

文章编号: 1673 1689(2011)01-0151-05

# 同时检测伐地那非及其类似物的免疫学方法

郭杰标<sup>1,2</sup>, 许杨<sup>\* 1,2</sup>, 刘师文<sup>1,2</sup>, 王刘花<sup>1,2</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 中德联合研究院; 江西 南昌 330047)

**摘要:** 伐地那非是用于治疗阳痿的磷酸二酯酶(phosphodiesterase type 5, PDE-5)抑制剂药物。违法添加到保健品和中药的伐地那非及其结构类似物对公众健康构成了威胁。单克隆抗体 4B9 被鉴别为能够同时检测伐地那非及其类似物。以这株抗体建立的间接竞争 ELISA 方法, 对伐地那非的检测限为 5.0 ng/mL, 线性范围为 5.0~40 ng/mL ( $R^2 = 0.952$ ),  $IC_{50}$  值为 18.2 ng/mL。对 20 个中成药进行检测没有发现假阳性, 伐地那非最低检出浓度为 0.08 mg/g; 添加回收率 76%~116%, 批内差异为 9.7%~16.2%。

**关键词:** 磷酸二酯酶抑制剂; 伐地那非; 违法添加; 结构类似物; 免疫检测

中图分类号: R 927

文献标识码: A

## Development of the an Immunoassay for Simultaneous Analysis of Vardenafil and Its Analogues

GUO Jie biao<sup>1,2</sup>, XU Yang<sup>\* 1,2</sup>, LIU Shi wen<sup>1,2</sup>, WANG Liu hua<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technologe, Nanchang University, Nanchang 330027, China; 2. Sino German Joint Research Institute; Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Vardenafil is a phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitor for the treatment of erectile dysfunction. Undeclared vardenafil and the related analogues adulterated in herbal commodities are a threat to human health. The anti vardenafil McAb of 4B9 was the specific to vardenafil and its analogues, based on this result, an indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was developed. The limit of detection of vardenafil was 5.0 ng/mL<sup>-1</sup>, the calibration curve was linear from 5.0 to 40 ng/mL<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.952$ ) with an  $IC_{50}$  value of 18.2 ng/mL<sup>-1</sup>. In the extracts of 20 Chinese traditional drugs, the detection capability (CC $\beta$ ) of vardenafil was 0.08 mg/g<sup>-1</sup>, the recoveries were 76-116% and the coefficients of variation (C. V.) were 9.7% -16.2%.

**Key words:** phosphodiesterase 5 inhibitors, vardenafil, illegal additives, artificial antigen, immunoassay

收稿日期: 2010-01-28

基金项目: 人事部归国留学人员资助计划项目(2006/164)。

作者简介: 郭杰标(1971-), 男, 广东韶关人, 讲师, 食品科学与工程博士研究生, 主要从事食品安全检测研究。

Email: sgyuanyuan@163.com

\* 通信作者: 许杨(1951-), 女, 安徽枞阳人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全检测研究。Email: xuyang1951@163.com。

盐酸伐地那非(Levitra, 拜尔)是一种获 US-FDA 批准用于治疗阳痿的 PDE-5 抑制剂药物。近年来, 违法添加到保健品和植物药品的伐地那非及其结构类似物对公众的健康构成了威胁。Piperidenafil (图 1) 是伐地那非的类似物<sup>[6]</sup>, 该药物具有比伐地那非更强的代谢稳定性和脂溶性, 能够在患者体内长时间维持高血药浓度, 同时, 更容易通过血脑屏障产生中枢神经伤害<sup>[8]</sup>。最近在香港又发现一种伐地那非的类似物(图 1)<sup>[7]</sup>, 这些类似物没有经过毒理实验和安全性评价, 给公众健康带来了很多的未知危害因素, 必须加强对伐地那非结构类似物的监管和筛查。

这些类似物是伐地那非的衍生物, 其色谱行为和相对分子质量与伐地那非存在差异。因此, 使用

HPLC 或 LC-MS 难以同时检测出伐地那非及其类似物<sup>[6,7]</sup>。目前, 只有 LC-ESI-MS 方法能够同时检测伐地那非及其类似物, 但是高昂的设备价格制约了该方法的广泛使用。近年来, 能够同时检测多个结构类似小分子物质的“多残留免疫检测方法”(multi residue immunoassay) 是热门的研究方向。如图 1 所示, 方框标示的发色团结构是伐地那非及其类似物共有基团。研究的目的是在前期获得的抗伐地那非单克隆抗体中, 鉴别出一株针对伐地那非发色团结构的抗体。基于这株抗体, 建立起了能够同时检测伐地那非及其结构类似物的间接竞争酶联免疫检测(indirect competitive Enzyme linked immunosorbent assay, ic-ELISA)。

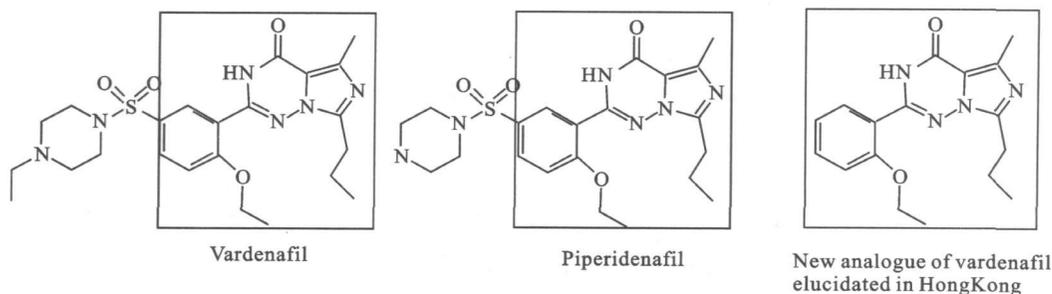


图 1 目前已发现的伐地那非结构类似物(方框所标示的发色团结构是伐地那非及其类似物的共同基团)

Fig.1 Vardenafil and its related analogues found up to date(The chromophore labeled with a frame is the common structure of vardenafil and its related analogues.)

## 1 材料与方

### 1.1 材料

1.1.1 主要药品及试剂 伐地那非标准品(Vardenafil) 购自德国拜耳公司; 他达那非(Tadalafil) 购自礼来公司; 西地那非、酚妥拉明和睾丸酮: 购自中国药品生物制品检验所; 山羊抗鼠 IgG-HRP 酶标二抗购自 Gene Tex; Piperidenafil 标准品(固体结晶)、含 Piperidenafil 的保健品胶囊由 US-FDA 提供; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 96 孔酶标板购自 Costar 公司; Ultrospec 紫外/可见光谱仪购自美国安玛西亚公司; 酶标仪购自 Labsystems 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 测定各株单抗对 piperidenafil 的交叉反应率 参照 Ju 等<sup>[13]</sup>报道的方法进行检测。

1.2.2 测定各株单抗对伐地那非水解产物的识别能力 称取 5 mg 伐地那非溶解在 5 mL HCFH<sub>2</sub>O (1:1) 溶液中, 置于一个密闭的塑料管 100 °C 水解

20 h。把在 0, 8, 12, 16, 20 h 取的水解样品, 在各株单抗建立的免疫检测体系中定量检测, 鉴别能识别伐地那非水解产物的单抗, 用于建立检测伐地那非及其衍生物的免疫检测系统。

1.2.3 对 ic-ELISA 系统的优化 把上一步骤鉴别得到的单抗腹水进行系列稀释(质量分数分别为 1: 2.0 × 10<sup>4</sup>, 1: 4.0 × 10<sup>4</sup>, 1: 8 × 10<sup>4</sup>, 1: 1.2 × 10<sup>5</sup>, 1: 1.6 × 10<sup>5</sup>) 对不同的检测抗原包被质量浓度(0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μg/mL) 进行正交分解, 对检测系统的性能进行优化; ic-ELISA 实验参照 Ju 等<sup>[13]</sup>报道的步骤进行。

1.2.4 检测系统的特异性评价 通过测定对西地那非、他达那非、酚妥拉明和睾丸酮的交叉反应率, 评价 ic-ELISA 系统的检测特异性。实验参照 Ju 等<sup>[13]</sup>的方法进行, 对每种药品进行 2 次平行实验检测 IC<sub>50</sub> 值, 交叉反应率用以下公式计算: CR(%) = 伐地那非的 IC<sub>50</sub> 值/受试药品的 IC<sub>50</sub> 值。

1.2.5 样品预处理 取 0.2 g (0.2 mL) 样品溶解在 20 mL 抽提缓冲液(5 mmol/L Tris-HCl, pH 5.0, 质量分数 0.1% Tween-20) 中充分混匀, 以 6,

000 r/min 离心 10 min; 抽提液以 1/100 在样品缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH 7.4, 0.05% Tween-20, 0.2% BSA)中稀释, 样品稀释 10 000 倍。

**1.2.6 检测系统的性能验证** 取 20 种经 LC-UV 检测证明不含伐地那非的中成药样品(包括 8 种胶囊, 8 种小蜜丸, 4 种口服溶液), 用 ic-ELISA 系统检测, 评价基质对检测系统的干扰; 在这 20 种空白样品中添加 0.05、0.08 mg/g 的伐地那非, 评价系统的最低检测限; 在空白样品中添加 0.10、0.20、0.30 mg/g 的伐地那非, 测定检测系统的添加回收率和变异系数; 使用 ic-ELISA 系统和 LG-UV 对 US-FDA 提供的 Piperidenafil 的保健品胶囊进行检测, 比较两者的结果。以上所用样品都进行 3 次平行重复检测, 取平均值作为检测结果。

## 2 结果和讨论

### 2.1 各株单抗对 piperidenafil 的交叉反应率

4 株抗伐地那非单抗对 piperidenafil 的交叉反应率如表 1 所示。其中 4B9 对伐地那非的结构类

似物的交叉反应率最高, 所以最有可能是针对伐地那非及其类似物的共有结构所产生的抗体。

表 1 各抗伐地那非抗体对伐地那非类似物 piperidenafil 的交叉反应率检测结果

Tab. 1 Cross Reactivity of each McAb to piperidenafil in indirect competitive ELISA method

抗体	IC <sub>50</sub> of vardenafil/(ng/mL)	IC <sub>50</sub> of piperidenafil/(ng/mL)	交叉反应率/%
1B5	22.1	55.2	40.1
1G3	16.5	51.3	32.1
3E11	31.6	73.5	42.9
4B9	27.2	33.5	81.2

### 2.2 各株单抗对伐地那非水解产物的识别能力

根据 Reepmeyer<sup>[6]</sup> 的报道, 伐地那非的 4 个水解产物都含有发色团结构(图 2)。伐地那非随着反应的进程不断被水解, 但是体系中发色团结构的总量保持不变(图 2)。

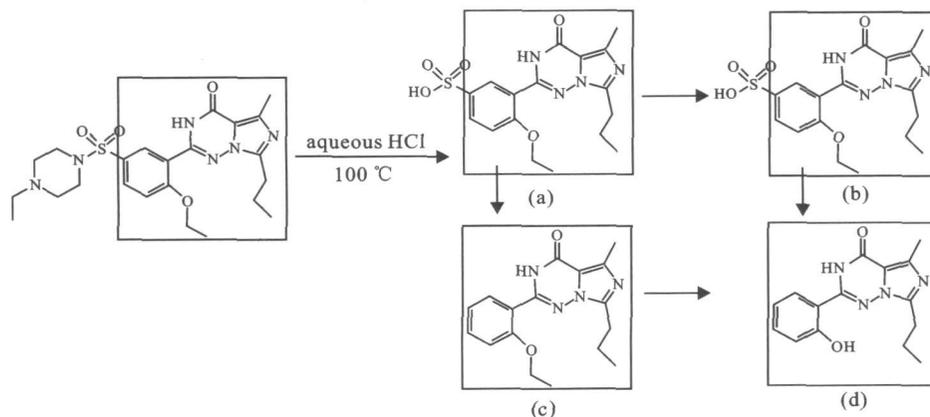


图 2 方框所标示的发色团结构存在于所有的水解产物

Fig. 2 Chromophore structure of vardenafil labeled with a frame was contained in each of the hydrolysis product of vardenafil

实验结果如图 3 所示, 使用 1B5、1G3 和 3E11 抗体建立的检测体系, 对各个时段水解产物的检测结果不断下降, 证明这些抗体识别的结构在水解过程中被破坏; 而使用 4B9 抗体建立的检测体系, 对各个时段水解产物的检测结果保持稳定, 证明该抗体所识别的结构没有被水解破坏, 所以推断 4B9 抗体能够识别的伐地那非发色团结构。而 2.1 的实验结果也显示 4B9 抗体最有可能是针对伐地那非发色团结构的抗体。综合两部分实验的结果, 4B9 抗体被最终选定用于建立本研究的检测系统。

### 2.3 ic-ELISA 系统的优化结果

使用 4B9 抗体建立 ic-ELISA 方法, 经过优化, 抗原包被质量浓度为 0.5 μg/mL, 抗体腹水稀释度为 1: 1.2 × 10<sup>5</sup>。以这株抗体建立的 ic-ELISA 方法, 对伐地那非的检测限为 5.0 ng/mL, 线性范围为 5.0~40 ng/mL (R<sup>2</sup> = 0.952), IC<sub>50</sub> 值为 18.2 ng/mL。

### 2.4 检测系统特异性评价结果

西地那非和他达那非是另外两种治疗阳痿的 PDE-5 抑制剂药物, 酚妥拉明是用于治疗阳痿的 α

受体阻断剂, 睾丸酮是常用的雄性激素。对这些药物进行交叉反应率检测, 能够针对性地评价检测系统对伐地那非检测的特异性。实验结果见表 3 所示, 检测系统对几种受试药品的交叉反应率都很低, 不会对伐地那非的检测特异性造成影响。

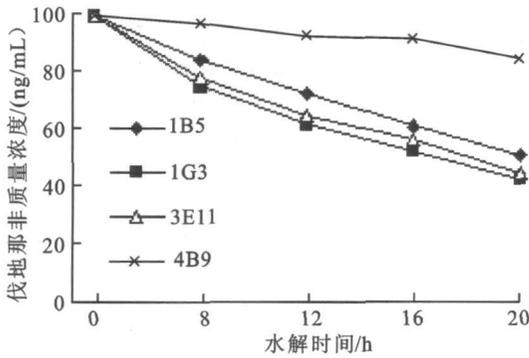


图 3 不同抗体建立的 ic ELISA 系统对各时间段伐地那非水解产物的检测结果

Fig. 3 Results of testing hydrolysis products of vardenafil in different hydrolyzed stages in different ic ELISA systems, respectively

表 2 检测系统对相关药品的交叉反应率检测结果

Tab. 2 Cross Reactivities (%) of McAb 4B9 to related drugs in the ic ELISA system

受试药品	交叉反应率/ %
枸橼酸西地那非	0.06
他达拉非	< 0.01
马来酸酚妥拉明	< 0.01
睾丸酮	< 0.01

### 2.5 检测系统的性能验证

作者把 ic-ELISA 检测产生的  $B/B_0$  为 80% (相当于  $IC_{20}$  值) 作为判断阳性结果的阈值。  $B/B_0$  值大于 80% 的为阴性,  $B/B_0$  值小于 80% 的为阳性。

如图 4 所示, 20 个空白中成药样品经预处理之后, 所有  $B/B_0$  值在 100% 上下波动, 没有产生  $B/B_0$  值小于 80% 的结果。对于 20 添加 0.08 mg/g 伐地那非的样品的检测结果  $B/B_0$  值都小于 80%, 全部被判读为阳性。因此, 使用现有样品处理和检测方法, 对空白样品检测没有发现假阳性结果, 对伐地那非的最低检出浓度为 0.08 mg/g。考虑到伐地那非每次的使用剂量为 5~20 mg, 本方法所达到的伐地那非的最低检出浓度能够符合筛查的要求。

如表 3 所示, 在 20 个空白样品中的 0.10、0.20、0.30 mg/g 3 个水平的添加回收率在 76%~116% 范围, 批内差异范围在 9.7%~16.2%。

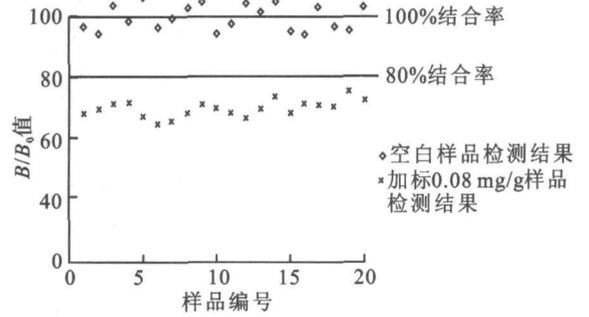


图 4 20 个空白和 20 个加标 0.08 mg/g 伐地那非的中成药样品的 ic ELISA 检测结果

Fig. 4 Determination results in the icELISA of 20 blank herbal samples and 20 fortified samples

表 3 ic ELISA 系统对 20 个加标中成药样品的回收率和批内差实验结果

Tab. 3 Recoveries and the coefficients of variation obtained in herbal products which were fortified with spiking of vardenafil in the ic ELISA system (n= 20)

加标质量 分数/ (mg/g)	检测质量 分数/ (mg/g)	回收率/ %	CV/ %
0.10	0.076	76~108	12.1
0.20	0.162	81~116	16.2
0.30	0.249	83~109	9.7

使用 ic-ELISA 系统和 LG-UV 对 US-FDA 提供的两个含 Piperidenafil 保健品胶囊进行检测, 结果如 Table 3 所示结果基本相符。

表 4 比较 ic ELISA 和 LC-UV 对含 Piperidenafil 保健品胶囊的检测结果

Tab. 4 Comparison of ic ELISA and LC-UV in the analysis of herbal products

样品	Piperidenafil 质量分数/ (mg/g)	
	ic ELISA	LC-UV
I	108.1	117.2
II	33.2	39.5

### 3 结 语

目前, 同时检测伐地那非及其结构类似物需要使用液相/离子阱串联质谱<sup>9-12]</sup>, 但是该方法需要昂贵的设备且运行费用高, 难以大规模开展。灵敏、特异、简便的免疫学快速筛查方法是一个值得关注的研究方向, 而多残留免疫检测 (multi-residue immunoassay) 是目前热门的研究方向。

作者鉴别得到了能够识别伐地那非发色团结构的抗体, 通过该抗体建立了能够同时检测伐地那非及其结构类似物的免疫学方法。本方法特异性强, 对常见的违法添加壮阳药物没有交叉反应。在

中成药中对伐地那非的最低检出浓度为 0.08 mg/g, 添加回收率范围在 76% ~ 116%, 批内差异范围在 9.7% ~ 16.2%, 灵敏度、精确度和均一性能够满足筛查工作的需要。建立的免疫检测系统对含伐地那非衍生物 Piperidenafil 保健品胶囊的检测结果基本吻合, 进一步的验证工作拟联系权威检测共

同进行。

致谢: 本文得到人事部归国留学人员资助计划(2006/164)的资助。衷心感谢美国 FDA 的 J. C. Reepmeyer 博士赠送的 Piperidenafil 样品。同时感谢香港 C. K. Lai 博士及其同事提供了关于实验的宝贵建议。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] Fleshner N, Harvey M, Adomat H, et al. Evidence for contamination of herbal erectile dysfunction products with phosphodiesterase type 5 inhibitors[ J ]. **Urology**, 2005, 174: 636– 641.
- [ 2 ] Wespes E, Amar E, Hatzichristou D, et al. European association of urology. Guidelines on erectile dysfunction [ J ]. **European Urology**, 2002, 41: 1– 5.
- [ 3 ] Hellstrom W J, Overstreet J W, Yu A, et al. Tadalafil has no detrimental effect on human spermatogenesis or reproductive hormones[ J ]. **Urology**, 2003, 170: 887– 891.
- [ 4 ] Kloner R. Erectile Dysfunction and Hypertension[ J ]. **International Journal of Impotence Research**, 2007, 19: 296– 302.
- [ 5 ] Teixeira C E, Priviero F B, Webb R C. Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta[ J ]. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2006, 316: 654– 661.
- [ 6 ] Reepmeyer J C, Woodruff J T. Use of liquid chromatography mass spectrometry and a hydrolytic technique for the detection and structure elucidation of a novel synthetic vardenafil designer drug added illegally to a “natural” herbal dietary supplement [ J ]. **Chromatography A**, 2006, 1125: 67– 75.
- [ 7 ] Lam Y H, Poon W T, Lai C K, et al. Identification of a novel vardenafil analogue in herbal product[ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2008, 46: 804– 807.
- [ 8 ] Daraghme N, Al Omari M, Badwan A A, et al. Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC[ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2001, 25: 483– 492.
- [ 9 ] Zhu X, Xiao S, Chen B, et al. Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [ J ]. **Chromatography A**, 2005, 1066: 89– 95.
- [ 10 ] Gratz S R, Flurer C L, Wolnik K A. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC ESI MS and LC UV[ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2004, 36: 525– 533.
- [ 11 ] Tseng M C, Lin J H. Determination of sildenafil citrate adulterated in a dietary supplement capsule by LC/MS/MS [ J ]. **Food & Drug Analysis**, 2002, 10: 112– 119.
- [ 12 ] Liang Q L, Qu J, Luo G A, et al. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS[ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2006, 40: 305– 311.
- [ 13 ] Ju C M, Tang Y, Fan H Y, et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using a specific monoclonal antibody as a new tool to detect Sudan dyes and Para red [ J ]. **Analytica Chimica Acta**, 2008, 621: 200– 206.