

保健食品中一个新型他达拉非类似物的分析鉴定^{*}

邓银华¹, 蔡丹丹², 黄朝辉^{3**}

(1. 湖南省人民医院药学部, 长沙 410005; 2. 宁波戒毒研究中心, 宁波 315010;
3. 宁波市药品检验所, 宁波 315048)

摘要 目的: 鉴定保健食品中非法添加的一个未知结构的他达拉非类似物。方法: 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器联用 (HPLC-DAD) 技术进行补肾壮阳类保健食品非法添加筛查时发现一个未知的他达拉非类似物, 经过正相硅胶薄层色谱分离纯化得到目标化合物后, 用超高效液相色谱-二级质谱联用 (UPLC-MS/MS) 技术获得其分子量和结构碎片, 用核磁共振得到碳谱和氢谱数据, 结合文献分析, 最终鉴定该化合物的结构。结果: 在保健食品中发现了一个新型他达拉非类似物-二乙氨基前他达拉非。结论: 该化合物不在现有补肾壮阳类中成药检验标准 11 种目标化合物范围内, 是一种新的非法添加化学物质。

关键词: 保健食品; 他达拉非类似物; 二乙氨基前他达拉非; 非法添加; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)07-1256-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.07.14

Analysis and identification of a new tadalafil analogue in health foods^{*}

DENG Yin-hua¹, CAI Dan-dan², HUANG Zhao-hui^{3**}

(1. Department of Pharmacy, People's Hospital of Hunan Province, Changsha, 410005, China;
2. Ningbo Drug Research Center, Ningbo 315010, China; 3. Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo, 315048, China)

Abstract Objective: To identify an unknown tadalafil analogue illegally adulterated in health foods. **Methods:** An unknown tadalafil analogue was observed in a routine screening for compounds illegally adulterated in health foods by HPLC-DAD. The target compound was isolated by silica gel thin layer chromatography. Its molecular weight and structural fragments were obtained by UPLC-MS/MS, and its ¹³C-NMR and ¹H-NMR spectrum were also obtained using nuclear magnetic resonance. Its structure was identified by analysis of these data in combination with literature analysis. **Results:** A new tadalafil analogue, diethylaminopretadalafil, was detected in health foods. **Conclusion:** It is a new compound illegally adulterated in health foods. The current inspection standard, which lists 11 target compounds, does not include this compound.

Keywords: health food; tadalafil analogue; diethylaminopretadalafil; illegal addition; HPLC-MS/MS

* 宁波市科技局自然科学基金项目(2015A610291)

** 通信作者 Tel:(0574)87834153 E-mail: huang-zhao@163.com

第一作者 Tel:(0731)83929301 E-mail: dengyinhua@sina.com

选择性的5型磷酸二酯酶(PDE₅)抑制剂包括西地那非、他达拉非、伐地那非、乌地那非等,主要用于治疗男性勃起功能障碍(ED)^[1]。具有治疗ED作用的PDE₅抑制剂多达几十种^[2-3],补肾壮阳类中成药中非法添加PDE₅抑制剂的事例层出不穷^[4-10]。非法添加的化学药品往往使用未经GMP认证的化工产品,并且随意添加剂量;同时由于医生和患者的不知情,将完全忽略非法添加的药物与患者正在应用的其他药物可能产生相互作用,甚至忽略了禁忌证,这都将给使用者带来直接或潜在的伤害^[11]。目前PDE₅抑制剂检测方法依照国家食品药品监督管理局颁布的现行检验标准检测11种非法添加成分^[12]。然而不法生产者为了规避检查,极可能添加现行标准检测范围之外的其他类似物。因此对保健食品的非法添加进行追踪分析具有重要意义。

本实验采用HPLC-DAD进行补肾壮阳类保健食品中非法添加筛查时发现有一个未知的他达拉非类似物,经过正相硅胶薄层色谱分离纯化得到目标物后,用UPLC-MS/MS得到其分子量和结构碎片,用核磁共振得到碳谱和氢谱数据,最终鉴定了目标物的结构为二乙氨基前他达拉非。

1 仪器与试药

Waters 2695-2996 HPLC仪(美国Waters公司),色谱柱为迪马Inertsustain C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);Waters Alliance-Quattro Micro液相色谱-质谱联用仪(美国Waters公司),色谱柱为Waters BEH C₁₈键合硅胶柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);Bruker AV400型核磁共振仪(德国Bruker公司);SB-5200DTN超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);R200D型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

氨基他达拉非对照品(Toronto research chemicals Ins公司,Cat#A629550;Lot#1-KMW-55-1),保健食品一批,为宁波市食品药品监督管理局提供的市场监督抽查样品。硅胶GF₂₅₄薄层色谱板(青岛海洋化工厂);氘代二甲亚砜(Bruker公司);氯仿(分析纯)、乙酸铵(分析纯);甲醇(HPLC级);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

称取氨基他达拉非对照品约1 mg,置10 mL量瓶中,加流动相A溶解并稀释至刻度,摇匀,即得氨基他达拉非对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

取供试品2片,研细,置50 mL量瓶中,加乙腈

40 mL,超声提取15 min,放冷至室温,用乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,得供试品溶液。

2.3 筛查的液相色谱条件及结果

2.3.1 筛查的液相色谱条件 色谱柱:迪马Inertsustain C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm;填料:十八烷基硅烷键合硅胶);流动相:以磷酸三乙胺溶液(取三乙胺7 mL用水稀释至1 000 mL,用磷酸调pH至2.8)-甲醇-乙腈(60:20:20)为流动相A,磷酸三乙胺溶液(取三乙胺7 mL用水稀释至1 000 mL,用磷酸调pH至2.8)-甲醇-乙腈(8:46:46)为流动相B,进行梯度洗脱(0~12 min, 100%A; 12~25 min, 100%A→100%B; 25~30 min, 100%B; 30~31 min, 100%B→100%A; 31~40 min, 100%A),DAD扫描,波长范围200~400 nm,检测波长230 nm,流速为1.0 mL·min⁻¹,进样量20 μL。

2.3.2 筛查的结果 在该批保健食品中发现1个色谱峰,其保留时间在氨基他达拉非之前,二者DAD扫描图基本一致(图1)。因此推测该化合物可能具有与氨基他达拉非相同的结构母核,是他达拉非的类似物。

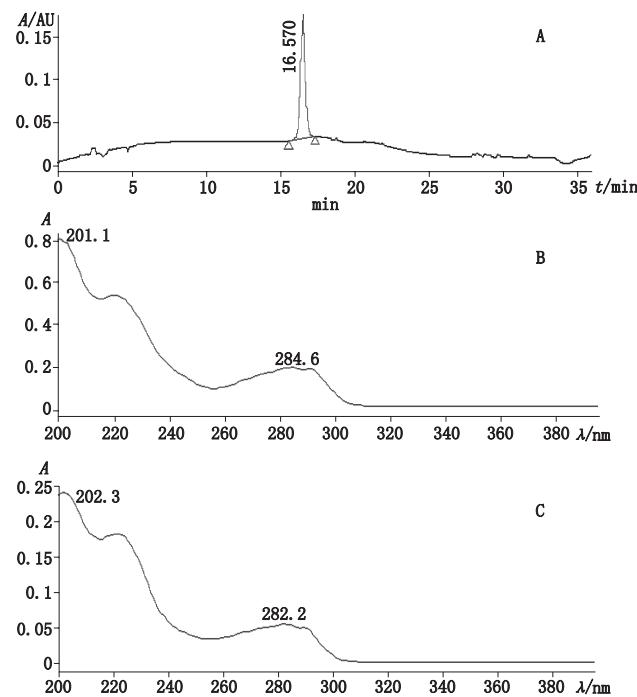


图1 样品溶液HPLC色谱图(A),氨基他达拉非紫外光谱图(B),保健食品中未知化合物紫外光谱图(C)

Fig. 1 HPLC chromatogram of the sample (A), UV spectrum of aminotadalafil (B) and the unknown compound in the health food (C)

2.4 分离纯化目标化合物

取保健食品30片,研细,置锥形瓶中,加乙腈

100 mL,超声(功率300 W,频率50 kHz)萃取20 min,滤过,滤液浓缩,用硅胶GF₂₅₄薄层板,以氯仿-甲醇(10:0.6)为展开剂展开,刮取目标化合物条带,置锥形瓶中,加乙腈50 mL,超声20 min,滤过,滤液挥去溶剂,得透明固体,即为目标化合物。

2.5 目标化合物质谱和核磁共振碳、氢谱分析

2.5.1 质谱条件 喷雾离子源(ESI),正离子检测;离子源温度:120 °C;毛细管电压3.0 kV,锥孔电压30 V,碰撞能量20 V,扫描方式采用母离子扫描和子离子扫描2种模式,质量数范围100~500。

2.5.2 测试溶液的制备 取分离纯化所得目标化合物约1 mg,加乙腈10 mL溶解,即得测试溶液。

2.5.3 目标化合物的分子量扫描和质谱裂解规律分析 取测试溶液,直接进样做分子量扫描,得到464.0 [M+H]⁺和485.99 [M+Na]⁺2个峰值,可知该化合物相对分子量为463,与文献^[3]综述的他达拉非类似物均不相同,为一新的他达拉非类似物。以464.0为母离子进行子离子扫描,得到结构碎片(图2A)。二级质谱碎片质荷比分别为m/z464→m/z379→m/z334→m/z264→m/z135。质谱裂解途径见图2B。

2.5.4 核磁共振氢谱 ¹H-NMR(DMSO-d₆,400 MHz) δ:10.83(1H,s),7.51(1H,d,J=8.0 Hz),7.26(1H,d,J=8.0 Hz),7.08(1H,t,J=7.2 Hz),7.00(1H,t,J=7.2 Hz),6.76(1H,t,J=8.4 Hz),6.73(1H,s),6.66(1H,s),6.45(1H,d,J=8.0 Hz),5.95(2H,d,J=4.0 Hz),5.76(1H,d,J=6.4 Hz),3.62(1H,m),3.49(1H,m),3.20(2H,m),3.00(1H,m),3.00(3H,s),2.54(2H,m),2.48(2H,m),0.93(6H,m)。

核磁共振碳谱数据 ¹³C-NMR(DMSO-d₆,400 MHz) δ:171.53(C=O),170.99(C=O),147.31,146.93,136.79,134.51,130.80,126.44,122.78,121.92,119.08,118.50,111.66,109.62,107.91,106.79,101.40(O-CH₂-O),58.35(CH₂),52.07,52.02,51.07(CH),47.24(2个CH₂),21.61,11.78(2个CH₃)。

HSQC谱显示δ21.61的碳同时与δ3.49和δ3.00的氢相关,表明该碳上2个氢原子的化学环境差异显著,符合他达拉非类化合物具有手性碳的结构特点。HMBC谱显示δ3.00的氢与δ171.53的碳相关,依此归属了与甲氧基相连的羰基碳。经过HSQC、HMBC及COSY谱分析,结合文献^[13],最终确定该目标化合物为二乙氨基前他达拉非,结构见图3。碳谱和氢谱数据归属见表1。

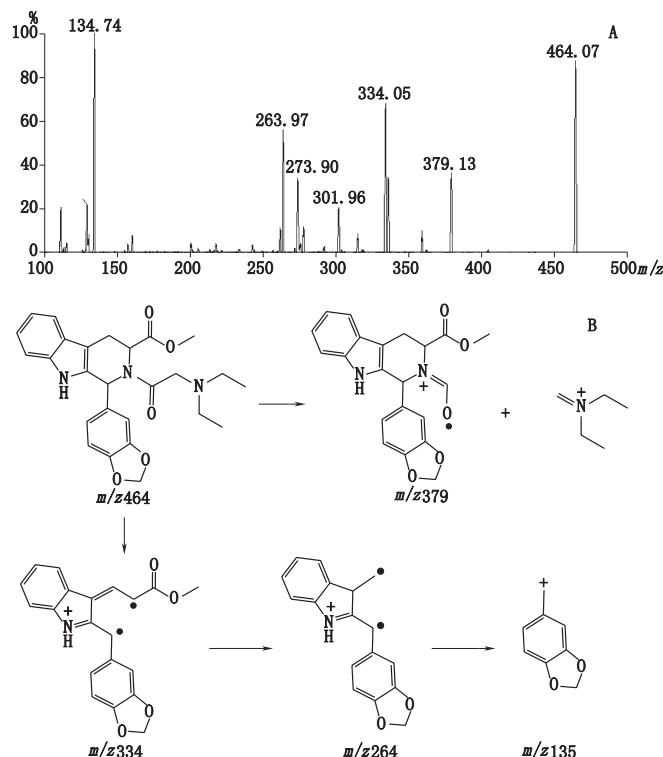


图2 目标化合物的子离子扫描质谱图(A),质谱裂解途径(B)

Fig. 2 Daughter scan MS spectrum of the target compound (A), and MS fragment pathways (B)

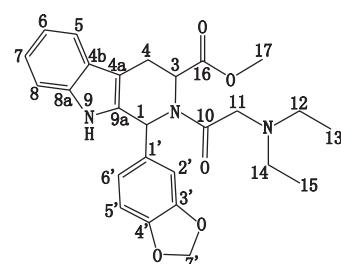


图3 目标化合物的结构图

Fig. 3 The structure of the target compound

2.6 样品测试

为保险起见,本实验还对保健食品样品进行了液相质谱分析,结果表明分离得到的化合物就是保健食品中非法添加的未知物,见图4。

2.6.1 色谱条件 色谱柱:Waters BEH C₁₈色谱柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:0.1%甲酸溶液-甲醇(60:40);流速:0.2 mL·min⁻¹;柱温:35 °C;进样量:5 μL。

2.6.2 质谱条件 模式为电喷雾离子化(ESI)方式,多反应监测(MRM),检测离子为正离子。干燥气流量为500 L·h⁻¹,雾化气流量为50 L·h⁻¹,氩气流量:0.1 mL·min⁻¹;取样锥孔电压30 V,碰撞能量:464>378.9,20 V;464>333.9,20 V。

表1 二乙氨基前他达拉非的核磁共振数据归属(DMSO-d₆)

Tab. 1 NMR data of diethylaminopretadalafil

位置 (position)	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}
1	6.73 (1H, s)	51.07
3	5.76 (1H, d, J=6.4 Hz)	52.02
4	3.49 (1H, m); 3.00 (1H, m)	21.61
4a		106.79
4b		126.44
5	7.51 (1H, d, J=8.0 Hz)	118.50
6	7.08 (1H, t, J=7.2 Hz)	121.92
7	7.02 (1H, t, J=7.2 Hz)	119.08
8	7.26 (1H, d, J=8.0 Hz)	111.66
8a		136.79
9a		130.80
10		170.99
11	3.20 (1H, m); 3.62 (1H, m)	58.35
12/14	2.48 (2H, m); 2.54 (2H, m)	47.24
13/15	0.93 (6H, m)	11.78
16		171.53
17	3.00 (3H, s)	52.07
1'		134.51
2'	6.66 (1H, s)	109.62
3'		146.93
4'		147.31
5'	6.76 (1H, t, J=8.4 Hz)	107.91
6'	6.45 (1H, d, J=8.0 Hz)	122.78
7'	5.95 (2H, d, J=4.0 Hz)	101.40
9 (NH)	10.83 (1H, s)	

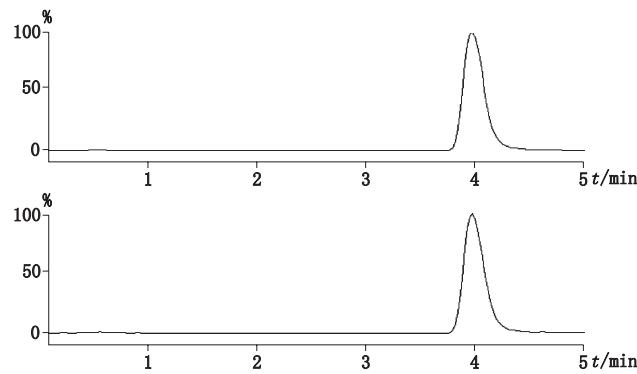


图4 保健食品样品 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 4 UPLC-MS/MS chromatograms of the health food sample

3 讨论

二乙氨基前他达拉非可能由氯前他达拉非与二乙胺反应而得,是他达拉非结构母核闭环前的中间体^[13],目前尚未见有关该化合物药理毒理活性数据的报道,不法生产者将其添加到保健食品中,使消费者面临极大的健康风险。

参考文献

- [1] TERRETT N K, BELL A S, BROWN D, et al. Sildenafil (Viagra), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1996, 6 (15): 1819
- [2] VENHUIS B J, de KASTE D. Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: A history, analytical aspects and health risks [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 69:196
- [3] PATEL DN, LI L, KEE CL, et al. Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: Analytical techniques and challenges [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87:176
- [4] SHIN M H, HONG M K, KIM W S, et al. Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction [J]. *Food Addit Contam*, 2003, 20 (9): 793
- [5] BLOK-TIPL, ZOMER B, BAKKERF, et al. Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products [J]. *Food Addit Contam*, 2004, 21 (8): 737
- [6] 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].中国药学杂志,2011,46(18):1441
- [7] 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
- [8] 高青,张喆,郭洪祝,等.中药及保健食品中PDE₅抑制剂检测方法研究及未知衍生物的发现[J].中国药学杂志,2008,43(2):142
- [9] GAO Q, ZHANG Z, GUO HZ, et al. Study on PDE₅ inhibitors and its unknown derivatives in traditional Chinese medicine and health food discovered [J]. *Chin Pharm J*, 2008, 43 (2):142
- [10] 罗卓雅,邓鲲鹏,雷毅.抗疲劳类保健品中添加化学成分的快速检测系统研究[J].药物分析杂志,2011,31(11):2091
- [11] LUO ZY, DENG KP, LEI Y. Studies on the system methods for determination of adulteration anti-fatigue health food [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31 (11):2091
- [12] 黄朝辉,蔡丹丹,陈仲益.保健食品中非法添加西地那非类似物的分析鉴定[J].药物分析杂志,2015,35(4):694
- [13] HUANG ZH, CAI DD, CHEN ZY, et al. Analysis and identification of illegally added sildenafil analogue in health food [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35 (4):694
- [14] 吴燕,李华龙,米亚娟,等.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
- [15] WU Y, LI LH, MI YX, et al. Study on the detection of new PDE₅ inhibitor in traditional Chinese medicine and health foods [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36 (1):117
- [16] POON T, LAM Y H, LAI CK, et al. Analogues of erectile dysfunction drugs: an under-recognised threat [J]. *Hong Kong Med J*, 2007, 13 (5): 359
- [17] 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 2009030 [S]
- [18] State Food and Drug Administration medical inspection and additional testing methods and project approval documents 2009030 [S]
- [19] ZHANG GF, YU Y, WU XO, et al. Separation and structural elucidation of a new tadalafil analogue, diethylaminopretadalafil, included as an adulterant in a dietary supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 94:210

(本文于2016年7月15日收到)