

一种新型他达拉非衍生物的分离和鉴定

冯睿, 于泓, 孙健, 胡青, 张甦, 毛秀红, 季申*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 分离、鉴定一种新型他达拉非衍生物的结构。**方法** 在液相色谱-串联质谱法对保健食品“金博大”的日常检测中, 发现了一种可能的他达拉非衍生物, 通过高效液相制备该化合物, 并通过紫外光谱、精确分子量及串联质谱的信息推测该化合物的结构, 经核磁共振及文献比对确证其结构。**结果** 确证该化合物为 2-羟乙基去甲基他达拉非(2-hydroxyethylnortadalafil), 是一种新型的他达拉非衍生物。**结论** 该化合物对人体可能产生的潜在危害认知较为有限, 需引起关注。该类化合物的紫外及质谱行为规律可提供丰富的化合物信息, 有助于新型衍生物结构的推测。

关键词: 他达拉非衍生物; PDE-5 抑制剂; 非法添加

Isolation and identification of a new type of tadalafil analogue

FENG Rui, YU Hong, SUN Jian, HU Qing, ZHANG Su, MAO Xiu-Hong, JI Shen*

(Shanghai institute for food and drug control, shanghai 201303, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and identify the structure of a new type of tadalafil analogue. **Methods** The compound was detected during routine screenings of dietary supplements-“JINBODA” by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), which displayed structural similarities with tadalafil. It was isolated from the supplements using preparative high performance liquid chromatography. The structure of the compound was estimated by ultra violet, accurate mass and LC-MS analyses, and its structure was further characterized using NMR and textual comparison. **Results** The compound was identified and confirmed as 2-hydroxyethylnortadalafil, which was a new analogue of tadalafil. **Conclusion** The compound may cause toxicological or pharmacological effects to public health and should be concerned, but there is little information on the potential risk. UV and mass spectrometric behaviors of this kind of compounds can provide abundant compounds information, which is beneficial to speculate the new derivative structure.

KEY WORDS: tadalafil analogue; phosphodiesterase 5 inhibitor; adulteration

1 引言

近年来, 在一些宣称具有补肾壮阳、增强性功能及抗疲劳等功效的中成药及保健食品中检出包括西地那非、他

达拉非及伐地那非等磷酸二酯酶 5(phosphodiesterase 5, PDE-5)抑制剂^[1,2], 这些 PDE-5 抑制剂必须在医生的指导下使用, 且不良反应比较明确。更为严重的是, 目前已经多次发现这些 PDE-5 抑制剂的衍生物的非非法添加情况, 这些

基金项目: 上海市科学技术委员会项目(14DZ2294000)

Fund: Supported by Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (14DZ2294000)

*通讯作者: 季申, 主任药师, 博士生导师, 主要研究方向为中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究。E-mail: jishen2013@163.com

*Corresponding author: JI Shen, Chief Pharmacist, Ph.D Supervisor, Shanghai Institute for Food and Drug Control, No. 1500 Zhangheng Road, Pudong New District, Shanghai 201203, China. E-mail: jishen2013@163.com

衍生物与已经批准上市的 PDE-5 抑制剂药物具有相同的母核, 结构差异小, 几乎没有药理和毒理方面的研究信息, 对公众健康构成了潜在的威胁^[3-9]; 同时, 层出不穷的新型衍生物也给监管工作带来了一定的挑战。本课题组一直关注中成药和保健食品中非法添加的检测^[10-13], 目前已经建立了 31 种 PDE-5 抑制剂(包括西地那非、他达拉非、伐地那非及其衍生物)的快速定性定量方法, 并且通过分析 3 类化合物的质谱行为规律, 提供了快速推测未知衍生物结构的方法^[14]; 基于该方法在保健食品中发现一种新型的西地那非的衍生物, 并且根据质谱信息推测了其可能的两种结构, 通过核磁共振氢谱(¹H nuclear magnetic resonance, ¹H NMR)确证其结构与一种推测结果相符^[15]。

本研究基于液相离子阱质谱, 在一种名为“金博大”的保健食品中发现了一种新型他达拉非衍生物 2-羟乙基去甲基他达拉非(2-hydroxyethylnortadalafil)(结构式见图 1), 经制备高效液相分离, 通过紫外吸收光谱和质谱信息推测其结构, 并通过比对文献核磁共振数据确证其结构。

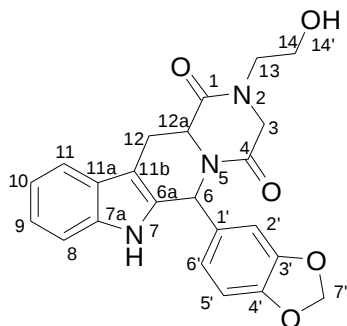


图 1 2-羟乙基去甲基他达拉非结构式^[15]

Fig.1 Structure of 2-hydroxyethylnortadalafil^[15]

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 6330 离子阱液质联用仪, Agilent 1290 Infinity 高效液相色谱仪, Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 液质联用仪, 双电喷雾离子源(美国 Agilent 公司); CP224S 分析天平(德国 Sartorius 公司); Varian PrepStar 制备液相色谱仪(美国瓦里安公司); Varian 核磁共振仪(500 MHz, 美国瓦里安公司)。

乙腈(LC-MS 级)、甲醇、甲酸、甲酸铵(色谱纯)、氘代 DMSO(TMS 为内标)均购自德国默克公司; 去离子水(Milli-Q 超纯水); 他达拉非对照品(美国礼来公司, 批号 RS0534, 纯度 100%)。

“金博大”试样购自市场。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

他达拉非标准溶液配制: 准确称取他达拉非对照品

适量, 加甲醇制成含 1 μg/mL 的溶液。

2.2.2 样品前处理

(1) 离子阱液质联用仪供试品溶液制备

取供试品 1 g, 加甲醇 10 mL, 超声 30 min, 过滤, 作为离子阱液质联用仪供试品溶液。

(2) Q-TOF 液质联用仪供试品溶液制备

取离子阱液质联用仪供试品溶液, 稀释 1000 倍, 作为 Q-TOF 液质联用仪供试品溶液。

(3) 化合物分离纯化

取样品 2 g, 加甲醇 10 mL, 超声 30 min, 过滤, 取滤液适量进样, 收集主色谱峰成分, 减压蒸发除去溶剂, 即得纯化物约 10 mg。

2.2.3 液相色谱-质谱联用仪条件

(1) 液相色谱条件

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(100 mm×3 mm, 1.8 μm); 柱温: 30 °C; 进样体积: 1 μL; 流动相: A 为 0.1%甲酸-水溶液, B 为 0.1%甲酸-乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0~2 min, 20%~30%B; 2~5 min, 30%B; 5~6 min, 30%~45%B; 6~12 min, 45%~70%B; 12~14 min, 70%~98%B; 14~16 min, 98%B; 16~17 min, 98%~20%B; 17~20 min, 20%B; 流速: 0.4 mL/min; 检测波长: 254 nm, 采集 200~400 nm 的紫外光谱。

(2) 离子阱质谱条件

电喷雾电离正离子模式(electronic spray ion+, ESI+); 扫描范围为 *m/z*: 100~800; 离子源参数: 雾化气(N₂): 30 psi(1 psi≈6.9 kPa), 干燥气(N₂): 流速 8 L/min, 温度为 350 °C; 全扫描模式, 轰击电压为 1.0/1.5 V。

(3) Q-ToF 质谱条件

电喷雾电离正离子模式(ESI+); 扫描范围 *m/z*: 100~1000。离子源参数: 雾化气(N₂): 35 psi(1 psi≈6.9 kPa); 干燥气(N₂): 流速 15 L/min, 温度 200 °C; 鞘气(N₂): 流速 12 L/min, 温度 350 °C; 毛细管电压 3.5 kV。

(4) 制备液相色谱仪分离条件

采用 Varian PrepStar 制备液相色谱仪和岛津 Shim-pack PREP-ODS 色谱柱; 流动相为乙腈-水(40:60, V:V), 流速为 10 mL/min, 检测器为紫外检测器, 波长 230 nm。

3 结果与分析

3.1 未知衍生物的发现及结构推断

在对样品进行离子阱质谱的常规检测时, 试样中未发现含有已建方法中的 31 种 PDE-5 抑制剂^[14], 但发现一个准分子离子峰为 420 的化合物(图 1), 将其紫外吸收光谱与他达拉非紫外光谱图比较, 二者极为相似(图 2), 具有他达拉非的特征的紫外吸收光谱, 推测可能为他达拉非衍生物^[4-9]。

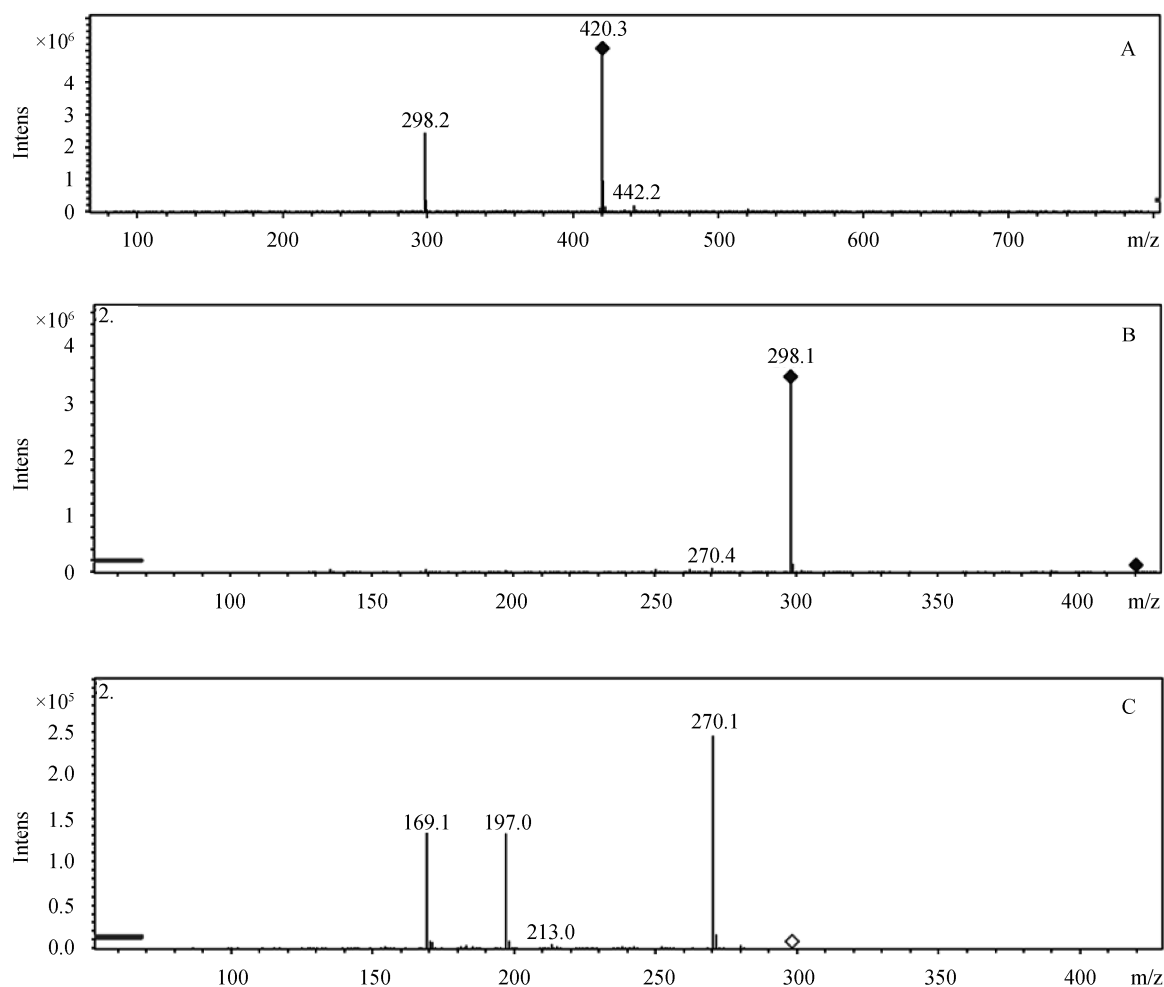


图 2 他达拉非衍生物质谱图(A:一级质谱图; B:二级质谱图; C:三级质谱图(420→298))

Fig.2 Mass spectrograms of tadalafil analogue (A: mass spectrum; B: MS/MS spectrum; C: MS³(420→298))

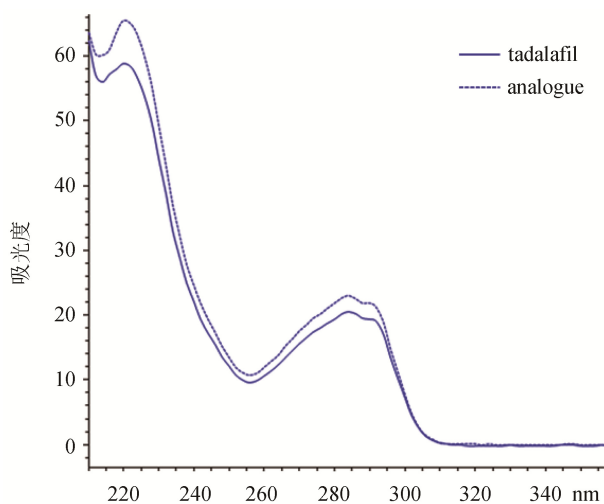


图 3 他达拉非及其衍生物紫外吸收光谱图

Fig. 3 UV spectrograms of tadalafil and its analogue

通过 Q-TOF 质谱仪测得精确分子量(m/z 420.1560, $[M+H]^+$, 理论值 420.1554), 推测该化合物的分子式为 $C_{23}H_{21}N_3O_5$, 比他达拉非多了一个 CH_2O 单元。LC-MSⁿ 液质测得的 MS/MS 谱图中, 衍生物的子离子的 m/z 为 298, 同时测得的他达拉非的 MS/MS 谱图中的子离子 m/z 为 268; MS³(420→298)谱图中, 子离子的 m/z 为 270、197、169(图 3), 他达拉非的 MS³(390→268)谱图中子离子的 m/z 为 240、197、169。通过这些子离子的信息, 根据他达拉非的质谱裂解规律^[4-9, 14], 推测他达拉非中的 13 号位的氮甲基被 $-C_2H_5O$ 基团取代(图 4)。

通过紫外和质谱的结构提示, 大大缩小了结构确证的范围。用高效制备液相对该化合物进行纯化, 采集核磁共振谱图进行确证。

3.2 核磁共振结构解析

从该化合物 1H NMR 谱图中可以看出, 对应于他达拉非 13 号位氮甲基的信号消失, 同时出现 2 个较低场的 CH_2

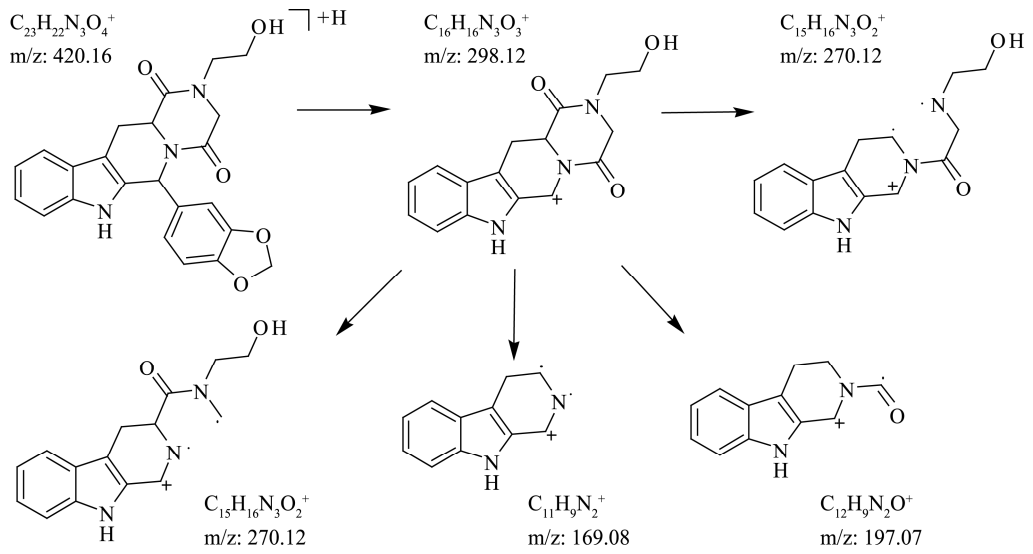


图 4 2-羟乙基去甲基他达拉非裂解规律
Fig. 4 Mass fragmentation pattern of 2-hydroxyethylnortadalafil

表 1 2-羟乙基去甲基他达拉非 ¹H NMR 数据*
Table 1 ¹H NMR of 2-hydroxyethylnortadalafil*

原子 No.	¹ H	原子 No.	¹ H
3	4.01 (1H, d, J = 17.0) 4.26 (1H, d, J = 17.0)	12	2.96 (1H, dd, J = 12.0, 15.0) 3.49 (1H, dd, J = 15.0, 4.5)
6	6.16 (1H, s)	13	3.35 (1H, m) 3.60 (1H, m)
7	11.06 (1H, s)	14	3.60 (2H, m)
8	7.30 (1H, d, J = 8.0)	14'	4.80 (1H, t, J = 4.5)
9	7.07 (1H, t, J = 8.0)	2'	6.85 (1H, s)
10	7.04 (1H, t, J = 8.0)	5'	6.76 (1H, d, J = 8.0)
11	7.54 (1H, d, J = 8.0)	6'	6.78 (1H, d, J = 8.0)

注: *500 MHz at DMSO-*d*₆.

信号和一个活泼氢信号;同时, 对比文献中 ¹H NMR 数据, 可确证其结构^[7], 为 2-羟乙基去甲基他达拉非 (2-hydroxyethylnortadalafil), 该化合物的 ¹H NMR 数据见表 1。

4 结 论

他达拉非及其衍生物具有较为特征的紫外吸收光谱, 通过其二级及三级质谱的碎片信息, 可以快速对他达拉非衍生物进行结构推测。本研究通过化合物的质谱、紫外和 NMR 谱图确定了一种他达拉非衍生物的结构, 该化合物被命名为 2-羟乙基去甲基他达拉非 (2-hydroxyethylnortadalafil), 目前未发现关于该化合物的药理及毒理学研究的报道, 其可能对人体产生潜在危害认

知还未知, 值得引起关注及追踪。

参考文献

[1] Zhu X, Xiao S, Chen B, *et al.* Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066: 89–95.

[2] Singh S, Prasad B, Savaliya AA, *et al.* Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs [J]. *Trends Anal Chem*, 2009, 28: 13–28.

[3] Vehuis BJ, Kaste D. Towards a decade of detecting new ana-logues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: a history, analytical aspects and health risks [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 69:

- 196–208.
- [4] Toomey VM, Litzau JJ, Fluker CL. Isolation and structural characterization of two tadalafil analogs found in dietary supplements [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59: 50–57.
- [5] Zhang G, Yu Y, Wu X, *et al*. Separation and structural elucidation of a new tadalafil analogue diethylaminopretadalafil included as an adulterant in dietary supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 94: 210–214.
- [6] Häberli A, Girard P, Low MY, *et al*. Isolation and structure elucidation of an interaction product of aminotadalafil found in an illegal health food product [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53: 24–28.
- [7] Kern SE, Nickum EA, Flurer RA, *et al*. Isolation and structural characterization of a new tadalafil analog (2-hydroxyethylnortadalafil) found in a dietary supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 103: 99–103.
- [8] Gratz SR, Gamble BM, Flurer RA. Accurate mass measurement using fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structure elucidation of designer drug analogs of tadalafil, vardenafil and sildenafil in herbal and pharmaceutical matrices [J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 2006, 20: 2317–2327.
- [9] Hasegawa T, Takahashi K, Saijo M, *et al*. Isolation and structural elucidation of cyclopentylmethyl N-octylnortadalafil found in a dietary supplement [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57: 185–189.
- [10] 张甦, 胡青, 孙健, 等. 液质联用检测中成药和保健食品中非法添加的 48 种抗生素类成分[J]. *中成药*, 2015, 37(3): 542–548.
- Zhang S, Hu Q, Sun J, *et al*. Simultaneous determination of 48 antibiotics in Chinese patent medicines and health foods by LC-ITMS [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2015, 37(3): 542–548.
- [11] 胡青, 张甦, 简龙海, 等. LC-MS 法测定减肥类保健食品中非法添加的西布曲明及其衍生物[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(8): 1861–1862.
- Hu Q, Zhang S, Jian LH, *et al*. Identification of sibutramine and its derivatives added illegally into functional food by LC-MS [J]. *Chin J Health Lab Tech*, 2011, 21(8): 1861–1862.
- [12] 胡青, 崔益冷, 张甦, 等. 降血脂和降血糖类中药及保健食品中违禁添加 17 种化学药物的液相色谱-离子阱质谱定性检测[J]. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(2): 124–127.
- Hu Q, Cui YL, Zhang S, *et al*. Determination of acetic acid in compound amino acids injection by ion chromatography [J]. *Chin J Pharm*, 2009, 40(2): 124–127.
- [13] 胡青, 崔益冷, 张甦, 等. 液质联用法测定解热镇痛类中药及保健食品中非法添加化学药品的研究[J]. *中成药*, 2009, 31(10): 1547–1550.
- Hu Q, Cui YL, Zhang S, *et al*. Detection of chemical drugs added illegally into analgesic-antipyretic traditional Chinese medicines and health food by LC-MS [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2009, 31(10): 1547–1550.
- [14] 于泓, 胡青, 张甦, 等. 补肾壮阳类中药及保健食品中 31 种 5 型磷酸二酯酶抑制剂的高分辨四级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): 1312–1318.
- 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): 1312–1318.
- [15] 孙健, 于泓, 胡青, 等. 一种新型西地那非衍生物的 Q-TOF-MS 鉴定[J]. *药科学报*, 2014, (4): 513–516.
- Sun J, Yu H, Hu Q, *et al*. Identification of a new sildenafil analogue based on Q-TOF-MS [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, (4): 513–516.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介

冯 睿, 理化检验师, 主要研究方向为中药和保健食品质量与安全检测。

E-mail: fengrui-vc@163.com

季 申, 主任药师, 主要研究方向为中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究。

E-mail: jishen2013@163.com