

UHPLC/LTQ Orbitrap MS 法 解析一种未知西地那非衍生物

周建良¹, 周哲², 陈碧莲¹, 马临科¹

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052; 2. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海 201206)

摘要: 基于已知药物合成新的衍生物, 以避免法定检验方法, 是目前化学药物非法添加的趋势之一。本工作采用超高分辨的线性离子阱-静电场轨道阱质谱(LTQ Orbitrap MS), 在标示中药来源的样品中检出一种未知的西地那非衍生物。基于 LTQ Orbitrap MS 超高分辨率细分同位素的能力, 并结合精确质量数, 准确地获得了未知衍生物的元素组成。通过与西地那非和硫代艾地那非二级质谱的比较, 进一步推断了该衍生物的结构, 并对文献中离子的归属进行了纠正。经核磁共振解析, 鉴定该衍生物为丙氧酚艾地那非(propoxyphenyl aildenafil), 系由艾地那非苯环上乙氧基衍生为丙氧基而成, 其结构与质谱推断的一致。通过总结丙氧酚艾地那非的质谱裂解规律, 并结合 UHPLC/LTQ Orbitrap 质谱分析方法, 可有效地鉴定 PDE-5 型抑制剂及其衍生物, 这是打击此类化合物非法添加的有力手段。

关键词: 西地那非衍生物; 丙氧酚艾地那非; 线性离子阱-静电场轨道阱质谱(LTQ Orbitrap MS); 非法添加

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2016)05-0422-09

doi: 10.7538/zpxb.2016.37.05.0422

Identification of an Unknown Derivative of Sildenafil by UHPLC/LTQ Orbitrap MS

ZHOU Jian-liang¹, ZHOU Zhe², CHEN Bi-lian¹, MA Lin-ke¹

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China;

2. Thermo Fisher Scientific (China) Co., Ltd, Shanghai 201206, China)

Abstract: It is a trend for illegal addition that new derivatives of known drugs are synthesized and used to avoid the statutory test. By using LTQ Orbitrap MS, an unknown derivative of sildenafil was found in a sample which was marked as traditional Chinese medicines extraction. The accurate formula of the unknown derivative was $C_{24}H_{34}N_6O_4S$, which was obtained based on the separating capacity of isotopic peaks of ultra-high-resolution by LTQ Orbitrap MS and accurate mass measurement. The structure of the unknown derivative was derived by comparison of the MS^2 spectra with those of sildena-

收稿日期: 2016-03-24; 修回日期: 2016-05-15

作者简介: 周建良(1982—), 男(汉族), 浙江人, 副主任中药师, 从事中药活性成分研究及质量评价。

E-mail: cpuzhou@163.com

通信作者: 马临科(1978—), 男(汉族), 浙江人, 副主任中药师, 从事中药质量评价。E-mail: malinke@zjyj.org.cn

fil and thioaildenafil. The unknown derivative had the same fragment ions with sildenafil (m/z 299.11, m/z 283.11 and m/z 255.12) and thioaildenafil (m/z 113.10 and m/z 177.06) in the MS² spectra. These fragment ions were assigned with the aid of Mass FrontierTM software. Furthermore, the assignment of one fragment ion (m/z 299.11) in literature was corrected in this paper by comparison of the accurate mass and isotopic abundance. The unknown derivative was finally identified as propoxyphenyl aildenafil by ¹H, ¹³C, DEPT and HMBC NMR, which proved that it is correct for the derived structure of the unknown derivative by LTQ Orbitrap MS. This derivative was obtained by substituting the ethoxy group of the benzene ring moiety of aildenafil to the propoxy group. The proposed fragmentation pathway of propoxyphenyl aildenafil was summarized and the analytical method based on UHPLC/LTQ Orbitrap MS was developed. This method can identify the PDE-5 inhibitors and their derivatives, which could be a power tool to control the illegal addition.

Key words: sildenafil analogue; propoxyphenyl aildenafil; LTQ Orbitrap MS; illegal addition

枸橼酸西地那非、他达拉非和伐地那非是美国 FDA 批准上市的磷酸二酯酶 5 型(PDE-5) 抑制剂类药物,可用于治疗男性勃起功能障碍疾病^[1]。目前,在补肾壮阳类中药制剂及保健食品中非法添加 PDE-5 抑制剂类化学药物的现象屡见不鲜,且有添加其衍生物的发展趋势^[2-3]。国家食品药品监督管理局于 2009 年出台了药品补充检验方法,用于监管中药及保健食品中非法添加西地那非等 11 种 PDE-5 型抑制剂的现象^[4]。为了逃避药品监督检验,一些不法分子开始合成和添加处于监管之外的新型 PDE-5 抑制剂衍生物,如艾地那非^[3]、硫代西地那非^[5]、1-[4-丙氧基-3-[5-(6, 7-二氢-1-甲基-7-氧代-3-丙基-1H-吡唑并[4, 3d]嘧啶)]苯磺酰]-4-甲基哌嗪^[6]等。

有关 PDE-5 型抑制剂及其衍生物的检测多采用液质联用法,包括高效液相色谱-三重四极杆质谱法(HPLC/QQQ-MS)^[2-3,5,10]和高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(HPLC/QTOF-MS)^[6-8]等。其中,QQQ-MS 法灵敏度高、选择性好,但不能对化合物进行精确分子质量的测定,在定性方面尚有欠缺;QTOF-MS 法能提供化合物精确的分子质量,在定性分析中应用广泛,但它一般只能提供二级质谱分析,无法实现复杂的化合物裂解分析。近年来,线性离子阱-静电场轨道阱-高分辨质谱(LTQ Orbitrap MS)因兼具离子阱和超高

分辨质谱平行检测的能力,在化合物的定性分析方面备受关注。LTQ Orbitrap MS 的分辨率高达 100 000,而且能对目标物进行多级质谱分析,因此可在没有标准物质的情况下,通过精确质量数和多级碎片信息对未知物进行快速筛查与结构确认^[11]。

本工作针对在“强力 V1 型羊肚菌补肾精华粉”(标示来源为乌青莲、冬虫夏草、淫羊藿、达米阿那和玛卡)样品中发现的一种新型西地那非衍生物,采用超高分辨的线性离子阱-静电场轨道阱质谱对其进行结构解析,并通过核磁共振(NMR)进行结果确证,总结质谱裂解规律,希望为鉴定 PDE-5 型抑制剂及其衍生物提供新的方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LTQ Orbitrap Velos Pro 快速液相色谱-质谱联用仪:美国 Thermo Fisher 公司产品;LC-20AP 高效液相色谱仪:日本岛津公司产品;500 MHz 核磁共振仪:德国 Bruker 公司产品;XPE205 电子分析天平:瑞士梅特勒-托利多公司产品。

伐地那非(Vardenafil, 1)、那红地那非(Noracetildenafil, 2)、红地那非(Acetildenafil, 3)、羟基豪莫西地那非(Hydroxyhomosildenafil, 4)、枸橼酸西地那非(Sildenafil citrate, 5)、

豪莫西地那非(Homosildenafil, 6)、氨基他达拉非(Aminotadalafil, 7)、他达拉非(Tadalafil, 8)、硫代艾地那非(Thioildenafil, 9)、伪伐地那非(Pseudovardenafil, 10)和那莫西地那非(Norneosildenafil, 11)等11种PDE-5型抑制剂对照品:纯度均大于98.0%,加拿大TLC Pharma Chem公司产品;强力V1型羊肚菌补肾精华粉样品:来自食品药品监督管理局市场抽样;乙腈、甲醇、甲酸:均为色谱纯,美国Merck公司产品;实验用水:由Milli-Q系统制备。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm×1.8 μm);柱温:35℃;流动相:A为0.1%甲酸水溶液,B为乙腈;梯度洗脱程序:0~10 min、20%~40%B,10~15 min、40%~90%B,15~18 min、90%B;流速:0.3 mL/min;进样体积:1 μL。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)正离子模式,高分辨检测模式(FTMS),分辨率60 000(FWHM);离子源温度:350℃;鞘气流速:35个单位;辅助气流速:10个单位;反吹气流速:0个单位;喷雾电压:4.0 kV;毛细管温度:300℃;一级全扫描范围 m/z 300~600;二级质谱采用HCD和CID两种碎裂方式,HCD碰撞电压50%、CID碰撞电压35%。

1.3 溶液制备

对照品溶液的制备:取适量上述11种对照品溶液,加入甲醇溶解,并稀释至约1 mg/L。

供试品溶液的制备:取0.1 g样品粉末,置于50 mL容量瓶中,加入约40 mL甲醇,超声10 min,冷却至室温;加甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤;取适量滤液,用甲醇稀释100倍,摇匀,以12 000 r/min离心10 min,取上清液,待UHPLC/LTQ Orbitrap MS分析。

1.4 样品化合物的纯化

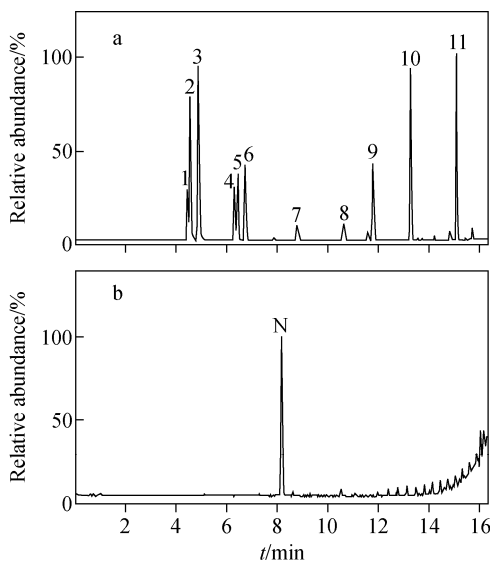
Kromasil C18 制备色谱柱(10 mm×250 mm×10 μm),流动相为乙腈-水溶液(45:55, V/V),流速5 mL/min,检测波长230 nm。

取1 g样品,加入20 mL甲醇,超声10 min,过滤,取适量滤液进样分析,收集主色谱峰成分,减压蒸发除去溶剂,即得纯化样品。

2 结果与讨论

2.1 未知衍生物的发现和结构解析

对照品溶液和供试品溶液的总离子流图示于图1。在供试品溶液中检测到1个保留时间和精确分子质量与11个对照品均不同的化合物(N) m/z 503.243 67,该未知化合物的质谱图示于图2。可见,未知化合物的M+2同位素离子出现2个裂峰,且M+2同位素离子的相对丰度约为4%。在超高分辨质谱中(分辨率 $\geq 60\ 000$ FWHM),含S化合物的M+2同位素离子出现2个裂峰,分别为 ^{34}S 和 $^{13}\text{C}_2 + ^{18}\text{O}$ (或只含 $^{13}\text{C}_2$),且含S的个数与其相对丰度正相关^[13]。据此,可推断该化合物含有S元素,且只含1个S,其分子式可能为 $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$,相对分子质量误差为 0.338×10^{-6} ,样品同位素与理论值一致。



注:1. 伐地那非;2. 那红地那非;3. 红地那非;
4. 羟基豪莫西地那非;5. 枸橼酸西地那非;6. 豪莫西地那非;
7. 氨基他达拉非;8. 他达拉非;9. 硫代艾地那非;
10. 伪伐地那非;11. 那莫西地那非

图1 对照品溶液(a)和供试品溶液(b)的总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatograms of standard compounds (a) and sample (b)

在二级质谱分析中,该化合物与西地那非和硫代艾地那非有相同的碎片离子,西地那非和硫代艾地那非的结构式于图3,其HCD、CID质谱图分别示于图4和图5,此结果表明该化合物可能是PDE-5型抑制剂的衍生物。在

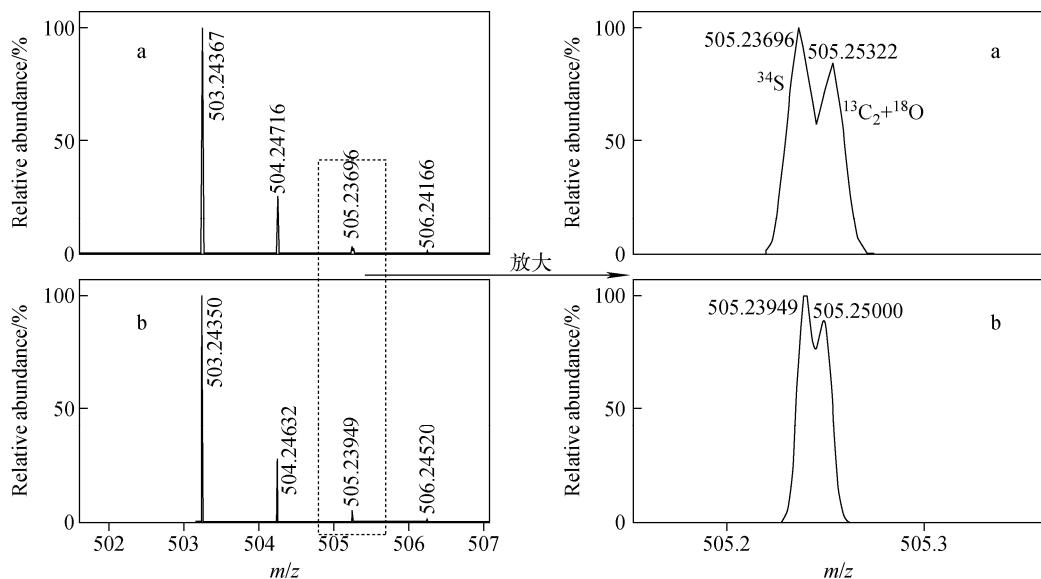


图2 未知化合物(a)和在60 000 FWHM分辨率下理论化学式 $C_{24}H_{34}N_6O_4S$ (m/z 503.243 50) (b)的质谱图

Fig. 2 MS spectra of sildenafil analogue (a) and $C_{24}H_{34}N_6O_4S$ (m/z 503.243 50) by computational simulation at high resolution mass of 60 000 FWHM (b)

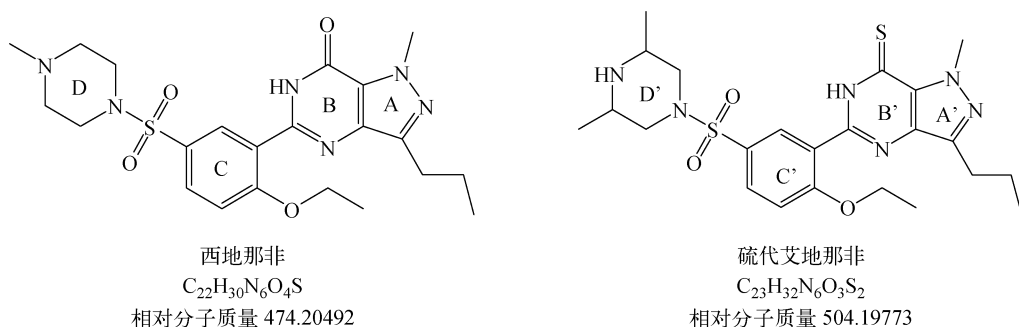


图3 西地那非和硫代艾地那非的结构式

Fig. 3 Chemical structures of sildenafil and thioaldenafil

HCD 碎裂方式下,未知化合物与西地那非的共有碎片离子有 m/z 299.11、283.11 和 255.12。根据 Mass FrontierTM 7.0 软件分析, m/z 299.11 和 m/z 283.11 离子均由西地那非苯环(C 环)上的 C—S 键和乙氧基发生裂解和重排产生,离子 m/z 255.12 则在 m/z 283.11 离子的基础上继续重排产生。此外,HCD 二级质谱中两组离子(未知化合物 m/z 325.16 $C_{18}H_{21}N_4O_2^+$ → 西地那非 m/z 311.15 $C_{17}H_{19}N_4O_2^+$,未知化合物 m/z 391.14 $C_{18}H_{23}N_4O_4S^+$ → 西地那非 m/z 377.12 $C_{17}H_{21}N_4O_4S^+$)均相差 1 个 CH_2 单元,表明该未知化合物在西地那非除 D 环外的结构基础上多 1 个 CH_2 单元,且该 CH_2 单元很有可能增加在 A 环的丙烷基或 C 环的乙氧基上。因

未知化合物与西地那非有相同的 m/z 299.11 和 m/z 283.11 离子,说明 A 环和 B 环及其基团并未发生生化改变,由此推断 CH_2 单元增加在 C 环的乙氧基上,即乙氧基衍生为丙氧基。

未知化合物与硫代艾地那非相比,在 HCD 二级质谱中具有相同的 m/z 113.10 离子,该离子由硫代艾地那非 D' 环上的 N—S 断裂产生;而在 CID 二级质谱中具有相同的 m/z 177.06 离子,该离子由 C' 环的 C—S 断裂产生。因此,推断该未知化合物具有 3,5-二甲基哌嗪-1-基磺基结构。

综上,推断该化合物的结构与西地那非相比,其苯环的乙氧基衍生为丙氧基,并且 4-甲基哌嗪衍生为 3,5-二甲基哌嗪。

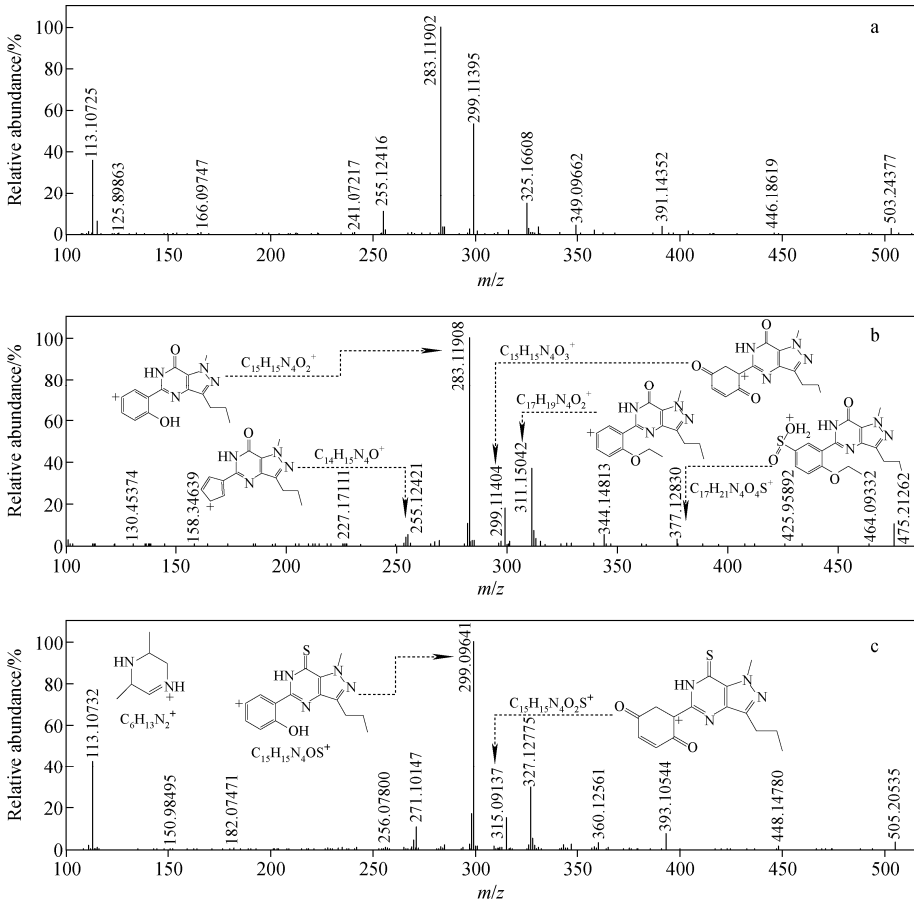


图 4 HCD 模式下,未知化合物(a)、西地那非(b)和硫代艾地那非(c)的二级质谱图

Fig. 4 MS/MS spectra of sildenafil analogue (a), sildenafil (b) and thioaildenafil (c) at HCD mode

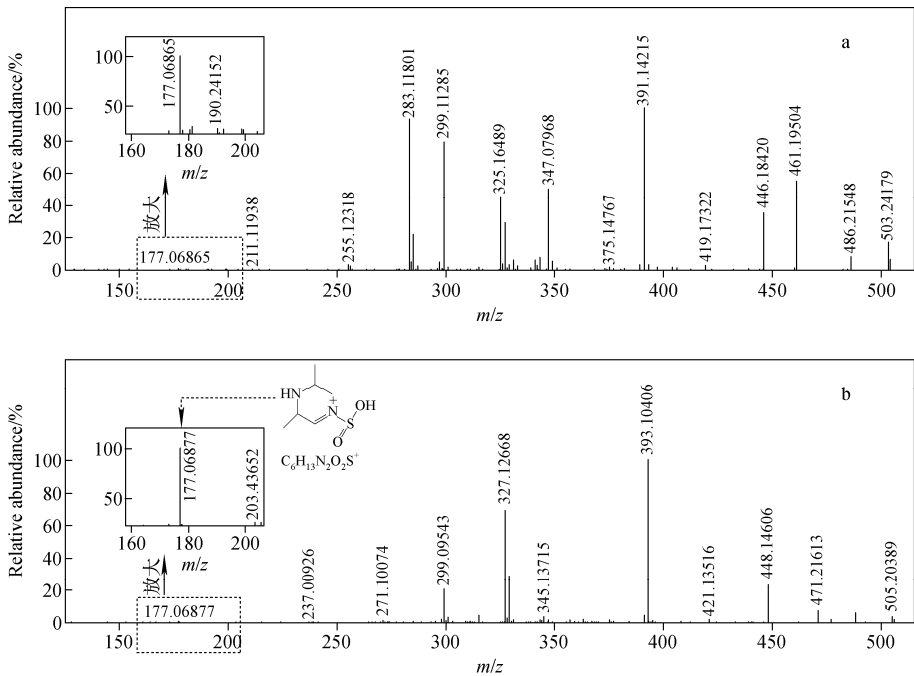


图 5 CID 模式下,未知化合物(a)和硫代艾地那非(b)的二级质谱图

Fig. 5 MS/MS spectra of sildenafil analogue (a) and thioaildenafil (b) at CID mode

2.2 NMR 结构确证

通过¹H、¹³C 和 DEPT、HMBC 谱对该未知化合物进行结构解析,其氢谱示于图 6。经

与文献[14]比较,确定该衍生物为丙氧酚艾地那非(propoxyphenyl aildenafil),其质谱裂解规律示于图 7。在 NMR 结构确证的基础上,

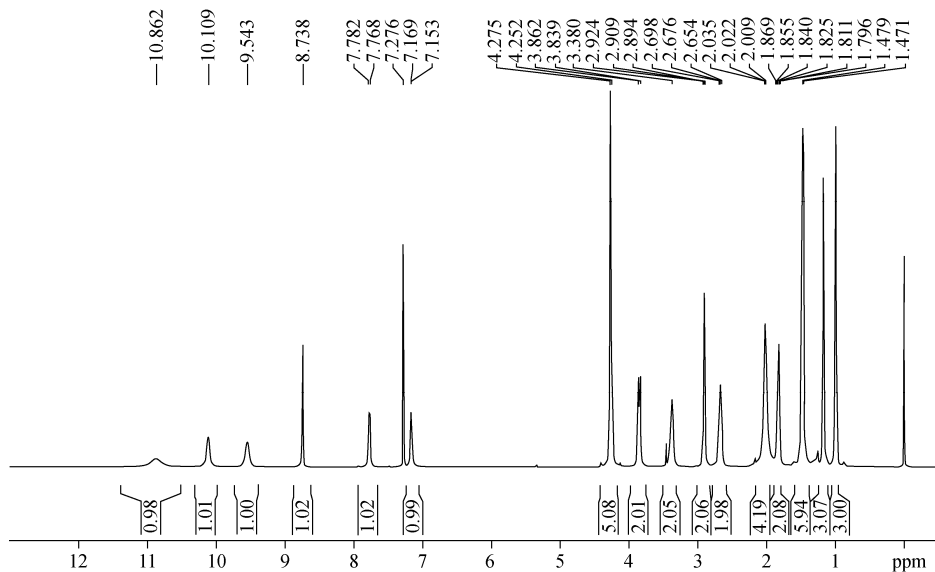


图 6 未知化合物的氢谱

Fig. 6 ¹H spectrum of sildenafil analogue

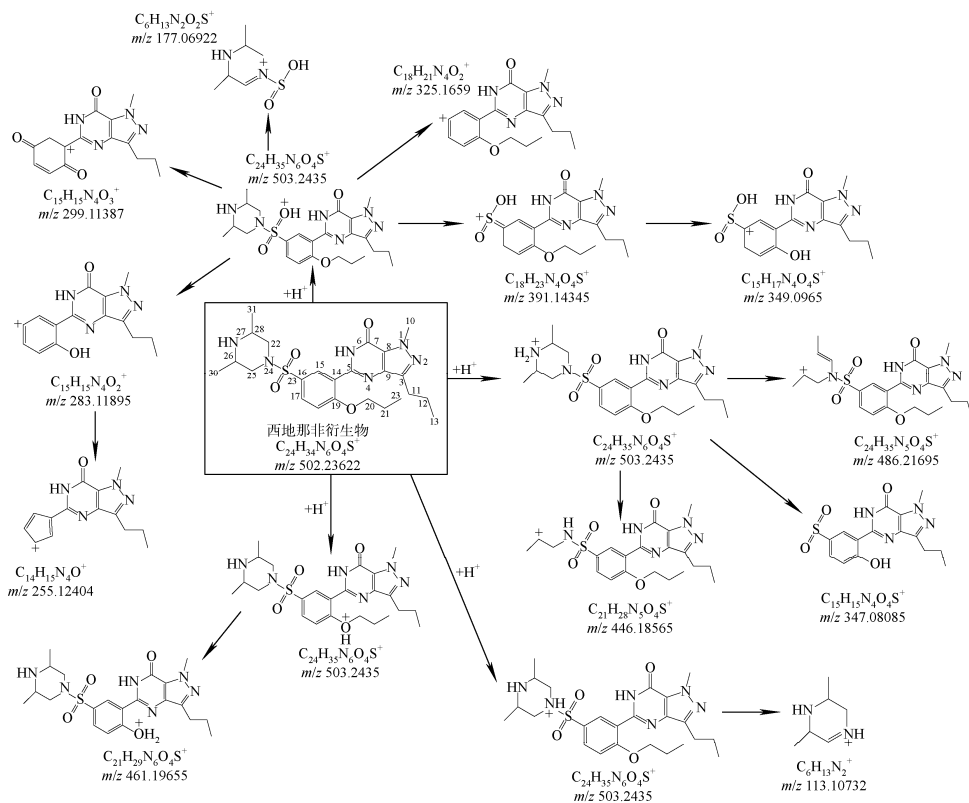


图 7 西地那非衍生物丙氧酚艾地那非(propoxyphenyl aildenafil)的质谱裂解规律

Fig. 7 Proposed fragmentation pathway of sildenafil analogue (propoxyphenyl aildenafil)

对该衍生物的裂解规律进行解析,并对 HCD 和 CID 二级质谱的主要碎片离子进行归属。结果表明,该化合物的结构与本实验推断的结构一致。

2.3 讨论

准确判定未知化合物的化学式是结构解析的重要部分。在高分辨质谱中,通过精确分子质量计算化学式时,若限定的组成元素种类和数量不对,则无法得到准确的化学式。本实验利用 LTQ Orbitrap MS 的超高分辨率准确判断了未知衍生物中含有 S 元素,且只含 1 个 S,结合精确质量数和同位素丰度比对,获得了该化合物的

化学式,这为后续的结构解析奠定了基础。

该衍生物曾在新加坡的某保健品中被发现,相关文献^[14]将样品中的 m/z 299.113 0 离子归属为 $C_{15}H_{15}N_4OS^+$ (m/z 299.096 11),与实测值的质量误差达 5.65×10^{-5} ,远超过了可接受的范围 ($\pm 5 \times 10^{-6}$)。本实验经精确分子质量及 $M+2$ 同位素离子丰度比较,推断该离子为 $C_{15}H_{15}N_4O_3^+$ (m/z 299.113 87),与本实验样品中实测值的质量误差仅为 2.67×10^{-7} ,与文献报道实测值的误差为 -2.91×10^{-6} ,均在可接受的范围之内,其质谱图示于图 8。

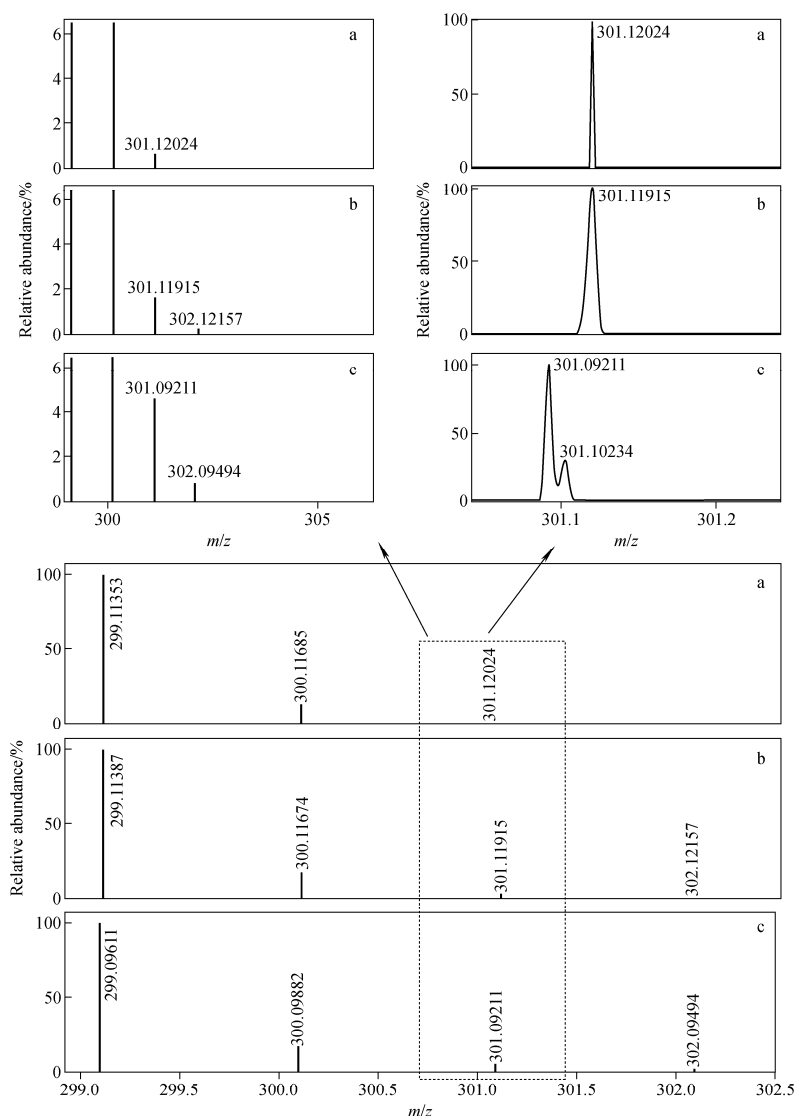


图 8 西地那非衍生物的子离子 m/z 299.11(a)和在 60 000 FWHM 分辨率下理论化学式

$C_{15}H_{15}N_4O_3^+$ (m/z 299.113 87)(b)与 $C_{15}H_{15}N_4OS^+$ (m/z 299.096 11)(c)离子的质谱图

Fig. 8 MS spectra of product ion (m/z 299.11) of sildenafil analogue (a) and $C_{15}H_{15}N_4O_3^+$ (m/z 299.113 87) (b), $C_{15}H_{15}N_4OS^+$ (m/z 299.096 11) (c) by computational simulation at high resolution mass of 60 000 FWHM

3 结论

采用 LTQ Orbitrap 超高分辨质谱对(标示)中药来源样品中的未知化合物进行结构解析,推断其为西地那非类衍生物 propoxyphenyl aildenafil, 并经¹H、¹³C 和 DEPT、HMBC 谱对其进行结构确证。该衍生物由艾地那非苯环上的乙氧基衍生为丙氧基而来,因目前在国内外鲜有报道,对其有效性和安全性更是知之甚少,值得引起重视。实验总结了西地那非、硫代艾地那非和 propoxyphenyl aildenafil 的质谱裂解规律,发现西地那非类化合物主要产生 m/z 377.12、311.15、299.11 和 283.11 等特征离子;当西地那非 B 环发生硫代时,会产生 m/z 315.09 和 299.09 等特征离子;此外,若在未知化合物的二级质谱中出现 m/z 391.14 和 325.16 等离子时,应考虑苯环上的乙氧基衍生为丙氧基的可能性。

迄今为止,已合成和报道的 PDE-5 型抑制剂及其衍生物有 80 余种,有非法添加报道的超过 30 种,将来可能还会出现新的衍生物。UPLC/LTQ Orbitrap 质谱分析方法可有效鉴定 PDE-5 型抑制剂及其衍生物,是打击此类化合物非法添加的有力手段。本实验总结的该类化合物的裂解规律可为 PDE-5 型抑制剂的新型衍生物的鉴定提供参考。

致谢:感谢浙江工业大学楚楚博士,浙江省药品化妆品审评中心张耀博士在 NMR 测定和解析中给予的帮助。

参考文献:

[1] SARANJIT S, BHAGWAT P, AKASH A, et al. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2009, 28(1): 13-28.

[2] 向智敏,张骊,祝明,等. HPLC 和 LC-MS/MS 鉴定锁阳固精丸中非法添加的西地那非衍生物[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(2): 167-171.

XIANG Zhimin, ZHANG Li, ZHU Ming, et al. Identification of sildenafil analog illegally added in dietary supplement using HPLC and LC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharma-

cy, 2010, 27(2): 167-171(in Chinese).

- [3] 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): 1 441-1 444.
- DENG Kunpeng, LUO Zhuoya, LEI Yi. Detection of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, aildenafil, in health care products for promoting sexual function[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2011, 46(18): 1 441-1 444(in Chinese).
- [4] 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: 补肾壮阳类中成药[S]. 2009.
- [5] 鲁艺, 邬晓鸥, 梁智渊, 等. 中药制剂及保健品中添加硫代西地那非的检测方法研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1 861-1 864.
- LU Yi, WU Xiaou, LIANG Zhiyuan, et al. Study to identify thiosildenafil mixed illegally in traditional Chinese medicine and health care food [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 30(10): 1 861-1 864(in Chinese).
- [6] 孙健, 于泓, 胡青, 等. 一种新型西地那非衍生物的 Q-TOF-MS 鉴定[J]. 药学学报, 2014, 49(4): 513-516.
- SUN Jian, YU Hong, HU Qing, et al. Identification of a new sildenafil analogue based on Q-TOF-MS[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2014, 49(4): 513-516(in Chinese).
- [7] 李锐, 陈国彪. UPLC-Q-TOF-MS 法快速检测补肾壮阳类中成药中 11 个 PDE5 型抑制剂类药物[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 879-884.
- LI Rui, CHEN Guobiao. Simultaneous determination of 11 phosphodiesterase-5 inhibitors added illegally in Chinese medicine preparations for invigorants by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34(5): 879-884(in Chinese).
- [8] 于泓, 胡青, 张甦, 等. 补肾壮阳类中药及保健食品中 31 种 5 型磷酸二酯酶抑制剂的高分辨四级杆飞行时间质谱定性定量检测方法[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(15): 1 312-1 318.
- YU Hong, HU Qing, ZHANG Su, et al. Qualitative and quantitative analysis of 31 PDE-5 inhibitors in herbal products and dietary supplements by UPLC/Q-TOF-MS[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2013, 48(15): 1 312-1 318 (in Chinese).

- [9] 王美玲, 曾乐, 颜鸿飞, 等. 高效液相色谱-离子阱飞行时间串联质谱法快速筛查保健食品中非法添加的磷酸二酯酶-5 抑制剂及其类似物[J]. 分析测试学报, 2014, 33(3): 239-247.
WANG Meiling, ZENG Le, YAN Hongfei, et al. Rapid screening and confirmation of illegally added phosphodiesterase-5 inhibitors and analogues in health foods by liquid chromatography-ion trap-time of flight tandem mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(3): 239-247(in Chinese).
- [10] 孙晶, 曹玲, 冯有龙, 等. 前体离子扫描法在快速筛查中药及保健食品中非法添加的 5 型磷酸二酯酶抑制剂及其未知衍生物中的应用[J]. 色谱, 2014, 32(11): 1 187-1 196.
SUN Jing, CAO Ling, FENG Youlong, et al. Application of precursor ion scanning method in rapid screening of illegally added phosphodiesterase-5 inhibitors and their unknown derivatives in Chinese traditional patent medicines and health foods[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32(11): 1 187-1 196(in Chinese).
- [11] 黎永乐, 郑彦婕, 熊岑, 等. 液相色谱/线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查葡萄酒中的合成色素[J]. 色谱, 2013, 31(8): 729-733.
LI Yongle, ZHENG Yanjie, XIONG Cen, et al. Fast screening of the artificial dyes in wine by liquid chromatography/hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(8): 729-733(in Chinese).
- [12] 仇镇武, 叶汝汉, 柳亚玲, 等. 一种新西地那非类似物的结构确证[J]. 分析测试学报, 2013, 32(4): 488-493.
QIU Zhenwu, YE Ruhan, LIU Yaling, et al. Confirmation of the structure of a new sildenafil analogue[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(4): 488-493(in Chinese).
- [13] MIN Y, ZHE Z, GUO D A. A strategy for fast screening and identification of sulfur derivatives in medicinal Pueraria, species based on the fine isotopic pattern filtering method using ultra-high-resolution mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 894: 44-53.
- [14] KEE C L, GE X, KOH H L, et al. Isolation and characterization of propoxyphenyl linked sildenafil and thiosildenafil analogues in health supplements[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2012, 70(21): 265-272.