

中成药中非法添加他达拉非新型衍生物的检测及结构鉴定

中国华¹, 刘晓普¹, 董培智¹, 王慧^{2*} (1.山西省食品药品检验所, 太原 030031; 2.中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 目的 对中成药中非法添加的一种新型他达拉非类衍生物进行结构确证。方法 采用制备液相分离、纯化目标物, 采用高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用技术、核磁共振氢谱技术等手段对其结构进行表征, 并结合文献报道, 推断该化合物的结构。结果 通过数据分析与文献报道, 确定该化合物为一种新型的他达拉非类衍生物。结论 该化合物为一种新型的他达拉非衍生物, 在国内现行的 PDE5 型抑制剂检测标准中均未收载。本研究为进一步完善 PDE5 型抑制剂检测标准提供了科学依据。

关键词: 中成药; 非法添加; 他达拉非衍生物

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)02-0192-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.02.013

引用本文: 中国华, 刘晓普, 董培智, 等. 中成药中非法添加他达拉非新型衍生物的检测及结构鉴定[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2): 192-196.

Detection and Characterize of a Novel Tadalafil Derivatives Added Illegally into Traditional Chinese Medicines

SHEN Guohua¹, LIU Xiaopu¹, DONG Peizhi¹, WANG Hui^{2*} (1. Shanxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030031, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To confirm a novel tadalafil derivatives added illegally into the traditional Chinese medicines. **METHODS** The target compound was separated and purified by preparative liquid phase, characterized by high performance liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry, nuclear magnetic resonance hydrogen spectrometry and other means, and its structure was concluded based on the literature reported. **RESULTS** The new compound was identified as a novel derivatived tadalafil based on the data analysis and literature reported. **CONCLUSION** The compound has not been in the scope of current detection range of PDE5 inhibitor illegally added in traditional Chinese medicines, as a newly derivatived tadalafil. This work provides a basis for further improving the quality control of PDE5 inhibitors.

KEYWORDS: traditional Chinese medicines; illegally; tadalafil analogue

近年来陆续有报道称, 部分不法分子将 PDE5 型抑制剂类化合物非法用于壮阳类等中成药^[1]或提高免疫力、缓解体力疲劳的保健食品中^[2-4], 以获取暴利。在山西省食品药品检验所近年来承接的各类非法添加的委托检测中, 壮阳类新型化合物的更新率及检出率也非常高^[5]。

基于上述背景, 笔者对日常中成药和保健食品的非法添加中出现的异常色谱峰格外关注, 并成功发现了一些添加物^[6]。在原补充检验方法^[7]和市场监管总局最近发布食品补充检验方法的公告^[8]及文献报道^[9]中涉及那非类、他达类的成分近 90 种和 102 种中, 该化合物均不在上述标准收载之列。

本实验采用 HPLC-DAD、MS 及 ¹H-NMR 等

技术手段确定该异常色谱峰为他达拉非类的新型衍生物^[10-11], 为完善国家中成药和保健食品中非法添加化学药的数据库和人民用药安全的日常监管工作提供了技术保障。

1 仪器与试剂

戴安 U3000 高效液相色谱仪、LTQ-XL 液质联用仪离子阱检测器、Thermo QExactive 高分辨质谱仪均来自美国赛默飞世尔; MS204S 电子天平(瑞士梅特勒); ESI+离子源; CheetahHP100 制备液相仪(天津博纳艾吉尔公司); Bruker Plus 600 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); 富士 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Dikma Spursil C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 3 μm)质谱柱; Venusil MP C₁₈ (21.2 mm×250 mm, 5 μm, 100 Å)制备液相柱; 甲

基金项目: 山西省重点研发计划项目(201903D321011)

作者简介: 中国华, 男, 副主任药师 Tel: (0351)2021138
Tel: (010)67095979 E-mail: whwhwang@sina.com

E-mail: sxczhfsg@sina.com

*通信作者: 王慧, 女, 硕士, 副主任药师

醇、乙腈、氘代二甲基亚砷(Dikma 公司); 水为屈臣氏蒸馏水; 三氟乙酸(国药集团化学试剂有限公司, 化学纯, 含量 $\geq 99.0\%$); 所测样品为案件检品, 剂型为片剂, 生产日期 2018-05-16。

2 供试品溶液与分离纯化样品的制备

取本品 10 片, 研细, 精密称定一次服用量 0.5 g, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈 40 mL, 超声处理(功率 250 kW, 频率 33 kHz)15 min, 冷却至室温, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。

取本品 10 片, 研细, 加入 150 mL 乙腈超声处理(功率 250 kW, 频率 33 kHz)15 min, 离心($5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)5 min, 上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 滤液浓缩至约 10 mL, 加 10 mL 乙醇, 再加 10 mL 二甲基亚砷, 摇匀, 即得。收集主色谱峰, 将收集液冷冻干燥, 即得制备目标物。

3 检测条件

3.1 液相条件

富士 C_{18} 色谱柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$)。流动相 A: 甲醇-乙腈-磷酸三乙胺溶液(取三乙胺 7 mL, 用水稀释至 1 L, 用磷酸调 pH 至 2.8)(20:20:60); 流动相 B: 甲醇-乙腈-磷酸三乙胺溶液(取三乙胺 7 mL, 用水稀释至 1 L, 用磷酸调 pH 至 2.8)(46:46:8)。梯度洗脱: 0~12 min, 100%A; 12~25 min, 100% $\rightarrow$ 0%A; 25~30 min, 0%A; 30~31 min, 0% $\rightarrow$ 100%A; 31~45 min, 100%A。柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流量 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 二极管阵列检测器, 检测波长 230 nm ; 进样体积 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

3.2 色谱及质谱条件

3.2.1 色谱条件 Dikma Spursil C_{18} 色谱柱($150\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$); 流动相为甲醇-乙腈-含 0.1%冰乙酸的 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(30:25:45), 等度洗脱; 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 体积流量 $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

3.2.2 质谱条件 扫描模式: ESI^+ ; 毛细管温度: $300\text{ }^{\circ}\text{C}$; 鞘气流速: 30 psi; 喷雾电压: 4.5 kV; 辅助气流速: $3\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 调谐电压: 110 V; 碰撞能量: 10 eV; 扫描方式: 一、二级质谱全扫描, 扫描范围为 m/z 125~600。

3.3 制备液相纯化条件

Venusil MP C_{18} ($21.2\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, $100\text{ }\text{\AA}$)制备液相柱; 流动相 A: 水(0.1%三氟乙酸); 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱, 0~30 min, 80% $\rightarrow$

20%A; 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 体积流量 $18\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 210, 230 nm; 进样体积: 10 mL。

4 结果

4.1 液相筛查

采用“3.2”项下色谱条件测定供试品溶液, 发现一个异常色谱峰, 其与他达拉非、2-羟丙基去甲基他达拉非对照品(其色谱峰为双峰, 根据其结构式分析其为非对应异构体, 故为双峰)保留时间非常接近, 且 DAD 光谱图与二者也一致, 见图 1, 故推断该化合物可能是他达拉非的类似物。

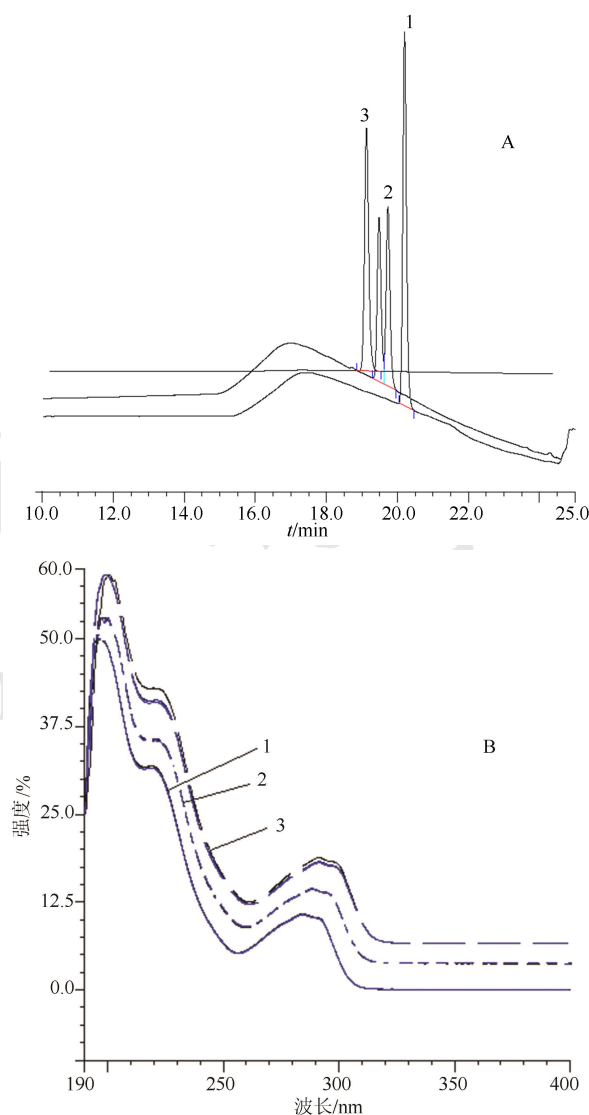


图 1 HPLC 色谱图(A)与紫外光谱图(B)

1-异常色谱峰; 2-羟丙基去甲基他达拉非; 3-他达拉非。

Fig. 1 HPLC chromatogram(A) and ultraviolet spectra(B)
1-aberrant peak; 2-2-hydroxypropyl demethylated tadalafil; 3-tadalafil.

4.2 液质筛查

按“2”项下方法制备供试品溶液, 用 50%乙腈进行适当的稀释, 按“3.2”项下液质条件进行

一、二级质谱全扫描, 可知该未知的准分子离子峰为 434, 与他达拉非(准分子离子峰为 390)不一致, 但与 2-羟丙基去甲基他达拉非的准分子离子峰一致, 同为 434(二级碎片主要有 312, 284, 302, 262, 250, 144, 134), 但二者的二级质谱碎片又存在细微差别, 表现在未知物中有 284 二级碎片, 但在 2-羟丙基去甲基他达拉非质谱碎片中未见, 且其他整体的碎片丰度均比未知物的弱, 见图 2~3, 主要裂解途径见图 4。

结合液相与液质的测定结果推断该化合物可能为 2-羟丙基去甲基他达拉非的同分异构体, 为进一步确证采用高分辨质谱二维核磁分析。

4.3 高分辨质谱确认

经高分辨质谱分析, 该目标物准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的实测质荷比为 434.170 40, 根据其为他达拉非类似物并经元素拟合, 确定目标物的元素组成为 $C_{24}H_{23}O_5N_3$ 。目标物的理论质荷比为 434.171 05, 计算高分辨质谱的误差, $[M+H]^+$ 为 1.5 ppm, 均 < 2 ppm, 符合高分辨质谱误差要求。

4.4 核磁氢谱分析

取“2”项下制备目标物约 10 mg, 加入氘代二甲亚砜使溶解, 摇匀, 进行 1H -NMR 检测。
 1H -NMR(CD_3Cl , 400 MHz) δ : 11.08(1H, s), 7.54(1H, d, $J=7.8$ Hz), 7.31(1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.06(1H, t, $J=7.5$ Hz), 7.00(1H, t, $J=7.4$ Hz), 6.85(1H, s), 6.79(1H, d, $J=8.0$ Hz), 6.76(1H, d, $J=8.3$ Hz), 6.16(1H, s), 5.93(2H, s), 4.51(1H, t, $J=5.1$ Hz), 4.42(1H, dd, $J=11.7, 4.7$ Hz), 4.23(1H, d, $J=16.9$ Hz), 3.93(1H, d, $J=17.0$ Hz), 3.37/3.55(1H each, m), 3.49(1H, dd, $J=16.0, 4.5$ Hz), 3.41(2H,

m), 2.96(1H, dd, $J=15.8, 11.7$ Hz), 1.67(2H, quintet, $J=6.7$ Hz)。

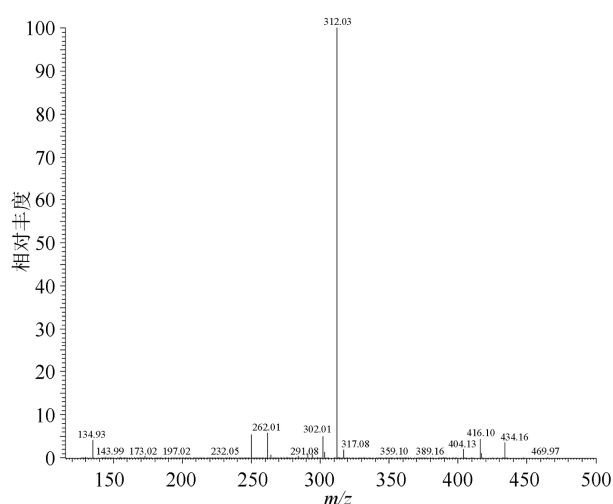


图 2 2-羟丙基去甲基他达拉非对照品质谱图

Fig. 2 Mass spectra of 2-hydroxypropyl demethylated tadalafil

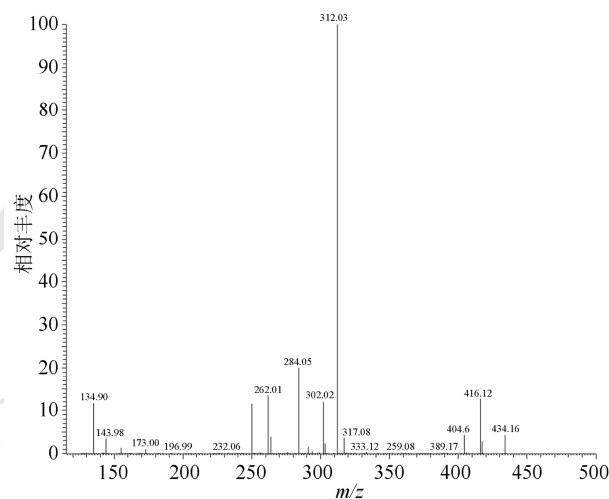


图 3 未知物质谱图

Fig. 3 Mass spectra of unknown compound

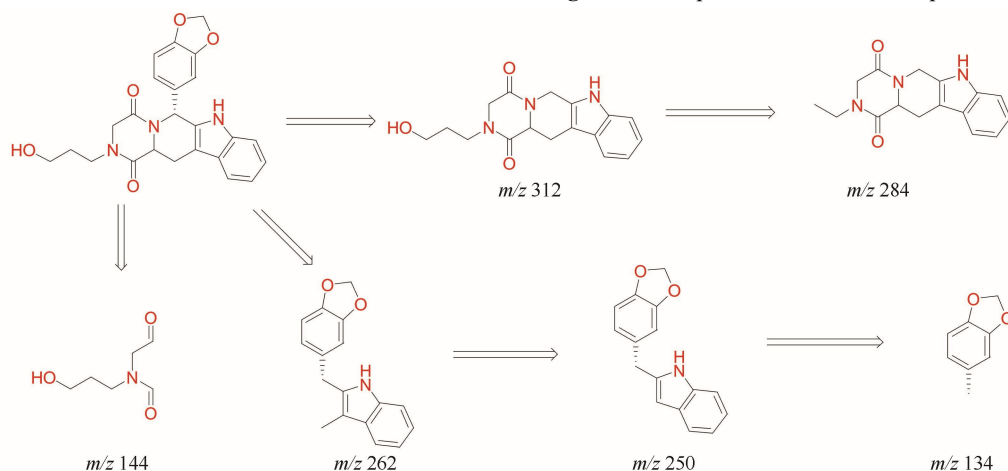


图 4 未知化合物裂解途径

Fig. 4 Proposed fragmentation pathway of unknown compound

H-H COSY 谱显示 δ 4.51(O-H)与 δ 3.41(H-20)相关, δ 1.67(H-19)与 δ 3.37/3.55 (H-18)和 δ 3.41 (H-20)相关, 见图 5。经过上述分析, 结合相关文献数据, 最终确证该化合物为 *N*-3-羟丙基去甲基他达拉非, 结构见图 6。氢谱数据归属见表 1。

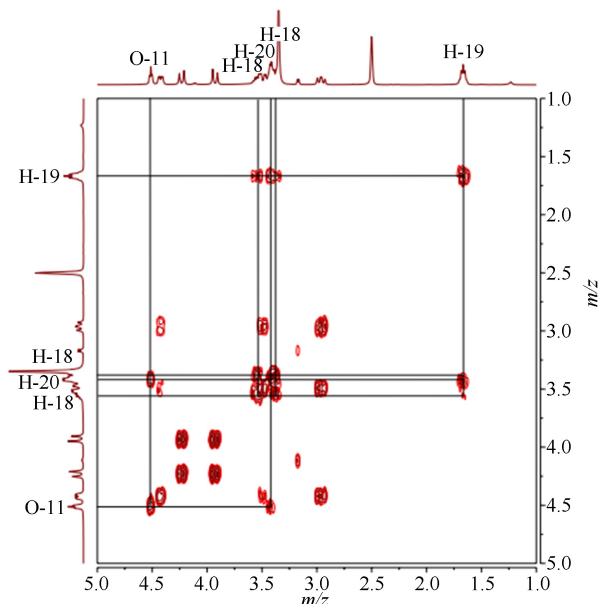


图 5 H-H COSY 谱中 H-18、H-19、H-20 和 O-H 的相关性
Fig. 5 Correlation of H-18, H-19, H-20 and O-H in H-H COSY

5 讨论

在中成药非法添加的检测中, 笔者发现一种与他达拉非衍生物(2-羟丙基去甲基他达拉非)一级质谱一致、二级质谱有细微差别的化合物。随后采用制备液相纯化、核磁共振氢谱分析, 结合

表 1 *N*-3-羟丙基去甲基他达拉非核磁氢谱数据归属

Tab.1 H-NMR spectra of *N*-3-hydroxypropyl demethylated tadalafil

位置	δ_{H}	COSY	位置	δ_{H}	COSY
1	—	—	15	—	—
2	4.42(1H, dd, $J=11.7, 4.7$ Hz)	H-3	16	3.93(1H, d, $J=17.0$ Hz) 4.23(1H, d, $J=16.9$ Hz)	—
3	2.96(1H, dd, $J=15.8, 11.7$ Hz) 3.49(1H, dd, $J=16.0, 4.5$ Hz)	H-2	17	—	—
4	—	—	18	3.37/3.55(1H, m)	H-19
5	—	—	19	1.67(2H, quintet, $J=6.7$ Hz)	H-18, H-20
6	7.54(1H, d, $J=7.8$ Hz)	H-7	20	3.41(2H, m)	H-19
7	7.00(1H, t, $J=7.4$ Hz)	H-6, H-8	21	—	—
8	7.06(1H, t, $J=7.5$ Hz)	H-7, H-9	22	6.76(1H, d, $J=8.3$ Hz)	H-3', H-6'
9	7.31(1H, d, $J=8.0$ Hz)	H-8	23	6.79(1H, d, $J=8.0$ Hz)	H-2'
10	—	—	24	—	—
11	11.08(1H, s)	—	25	—	—
12	—	—	26	6.85(1H, s)	H-2'
13	6.16(1H, s)	—	27	5.93(2H, s)	—
14	—	—	O-H	4.51(1H, t, $J=5.1$ Hz)	H-20

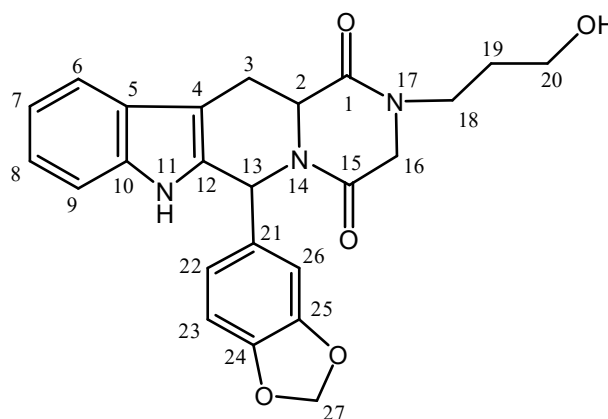


图 6 目标化合物的结构图

Fig. 6 Structure of the target compound

文献报道, 确定为一类新型他达拉非衍生物, 与 2-羟丙基去甲基他达拉非结构相比, 只是将其 19 位上的羟基转移至 20 位, 进行简单结构修饰而成为新化合物。

本实验采用液相、液质、核磁等检测方法, 并结合文献^[12]的佐证, 可确认该化合物为 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(3-hydroxypropyl)-2, 3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1'2':1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione, 另外, 通过该实验的确证过程分析液质的离子阱检测器相比其他的检测器在对同分异构体的鉴别上有一定独特的分辨能力。

该新化合物目前还没有 CAS Number 号, 在加拿大对照品供应商处仍显示为 Tadalafil Impurity 37, 参考相关文献, 暂将其命名为 *N*-3-羟丙基去甲基他达拉非。

根据近年来非法添加化学药品的检验检测结果统计分析,壮阳类中成药、提高免疫力或缓解体力疲劳保健食品、降糖类中成药或保健食品、减肥类保健食品中检出率非常高,从其来源分析,正规渠道检出率极低,但通过网上购买的相关中成药或保健食品中非法添加现象特别严重,尤其以壮阳、降糖、减肥、抗风湿为甚,且存在混合添加^[13]的现象,根本不顾使用带来的危害,肆意添加。综上,相关部门应将网络销售列为重点监控区域,加强监管,堵住漏洞,不应使网络成为法外之地。

目前该化合物的药理毒理作用鲜有报道,存在潜在危害,应该给予密切的关注。

REFERENCES

- [1] JIN M N, PENG Y, WANG X X, et al. Determination of 16 anti-allergic drugs in Chinese traditional patent medicine and health food by UPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(2): 186-190.
- [2] NI Z, ZHANG C S. Determination of 9 phosphodiesterase-5 inhibitors and its derivative illegally added to invigorant herbal medicines and dietary supplements by UPLC-MS/MS [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2018, 16(9): 1295-1299.
- [3] LIN W J, LIANG Q, ZHAN R T, et al. Rapid screening of 12 chemicals illegally added in anti-impotence Chinese patent drugs and health foods by mass spectrum database [J]. Phys Test Chem Anal Part B: Chem Anal(理化检验: 化学分册), 2018, 54(8): 875-882.
- [4] HANG F, WU H Q, HAUNG X L, et al. Simultaneous determination of 17 aphrodisiac chemical drugs illegally added in health products and Chinese patent medicines by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2016, 34(3): 270-278.
- [5] XU S, JIN P F, XU Q L, et al. Advances in the chemical substances illegally adulterated in traditional Chinese medicines and health foods [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2015, 24(16), 1843-1850.
- [6] SHEN G H, DONG P Z, WANG Z L, et al. Detection of *N*-ethyl tadalafil added illegally into traditional Chinese medicines by LC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(8): 1154-1157.
- [7] 2009030, 药品检验补充检验方法和检验项目批准件[S]. 2009.
- [8] 2018-05, 食品类那非类物质的测定 2018 第 14 号[S]. 2018.
- [9] 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]. Chin J Chromatogr(色谱), 2018, 36(10): 1005-1017.
- [10] LI K, GUO C C, SHI F, et al. Research progress in determination technologies for adulterated phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors and their analogue in invigorant herbal medicines and dietary supplements [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(4): 566-574.
- [11] GONG X, LU L, FENG Y L, et al. Fast screening of 25 illegally added chemical drugs in weight-reducing, lipid-lowering and hypoglycemic health foods by HPLC-IT-TOF-MS [J]. China Pharm(中国药师), 2018, 21(8), 1463-1468.
- [12] LEE C H, LIN Y L, HUANG Y C. Identification of a new tadalafil analogue, *N*-3-hydroxypropylnortadalafil, in a supplement product [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018(158): 257-261.
- [13] HUANG C H, CAI D D. Rapid identification of phenacetin and berberine illegally adulterated in traditional Chinese medicine and health food based on internet search strategy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(11), 1642-1645.

收稿日期: 2019-02-10
(本文责编: 曹粤锋)