

保健食品中新型二硫代卡地那非类似物的分析鉴定

黄朝辉¹, 蔡丹丹², 卓开华¹ (1.宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315048; 2.宁波戒毒研究中心, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 鉴定保健食品中非法添加的一个未知结构的二硫代卡地那非类似物。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结构的二硫代卡地那非类似物, 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)技术获得其准分子离子和二级质谱图, 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二硫代卡地那非类似物, 结构为 3,5-二甲基哌嗪基二硫代去甲卡地那非。结论 该化合物不在现有补肾壮阳类中成药检验标准的 13 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; 二硫代卡地那非类似物; 3,5-二甲基哌嗪基二硫代去甲卡地那非; 非法添加; 液相色谱-质谱联用; 结构鉴定

中图分类号: R927.11 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)07-0991-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.009

引用本文: 黄朝辉, 蔡丹丹, 卓开华. 保健食品中新型二硫代卡地那非类似物的分析鉴定[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 991-994.

Analysis and Identification of A New Dithio-carbodenafil Analogue in Health Foods

HUANG Zhaohui¹, CAI Dandan², ZHUO Kaihua¹ (1.Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China; 2.Ningbo Drug Research Center, Ningbo 315010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify an unknown dithio-carbodenafil analogue illegally adulterated in health foods. **METHODS** An unknown dithio-carbodenafil analogue was observed in a routine screening for compounds illegally adulterated in health foods by HPLC-DAD. The compound of interest was isolated by silica gel TLC. Its quasi-molecular ion and MS² fragmentation spectrum were obtained by UPLC-MS/MS, and its ¹³C-NMR and ¹H-NMR spectrum were also obtained using nuclear magnetic resonance. Its structure was elucidated by analysis of these data in combination of the literature. **RESULTS** A new dithio-carbodenafil analogue, which structural was 3,5-dimethylpiperazinyl dithio-desmethyl carbodenafil, was detected in health foods. **CONCLUSION** It is a new compound illegally adulterated in health foods. The current inspection standard, which lists 13 target compounds, does not include this compound.

KEY WORDS: health food; dithio-carbodenafil analogue; 3,5-dimethylpiperazinyl dithio-desmethyl carbodenafil; illegal addition; LC-MS/MS; structural identification

选择性的 5 型磷酸二酯酶 (type 5 phosphodiesterase, 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 (erectile dysfunction, ED)^[1-2]。对这些结构母核进行修饰可得到数量众多的衍生物^[3-4], 因此补肾壮阳类保健食品和中成药中非法添加 PDE₅ 抑制剂的事例屡见不鲜^[5-10]。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; 同时由于医师和患者的不知情, 将忽略非法添加的药物与患者正在使用的其他药物可能产生相互作用, 甚至是禁忌证, 这都将给使用者带来直接或潜在的伤害^[11]。目前 PDE₅ 抑制剂的检

测方法依照国家药品监督管理局颁布的现行检验标准检测 13 种非法添加成分^[12-13]。然而不法生产者为了规避检查, 不断尝试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持续追踪分析具有重要意义。

本研究采用 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二硫代卡地那非类似物, 经过正相硅胶薄层色谱分离纯化得到目标物后, 用 UPLC-MS/MS 分析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 3,5-二甲基哌嗪基二硫代去甲卡地那非。

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(2015A610291)

作者简介: 黄朝辉, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (0574)89180376

E-mail: huang-zhao@163.com

1 仪器与试剂

Thermo U3000 HPLC 仪(美国 Thermo Fisher 公司), 色谱柱为迪马 Inertsustain C₁₈ 键合硅胶柱(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); 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)。

硫代艾地那非对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 520048-201401, 纯度: 99.8%); 保健食品 1 批, 为市售品; 硅胶 GF₂₅₄ 薄层色谱板(青岛海洋化工厂, 批号: 20160712); 氘代二甲亚砜(Bruker 公司); 乙腈(HPLC 级); 甲醇(HPLC 级); 甲酸(LC-MS 级); 乙腈(LC-MS 级); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

称取硫代艾地那非对照品约 10 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加磷酸三乙胺溶液(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)(流动相 A)溶解并稀释至刻度, 摇匀; 量取 1.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 即得硫代艾地那非对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

取供试品 1 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(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 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%→0A; 25~30 min, 0A; 30~31 min, 0→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, 其保留时间与硫代艾地那非相近, 但是

DAD 扫描图不同于现有检测标准所列的 13 种对照品, 而与二硫代卡地那非的 DAD 扫描图相似^[14]。见图 1。因此推测该化合物可能具有与二硫代卡地那非相同的结构母核, 是二硫代卡地那非的类似物。

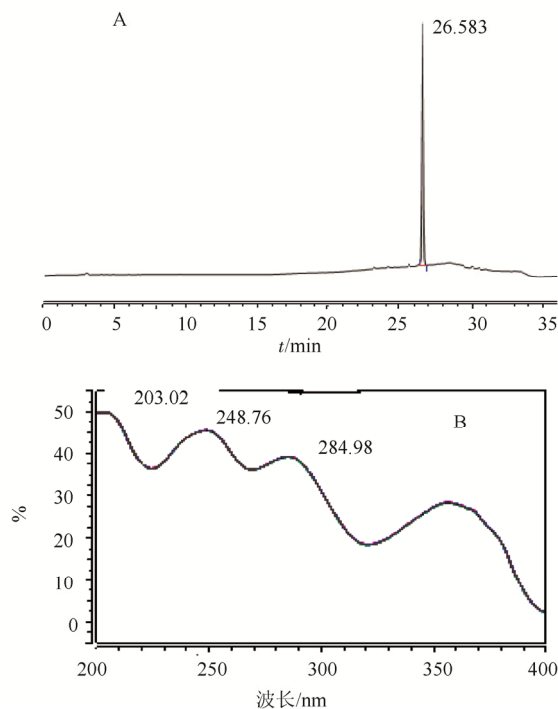


图 1 样品溶液 HPLC 色谱图(A)和保健食品中未知化合物紫外光谱图(B)

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

2.4 分离纯化目标化合物

取保健食品 2 片, 研细, 置锥形瓶中, 加乙腈 50 mL, 超声萃取 20 min, 滤过, 滤液浓缩。用硅胶 GF₂₅₄ 薄层板, 以乙酸乙酯为展开剂展开, 刮取目标化合物条带, 置锥形瓶中, 加乙腈 20 mL, 超声 20 min, 滤过, 滤液挥去溶剂, 得淡黄色透明固体(20 mg), 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 电喷雾离子源(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(MS scan)和子离子扫描(daughter scan)2 种模式, 质量数范围 100~550。

2.5.2 测试溶液的制备 取“2.4”项下分离纯化所得目标化合物约 1 mg, 加乙腈 50 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“2.5.2”项下测试溶液,直接进样做分子量扫描(MS scan),得到准分子离子峰为499.2(M+H)(图 2A)。以 499.2 为母离子进行子离子扫描(daughter scan),得到二级质谱图(图 2B)。质谱裂解途径见图 2C。

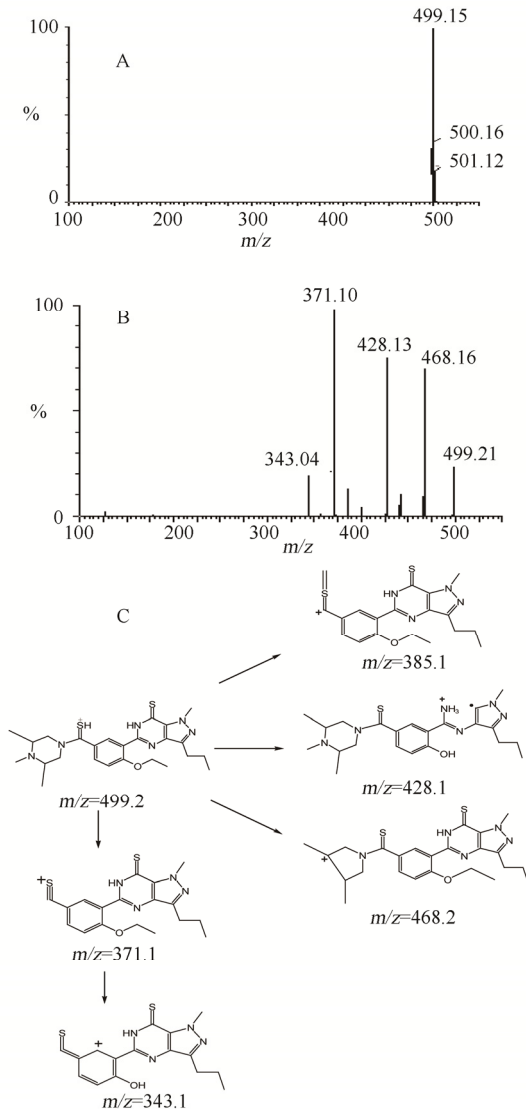


图 2 目标化合物的母离子扫描图(A)、子离子扫描质谱图(B)、质谱裂解途径(C)

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

2.5.4 核磁共振氢谱 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.31(1H, s, NH), 7.70(1H, s), 7.48(1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.18(1H, d, $J=8.8$ Hz), 5.22(1H, d, $J=12$ Hz), 4.41(3H, s), 4.20(2H, q, $J=6.8$ Hz), 3.78(1H, d, $J=12$ Hz), 3.13(1H, t, $J=11.6$ Hz), 2.97(1H, t, $J=12$ Hz), 2.80(2H, t, $J=7.2$ Hz), 2.30(1H, m), 2.22(1H, m), 2.19(3H, s), 1.73(2H, sextet,

$J=7.6$ Hz), 1.37(3H, t, $J=6.8$ Hz), 1.12(3H, d, $J=6$ Hz), 0.92(3H, d, $J=7.2$ Hz), 0.91(3H, t, $J=7.2$ Hz)。

核磁共振碳谱数据: $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 197.1(C=S), 172.1(C=S), 157.4, 148.7, 145.3, 135.1, 134.0, 132.3, 131.2, 128.6, 120.9, 113.2, 65.3, 58.4, 57.8, 57.4, 55.5, 39.5, 37.4, 27.4, 22.1, 18.0, 17.6, 14.9, 14.2。

HSQC 谱显示 $\delta 55.5$ 的碳同时与 $\delta 2.97$ 和 $\delta 5.22$ 的两氢相关, $\delta 57.8$ 的碳同时与 $\delta 3.13$ 和 $\delta 3.78$ 的两氢相关, 表明这 2 个碳上各自 2 个氢原子的化学环境差异显著, 符合二硫代卡地那非的结构特点。HMBC 谱显示, $\delta 2.19$ (H-29) 与 $\delta 57.4$ (C-25) 及 $\delta 58.4$ (C-27) 相关, $\delta 1.12$ (H-30) 与 $\delta 57.4$ (C-25) 及 $\delta 55.5$ (C-24) 相关, $\delta 0.91$ (H-31) 与 $\delta 58.4$ (C-27) 及 $\delta 57.8$ (C-28) 相关, $\delta 0.91$ (H-13) 与 $\delta 22.1$ (C-12) 及 $\delta 27.3$ (C-11) 相关, $\delta 1.37$ (H-21) 与 $\delta 65.3$ (C-20) 相关, $\delta 4.41$ (H-10) 与 $\delta 132.3$ (C-8) 相关。经过 HSQC、HMBC 谱分析, 结合文献数据^[15], 最终确定该目标化合物为 3,5-二甲基哌嗪基二硫代去甲卡地那非, 结构见图 3。碳谱和氢谱数据归属见表 1。

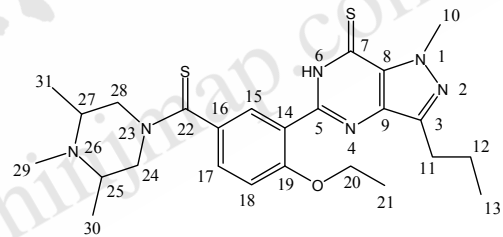


图 3 目标化合物的结构图

Fig. 3 The structure of the target compound

2.6 样品测试

为进一步确认, 本研究还对保健食品样品进行了 UPLC-MS/MS 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 C_{18} 色谱柱 (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1%甲酸溶液-乙腈(18:82); 流速: 0.2 mL \cdot min $^{-1}$; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 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 \cdot h $^{-1}$, 雾化气流量为 50 L \cdot h $^{-1}$, 氩气流量: 0.1 mL \cdot min $^{-1}$; 取样锥孔电压 30 V, 碰撞能量: 499.2>371.1, 25 V; 499.2>428.1, 25 V。化合物的 UPLC-MRM 见图 4。

表 1 3,5-二甲基哌嗪基二硫代去甲卡地那非的核磁共振数据归属(DMSO- d_6)

Tab. 1 NMR data of 3,5-dimethylpiperazinyl dithio-desmethyl carbodenafil (DMSO- d_6)

| 位置 | $\delta_H(J, \text{Hz})$ | δ_C | 位置 | $\delta_H(J, \text{Hz})$ | δ_C |
|----|------------------------------|------------|----|--|------------|
| 1 | - | - | 17 | 7.48(1H, d, $J=8.4$ Hz) | 131.2 |
| 2 | - | - | 18 | 7.18(1H, d, $J=8.8$ Hz) | 113.2 |
| 3 | - | 145.3 | 19 | - | 157.4 |
| 4 | - | - | 20 | 4.20(2H, q, $J=6.8$ Hz) | 65.3 |
| 5 | - | 148.7 | 21 | 1.37(3H, t, $J=6.8$ Hz) | 14.9 |
| 6 | 13.31(1H, s) | - | 22 | - | 197.1 |
| 7 | - | 172.1 | 23 | - | * |
| 8 | - | 132.3 | 24 | Ha 2.97(1H, t, $J=12$ Hz) He 5.22(1H, d, $J=12$ Hz) | 55.5 |
| 9 | - | 134.0 | 25 | 2.30(1H, m) | 57.4 |
| 10 | 4.41(3H, s) | 39.5 | 26 | - | * |
| 11 | 2.80(2H, t, $J=7.2$ Hz) | 27.3 | 27 | 2.22(1H, m) | 58.4 |
| 12 | 1.73(2H, sextet, $J=7.6$ Hz) | 22.1 | 28 | Ha 3.13(1H, t, $J=11.6$ Hz) He 3.78(1H, d, $J=12$ Hz) | 57.8 |
| 13 | 0.92(3H, t, $J=7.2$ Hz) | 14.2 | 29 | 2.19(3H, s) | 37.4 |
| 14 | - | 135.1 | 30 | 1.12(3H, d, $J=6$ Hz) | 18.0 |
| 15 | 7.70(1H, s) | 128.6 | 31 | 0.91(3H, d, $J=7.2$ Hz) | 17.6 |
| 16 | - | 120.9 | | | |

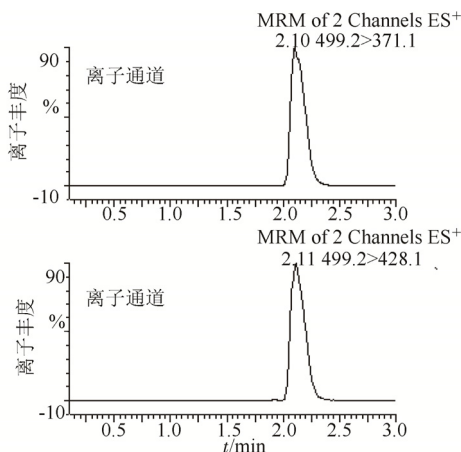


图 4 保健食品样品 UPLC-MS/MS 色谱图

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

3 讨论

3,5-二甲基哌嗪基二硫代去甲卡地那非是 1 个新的二硫代卡地那非的结构类似物, 目前尚未登记 CAS 号, 亦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。

本研究在没有对照品的情况下, 依靠细致的文献检索, 快速锁定了未知化合物的结构类型, 明确鉴定了一个新型非法添加物质的结构, 为检测标明外非法添加物质的筛查提供了一种有效的

技术解决方案。

REFERENCES

- 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): 1819-1824.
- LI H Y, CAI Z L, TAO R Y, et al. Pharmacological and clinical studies on avanafil-a new drug for erectile Dysfunction [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂志), 2016, 35(2): 77-81.
- 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): 196-208.
- PATEL D N, LI L, KEE C L, et al. Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: Analytical techniques and challenges [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014(87): 176-190.
- XIA J, YAO H, DU L P, et al. Structue identification of a new tadalafil related compound in dietary supplement [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2017, 34(8): 1167-1170.
- DENG K P, LUO Z Y, LEI Y. Detection of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, aildenafil, in health care products for promoting sexual function [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2011, 46(18): 1441-1444.
- GAO Q, ZHANG Z, GUO H Z, et al. Study on PDE₅ inhibitors and its unknown derivatives in traditional chinese medicine and health food discovered [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2008, 43(2): 142-146.
- LUO Z Y, DENG K P, LEI Y. Studies on the system methods for determination of adulteration anti-fatigue health food [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2011, 31(11): 2091-2094.
- HUANG Z H, CAI D D, CHEN Z Y, et al. Analysis and identification of illegally added sildenafil analogue in health food [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2015, 35(4): 694-698.
- WU Y, LI L H, MI Y X, et al. Study on the detection of new PDE₅ inhibitor in traditional Chinese medicine and health food [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2016, 36(1): 117-121.
- POON T, LAM Y H, LAI C K, et al. Analogues of erectile dysfunction drugs: an under-recognised threat [J]. *Hong Kong Med J*, 2007, 13(5): 359-363.
- State Food and Drug Administration medical inspection and additional testing methods and project approval documents 2009030 [S].
- Detection of nor-tadalafil and thiosildenafil in foods(HPLC-MS BJS 201704) [S].
- KEE C L, GE X W, GILARD V, et al. A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements [J]. *J Pharm Biomed Anal* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.031>.
- KEE C L, LOW M Y, GE X W, et al. Isolation and characterization of a novel dithio-carbodenafil analogue from a health supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017(137): 132-138.

收稿日期: 2017-11-03

(本文责编: 李艳芳)