

文章编号: 1673-1689(2010)03-0331-05

# 磷酸二酯酶-5 抑制剂检测方法研究进展

郭杰标<sup>1</sup>, 许杨<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:** 3 种获准上市的磷酸二酯酶-5 抑制剂药物(西地那非、伐地那非和他达那非)在市场上获得了巨大成功。不法商人把这些药品违法添加到植物保健品和药品中谋取利益, 对公众的健康构成了威胁。不断出现的 PDE-5 抑制剂的结构类似物导致问题变得更加复杂。目前, 在标准品的参照下, TLC、HPLC、LG-MS 和 MECC 等检测方法可以实现对已知 PDE-5 药物的检测。只有液相/离子阱串联质谱能够同时检测合法的药物和未知的 PDE-5 抑制剂类似物。免疫学检测方法正成为快速、灵敏、高效检测 PDE-5 药物的新方法。

**关键词:** 磷酸二酯酶-5; 抑制剂; 检测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

## Update of Techniques for Screening of PDE-5 Inhibitors as Illegal Adulterant

GUO Jie-biao<sup>1</sup>, XU Yang<sup>\* 1,2</sup>

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

**Abstract:** The success of licensed phosphodiesterase type-5 (PDE-5) inhibitor drugs (viz sildenafil, vardenafil and tadalafil) has led to the widespread use as adulterants in herbal dietary supplements or herbal medicines. Which cause a threat to the public health, in this review, the apply progress of TLC, HPLC, LG-MS and MECC in the analysis of known PDE-5 drugs with the standards were summarized. However, only LG-ESI-MS/MS can be competent for the identification of both the licensed PDE-5 drugs and unknown analogues in herbal products simultaneously. It is believed that Immunoassay may be a promising strategy for rapid detecting of undecared PDE-5 drugs in a simple, sensitive and high-throughput way.

**Key words:** PDE-5; inhibitions, determination

植物保健品和药品由于被认为安全和无副作用, 近年来在全世界各地广受消费者青睐<sup>[1]</sup>, 天然

收稿日期: 2009-07-13

基金项目: 国家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, 主要从事食品安全研究;

Email: sgyuanyuan@163.com

\* 通信作者: 许杨(1951-), 女, 安徽枞阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品安全研究; Email: xuyang1951@163.com

壮阳药品(natural aphrodisiacs)是其中最为活跃的产品类型<sup>[2]</sup>。目前,天然产品中违法添加磷酸二酯酶-5抑制剂(PDE-5 inhibitors)已经成为全球性的问题。

磷酸二酯酶-5(PDE-5)主要存在于阴茎海绵体平滑肌和阴茎血管平滑肌,能够特异性水解环磷酸鸟苷(cGMP)。PDE-5药物通过抑制磷酸二酯酶-5提高cGMP含量,激活cGMP依赖性蛋白激酶(PKG)引起胞内钙浓度降低,从而导致阴茎海绵体及阴茎动脉平滑肌舒张,达到治疗阳痿的效果<sup>[3]</sup>。目前,US-FDA批准上市用于治疗阳痿的PDE-5抑制剂包括:枸橼酸西地那非(Viagra,辉瑞)、盐酸伐地那非(Levitra,拜尔)和他达那非(Cialis,礼来)。世界各地在天然产品中检测到的违法添加PDE-5抑制剂,不仅包括以上3种药品<sup>[4-10]</sup>,还包括对获准上市的PDE-5药品进行了结构衍生化的结构类似物(structural analogues)<sup>[6,10,15-25]</sup>。作者对在保健品和中成药中违法添加的PDE-5药物危害性和检测方法研究进展情况进行综述。

## 1 违法添加PDE-5抑制剂药物的危害性

在天然壮阳药品中违法添加PDE-5药物,对公众健康构成一系列的威胁。PDE-5抑制剂药物具有一系列副作用,如头痛、面部潮红、消化不良、视力模糊和肌肉酸痛<sup>[26-27]</sup>。美国FDA官方网站(<http://www.fda.gov/medwatch/report.htm>)发布的药物不良反应信息显示,服用Viagra可能导致失明(2005年),服用Viagra、Levitra和Cialis会导致听力突然下降甚至失聪(2007年)。因此,世界各国对PDE-5药物都严格按照处方药管理,在没有医生指导下服用该类药品是危险的。其次,PDE-5抑制剂与硝酸酯药物的相互作用会导致严重的低血压<sup>[28-29]</sup>。硝酸酯药物广泛应用于糖尿病、高血压、高血脂和冠心病的治疗,患有这些疾病而又伴随阳痿症状的病人,往往求助于天然壮阳药品。如果这些病人所服用的天然药品中含违法添加的PDE-5药物,将会导致可怕的后果。

对于众多的PDE-5抑制剂结构类似物,问题显得更加复杂。首先,由于这些药品没有进行过毒理和安全性实验,存在很多的未知危害因素<sup>[20]</sup>。日本厚生省官方网站(<http://www.mhlw.go.jp/english/index.html>)报道了一例服用西地那非类似物(hydroxyt-homosildenafil)导致严重肝功能损伤的个案。香港一位28岁男性服用西地那非类似物

(acetildenafil)后,导致了严重的运动共济失调(ataxia)<sup>[30]</sup>。其次,大多数PDE-5抑制剂类似物比获准上市的同类药物具有更强的药理活性,如Viagra两个结构类似物hydroxyt-homosildenafil和homosildenafil对PDE-5的50%抑制浓度(IC<sub>50</sub>值)分别为3.4 nmol/L和3.8 nmol/L,比Viagra(对PDE-5的IC<sub>50</sub>值为7.6 nmol/L)药理活性高一倍多<sup>[31]</sup>。再者,PDE-5抑制剂类似物由于结构被修饰,导致药物在体内的生物学分布和药代动力学发生改变,从而增加了危险因素。有报道Levitra的结构类似物piperidenafil代谢稳定性和脂溶性增强,使其在体内维持长时间的高血药浓度,并且更加容易通过血脑屏障产生严重的视觉障碍<sup>[32]</sup>。因此,与获准上市的同类药品相比,违法添加的PDE-5抑制剂类似物对消费者的健康危害程度更大,必须加强监管和筛查。

## 2 PDE-5药物筛查方法研究进展

近年来,世界各国的检测部门和科研机构对PDE-5药物筛查方法进行了大量的研究,主要有以下几种技术:

### 2.1 样品预处理方法

目前,文献报道的在复杂基质中萃取富集PDE-5药物的方法,主要使用甲醇、乙腈、二氯甲烷、二甲基亚砜等有机溶剂进行液-液萃取<sup>[7-11]</sup>。J. Kim等<sup>[11]</sup>利用二氯甲烷萃取人体血浆中的西地那非及其代谢产物去甲基西地那非,经吹干有机溶剂进行浓缩后进行HPLC检测,检出限达到2.0 ng/mL,偏差系数小于5.0%,加标回收率大于95%。

P. Dzygiel等<sup>[12]</sup>利用分子印迹聚合物(molecular imprinted polymers, MIPs)作为固相萃取载体,检测人体血浆中的西地那非及去甲基西地那非,检测灵敏度为50 ng/mL,偏差系数小于10%,加标回收率大于70%。M. H. Guermouche等<sup>[13]</sup>利用商业化固相萃取柱(Oasis HLB)富集小鼠血浆中的西地那非及去甲基西地那非,检测灵敏度达到10 ng/mL,偏差系数小于5.2%,加标回收率大于93%。

可见,样品预处理是违法药物筛查过程中的重要环节。而在需要精确定量的PDE-5药物体内代谢监测中,样品预处理过程更是确保实验成败的关键。

### 2.2 薄层层析(TLC)技术

TLC技术简单易行,检测成本低廉,适用大规

模初步鉴定。T. S. Reddy 等<sup>[14]</sup> 使用碘化铯钾显色, 建立了高效薄层层析(HPTLC)技术, 在标准品的参照下, 筛查天然药品中违法添加的PDE-5 药物取得了良好的效果。

### 2.3 高效液相色谱(HPLC)和液质联用(LG-MS)技术

高效液相色谱(HPLC)技术被广泛应用于PDE-5 药物的筛查<sup>[7-13, 15-25, 32]</sup>, 其最大的优势是可以实现定量检测, 检测结果的灵敏度、准确性和精密度能够达到较高的水平<sup>[11, 13]</sup>。液质联用(LG-MS)<sup>[16, 19-21]</sup>能够结合检品的质谱信息对违法添加的PDE-5 药物进行确证检验。但是, 对于一种结构被修饰过的PDE-5 药物类似物, 由于其色谱和质谱行为都发生了很大的改变, 仅使用HPLC和LG-MS技术难以进行有效筛查。US-FDA的J. C. Reepmeyer等<sup>[19]</sup>报道, 在同样的LG-MS条件下, 伐地那非和其类似物piperidenafil的保留时间分别是10.405 min和14.050 min, 质谱结果显示 $m/z$ 分别为499.3 ( $[M+H]$ )和460.3 ( $[M+H]$ )。在没有掌握这种新化合物的检测资料的情况下, 很容易认为检测结果来自于基质的杂信号, 从而产生假阴性的检测结果。

### 2.4 液相/串联离子阱质谱(LC/ESI-MS/MS)技术

已有大量文献报道, 利用LC/ESI-MS/MS技术同时检测违法添加的Viagra、Levitra和Cialis及其结构类似物<sup>[6, 10, 21, 33-34]</sup>。该技术把LC分离得到的检品用电喷雾电离(ESI)转换为准分子离子, 经碰撞室(CID)进行解离产生的特征离子碎片在二级质谱(MS<sub>2</sub>)进行检测。Viagra、Levitra和Cialis及其结构类似物的特征离子碎片的 $m/z$ 值, 综合分析检品液相分离结果以及串联质谱得到的化合物结构信息, 可以在同一过程中检测出已知的和未知的PDE-5 药物。US-FDA的S. R. Gratz等<sup>[21]</sup>利用该技术检测了40个在市场中抽查的天然壮阳药品, 筛查出了包括多种PDE-5 药物类似物在内的19个阳性结果。

### 2.5 通过检测水解产物分析检品结构

在有些情况下, 即使已经检测出一个检品的分子式, 也难以推断出其结构式。通过在酸性条件下对检品进行水解, 用LG-MS或GG-MS对水解产物进行分析, 掌握该检品的各水解产物的柱保留时间和 $m/z$ 值, 与已知的PDE-5 药物标准品的水解产物的LG-MS或GG-MS检测结果进行比较, 可以推测目标检品的精确结构。J. C. Reepmeyer等<sup>[19]</sup>报道使用LG-MS分别检测piperidenafil和伐地那非

的水解产物, 发现两者有4个水解产物完全相同, 从而确定piperidenafil是伐地那非的结构类似物。他们还通过比较nor-acetildenafil和西地那非水解产物的LG-MS检测结果, 鉴别出该检品是西地那非的结构类似物<sup>[20]</sup>。香港的Y. H. Lam等<sup>[25]</sup>发现的一种未知化合物, 其LG-MS检测柱保留时间与伐地那非的一个水解产物相同,  $m/z$ 值与该水解产物都是313 ( $[M+H]$ ), 从而鉴定出该化合物是一种只含母核结构的伐地那非类似物。

### 2.6 胶束动电毛细管色谱法(MECC)

胶束动电毛细管色谱法(micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC)比普通毛细管电泳(capillary electrophoresis, CZE)具有更高的分辨率和特异性。Nevado等<sup>[35]</sup>利用MECC同时检测西地那非和去甲基西地那非, Flores等<sup>[36]</sup>利用MECC法同时检测西地那非、伐地那非和他达那非。两个方法报道的检测灵敏度基本与LC相当, 但是3个药品的迁移时间(migration time)分得很开, 显示出比液相方法高得多的分辨率。变异系数小于5.3%, 加标回收率在98%~107%之间, 精确度和准确性良好。

### 2.7 免疫学快速检测方法

仪器检测方法虽然灵敏、精确和可靠, 但需要昂贵设备且运行费用高, 难以在基层工作中大规模开展。免疫学检测方法具有灵敏、特异、快速和廉价的优点, 已广泛应用于食品和环境样品的快速检测<sup>[37-38]</sup>。

作者用杂交瘤技术得到多株针对伐地那非的单克隆抗体, 并鉴别出其中一株能识别伐地那非的母核结构, 从而建立了一种能够同时检测伐地那非及其类似物的免疫检测方法(专利申请号200910115192X)。该方法对伐地那非的检测灵敏度为5.0 ng/mL, 在检品在预处理过程被稀释了10<sup>4</sup>倍的情况下, 对伐地那非加标量为0.08 mg/g的20种中成药的检出率为100%, 对20种阴性样品检测没有发现假阳性。使用该免疫检测系统对US-FDA赠送的伐地那非类似物piperidenafil标准品进行检测, 发现方法能够检测伐地那非的结构类似物。使用该免疫学方法对两个经US-FDA证实含piperidenafil的保健品的检测结果, 与使用LG-UV对这两个样品的检测结果相吻合。该检测系统还显示出高度的特异性, 与西地那非、他达那非、酚妥拉明、睾酮等壮阳药品基本没有交叉反应。

## 3 结 语

自从1998年第一个PDE-5抑制剂Viagra面

世以来, 该类药品在市场上取得了巨大的成功。受利益驱使, 不法商人在天然壮阳产品中违法添加 PDE-5 抑制剂的行为在全球蔓延。而不断出现的 PDE-5 抑制剂类似物, 不仅对消费者的健康带来更大的危害性, 而且对检测工作造成了很大的困难。现代仪器分析技术的发展, 为筛查违法添加的

PDE-5 抑制剂提供了多种灵敏和精确的检验手段。但能够配备 LG-MS、GG-MS、MECC 和 LC/ESI-MS/MS 等高端设备的检验部门毕竟为少数, 在我国这样的发展中国家尤其是这样。灵敏、特异、简便和价廉的免疫学快速筛查方法是一个值得关注的研究方向。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] R Yuan, Y Lin. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation [ J ]. **Pharmacology & Therapeutics**, 2000, 86 ( 2 ): 191.
- [ 2 ] Venhuis B J, Blok-Tip L, Kaste D de. Designer drugs in herbal aphrodisiacs [ J ]. **Forensic Science International**, 2008, 177 ( 2 ): e25.
- [ 3 ] Fleshner N, Harvey M, Adomat H, et al. Evidence for contamination of herbal erectile dysfunction products with phosphodiesterase-5 inhibitors [ J ]. **Urology**, 2005, 174 ( 2 ): 636.
- [ 4 ] Au A M, Ko R, Boo F O, et al. Screening methods for drugs and heavy metals in Chinese patent medicines [ J ]. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2000, 65 ( 1 ): 112.
- [ 5 ] Koh H L, Woo S O. Chinese Proprietary medicine in singapore: regulatory control of toxic heavy metals and undeclared drugs [ J ]. **Drug Safety**, 2000, 23 ( 5 ): 351.
- [ 6 ] Blok-Tip L, Zomer B, Bakker F, et al. Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products [ J ]. **Food Additives & Contaminants**, 2004, 21 ( 8 ): 737.
- [ 7 ] Mikami E, Ohno T, Matsumoto H. Simultaneous identification/determination system for phentolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising roborant nutrition [ J ]. **Forensic Science International**, 2002, 130 ( 2/3 ): 140.
- [ 8 ] Lai K C, Liu Y C, Tseng M C, et al. Isolation and identification of a sildenafil analogue illegally added in dietary supplements [ J ]. **Food & Drug Analysis**, 2006, 14 ( 1 ): 19.
- [ 9 ] Zou P, Oh S S Y, Hou P, et al. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography [ J ]. **Chromatography A**, 2006, 1104 ( 1-2 ): 113.
- [ 10 ] 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 ( 1-2 ): 89.
- [ 11 ] Kim J, Ji H Y, Kim S J, et al. Simultaneous determination of sildenafil and its active metabolite UK-103,320 in human plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2003, 32 ( 2 ): 317.
- [ 12 ] Dzygiel P, O'Donnell E, Fraier D, et al. Evaluation of water-compatible molecularly imprinted polymers as solid-phase extraction sorbents for the selective extraction of sildenafil and its desmethyl metabolite from plasma samples [ J ]. **Chromatography B**, 2007, 853 ( 1-2 ): 346.
- [ 13 ] Guermouche M H, Bensalah K. Solid phase extraction and liquid chromatographic determination of sildenafil and N-desmethylsildenafil in rat serum with basic mobile phase [ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2006, 40 ( 4 ): 952.
- [ 14 ] Reddy T S, Reddy A S, Devi P S. Identification of a sildenafil in dietary supplements by TLC [ J ]. **Planar Chromatography - Modern TLC**, 2006, 52 ( 3 ): 427.
- [ 15 ] Gratz S R, Gamble B M, Flurer R A. Accurate mass measurement using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structure elucidation of designer drug analogs of tadalafil, vardenafil and sildenafil in herbal and pharmaceutical matrices [ J ]. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2006, 20 ( 15 ): 2317.
- [ 16 ] Reepmeyer J C, d'Avignon D A. Structure elucidation of thioketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs [ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2009, 49 ( 1 ): 145.
- [ 17 ] Zou P, Hou P L, Yin S S, et al. Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements [ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2008, 47 ( 2 ): 279.
- [ 18 ] Mei C L, Yi C L, Jer H L. Identification of a sildenafil analogue adulterated in two herbal food supplements [ J ]. **Food &**

**Drug Analysis**, 2006, 14( 3 ): 260.

- [ 19 ] 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 ( 1 ): 67.
- [ 20 ] Reepmeyer J C, Woodruff J T. Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement [ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2007, 44 ( 4 ): 887.
- [ 21 ] Gratz S R, Flurer C L, Wolnik K A. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LG-ESI-MS and LC UV [ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2004; 36( 3 ): 525.
- [ 22 ] Reepmeyer J C, Woodruff J T, Avignon D A. Avignon. Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement [ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2007, 43 ( 5 ): 1615.
- [ 23 ] Hou P, Zou P, Low M Y, 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 ( 6 ): 870.
- [ 24 ] Zou P, Hou P, Low M Y, et al. Structural elucidation of a tadalafil analogue found as an adulterant of a herbal product [ J ]. **Food Additives & Contaminants**, 2006; 23 ( 5 ): 446.
- [ 25 ] 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( 4 ): 804.
- [ 26 ] Wespes E, Amar E, Hatzichristou D, et al. European association of urology. Guidelines on erectile dysfunction [ J ]. **European Urology**, 2002; 41( 1 ): 1.
- [ 27 ] 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( 3 ): 887.
- [ 28 ] Kloner R. Erectile Dysfunction and Hypertension [ J ]. **International Journal of Impotence Research**, 2007, 19( 3 ): 296.
- [ 29 ] 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( 2 ): 654.
- [ 30 ] Poon W T, Lam Y H, Lai C K, et al. Analogues of erectile dysfunction drugs: an under-recognised threat [ J ]. **Hong Kong Medical Journal**, 2007, 13( 2 ): 359.
- [ 31 ] Wang J, Jiang Y, Wang Y, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to determine the pharmacokinetics of sildenafil in human plasma [ J ]. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2007, 44( 1 ): 231.
- [ 32 ] Daraghmeh 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( 3/ 4 ): 483.
- [ 33 ] 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( 2 ): 112.
- [ 34 ] 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( 2 ): 305.
- [ 35 ] Nevado J J B, Flores J R, Peñalvo G C, et al. Determination of sildenafil and its metabolite by sample stacking with polarity switching using micellar electrokinetic chromatography [ J ]. **Chromatography A**, 2002, 953 ( 1 ): 279.
- [ 36 ] Flores J R, Nevado J J B, Peñalvo G C, et al. Development of a Micellar electrokinetic capillary chromatography method for the determination of three drugs employed in the erectile dysfunction therapy [ J ]. **Chromatography B**, 2004, 811( 2 ): 231.
- [ 37 ] Acharya D, Dhar T K. A novel broad-specific noncompetitive immunoassay and its application in the determination of total aflatoxins [ J ]. **Analytica Chimica Acta**, 2008, 630( 1 ): 82.
- [ 38 ] Jeon M, Paeng I R. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay [ J ]. **Analytica Chimica Acta**, 2008, 626 ( 2 ): 180.

( 责任编辑: 朱明 )