BÀI NGHIÊN CỨU

Xây dựng phương pháp phát hiện vardenafil trộn trái phép trong chế phẩm nguồn gốc dược liệu bằng sắc ký lớp mỏng kết hợp phổ Raman tăng cường bề mặt (TLC-SERS)

Nguyễn Thị Quỳnh Như[1,2], Đào Thị Cẩm Minh[2], Lê Anh Thi[3], Lê Văn Vũ[4], Nguyễn Thị Kiều Anh[1], Phạm Thị Thanh Hà[1]*

[1]Trường Đại học Dược Hà Nội

[2]Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

[3]Trường Đại học Duy Tân

[4]Trường Đại học Khoa học Tự nhiên- Đại học Quốc gia Hà Nội

** Tác giả liên hệ: thanhha.pham@hup.edu.vn*

(Ngày gửi đăng: 31/3/2022 – Ngày duyệt đăng: 25/5/2022)

SUMMARY

A qualitative method with thin layer chromatography (TLC) combined with surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) was developed for identification of vardenafil adulterated in herbal products. The method was proposed as: TLC plate - silice gel GF254; Mobile phase - Ethylacetate-isopropanol-ammonia 25% (45:5:2.6, v/v/v), with freshly prepared silver colloid for Raman signal enhancement and typical Raman shift for SERS detection. The detection limit of the proposed TLC-SERS was 1.65 Ng vardenafil/spot. As tests for practical application of the method, 24 herbal products for erectile dysfunction therapy on the market were analyzed and the results were verified by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Of these, one herbal supplement product was found adulterated with vardenafil by both TLC-SERS and LC-MS/MS methods.

Từ khóa: *chế phẩm dược liệu, sắc ký lớp mỏng, phổ Raman tăng cường bề mặt (TLC-SERS), vardenafil.*

Đặt vấn đề

Cho tới nay, việc trộn trái phép các thuốc điều trị rối loạn cương dương nhóm ức chế enzym phosphodiesterase-5 (PDE-5) trong chế phẩm nguồn gốc dược liệu vẫn là một hiện trạng cần được khắc phục. Thông tư 10/2021/TT-BYT của Bộ Tế đã đưa ra danh mục các chất cấm sử dụng trong sản xuất và kinh doanh các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khoẻ (TPBVSK)(TPBVSK), trong đó có một số chất nhóm PDE-5 như sildenafil, vardenafil, tadalafil. Để phục vụ cho công tác phát hiện và ngăn chặn tình trạng trộn trái phép PDE-5 trong các chế phẩm dược liệu, nhiều phương pháp phát hiện thuốc nhóm PDE-5 trong chhế phẩm từ dược liệu đã được phát triển

như HPTLC [2], HPLC [3], LC-MS/MS [8], sắc ký miễn dịch [6]. Đặc biệt, quang phổ Raman đang là phương pháp nhận được sự quan tâm và có nhiều ứng dụng trong kiểm nghiệm thuốc, có độ đặc hiệu cao đặc biệt khi sử dụng phổ Raman tăng cường bề mặt (SERS – Surface-enhanced Raman scattering) [1], [9]. Tuy nhiên, nền mẫu chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu với các thành phần phức tạp, phát huỳnh quang mạnh và ít bền với nhiệt của tia laser là thách thức đối với Raman. Do đó, phương pháp TLC-SERS đã sử dụng sắc ký lớp mỏng (TLC) để tách các thành phần phát huỳnh quang từ dược liệu, khắc phục nhược điểm này. Việc kết hợp TLC với SERS giúp cho phát hiện nhanh tại chỗ các chất phân tích với độ nhạy cao, đơn giản, được áp dụng thành công để phát hiện các chất phân tích khác nhau, đặc biệt là phát hiện các chất trộn trái phép trong các chê phẩm có nguồn gốc từ dược liệu [5],[7]. Việc phát triển kỹ thuật TLC-SERS trong kiểm nghiệm thuốc, thực phẩm có nền mẫu phức tạp, với độ nhạy cao và độ đặc hiệu tốt, sẽ là một công cụ khả thi phục vụ công tác kiểm tra chất lượng, giúp người sử dụng tránh được tác dụng phụ nguy hiểm.

Năm 2019, nhóm nghiên cứu đã thành công phát hiện sildenafil trong chế phẩm nguồn gốc dược liệu bằng phương pháp TLC-SERS [5]. Vardenafil là hoạt chất thuộc nhóm PDE-5, có cấu trúc hóa học tương tự sildenafil, và cũng có trong danh mục các chất cấm theo thông tư 10/2021/TT-BYT. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phát hiện vardenafil trộn trái phép trong chế phẩm nguồn gốc dược liệu bằng kỹ thuật TLC-SERS.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất, chất chuẩn

Chất đối chiếu: Vardenafil hydroclorid hàm lượng 90,5 %, Code Y0001647, Hội đồng Dược điển Châu Âu. Sildenafil citrate (98,8 %) SKS. C0419265.04, Viện kiểm thuốc Trung Ương.

Hóa chất, vật tư: Methanol, ethyl acetat, isopropanol, amoniac đạt độ tinh khiết phân tích. Acetonitril, methanol, acid formic đạt tiêu chuẩn HPLC. Bản mỏng TLC silica gel 60 F254 của Merck (Đức). Cột sắc ký Restek Ultra II C18 (100mm x 2,1 mm; 1,9 µm), Mỹ.

Thiết bị nghiên cứu: Hệ thống quang phổ Raman, LabRam, Horiba Jobin Yvon, camera CCD, tia laser 632,8 nm (Pháp). Dải đo sóng 120-4000 cm^{-1}. Phần mềm Labspec và Origin. Hệ thống sắc ký LC-MS/MS, EVOQ Qube, Bruker, (Mỹ). Cân phân tích chính xác đến 0,01 mg XPE105 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); cân kỹ thuật XP 320C (Presica, Thụy Sĩ); máy ly tâm Z306 (Hermle,Đức).

Đối tượng nghiên cứu

Các chế phẩm có nguồn gốc dược liệu trong đó có 24 chế phẩm với dạng bào chế viên hoàn, viên nang, cao thuốc có tác dụng tăng cường sinh lý, hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, đang lưu hành tại Việt Nam; các chế phẩm này được mua tại các nhà thuốc, qua internet, của lương y và người dùng nghi ngờ gửi đến.

Mẫu placebo: Xây dựng 3 nền mẫu có thành phần dựa trên các bài thuốc cổ truyền. Nền viên nang tự tạo bào chế từ dược liệu dựa trên bài thuốc Hoàn sâm nhung bổ thận trong Dược điển Việt Nam V; nền viên hoàn dựa trên bài thuốc *Minh mạng thang*; nền cao thuốc dựa trên bài thuốc *Điều nguyên cứu bản thang* trong Hải Thượng Y tông tâm lĩnh.

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình xử lý mẫu thực hiện theo quy trình đã xây dựng [2]: Mẫu thử được nghiền mịn, cân ½ liều dùng mẫu thử hoặc mẫu placebo vào ống falcon. Thêm 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, lọc lớp dịch trong qua màng lọc 0,45 µm, chấm sắc ký.

Chuẩn bị dung dịch keo bạc: Hỗn dịch keo bạc ổn định được nhóm nghiên cứu tự chế tạo theo quy trình [5]: Lấy 194 ml nước cất được đun nóng đến 100 °C dưới sinh hàn hồi lưu có khuấy từ mạnh. Sau khi sôi, thêm từng giọt lần lượt 2 ml dung dịch $AgNO_3$ 0,1 M và 4 ml dung dịch natri citrat 1 %. Tiếp tục, đun hồi lưu trong 40 phút, sau đó để nguội đến nhiệt

độ phòng. Bảo quản trong tủ lạnh, dùng trong thời gian 6 tháng.

Phương pháp TLC: Gồm pha tĩnh TLC silica gel 60 F254 với kích thước (20×10cm); thể tích mẫu 5 µl, hệ dung triển khai ethyl acetat-isopropanol-amoniac 25 % (45:5:2,6), thời gian triển khai 20 phút, vết vardenafil tách hoàn toàn khỏi nền dược liệu, vết gọn, màu đen phát hiện dưới đèn UV 254 nm với R_f là 0,35.

Thẩm định phương pháp theo AOAC [4].

Phương pháp LC-MS/MS: Vardenafil được tách bằng cột UltraII C18 (100mm × 2,1 mm; 1,9µm), pha động gồm acid formic 0,1 % trong nước (A) và acid formic 0,1 % trong acetonitril (B); tỉ lệ pha động: gradient (0 -7 phút, 30 % B; 7 phút, 70 % B; 8,5 phút, 30 % B; 12 phút, 30 % B) thể tích tiêm mẫu 2 µl, tốc độ dòng 0,3 ml/phút, thời gian 12 phút. Chất phân tích được phát hiện bằng detector MS/MS với nguồn ion hóa ESI (+), mảnh mẹ có m/z là 489,2 và 2 mảnh con là 151,1 và 312,0; tỉ lệ 2 mảnh con 151,1 và 312,0 lần lượt là 86,4 %; 13,6 %; theo tiêu chuẩn EC cho phép tỷ lệ mảnh con ± 20 %.

Kết quả nghiên cứu

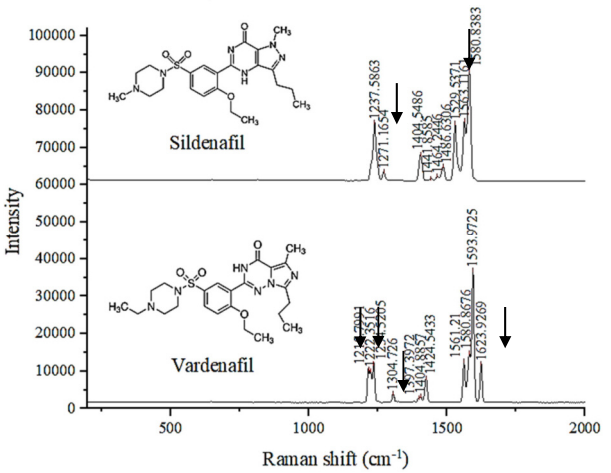
Xây dựng bộ đỉnh đặc trưng định tính vardenafil bằng TLC-SERS

Một số nghiên cứu trước đây đã cho thấy hiện tượng trộn đồng thời nhiều chất trong cùng nhóm PDE-5 trong các TPBVSK, được phát hiện đồng thời bằng các phương pháp sắc ký khác nhau như HPTLC [2] hay LC-MS/MS [3]. Phương pháp TLC sử dụng trong nghiên cứu này đã tách được vết vardenafil và sildenafil [2], nên hoàn toàn có thể phát hiện đồng thời sildenafil và vardenafil với độ đặc hiệu cao.

Trong nghiên cứu trước của nhóm [5], sildenafil trộn trái phép trong một số mẫu TPBVSK đã được phát hiện thành công bằng phương pháp TLC-SERS bằng bộ đỉnh đặc trưng cho sildenafil. Nếu xác định được bộ đỉnh đặc trưng cho vardenafil với các đỉnh khác biệt so với sildenafil, độ đặc hiệu của việc phát hiện bằng SERS sẽ tăng lên. Nếu Rf của hệ TLC ổn định, ứng dụng này có thể mở ra khả năng phát hiện bằng TLC-SERS kể cả khi không có các dung dịch chuẩn, mà chỉ cần so sánh phổ khớp với các đỉnh trong bộ đỉnh đặc trưng của từng chất. Để xác định các đỉnh tương ứng với cấu trúc trong phổ SERS, trước hết cần so sánh phổ Raman của hai chất ở dạng bột, để xác định các đỉnh khác biệt tiềm năng.năng.

Khảo sát phổ Raman của bột vardenafil chuẩn

Điểm khác biệt giữa cấu trúc hóa học và phổ SERS của vardenafil bột chuẩn so với sildenafil bột chuẩn có thể được quan sát trong Hình 1.



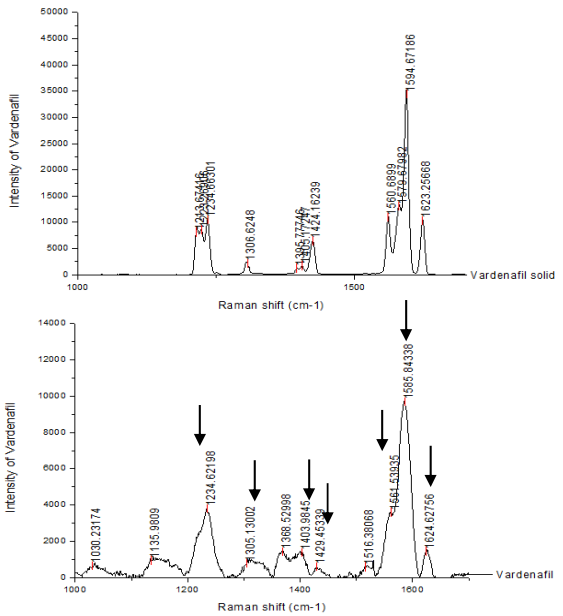
Hình 1. Cấu trúc hóa học và phổ SERS của bột chuẩn Sildenafil và Vardenafil

Trong hình 1, phổ SERS của sildenafil với các đỉnh đặc trưng là 1238 cm^{-1} (υ_s SO_2+ υ C-N), 1271 cm^{-1} (δ vòng), 1404 cm^{-1} (υ C-N), 1529 cm^{-1} (δ NH+ δ CH), 1563 cm-1 (δ NH), 1581 cm^{-1} (δ vòng); phổ SERS của vardenafil gồm 1235 cm^{-1} (υ_s SO_2+ υ C-N), 1304 cm^{-1} (δ vòng), 1424 cm^{-1} (υ C-N), 1561 cm-1 (δ NH+ δ CH), 1580 cm^{-1} (δ NH), 1594 cm^{-1} (δ vòng), 1624 cm^{-1} (δ NH) [5]. Đặc biệt cấu trúc hóa học của sildenafil và vardenafil có điểm khác biệt chính là vòng piperazin 5 cạnh có 2 nitơ được gắn khác nhau. Do đó, phổ SERS của bột chuẩn

Vardenafil có đỉnh khác biệt với bột chuẩn Sildenafil ở một số đỉnh đặc trưng tại 1624 cm^{-1}, có thêm đỉnh 1215 cm^{-1} rất rõ ở phía trước đỉnh 1235 cm^{-1}.

Khảo sát phổ SERS của vardenafil trên bản mỏng TLC - Xác định bộ đỉnh đặc trưng

Do ảnh hưởng tăng cường của nano bạc, phổ SERS của một chất có thể có những chênh lệch nhất định về vị trí và cường độ đỉnh. Để xác định các đỉnh đặc trưng trên phổ SERS của vardenafil, tiến hành đo và so sánh (Hình 2.b) phổ SERS của vết chấm dung dịch vardenafil trên bản TLC thu được sau khi nhỏ keo bạc nano với (Hình 2.a) phổ Raman của vardenafil bột chuẩn. Phổ TLC-SERS của vardenafil trong Hình 2.b đã được trừ phổ cho mẫu trắng, là phổ TLC-SERS khi nhỏ keo bạc lên một vị trí chỉ có dung môi (MeOH) mà không có chất phân tích hay dịch chiết.



(a) (b)

Hình 2. Phổ Raman của bột vardenafil (a), và phổ SERS của dung dịch vardenafil trên TLC (b).

Từ hình 2, phổ SERS của vardenafil chuẩn ở các bản mỏng khác nhau xác định được 7 đỉnh đặc trưng của vardenafil chuẩn trong đó đỉnh 1235 cm^{-1} được chọn làm đỉnh tham chiếu. Các đỉnh đặc trưng của vardenafil ở các bản mỏng khác nhau có các đỉnh dao động như sau 1235 ± 1, 1305 ± 2, 1405 ± 2, 1428 ± 2, 1563 ± 1, 1586 ± 1 và 1624 ± 2 cm^{-1} với dao động tỷ lệ so với đỉnh 1235 cm^{-1} tương ứng lần lượt 1,00; 0,24-0,33; 0,22-0,24; 0,14-0,17; 0,88-1,64; 2,06-3,29; 0,61-1,21.

Khảo sát điều kiện nhỏ keo bạc nano và ghi phổ SERS

Điều kiện ghi phổ Raman

Nhỏ dung dịch keo bạc lên vết được đánh dấu có R_f tương đương với vardenafil. Phát hiện vết bằng máy Raman cho tín hiệu tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) bằng tia laser 632,8 nm, thời gian chiếu tia laser 60 giây, công suất laser 10 mW.

Khảo sát thể tích nhỏ hỗn dịch keo bạc

Pha dung dịch chuẩn vardenafil 1 mg/ml trong methanol. Tiến hành TLC với các điều kiện đã chọn và đánh dấu các điểm phân tách. So sánh phổ SERS của các vết chuẩn sildenafil khi nhỏ hỗn dịch keo có các thể tích khác nhau từ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 µl; trong thời gian thu tín hiệu 60s với hỗn dịch keo bạc, và đánh giá cường độ đỉnh 1564 cm^{-1}. Kết quả được minh họa trong hình 3.a. Lựa chọn thể tích keo bạc là 1,5 µl vì cường độ tín hiệu cao và vết keo loang không quá lớn.

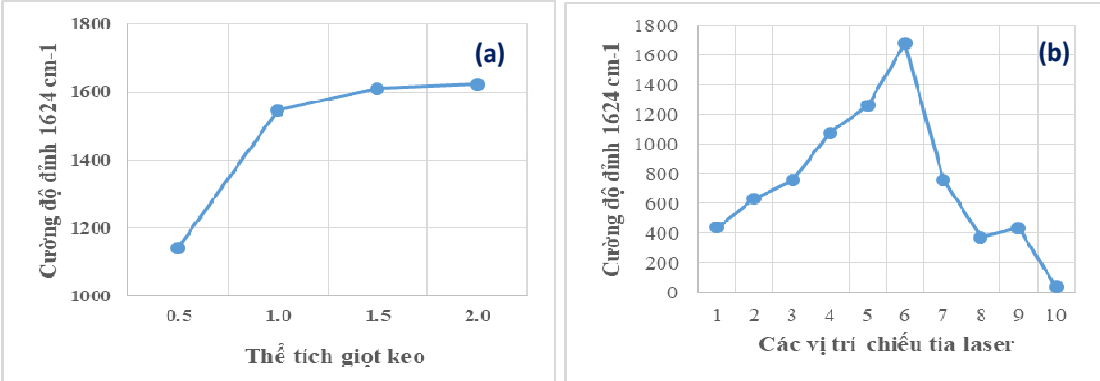
Khảo sát vị trí chiếu tia laser

Pha dung dịch chuẩn vardenafil 1 mg/ml trong methanol. Tiến hành TLC với các điều kiện đã chọn và đánh dấu các điểm phân tách. Chiếu tia laser tại các vị trí từ 1 (tâm vết) đến vị trí 10 (viền ngoài cùng của vết), kết quả minh họa trên hình 3.b. Cường độ đỉnh 1624 cm^{-1}; của đỉnh vardenafil tăng từ 1 (tâm vết) đến 6 (vành keo); và giảm từ 6 (vành keo) đến 10 (viền ngoài cùng của vết). Do đó, hiệu ứng giọt cà phê vẫn được ghi nhận đối với vardenafil, tương tự sildenafil [7].

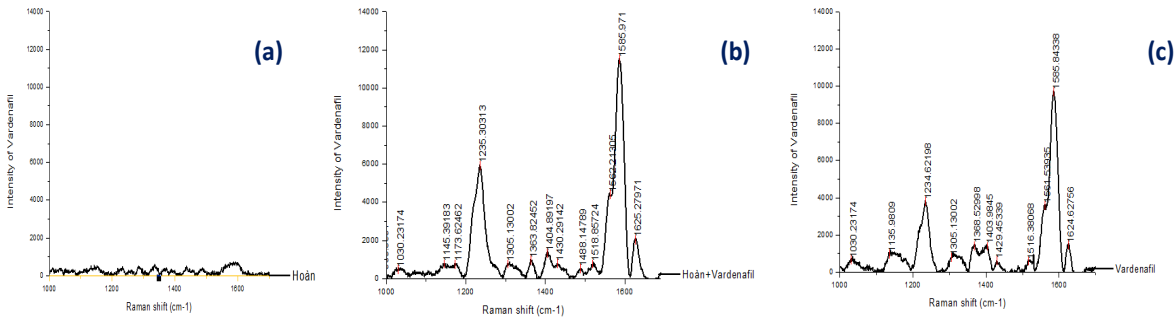
Thẩm định phương pháp định tính vardenafil bằng TLC-SERS

Độ chọn lọc

Phân tích và ghi nhận các phổ SERS đồng thời 3 loại mẫu gồm dịch chiết mẫu placebo (các dạng viên nang, viên hoàn, cao thuốc),



Hình 3. Kết quả khảo sát thể tích nhỏ kheo bạc (a) và vị trí chiếu tia laser (b)



Hình 4. Phổ SERS đánh giá độ chọn lọc vardenafil trong nền hoàn: (a).Nền hoàn; (b). Vardenafil thêm vào nền hoàn; (c). Vardenafil chuẩn

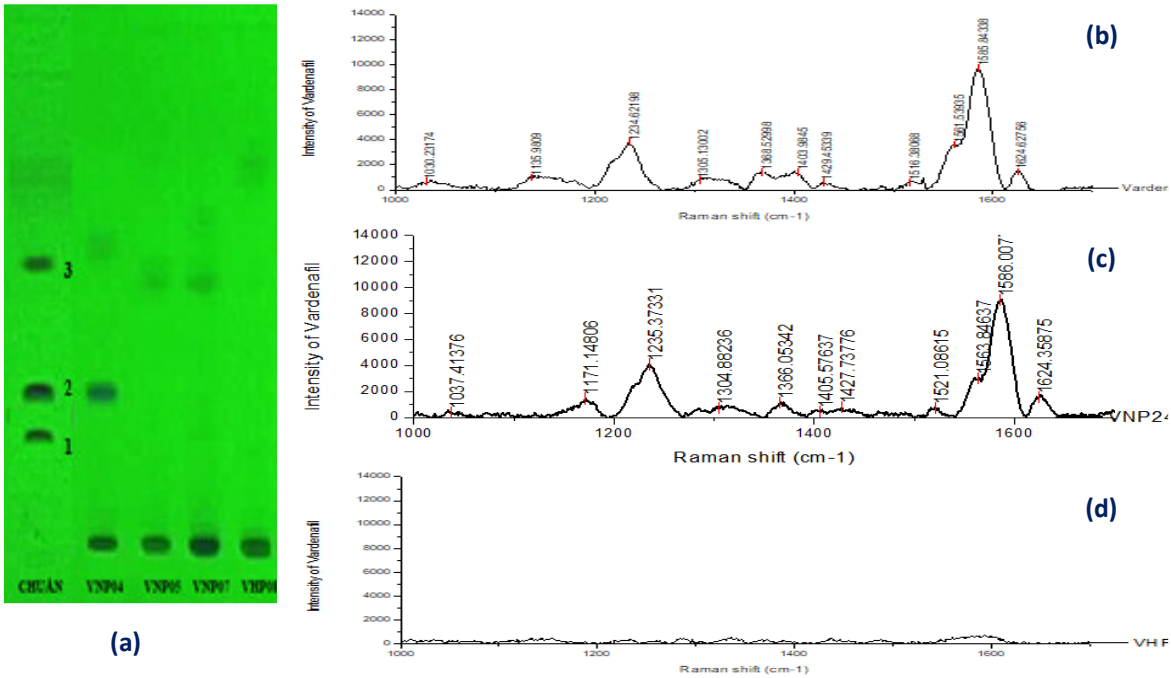
dung dịch vardenafil chuẩn và dịch chiết mẫu placebo thêm chuẩn. Hình 4 thể hiện một ví dụ khảo sát độ chọn lọc trên nền viên hoàn, gồm phổ SERS cho nền hoàn (hình 4.a) và nền hoàn thêm chuẩn (hình 4b) và dung dịch chuẩn vardenafil (hình 4c). Kết quả phổ SERS của các vết cho thấy vardenafil trong mẫu placebo thêm chuẩn (hình 4b) có các tín hiệu đặc trưng tái lặp quanh các dịch chuyển Raman chính của chất chuẩn (hình 4c). Nền mẫu ảnh hưởng không đáng kể đến vị trí các đỉnh đặc trưng của vardenafil (hình 4a). Như vậy các đỉnh đặc trưng của vardenafil gồm có 1235 ± 1, 1305 ± 2, 1405 ± 2, 1428 ± 2, 1563 ± 2, 1586 ± 1 và 1624 ± 2 cm^{-1}.

Giới hạn phát hiện (LOD):

Thêm 1 dung dịch chuẩn của vardenafil hydroclorid có nồng độ 33,000; 16,500; 8,250; 4,125 µg/ml. Thêm 1 ml các dung dịch trên vào bột nền mẫu trắng với lượng khoảng ½ liều dùng, trộn đều. Xử lý mẫu và tiến hành phân tích, tín hiệu các đỉnh đặc trưng của vardenafil ở nồng độ 8,250 µg/ml (tương đương 1,65 ng/vết) phát hiện được. Do đó, LOD của vardenafil là 1,65 ng/vết.

Ứng dụng phương pháp

Ứng dụng phương pháp để phân tích 24 mẫu chế phẩm có nguồn gốc dược liệu thu thập được. Các mẫu chế phẩm được xử lý theo quy trình và phân tích bằng TLC-SERS với các điều kiện đã chọn. Kết quả thu được cho thấy trên sắc ký đồ TLC của 24 mẫu chế phẩm có nguồn gốc dược liệu được khảo sát, phát hiện có 01 mẫu VNP04 có vết tương ứng tại R_f



Hình 5. Sắc ký đồ của một số mẫu thực với vị trí số 2 trên vết chuẩn là vardenafil (a); Phổ SERS tại Rf tương ứng 0,35 của chuẩn Vardenafil (b); mẫu VNP04 dương tính với vardenafil (c); Phổ SERS của VNHP08 âm tính với Vardenafil (d).

của vardenafil chuẩn theo hình 5 (a). Trên phổ SERS của 01 vết VNP04 cho kết quả ở hình 5 (b), bảng 1 như sau:

Bảng 1. Các đỉnh đặc trưng và tỉ lệ cường độ SERS của mẫu VNP04 dương tính

VNP04	Raman shift (cm^{-1})	1235	1304	1405	1428	1563	1586	1624
	Tỉ lệ	1,00	0,30	0,16	0,21	1,05	2,50	0,85

Phương pháp sắc ký khối phổ LC-MS/MS để kiểm chứng kết quả của TLC-SERS

Tiến hành pha loãng 50 lần trong methanol các dung dịch mẫu thử dùng cho TLC-SERS và tiêm vào hệ thống LC-MS/MS. Kết quả cho thấy 1/24 mẫu phát hiện được vardenafil là VNP04 cho mảnh ion mẹ có m/z là 489,2 và 2 mảnh con là 151,1 và 312,0; tỉ lệ 2 mảnh con 151,1 và 312,0 lần lượt là 74,9 %; 25,1 %, đáp ứng yêu cầu số điểm IP = 4 cho phép khẳng định sự có mặt của vardenafil. Tất cả các kết luận âm tính và dương tính qua phân tích LC-MS/MS đều tương đồng với kết quả thu được khi phân tích 24 mẫu thử nghiên cứu bằng phương pháp TLC-SERS. Kết quả này minh chứng cho tính đặc hiệu và độ tin cậy của phương pháp TLC-SERS vừa xây dựng.

Bàn luận

Mẫu VNP04 cho tín hiệu SERS có các đỉnh đặc trưng trùng với các đỉnh đặc trưng của vardenafil chuẩn với tỉ lệ các đỉnh nằm trong ngưỡng dao động. Như vậy, phương pháp TLC-SERS đã khẳng định được 1 mẫu dương tính với vardenafil trong tổng số 24 mẫu chế phẩm được khảo sát. Nghiên cứu của Xiaopeng Hu và cộng sự [7] cũng đã sử dụng phương pháp TLC-SERS để phát hiện 6 chất ức chế PDE-5 trong đó có vardenafil dihydrochlorid và pseudo vardenafil. Tuy nhiên, khi khảo sát trên 50 chế phẩm có

nguồn gốc dược liệu chưa phát hiện mẫu dương tính vardenafil.

Kết luận

Nghiên cứu đã phân tách vardenafil trong 3 nền mẫu chế phẩm có nguồn gốc dược liệu viên nang, viên hoàn, cao thuốc; dựa vào Rf của vardenafil rồi nhỏ keo bạc, chiếu tia laser trong 60 giây, thu nhận được phổ SERS với các đỉnh đặc trưng của vardenafil bằng phương pháp TLC-SERS. Phương pháp đã được thẩm định theo AOAC, có giới hạn phát hiện là 1,65 ng/vết, và đã được kiểm chứng song song với phương pháp LC-MS/MS. Đây là phương pháp mới được phát triển tại Việt Nam, đã thành công phát hiện 1 mẫu dương tính với vardenafil trong 24 mẫu chế chế phẩm có nguồn gốc dược liệu đang lưu hành trên thị trường, mở ra nhiều triển vọng trong ứng dụng phát hiện các chất trộn trái phép trong chế phẩm có nguồn gốc dược liệu.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 104.04 - 2020.29.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Thị Ngọc Lan; Đoàn Cao Sơn; Thái Nguyễn Hùng Thu; Nghiên cứu xác định bộ dịch chuyển Raman cơ bản của sildenafil, ibuprofen và lamivudin để sàng lọc nhanh thuốc giả. *Tạp chí Dược học* (483), pp.16-20, 2016.
2. Đào Thị Cẩm Minh; Nguyễn Thị Thanh Huyền; Phạm Thị Thanh Hà; Nguyễn Thị Kiều Anh; Xây dựng phương pháp xác định chất ức chế phosphodiesterase-5 trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC). *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học 23* (5), pp.11-19, 2018.
3. Đào Thị Cẩm Minh; Phạm Thị Thanh Hà; Nguyễn Thị Kiều Anh; Xác định một số chất ức chế phosphodiesterase-5 trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS. *Tạp chí Dược liệu 25* (1), pp. 27-30, 2020.
4. Al-Tahami, K.; Determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements sold in the Yemeni market. *Internationa journal of scientific research 3* (4), pp.403-405, 2014.
5. AOAC International, "Appendix K: Guidelines for dietary supplements and botanicals," AOAC Ofcial Methods of Analysis, pp. 3-32, 2013.
6. Dao Thi Cam Minh; Le Anh Thi; Nguyen Thi Thanh Huyen; Le Van Vu; Nguyen Thi Kieu Anh; Pham Thi Thanh Ha; Detection of sildenafil adulterated in herbal products using thin layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy: "Double coffee-ring effect" based enhancement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 174*, pp.340–347, 2019.
7. Fan He; Jinyi Yang; Tingting Zou; Zhenlin Xu; Yuanxin Tian; Wenjia Sun; Hong Wang; Yuanming Sun; Hongtao Lei; Zijian Chen; Juewen Liu; Xuecai Tan; Shen, Y.; A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for simultaneous detection of multiplex sildenafil adulterants in health food by only one antibody. *Analytica Chimica Acta*, 1141, pp.1-12, 2021.
8. Hu, X.; Fang, G.; Han, A.; Fu, Y.; Tong, R.; Wang, S.; Rapid detection of six phosphodiesterase type 5 enzyme inhibitors in health care products using thin-layer chromatography and surface enhanced Raman spectroscopy combined with BP neural network. *Journal of Separation Science 40* (11), pp.2316-2521, 2017.
9. Lee, J. H.; Kim, N. S.; Han, K. M.; Kim, S. H.; Cho, S.; Kim, W. S.; Monitoring by LC-MS/MS of 48 compounds of sildenafil, tadalafil, vardenafil and their analogues in illicit health food products in the Korean market advertised as enhancing male sexual performance. *Food Additives & Contaminants:* Part A 30 (11), pp.1849–1857, 2013.
10. Mao, D.-Z.; Weng, X.-X.; Yang, Y.-J.;; Rapid screening of sildenafil and tadalafil adulterated in healthcare products by Micro-Raman spectroscopy. *Journal of Raman spectroscopy,* 10.1002/jrs.4102, 2012.