

表面增强拉曼光谱法筛查保健酒中那非类药物

Screening of PDE-5 inhibitors in health wine by surface-enhanced Raman spectroscopy

胡家勇^{1,2,3} 周陶鸿^{1,2,3} 姚晓帆^{1,2,3} 袁敏文⁴ 柳迪^{1,2,3}

HU Jia-yong^{1,2,3} ZHOU Tao-hong^{1,2,3} YAO Xiao-fan^{1,2,3} YUAN Min-wen⁴ LIU Di^{1,2,3}

(1. 湖北省食品质量与安全监督检验研究院, 湖北 武汉 430075; 2. 国家市场监督管理总局重点实验室, 湖北 武汉 430075; 3. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北 武汉 430075;

4. 黄石市食品药品检验检测中心, 湖北 黄石 435000)

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan, Hubei 430075, China;

2. Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Wuhan, Hubei 430075, China; 3. Hubei Provincial Engineering and

Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan, Hubei 430075, China;

4. Huangshi Institute for Food and Drug Test, Huangshi, Hubei 435000, China)

摘要:目的:利用表面增强拉曼光谱(SERS)技术快速非靶向筛查保健酒中非法添加那非类药物。方法:制备合适的那非类药物胶体金 SERS 基底,基底与 78 种那非类药物混合后进行 SERS 分析,建立谱图筛查数据库,以匹配度是否高于 70% 作为评判是否疑似添加那非类药物的依据。最后考察方法的灵敏度和特异性。结果:那非类药物胶体金 SERS 基底最佳制备方式为 98.3 mL 超纯水中加入 1.0 mL 1% 氯金酸和 0.7 mL 1% 柠檬酸三钠;最低检出质量浓度分别为西地那非 0.05 mg/L、他达拉非 0.5 mg/L、硫代西地那非 0.05 mg/L、乙酰伐地那非 0.1 mg/L;对模拟样品进行检测,其定性结果与高效液相色谱—质谱法测量结果一致。结论:理论上,该方法可非靶向筛查出保健酒中非法添加的那非类药物。

关键词:表面增强拉曼光谱;保健酒;非法添加;那非类药物;非靶向筛查;聚类分析

Abstract: Objective: A surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) method was developed for non-targeted screening of PDE-5 inhibitors in health wine. Methods: An appropriate SERS base of colloidal gold was prepared, and SERS analysis was conducted after the base was mixed with 78 kinds of PDE-5

inhibitors. The spectrogram screening database was established, and whether the matching degree was higher than 70% was used as the basis for judging whether the PDE-5 inhibitors were suspected to be added. Finally, the sensitivity and specificity of the method were investigated. Results: The best method of preparing PDE-5 inhibitors of SERS base was adding 1.0 mL 1% chlorauric acid and 0.7 mL 1% trisodium citrate into 98.3 mL ultrapure water. The lowest concentrations were sildenafil 0.05 mg/L, tadalafil 0.5 mg/L, thiosildenafil 0.05 mg/L and acevedafenafil 0.1 mg/L, respectively. The qualitative results of simulated samples were consistent with those of HPLC-MS. Conclusion: In theory, this method can be used to screen non-targeted illegal addition of PDE-5 inhibitors in health wine.

Keywords: surface-enhanced Raman spectroscopy; health wine; illegally added; PDE-5 inhibitors; non-targeted screening; cluster analysis

保健酒是指具有特定保健功能的酒,即适宜于特定人群饮用,具有调节机体功能,不以治疗为目的的酒^[1]。保健酒主要以保健、养生、健体为目的,但为增加保健酒的壮阳效果,不法商贩会在酒中非法添加了西地那非(俗称“伟哥”药品成分)等化学成分。那非类药物具有一定毒副作用,若长期饮用添加“伟哥”的“保健酒”,会导致机体内分泌失调、头痛、昏厥、狂躁,引起心血管功能紊乱和呼吸功能衰竭,甚至导致死亡^[2]。目前对于保健酒中那非类药物的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[3-5]、高效液相色谱串联质谱法(HPLC-

基金项目:湖北省市场监督管理局科技计划项目(编号: Hbsejg-kj201915);湖北省重点研发计划项目(编号: 2020BCA091)

作者简介:胡家勇(1990—),男,湖北省食品质量与安全监督检验研究院工程师,硕士。E-mail: hjyong0213@163.com

收稿日期:2022-01-24 **改回日期:**2022-05-20

MS)^[6-9]、HPLC-MS/MS^[10-11]和薄层色谱法^[12]等,此外,免疫法^[13]、红外^[14-15]及离子迁移谱法^[16]等都被尝试用于保健食品中西地那非类药物的测定。目前国标检验方法^[17-18]采用的是HPLC-MS,该方法在检测的灵敏度、选择性和高通量方面优势显著,但是存在检测周期长、仪器昂贵、检验费用高等缺点。目前关于保健食品中那非类药物的检验(无论是色谱法、质谱法,还是拉曼光谱法^[19-21])都是针对已知目标物的靶向检测(HPLC-MS方法亦属于靶向检验)。鉴于食品中非法添加的那非类药物种类高达90种,并且还在不断更新,亟需建立一种非靶向检测技术以实现保健食品中非法添加那非类药物的快速筛查。

研究拟利用表面增强拉曼光谱技术建立那非类药物谱图库以及配套的数据库检索方式,将采集的光谱图导入到非靶向筛查数据库,实现非法添加物的快速初步筛查,以期食品非法添加物检测提供技术支撑。

表1 78种那非类药物标准物质信息

Table 1 Information of the standard substances of 78 kinds of PDE-5 inhibitors

序号	中文名/英文名	CAS	分子式	序号	中文名/英文名	CAS	分子式
1	西地那非/Sildenafil	139755-83-2	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	18	阿伐那非/Avanafil	330784-47-9	C ₂₃ H ₂₆ ClN ₇ O ₃
2	他达那非/Tadalafil	171596-29-5	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	19	艾地那非/Aildenafil	496835-35-9	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S
3	脱硫伐地那非/Imidazosaga-triazinone	139756-21-1	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₂	20	豪莫西地那非/Homosildenafil	642928-07-2	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S
4	庆地那非/Gendenafil	147676-66-2	C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₃	21	伐地那非/Vardenafil	224785-90-4	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S
5	那非乙酸酯/Acetil acid	147676-78-6	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄	22	硫代西地那非/Thiosildenafil	479073-79-5	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₃ S ₂
6	苯酰胺那非/Xanthoanthrafil	1020251-53-9	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₆	23	硫代豪莫西地那非/Thio-homosildenafil	479073-80-8	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂
7	氨基他达那非/Amin-otadalafil	385769-84-6	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₄	24	羟基伐地那非/Hydroxy-vardenafil	224785-98-2	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S
8	他达那非甲基氯化物/Chloropretadalafil	171489-59-1	C ₂₂ H ₁₉ ClN ₂ O ₅	25	丙氧苯基艾地那非/Propoxyphenyl aildenafil	1391053-82-9	C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₄ S
9	苯噻啉红地那非/Piperiacetildenafil	147676-50-4	C ₂₄ H ₃₁ N ₅ O ₃	26	乌地那非/Udenafil	268203-93-6	C ₂₅ H ₃₆ N ₆ O ₄ S
10	那红地那非/Noracetildenafil	949091-38-7	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃	去甲基哌嗪基西地那非磺			
11	卡巴地那非/Carbodenafil	944241-52-5	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃	27	酸/Demethylpiperaziny sil-	1357931-55-5	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₅ S
12	伪伐地那非/Pseudovarildenafil	224788-34-5	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	denafil sulfonic acid			
13	那莫西地那非/Norneosildenafil	371959-09-0	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	28	那莫伐地那非/Norneovardenafil	358390-39-3	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄
14	N-去乙基伐地那非/N-Desethylvardenafil	448184-46-1	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	29	硝地那非/Nitrodenafil	147676-99-1	C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₄
15	N-去甲基西地那非/N-Desmethylsildenafil	139755-82-1	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	30	去甲基他达那非/Nortadalafil	171596-36-4	C ₂₁ H ₁₇ N ₃ O ₄
16	红地那非/Acetildenafil	831217-01-7	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	31	吡唑 N-去甲基西地那非/Pyrazole N-desmethylsildenafil	139755-95-6	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S
17	羟基红地那非/Hydroxyacetildenafil	147676-56-0	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₄	32	异丁基西地那非/Isobutylsildenafil	1391053-95-4	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

金纳米溶胶:普拉瑞思科学仪器(苏州)有限公司;
乙酸乙酯、氯金酸、柠檬酸三钠、硫酸、氯化钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

西地那非、他达那非、脱硫伐地那非、庆地那非、那非乙酸酯、苯酰胺那非等78种那非类标准物质(见表1);纯度≥98%,中国药品生物制品研究所;

拉曼光谱仪:inVia型,英国Renishaw公司;

紫外分光光度计:UH5300型,日立公司;

扫描电镜:Quanta650 FEG,美国FEI公司。

1.2 方法

1.2.1 SERS基底制备 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金^[22]。根据氯金酸和柠檬酸三钠溶液的不同配比(见表2),制备不同粒径的胶体金粒子。制备完成后胶体金

续表 1

序号	中文名/英文名	CAS	分子式	序号	中文名/英文名	CAS	分子式
33	双去碳西地那非/Didescarbosildenafil	466684-88-8	C ₂₀ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	57	脱哌嗪基硫代西地那非/Depiperazinothiosildenafil	1353018-10-6	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₄ S ₂
34	伐地那非 哌嗪 酮/Vardenafil oxopiperazine	448184-58-5	C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₅ S	58	乙酰胺基他达那非/Acetaminotadalafil	1446144-71-3	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O ₅
35	西地那非 N-氧化物/Sildenafil N-oxide	1094598-75-0	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₅ S	59	2-羟丙基去甲他达那非/2-Hydroxypropylnortadalafil	1353020-85-5	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₅
36	伐地那非 N-氧化物/Vardenafil N-oxide	448184-48-3	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S	60	乙酰伐地那非/Acetylvarde-nafil	1261351-28-3	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃
37	2-羟乙基去甲他达那非/2-Hydroxyethylnortadalafil	385769-94-8	C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₅	61	丙氧苯基羟基基豪莫西地那非/Propoxyphenyl hydroxy-homosildenafil	139755-87-6	C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₅ S
38	伐地那非二聚体/Vardenafil dimer	1255919-03-9	C ₃₈ H ₄₆ N ₁₀ O ₈ S ₂	62	丙氧苯基硫代艾地那非/Propoxyphenyl thioaidenafil	856190-49-3	C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₃ S ₂
39	米罗那非/Mirodenafil	862189-95-5	C ₂₆ H ₃₇ N ₅ O ₅ S	63	硫唑派非/Thioquinapiperfil	220060-39-9	C ₂₄ H ₂₈ N ₆ OS
40	氯地那非/Chlorodenafil	1058653-74-9	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₄ O ₃	64	氨基西地那非/Aminosildenafil	319491-68-4	C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₄ S
41	Hydroxychlorodenafil/羟基氯地那非	1391054-00-4	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₄ O ₃	65	N-去乙基红地那非/N-Desethylacetildenafil	147676-55-9	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₃
42	N-丁基他达那非/N-Bu-tyltadalafil	171596-31-9	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₄	66	去甲基硫代西地那非/Des-methylthiosildenafil	479073-86-4	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₃ S ₂
43	去甲基卡巴地那非/Des-methylcarbodenafil	147676-79-7	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₃	67	N-叔丁氧羰基-N-去乙基红地那非/N-Boc-N-desethyl acetildenafil	1246820-46-1	C ₂₈ H ₃₈ N ₆ O ₅
44	去碳西地那非/Descarbonsildenafil	1393816-99-3	C ₂₁ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	68	N-乙基他达那非/N-Ethyl-tadalafil	1609405-34-6	C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₄
45	二甲基红地那非/Dimethylacetildenafil	1290041-88-1	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	69	O-去乙基西地那非/O-Desethylsildenafil	139755-91-2	C ₂₀ H ₂₆ N ₆ O ₄ S
46	二硫代去甲基卡巴地那非/Dithio-desmethylcarbodenafil	1333233-46-7	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ OS ₂	70	N-苯丙烯基他达那非/N-Phenylpropenyltadalafil	2064212-00-4	C ₃₀ H ₂₄ N ₄ O ₄
47	酮红地那非/Oxohongdenafil	1446144-70-2	C ₂₅ H ₃₂ N ₆ O ₄	71	N-去乙基-N-甲基伐地那非/N-Desethyl-N-methyl-vardenafil	224785-87-9	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S
48	N-辛基去甲他达那非/N-Octylnortadalafil	1173706-35-8	C ₂₉ H ₃₃ N ₃ O ₄	72	硫代艾地那非/Thioaidenafil	856190-47-1	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂
49	双酮红地那非/Dioxohongdenafil	1609405-33-5	C ₂₅ H ₃₀ N ₆ O ₅	73	双氯地那非/Dichlorodenafil	1446089-84-4	C ₁₉ H ₂₀ Cl ₂ N ₄ O ₂
50	羟基硫代伐地那非/Hydroxythiovardenafil	912576-30-8	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S ₂	74	哌唑那非/Piperazonifil	1335201-04-1	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₄
51	环戊那非/Cyclopentynafil	1173706-34-7	C ₂₆ H ₃₆ N ₆ O ₄ S	75	丙氧苯基硫代西地那非/Propoxyphenyl thiosildenafil	479073-87-5	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂
52	丙氧苯基硫代羟基豪莫西地那非/Propoxyphenyl thiohydroxyhomosildenafil	479073-90-0	C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₄ S ₂	76	丙氧苯基硫代豪莫西地那非/Propoxyphenyl thiohomosildenafil	479073-88-6	C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₃ S ₂
53	苄西地那非/Benzylsildenafil	1446089-82-2	C ₂₈ H ₃₄ N ₆ O ₄ S	77	羟基硫代红地那非/Hydroxythioacetildenafil	1159977-47-5	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃ S
54	桂地那非/Cinnamylidenafil	1446089-83-3	C ₃₂ H ₃₈ N ₆ O ₃	78	亚硝地那非/Mutaprodenafil	1387577-30-1	C ₂₇ H ₃₅ N ₉ O ₅ S ₂
55	罗地那非碳酸酯/Lodenafil carbonate	398507-55-6	C ₄₇ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁ S ₂				
56	丙氧苯基西地那非/Propoxyphenylsildenafil	877777-10-1	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S				

表 2 胶体金制备

Table 2 The preparation of colloidal gold with sodium citrate

编号	超纯水/mL	1%氯金酸添加量/mL	1%柠檬酸添加量/mL
1	97.0	1.0	2.0
2	97.5	1.0	1.5
3	98.0	1.0	1.0
4	98.3	1.0	0.7
5	98.5	1.0	0.5
6	98.6	1.0	0.4

粒子在 200~800 nm 波段进行紫外光谱扫描。

1.2.2 标准溶液配制 用甲醇分别将 78 种那非类物质的标准品配制成 100 mg/L 的标准溶液, -18 °C 下避光保存。使用前需恢复至室温。

1.2.3 样品前处理 吸取 1 mL 试样于 15 mL 离心管中, 向离心管中加入 4 mL 乙酸乙酯, 振荡涡旋 5 min 后 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上层有机相并定容至 5 mL, 上层有机相为提取液 A。吸取 1 mL 提取液 A 于 10 mL 离心管中, 加入 4 mL 0.3 mol/L 硫酸溶液, 振荡涡旋 5 min 后 3 000 r/min 离心 5 min, 收集下层溶液并定容至 5 mL, 下层溶液为提取液 B。依次向检测瓶中加入 500 μ L 纳米金溶胶, 100 μ L 提取液 B, 100 μ L 1% 的氯化钠溶液, 混匀后上机检测。

1.2.4 拉曼光谱仪测定条件 曝光时间 1 s, 激光功率 100 mW, 扫描次数 1 次, 物镜倍数 50 L, 激光波长 785 nm, 光栅 1 200 L/mm, 扫描范围 650~1 700 cm^{-1} 。

1.3 数据统计分析

采用 OMIC 软件进行数据库的构建, 用 Python 软件对数据进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 胶体金表征

2.1.1 不同粒径胶体金目测评价及紫外光谱表征 当 1% 柠檬酸三钠加入量为 2.0 mL(1 号)和 1.5 mL(2 号)时, 所得到的胶体金呈酒红色, 此时的胶体金粒径较小, 视觉良好透明度高, 无悬浮颗粒出现; 当加入量为 1.0 mL(3 号)和 0.7 mL(4 号)时, 胶体金呈现深红色; 当加入量为 0.5 mL(5 号)和 0.4 mL(6 号)时, 呈砖红色, 且胶体金透明度较低, 有明显肉眼可见的颗粒悬浮物。其中 5 号、6 号放置一段时间出现了聚沉现象, 稳定性差, 而 1 号、2 号、3 号、4 号金纳米溶胶未出现此现象, 溶胶稳定性较好。

由图 1 可知, 6 组纳米金溶胶均有明显的吸收峰, 每组的最大吸光值不同, 1~3 号纳米金胶体的最大吸光度逐渐增大, 4~6 号的最大吸光度逐渐减小。随着柠檬酸三钠添加量逐渐减少, 最大吸收峰发生了明显的红移现象, 因此, 纳米金的最大吸收峰随其粒径的增大而发生红

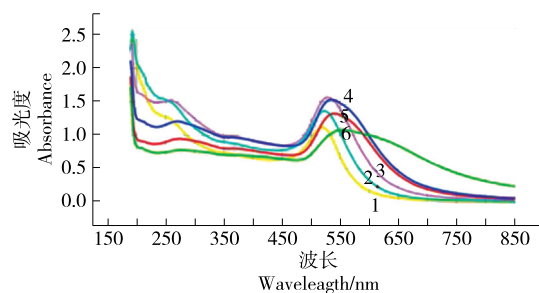


图 1 不同粒径胶体金紫外吸收光谱

Figure 1 UV of colloidal gold with different particle sizes

移, 与文献[23]研究结果一致。

2.1.2 金纳米溶胶灵敏度性能评价 基底的灵敏度是评估基底是否合适的指标, 其中, 基底的灵敏度通常由增强因子^[24](EF)表示, 增强因子数学表达式为:

$$E_{\lambda} = \frac{|E_{\text{out}(\lambda)}|^2}{|E_{\text{out}(\lambda-\lambda_s)}|^2} = \frac{I_{\text{SERS}}}{I_{\text{R}}} \times \frac{N_{\text{R}}}{N_{\text{SERS}}}, \quad (1)$$

式中:

E_{λ} ——增强因子;

I_{SERS} ——分析物的 SERS 光谱中选定的特征峰的强度;

I_{R} ——分析物的常规 Raman 光谱中选定的特征峰的强度;

N_{SERS} ——SERS 光谱采集的被分析物分子的相应数量;

N_{R} ——常规 Raman 光谱采集的被分析物分子的相应数量。

选取西地那非作为目标物进行灵敏度试验。

对于金溶胶溶液拉曼增强基底, SERS 探测和普通拉曼探测时的有效散射体积可认为相同, 此时 SERS 增强因子按式(2)^[25]计算:

$$E_{\lambda} = \frac{I_{\text{SERS}}}{I_{\text{R}}} \times \frac{C_{\text{R}}}{C_{\text{SERS}}}, \quad (2)$$

式中

E_{λ} ——增强因子;

I_{SERS} ——分析物的 SERS 光谱中选定的特征峰的强度;

I_{R} ——分析物的常规 Raman 光谱中选定的特征峰的强度;

C_{R} ——普通拉曼光谱探测时溶液质量浓度, mg/L;

C_{SERS} ——SERS 光谱探测时溶液质量浓度, mg/L。

1~6 号金纳米溶胶增强因子分别为 2×10^3 , 6×10^3 , 8×10^5 , 1.2×10^6 , 1.5×10^5 , 4×10^3 , 其中 4 号金纳米溶胶增强因子最高。结合目测评价、紫外光谱表征以及灵敏度性能评价对 1~6 号不同金纳米溶胶进行综合评价, 最终结果显示 4 号金纳米溶胶性能最佳, 因此胶体金制备方式为: 在 98.3 mL 超纯水中加入 1.0 mL 1% 氯金酸和

0.7 mL 1%柠檬酸三钠。

2.1.3 金纳米溶胶 SEM 表征 图 2 是 4 号金纳米溶胶的 SEM 图。由图 2 可知,4 号金纳米溶胶粒子分布均匀,形状较为规则,粒径范围为 70~114 nm。

2.2 光谱数据的预处理

在拉曼光谱测试中,荧光是影响拉曼光谱分析的主要因素之一。利用 WIRE 5.0 拉曼光谱分析软件并使用荧光校正+基线校正+一阶导数的方法对光谱进行预处理。

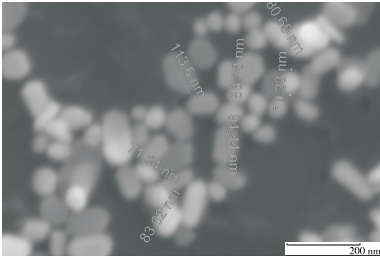


图 2 金纳米溶胶的 SEM 图

Figure 2 SEM image of gold colloid substrates

2.3 自建数据库

按照拉曼光谱仪的测定方式测定 78 种那非类药物,获取拉曼光谱图,并将 SPC 格式的文件导入 OMIC 软件中,同时备注化学药物的名称、CAS 号,构建非靶向筛查数据库。

2.4 数据库的检索

样品经 1.2.3 的前处理方式处理后在 650~1 700 cm⁻¹ 扫描范围的模式下采集光谱,将采集的光谱图导入到非靶向筛查数据库进行检索筛查,检索结果中匹配度高于 70% 的样品被认为是疑似添加了那非类药物^[26]。

2.5 非法添加物归属分析

为了能够确定检索出来的疑似物的类别归属及母核结构,研究基于 78 种那非类药物的拉曼光谱信息数据,通过 Python 软件对 78 种那非类药物进行聚类分析,将 78 种那非类药物分为了 4 种,定义为西地那非类、他达那非类、硫代西地那非类、伐地那非类。结合 2.3 的自建数据库进行那非类疑似药物的筛查及疑似物的母核结构预测。具体分类归属见表 3。

表 3 78 种那非类药物分类

Table 3 Classification of the 78 kinds of PDE-5 inhibitors

类型	化合物	母核结构
西地那非类	西地那非、豪莫西地那非、那莫西地那非、丙氧苯基羟基豪莫西地那非、去碳西地那非、脱硫伐地那非、哌唑那非、氨基西地那非、羟基氯地那非、乌地那非、西地那非 N-氧化物、罗地那非、双去碳西地那非、苄西地那非、异丁基西地那非、丙氧苯基艾地那非、艾地那非、N-去甲基西地那非、米罗那非、庆地那非、双氯地那非、氯地那非、去甲基卡巴地那非、卡巴地那非、O-去乙基西地那非、丙氧苯基西地那非、红地那非、羟基红地那非、N-去乙基红地那非、苯噻啉红地那非、N-叔丁氧羟基-N-去乙基红地那非、桂地那非、硝地那非、那非乙酰胺、苯酰胺那非、吡啉 N-去甲基西地那非、双酮红地那非、酮红地那非、那红地那非、二甲基红地那非	
他达那非类	氨基他达那非、他达那非、2-羟乙基去甲他达那非、他达那非甲基氯化物、乙酰氨基他达那非、N-丁基他达那非、2-羟丙基去甲他达那非、去甲基他达那非、N-乙基他达那非、N-辛基去甲他达那非、N-苯丙烯基他达那非	
硫代西地那非类	硫代西地那非、羟基硫代伐地那非、二硫代去甲基卡巴地那非、羟基硫代红地那非、丙氧苯基硫代羟基豪莫西地那非、硫代豪莫西地那非、丙氧苯基硫代豪莫西地那非、丙氧苯基硫代西地那非、去甲基硫代西地那非、硫代艾地那非、脱哌嗪硫代西地那非、丙氧苯基硫代艾地那非、亚硝地那非	
伐地那非类	乙酰伐地那非、那莫伐地那非、N-去乙基伐地那非、N-去乙基-N-甲基伐地那非、伐地那非 N-氧化物、环戊那非、伐地那非二聚体、羟基伐地那非、伐地那非哌嗪、伪伐他那非溶液、阿伐那非、去甲基哌嗪基西地那非磺酸	

2.6 筛查方法最低检出质量浓度

选取 4 类那非类药物中具有代表性(结构与母核结构最接近)的化合物进行方法的最低检出质量浓度研究,选取的化合物分别为西地那非、他达那非、硫代西地那非、乙酰伐地那非,其对应的最低检出质量浓度见表 4。

选取西地那非进行最低检出质量浓度确定,结果见图 3。空白仅有试剂的 SERS 峰出现,而 0.05,0.1,0.2 mg/L 均出现了西地那非 SERS 特征光谱图,由此确定其最低检出质量浓度为 0.05 mg/L。其他化合物的最低检出质量浓度同法确定。

2.7 方法特异性考察

选取 40 个保健酒阴性样品,其中 10 个样品添加

表 4 代表化合物最低检出质量浓度
Table 4 The lowest detectable concentration of the representative compound

类型	代表化合物	最低检出质量浓度/(mg·L ⁻¹)
西地那非类	西地那非	0.05
他达那非类	他达那非	0.50
硫代西地那非类	硫代西地那非	0.05
伐地那非类	乙酰伐地那非	0.10

78 种那非类标准物质,10 个样品添加建库之外的那非类标准物质(那莫西地那非、羟基豪莫西地那非、羟基硫代豪莫西地那非、去乙基巴地那非、伐地那非乙酰基类似物、丙氧苯基异丁基艾地那非、他达那非二氯代杂质、二硫代去乙基卡巴地那非),构建 20 个质量浓度为 50 mg/L 的模拟阳性样本。另外 20 个作为阴性样品,随机编号为 1[#]~40[#],按照 1.2 中样品前处理方法对 40 批次样品进行前处理后上机检测。由表 5 可知,样品未出现假阳性及假阴性结果,根据匹配度定性类别归属即能判定其母核结构。

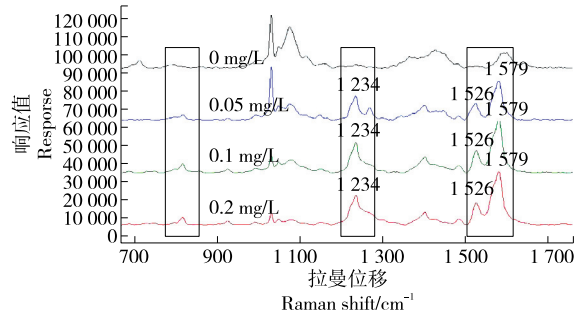


图 3 最低检出质量浓度光谱图
Figure 3 Spectrogram of minimum detected concentration

表 5 模拟阳性样品中那非类药物筛查

Table 5 Screening of PDE-5 inhibitors in simulated positive samples

编号	筛查结果	高效液相色谱—质谱测试结果	第一匹配度定性结果
1 [#]	阳性	46.0 mg/L(羟基豪莫西地那非)	西地那非类(西地那非匹配度得分 97)
2 [#]	阴性	未检出	/
3 [#]	阴性	未检出	/
4 [#]	阴性	未检出	/
5 [#]	阳性	48.9 mg/L(丙氧苯基异丁基艾地那非)	西地那非类(丙氧苯基艾地那非匹配度得分 88)
6 [#]	阴性	未检出	/
7 [#]	阳性	44.2 mg/L(那莫西地那非)	西地那非类(红地那非匹配度得分 98)
8 [#]	阳性	47.1 mg/L(伐地那非乙酰基类似物)	伐地那非类(乙酰伐地那非匹配度得分 89)
9 [#]	阴性	未检出	/
10 [#]	阴性	未检出	/
11 [#]	阳性	43.3 mg/L(那莫西地那非)	西地那非类(西地那非匹配度得分 98)
12 [#]	阴性	未检出	/
13 [#]	阳性	48.8 mg/L(那莫西地那非)	西地那非类(西地那非匹配度得分 98)
14 [#]	阳性	46.6 mg/L(他达那非二氯代杂质)	他达那非类(他达那非匹配度得分 83)
15 [#]	阳性	46.0 mg/L(二硫代去乙基卡巴地那非)	硫代西地那非类(二硫代去甲基卡巴地那非得分 96)
16 [#]	阳性	43.3 mg/L(去乙基巴地那非)	西地那非类(去甲基卡巴地那非匹配度得分 92)
17 [#]	阴性	未检出	/
18 [#]	阳性	44.2 mg/L(羟基豪莫西地那非)	西地那非类(西地那非匹配度得分 97)
19 [#]	阴性	未检出	/
20 [#]	阴性	未检出	/
21 [#]	阴性	未检出	/
22 [#]	阴性	未检出	/

续表 5

编号	筛查结果	高效液相色谱-质谱测试结果	第一匹配度定性结果
23 [#]	阴性	未检出	/
24 [#]	阴性	未检出	/
25 [#]	阳性	45.5 mg/L(丙氧苯基异丁基艾地那非)	西地那非类(丙氧苯基艾地那非匹配度得分 88)
26 [#]	阴性	未检出	/
27 [#]	阳性	47.9 mg/L(羟基豪莫西地那非)	西地那非类(西地那非匹配度得分 91)
28 [#]	阳性	49.6 mg/L(伐地那非乙酰基类似物)	伐地那非类(乙酰伐地那非匹配度得分 89)
29 [#]	阴性	未检出	/
30 [#]	阴性	未检出	/
31 [#]	阳性	53.7 mg/L(羟基硫代豪莫西地那非)	西地那非类(西地那非匹配度得分 97)
32 [#]	阴性	未检出	/
33 [#]	阳性	41.4 mg/L(那莫西地那非)	西地那非类(西地那非匹配度得分 98)
34 [#]	阳性	53.8 mg/L(他达那非二氯代杂质)	他达那非类(他达那非匹配度得分 83)
35 [#]	阳性	42.6 mg/L(二硫代去乙基卡巴地那非)	硫代西地那非类(二硫代去甲基卡巴地那非得分 96)
36 [#]	阳性	52.3 mg/L(去乙基卡巴地那非)	西地那非类(去甲基卡巴地那非匹配度得分 92)
37 [#]	阴性	未检出	/
38 [#]	阳性	43.8 mg/L(羟基硫代豪莫西地那非)	硫代西地那非类(羟基硫代红地那非得分 97)
39 [#]	阴性	未检出	/
40 [#]	阳性	47.2 mg/L(羟基硫代豪莫西地那非)	硫代西地那非类(羟基硫代红地那非得分 97)

3 结论

(1) 基于 SERS 技术构建了保健酒中可能非法添加那非类药物的拉曼光谱谱图库以及配套的数据库检索方式,建立了保健酒中非法添加那非类药物非靶向筛查技术。

(3) 对于 SERS 基底的性能评价采取目测评价、紫外光谱表征以及灵敏度测试。结果表明,那非类药物胶体金 SERS 基底最佳制备方式为 98.3 mL 超纯水中加入 1.0 mL 1%氯金酸和 0.7 mL 1%柠檬酸三钠。关于那非类药物数据库的建立及检索是基于 OMIC 软件,以匹配度是否高于 70%作为评判是否疑似添加那非类化学药品的依据。

(3) 为了更深层次地弄清非法添加那非类药物的归属,试验基于 Python 软件对 78 种那非类药物进行了聚类分析,最后选取 4 类那非类药物中具有代表性的化合物进行方法的最低检出质量浓度研究,结果:西地那非 0.05 mg/L、他达那非 0.5 mg/L、硫代西地那非 0.05 mg/L、乙酰伐地那非 0.1 mg/L。通过模拟实际样品对方法进行特异性考察试验,结果未出现假阳性及假阴性,说明建立的非靶向筛查技术能有效的筛查出保健酒中的那非类非法添加物。

参考文献

[1] 陈玉浩, 梁莱刚, 蓝康华, 等. 功能性酒中非法添加西地那非等 11 种壮阳类药物的调查研究[J]. 广东化工, 2018, 45(10): 77-79.
CHEN Y H, LIANG M G, LAN K H, et al. The study and investigation of eleven kinds of sildenafil drug illegally added in functional

wines[J]. Guangdong Chemical Industry, 2018, 45(10): 77-79.
[2] MOREIRA S G, BRANNIGAN R E, SPITZ A, et al. Side-effect profile of sildenafil citrate (Viagra) in clinical practice[J]. Urology, 2000, 56(3): 474-476.
[3] 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.
LEI Y, HUANG Y T, CHEN L, et al. Simultaneous rapid determination of 18 illegal additives in impotence healthy products by HPLC[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis. 2016, 52(3): 249-254.
[4] PARK M, AHN S. Quantitative analysis of sildenafil and tadalafil in various fake drugs recently distributed in Korea[J]. Journal of Forensic Sciences, 2012, 57(6): 1 637-1 640.
[5] YANG Y J, SONG D M, JIANG W M, et al. Rapid resolution RP-HPLC-DAD method for simultaneous determination of Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in pharmaceutical preparations and counterfeit drugs[J]. Analytical Letters, 2010, 43(1/2/3): 373-380.
[6] 胡婷婷, 曲晓宇, 康明芹, 等. 高效液相色谱—高分辨质谱快速筛查和确证保健品中非法添加的壮阳药物[J]. 色谱, 2015(8): 897-901.
HU T T, QU X Y, KANG M Q, et al. Rapid screening and confirmation of illegally added anti-impotence preparations in health care products by high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2015(8): 897-901.
[7] 张书文, 王锬, 韩圣谦. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定露酒中伐地那非、西地那非和他达那非含量[J]. 化学分析计

- 量, 2016, 25(1): 44-46.
- ZHANG S W, WANG K, HAN S Q. Determination of vardenafil-sildenafil and tadalafil in liqueur by UPLC-MS/MS[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2016, 25(1): 44-46.
- [8] 李绍辉, 吴寒秋, 许秀丽, 等. 超高效液相色谱串联质谱法检测玛咖产品中非法添加西地那非[J]. 食品工业科技, 2016, 37(11): 310-313.
- LI S H, WU H Q, XU X L, et al. Detection of sildenafil illegally added in maca products by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(11): 310-313.
- [9] ZHANG Y, HUANG Z, DING L, et al. Simultaneous determination of Yohimbine, Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil in dietary supplements using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(14): 2109-2114.
- [10] LIN L L, XIU J Z, CHAO Z, et al. Simultaneous determination and determination of Sildenafil and its active metabolite in human plasma using LC-MS/MS method[J]. Biomedical Chromatography, 2020, 34(10): e4927.
- [11] LEE J H, MIN A Y, PARK O R, et al. Detection of 94 compounds related to sexual enhancement including Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil and their analogues in various formulations of dietary supplements and food samples using HPLC and LC-MS/MS[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2021, 38(5): 769-781.
- [12] 庞小雄, 吕华冲, 张怡红, 等. 中成药及中药保健品中添加西地那非的快速检测方法[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(8): 673-674.
- PANG X X, LU H C, ZHANG Y H, et al. Rapid determination of Sildenafil in Chinese patent medicines and health products[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2008, 28(8): 673-674.
- [13] GUO J B, XU Y, HUANG Z B, et al. Development of an immunoassay for rapid screening of vardenafil and its potential analogues in herbal products based on a group specific monoclonal antibody[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 658(2): 197-203.
- [14] 彭耀文, 申兰慧, 杨敏智, 等. 建立应急检验模型快速筛查及确证片剂中添加的枸橼酸西地那非[J]. 中国药事, 2015, 29(3): 303-308.
- PENG Y W, SHEN L H, YANG M Z, et al. Establishment of emergency inspection model for rapid screening and identification of Sildenafil citrate in tablets[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2015, 29(3): 303-308.
- [15] VREDENBREGT M J, BLOK-TIP L, HOOGERBRUGGE R, et al. Screening suspected counterfeit Viagra® and imitations of Viagra® with near-infrared spectroscopy[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2006, 40(4): 840-849.
- [16] MANS D J, CALLAHAN R J, DUNN J D, et al. Rapid-screening detection of acetildenafil, sildenafil and avanafil by ion mobility spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 75: 153-157.
- [17] 国家市场监督管理总局. 食品中那非类药物的测定: BJS 201601[S]. 北京: 国家市场监督管理总局, 2016.
- State Administration for Market Regulation. Determination of non-drugs in food: BJS 201601[S]. Beijing: State Administration for Market Regulation, 2016.
- [18] 国家市场监督管理总局. 食品中那非类药物的测定: BJS 201805[S]. 北京: 国家市场监督管理总局, 2018.
- State Administration for Market Regulation. Determination of non-drugs in food: BJS 201805[S]. Beijing: State Administration for Market Regulation, 2018.
- [19] 王红梅, 李玲玲, 陈海滨, 等. 表面增强拉曼光谱对西地那非类药物的快速检测[J]. 高等学校化学学报, 2017, 38(6): 1040-1045.
- WANG H M, LI L L, CHEN H B, et al. Application of Surface-enhanced Raman Spectroscopy in the fast screening of phosphodiesterase type 5 inhibitors[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2017, 38(6): 1040-1045.
- [20] 吴国萍, 周亚红, 李静泉, 等. 表面增强拉曼光谱测定保健品中非法添加物西地那非[J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 254-259, 264.
- WU G P, ZHOU Y H, LI J Q, et al. Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for the detection of Sildenafil in health care products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(11): 254-259, 264.
- [21] 胡家勇, 张嫚, 皮江一, 等. 表面增强拉曼光谱法定性定量检测保健食品中非法添加物西地那非[J]. 食品科学, 2020, 41(8): 297-302.
- HU J Y, ZHANG M, PI J Y, et al. Quantitative and qualitative determination of illicit Sildenafil in health foods by surface enhanced raman spectroscopy[J]. Food Science, 2020, 41(8): 297-302.
- [22] 吴宝林. 金、银纳米粒子的制备及其表面增强拉曼光谱研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- WU B L. The preparation and surface-enhanced Raman Spectroscopy effect of gold and silver nanoparticles[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [23] 皋玉婷, 陈芮, 陈燕. 纳米金的合成与表征[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2016, 36(6): 46-49.
- GAO Y T, CHEN R, CHEN Y. Synthesis and characterization of gold Nano-sol[J]. Journal of Yunan Normal University (Natural Sciences Edition), 2016, 36(6): 46-49.
- [24] ALVAREZ-PUEBLA R A. Effects of the excitation wavelength on the SERS spectrum[J]. Journal of Physical Chemistry Letters, 2012, 3(7): 857-866.
- [25] 张心敏, 史晓凤, 韩晓红, 等. 金溶胶基底的 SERS 增强效果的实验研究[J]. 激光生物学报, 2014(6): 553-559.
- ZHANG X M, SHI X F, HAN X H, et al. Experimental study on SERS Enhancement of gold colloid[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2014(6): 553-559.
- [26] 覃玲. 食品中非法添加物质筛查模式的研究[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2018.
- QIN L. Study on the screening model of illegally added substances in food[D]. Beijing: National Institute for Food and Drug Control, 2018.