

中图分类号: R927.2; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)15-0067-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.15.014



高效液相色谱 - 高分辨四极杆 - 飞行时间 - 质谱法 测定中成药中非法添加物二乙氨基前他达拉非*

舒展, 王琤帅, 应斌斌, 金 琴, 陈 旦

(浙江省金华市食品药品检验检测研究院, 浙江 金华 321000)

摘要:目的 建立检测中成药中非法添加物二乙氨基前他达拉非的高效液相色谱 - 高分辨四极杆 - 飞行时间 - 质谱(HPLC - Q - TOF - MS)法,并根据他达拉非类化合物的特征碎片离子实现非目标化合物的筛查。方法 色谱柱为 Agilent EC C₁₈柱(100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm),流动相为乙腈 - 0.1%乙酸溶液(梯度洗脱),流速为 0.3 mL/min,柱温为 35 °C,进样量为 1 μL;采用 Q - TOF - MS 作检测器,电喷雾电离(ESI),正离子模式,根据保留时间、精确相对分子质量和二级碎片比进行定性分析;由提取离子流图峰面积与质量浓度关系进行定量分析;基于精确相对分子质量的二级质谱图推测裂解规律;通过提取质荷比(*m/z*)为 135.044 1 碎片离子的色谱峰识别他达拉非类化合物。结果 归纳了常见磷酸二酯酶 V 型抑制剂(PDE5i)他达拉非类化合物的 ESI 质谱裂解规律。二乙氨基前他达拉非质量浓度在 0.11 ~ 5.26 μg/mL 范围与峰面积线性关系良好($r = 0.997 0, n = 5$);检测限为 0.021 μg/mL,定量限为 0.053 μg/mL;稳定性、重复性、精密度试验结果的 RSD 均小于 4.60%;平均加样回收率大于 97.80%($n = 9$)。1 批样品中检出二乙氨基前他达拉非,含量为 3.58 mg/g。结论 该方法准确、可靠,适用于二乙氨基前他达拉非的定性定量分析,通过特征碎片离子可以实现他达拉非类化合物的快速识别。

关键词: 高效液相色谱 - 高分辨四极杆飞行时间 - 质谱法;非法添加物;磷酸二酯酶 V 型抑制剂;二乙氨基前他达拉非;非靶向筛查

Determination of Diethylaminopretadalafil Illegally Added in Chinese Traditional Patent Medicines by HPLC - Q - TOF - MS

SHU Zhan, WANG Chengshuai, YING Binbin, JIN Qin, CHEN Dan

(Jinhua Institute for Drug and Food Control, Jinhua, Zhejiang, China 321000)

Abstract: Objective To establish a high - performance liquid chromatography - quadrupole time - of - flight mass spectrometry (HPLC - Q - TOF - MS) method for the determination of diethylaminopretadalafil illegally added in Chinese traditional patent medicines, and to screen non - target compounds according to the characteristic fragment ions of tadalafil derivatives. **Methods** The chromatographic column was Agilent EC C₁₈ column (100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% acetic acid solution (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 1 μL. Q - TOF - MS equipped with electrospray ionization (ESI) source was performed in positive ionization mode, and qualitative analysis was carried out according to the retention time, accurate mass and secondary fragment ratio. Quantitative analysis was performed based on the relationship between the peak area of the extracted total ion flow chromatogram and the mass concentration. The fragmentation pattern was inferred based on the second order mass spectrometry with accurate mass. Tadalafil derivatives were identified by the chromatographic peak of fragment ion with extraction mass - to - charge ratio (*m/z*) of 135.044 1. **Results** The ESI mass spectrometry fragmentation patterns of common phosphodiesterase type V inhibitor (PDE5i) tadalafil derivatives were summarized. The linear range of diethylaminopretadalafil was 0.11 - 5.26 μg/mL ($r = 0.997 0, n = 5$), the limit of detection (LOD) was 0.021 μg/mL, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.053 μg/mL. The RSDs of stability, repeatability, and precision tests results were all lower than 4.60%, and the average recovery was higher than 97.80% ($n = 9$). Diethylaminopretadalafil was detected in one batch of samples, with a content of 3.58 mg/g. **Conclusion** The method is accurate, reliable, and suitable for the qualitative and quantitative analysis of diethylaminopretadalafil, and the characteristic fragment ions can be used to quickly identify tadalafil derivatives.

Key words: HPLC - Q - TOF - MS; illegal additives; phosphodiesterase type V inhibitor; diethylaminopretadalafil; non - targeted screening

中成药中常非法添加化学药物,以磷酸二酯酶 V 型抑制剂(PDE5i)为例,由于功能特殊,利润巨大,作为非法添加物的现象尤为严重^[1-3]。目前,补充检验方法 BJS201805 规定了 90 种那非类的物质的检验方法^[4],但

在日常检验工作中发现此标准规定范围外的、通过结构修饰得到的新型 PDE5i^[5-9]。非法添加物二乙氨基前他达拉非是一种他达拉非的结构衍生物^[10-11],尚缺乏高分辨质谱的定性定量研究。为此,本研究中采用高效

* 基金项目:浙江省药品监管系统科技计划项目[2020002]。

第一作者:舒展,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物分析,(电话)0579-82301374(电子信箱)185161587@163.com。

液相色谱-高分辨四极杆-飞行时间-质谱(HPLC-Q-TOF-MS)法对中成药中的二乙氨基前他达拉非进行分析方法的研究,同时利用高分辨质谱对裂解规律进行总结,可用于他达拉非系列衍生物的非目标化合物的筛查。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 6530型HPLC-QTOF液质联用仪(美国Agilent公司),配有Mass Hunter B04.00软件;XS205DU型电子天平(瑞士Mettler公司,精度为0.01 mg);KQ-250DE型超声仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz);Direct-Q 5UV型超纯水系统(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

二乙氨基前他达拉非对照品(批号520043-201401,含量99.7%),他达拉非对照品(批号510170-202102,含量99.8%),氨基他达拉非对照品(批号520042-202002,含量99.5%),均购于中国食品药品检定研究院;*N*-去甲基他达拉非对照品(多伦多研究化学公司,批号19-MVI-126-1,含量99.8%);乙腈(色谱纯,美国霍尼韦尔公司,批号EC943-CN);冰醋酸(色谱纯,德国Merck公司,批号Z0763908147);样品均为抽检样品(批号分别为A363632, 20210509, ST11220, BN00701, 20210315)。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent EC-C₁₈柱(100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%乙酸溶液(B),梯度洗脱(0~15 min时10%A~40%A, 15~20 min时40%A~90%A, 20~30 min时90%A, 30~31 min时10%A, 31~40 min时10%A);流速:0.3 mL/min;柱温:40 °C;进样量:1 μL。

2.1.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI),正离子模式;质荷比(*m/z*)扫描范围:50~1 000;雾化气(N₂)压力:35 psi;干燥气(N₂)流速:12 L/min;温度:350 °C;毛细管电压:3.5 kV;碎裂电压:180 V;二级质谱碰撞裂解能量:30 eV。

2.2 溶液制备

对照品贮备液:取二乙氨基前他达拉非对照品10.52 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加50%乙腈适量,超声使溶解并定容,摇匀,即得。

混合对照品溶液:取二乙氨基他达拉非10.12 mg,氨基他达拉非10.03 mg,*N*-去甲基他达拉非10.22 mg,他达拉非10.11 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,用

乙腈溶解并定容,摇匀,用50%乙腈稀释,得质量浓度为1 mg/mL的溶液,即得。

供试品溶液:取样品1.0 g,置100 mL容量瓶中,用50%乙腈超声溶解并定容,精密量取5 mL,置50 mL容量瓶中,用50%乙腈定容,即得。

2.3 质谱行为分析

取2.2项下对照品贮备液,用50%乙腈稀释成质量浓度为1.05 μg/mL的对照品溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定。由于二乙氨基前他达拉非结构中存在N,易与H⁺结合形成[M+H]⁺准分子离子,与加钠分子离子峰[M+Na]⁺比较,[M+H]⁺的丰度更高(图1)。故在实际样品测定中,选择[M+H]⁺为母离子进行定量分析。

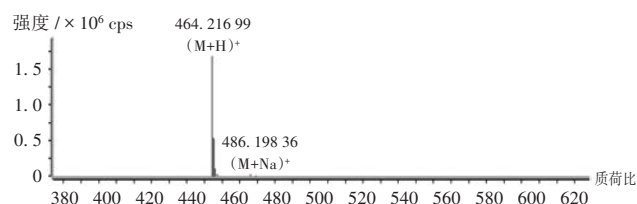


图1 二乙氨基前他达拉非一级质谱图

Fig. 1 The first order mass spectrum of diethylaminopretadafil

2.4 定量分析

采用Agilent Mass Hunter B04.00软件按精确相对分子质量464.2180提取离子色谱图进行定量分析。提取质量窗口为 10×10^{-6} 。

2.5 二乙氨基前他达拉非裂解规律推测

通过二乙氨基前他达拉非的二级质谱图(图2)推测可能的裂解途径(图3)。裂解途径1:哌啶环上的C-N键发生断裂形成*m/z*为334.1074的碎片离子,进一步脱去甲氧酰基形成*m/z*为274.0863的碎片离子。裂解途径2:通过反Diels-Alder反应得到*m/z*为262.0863的碎片离子,此碎片离子最终形成*m/z*为135.0441的碎片离子^[12]。

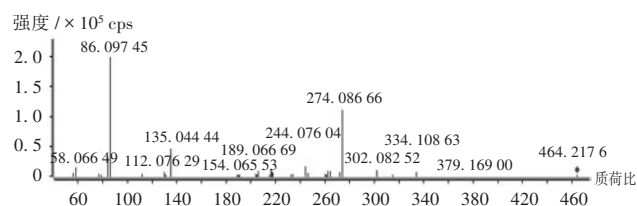


图2 二乙氨基前他达拉非二级质谱图

Fig. 2 The second order mass spectrum of diethylaminopretadafil

2.6 二乙氨基前他达拉非方法学考察

线性关系考察与检测限、定量限确定:取2.2项下对照品贮备液,用50%乙腈稀释成质量浓度分别为0.11, 0.53, 1.05, 2.10, 5.26 μg/mL的系列对照品溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,以母离子峰面积(*Y*)对二乙氨基前他达拉非质量浓度(*X*)进行线性

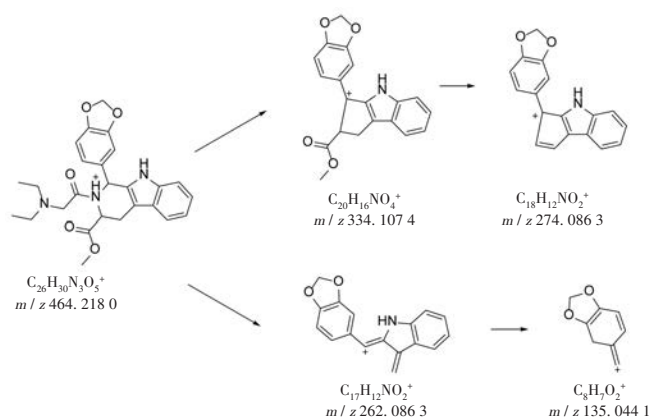


图3 二乙氨基前甲基他达拉非的裂解途径及主要碎片离子
Fig. 3 Pyrolysis pathway and main fragmentation of diethylamino-pretadafil

回归,得回归方程 $Y = 13\ 816\ 134X + 4\ 257\ 269$ ($r = 0.997\ 0, n = 5$)。结果表明,二乙氨基前他达拉非质量浓度在 $0.11 \sim 5.26\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。取对照品贮备液,用50%乙腈稀释后,按2.1项下色谱与质谱条进样测定,以信噪比(S/N)分别为3:1和10:1的质量浓度为检测限和定量限。结果检测限为 $0.021\ \mu\text{g}/\text{mL}$,定量限为 $0.053\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

精密度试验:取线性关系考察项下对照品溶液(质量浓度为 $1.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$)适量,按2.1项下色谱、质谱条件连续进样测定5次,以峰面积计算精密度。结果的 RSD 为 3.52% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取线性关系考察项下对照品溶液(质量浓度为 $1.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$)适量,分别于0, 2, 4, 8, 12 h时按2.1项下色谱与质谱条件进样测定母离子峰面积。结果的 RSD 为 4.56% ($n = 5$),表明对照品溶液在12 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为A363632),依法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,记录母离子峰面积。结果的 RSD 为 2.33% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取未检出二乙氨基前他达拉非的阴性片剂粉末1 g,精密称定,置100 mL容量瓶中,分别精密加入对照品溶液(质量浓度为 $105.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$)0.8, 1.0, 1.2 mL,用50%乙腈定容,每个浓度平行制备3份,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,计算加样回收率。结果见表1。

2.7 样品含量测定

取样品(批号为A363632),依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,得到与对照品保留时间相同的提取离子流色谱峰(图4),其准分子离子峰 $[M + H]^+$ m/z 为464.2176(理论 m/z 为464.2180, $\Delta m = -0.8 \times 10^{-6}$),与二级质谱图一致(图5)。结果测定含量为 $3.58\ \text{mg}/\text{g}$ 。

表1 二乙氨基前他达拉非加样回收试验结果($n = 9$)

Tab. 1 Results of the recovery test of diethylamino-pretadafil ($n = 9$)

加样浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测定浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)			\bar{X} (%)	RSD (%)
	1	2	3		
0.842	0.815	0.842	0.814	97.82	1.93
1.052	1.068	1.025	1.026	98.82	2.36
1.262	1.242	1.236	1.225	97.81	0.70

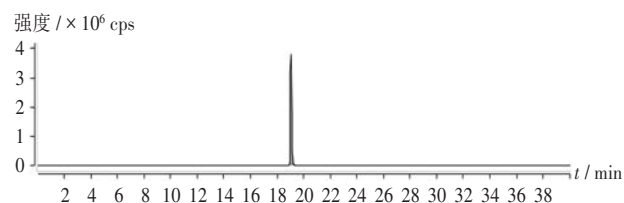


图4 供试品溶液提取离子色谱图

Fig. 4 Extraction ion chromatogram of the test solution

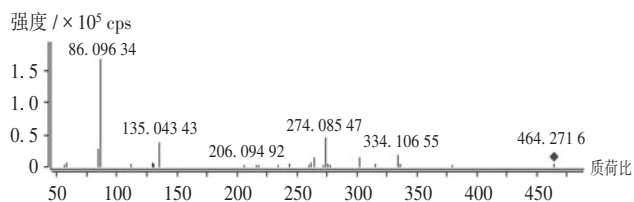


图5 供试品溶液与对照品溶液二级质谱图

Fig. 5 The second order mass spectrum of the test solution and the reference solution

2.8 他达拉非类化合物裂解规律比较

通过比较他达拉非、氨基他达拉非和 N -去甲基他达拉非的裂解规律^[13-14]发现,他达拉非类化合物均具有 m/z 为135.0441的特征碎片离子(图6),其原因为此类物质具有胡椒环结构^[15]。实际工作中,可根据这一特征离子快速筛查他达拉非类化合物,再根据裂解规律推测化合物的结构,在结构信息未知的情况下实现物质结构的推测。

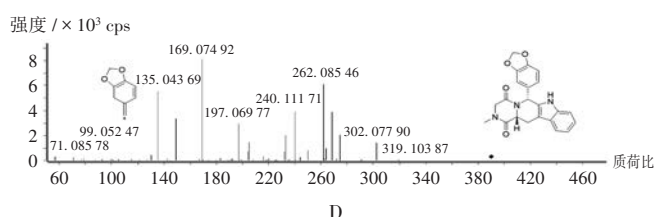
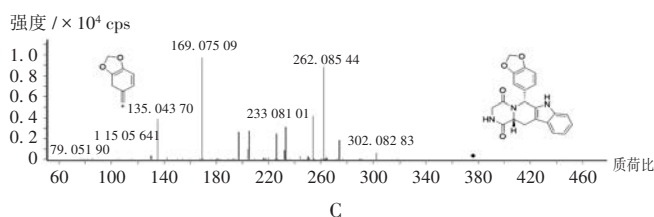
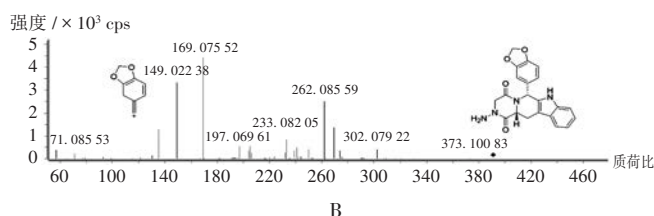
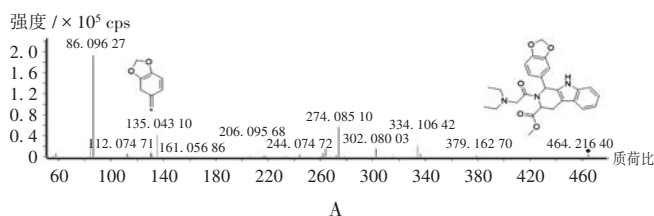
2.9 基于特征离子的他达拉非类化合物筛查

取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱与质谱条件,以 auto MS/MS 模式进行扫描,采用 Mass Hunter 软件,按精确相对分子质量135.0441处二级质谱提取离子色谱图(图7),快速识别他达拉非类化合物,根据裂解规律推测出二乙氨基前他达拉非、他达拉非、氨基他达拉非、 N -去甲基他达拉非等。

3 讨论

3.1 流动相选择

曾考察水-乙腈、10 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈、0.1% 乙酸溶液-乙腈流动相体系对分离效果及质谱灵敏度的影响。结果采用0.1% 乙酸溶液-乙腈流动相体系不仅具有较好的峰形,且具有较高的质谱响应。故选择0.1% 乙酸溶液-乙腈作为流动相。

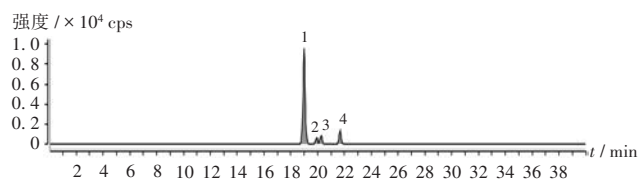


A. 二乙氨基前他达拉非 B. 氨基他达拉非 C. N-去甲基他达拉非 D. 他达拉非

图6 他达拉非类化合物二级质谱图

1. Diethylaminopretadafil 2. Animotadalafil 3. Nortadalafil 4. Tadalafil

Fig. 6 The second order mass spectrum of tadalafil derivatives



1. 二乙氨基前他达拉非 2. 氨基他达拉非 3. N-去甲基他达拉非 4. 他达拉非

图7 混合对照品溶液在 m/z 为 135.044 1 处的二级质谱提取离子色谱图

1. Diethylaminopretadafil 2. Animotadalafil 3. Nortadalafil 4. Tadalafil

Fig. 7 Extraction ion chromatogram of mixed reference solution at m/z of 135.044 1

3.2 毛细管出口电压优化

随着毛细管出口电压的增加,二乙氨基前他达拉非的 $[M+H]^+$ 离子响应逐渐增加,但随后发生源内裂解,离子响应逐渐减小。采用 100~200 V 的毛细管出口电压测定(每隔 10 V 增加 1 次),结果毛细管出口电压设定为 160 V 时 $[M+H]^+$ 离子具有最高响应值。

3.3 碰撞裂解能优化

他达拉非类化合物在碰撞裂解的条件下易产生碎

片离子。采用 10, 20, 30, 40 eV 的碰撞裂解能对二乙氨基前他达拉非进行裂解。结果碰撞裂解能为 30 eV 时裂解碎片细节最丰富,有利于裂解途径的归纳和鉴别测定。故碰撞裂解能设定为 30 eV。

3.4 方法评价

二乙氨基前他达拉非作为一种新型的 PDE5i, 目前报道的检测方法较少。本研究中采用 HPLC 作为分离手段,以 Q-TOF-MS 检测器作为检测手段,定性可靠。特别是通过对他达拉非类化合物裂解规律的总结,利用药物构效关系设计的原理,发现此类物质特征碎片离子。利用特征碎片离子能有效发现他达拉非类化合物,为非法添加物的检测提供了新思路,从靶向目标化合物的筛查转向了非靶向、非目标化合物的筛查,为市场监管提供技术支撑,保障患者用药的安全。

参考文献

- [1] 贾婧怡,李 玮,张 焯,等. 保健食品中非法添加药物事件及检测技术[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(11): 3558-3570.
- [2] 汪瑾彦,梁 祈,庄 玥,等. UPLC-MS/MS 法测定止咳平喘中药制剂中 16 种非法添加化学药物[J]. 中成药,2022,44(1):127-131.
- [3] 刘 静,董 宇,姜 鑫,等. LC-MS 测定止咳平喘类中成药中非法添加的 8 种化学药物[J]. 中国现代应用药学,2021,38(7):851-855.
- [4] 国家市场监督管理总局. 食品中那非类物质的测定(BJS 201805)[S/OL]. (2018-07-02)[2023-03-12]. https://gkml.samr.gov.cn/nsjg/spcjs/201905/t20190505_293380.htmL.
- [5] 王子龙,刘晓普,张 禄,等. 中成药中非法添加物 N-苄基他达拉非的结构确证[J]. 中国现代应用药学,2022,39(1):68-71.
- [6] 夏金涛,吴婉琴,朱松松,等. 固体饮料中一种新型卡巴地那非类似物的定性鉴别和定量分析[J]. 分析测试学报,2022,41(5):754-760.
- [7] 杨丽蓉,赵海鹏,齐衍超,等. 高效液相色谱法测定保健食品中一新型他达拉非类似物的含量[J]. 食品安全导刊,2021(20):123-124.
- [8] ASSEMAT G, BALAYSSAC S, GILARD V, et al. Isolation and identification of ten new sildenafil derivatives in an alleged herbal supplement for sexual enhancement[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 191:113482.
- [9] GU Y, HU Q, SUN J, et al. Isolation and identification of a new sildenafil analogue, hydroxycarbodenafil, found as an adulterant in a health supplement[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 185:113222.
- [10] 王鼎乾,邢海艳,胡 珀. 保健食品中二乙氨基前他达拉非的检测方法研究[J]. 广州化工,2019,47(10):82-84.
- [11] 邓银华,蔡丹丹,黄朝辉. 保健食品中一个新型他达拉非类似物的分析鉴定[J]. 药物分析杂志,2017,37(7): 1256-1259.