



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107163052 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710253371.4

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2017.04.18

G01N 33/535(2006.01)

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483号

(72)发明人 沈玉栋 华彦涛 徐振林 杨金易  
王弘 孙远明 雷红涛

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102

代理人 任重

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

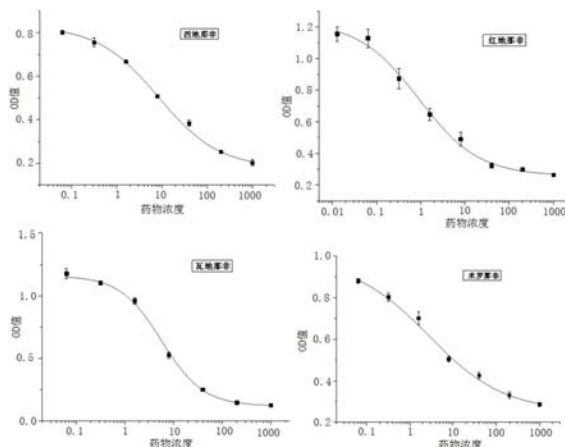
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

## (54)发明名称

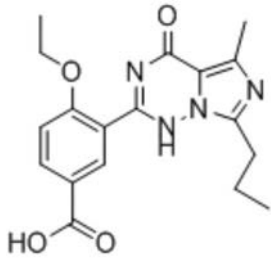
一种针对多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法

## (57)摘要

本发明公开了一种针对多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法。首先合成了一种新型的小分子结构,以其为半抗原制备免疫原和包被原,从而制备抗体,构建针对多种PDE-5抑制剂类药物的免疫检测方法。本发明的抗体及免疫检测方法可用于检测多种PDE-5抑制剂类药物,首次实现同时对保健食品等样品中多种PDE-5抑制剂药物残留检测,且抗体效价可达1:500000,对西地那非、瓦地那非、红地那非、米罗那非等PDE-5抑制剂类药物及其类似物的检测特异性高、灵敏度高、准确度高,而且,检测快速,从而用于快速检测食品中残留的PDE-5抑制剂,具有广阔的应用前景。



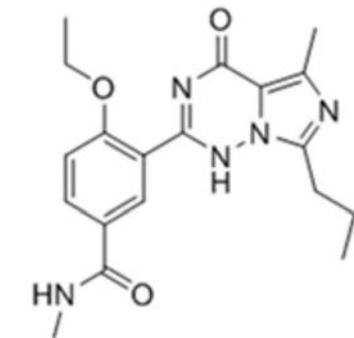
1. 一种可用于制备多种PDE-5抑制剂药物的检测试剂的小分子化合物,其特征在于,其结构式如式(I)所示:



式 (I) 。

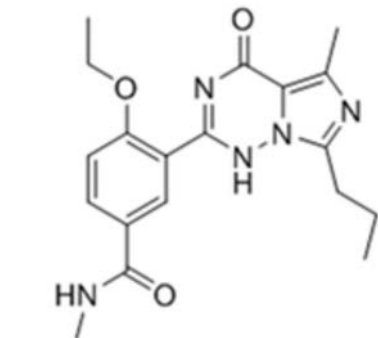
2. 权利要求1所述小分子化合物在检测多种PDE-5抑制剂药物方面的应用,或在制备检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原和/或抗体制剂方面的应用。

3. 一种用于检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原,其特征在于,其结构式如式(II)所示:



载体蛋白 (II) 。

4. 一种用于检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原,其特征在于,其结构式如式(III)所示:



载体蛋白 (III) 。

5. 根据权利要求3或4所述的人工抗原,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或人血蓝蛋白。

6. 权利要求3或4所述人工抗原在检测多种PDE-5抑制剂药物方面的应用,或在制备检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原和/或抗体制剂方面的应用。

7. 一种用于检测多种PDE-5抑制剂药物的抗体,其特征在于,以权利要求3所述的人工抗原为免疫原制备得到。

8. 权利要求7所述抗体在检测多种PDE-5抑制剂药物方面的应用,或在制备检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原和/或抗体制剂方面的应用。

9. 一种检测多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 将式(II)所示的人工抗原作为免疫原免疫动物制备抗体,并与标记酶结合制备得到酶标抗体;

S2. 将式(III)所示的人工抗原作为包被原包被在微孔板上;采用间接竞争酶联免疫法测定样品中多种PDE-5抑制剂药物的含量。

10. 权利要求9所述免疫检测方法在检测样品中多种PDE-5抑制剂药物含量方面的应用。

## 一种针对多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域。更具体地,涉及一种针对多种PDE-5抑制剂药物(包括西地那非、瓦地那非、红地那非、米罗那非及其结构类似物)的免疫检测方法。

### 背景技术

[0002] 西地那非、瓦地那非、红地那非、米罗那非等药物为PDE-5抑制剂,用于治疗男性勃起功能障碍,属于处方药。然而,一些保健食品生产企业为突出产品的功效,违法在保健食品中添加化学药物,如在抗疲劳产品中非法添加枸橼酸西地那非、他达拉非、瓦地那非、红地那非等,对消费者身体健康构成严重威胁。目前市场许多声称具有补肾壮阳类、抗疲劳类、增强免疫力等作用的保健食品,违法添加了化学药品的现象可谓是触目惊心。添加的成分主要为:西地那非、他达拉非、瓦地那非,红地那非等。2016年5月国家食药监通报,补酒中查出西地那非,多家企业被查;2012年山西药监局公布的10种禁售保健食品中,7种含有PDE-5抑制剂,分别为西地那非,瓦地那非等;与此同时,北京、江苏无锡、安徽铜陵、江苏南通、南京、重庆、湖南衡阳等地的食品药品监督部门在当地的补肾、壮阳、抗疲劳保健食品抽检中均检出西地那非等PDE-5抑制剂;不仅如此,还有一些尚未被批准的西地那非的结构类似物被非法添加在保健食品、能量饮料、中草药中。2016年5月,食药监总局发布通告:明确禁止食品或保健食品添加西地那非等药物

[0003] 在不知情的情况下服用了添加PDE-5抑制剂类药物的保健食品极易引发毒副作用,会出现头晕、昏晕、甚至青光眼,造成对肾功能、心脏功能、心血管疾病的严重损害。长期服用,还会导致食用者勃起不倒,伤及阴部肌肉组织,甚至加重阳痿,甚至变为永久性阳痿。因此针对多种PDE-5抑制剂残留问题,建立一种快速、有效的检测方法显得尤为重要。

[0004] PDE-5抑制剂类药物的检测最常使用的方法为仪器分析法,Hasegawa等利用LC-MS测定了保健食品中他达拉非、西地那非、伐地那非的含量。国内进出口行业标准(SNT4054-2014)中已把HPLC-MS法作为进出口保健食品中西地那非、他达拉非、伐地那非的检测方法之一。该方法在片剂、胶囊剂中对三者的测定低限为1.0mg/kg,回收率在90~105%之间;口服溶液剂中对三者的测定低限为0.01mg/L,回收率在94.5~108%之间。虽然上述几种仪器分析法的检测精确度高,但因其仪器化程度高、检测时间长、过程繁琐、检测费用昂贵,因而通常作为实验室确证方法,无法满足现场或者大批量的快速筛查检测。而免疫分析法因成本低、操作简单、速度快、一次检测样本量大、仪器化程度低,成为常用的筛选方法,现有技术中缺乏一种抗体同时检测多种PDE-5抑制剂药物的免疫方法。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服上述现有技术中多种PDE-5抑制剂药物检测技术的缺陷和不足,提供一种针对多种PDE-5药物(包括西地那非、瓦地那非、红地那非、米罗那非及其结构类似物)的半抗原、人工抗原、抗体,从而构建了一种针对多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法。

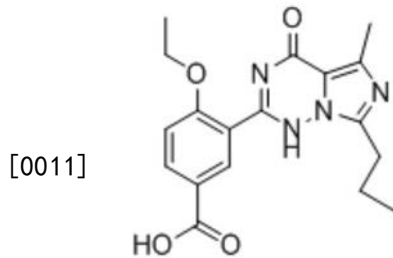
[0006] 本发明的目的是提供一种针对多种PDE-5药物的半抗原、人工抗原、抗体。

[0007] 本发明另一目的是提供所述半抗原、人工抗原和抗体的应用。

[0008] 本发明的再一目的是提供一种直接检测多种PDE-5抑制剂药物的免疫分析方法。

[0009] 本发明上述目的通过以下技术方案实现：

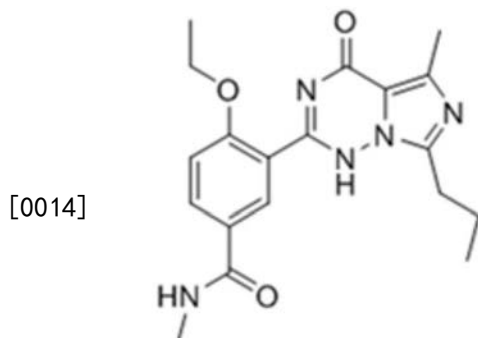
[0010] 一种可用于制备多种PDE-5抑制剂药物的检测试剂的小分子化合物，其结构式如式(I)所示：



式 (I) 。

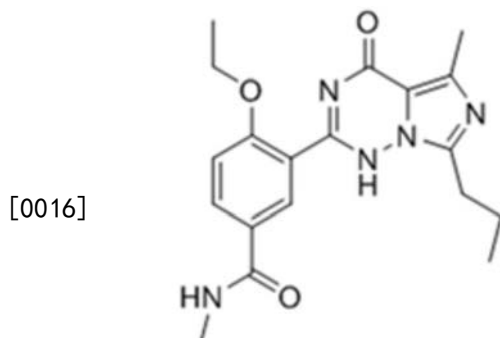
[0012] 式(I)所示小分子化合物在检测多种PDE-5抑制剂药物方面的应用，或在制备检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原和/或抗体等检测试剂方面的应用，也在本发明的保护范围之内。

[0013] 一种用于检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原，其结构式如式(II)所示：



载体蛋白 (II) 。

[0015] 一种用于检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原，其结构式如式(III)所示：



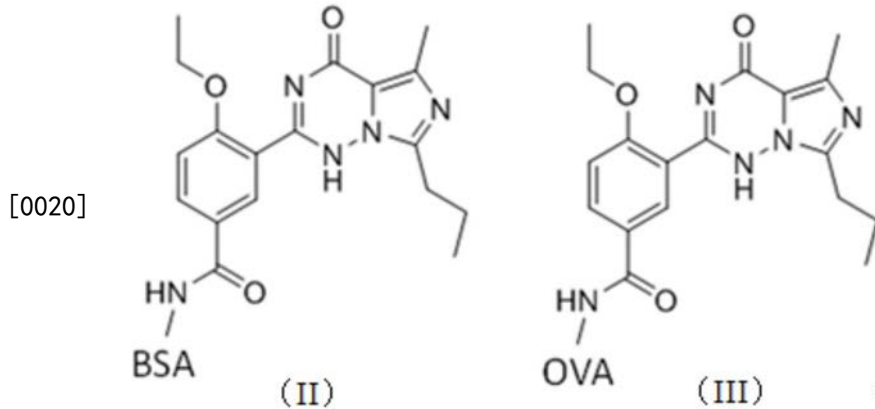
载体蛋白 (III) 。

[0017] 优选地，所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或人血蓝蛋白。

[0018] 更优选地，所述载体蛋白为牛血清蛋白或卵血清蛋白。

[0019] 具体优选地，式(II)所述结构作为免疫原，载体蛋白为牛血清蛋白(BSA)，式(III)

所示结构作为包被原,载体蛋白为蛋清蛋白(OVA)。



[0021] 上述人工抗原在检测多种PDE-5抑制剂药物方面的应用,或在制备检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原和/或抗体等检测制剂方面的应用,也都在本发明的保护范围之内。

[0022] 作为一种可选择的实施方案,利用式(I)结构制备式(II)和式(III)所示人工抗原的方法可采用活泼酯法:将所述的Norneovardenafil半抗原溶于DMF中,搅拌加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐,然后再加入载体蛋白,4℃下搅拌反应过夜;偶联混合物于4℃下生理盐水透析2天得到目标产物;所述半抗原与载体蛋白的摩尔比为100~60:1。

[0023] 具体地,所述活泼酯法制备人工抗原包括如下步骤:

[0024] (1)将5mg的式(I)所示的Norneovardenafil半抗原溶解于0.3mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF);

[0025] (2)在步骤(1)得到的溶液中分别加入1.5倍于Norneovardenafil半抗原摩尔质量的DCC(N,N-二环己基碳二亚胺)和NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),室温避光反应过夜;

[0026] (3)将载体蛋白(12.3mg BSA、10mg OVA)分别溶于6mL的0.01M PBS缓冲液中,再加入步骤(1)得到的溶液,并于4℃反应过夜。

[0027] 其中,优选地,所述PBS缓冲液的pH值为7.4~8.0。

[0028] 一种以式(II)所示的人工抗原为免疫原制备得到用于检测多种PDE-5抑制剂药物的抗体(包括单克隆抗体、多克隆抗体或基因工程抗体),以及该抗体在检测多种PDE-5抑制剂药物方面的应用,或在制备检测多种PDE-5抑制剂药物的人工抗原和/或抗体等检测制剂方面的应用,也都在本发明的保护范围之内。

[0029] 一种检测多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法,包括以下步骤:

[0030] S1.将式(II)所示的人工抗原作为免疫原免疫动物制备抗体,并与标记酶结合制备得到酶标抗体;

[0031] S2.将式(III)所示的人工抗原作为包被原包被在微孔板上;采用间接竞争酶联免疫法测定样品中多种PDE-5抑制剂药物的含量。

[0032] 具体是:包括以下步骤:

[0033] S1.将式(II)所示的Norneovardenafil人工抗原免疫动物制备多克隆抗体,并与标记酶结合制备得到酶标抗体;

[0034] S2.将式(III)所示的Norneovardenafil人工抗原作为包被原包被在微孔板上,将步骤S1制备得到多克隆抗体加入微孔板中;

- [0035] S3. 加入待测样品,采用间接竞争ELISA测定待测样品中PDE-5抑制剂的含量。
- [0036] 另外,所述免疫检测方法在检测样品中多种PDE-5抑制剂药物含量方面的应用,也在本发明的保护范围之内。
- [0037] 优选地,所述样品为保健食品或保健药品。
- [0038] 优选地,上文所述多种PDE-5抑制剂药物为瓦地那非、西地那非、红地那非、米罗那非及其结构类似物。
- [0039] 本发明具有以下有益效果:
- [0040] 本发明首先通过分析几种PDE-5抑制剂药物空间结构,合成了一种新型的小分子化合物作为半抗原用于制备人工抗原,与现有技术相比,本发明的抗原进行动物免疫后得到更优质、高效、广谱性的抗体。
- [0041] 利用本发明的人工抗原免疫动物得到的抗体用于检测PDE-5抑制剂类药物,首次实现同时对保健食品等样品中多种PDE-5抑制剂药物残留检测,且抗体效价可达1:500000,对西地那非的最大检测范围为0.97~70.72ng/mL,IC<sub>50</sub>为8.32ng/ml;对瓦地那非的最大检测范围为1.45~22.72ng/ml,IC<sub>50</sub>为5.70ng/ml;对红地那非的最大检测范围为0.74~27.68ng/ml,IC<sub>50</sub>为4.54ng/ml;对米罗那非的最大检测范围为0.20~22.8ng/ml,IC<sub>50</sub>为2.16ng/ml。
- [0042] 所述抗体具有特异性高、灵敏度好、准确度高等显著优点,因此本发明提供的抗原和抗体,可用于建立针对多种PDE-5抑制剂药物的酶联免疫吸附分析技术,检测快速、大大缩短了检测时间,且实现多残留的检测,检出限更低、灵敏度更,从而用于快速检测食品中残留的PDE-5抑制剂,具有广阔的应用前景。

## 附图说明

- [0043] 图1为Norveardenafil免疫抗原、载体蛋白紫外扫描图。
- [0044] 图2为半抗原所制备抗体对多种PDE-5抑制剂药物的抑制曲线。

## 具体实施方式

- [0045] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。
- [0046] 除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。
- [0047] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。
- [0048] 实施例1免疫原/包被原的制备
- [0049] 1、本发明通过分析几种PDE-5抑制剂药物空间结构,合成了一种新型的小分子化合物,如式(I)所示,可作为半抗原用于制备人工抗原、抗体用于检测多种PDE-5抑制剂药物。



[0060] 间接竞争ELISA测定抗体阳性滴度以2.1倍于阴性血的测定值为准,结果表明半抗原对应的抗血清效价为1:500000。

[0061] 实施例3抗体的特异性及灵敏度

[0062] 1、依据如上效果,使用抗血清绘制酶联免疫分析(ELISA)标准曲线;使用磷酸吐温缓冲液(PBST,0.1mol/L,pH=7.4)作为所有样品的稀释液;将50 $\mu$ L系列浓度的药物标准品和50 $\mu$ L适当稀释倍数的多特异性抗体加入96孔酶标板中,竞争反应后通过酶标分析仪测定吸光值(OD)。以OD值为纵坐标,相应的标准品浓度对数值为横坐标,应用origin9.1软件四参数对函数进行曲线拟合: $y = (A-D) / [1 + (X/C)^B] + D$

[0063] 其中,A和D分别代表药物浓度最小和最大的吸光值(OD),C为中点浓度,当标准品浓度等于C时的OD值为(A+D)/2,正处于曲线的拐点处,半数抑制量浓度为IC<sub>50</sub>,B表示曲线的陡峭程度,称斜率因子;以IC<sub>10</sub>为检测限,以IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub>为检测范围。建立ELISA的标准曲线,结果如图2,相关标准曲线参数见表1。

[0064] 结合附图及附表可知,以几种PDE-5抑制剂药物为标准品建立的标准曲线具备典型的S型曲线,检测灵敏度好。由于该抗体能直接识别多种PDE-5抑制剂药物,因此该方法可以直接测食品中的PDE-5抑制剂药物的含量。

[0065] 表1抗血清对几种PDE-5抑制剂药物的检测参数

[0066]

药物	线性范围 (ng/mL)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	相关系数 R <sup>2</sup>
西地那非	0.97 ~70.72	8.32	0.9961
红地那非	0.74~27.68	4.54	0.9912
瓦地那非	1.45~22.72	5.7	0.9991
米罗那非	0.20~22.8	2.16	0.9944

[0067] 2、另外,抗体对PDE-5抑制剂类药物类似物的检测结果如表2所示,制备的多克隆抗体对主要使用的几种PDE-5抑制剂的结构与功能类似物均有识别,并能直接检测其含量。

[0068] 表2抗体对主要使用的PDE-5抑制剂类药物的结构与功能类似物检测参数

	药物	IC <sub>50</sub> ( ng/ml )	药物	IC <sub>50</sub> ( ng/ml )
	硫代豪莫西地那非 (thiohomo sildenafil)	10.25	羟基豪莫西地那非 (Hydroxyhomo Sildenafil)	15.23
	羟基-红地那非	3.49	那瓦地那非 (Norneo Vardenafil)	0.32
[0069]	苯噻啉红地那非 (piperacetildenafil) (那红地那非) Nor-acetildenafil	8.21	N-脱乙基瓦地那非 (N-Desethyl-Vardenfil)	1.62
	乌地那非	3.08	硫代艾力那非 (thiosildenafil)	19.94
	N-去甲基西地那非	3.63	豪莫西地那非 (Homo Sildenafil)	6.35
		9.45	(艾力那非) (aildenfil)	6.05

[0070] 因此,本发明构建了一种检测多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0071] (1) 将式(II)所示的Norneovardenafil人工抗原作为免疫原免疫动物制备Norneovardenafil抗体,并与标记酶结合制备得到酶标抗体;

[0072] (2) 将式(III)所示的Norneovardenafil人工抗原作为包被原包被在微孔板上;采用间接竞争酶联免疫法测定样品中多种PDE-5抑制剂药物的含量。

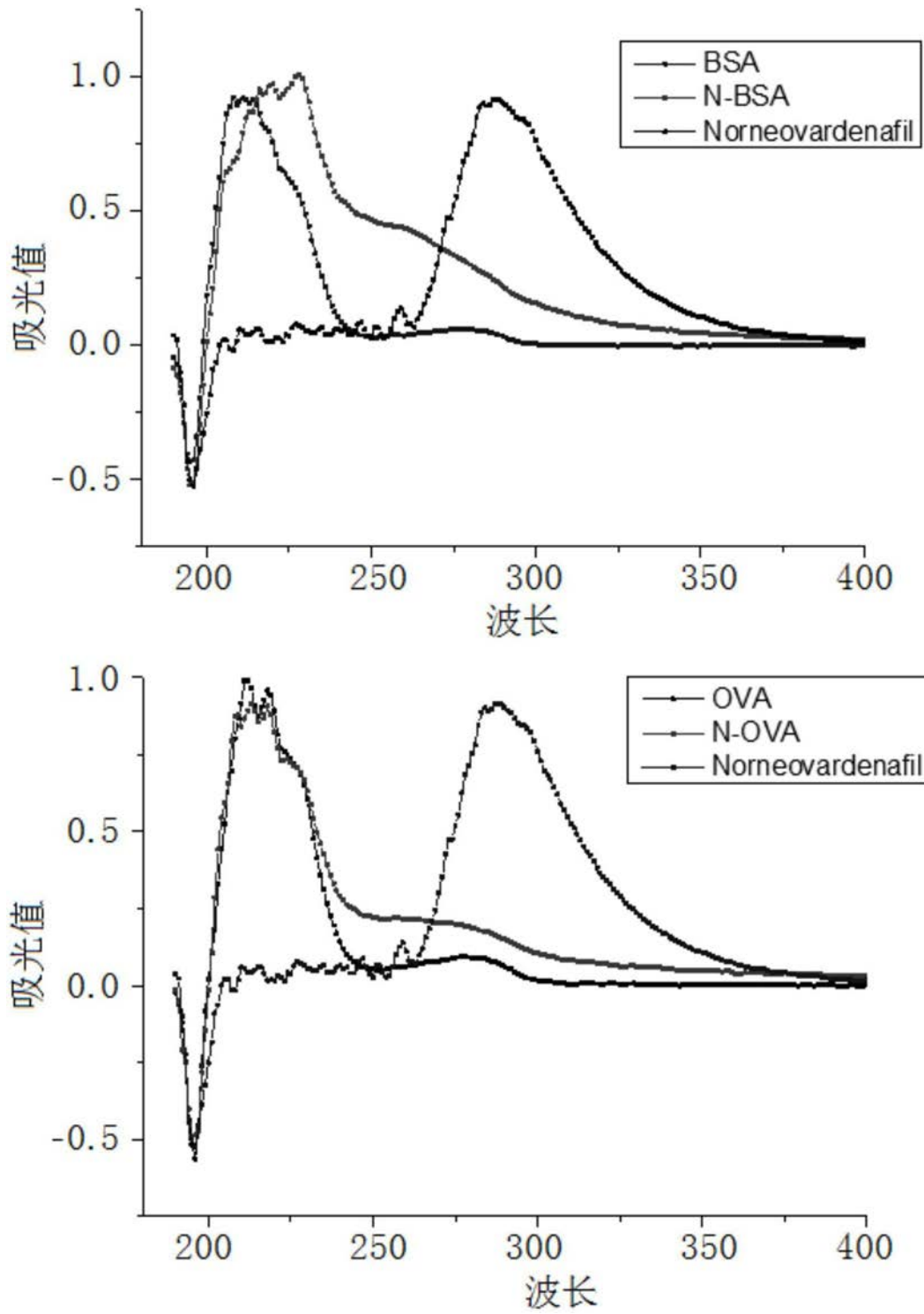


图1

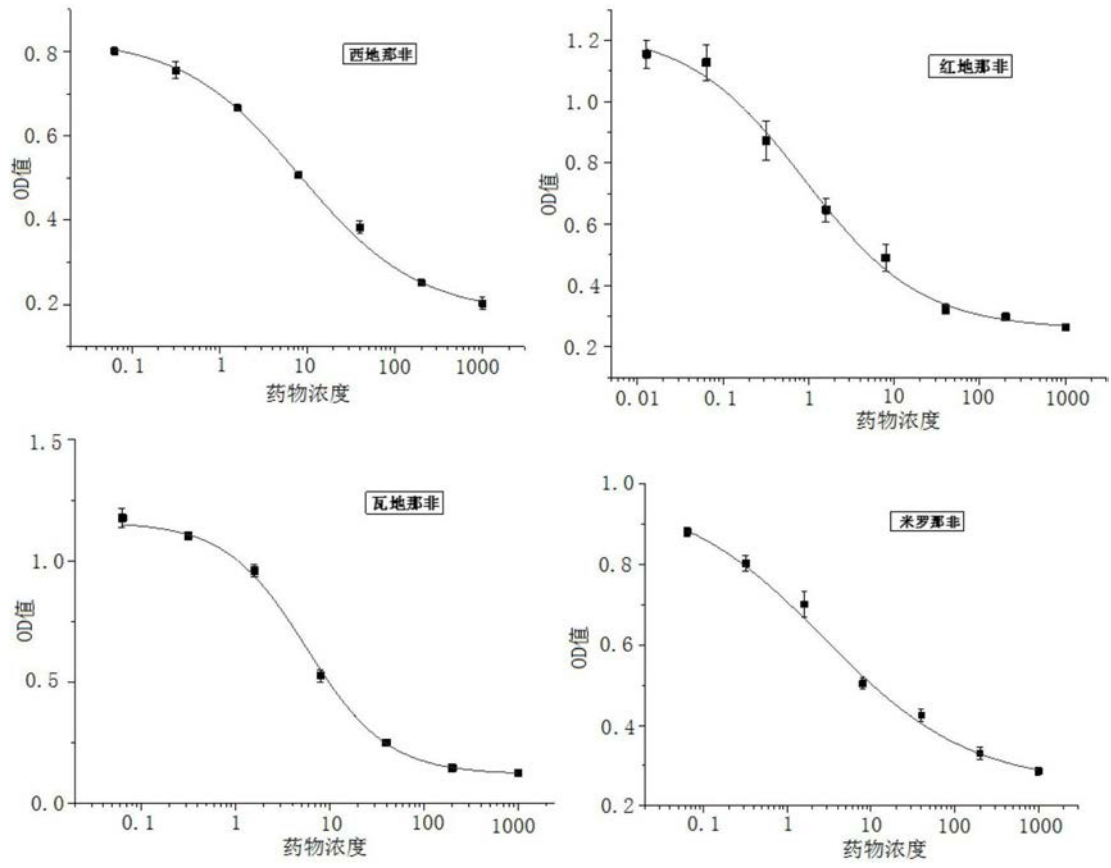


图2

专利名称(译)	一种针对多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107163052A</a>	公开(公告)日	2017-09-15
申请号	CN201710253371.4	申请日	2017-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	沈玉栋 华彦涛 徐振林 杨金易 王弘 孙远明 雷红涛		
发明人	沈玉栋 华彦涛 徐振林 杨金易 王弘 孙远明 雷红涛		
IPC分类号	C07D487/04 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/535		
CPC分类号	C07D487/04 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/535		
代理人(译)	任重		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种针对多种PDE-5抑制剂药物的免疫检测方法。首先合成了一种新型的小分子结构，以其为半抗原制备免疫原和包被原，从而制备抗体，构建针对多种PDE-5抑制剂类药物的免疫检测方法。本发明的抗体及免疫检测方法可用于检测多种PDE-5抑制剂类药物，首次实现同时对保健食品等样品中多种PDE-5抑制剂药物残留检测，且抗体效价可达1:500000，对西地那非、瓦地那非、红地那非、米罗那非等PDE-5抑制剂类药物及其类似物的检测特异性高、灵敏度好、准确度高，而且，检测快速，从而用于快速检测食品中残留的PDE-5抑制剂，具有广阔的应用前景。

