

## 一种他达拉非衍生物的发现与鉴定

冯亭亭<sup>1,2,3</sup>, 孙 健<sup>2</sup>, 张静娴<sup>2</sup>, 于 泓<sup>2</sup>, 冯 睿<sup>2</sup>, 张 甦<sup>2</sup>, 毛秀红<sup>2</sup>,  
胡 青<sup>2\*</sup>, 季 申<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国医药工业研究总院, 上海 201203; 2. 上海市食品药品检验所, 国家药品监督管理局中药质量控制重点实验室, 上海 201203; 3. 河北北方学院, 河北 张家口 075000)

**摘要:** 采用超高效液相色谱串联四级杆-飞行时间高分辨质谱 (UHPLC/Q-TOF HRMS) 法, 从两种宣称具有缓解疲劳、增强免疫力的保健食品中发现了一种他达拉非衍生物。该化合物与2-羟丙基去甲他达拉非的质谱图特征非常相似, 但保留时间却略有差异。采用制备液相色谱仪对该衍生物进行分离纯化, 经质谱和氢核磁共振分析鉴定为3-羟丙基去甲他达拉非 (3-hydroxypropylnortadalafil), 为国内首次报道。

**关键词:** 他达拉非衍生物; 四级杆-飞行时间高分辨质谱; 磷酸二酯酶5抑制剂; 保健食品

**中图分类号:** R917      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-4870(2020)08-1877-05

## Discovery and identification of a tadalafil analogue

FENG Ting-ting<sup>1,2,3</sup>, SUN Jian<sup>2</sup>, ZHANG Jing-xian<sup>2</sup>, YU Hong<sup>2</sup>, FENG Rui<sup>2</sup>, ZHANG Su<sup>2</sup>,  
MAO Xiu-hong<sup>2</sup>, HU Qing<sup>2\*</sup>, JI Shen<sup>1,2\*</sup>

(1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract:** A tadalafil analogue was detected during routine screenings from two "fatigue reliever, immunity enhancer" dietary supplements by using UHPLC/Q-TOF HRMS. The MS<sup>2</sup> spectrum of this compound was almost identical to that of 2-hydroxypropylnortadalafil. However, the retention time of this analogue was different from that of the 2-hydroxypropylnortadalafil isomers. The analogue was purified by using preparative HPLC and the structure was elucidated by mass spectrometric and NMR spectroscopic experiments. The spectral data suggested that the analogue bore a 3-hydroxypropyl group instead of the *N*-methyl group in tadalafil. The structure was further confirmed by comparison of the <sup>1</sup>H NMR spectra data with those of the reference standard, and thus named as 3-hydroxypropylnortadalafil. The structure is first reported in China.

**Key words:** tadalafil analogue; UHPLC/Q-TOF HRMS; PDE-5; dietary supplement

近年来, 中成药和保健食品中非法添加壮阳作用的磷酸二酯酶 (phosphodiesterase 5, PDE-5) 抑制剂屡

见报道<sup>[1]</sup>。针对这种现象, 国家食品药品监督管理局先后颁布了多项法规, 2017年以前主要针对西地那非、豪莫西地那非、伐地那非、他达拉非、氨基他达拉非等13种PDE-5抑制剂检测。不法生产厂商为了逃避监管, 非法添加上述PDE-5抑制剂的衍生物, 其中最常见的是在西地那非、他达拉非、艾迪地非、伐地那非等化合物母核的基础上进行结构修饰, 如文献报道中成药或保健食品中发现了用乙酰氨基<sup>[2]</sup>、羟乙基<sup>[3]</sup>等取代

收稿日期: 2020-01-10; 修回日期: 2020-03-25.

基金项目: 国家科技部重点研发计划 (2017YFC1700800); 上海市科委研发平台专项 (18DZ2292200); 上海市科委仪器专项 (18142202300); 上海科委长三角合作项目 (18395810300).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-50798195,

E-mail: huqingyjs@163.com; jishen2013@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0033

甲基结构的他达拉非类衍生物。这些衍生物的药理毒理学作用尚不明确, 严重危害消费者健康。同时, 层出不穷的衍生物也给食品药品监管工作带来了一定的挑战。为全面监测和打击食品中添加PDE-5抑制剂衍生物和其他具备抗疲劳的非法药物, 国家食品药品监督管理局2018年颁布了本课题组制定的《食品中那非类物质的测定》(BJS201805), 对那非类物质的监管增加至了90种, 但是新的PDE-5抑制剂衍生物仍然不断的出现。

本课题组前期已经建立了中成药和保健食品中102种PDE-5抑制剂的快速定性定量分析方法<sup>[4]</sup>。在日常检验中, 从两批声称具有缓解体力疲劳、提高免疫力的咖啡饮品中发现了一种新型他达拉非衍生物。采用制备液相色谱方法从样品中分离该未知化合物, 通过质谱信息与核磁数据分析, 对其进行了准确结构鉴定。

## 材料与方法

**仪器与试剂** 超高效液相色谱仪串联四级杆-飞行时间高分辨质谱仪 (Agilent 1290/Agilent 6530, 美国 Agilent 公司), 分析天平 (CP 224S, 德国 Sartorius 赛多利斯公司)。制备液相色谱仪 (Agilent 1260 Infinity II, 美国 Agilent 公司), Varian 核磁共振仪 (500 MHz, 美国瓦里安公司)。乙腈 (MS 级)、甲醇、甲酸、甲酸铵 (色谱纯) 均购自德国默克公司; 去离子水 (Milli-Q 超纯水); 2-羟丙基去甲他达拉非 (加拿大 TLC 公司, 批号 1516-091A7, 异构体混合物)。两种咖啡饮品购自网络平台。

**供试品溶液制备** 分别取两种咖啡饮品 1 g, 加甲醇 10 mL, 超声 30 min, 过滤, 稀释 1 000 倍, 作为供试品溶液。

**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<sup>-1</sup>。

**质谱条件** 采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式检测, 扫描范围  $m/z$ : 100~1 000。离子源参数: 雾化气 ( $N_2$ ): 35 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 干燥气 ( $N_2$ ) 流速 15 L·min<sup>-1</sup>, 温度 200 °C; 鞘气 ( $N_2$ ) 流速 12 L·min<sup>-1</sup>, 温度 350 °C; 毛细管电压 3.5 kV, 碎裂电压 250 V, 二级谱碰撞池 (CID) 电压 5~40 eV。

**分离纯化** 分离纯化采用 Varian Prep Star 制备

液相色谱仪和岛津 Shim-pack PREP-ODS 色谱柱 (20 mm×250 mm, 15 μm); 流动相为甲醇-水 (65:35), 流速为 20 mL·min<sup>-1</sup>, 检测器为紫外检测器 (检测波长 222 nm)。分别取咖啡饮品 12 g, 加甲醇 120 mL, 振摇 30 min, 过滤, 滤液浓缩至 20 mL 进样。

## 结果

### 1 未知化合物的发现及结构推断

采用 UHPLC/Q-TOF HRMS 法对试样中非法添加物筛查时, 在两个咖啡饮品中同时发现一个  $m/z$  为 434.172 0 的未知化合物, 保留时间约为 10.20 min, 与 2-羟丙基去甲他达拉非具有相同的元素组成 ( $C_{24}H_{23}N_3O_5$ ), 但保留时间略有差别, 2-羟丙基去甲他达拉非为一对光学异构体, 保留时间分别为 10.93 和 11.56 min (图 1), 二级质谱图相似 (图 2), 主要碎片离子包括  $m/z$  135.043 8、169.075 5、197.069 0、262.086 0、284.138 6 和 312.135 5, 推断其可能为 2-羟丙基去甲他达拉非的同分异构体。

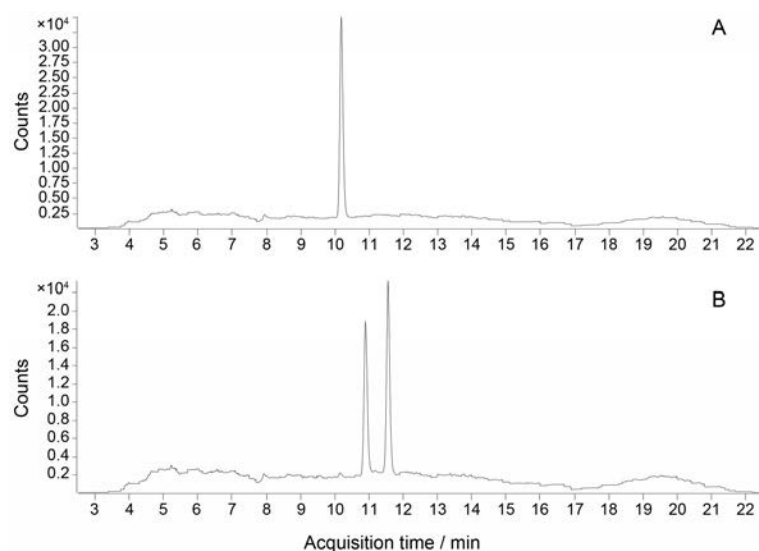
### 2 未知化合物的分离纯化

采用制备液相色谱仪对两个咖啡饮品中未知化合物进行分离纯化, 收集主色谱峰 (波长 220 nm) 成分, 减压浓缩除去溶剂, 干燥后分别得未知化合物 8.2 mg、13.3 mg。

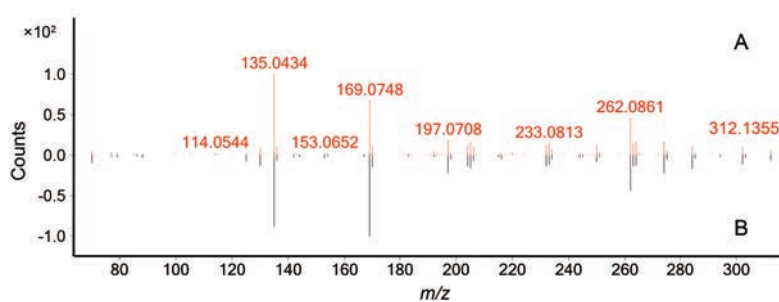
### 3 <sup>1</sup>H NMR 结构解析

从两个样品中分离出来的化合物具有相似的 <sup>1</sup>H NMR 数据, 见表 1<sup>[5]</sup>。δ<sub>H</sub> 6.75 (2H, m) 和 6.85 (1H, s) 为苯并二噁唑苯环的 1, 3, 4 取代的 H 信号; δ<sub>H</sub> 5.9 (2H, s) 为苯并二噁唑亚甲基的 H 信号; δ<sub>H</sub> 7.54 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.00 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.06 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.30 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz) 是邻二取代苯的 H 信号; δ<sub>H</sub> 4.52 (1H, s) 和 11.06 (1H, s) 分别为 O-H 和 N-H 信号; δ<sub>H</sub> 4.43 (1H, dd,  $J = 12, 4.5$  Hz) 为烯炔次甲基质子信号; δ<sub>H</sub> 6.16 (1H, s) 提示次甲基连接多个吸电子基; δ<sub>H</sub> 3.93 (1H, d,  $J = 17$  Hz) 和 4.23 (1H, d,  $J = 17$  Hz) 为亚甲基两个不等价氢相互耦合的 H 信号; 与 2-羟丙基去甲他达拉非的母核 H 信号一致。但是, 未知化合物的 <sup>1</sup>H NMR 没有 2-羟丙基去甲他达拉非的 δ<sub>H</sub> 3.88 (1H, br m) 信号 (连氧脂肪族次甲基 H 信号) 和 δ<sub>H</sub> 1.04 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz) 信号 (脂肪族甲基 H 信号), 而多出了 δ<sub>H</sub> 3.42 (2H, m) 信号 (与氧相连的亚甲基信号) 和 δ<sub>H</sub> 1.66 (2H, m) 信号 (脂肪族亚甲基 H 信号), 推测可能为 2-羟丙基去甲他达拉非结构中 2-羟丙基被 3-羟丙基取代。

为了进一步确定未知化合物结构, 定制了构型为 6R, 12aR 的 3-羟丙基去甲他达拉非对照品 (加拿大 TLC 公司), 经比较发现, 未知化合物的保留时间、精确



**Figure 1** The EIC chromatograms ( $m/z$  434.172 0) of unknown compound in the sample (A) and 2-hydroxypropylnortadalafil diastereomer reference (B)



**Figure 2** The MS2 spectra of unknown compound (A) and 2-hydroxypropylnortadalafil (B)

**Table 1**  $^1\text{H}$  NMR data of unknown compound, 2-hydroxypropylnortadalafil and 3-hydroxypropylnortadalafil reference. <sup>a</sup>See Figure 4 for atom numbering

Position <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$			
	Unknown compound from sample 1	Unknown compound from sample 2	2-Hydroxypropylnortadalafil <sup>[5]</sup>	3-Hydroxypropylnortadalafil reference
3	3.93 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)	3.92 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)	4.03 (1H, m)	3.90 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)
	4.23 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)	4.23 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)	4.29 (1H, m)	4.20 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)
6	6.16 (1H, s)	6.16 (1H, s)	6.18 (1H, s)	6.13 (1H, s)
8	7.30 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	7.30 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	7.31 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	7.28 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)
9	7.06 (1H, t, $J = 7.5$ Hz)	7.06 (1H, t, $J = 7.5$ Hz)	7.06 (1H, m)	7.04 (1H, t, $J = 7.5$ Hz)
10	7.00 (1H, t, $J = 7.5$ Hz)	7.00 (1H, t, $J = 7.5$ Hz)	7.00 (1H, m)	6.98 (1H, t, $J = 7.5$ Hz)
11	7.54 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	7.54 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	7.54 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	7.52 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)
12	2.95 (1H, m)	2.95 (1H, m)	2.96 (1H, m)	2.95 (1H, m)
	3.49 (1H, m)	3.49 (1H, m)	3.50 (1H, m)	3.49 (1H, m)
12a	4.43 (1H, dd, $J = 12, 4.5$ Hz)	4.42 (1H, dd, $J = 12, 4.5$ Hz)	4.4 (1H, dd, $J = 11.6, 4.1$ Hz)	4.42 (1H, dd, $J = 12, 4.5$ Hz)
13	3.55 (2H, m)	3.55 (2H, m)	3.49–3.21 (2H, m)	3.52 (2H, m)
14	1.66 (2H, m)	1.66 (2H, m)	3.88 (1H, br m)	1.63 (2H, m)
15	3.39 (2H, m)	3.37 (2H, m)	1.04 (3H, d, $J = 6.3$ Hz)	3.35 (2H, m)
2'	6.85 (1H, s)	6.84 (1H, s)	6.85 (1H, s)	6.82 (1H, s)
5'/6'	6.75 (2H, m)	6.77 (2H, m)	6.77 (2H, m)	6.73 (2H, m)
7'	5.92 (2H, s)	5.92 (2H, s)	5.92 (2H, s)	5.90 (2H, s)
N-H	11.08 (1H, s)	11.07 (1H, s)	11.08 (1H, s)	11.05 (1H, s)
O-H	4.52 (1H, s)	4.50 (1H, s)	3.35 (1H, s)	4.50 (1H, s)

分子量、高分辨二级质谱图及  $^1\text{H NMR}$  数据与对照品均一致。由此, 可确证未知物的结构为 2-羟丙基去甲他达拉非的同分异构体 3-羟丙基去甲他达拉非, 化合物结构见图 3。3-羟丙基去甲他达拉非的可能的质谱裂解途径如图 4 所示。  $m/z$  312.1353 为母离子失去苯并二噁唑基团的碎片, 且提示双酮哌嗪环结构上有一个  $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$  片段。  $m/z$  169.0755 和  $m/z$  197.0690 为他达拉非类化合物中吡啶并吡啶环系统部分的碎片,  $m/z$  135.0438 为苯并二噁唑基团的碎片, 这三个离子是具有双酮哌嗪环的他达拉非类衍生物常见的离子碎片。

### 讨论

他达拉非及其衍生物具有较稳定的母核结构, 通

过其质谱碎片信息, 可以快速对他达拉非衍生物进行结构推测。目前发现的他达拉非衍生物多数都是双酮哌嗪环上发生结构变化, 一类是在 2-N 的取代上有差异, 如 *N*-ethyl nortadalafil<sup>[6]</sup>、cyclopentyl nortadalafil<sup>[7]</sup>, 另外一类没有双酮哌嗪环, 如 chloropretadalafil<sup>[8]</sup>、diethylaminopretadalafil<sup>[9]</sup>。比较这些化合物的二级质谱图, 一般含有  $m/z$  135、169、197、262 等碎片离子, 低质量区碎片分子量比较类似, 可以帮助此类化合物的快速推断。在他达拉非母核 6、12a 位有两个手性中心, 存在 4 种构型, 但顺式他达拉非衍生物 (6*R*, 12a*R*) 活性明显优于反式<sup>[10]</sup>, 根据产品所描述的功效推断该非法添加的衍生物结构最大可能性为 6*R*、12a*R* 构型。经分离得到的非法添加的未知化合物与定制的 6*R*、12a*R* 构

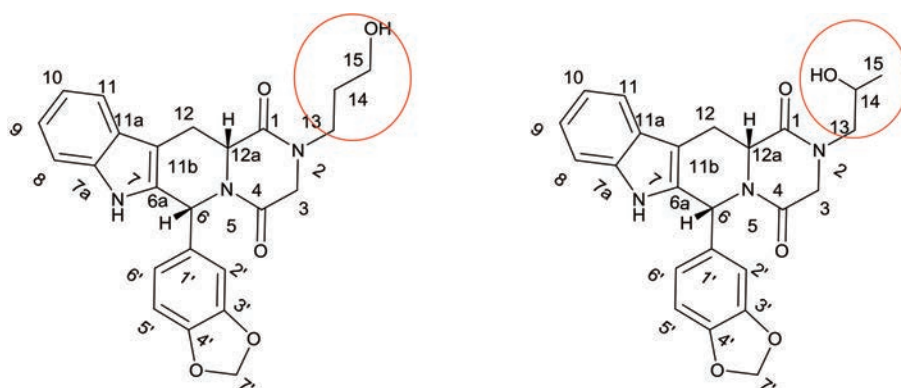


Figure 3 Structures of 3-hydroxypropyl nortadalafil (A) and 2-hydroxypropyl nortadalafil (B)

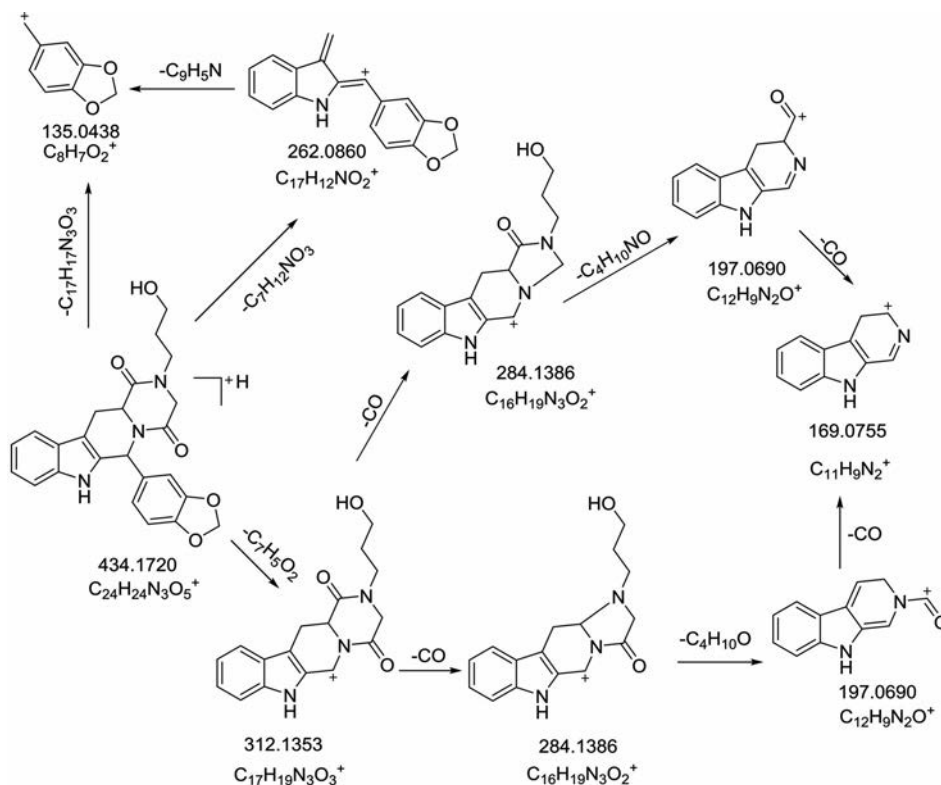


Figure 4 MS fragmentation pattern of 3-hydroxypropyl nortadalafil

型3-羟丙基去甲他达拉非对照品的保留时间、一级二级质谱及<sup>1</sup>H NMR 均能匹配, 故确定其为6R、12aR构型的3-羟丙基去甲他达拉非。

后期实验中进一步测定了两种咖啡饮品中3-羟丙基去甲他达拉非含量, 结果显示该化合物含量分别高达1.70和2.05 mg·g<sup>-1</sup>, 根据产品标签的用法用量, 每次服用量高达22和25 mg, 超过了同类上市药物他达拉非的每次服用量(10 mg), 对人体存在严重的潜在危险。该化合物在国内尚未被报道, 药理毒理作用尚不清楚, 对人体的潜在危害认知还较为有限, 值得引起关注和追踪。

## 结论

采用UHPLC/Q-TOF HRMS从两种咖啡饮品中检测发现了2-羟丙基去甲他达拉非的同分异构体, 经分离纯化和<sup>1</sup>H NMR 确证, 该化合物为2-羟丙基去甲他达拉非的同分异构体3-羟丙基去甲他达拉非, 该化合物化学名为(6R,12aR)-6-(1,3-苯并间二氧戊环-5-基)-2-(3-羟丙基)-2,3,6,7,12,12a-六氢吡啶并[1',2':1,6]-吡啶并[3,4-b]吲哚-1,4-二酮。此化合物的发现提供了一种新型他达拉非衍生物发现的新思路, 有助于新型衍生物结构的发现, 保障监管工作及时有效。

**作者贡献:** 冯亭亭负责数据采集、分析与撰写文章; 孙健负责实验设计、数据分析和阐释; 张静娴负责数据采集、分析与审阅文章; 于泓负责数据采集、分析; 冯睿负责数据采集、分析; 张甦和毛秀红负责指导; 胡青负责审阅文章与行政支持; 季申负责技术与材料支持, 获取研究经费。

**利益冲突:** 本文无任何利益冲突。

## References

[1] Kee CL, Ge X, Gilard V, et al. A review of synthetic phosphodi-

esterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147: 250-277.

- [2] Lee ES, Kim JW, Lee JH, et al. Identification of a new tadalafil analogue found in a dietary supplement [J]. *Food Addit Contam Part A*, 2013, 30: 621-626.
- [3] Kern SE, Nickum EA, Flurer RA, et al. Isolation and structural characterization of a new tadalafil analog (2-hydroxyethyl-nortadalafil) found in a dietary supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 103: 99-103
- [4] 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, 10: 1007-1017.
- [5] Toomey VM, Litzau JJ, Flurer CL. Isolation and structural characterization of two tadalafil analogs found in dietary supplements [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 1: 50-57.
- [6] Lee JH, Kim HY, Noh E, et al. Identification and screening of a tadalafil analogue found in adulterated herbal products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 103: 80-84.
- [7] Xu Y, Kee CL, Ge X, et al. Isolation and characterization of a tadalafil analogue, *N*-cyclopentyl nortadalafil in health supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 118: 235-241.
- [8] Hasegawa T, Saijo M, Ishii T, et al. Structural elucidation of a tadalafil analogue found in a dietary supplement [J]. *J Food Hyg Soc Jpn*, 2008, 49: 311-315.
- [9] Zhang G, Yu Y, Wu X, 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: 210-214.
- [10] Alain D, Pascal G, Cécile R, et al. The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 1:5,6,11,11a-Tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,6]pyrido[3,4-*b*]indole-1,3(2*H*)-dione analogues [J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 4525-4532.