

张申平, 侯超, 张妮, 等. UPLC-Q/Orbitrap HRMS 测定口服液中 6 种西地那非衍生物的不确定度分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(11): 280–286. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060278

ZHANG Shenping, HOU Chao, ZHANG Ni, et al. Uncertainty Evaluation for Determination of 6 Sildenafil Derivatives in Oral Liquid by UPLC-Q/Orbitrap HRMS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(11): 280–286. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060278

· 分析检测 ·

UPLC-Q/Orbitrap HRMS 测定口服液中 6 种西地那非衍生物的不确定度分析

张申平, 侯超, 张妮, 杜茹芸*, 周静, 刘洋

(上海市质量监督检验技术研究院, 国家市场监管重点实验室(乳及乳制品检测与监控技术), 上海 200233)

摘要: 为了保证高分辨质谱法测定壮阳类口服液中西地那非类似物的结果准确性和可靠性, 对测定结果进行不确定度评定是十分必要的。本研究采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q/Orbitrap HRMS)测定口服液保健食品中 6 种西地那非衍生物的含量, 依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》, 建立数学模型, 进行测量不确定度评定。当口服液中 N-去甲基西地那非、去甲基硫代西地那非、二甲基西地那非、羟基硫代莫西地那非、硫代莫西地那非、硫代西地那非的含量为 0.90、1.04、1.22、2.01、1.51、1.14 mg/kg 时, 扩展不确定度分别为 0.07、0.09、0.10、0.16、0.13、0.09 mg/kg ($k=2$)。评定结果表明, 不确定度主要来自 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 仪器、标准溶液配制、回收率和随机效应。

关键词: UPLC-Q/Orbitrap HRMS, 口服液, 西地那非衍生物, 不确定度, 扩展不确定度

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)11-0280-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060278



本文网刊:

Uncertainty Evaluation for Determination of 6 Sildenafil Derivatives in Oral Liquid by UPLC-Q/Orbitrap HRMS

ZHANG Shenping, HOU Chao, ZHANG Ni, DU Ruyun*, ZHOU Jing, LIU Yang

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Key Laboratory of Milk and Dairy Products Detection and Monitoring Technology for State Market Regulation, Shanghai 200233, China)

Abstract: In order to ensure the accuracy and reliability of high resolution mass spectrometry for the determination of sildenafil derivatives in aphrodisiac oral liquid, it is necessary to evaluate the uncertainty of the determination results. In this study, the content of 6 sildenafil derivatives in oral liquid health food was determined by ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole/electrostatic field Orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q/Orbitrap HRMS). The mathematical model was established and the measurement uncertainty was evaluated according to JJF 1059.1-2012 "Evaluation and Expression of Measurement Uncertainty". When the contents of N-demethyl sildenafil, dimethyl thiosildenafil, dimethyl sildenafil, hydroxythiocarmo sildenafil, thiocarmo sildenafil and thiosildenafil in oral solution were 0.90, 1.04, 1.22, 2.01, 1.51 and 1.14 mg/kg, the extended uncertainties were 0.07, 0.09, 0.10, 0.16, 0.13 and 0.09 mg/kg ($k=2$), respectively. The results show that the uncertainty mainly comes from UPLC-Q/Orbitrap HRMS, standard solution preparation, recovery and random effect.

Key words: UPLC-Q/Orbitrap HRMS; oral liquid; sildenafil derivatives; uncertainty; the expanded uncertainty

收稿日期: 2022-06-28

基金项目: 上海市食品质量安全检测与评价专业技术服务平台(18DZ2292400)。

作者简介: 张申平(1992-), 男, 博士, 工程师, 研究方向: 高分辨质谱技术应用, E-mail: zhangspl@sqi.org.cn。

* 通信作者: 杜茹芸(1982-), 女, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品化妆品安全检测研究, E-mail: dury@sqi.org.cn。

保健食品是对人们正常饮食的有益补充,但一些违法生产者为了达到产品宣称的保健功效,超量、超范围添加处方西药,给消费者健康带来隐患,其中以补肾壮阳类药物违法添加居多^[1-2]。西地那非属于磷酸二酯酶 5 型(phosphodiesterase type 5, PDE5)选择性抑制剂,具有扩张血管、改善血流的作用^[3-5],在补肾壮阳类保健食品中检出频次较高。随着药物研发水平的提高,西地那非类似物的种类也日渐增多,主要有 N-去甲基西地那非、去甲基硫代西地那非、二甲基西地那非、羟基硫代豪莫西地那非、硫代豪莫西地那非、硫代西地那非等^[6-7]。在日常检测工作中发现,大部分保健食品生产者避开了西地那非,转用其他类似物代替,因此迫切需要建立更加全面且有效的检测方法作为技术储备。目前保健食品中非法添加药物的测定主要是基于薄层色谱法^[8]、溶剂萃取法、QuEChERS 法等结合液相色谱串联质谱仪^[9-10]、高效液相色谱-高分辨质谱仪^[11-14]的方法。其中 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 法具有通量、分辨率和准确性高的特点,在保健食品非法添加药物的筛查及检测中有很好的应用前景^[15-17]。

在测定的过程中会存在很多不确定的因素,如取样、样品制备、标准物质选择、分析测量及数据处理等每一个环节,这些不确定的因素导致最终测量值均存在不能确定的部分,这些部分是和测量结果相联系的参数,表示被测量值的分散程度^[18-20]。检测实验室应分析测量不确定度对检测结果的贡献,评定每一项分量的测量不确定度。测定不确定度评定也是日常检验工作的重要技术组成部分,可以为进一步提高检测结果的准确性提供参考。高效液相色谱-高分辨质谱测定保健食品中非法添加药物时具有前处理简单、抗干扰能力强等优点,但鲜有对其不确定度的评价研究,为了保证壮阳类口服液中西地那非类似物测定结果的准确性和可靠性,对测定结果进行不确定度评定是十分必要的。本研究参照已经报道的色谱-质谱法测定目标化合物的不确定度评定方式^[21-23]和评定要点^[24-26],采用 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 法对壮阳类口服液中的西地那非类似物含量进行测定,依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[27]、JJF 1135-2005《化学分析测量不确定度评定》^[28],对壮阳类口服液中非法添加的西地那非类似物进行不确定度分析与评定,确定各不确定度分量对实验结果的影响,为实验室检测结果的质量控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

N-去甲基西地那非(desmethyl sildenafil, 纯度 $\geq 99.9\%$, 浓度 $100.1 \mu\text{g/mL}$)、去甲基硫代西地那非(desmethyl thiosildenafil, 纯度 $\geq 99.9\%$, 浓度 $100.0 \mu\text{g/mL}$)、二甲基西地那非(dimethyl sildenafil, 纯度 $\geq 99.8\%$, 浓度 $99.6 \mu\text{g/mL}$)、羟基硫代豪莫西地

那非(hydroxythiohomo sildenafil, 纯度 $\geq 98.5\%$, 浓度 $98.8 \mu\text{g/mL}$)、硫代豪莫西地那非(thiohomo sildenafil, 纯度 $\geq 99.6\%$, 浓度 $99.9 \mu\text{g/mL}$)、硫代西地那非(thiosildenafil, 纯度 $\geq 98.0\%$, 浓度 $99.5 \mu\text{g/mL}$) 溶剂为甲醇 天津阿尔塔科技有限公司; 甲醇、乙腈 色谱纯, 美国 Thermo 公司; 其他试剂 均为国产分析纯; 试验用水 自制超纯水; 口服液样品 上海市质量监督检验技术研究院抽检样品。

Thermo Q Exactive PLUS 超高液相色谱-质谱联用系统(包括 VANQUISH VF-P10-A 液相系统及 Orbitrap 高分辨质谱)、Xcalibur 4.3 软件用于质谱仪器控制及数据采集、TraceFinder 5.0 软件用于数据分析 美国 Thermo 公司; MS204S 电子天平 感量 0.1 mg , 德国 Mettler Toledo 公司; Centrifuge 5804 离心机 德国 Eppendorf 公司; Reax Control 涡旋振荡器 德国 heidolph 公司; Milli-Q 超纯水器 美国 Millipore 公司; SK8300 GT 超声波清洗器 上海科导超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制 5 mg/L 混合标准储备溶液: 分别取 6 种标准溶液各 $250 \mu\text{L}$ 于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释定容至 5 mL , 于 $(-20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 临用前取出恢复至室温。系列标准溶液: 分别取 20 、 40 、 60 、 100 、 $200 \mu\text{L}$ 混合标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。

1.2.2 样品前处理 参照徐红斌等^[29]的实验方法, 准确称量 0.5 g 样品置于 15 mL 具塞离心管中, 加入 10 mL 50% 甲醇-水溶液, 摇匀, 25°C 下超声 15 min , 于 5000 r/min 离心 2 min , 上清液过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取滤液即为供试品溶液。对于浓度超过标准曲线上限的待测液, 需用 50% 甲醇-水适当稀释后再次测定。

1.2.3 仪器条件

1.2.3.1 色谱条件 参照徐红斌等^[29]的仪器方法, 色谱柱 Thermo Hypersil Gold Vanquish 色谱柱($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.9 \mu\text{m}$), 柱温: 25°C , 流速: 0.3 mL/min , 进样量: $5 \mu\text{L}$ 。流动相及梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流速(mL/min)	A: 0.1%甲酸/水(%)	B: 0.1%甲酸/乙腈(%)
0	0.3	90	10
2	0.3	90	10
8	0.3	10	90
10	0.3	10	90
11	0.3	90	10
14	0.3	90	10

1.2.3.2 质谱条件 离子源: 可加热电喷雾离子源(HESI); 离子源温度: 325°C ; 喷雾电压: 3.50 kV (正模式); 透镜电压: 50.0 V ; 鞘气流速: 40 arb ; 辅助气流速: 10 arb ; 辅助气温度: 350°C ; 扫描模式: Full MS-

表2 6种西地那非衍生物的质谱参数

Table 2 Mass spectrometry parameters of 6 sildenafil derivatives

化合物	分子式	保留时间(min)	母离子(m/z)	碎片离子(m/z)	加合方式
N-去甲基西地那非	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	5.94	461.19626	283.11868*, 255.12376	[M+H] ⁺
去甲基硫代西地那非	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₃ S ₂	6.69	477.17288	299.09586*, 315.09033	[M+H] ⁺
二甲基西地那非	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	6.05	489.22803	283.1192*, 344.14856	[M+H] ⁺
羟基硫代豪莫西地那非	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S ₂	6.65	521.19958	299.09589*, 327.12759	[M+H] ⁺
硫代豪莫西地那非	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂	6.81	505.20401	299.09607*, 113.10741	[M+H] ⁺
硫代西地那非	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₃ S ₂	6.72	491.18918	341.14389*, 407.12027	[M+H] ⁺

注: *为定量离子。

ddMS²; 采集范围: 100.0~1000.0 m/z; 一级质谱分辨率为 70000 FWHM; 自动增益控制目标离子数(AGC target): 1×10^6 ; C-trap 最大注入时间: 200 ms; 二级质谱分辨率 17500 FWHM; C-trap 最大容量(AGC target): 2×10^5 ; C-trap 最大注入时间: 60 ms; 归一化碰撞能(NCE): 20%/40%/60%; 动态排除: 8.0 s。表2列出了6种西地那非衍生物的分子式、保留时间、母离子、碎片离子精确质量数等信息。

1.2.4 含量计算 根据壮阳类口服液中西地那非衍生物的测定方法, 待测物在样品中的含量计算公式为:

$$X = \frac{c \times V}{m} \times 10$$

式中: X为样品中西地那非衍生物的含量, mg/kg; c为外标标准曲线得到的供试品溶液浓度, $\mu\text{g/L}$; V为供试品溶液定容体积, mL; m为样品称样量, g。

1.3 数据处理

采用 TraceFinder 5.0 软件进行数据处理, 绘制标准曲线, 计算样品中目标物的含量, 利用 Excel 计算平均值和标准偏差, 相应的公式用 Microsoft 公式编辑器编辑。

2 结果与分析

2.1 不确定度的主要来源

在 1.2.3 的仪器条件下, 6 种西地那非衍生物的分离度好、峰形规整、质谱响应高, 定量离子的提取离子色谱图如图 1 所示。结合数据模型和整个实验操作过程, 测定结果的 A 类不确定度包括: a. 标准曲线拟合引入的不确定度; b. 回收率的不确定度, 方法前处理过程复杂, 步骤较多, 采用样品添加回收对样品处理过程的不确定度进行评定; c. 随机效应的不确定度, 即称量的重复性、体积的重复性、液相色谱-串联质谱仪的重复性等引入的不确定度等。B 类不确定度包括: a. 样品浓度测定值的不确定度, 包括标准物质纯度、标准溶液配制和高效液相色谱-串联质谱仪等的不确定度; b. 样品质量的不确定度, 主要是天平的校准的不确定度; c. 定容体积的不确定度。详见图 2。

2.2 由标准物质引入的不确定度

2.2.1 标准物质纯度引入的不确定度 西地那非衍生物的纯度(p)和扩展不确定度(U_p)见表 3, 根据标

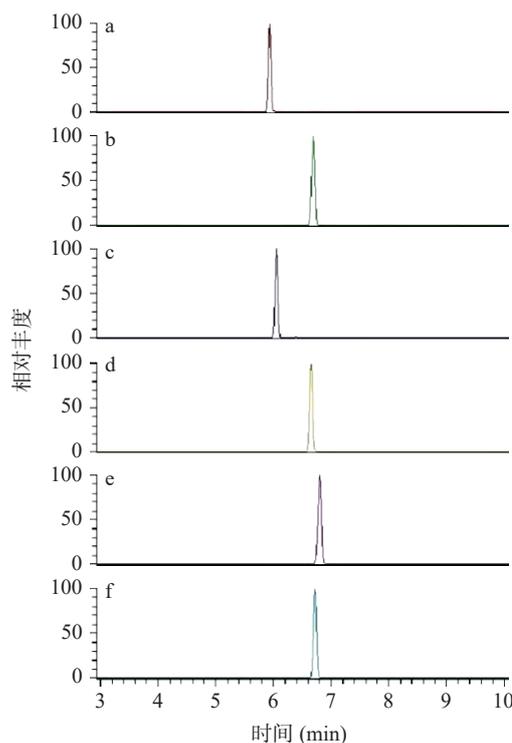


图1 6种西地那非衍生物定量离子的提取离子色谱图

Fig.1 The extracted ion chromatogram of quantitative ions of six sildenafil derivatives

注: a: N-去甲基西地那非; b: 去甲基硫代西地那非; c: 二甲基西地那非; d: 羟基硫代豪莫西地那非; e: 硫代豪莫西地那非; f: 硫代西地那非。

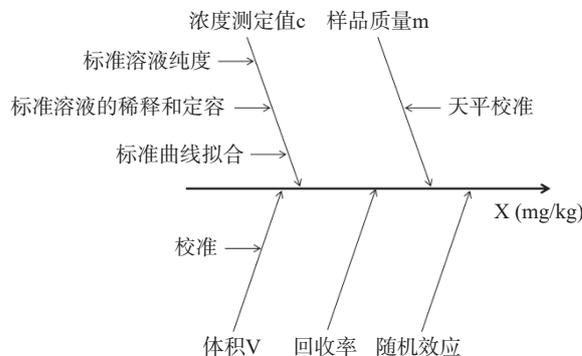


图2 口服液中西地那非衍生物测定不确定度来源分析

Fig.2 Analysis of source of uncertainty in sildenafil derivatives of oral liquid

准物质证书, 包含因子 $k=2$ 时, 在 95% 置信区间上扩展不确定度 $U_p=0.5\%$, 以矩形分布计算, 由 N-去甲基西地那非标准物质纯度引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(std) = \frac{U_p/k}{p} = 0.00250$$

表 3 标准物质的纯度及不确定度

Table 3 Purity and uncertainty of standard materials

标准物质	纯度 (%)	扩展不确定度 U_p (%)	包含因子 k	标准不确定度 (%)	相对标准不确定度 (%)
N-去甲基西地那非	99.9	0.5	2	0.25	0.00250
去甲基硫代西地那非	99.9	0.5	2	0.25	0.00250
二甲基西地那非	99.8	0.5	2	0.25	0.00250
羟基硫代豪莫西地那非	98.5	0.5	2	0.25	0.00254
硫代豪莫西地那非	99.6	0.5	2	0.25	0.00251
硫代西地那非	98.0	0.5	2	0.25	0.00255

2.2.2 标准物质定容引入的不确定度

2.2.2.1 由移液器校准引入 依据移液器校准证书得到标称容量, 1000 μ L 最大允差为 $\pm 10.0 \mu$ L, 按三角分布计算, 由移液器校准引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_{5-1}) = \frac{10}{\sqrt{6} \times 1000} = 0.00408$$

2.2.2.2 由容量瓶校准引入 标准 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》中规定 5 mL 容量瓶(A)级容量允差为 ± 0.020 mL, 以三角分布计算, 包含因子 $k=6$, 则由容量瓶允差引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(V_{5-2}) = \frac{0.02}{\sqrt{6} \times 5} = 0.00163$$

2.2.2.3 由温度波动引入 标准 JJG 209-2010《体积管检定规程》中规定 20 $^{\circ}$ C 时甲醇的体积膨胀系数为 $1.2 \times 10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$, 玻璃的体积膨胀可忽略不计, 实验环境温度波动控制在 $20 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 按均匀分布计算, 由温度波动引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(V_{5-3}) = \frac{1.2 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.00069$$

配制 5 mL 混合标准溶液引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(V_5) = \sqrt{5 \times u_{rel}(V_{5-1})^2 + u_{rel}(V_{5-2})^2 + 6 \times u_{rel}(V_{5-3})^2} / 5 = 0.00188$$

2.2.3 配制系列标准工作曲线溶液引入的相对不确定度 配制标准工作溶液与 1.2.1 同理, 使用 200 μ L 移液器 5 次, 10 mL 容量瓶 5 次, 所用的量器相对不确定度见表 4。依据计量检定规程^[30-31] 和表 4 中的数据计算, 由 N-去甲基西地那非标准工作溶液的配制引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(V) = \sqrt{5 \times 0.00612^2 + 5 \times 0.000816^2 + 10 \times 0.00069^2} = 0.01398$$

2.3 由标准曲线引入的不确定度

仍然以 N-去甲基西地那非为例, 对 5 个标准工作曲线溶液分别进行 3 次测定, 计算平均值, 以峰面积(y)和标准浓度(c, μ g/L)按照最小二乘法进行拟

表 4 标准溶液稀释过程中由量器引入的相对不确定度

Table 4 Relative uncertainty introduced by instruments during standard solution dilution

量器规格(次数)	最大允差	标准不确定度	单次相对标准不确定度
200 μ L 移液器(5次)	$\pm 3.0 \mu$ L	$\frac{3.0}{\sqrt{6}}$	$\frac{3.0}{200 \times \sqrt{6}} = 0.00612$
1000 μ L 移液器(6次)	$\pm 10.0 \mu$ L	$\frac{10.0}{\sqrt{6}}$	$\frac{10.0}{1000 \times \sqrt{6}} = 0.00408$
5 mL A级容量瓶(1次)	± 0.020 mL	$\frac{0.020}{\sqrt{6}}$	$\frac{0.020}{5 \times \sqrt{6}} = 0.00163$
10 mL A级容量瓶(5次)	± 0.020 mL	$\frac{0.020}{\sqrt{6}}$	$\frac{0.020}{10 \times \sqrt{6}} = 0.000816$

合, 结果见表 5。拟合曲线求待测样品中去甲基西地那非平均浓度 c 产生的标准不确定度为:

$$u_{(c)} = \frac{s(A)}{a} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(c - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}}$$

$$s(A) = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n [A_i - (aC_i + b)]^2}$$

式中: $s(A)$: 标准溶液峰面积的标准偏差; c : 样品溶液的质量浓度, $c=45.00 \mu$ g/L; \bar{C} : 标准系列溶液的平均浓度, $\bar{C}=42 \mu$ g/L; A_i : 对应的峰面积; a : 线性回归方程的斜率, $a=872031$; C_i : 标准系列溶液浓度; b : 标准曲线截距; N : 样品平行测定的次数, $N=2$; n : 标准溶液测定次数, $n=3 \times 5=15$ 。

计算得到 $u_{(c)}=0.21653$ 。

相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(c) = \frac{u_{(c)}}{c} = \frac{0.21653}{45.0} = 0.00481$$

表 5 最小二乘法拟合标准曲线

Table 5 Standard curve data by fitting least square curve

标准曲线浓度 c (μ g/L)	平均峰面积	线性回归方程	线性相关系数 r
5	4421764		
10	8835701		
50	44072074	$y=872031c+331764$	1
100	88264579		
200	174355919		

2.4 样品称量引入的相对不确定度

实验使用的万分之一天平根据标准 JJG 1036-2008《电子天平检定规程》中规定的最大允差为 ± 0.0005 g, 称样量为 0.5 g, 称量两次(一次去皮, 一次称样)以矩形分布计算, 由天平允差引入的相对不确定度为: $u_{rel}(m) = \sqrt{2 \times \left(\frac{0.0005}{0.5 \times \sqrt{3}}\right)^2} = 0.00082$ 。查该台天平的检定证书, 其分辨力为 0.0001 g, 半宽为 0.00005 g, 按矩形分布计算, 由天平分辨力引入的相对不确定度小于天平允差引入相对不确定度的十分之一, 该值可忽略。

2.5 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 仪器的相对不确定度

查询 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 仪器的校准证书, 仪器的相对扩展不确定度为 7.0%(k=2), 则由 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 仪器引入的相对不确定度 $u_{rel}(MS) = 0.035$ 。

2.6 回收率的不确定度 $u_{rel}(R)$

对加标浓度为 1.0 mg/kg 的口服液样品进行平行 6 次测定, N-去甲基西地那非的平均回收率为 90.2%, 标准偏差为 1.95, 相对不确定度 $u_{rel}(R) = \frac{S(R)}{\sqrt{6} \times \bar{R}} = 0.00881$ 。

用 t 检验对回收率进行显著性检验, $t = \frac{|100\% - \bar{R}|}{S(R)}$, 取 $P=0.95$, 查 t 值表, $t_{(0.05, 5)}=2.571$, 即当 t 值大于 2.571 时, \bar{R} 与 100% 有显著性差异, 回收率因子 f_{rec} 必须在计算公式中采用修正结果, 否则 \bar{R} 与 100% 无显著性差异, 不需要进行结果修正。计算加标样品中 N-去甲基西地那非、去甲基硫代西地那非、二甲基西地那非、羟基硫代豪莫西地那非、硫代豪莫西地那非、硫代西地那非的 t 值分别为 1.75、2.31、0.56、1.97、3.39、1.11, 可见硫代豪莫西地那非需要采用回收率因子校正, 其余 5 种化合物不需要校正。

2.7 随机效应的不确定度

参考范广宇等^[32]的报道, 随机效应的不确定度包括称量、定容等过程中随机效应不确定度的加和。对同一加标样品平行进行 6 次测定, 以 N-去甲基西地那非为例, 相对不确定度为 $u_{rel}(A) = 0.00666$ 。

2.8 合成标准不确定度

由上述各相对不确定度分量合成的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(X) = \sqrt{\frac{u_{rel}(std)^2 + u_{rel}(V_5)^2 + u_{rel}(V)^2 + u_{rel}(c)^2}{u_{rel}(m)^2 + u_{rel}(MS)^2 + u_{rel}(R)^2 + u_{rel}(A)^2}} = 0.04106$$

2.9 相对扩展不确定度

取包含因子 $k=2$ (置信概率为 95%), UPLC-Q/

Orbitrap HRMS 法测定口服液中 N-去甲基西地那非的相对扩展不确定度为: $U_{rel} = k \times U_{rel}(X) = 0.08213$ 。

2.10 扩展不确定度

扩展不确定度 U 以 N-去甲基西地那非的实测值与其相对扩展不确定度 U_{rel} 计算: $U=0.90 \times 0.08213 = 0.07$ 。

2.11 测试结果表示

用 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 法测定口服液中 6 种西地那非衍生物的含量, 结果见表 6, 各相对不确定度分量值如图 3 所示。以 N-去甲基西地那非为例, 测试结果为: $X=(0.90 \pm 0.07) \text{mg/kg}$, $k=2$ 。该结果与谢柏艳等^[33]利用液相色谱-串联质谱法测定保健食品中西地那非不确定度的结果相近 ($0.927 \pm 0.06 \text{mg/kg}$, $k=2$), 说明 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 法在不确定度评定实验中的可靠性可与液相色谱-串联质谱法相媲美, 有利于 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 法在不确定度评定工作中的进一步应用。

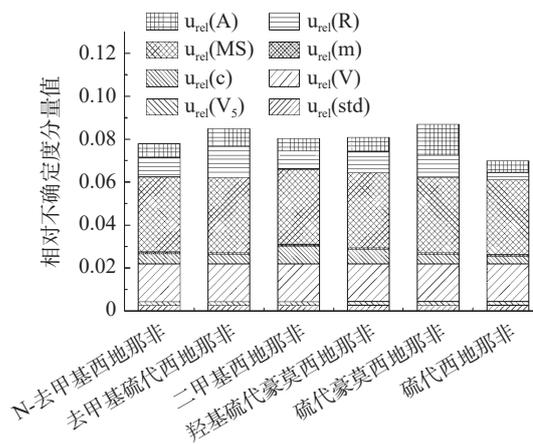


图 3 口服液中 6 种西地那非衍生物的不确定度分量
Fig.3 Uncertainty components of six sildenafil derivatives in oral liquid

3 结论

本研究建立了壮阳类口服液保健食品中 6 种西地那非衍生物测量不确定度评定方法, 通过分析不

表 6 不确定度分量汇总及 6 种西地那非衍生物测定不确定度评定结果

Table 6 Summary of each uncertainty component and uncertainty evaluation result for determination of six sildenafil derivatives

不确定度分量	N-去甲基西地那非	去甲基硫代西地那非	二甲基西地那非	羟基硫代豪莫西地那非	硫代豪莫西地那非	硫代西地那非
$u_{rel}(std)$	0.00250	0.00250	0.00250	0.00254	0.00251	0.00255
$u_{rel}(V_5)$				0.00188		
$u_{rel}(V)$				0.01398		
$u_{rel}(c)$	0.00481	0.00445	0.00837	0.00669	0.00441	0.00343
$u_{rel}(m)$				0.00082		
$u_{rel}(MS)$				0.035		
$u_{rel}(R)$	0.00881	0.01445	0.00837	0.00969	0.01041	0.00343
$u_{rel}(A)$	0.00666	0.00840	0.00587	0.00669	0.01441	0.00531
合成相对不确定度	0.03970	0.04159	0.04007	0.04018	0.04203	0.03851
实测值 (mg/kg)	0.90	1.04	1.22	2.01	1.51	1.14
扩展不确定度 $U(k=2, \text{mg/kg})$	0.07	0.09	0.10	0.16	0.13	0.09
测定结果 ($k=2, \text{mg/kg}$)	0.90 ± 0.07	1.04 ± 0.09	1.22 ± 0.10	2.01 ± 0.16	1.51 ± 0.13	1.14 ± 0.09

确定度分量来源计算各分量值,得出了扩展不确定度及检测结果报告。排名前四位的不确定度分量依次是 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 仪器 ($u_{\text{rel}}(\text{MS})$)、标准溶液配制 ($u_{\text{rel}}(\text{V})$)、回收率 ($u_{\text{rel}}(\text{R})$)、随机效应 ($u_{\text{rel}}(\text{A})$)、分量值依次为 0.035、0.01398、0.00343~0.01445、0.00531~0.01441,提示研究人员在日常检测过程中应当注意标准溶液的配制且保持仪器的良好状况,同时规范实验人员操作,通过各方面的控制,可进一步提高检测结果的可靠性,降低质量安全风险。

参考文献

- [1] 孔璇,吴燕. 2013~2020 年天津市保健食品监督抽检非法添加化学物质检验结果分析[J]. 中国食品药品监管, 2021(8): 68-73. [KONG X, WU Y. Analysis of sampling and testing results of illegal chemical additives in health food in Tianjin from 2013 to 2020[J]. China Food Drug Administration, 2021(8): 68-73.]
- [2] 贾婧怡,李玮,张焱,等. 保健食品中非法添加药物事件及检测技术[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3558-3570. [JIA J Y, LI W, ZHANG Y, et al. Illegal drug addition events and determination technologies in health supplements[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(11): 3558-3570.]
- [3] 何翠瑶. 西地那非在儿童肺动脉高压的应用现状[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(6): 509-512. [HE C Y. Use of sildenafil in children with pulmonary arterial hypertension[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2010, 12(6): 509-512.]
- [4] 张坚,薛建国. 薛建国从中医视角运用 5 型磷酸二酯酶抑制剂体会[J]. 山东中医杂志, 2018, 37(8): 678-680. [ZHANG J, XUE J G. XUE Jianguo's experience in application of phosphodiesterase type 5 inhibitors from perspective of traditional chinese medicine[J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 37(8): 678-680.]
- [5] 殷艳蓉,王燕,朱萧玲,等. PDE5 抑制剂对异丙肾上腺素诱导乳鼠心肌细胞肥大的作用[J]. 心脏杂志, 2019, 31(5): 510-514. [YIN Y R, WANG Y, ZHU X L, et al. Effect of PDE5 inhibitor on isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy in neonatal rats[J]. Chinese Heart Journal, 2019, 31(5): 510-514.]
- [6] 帅放文,黄祖云,王向峰,等. 西地那非类似物的合成[J]. 合成化学, 2016, 24(5): 454-456,460. [SHUAI F W, HUANG Z Y, WANG X F, et al. Synthesis of sildenafil analogues[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2016, 24(5): 454-456,460.]
- [7] 段琼,马春艳,封淑华. 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[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 277-282. [DUAN Q, MA C Y, FENG S H. Investigation and analysis of the PDE-5 inhibitors and their analogues in tonic wines and wine products[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2017, 37(2): 277-282.]
- [8] 许凤,李晓雪,李莉,等. 基于薄层色谱原位富集显微拉曼光谱法快速检测降压保健食品中非法添加的 3 种西药[J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(6): 1172-1177. [XU F, LI X X, LI L, et al. Rapid detection of three chemical components added illegally into antihypertensive health food by TLC concentration in situ combined with micro-Raman spectroscopy method[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2018, 39(6): 1172-1177.]
- [9] 项昭保,伍晓玲,汪程远,等. 色谱及其联用技术在保健食品非法添加药物检测中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 338-344. [XIANG Z B, WU X L, WANG C Y, et al. Research progress in the application of chromatography and its hyphenated techniques in the detection of illegally added drugs in health

foods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(19): 338-344.]

[10] 徐敦明,赖国银,陈燕,等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健食品中 21 种非法添加化合物[J]. 色谱, 2019, 37(7): 778-785. [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]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(7): 778-785.]

[11] 洪灯,谢文,侯建波,等. 高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查保健食品中的西布曲明及其 5 种衍生物[J]. 色谱, 2019, 37(11): 1173-1178. [HONG D, XIE W, HOU J B, et al. Rapid screening of sibutramine and five derivatives in health food by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(11): 1173-1178.]

[12] 赵礼祥,杨爽,柴铭骏,等. 液相色谱-四极杆-静电轨道阱高分辨质谱法测定保健食品中 11 种磷酸二酯酶抑制剂[J]. 理化检验(化学分册), 2020, 56(2): 136-141. [ZHAO K X, YANG S, CHAI M J, et al. Determination of 11 phosphodiesterase inhibitors in health food by LC-Quadrupole-Orbitrap high resolution MS[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2020, 56(2): 136-141.]

[13] SHI S, WU Y Y, ZHOU M H, et al. Simultaneous analysis of 31 anti-impotence compounds potentially illegally added to herbal-based dietary supplements by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1144: 122077.

[14] CAO J K, JIANG Q, LI R X, et al. Nanofibers mat as sampling module of direct analysis in real time mass spectrometry for sensitive and high-throughput screening of illegally adulterated sulfonyleureas in antidiabetic health-care teas[J]. Talanta, 2019, 204: 753-761.

[15] 谭会洁,郭常川,邢晟,等. Orbitrap 高分辨质谱用于保健食品中 15 种非法添加减肥类药物的筛查鉴定[J]. 色谱, 2019, 37(9): 969-976. [TAN H J, GUO C C, XING S, et al. Application of Orbitrap high resolution mass spectrometry for the screening and identification of 15 adulterated weight loss compounds in dietary supplements[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(9): 969-976.]

[16] 郭常川,孙华,石峰,等. Orbitrap 高分辨质谱法高通量筛查生化药品、中成药与保健品中非法添加的 13 种消化类化学药物[J]. 分析测试学报, 2018, 37(3): 300-306. [GUO C C, SUN H, SHI F, et al. High-throughput screening of 13 digestive drugs adulterated illegally in biochemical drugs, chinese patent medicines and dietary supplements by Orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2018, 37(3): 300-306.]

[17] 刘斌,包懿,郎乐,等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查及定量分析保健品中 29 种非法添加物[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(6): 1511-1518. [LIU B, BAO Y, LANG L, et al. Rapid screening and quantitative analysis of 29 kinds of illegally added compounds in diet health foods by ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(6): 1511-1518.]

[18] 靳浩元,刘军. 测量不确定度的评定方法及应用研究[J]. 计量科学与技术, 2021, 65(5): 124-131. [JIN H Y, LIU J. The evaluation method and application research of measurement uncertainty[J]. Metrology Science and Technology, 2021, 65(5): 124-

- 131.]
- [19] 翟洪稳, 范素芳, 王娟, 等. 测量不确定度在食品检验中的应用及进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(5): 314-320. [ZHAI H W, FAN S F, WANG J, et al. Recent progress in measurement uncertainty and its application in food inspection and detection[J]. *Food Science*, 2021, 42(5): 314-320.]
- [20] SEPAROVIC L, LOURENCO F R. Frequentist approach for estimation of false decision risks in conformity assessment based on measurement uncertainty of liquid chromatography analytical procedures[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 184: 113203.
- [21] WANG F Q, ZHANG Y N, WU Q, et al. Purity determination and uncertainty estimation of natural products sourcing chemical reference substances by high-performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry[J]. *Microchemical Journal*, 2021, 166: 106257.
- [22] LEE M J, LEE J M, KIM S J, et al. Simultaneous analysis and measurement of uncertainty estimation of six isoflavones in Cheonggukjang by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2019, 289: 139-144.
- [23] SRIVASTAVA M, SINGH M, MAURYA P, et al. Simultaneous quantification of five bioactive phenylethanoid, iridoid, and flavonol glycosides in *Duranta erecta* L.: Ultra performance liquid chromatography method validation and uncertainty measurement [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 174: 711-717.
- [24] 左兆迎, 臧海燕, 刘妮妮. 检测实验室不确定度评定的关键点及控制措施[J]. *质量与认证*, 2021(4): 46-48. [ZUO Z Y, ZANG H Y, LIU W W. Evaluation key points and control measures of uncertainty in testing laboratory[J]. *China Quality Certification*, 2021(4): 46-48.]
- [25] 张国奇, 魏丽琢, 段惠芳. 检测实验室测量不确定度的全过程管理[J]. *中国检验检测*, 2019, 27(3): 38-39. [ZHANG G Q, WEI L Z, DUAN H F. Discussion on whole process management of measurement uncertainty in testing laboratory[J]. *China Inspection Body & Laboratory*, 2019, 27(3): 38-39.]
- [26] 王婷, 王儒, 赵晓野, 等. 液相色谱质谱法测定贝类水产品中氯霉素的 不确定度 评定[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(4): 245-251. [WANG T, WANG R, ZHAO X Y, et al. Evaluation of uncertainty in determination of chloramphenicol in shellfish by LC-MS-MS[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(4): 245-251.]
- [27] 国家质量监督检验检疫总局. JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国质检出版社, 2013: 4-24. [Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of measurement uncertainty[S]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2013: 4-24.]
- [28] 国家质量监督检验检疫总局. JJF 1135-2005 化学分析测量不确定度评定[S]. 北京: 中国质检出版社, 2005: 4-9. [Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. JJF 1135-2005 Evaluation of uncertainty in chemical analysis measurement[S]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2005: 4-9.]
- [29] 徐红斌, 张中平, 杜茹芸, 等. 超高效液相色谱-Orbitrap 高分辨质谱用于减肥和壮阳类保健食品中 32 种非法添加药物的快速筛查和确证[J]. *色谱*, 2022, 40(6): 531-540. [XU H B, ZHANG S P, DU R Y, et al. Ultra-high performance liquid chromatography-orbitrap high-resolution mass spectrometry for rapid screening and identification of 32 adulterated slimming and anti-impotence compounds in health foods[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2022, 40(6): 531-540.]
- [30] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 12806-2011 实验室玻璃仪器 单标线容量瓶[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 4. [Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. GB/T 12806-2011 Laboratory glassware-one-mark volumetric flasks [S]. Beijing: China Standards Press, 2011: 4.]
- [31] 国家质量监督检验检疫总局. JJG 646-2006 移液器检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007: 3. [Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. JJG 646-2006 Verification regulation of locomotive pipette[S]. Beijing: China Metrology Press, 2007: 3.]
- [32] 范广宇, 唐秀, 张琳, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鲜鲈类水产品中喹诺酮的不确定度评定[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(20): 248-254. [FAN G Y, TANG X, ZHANG L, et al. Uncertainty evaluation of determination of quinolones in flatfish by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(20): 248-254.]
- [33] 谢柏艳, 李文博, 杨玉平. 液相色谱-串联质谱法测定抗疲劳类保健食品中非法添加的西地那非含量的不确定度评定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(3): 1113-1118. [XIE B Y, LI W B, YANG Y P. Uncertainty evaluation for the determination of sildenafil illegally added in anti-fatigue health food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(3): 1113-1118.]