

保健食品中非法添加西地那非衍生生物的确证

王珂¹, 董培智², 申国华², 张禄², 梁卜文², 郭景文^{2*} (1. 山西中医药大学, 晋中 030619; 2. 山西省食品药品检验所, 太原 030001)

摘要 目的: 对在保健食品中发现的一种非法添加的西地那非衍生物进行确证。方法: 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 技术在日常检测保健食品非法添加时发现一种新型西地那非衍生物。经制备液相法分离纯化得到该化合物, 采用高效液相色谱-二级质谱联用 (LC-MS/MS) 技术获得该化合物准分子离子和碎片离子, 并进一步通过核磁共振氢谱确认, 结合文献分析, 最终确证该化合物。结果: 该化合物分子式 $C_{23}H_{30}N_6O_3$, 分子量438, 结构为去甲基卡波地那非。结论: 去甲基卡波地那非在国内未被报道, 是一种新型PDE-5抑制剂。

关键词: 保健食品; 非法添加; 西地那非衍生物; PDE-5抑制剂; 去甲基卡波地那非; 液质联用; 核磁共振

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2019)04-0429-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2019.04.013

Confirmation of Sildenafil Derivatives Illegally Added in Health Foods

Wang Ke¹, Dong Peizhi², Shen Guohua², Zhang Lu², Liang Buwen², Guo Jingwen^{2*} (1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China; 2. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective: To confirm one kind of sildenafil derivatives illegally added in health foods. **Methods:** A novel sildenafil derivative was observed in a routine screening for compounds illegally added in health foods by HPLC-DAD. The compound was purified by preparative HPLC. Its quasi-molecular ion and MS2 fragmentation spectrum were obtained by UPLC-MS/MS and was further confirmed by ¹H-NMR. The structure of the compound was elucidated by analysis of these data and literature review. **Results:** The formula of this compound was $C_{23}H_{30}N_6O_3$ with molecular weight of 438, and the structure was Desmethyl Carbodenafil. **Conclusion:** Desmethyl Carbodenafil has not been reported in China yet and is a novel PDE-5 inhibitor.

Keywords: health foods; illegally added; sildenafil derivatives; PDE-5 inhibitor; Desmethyl Carbodenafil; liquid chromatograph-mass spectrometer; nuclear magnetic resonance

磷酸二酯酶-5 (PDE-5) 抑制剂是一类抑制磷酸二酯酶活性的药物, 被用于治疗男性勃起功能障碍等疾病^[1]。由于其特殊的功能主治和市场需求, 在抗疲劳类保健品中添加PDE-5抑制剂成为不法厂商谋取暴利的手段, 其中以添加西地那非、他达

拉非和伐地那非等PDE-5抑制剂最为常见^[2-3]。为此, 2009年原国家食品药品监督管理总局陆续颁布了用于监管中成药及保健食品中非法添加PDE-5抑制剂的补充检验方法^[4-7], 对不法行为起到了有效的震慑。但随着监督检查工作力度的不断深入,

作者简介: 王珂, 硕士研究生; 研究方向: 中药分析技术与质量控制; E-mail: wangk7799@163.com

通信作者: 郭景文, 主任药师, 硕士研究生导师; 研究方向: 中药分析; E-mail: guojw2009@126.com

陆续报道发现一些现行检验标准中未涵盖的新型PDE-5抑制剂^[8-20]。这些新型PDE-5抑制剂大多是西地那非衍生物,由于国内无相关检验标准,可能被检验人员忽略,危害消费者健康,进而扰乱保健食品市场秩序。

笔者在宣称抗疲劳的保健食品中通过“异常色谱法”^[21-22]发现一种西地那非衍生物,通过高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术以及核磁共振氢谱(¹H-NMR)技术对其结构进行解析,并结合国外文献分析,最终确定该化合物为去甲基卡波地那非(Desmethyl Carbodenafil)。

1 材料

1.1 材料与设备

甲醇(色谱纯,美国迪马公司),乙腈(色谱纯,美国迪马公司),甲酸(色谱纯,天津科密欧公司);二级纯化水;抗疲劳的保健食品来源于抽检案件;去甲基卡波地那非对照品(纯度99.7%,购自加拿大TLC pharmachem公司)。

1.2 仪器与设备

LC-MS8050液质联用仪(日本岛津公司);Ultimate3000高效液相色谱仪(美国赛默飞公司);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);MS-204S电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

2 方法

2.1 高效液相色谱方法

参照文献^[4]中高效液相色谱条件。色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),柱温:35℃;流速:1 mL·min⁻¹;流动相:A为磷酸三乙胺溶液(取三乙胺7 mL,用水稀释至1000 mL,用磷酸调pH至2.8)-甲醇-乙腈(60:20:20),B为磷酸三乙胺溶液-甲醇-乙腈(8:46:46),梯度洗脱:0~12 min, 0%B;12~25 min, 100%B;25~30 min, 100%B;30~31 min, 0%B;31~36 min, 0%B;二极管阵列检测器;检测波长:230 nm;扫描范围:200~400 nm。

2.2 高效液相色谱-质谱联用方法

参照文献^[5]液质联用色谱条件。色谱柱:Dikma Spursil C18色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3 μm);流动相:0.1%甲酸水(A)-0.1%甲

酸乙腈(B);梯度洗脱:0~1 min, 10%B;1~4 min, 40%B;4~7 min, 90%B;7~9 min, 90%B;9~9.1 min, 10%B;9.1~12 min, 10%B;流速:0.3 mL·min⁻¹;进样量2 μL;柱温35℃。质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI);正离子扫描模式;多反应检测(MRM);雾化器流速:3 L·min⁻¹;加热器温度:400℃;干燥气流速:10 L·min⁻¹;加热气流速:10 L·min⁻¹;接口温度:300℃;喷雾电压:4.5 kv。

2.3 分离纯化方法

称取7 g样品,用125 mL乙腈超声(功率:250 W 频率:33 Hz)提取20 min,8000 r·min⁻¹离心8 min,0.22 μm尼龙滤膜滤过,旋转蒸发至10 mL,加10 mL乙醇超声(功率:250 W 频率:33 Hz)溶解,加10 mL二甲基亚砜稀释。采用Venusil MP C18(100 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱。流动相A为0.1%甲酸水,B为乙腈;梯度洗脱:0~3 min, B 10%;3~43 min, B 10%~50%;波长230 nm下收集主色谱峰,冷冻干燥,即得纯化物。

2.4 核磁共振方法

称取5 mg纯化样品,加入氘代氯仿溶解,使用5 mm PABBO 探头,¹H观察频率为600.23 MHz,进行¹H-NMR测试。

2.5 对照品溶液制备

精密称取对照品8 mg,置25 mL容量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm有机滤膜滤过,即为HPLC对照品溶液。将对照品溶液稀释至每1 mL含有100 ng溶液,作为MS对照品溶液。

2.6 供试品溶液制备

精密称取待测样品0.1 g,置10 mL容量瓶中,加乙腈8 mL超声(功率:250 W 频率:33 Hz)15 min,放冷至室温,用乙腈稀释至刻度,摇匀,0.22 μm有机滤膜滤过,即为HPLC供试品溶液。将HPLC供试品溶液用乙腈稀释至每1 mL含有100 ng溶液,作为MS供试品溶液。

3 结果与分析

3.1 高效液相色谱分析

在样品的色谱图中发现一个色谱峰,保留时间为7.980 min(见图1)。在209 nm和295 nm处有最大吸收波长(见图2)。与补充检验办法(编号2009030)所列11种非法添加物保留时间及光谱图均不一致,进一步通过质谱分析。

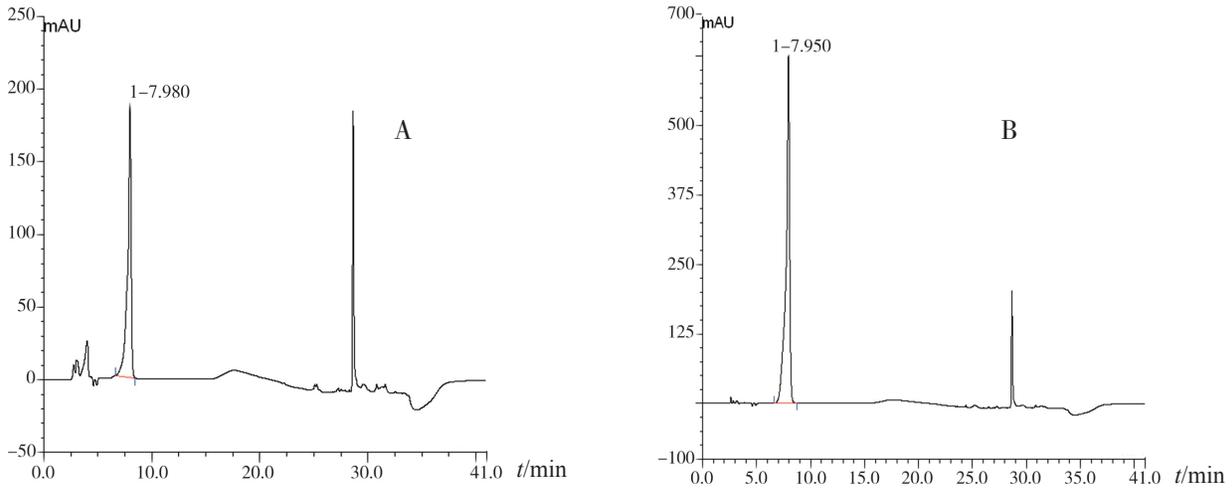


图1 样品色谱图 (A) 与去甲基卡波地那非对照品色谱图 (B)

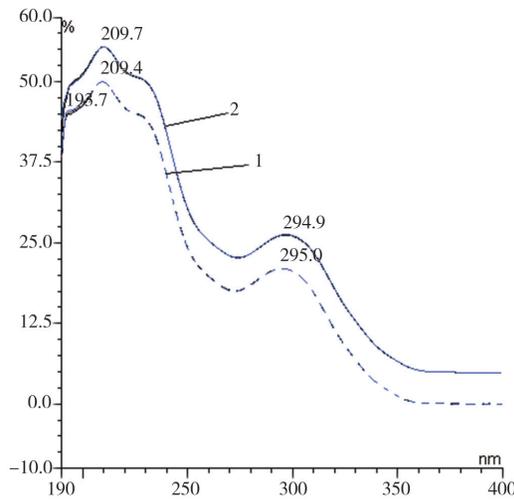


图2 样品 (1) 和去甲基卡波地那非对照品 (2) 紫外光谱图

3.2 质谱解析

对样品进行一级和二级质谱全扫描分析 (见图3)。结果显示分子离子峰 $[M+H]^+$ 为439.20, 二级质谱的主要裂解碎片离子 (m/z) 分别为339.15, 311.05。与文献^[23]比较, 发现比卡波地那非质荷比少14, 同时含有相同的碎片离子 m/z 339, m/z 311。推断可能是卡波地那非失去甲基形成的, 进一步通过核磁氢谱解析。

3.3 $^1\text{H-NMR}$ 解析

经制备液相纯化, 得到类白色的固体化合物18.4 mg, 纯度为98.9%。该化合物核磁氢谱解析结果: $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Chloroform- d) δ 11.01

(s, 1H), 8.60 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.36 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.29 (s, 3H), 3.84 (s, 2H), 3.70 (s, 2H), 2.94 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.59 (s, 4H), 2.43 (s, 3H), 1.89 (h, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.65 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.05 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)。与文献中报道的去甲基卡波地那非核磁共振氢谱^[24]对比, 信号一致, 确证该未知化合物为去甲基卡波地那非, 化合物结构见图4。

3.4 样品测试

为进一步确认, 后经与对照品比对, 结果确

证未知物为去甲基卡波地那非。

3.4.1 质谱测定

经与去甲基卡波地那非对照品比对, 确证样品与对照品一级和二级质谱图(见图5)相一致。根据二级质谱碎片推断去甲基卡波地那非的裂解机理(见图6): 母离子 m/z 439.20失去哌嗪环形成碎片离子 m/z 339.15, 再失去乙基, 得到碎片离子 m/z

311.05。

3.4.2 含量测定

采用高效液相色谱法测定, 去甲基卡波地那非对照品保留时间为7.850 min, 其最大吸收波长为209 nm和295 nm, 与样品一致。同时计算得出样品中去甲基卡波地那非含量为 $5.015 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

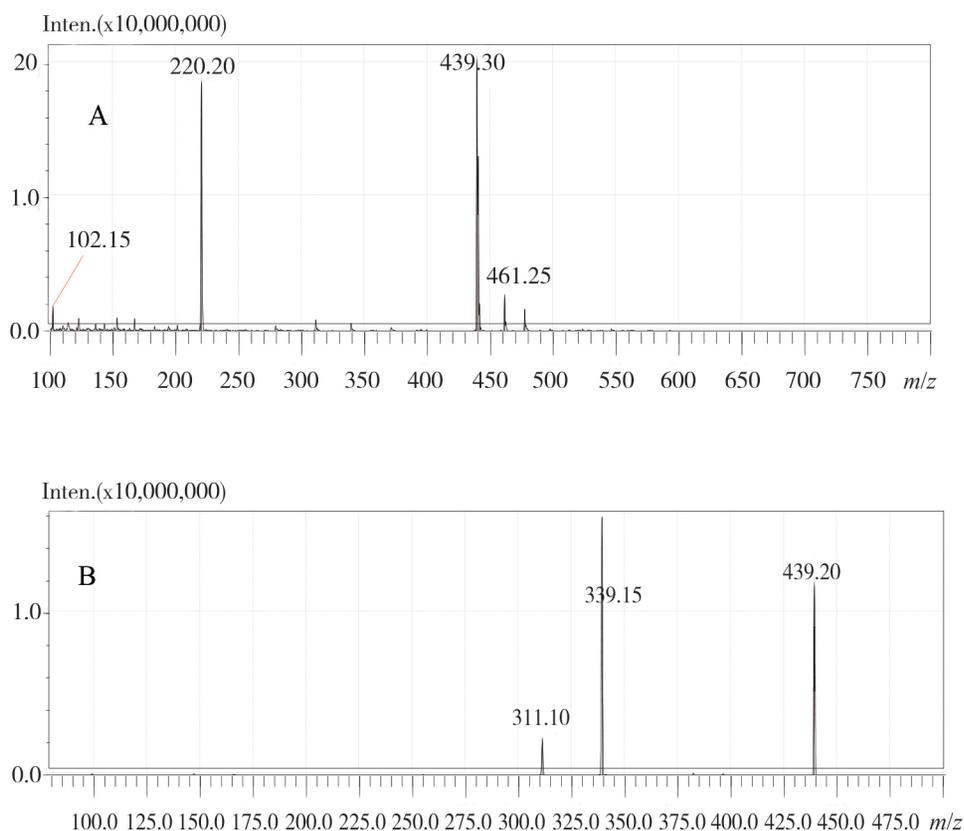


图3 样品一级质谱图(A)和二级质谱图(B)

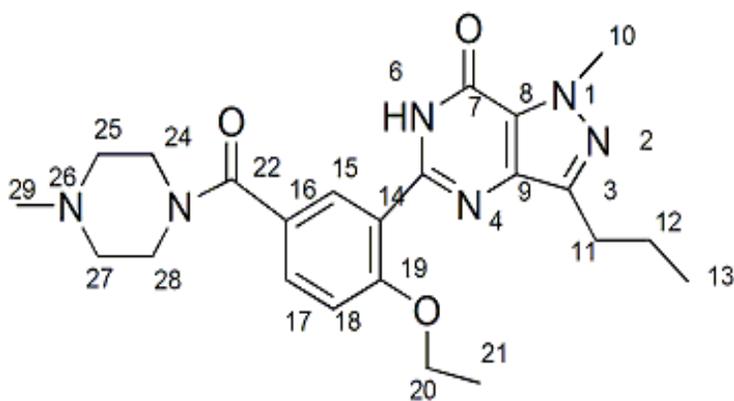


图4 去甲基卡波地那非结构

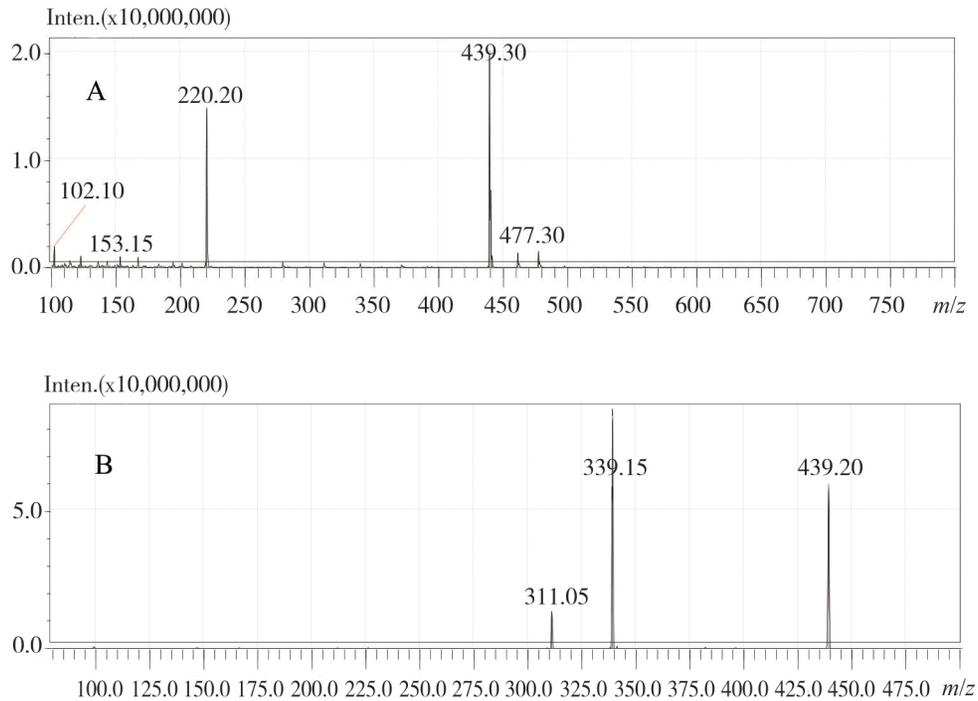


图5 去甲基卡波地那非对照品一级质谱图(A)与二级质谱图(B)

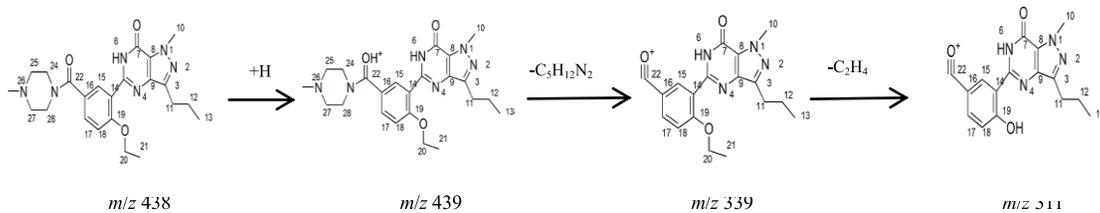


图6 去甲基卡波地那非质谱裂解规律

4 讨论

在抗疲劳类保健食品中发现的新化合物经 HPLC-DAD、LC-MS/MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 确证，该化合物为 5-(5-(4-甲基哌嗪-1-羰基)-2-乙氧苯基)-1-甲基-3-丙基-1H-吡唑[4,3-d]嘧啶-7(6H)-酮，命名为去甲基卡波地那非。该化合物未在国内报道，没有相关检验标准，因此，有必要完善检验标准，为打击不法行为提供技术支撑。

去甲基卡波地那非在市场上并没有合法来源，可能不法分子通过自制的化工原料添加到保健食品或功能性食品中，由于添加剂量随意，且未经过系统的毒理学研究，消费者在不知情的情况下日常服用添加该类化合物的保健食品，会对人体健康带来巨大危害，国外已有服用该化合物致死案例的报道^[25]。

参考文献：

- [1] 蒋丽萍, 屠婕红, 徐宏祥, 等. UPLC-MS/MS法测定抗疲劳类保健食品中非法添加的9种壮阳类化学药物[J]. 中草药, 2015, 46(15): 2238-2245.
- [2] 高咏莉, 郭晓鸥, 肖丽和, 等. HPLC-MS/MS法测定补肾壮阳类药品或保健品中非法添加羟基豪莫西地那非的研究[J]. 中成药, 2009, 31(7): 1058-1061.
- [3] 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): 694-698.
- [4] 国家食品药品监督管理总局. 编号2009030 药品检验补充检验方法和检验项目批准件 补肾壮阳类中成药中PDE5型抑制剂的快速检测办法[S]. 2009.
- [5] 国家食品药品监督管理总局. BJS201601 国家食品补充检验办法 食品中那非类物质的测定[S]. 2016.

- [6] 国家食品药品监督管理总局. BJS201704 国家食品补充检验办法 食品中去甲基他达拉非和硫代西地那非的测定高效液相色谱-串联质谱法[S]. 2017.
- [7] 国家食品药品监督管理总局. BJS201710 国家食品补充检验办法 保健食品中75种非法添加化学药物的检测[S]. 2017.
- [8] Xiaowei Ge, Lin Li, Hwee-Ling Koh, et al. Identification of a New Sildenafil Analogue in a Health Supplement [J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2011, 56 (3) : 491-496.
- [9] Lin YT, Huang YC, Lee HC, et al. Isolation and Identification of a Novel Sildenafil Analogue Adulterant in Herbal Products[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2017, 34 (3) : 330-334.
- [10] Huang YC, Lee HC, Lin YL, et al. Identification of a New Sildenafil Analogue Adulterant, Desethylcarbodenafil, in a Herbal Supplement[J]. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2016, 33 (11) : 1637-1642.
- [11] J Ulloa, L Sambrotta, F Redko, et al. Detection of a Tadalafil Analogue as an Adulterant in a Dietary Supplement for Erectile Dysfunction[J]. *Journal of Sexual Medicine*, 2015, 12 (1) : 152-157.
- [12] Sun J, Yu H, Hu Q, et al. Identification of a New Sildenafil Analogue Based On Q-TOF-MS[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49 (4) : 513-516.
- [13] Han KM, Lee JH, Park HJ, et al. Isolation and Identification of Novel Propoxyphenyl Thiosildenafil Found in Natural Health Food Product[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2014, 31 (1) : 1-6.
- [14] NS Kim, JH Lee, KM Han, et al. Isolation and Structural Characterisation of a Propoxyphenyl-linked Thiohomosildenafil Analogue Found in a Herbal Product[J]. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2013, 30 (10) : 1693-1700.
- [15] YH Lam, WT Poon, CK Lai, et al. Identification of a Novel Vardenafil Analogue in Herbal Product[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2008, 46 (4) : 804-807.
- [16] JC Reepmeyer, JT Woodruff, DA D'Avignon. Structure Elucidation of a Novel Analogue of Sildenafil Detected as an Adulterant in an Herbal Dietary Supplement[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2007, 43 (5) : 1615-1621.
- [17] PeilingHou, PengZou, Min-YongLow, et al. Structural Identification of a New Acetildenafil Analogue from Pre-mixed Bulk Powder Intended as a Dietary Supplement[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2006, 23 (9) : 870-875.
- [18] Hasegawa T, Saijo M, Ishii T, et al. Structural Elucidation of a Tadalafil Analogue Found in a Dietary Supplement[J]. *Shokuhinseigaku Zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2008, 49 (4) : 311.
- [19] Alp M, Coşkun M, Göker H. Isolation and Identification of a New Sildenafil Analogue Adulterated in Energy Drink: Propoxyphenyl Sildenafil[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2013, 72 (2) : 155.
- [20] Balayssac S. Identification of a Novel Sildenafil Analogue in an Adulterated Herbal Supplement[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2012, 59 (1) : 58.
- [21] 董培智, 申国华, 裴社强, 等. 降糖类中成药中非法添加新物质格列波脉的确证及裂解规律[J]. *解放军药学报*, 2015, 31 (6) : 481-483, 488.
- [22] 申国华, 董培智, 裴社强, 等. HPLC-MS-MS法测定降糖类中成药中非法添加物格列波脉[J]. *中成药*, 2014, 36 (6) : 1213-1217.
- [23] Yen-Chun Huang, Hui-Chun Lee, Yun-Lian Lin, et al. Identification of a New Sildenafil Analogue Adulterant, Desethylcarbodenafil, in an Herbal Supplement[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2016, 33 (11) : 1637-1642.
- [24] Nicholas Schramek, Uwe Wollein, Wolfgang Eisenreich. Identification of New Synthetic PDE-5 Inhibitors Analogues Found as Minorcomponents in a Dietary Supplement[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 96 (2) : 45-53.
- [25] Erica L. Bakota, Anna T. Kelly, Jeffrey P. Walterscheid, et al. A Case Report of Fatal Desmethyl Carbodenafil Toxicity[J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2017, 41 (3) : 250 - 255.

(收稿日期 2018年12月17日 编辑 王雅雯)