

# 保健食品中西地那非检测方法的研究进展

李萍, 杨金易, 张燕, 曾道平, 孙远明\*

(华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室,  
农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 广州 510642)

**摘要:** 枸橼酸西地那非作为一种特异性磷酸二酯酶 5 型抑制剂, 常被非法应用于保健食品中。由于西地那非毒副作用大及滥用问题突出, 研究其检测方法十分必要。目前已报道的西地那非检测的方法主要有分光光度法、色谱法、光谱法、毛细管电泳以及免疫分析法, 但这些方法各有利弊。本文针对当前保健食品中西地那非检测方法作了综述, 以期为该类食品的安全检测提供方法学思路。

**关键词:** 西地那非; 检测; 保健食品

## Research progress on detection of sildenafil in health care food

LI Ping, YANG Jin-Yi, ZHANG Yan, ZENG Dao-Ping, SUN Yuan-Ming\*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment in Agricultural Products Preservation of the Ministry of Agriculture, College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

**ABSTRACT:** Sildenafil citrate is now illegally used in some health care foods as a specific phosphodiesterase type 5 (PDE) inhibitor. Because of its side effects and abuse in drug market, the detection of sildenafil in such foods has become a focus. The detection methods of sildenafil that have been reported basically include spectrophotometry, chromatography, spectrometry, capillary electrophoresis and immunoassay methods. Each method has its own advantages and disadvantages. Herein we present a summary of the research progress on detection of sildenafil in health care food.

**KEY WORDS:** sildenafil; detection; health care food

枸橼酸西地那非(sildenafil citrate)<sup>[1]</sup>, 简称西地那非, 属于特异性环磷酸鸟苷(cGMP)磷酸二酯酶 5 型(PDE5)口服制剂, 是万艾可(又称伟哥, 英文名 Viagra)的主要活性药物成分。其药理作用是通过抑制第二信使 cGMP 的代谢, 促进海绵体动脉平滑肌舒张, 进而改善勃起功能障碍(ED)症状<sup>[2-3]</sup>。目前该药是国家药品监督管理局批准上市的治疗男性性功能障碍的药品, 属于二类精神药管理范围, 已知其主要副作用有面部潮红、头晕、头痛、鼻塞和视觉异常等<sup>[4]</sup>, 严重的会导致死亡, 因此不得在药店零售。目前一些

不法厂家为了在短时间内起效, 经常在所谓“抗疲劳”类保健品中随意添加西地那非药物。因此, 对于保健食品中西地那非检测方法的研究显得尤为重要。

目前, 世界各国都还没有制定西地那非的最高限量标准, 国内外报道中西地那非药物残留检测的主要方法有以下几种。

### 1 分光光度法

分光光度法因具有灵敏度高、操作简单、所需试剂简单、成本低等优点, 在药物分析中应用广泛<sup>[5-6]</sup>。

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003008)、广东省重大科技专项(2010A080403005)、广东省教育部产学研结合项目(2010A090200084)、省部产学研结合项目(2011A090200029)

\*通讯作者: 孙远明, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 食品安全、食品营养。E-mail: ymsun@scau.edu.cn

Dinesh<sup>[7]</sup>首次建立了两种检测西地那非纯药物以及药制剂的分光光度法。方法 A 在最大吸收波长在 415 nm 处, 枸橼酸西地那非浓度在 1.25~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内与吸光度线性关系良好( $r=0.9992$ ), 检出限为 0.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。方法 B 在最大吸收波长 460 nm 处, 枸橼酸西地那非浓度在 1.5~60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内与吸光度线性关系良好( $r=0.9996$ ), 检出限为 0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

秦宗会<sup>[8]</sup>建立了测定西地那非的依文思蓝褪色光度法以及乙基曙红光度法, 这两种方法的原理是在酸性介质中, 利用西地那非与依文思蓝、乙基曙红反应, 形成离子络合物, 产生最大褪色作用。依文思蓝褪色光度法的最大褪色波长位于 620 nm, 褪色程度与西地那非浓度在  $0\sim 1.5\times 10^{-5}$  mol/L 呈线性关系, 表观摩尔吸光系数  $\epsilon_{620}$  为  $3.20\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , 检出限为  $6.2\times 10^{-7}$  mol/L。乙基曙红光度法在最大褪色波长 520 nm 处, 褪色程度与西地那非浓度在  $0.2\sim 2.0\times 10^{-5}$  mol/L 范围内呈线性关系, 表观摩尔吸光系数  $\epsilon_{520}$  为  $2.44\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , 检出限为  $9.3\times 10^{-7}$  mol/L。

利用西地那非与染料显色反应的光度法, 操作简便, 体系稳定, 灵敏度较高, 选择性好, 但由于吸收光谱的特征性不强, 对于结构相似的物质难以鉴别, 因此不适用于成分复杂的枸橼酸西地那非片中西地那非的含量测定。

## 2 色谱技术

色谱技术广泛应用于多组分混合物的分离和分析, 特别适合有机化合物的定量分析, 因此该方法非常适用于食品中的药物残留检测<sup>[9]</sup>。目前常用于保健食品中西地那非的色谱检测方法主要有以下几种。

### 2.1 薄层色谱法(TLC)

薄层色谱最早主要应用于药物制品的检测, 自 1979 年 Armstrong 等开创胶束薄层色谱以来, 由于其特殊的选择性、无毒、价廉等优点而获得较大发展。该方法简便、快速、可靠、专属性强, 在药物分析中得到广泛应用<sup>[10-11]</sup>。

庞小雄等<sup>[12]</sup>在参照国家标准的前提下, 选用硅胶作吸附剂, 将中药或保健食品中西地那非经水溶出后, 利用西地那非的碱性特点, 先用酸碱处理, 最大限度地除去中药成分的干扰, 在硅胶薄层板上层析分离, 然后用碘化铋钾显色, 实验表明 10 种供

试品溶液与对照品溶液所显示主斑点的颜色和位置一致。

TLC 法具有简便快速等优点, 但也存在缺陷, 其分离时间较长, 必须使用可透紫外的管材, 灵敏度较低, 不够准确, 重复使用性差。

### 2.2 高压液相色谱法(HPLC)

高压液相色谱法具有灵敏度较高、检测速度快、重复性好、适用范围广等优点, 是目前检测保健品中西地那非及其类似物的常用方法<sup>[13-14]</sup>。

DaraghmeH 等<sup>[15]</sup>在分析片剂产品中非法添加的西地那非及相关物质的研究中, 采用  $\text{C}_{18}$  色谱柱(3.9 mm $\times$ 300 mm, 10  $\mu\text{m}$ ), 流动相为 0.2 mol/L 乙酸铵: 乙腈(1: 1), 流速 1 mL/min, 紫外检测器 240 nm 处进行测定。结果表明西地那非浓度在 2~17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内呈良好的线性关系, 平均回收率 100.4%。

HPLC 具有高速、高效分离能力和很高的灵敏度, 但仅显示色谱峰和保留时间, 不能提供被测组分的结构信息或对未知分离物作结构鉴定, 不足以对被测组分做出定性判断, 并且检出限较高。

### 2.3 液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)

液质联用技术(LC-MS)将分离、结构鉴定和定量一次完成, 分析过程比较简便, 检出限更低, 结果精确可靠, 灵敏度高, 特别适合复杂混合物中痕量药残组分确证分析<sup>[16]</sup>。

杜书君等<sup>[17]</sup>建立液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)对中药制剂中的西地那非进行定性和定量研究, 采用  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为 0.01 mol/L, 乙酸铵: 乙腈: 甲醇(55: 10: 35), 流速 0.2 mL/min。样品在三重四级杆串联质谱中经 ESI 源离子化后以 Full Scan, SIR, Daughter 等方式进行测定。结果表明西地那非浓度在 1~5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内呈良好的线性关系, 三个浓度的平均回收率分别为 103%, 105%, 98%。

我国现行的进出口行业标准 SN/T 1951-2007 采用液相色谱-质谱/质谱测定西地那非<sup>[5]</sup>, 方法已趋于成熟, 它具有很强的确证和检测能力, 用该方法检测片剂和胶囊样品的检测限为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 检测口服溶液剂样品的检测限为 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 但存在仪器昂贵、操作复杂等问题, 限制了此方法的推广。

### 3 光谱法

#### 3.1 近红外光谱法(NIR)

近红外光谱分析技术由于具有操作简便、分析速度快、不损伤样品等特点,已经逐渐成为分析领域的热点技术,近年来在药物分析领域被广泛应用<sup>[18-19]</sup>。

王学良等<sup>[20]</sup>利用近红外特征谱段相关系数法对中药胶囊中是否添加枸橼酸西地那非进行快速定性分析。分别使用近红外光谱仪的积分球和光纤附件测定光谱,以枸橼酸西地那非化学对照品的近红外光谱为参照光谱,选择特定谱段,根据枸橼酸西地那非被掺入胶囊中的最小起效浓度建立待测样品光谱与参照光谱在该谱段的相似系数阈值,定性判断待测样品是否含有枸橼酸西地那非。通过用含有西地那非的市售样品进行验证,证明此方法具有较好的预测能力,可作为市场上该种非法添加药物的快速有效检查手段。

近红外光谱法是一种快速筛查保健食品中非法添加西地那非的方法,但一般只用于定性,若用于定量则误差较大。

#### 3.2 核磁共振(NMR)

由于核磁共振技术在有机化合物分子结构解析方面的优势,因此其在药物质量控制领域中也得到了极大的应用。核磁共振技术的测定过程简单、分析快速,可以进行定性和定量分析,在药物的质量控制如组分鉴定、杂质鉴定、药物含量分析等项目中应用日趋广泛<sup>[21-22]</sup>。

Wawer等<sup>[23]</sup>通过采集<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N核磁共振谱图数据,从而对西地那非进行鉴定以及结构表征,结果显示固相<sup>13</sup>C NMR方法能够准确快速对含有西地那非的商品及药剂进行定性定量检测。

核磁共振法以其重现性好、特征性强等优点已成为药物研究的重要手段。由于核磁共振具有指纹图谱特点,已建立的中成药核磁共振指纹图谱鉴定分析法为药物的分析鉴别和质量控制带来了快速、有效、可靠的途径。

### 4 毛细管电泳(CE)

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)具有灵敏度高、柱效高、分析速度快、进样量少、溶剂消耗少、应用面广等特点,已成为药物分析方法研究的热点之一<sup>[24]</sup>。

Qin等<sup>[25]</sup>通过固相萃取和毛细管电泳-质谱联用技术,检测人血清中的西地那非及其代谢物UK-103, 320(UK)。药物的分离时间小于14 min,西地那非及UK的检出限分别为14 ng/mL和17 ng/mL,两者浓度分别在50~600 ng/mL和40~400 ng/mL范围内呈良好的线性关系。

毛细管电泳常用的紫外检测器由于受到光路较短的影响,灵敏度略显不足,而且只靠保留时间定性,选择性不高。而毛细管电泳-质谱联用技术可同时得到迁移时间、相对分子质量和碎片特征信息,提高了检测的灵敏度和选择性。

### 5 免疫分析法

免疫检测技术是将免疫反应和现代测试手段相结合而建立的超微量测定技术。免疫分析法<sup>[26]</sup>就是基于抗原、抗体的特异性识别和结合反应为基础的分析方法,它具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、分析容量大、检测成本低、安全可靠等优点。目前,应用到药物安全检测领域的免疫分析方法包括有传统的放射免疫分析、酶联免疫分析、荧光免疫分析、发光免疫分析、免疫传感器技术等,还出现了新型的免疫分析方法如分子印迹技术、流动注射免疫分析、免疫PCR技术及多组分免疫分析等新方法。免疫分析技术以其独特的优势处于药物安全检测的前沿,也将成为药物分析新的发展趋势<sup>[27,28]</sup>。

Song等<sup>[29]</sup>通过获得西地那非的多克隆抗体,建立了一种快速免疫检测分析方法,通过对酶联免疫反应不同反应条件的优化,经优化后的直接竞争酶联免疫方法的IC<sub>50</sub>为6±0.1 ng/mL,检测限为0.6±0.02 ng/mL,回收率在70%~120%。在消除基质影响的研究中,样品经过水和甲醇混合溶液提取后,直接用PBS稀释10倍后即可消除基质影响。

免疫学药物残留分析中的重要技术点是半抗原的合成、有效抗体的制备及其与免疫分析技术的结合。免疫学检测方法对样品纯度要求不高,样品通量大,在药物安全检测方面将得到更广泛的应用。

### 6 结束语

综上所述,薄层色谱法、光谱法常用于定性检测保健食品中的西地那非;分光光度法主要用于成分

简单的枸橼酸西地那非片中西地那非的含量测定,其最低检测限为 0.16  $\mu\text{g/mL}$ , 达不到我国行业标准的检测限; HPLC-MS-MS、CE 等仪器方法检测限分别可以达到 0.01  $\mu\text{g/mL}$ 、0.014  $\mu\text{g/mL}$ , 虽然准确性高, 但前处理复杂, 成本昂贵; 与 HPLC 法相比, 毛细管电泳方法不仅能达到较低的检测限, 而且样品处理简单, 检测时间短, 成本低, 因此可以作为测定西地那非的一种准确简便的方法。

随着保健食品中的西地那非残留检测研究的日趋深入, 以后的检测会逐渐转向现场监控和基层实际检测, 免疫快速检测方法以其灵敏度高、成本低、快速等优势正成为检测保健品中西地那非药物的新方法。已建立的一种快速免疫检测分析方法可以达到的检测限为  $0.6 \pm 0.02 \text{ ng/mL}$ , 完全可以满足对市场上保健食品中西地那非的检测。

#### 参考文献

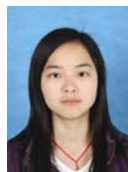
- [1] 国家药典会编.《国家药品标准》(第一册)[S]. 2002: 9.
- [2] Behr-Roussel D, Oudot A, Caisey S, *et al.* Daily treatment with sildenafil reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in an animal model of insulin resistance [J]. *Eur Urol*, 2008, (6): 1272–1281.
- [3] Fleshner N, Harvey M, Adomat H, *et al.* Evidence for contamination of herbal erectile dysfunction products with phosphodiesterase type-5 inhibitors [J]. *Urology*, 2005, 174(2): 636.
- [4] McCulley TJ, Luu JK, Marmor MF, *et al.* Effects of sildenafil citrate (Viagra) on choroidal congestion [J]. *Ophthalmologica*, 2002, 216 (6): 455–458.
- [5] Vidya Sagar G, Sastry BS, Gangadhara Rao NVS. Spectrophotometry methods of the determination of sildenafil in tablets [J]. *Chem Sci*, 2003, 1(3): 221–224.
- [6] 江虹, 湛海胤, 吴兴发. 亚甲基蓝光度法测定西地那非的含量[J]. *分析科学学报*, 2004, 20(3): 287–289.
- [7] Dinesh ND, Nagaraja P, Made Gowda NM, *et al.* Extractive spectrophotometric methods for the assay of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations [J]. *Talanta*, 2002, 57, 757–764.
- [8] 秦宗会, 谭蓉. 乙基曙红光度法测定西地那非的含量[J]. *分析科学学报*, 2004, 20(2): 176–177.
- [9] 何琳, 王凌. 色谱技术在检测中成药和保健食品中非法添加化学物质的应用研究进展[J]. *安徽医药*, 2011, 15(10): 1306–1309.
- [10] Kaale E, Risha P, Layloff T. TLC for pharmaceutical analysis in resource limited countries [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1218: 2732–2736.
- [11] 吕长淮. 反相薄层色谱法在药物分析中的应用研究进展[J]. *安徽医药*, 2008, 12(9): 854–855.
- [12] 庞小雄, 吕华冲. 中成药及中药保健品中添加西地那非的快速检测方法[J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(8): 673–674.
- [13] Zou P, Oh SSY, 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]. *J Chromatogr A*, 2006, 1104(1–2): 113.
- [14] Guermouche MH, Bensalah K. Solid phase extraction and liquid chromatographic determination of sildenafil and N-demethyl sildenafil in rat serum with basic mobile phase [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(4): 952.
- [15] Daraghme N, Al-Omari M, Badwan AA, *et al.* Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 25, 483–492.
- [16] Kim J, Ji HY, Kim SJ, *et al.* Simultaneous determination of sildenafil and its active metabolite UK-103, 320 in human plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 32(2): 317.
- [17] 杜书君, 唐斌斌, 高海. 液相色谱-串联质谱法对中药制剂中西地那非的测定[J]. *中国执业药师*, 2010, (9): 36–38.
- [18] Chu XL, Xu YP, Lu WZ. Research and application progress of chemometrics methods in near infrared spectroscopic analysis [J]. *Chin J Anal Chem*, 2008, 36(5): 702–709.
- [19] Luypaert J, Massart DL, Vander-Heyden Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis [J]. *Talanta*, 2007, 72(3): 865–883.
- [20] 王学良, 冯艳春. 近红外特征谱段相关系数法测定中药胶囊中添加枸橼酸西地那非[J]. *分析化学研究简报*, 2009, 37(12): 1825–1828.
- [21] Lianga YZ, Xieb P, Chanc K. Quality control of herbal medicines [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 812: 53–70.
- [22] 陈合兵. 核磁共振技术在药物定量分析和结构鉴定中的应用[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [23] Wawer I, Pisklak M.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38: 865–870.
- [24] Hoff R, Kist TB. Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(5): 854–866.

- [25] Qin WD, Li SFY. An ionic liquid coating for determination of sildenafil and UK-103,320 in human serum by capillary zone electrophoresis-ion trap mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2002, 23, 4110–4116.
- [26] 焦奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [27] 赵津子, 郑礼. 药物残留免疫分析新进展[J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(2): 85–88.
- [28] Jeon M, Paeng IR. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 626 (2): 180.
- [29] Song Y, Wang YY, Zhang Y, *et al.* Development of enzyme-linked assay for rapid determination of sildenafil in

adulterated functional foods [J]. *Food Agr Immunol*, 2011: 1–14.

(责任编辑: 张宏梁)

### 作者简介



李萍, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量安全。

E-mail: sweetgirl1216@163.com



孙远明, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 食品安全、食品营养。

E-mail: ymsun@scau.edu.cn