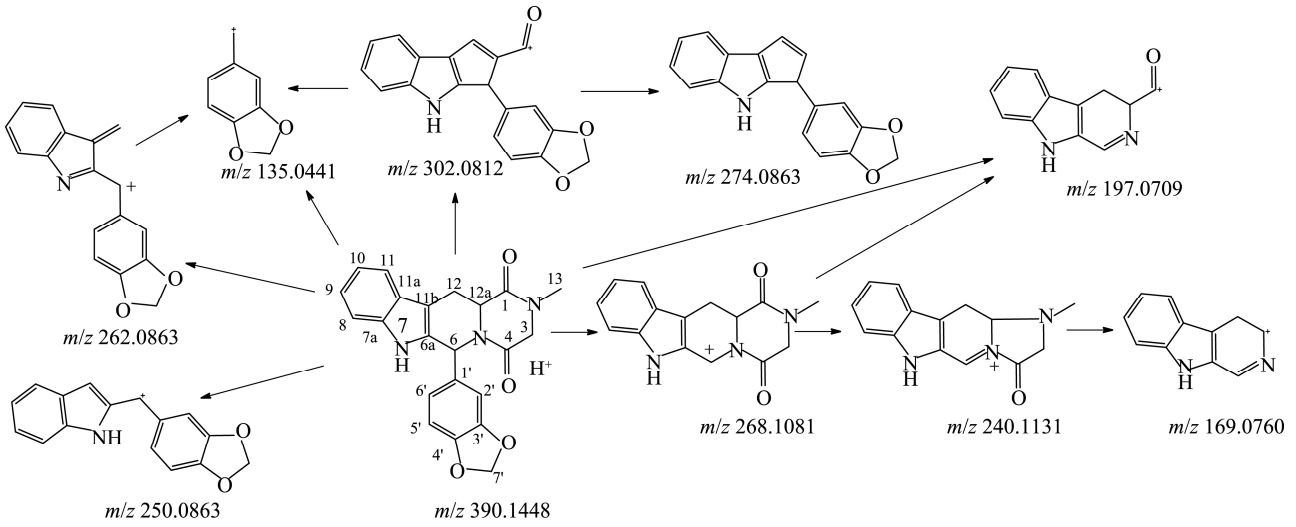


图 2 他达那非的质谱裂解规律

Fig.2 Mass spectrometry fragmentation rules of tadalafil

除此之外, *m/z* 197.0709 碎片被认为是 C-1 与 N-2 位、C-4 与 N-5 位之间断裂或 *m/z* 268.1081 进一步碎裂而形成的碎片离子。目前, 在食品中已确证的他达拉非及其衍生物主要是在 N-2 位发生不同取代形成的衍生物。

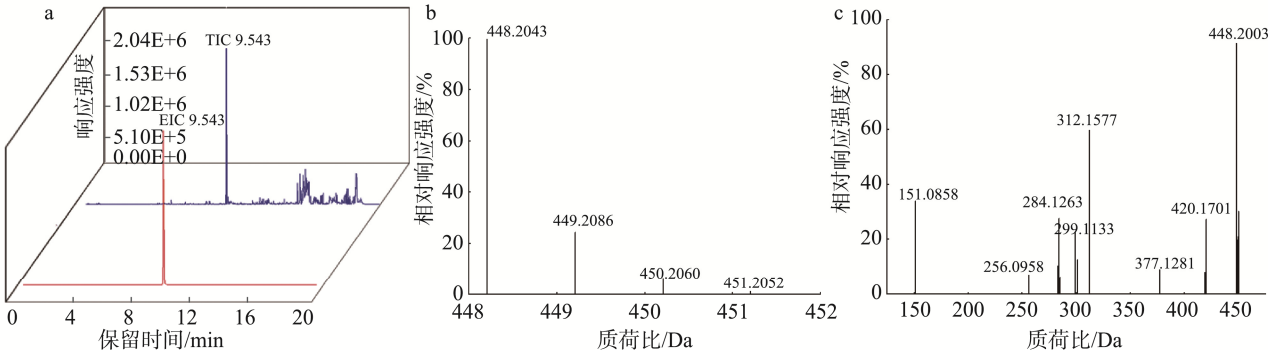
在具体筛查工作中, 可依据实际情况, 结合近期发布的补充检验方法 BJS 202405 所提供的信息及自建数据库信息, 推测筛查成分的结构归属。

2.2 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱非靶向筛查结果分析

采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法对网购的 50 批次样品提取液进行信息依赖采集(information dependent acquisition, IDA)模式采集, 通过自建数据库, 以信号响应阈值大于 50, 阈值与基质空白比大于 10, 提取离子流图峰宽 0.02 Da, 数据库匹配准分子离子偏差±0.4 Da, 碰撞能量±5 eV, 质量偏差±0.4 Da 进行筛查, 设置质量偏差小于 5.0×10^{-6}、保留时间偏差小于 5%、同位素比值偏差小于 10%、数据库匹配得分大于 70%、分子式检索得分大于 70%作为高置信度的阳性确证; 设置质量偏差≥10.0×10^{-6}、保留时间偏差≥15%、同位素比值偏差≥20%、数据库匹配得分≤30%、分子式检索得分≤30%作为阴性确证, 结果表明该物质未与自建数据库中 104 种那非类化合物匹配, 说明样品中不含或含数据库以外的那非类化合物。进一步挖掘数据发现, 在数批次样品提取液中, 保留时间为 9.543 min(图 3a)处的同位素模式(图 3b)表明未知化合物带一个电荷, 准分子离子$[M+H]^+$为 448.2003, 经拟合得到分子式为 $C_{21}H_{29}N_5O_4S$。与伪伐地那非分子式($C_{22}H_{29}N_5O_4S$)相比, 该化合物少了一个碳原子; 与对氧代伪伐地那非(分子式为 $C_{21}H_{27}N_5O_5S$)[27]相比, 该化合物多了两个氢原子, 少了一个氧原子。通过对特征碎片离子 $C_8H_{11}N_2O^+$ (*m/z* 151.0858)、$C_{15}H_{16}N_4O_2^+$ (*m/z* 284.1273)、$C_{15}H_{15}N_4O_3^+$ (*m/z* 299.1133)、$C_{17}H_{20}N_4O_2^+$ (*m/z* 312.1586)及 $C_{17}H_{21}N_4O_4S^+$ (*m/z* 377.1278)(图 3c)分析表明, 该物质为伐地那非类化合物。碰撞发生在 20、35、50 eV 3 个能量下的碎片叠加图(图 3c)显示 *m/z* 448.2003 到 *m/z* 420.1701 丢失了分子量为 28.0302 Da 的碎片, 结合中性丢失 CO (29.9949)、CH_2=CH_2 (28.0313)、N_2 (28.0061)的精确分子量、“诊断离子”及伐地那非类似物的基本结构特征综合判断, 应为发生了麦氏重排丢失了中性碎片 CH_2=CH_2。因此基本确定磺胺氮上的取代为两个乙基, 通过核磁共振波谱表征可以进一步确认其结构。

2.3 NMR 结构确证分析

将 1.3.2 制备得到的参考样品通过 1.4.2 的核磁采样条件进行数据采集, 并对分析物进行结构解析和原子编号归属。在 ^{1}H NMR 谱(图 4a)中, 显示 29 个质子信号; 其中芳基区化学位移 δ (ppm) 9.68 (s, 1H)对应酰胺的活泼 N-H; 8.54 (d, *J*=2.28 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J*=8.76, 2.34 Hz, 1H), 7.12 (d, *J*=8.82 Hz, 1H)为三取代苯环上的 C-H; 烷基区化学位移 4.33 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), 1.59 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)对应 CH_3CH_2O-; 3.00 (t, *J*=7.56 Hz, 2H), 1.87 (sex, *J*=7.44 Hz, 2H), 1.02 (t, *J*=7.32 Hz, 3H)对应 $CH_3CH_2CH_2$-; 2.63 (s, 3H)对应 CH_3-; 通过与 N-去乙基伐地那非的核磁谱图对比, 验证这些 ^{1}H NMR 信号符合伐地那非母核结构的基本特征。在烷基区 3.29 (q, *J*=7.08 Hz, 4H), 1.18 (t, *J*=7.14 Hz, 6H)的信号推测为一对对称的乙基取代结构。综合质谱分析研究并结合 ^{13}C NMR 谱(图 4b)、无畸变极化转移(distortionless enhancement by polarization transfer, DEPT135)、HSQC 和 HMBC, 确证该化合物化学名称为 4-乙氧基-N,N-二乙基-3-(5-甲基-4-氧代-7-丙基-3,4-二氢咪唑并[5,1-f][1,2,4]三嗪-2-基)苯磺酰胺, 简称伐地那非药品去-N-乙基衍生物, 由伐地那非哌嗪环上的 N-乙基被移除而得到。伐地那非药品去-N-乙基衍生物结构式如图 4 谱图中内插图所示, ^{1}H NMR、^{13}C NMR、DEPT135、HSQC、HMBC 谱数据归属列于表 1。



注: 总离子流图(total ion chromatogram, TIC), 提取离子流图(extracted ion chromatogram, EIC)。

图 3　未知物的质谱色谱图(a)、同位素模式图(b)和碎片离子图(c)

Fig.3　Mass spectrometry chromatogram (a), isotope pattern diagram (b) and fragment ion diagram (c) of the unknown substance

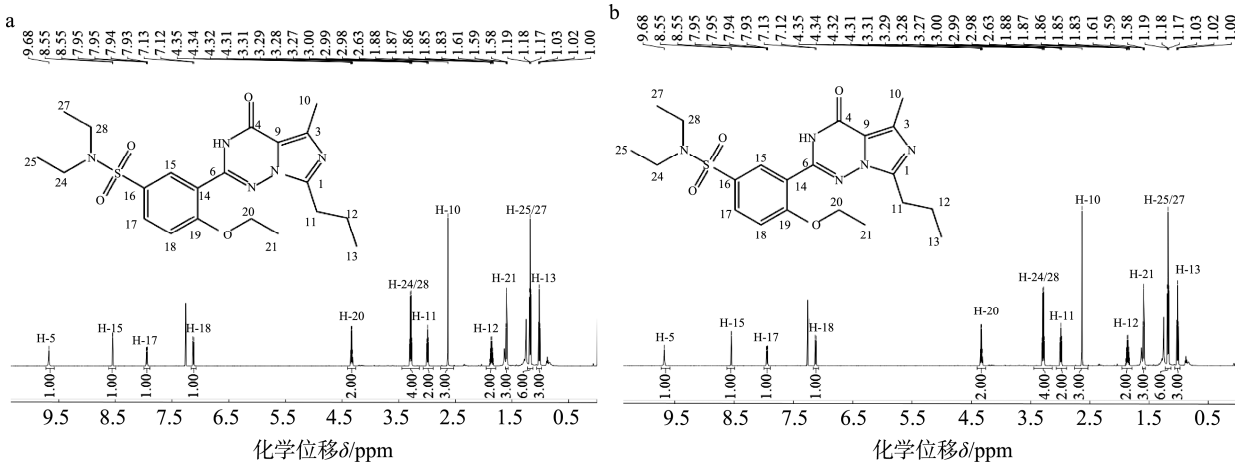


图 4　伐地那非药品去-N-乙基衍生物的 ^{1}H NMR 谱(a)与 ^{13}C NMR 谱(b)

Fig.4　^{1}H NMR (a) and ^{13}C NMR (b) spectra of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug

表 1　伐地那非药品去-N-乙基衍生物的 NMR 数据

Table 1　NMR data of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug

序号	^{1}H (δ_H)	^{13}C (δ_C)	DEPT135	HMBC	HSQC
1	-	146.36	0	H-11/H-12	-
3	-	140.35	0	H-10	-
4	-	154.60	0	H-10 (weak)	-
5	9.68 (1H, brs)	-	-	-	-
6	-	144.64	0	H-15/H-18 (weak)	-
9	-	113.69	0	H-10/H-5 (weak)	-
10	2.63 (3H, s)	14.51	3	-	H-10/C-10
11	2.99 (2H, t, *J*=7.56 Hz)	28.03	2	H-12/H-13	H-11/C-11
12	1.87 (2H, sex, *J*=7.44 Hz)	21.00	2	H-11/H-13	H-12/C-12
13	1.02 (3H, t, *J*=7.32 Hz)	13.97	3	H-11/H-12	H-13/C-13
14	-	118.43	0	H-18	-
15	8.52 (1H, d, *J*=2.28 Hz)	129.37	1	H-17	H-15/C-15
16	-	134.07	0	H-18/H-15 (weak)/H-17 (weak)	-
17	7.95 (1H, dd, *J*=8.76, 2.34 Hz)	131.82	1	H-15	H-17/C-17
18	7.12 (1H, d, *J*=8.82 Hz)	113.10	1	-	H-18/C-18
19	-	159.39	0	H-17/H-18 (weak)/H-15/H-20	-
20	4.33 (2H, q, *J*=6.96 Hz)	66.02	2	H-21	H-20/C-20
21	1.59 (3H, t, *J*=6.96 Hz)	14.54	3	H-20	H-21/C-21
24/28	2.89 (4H, q, *J*=7.14 Hz)	42.02	2	H-25/H-27	H-24/C-24 H-28/C-28
25/27	1.18 (6H, t, *J*=7.14 Hz)	14.14	3	H-24/H-28	H-25/C-25 H-27/C-27

注: -表示无信号; weak 表示信号相关弱。

2.4 超高效液相色谱-串联质谱法的开发与应用

现行食品安全国家标准及食品补充检验方法 BJS 202405 中未有伐地那非药品去-N-乙基衍生物的检测方案，因此建立并验证伐地那非药品去-N-乙基衍生物的定量检测方法将为样品中该物质的检测和稽查办案提供技术支持。

2.4.1 标准曲线及线性范围

按照 1.4.3 超高效液相色谱-串联质谱仪条件，研究以定量离子通道 *m*/*z* 448.2>151.1 的峰响应信号为纵坐标(*Y*)，伐地那非药品去-N-乙基衍生物质量浓度为横坐标(*X*, ng/mL)进行线性回归分析。检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)参照 BJS 202405 及方法在各仪器及检测机构的普适性分别以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算。结果表明：在质量浓度 2~100 ng/mL 线性范围内，方法的线性方程为 Y=1678.2X+2250.5，相关系数(r^2)为 0.998; LOD 为 0.05 mg/kg, LOQ 为 0.10 mg/kg。

2.4.2 基质效应

在定量分析中，基质效应影响着定量的灵敏度和准确性。研究参照 1.3.1 的操作步骤通过向阴性基质中添加不同浓度的标准溶液的方法评估了伐地那非药品去-N-乙基衍生物在固体饮料、压片糖果、咖啡、配制酒 4 种常见基质中的基质效应，以基质标曲和溶剂标曲的斜率表示基质效应。若斜率比值大于 100%，表明存在基质增强效应；若斜率比值小于 100%，表示存在基质抑制效应；当斜率比值在 80%~110%之间时，认为基质效应在可接受范围内，可采用溶剂标准曲线进行定量分析。4 种食品基质和溶剂甲醇水溶液(1:1)对目标化合物的基质标准曲线和溶剂标准曲线及基质效应评价见表 2。从表 2 中可见，4 种基质均存在一定基质效应，咖啡的基质效应相对较强，但在可接受范围内，当采用甲醇水溶液(1:1)将咖啡基质稀释 50 倍后，基质效应有所减弱。因此研究针对待检样品采用溶剂标准曲线进行批量食品基质的定量检测。对于实际检出的阳性样品，在前处理过程中可通过增加稀释过程降低基质效应，或通过采用基质标准工作液进行精准定量。

表 2 伐地那非药品去-N-乙基衍生物在 4 种食品基质中的基质效应

Table 2 Matrix effects of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug in 4 kinds of foodstuffs

基质	斜率	相关系数(r^2)	基质效应/%
乙腈-水	1678.2	0.9976	/
固体饮料	1573.2	0.9963	93.74
压片糖果	1774.9	0.9974	105.76
咖啡	1385.0	0.9977	82.50
配制酒	1657.0	0.9971	98.74

注: /为未有相关数值。

2.4.3 重复性和精密度

分别称取固体饮料、压片糖果、咖啡和配制酒的空白基质样品各 24 份，分别制备成 LOQ、2LOQ、10LOQ, 100LOQ 4 个含量水平的加标测试样，每个水平制备 6 份平行样，以考察方法的重复性和精密度。在 4 种基质中伐地那非药品去-N-乙基衍生物的加标回收率在 74.07%~110.05%之间，相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 0.36%~5.09%之间，4 种基质的重复性实验的回收率范围和相对标准偏差满足分析要求。具体结果见表 3。

2.4.4 方法验证及阳性样品测定

采用建立的方法，按照 1.3.1 的前处理方式分别对 50 批次宣称具有壮阳功效的食品进行测定，结果在 2 批次硬质压片糖果、2 批次固体饮料和 1 批次咖啡中检出伐地那非药品去-N-乙基衍生物，含量在 722~1548 mg/kg 之间。研究方案被提供给 6 家检验检测机构进行了方法验证和一批次压片糖果阳性样品(图 5)复测，结果表明阳性样品的检出均值为 937 mg/kg，标准偏差为 5.69%，方法具有较好的重现性。

表 3 伐地那非药品去-N-乙基衍生物在 4 种食品基质中的平均加标回收率及相对标准偏差(*n*=6)

Table 3 Average recoveries and relative standard deviations of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug in 4 kinds of foodstuffs (*n*=6)

物质	加标含量/(mg/kg)	固体饮料		压片糖果		咖啡		配制酒	
		平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%
伐地那非药品去-N-乙基衍生物	0.1	93.63	4.43	74.07	1.79	84.58	2.58	88.88	3.20
	0.2	100.55	3.71	97.45	5.09	95.75	4.11	98.02	2.22
	1.0	101.00	1.36	110.05	3.45	104.53	1.52	104.77	1.42
	10.0	99.82	0.36	104.25	2.42	102.70	1.37	102.39	1.22

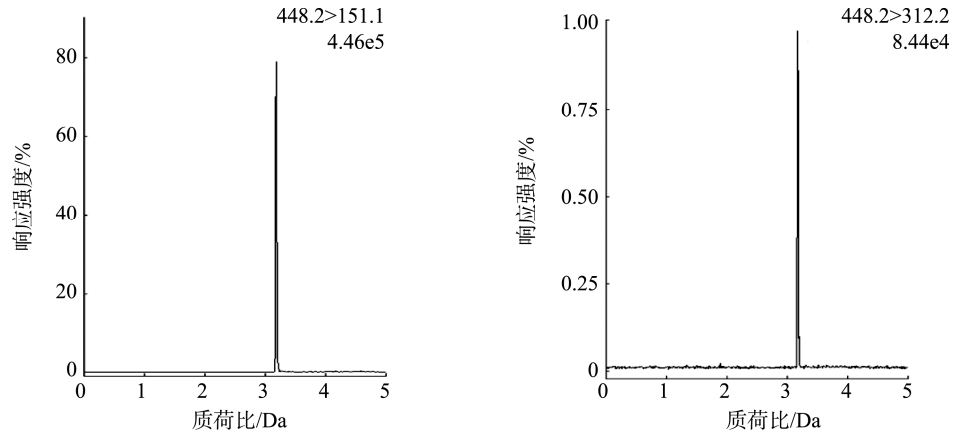


图 5　阳性样品中伐地那非药品去-N-乙基衍生物的 MRM 图

Fig.5　MRM spectra of de-N-ethyl derivative of vardenafil drug in positive sample

3　结论与讨论

本研究基于那非类化合物的结构特征, 在自建数据库的基础上, 总结了非法添加那非类化合物的典型“诊断离子”, 结合质谱筛查识别和核磁共振波谱表征技术, 实现了对硬质压片糖果中一种非法添加新型伐地那非药品去-N-乙基衍生物的精准确证, 并利用分离得到的参考样品建立了灵敏度高、可靠性好、普适性强的液相色谱-串联质谱法。方法经 6 家省级机构验证和阳性样品复测, 均呈现出较好的稳定性和复现性。与 BJS 202405 相比, 方法在检出限, 定量限上相当, 检测线性范围更宽, 分析时间更短(针对单一物质进行检测), 能够为食品中非法添加伐地那非药品去-N-乙基衍生物的监管提供技术支撑。与之前的研究相比, 该方法能够快速锁定分析物的类型, 为分子结构的后续精准确证提供了分析方向。然而, 高分辨质谱非靶向筛查分析方法的开发和应用与广泛出现的新型化合物的高通量筛查需求之间仍然存在不小的差距。其数据采集模式产生的庞大质谱数据集使得数据分析及对未知物的解析十分烦琐; 此外, 缺乏全面和标准化的化合物高分辨质谱数据库, 无法对复杂样品中的数据库以外的化合物进行全面识别, 导致存在漏筛和仪器检出限以下的物质无法识别到; 同时质谱系统间的谱图和数据库的普适性也有待提高。非法生产者通过临床三期筛选试用阶段的化合物作为逃避监管的功效成分添加至普通食品中, 从监管的角度考虑, 未知物识别技术的不断进步将对维护市场秩序, 保护消费者健康具有重大的意义。面对不断出现的新型非法添加物的威胁, 通过构建“技术防范+法律监督+社会共治”的立体防线, 才能有效遏制非法添加物的滥用。

参考文献

[1] 郭文钧, 高冉, 樊天斐, 等. PDE5 抑制剂与 cGMP 信号通路相关疾病的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(1): 159–165.
GUO WJ, GAO R, FAN TF, *et al*. Advances in PDE5 inhibitors and diseases related to cGMP signaling pathway [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2021, 37(1): 159–165.

[2] 杨伟. 他达拉非片降阶梯治疗慢性前列腺炎合并勃起功能障碍的效果分析[J]. 中外医疗, 2024, 43(22): 87–90.
YANG W. Analysis of the effect of de-escalation treatment of chronic prostatitis with erectile dysfunction with tadalafil tablets [J]. China & Foreign Medical Treatment, 2024, 43(22): 87–90.

[3] SHIN D, KWON J, KANG HS, *et al*. The presence of unauthorized ingredients in dietary supplements: An analysis of the risk warning data in Korea [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 108: 104462.

[4] 陈燕, 严丽娟, 徐敦明, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测蒸馏酒及其配制酒中 90 种那非类物质[J]. 分析测试学报, 2023, 42(5): 519–530.
CHEN Y, YAN LJ, XU DM, *et al*. Simultaneous determination of 90 nafils in distilled liquor and its products by QuEChERS/high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(5): 519–530.

[5] 冯峰, 常启智, 孙晓, 等. 超高效液相色谱-高分辨质谱法快速测定食品中 107 种那非类非法添加物[J]. 食品科学, 2025, 46(10): 290–298.
FENG F, CHANG QZ, SUN X, *et al*. Rapid determination of 107 illegally added nafils in foods by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Food Science, 2025, 46(10): 290–298.

[6] 夏金涛, 朱松松, 吴婉琴, 等. 基于对照品从头合成策略确证保健食品中非法添加物丙氧基去碳去甲基卡巴地那非[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(2): 249–254.
XIA JT, ZHU SS, WU WQ, *et al*. Identification of illegal additive propoxydescarbon desmethyl carbodenafil in health food based on de novo synthesis strategy of reference substance [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2025, 42(2): 249–254.

[7] 王娟强, 孔维恒, 李慧晨, 等. 食品中新型那非衍生物丙氧苯基羟基伐地那非的筛查和定量测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(12): 50–58.
WANG JQ, KONG WH, LI HC, *et al*. Screening and quantitative determination of novel nafil derivative propoxyphenylhydroxyvardenafil in foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(12): 50–58.

[8] 廖敏, 王影超, 陈琪, 等. 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[J]. 质谱学报, 2025, 46(3): 370–379.
LIAO M, WANG YC, CHEN Q, *et al*. 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 [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2025, 46(3): 370–379.

[9] YUSOP AYM, XIAO L, FU S. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry analysis of erectile dysfunction drugs and their analogues in food products [J]. Forensic Science International, 2021, 322: 110748.

[10] 宁霄, 金绍明, 李志远, 等. 功能性老年乳粉中 300 种非法添加药物及其类似物的液相色谱-高分辨质谱分析[J]. 色谱, 2023, 41(11): 960–975.
NING X, JIN SM, LI ZY, *et al*. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry analysis of 300 illegally added drugs and their analogues in functional milk powder for the elderly [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(11): 960–975.

[11] FRANCESCO S, SHAANTANU D, TAREK AH, *et al*. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction: Pharmacology and clinical impact of the sildenafil citrate orodispersible tablet formulation [J]. Clinical Therapeutics, 2017, 39(2): 370–377.

[12] ALI K, MARWA MK, AMANY MG, *et al*. Ameliorative effects of sildenafil and/or febuxostat on doxorubiciN-induced nephrotoxicity in rats [J]. European Journal of Pharmacology, 2017, 805(7): 118–124.

[13] TJAŠA E, SAMO K. Common risks of adulterated and mislabeled herbal preparations [J]. Food and Chemical Toxicology. 2019, 123: 288–297.

[14] KEE CL, GE XW, GILARD V, *et al*. A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 147: 250–277.

[15] YANG YS, CHEN JX, LI GY, *et al*. Recent developments and workflows of noN-targeted LC-HRMS screening in the detection of veterinary drug residues in foods [J]. TrAC, Trends in Analytical Chemistry, 2025, 191: 118314.

[16] CHEN TT, LIANG WY, ZHANG XQ, *et al*. Screening and identification of unknown chemical contaminants in food based on liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and machine learning [J]. Analytica Chimica Acta, 2024, 1287: 342116.

[17] 范轶欣, 迟英欣, 杨路平, 等. 高分辨质谱技术在环境和食品风险物质非靶向筛查检测中应用的研究进展[J]. 预防医学论坛, 2023, 29(12): 955–960.
FAN YOU, CHI YX, YANG LP, *et al*. Advances in the application of high-resolution mass spectrometry in noN-targeted screening and detection of environmental and food risk substances [J]. Preventive Medicine Tribune, 2023, 29(12): 955–960.

[18] 谈晓梅, 张雨薇, 焦昭钰, 等. 基于分子网络技术识别新污染物及其转化产物的研究进展[J]. 色谱, 2025, 43(1): 33–42.
TAN XM, ZHANG YM, JIAO ZY, *et al*. Advances in molecular networking technology for discovering emerging contaminants and transformation products [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(1): 33–42.

[19] 孙晓珊, 路鑫, 许国旺. 基于高分辨质谱的代谢组学分析技术研究进展[J]. 质谱学报, 2021, 42(5): 787–803.
SUN XS, LU X, XU GW. New advances in analytical methods for high resolution mass mass spectrometry-based metabolomics [J].Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(5): 787–803.

[20] 石培育, 宋娟, 蒋锡兰, 等. 高分辨质谱非靶向筛查分析方法在食品化学危害物监测中的研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(19): 317–331.
SHI PY, SONG J, JIANG XL, *et al*. Research progress on noN-targeted screening methods with high resolution mass spectrometry for food chemical hazards monitoring [J]. Food Science, 2024, 45(19): 317–331.

[21] LIANG WY, ZHENG FJ, CHEN TT, *et al*. Nontargeted screening method for veterinary drugs and their metabolites based on fragmentation characteristics from ultra high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2022, 369: 130928.

[22] 薛伟锋, 杨爱馥, 栾慎顺, 等. 代谢组学在鱼肉中兽药残留非靶向筛查的新应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(7): 1–11.
XUE WF, YANG AF, LUAN SS, *et al*. New application of metabolomics in noN-targeted screening of residual veterinary drugs in fish [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(7): 1–11.

[23] ZHUANG LX, XIAO K, LU DX, *et al*. A strategy integrating improved mass defect filtering, diagnostic product ions, and molecular network for rapid screening and systematic characterization of steroidal alkaloids in fritillaria ussuriensis [J]. Microchemical Journal, 2024, 205: 111290.

[24] CHEN XQ, XIA B, WU WL, *et al*. Development and application of a comprehensive noN-targeted screening strategy for fentanyl analogues [J]. Journal of Hazardous Materials, 2025, 487: 137232.

[25] 于泓, 胡青, 孙健, 等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法定性筛查保健食品中西地那非及其相关功效类非法添加化合物[J]. 色谱, 2018, 36(10): 1005–1017.
YU H, HU Q, SUN J, *et al*. Qualitative analysis of illegally adulterated sildenafil and related compounds in dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(10): 1005–1017.

[26] LI CZ, WANG XZ, WU SM, *et al*. Separation and structural elucidation of a novel vardenafil analogue as an adulterant in a natural health care dietary supplement [J]. Heliyon, 2023, 9(4): e15428.

[27] 夏金涛, 吴婉琴, 江丰, 等. 压片糖果中一种新型伐地那非衍生物的发现和确证[J]. 分析试验室, 2024, 43(7): 1004–1010.
XIA JT, WU WQ, JIANG F, *et al*. Discovery and confirmation of a new type of vardenafil derivatives in pressed candy [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2024, 43(7): 1004–1010.

[28] ZHAO LH, LIU XP, DONG PZ, *et al*. Isolation and identification of two novel PDE-5 inhibitors illegally added to pressed candies [J].Food Additives & Contaminants: Part A, 2025, 42(2): 180–190.

[29] 夏金涛, 张莉, 吴婉琴, 等. 保健食品中 O-丙基羟基伐地那非的快速筛查、确证和定量测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(21): 13–21.
XIA JT, ZHANG L, WU WQ, *et al*. Rapid screening, identification and quantitative determination of O-propyl hydroxyvardenafil in dietary supplement [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(21): 13–21.

[30] XIA JT, WU WQ, JIANG F, *et al*. A novel vardenafil analog in a healthcare product: Preparation, characterization, and quantification [J]. Heliyon, 2023, 9(9): e19456.

[31] 赖雅琳, 武正华, 缪文清, 等. 2种芳香化酶抑制剂和3种5型磷酸二酯酶抑制剂的电喷雾四极杆飞行时间质谱裂解规律研究[J]. 中南药学, 2021, 19(3): 471–477.
LAI YL, WU ZH, MIAO WQ, *et al*. Fragmentation rules of 2 aromatase inhibitors and 3 phosphodiesterase-5 inhibitors with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Central South Pharmacy, 2021, 19(3): 471–477.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)