

体液中西地那非的测定及其代谢物的确认

陈 聪^{1,2} 向 平² 沈保华² 卓先义^{*2}

¹(复旦大学上海医学院法医系, 上海 200032)

²(司法部司法鉴定科学技术研究所, 上海市法医学重点实验室, 上海 200063)

摘 要 建立了高效液相色谱-电喷雾串联质谱 (HPLC-ESI-MS/MS) 测定血液中西地那非以及利用电场轨道阱回旋共振组合质谱仪 (LTQ-Orbitrap) 鉴定尿液中西地那非代谢产物的方法。用乙醚提取体液, 采用 Ultra IBD 色谱柱, 以乙腈-20 mmol 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸) 缓冲液 (70: 30, V/V) 为流动相, 恒流分离后, 在 LC-MS/MS 多反应监测模式下进行定性及定量分析; 代谢物分离鉴定选用 PLRP-S 聚合色谱柱, 以 0.1% 甲酸溶液 (A) 和乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱分离后, 在 LTQ-Orbitrap 全扫描模式下进行代谢物鉴定。本方法在 5 ~ 1000 $\mu\text{g/L}$ 内线性关系良好, 回收率为 81.3% ~ 103.3%, 日内与日间精密度 RSD 均小于 10%, 检出限为 1.0 $\mu\text{g/L}$; 尿液中检出 5 种代谢产物, 分别为 N^1 , N^4 -去乙基代谢物 (M1), N -去甲基代谢物 (M2, M3), 羟化代谢物 (M4) 和 N -甲基氧化代谢物 (M5), 其中 M3 和 M5 在人体尿液中为第一次检测到。

关键词 西地那非; 代谢物; 高效液相色谱-电喷雾串联质谱; 线性离子阱静电场轨道阱组合质谱; 结构鉴定

1 引 言

西地那非 (Sildenafil) , 成品为西地那非的枸橼酸盐, 商品名为“万艾可”, 俗称伟哥。它作为一种性药, 对于治疗男性勃起功能障碍有很好疗效。自 1998 年该药上市以来, 一直有报道使用西地那非会对严重心血管疾病患者产生影响, 已有因服用西地那非治疗性功能障碍引起意外死亡的报道^[1]。因此, 急需建立灵敏度高、准确性强的测定体液中西地那非的方法。目前, 检测西地那非的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[2~4]、气相质谱-质谱联用法 (GC/MS)^[5]、毛细管电泳色谱法^[6]、液相色谱-质谱法 (LC-MS)^[7,8]和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[9,10]。国内仅见杨士云等^[11]采用 HPLC 检测全血中西地那非。

代谢物确认在毒理学研究中具有很高的应用价值。代谢物的测定可以延长检测时限, 更重要的是根据毒 (药) 物及其代谢物浓度可以进行临床和法医毒理学分析、解释。目前, 对于代谢物确认最为常用的方法是核磁共振法 (NMR) 和质谱分析法。核磁共振法虽然能够对样品进行非破坏性、非选择性分析, 非常适合代谢物的研究, 但其最大的缺陷是灵敏度相对较低, 不适合分析低浓度代谢物, 对样品制备的要求很高; 同时, NMR 的动态范围有限, 很难同时测定生物体系中共存浓度相差较大的代谢产物^[12]。HPLC-MS 法虽然集合了 HPLC 高分离性和 MS 高灵敏度、高选择性的优点, 但确证化合物结构的能力有限, 不能满足体内复杂多样的代谢物研究的需要^[13]。近年开发的电场轨道阱回旋共振组合质谱仪 (LTQ-Orbitrap), 使用线性离子阱实现离子分离、裂解以及多级质谱功能, 在质量准确度、分辨率、动态范围、灵敏度以及多级质谱能力等方面具有明显优势, 可以实现生物样本中复杂多样代谢物的结构鉴定, 将是小分子化合物及其代谢物鉴定的发展方向^[14~16]。本研究采用三重四极串联质谱 (LC-MS/MS) 建立血液中西地那非的测定方法, 并将方法应用于实际检测; 运用 LTQ-Orbitrap 技术分离鉴定尿液中西地那非的代谢产物, 为临床和法医毒理学领域提供技术储备。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

2010-10-19 收稿; 2011-02-18 接受

本文系质检公益行业科研资助专项 (No. 10-137)

* E-mail: zhuoxianyi126@126.com

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent 1100 自动进样器, API4000 三重四极串联质谱仪(Applied Biosystems 公司); Finnigan Surveyor 液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 电场轨道阱回旋共振组合质谱仪(德国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

西地那非片(Sildenafil, 辉瑞制药公司), 每片相当于含 100 mg 西地那非。内标多虑平(Doxepin, Cerilliant 公司), 乙腈、甲酸、乙酸铵(HPLC 级, Fluka 公司), 实验用水为超纯水。其它试剂均为国产分析纯。空白血液来自无用药史的健康志愿者。

2.2 工作溶液的配制

(1) 西地那非工作溶液 将西地那非片磨粉后加入 10 mL 甲醇, 超声 1 h, 离心后, 上清液用甲醇定容至 100 mL, 配制成 1.0 g/L 储备液, 并用甲醇逐级稀释成 10 和 0.1 mg/L 的工作溶液, 备用。(2) 多虑平工作溶液 取 1.0 g/L 多虑平储备液 20 μ L 至 10 mL 容量瓶中, 以甲醇定容, 配制成 2 mg/L 的工作溶液, 备用。

2.3 样品和样品处理

2009 年 11 月某日, 浙江省某高龄男子在家中猝死, 因怀疑其死亡前服用过“西地那非”, 遂进行毒化和病理的全面尸检。送检死者的血液、尿液等检材于 -20°C 条件下保存, 待测。取体液(血液、尿液) 1.0 mL, 加入 5 μ L 多虑平内标溶液(2 mg/L) 和 1 mL 的硼酸盐缓冲液(pH 9.2), 再加入 3 mL 乙醚, 涡旋混合 2 min, $1650 \times g$ 离心 3 min, 取乙醚液, 60°C 水浴挥干, 加入 0.5 mL 流动相溶解, 取 200 μ L 至进样衬管中。

2.4 LC-MS/MS 分析条件

Ultra IBD 液相色谱柱($100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$, Resteck 公司), 此前接 Phenomenex 保护柱($4\text{ mm} \times 2\text{ mm}$)。流动相为乙腈-20 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸) 缓冲液(70: 30, V/V); 恒流, 流速为 200 μ L/min; 柱温: 室温; 进样量 5 μ L。

电喷雾(ESI) 离子源, 正离子扫描, 离子喷射电压 5.5 kV; 离子源温度 450°C ; 离子源气 1(GS1): 241 kPa; 离子源气 2(GS2): 276 kPa; 气帘气 172 kPa; 检测方式为多反应监测(MRM); 碰撞气: 48 kPa。每个化合物选取两个离子对进行定性分析, 第一对母离子/子离子确定为定量离子对, 见表 1。

表 1 西地那非和内标多虑平的质谱分析参数

Table 1 Analytical parameters of sildenafil and doxepin (IS)

化合物 Compound	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Product ion (m/z)	去簇电压 Declustering potential (V)	碰撞能 Collision energy (eV)
西地那非 Sildenafil	475.0	58.1 100.1	80	60 41
多虑平 Doxepin	280.3	107.2 220.2	50	31 36

2.5 LTQ-Orbitrap 分析条件

PLRP-S 液相色谱柱($150\text{ mm} \times 2.1\text{ mm} \times 3\text{ }\mu\text{m}$, Shropshire 公司), 此前接相同型号的保护柱($5\text{ mm} \times 3.0\text{ mm}$)。流动相为 0.1% 甲酸(A) -乙腈(B) 梯度洗脱程序: 0~1.9 min 2% B; 2~5 min 20% B; 5.1~12 min, 50% B; 12.1~20 min, 2% B。流速为 200 μ L/min, 柱温: 室温; 进样量 5 μ L。

电喷雾离子源, 正离子模式检测, 喷雾电压 4.5 kV; 毛细管温度 275°C ; 毛细管电压 9 V; 管透镜电压 65 V。鞘气: 7.5 L/min; 辅助气: 1.5 L/min; 多级质谱相对碰撞能量: HCD (45%); 精确质量数采用外质量校准法($<1 \times 10^{-6}$) 校正液含咖啡因(M_w 194), MRFA (短肽 M_w 523), Ultramark (聚合物 M_w 1022~1922); 一级扫描和多级质谱扫描选用 FTMS 质量分析器, 一级扫描分辨率为 60000, 多级扫描分辨率为 7500; 扫描范围: m/z 300~800。

2.6 数据处理

LTQ-Orbitrap 采集谱图通过代谢物筛查软件 MetWorksTM 1.1.0 (Thermo scientific) 分析, 消除空白背景干扰, 寻找符合西地那非代谢修饰的代谢产物分子离子 $[M+H]^+$, 对寻找到的与西地那非原体相关度较高的可疑分子离子, 根据精确质量数测定和运用元素组成分析软件得到可疑西地那非代谢物的元素组成以及它们的化学式和不饱和度(环和双键 [RDB]), 被鉴定的未知代谢物分子量误差小于 5

$\times 10^{-6}$ amu 结合二级及多级质谱功能对每个化合物提供更多结构的特征相关信息, 并通过 Mass Frontier 5.0 (Thermo scientific) 谱图解析软件对各个代谢产物的特征裂解方式进行验证。

3 结果与讨论

3.1 选择性

取不同来源的空白血液, 按 2.3 节处理后进样 (不加内标) 结果如图 1a; 向空白血液中添加西地那非对照品, 使其质量浓度为 $5 \mu\text{g/L}$, 按 2.3 节处理后进样, 结果如图 1b; 图 1c 为空白血液中添加内标, 表明空白血液中的内源性物质不会干扰西地那非的测定。

3.2 线性关系

取空白血液 1 mL, 加入西地那非工作溶液配制成为 5, 25, 50, 100, 500 和 1000 $\mu\text{g/L}$ 的样品, 按 2.3 节处理后进行 LC-MS/MS 分析。以西地那非质量浓度 ($\mu\text{g/L}$) 为横坐标, 以西地那非和内标峰面积比值为纵坐标, 得回归方程为: $y = 0.00434x - 0.0148$, $r = 0.9972$ (见图 2)。结果表明, 西地那非在 5 ~ 1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围呈良好的线性关系。

由于临床治疗浓度通常高于 $\mu\text{g/L}$ 级, 本研究处理后进样量仅 5 μL , 得本方法的检出限 ($S/N \geq 3$) 为 1 $\mu\text{g/L}$, 定量限 ($S/N \geq 10$) 为 5 $\mu\text{g/L}$, 此方法有较宽的线性范围, 便于实际样品的定量分析。

3.3 提取回收率、精密度和基质效应

取空白血液 1.0 mL, 添加西地那非, 配制 10, 100 和 800 $\mu\text{g/L}$ 低、中、高 3 个质量浓度的控制样品, 按 2.3 节操作, 每个质量浓度点设 6 个重复样品, 按相同方法分析, 连续测定 3 d, 按线性方程回归计算回收率、日内和日间精密度。结果表明, 此方法的日内和日间精密度的 RSD 均小于 10%, 结果见表 2。

空白血液经提取后, 加入西地那非, 采用 LC-MS/MS 分析, 所得峰面积与其对应的标准溶液直接进样得到的峰面积相比即得基质效应。提取回收率是分别在空白血液预处理前和预处理后加入西地那非, 分析所得峰面积的百分比, 结果见表 2。

表 2 全血中西地那非的提取回收率、精密度和基质效应

Table 2 Accuracy, precision, recovery and matrix effects of sildenafil in human blood

添加浓度 Spiked conc. ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recovery (%, $n=6$)	日内精密度 Intra-day RSD (%, $n=6$)	日间精密度 Inter-day RSD (%, $n=18$)	基质效应 Matrix effects (%, $n=5$)
10	101.6	7.48	5.46	91.6
100	81.3	6.31	3.59	96.6
800	103.1	5.64	6.59	118.1

3.4 质谱解析

采用 LTQ-Orbitrap 质谱, 在正离子检测模式下进行一级全扫描, 对照品西地那非准分子离子 $[M +$

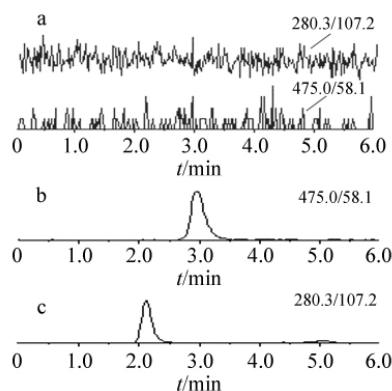


图 1 MRM 模式下的色谱图

Fig. 1 Representative MRM chromatograms of Sildenafil in blood

a. 空白血液 (Free blood); b. 添加西地那非质量浓度为 $5 \mu\text{g/L}$ 的血样 (Sildenafil standards spiked blood samples ($5 \mu\text{g/L}$)); c. 添加内标多虑平质量浓度为 $20 \mu\text{g/L}$ 的血样 (Doxepin standards spiked blood samples ($20 \mu\text{g/L}$)).

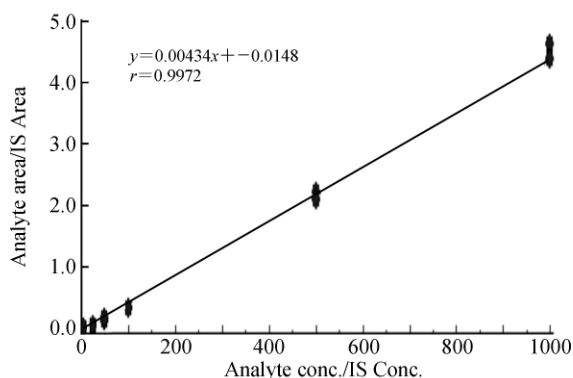


图 2 HPLC-MS/MS 测定血液中西地那非的标准曲线

Fig. 2 Standard curves of Sildenafil in whole blood determined by HPLC-MS/MS method

$[H]^+ m/z$ 475.2120 (分子量误差 -0.422×10^{-6}) ,其主要碎片离子分别为 m/z 377.1274 , 311.1499 和 283.1186。由于西地那非甲磺基团有两个 O ,有很强的吸电子作用 ,造成 N—S 键和 C—S 键不稳定 ,容易发生断裂 ,形成碎片离子 m/z 377 ($M + H - C_5H_{10}N_2$) 和 m/z 311 ($M + H - C_5H_{12}O_2N_2S$) , MS^3 质谱碎片离子 m/z 283 由 MS^2 质谱碎片离子 m/z 311 丢失 C_2H_4 产生 ,西地那非裂解途径见图 3A。以上西地那非由多级质谱产生的碎片离子及裂解方式分别与文献 [19, 17, 18,]报道一致。

对尿液进行一级全扫描和二级 Data-dependent 质谱分析 ,采集到的谱图通过代谢物分析软件 Met-Works™ 1.1.0 处理 ,发现原药西地那非及其相关的 5 种代谢物 ,它们的质子化分子离子 $[M + H]^+$ 精确质量数分别为 m/z 449.1957 , 461.1960 , 461.1959 , 491.2063 和 505.1854。对这些组分进行二级 Data-dependent 质谱分析 ,得到各个组分的 MS 色谱及 MS^2 质谱图。西地那非及各代谢物的化学式、保留时间、积分峰面积、理论分子量、实测分子量、不饱和度 (RDB) 、理论值与实测值之间的相对误差及 MS^2 质谱主要碎片离子见表 3。从表 3 可知 ,除代谢物 M3 和 M4 外 ,其余代谢物在二级和多级质谱中均出现相同特征碎片离子 m/z 311 和 283 ,为有效鉴定该类化合物提供了重要的结构信息。尿液中原药西地那非二级质谱得到的主要碎片离子与对照品西地那非二级质谱碎片离子相同。

表 3 西地那非及其代谢物保留时间及其碎片离子 LTQ-Orbitrap 分析结果

Table 3 Linear trap quadrupole (LTQ) -Orbitrap retention times and fragment ions of sildenafil and its related metabolites

化合物 Compound	化学式 Chemical formula $[M + H]^+$	保留时间 Retention time (min)	理论分子量 Theoretical mass	实测分子量 Measured mass	不饱和度 RDB	主要碎片离子 Major fragment ions (m/z)
Sildenafil	$C_{22}H_{31}O_4N_6S$	12.03	475.2122	475.2113	10.5	377, 311, 283
M1	$C_{20}H_{29}O_4N_6S$	11.25	449.1966	449.1957	9.5	418, 392, 361, 311, 283
M2	$C_{21}H_{29}O_4N_6S$	11.88	461.1966	461.1960	10.5	377, 311, 283
M3	$C_{21}H_{29}O_4N_6S$	10.94	461.1966	461.1959	10.5	297, 269
M4	$C_{22}H_{31}O_5N_6S$	10.35	491.2071	491.2063	10.5	473, 375, 327, 310, 281
M5	$C_{22}H_{29}O_6N_6S$	15.73	505.1864	505.1854	11.5	487, 461, 311, 283

代谢物 M1, $[M + H]^+$ (m/z 449.1957) 结合原药元素组成 (C, H, O, N, S) 及其精确质量数和分子量误差 ($<5 \times 10^{-6}$) ,可推断 M1 $[M + H]^+$ 化学式为 $C_{20}H_{29}O_4N_6S^+$,与原药西地那非 $[M + H]^+$ 化学式 $C_{22}H_{31}O_4N_6S^+$ 比较 ,由失去 C_2H_2 ,产生 $[M + H - C_2H_2]^+$,二级质谱主要碎片离子为 m/z 311 和 283 ,与文献 [19]报道 M1 为 N^1 , N^4 -去乙基化代谢物一致。

代谢物 M2, $[M + H]^+$ (m/z 461.1960) 结合原药元素组成 (C, H, O, N, S) 及其精确质量数和分子量误差 ($<5 \times 10^{-6}$) ,可推断 M2 $[M + H]^+$ 化学式为 $C_{21}H_{29}O_4N_6S^+$,与原药西地那非 $[M + H]^+$ 化学式 $C_{22}H_{31}O_4N_6S^+$ 比较 ,为失去 CH_2 产生 $[M + H - CH_2]^+$,推断 M2 为原型药物去甲基化代谢产物 ,二级质谱主要碎片离子为 m/z 311 和 283 ,表明 N-去甲基化应发生在哌嗪环上 ,与文献 [1, 18, 19, 20]报道一致。

由代谢物 M3, $[M + H]^+$ 的精确质量数可推断其化学式与 M2 一致 ,但两者的色谱峰保留时间不同 ,可推测与 M2 互为同分异构 ,二级质谱主要碎片离子 m/z 297 和 269 ,表明 N-去甲基化应发生在吡唑环上。Walker 等^[19]对该代谢物进行了报道 ,主要二级质谱碎片离子与本实验一致 ,但只在老鼠和狗的体内检测到该代谢物 ,在人体内未能检测出该化合物。代谢物 M3 二级图谱裂解途径见图 3B。

代谢物 M4, $[M + H]^+$ (m/z 491.2063) 结合原药元素组成 (C, H, O, N, S) 及其精确质量数和分子量误差 ($<5 \times 10^{-6}$) ,可推断 M4 $[M + H]^+$ 化学式为 $C_{22}H_{31}O_5N_6S^+$,与原药西地那非 $[M + H]^+$ 化学式 $C_{22}H_{31}O_4N_6S^+$ 比较 ,增加一个氧原子 $[M + H + O]^+$,初步推断 M4 为原药的羟化代谢产物。二级质谱主要碎片离子 m/z 473, 375, 327, 310, 281 ,与文献 [1, 20]报道一致 ,羟化发生在吡唑环烷烃上。

代谢物 M5, $[M + H]^+$ (m/z 505.1854) 结合原药元素组成 (C, H, O, N, S) 及其精确质量数和分子量误差 ($<5 \times 10^{-6}$) ,可推断 M5 $[M + H]^+$ 化学式为 $C_{22}H_{29}O_6N_6S^+$,与原药西地那非 $[M + H]^+$ 化学式 $C_{22}H_{31}O_4N_6S^+$ 比较 ,推断其可能为 $-CH_3$ 氧化成 $-COOH$ $[M + H + O_2 - H_2]^+$ 。分析结果表明 ,代谢物 M5 与其它已找到的代谢物比较 ,M5 在体内代谢微量。由于代谢物 M5 一级全扫描响应偏低 ,在

Data-dependent 质谱分析中未能得到多级质谱图,为进一步确证代谢物 M5,单独对 M5 作多级质谱扫描,所得二级质谱图碎片离子出现离子峰 m/z 487 和 461,碎片离子 m/z 487 较母离子质子分子离子 $[M+H]^+$ (m/z 505) 减少 18 amu,推测为丢失一个中性分子 H_2O 所致 $[M+H-H_2O]^+$; 碎片离子 m/z 461 较母离子 m/z 505 减少 44 amu,推测其为丢失另一个中性分子 CO_2 所致 $[M+H-CO_2]^+$ 。由二级质谱碎片离子 m/z 487 和 461 产生的 MS^3 质谱图均含特征离子 m/z 311 和 283,结合西地那非的特征离子及裂解规律,推断氧化可能发生在母体哌嗪环的 N 位甲基上。图 3C 为代谢物 M5 的可能裂解途径。

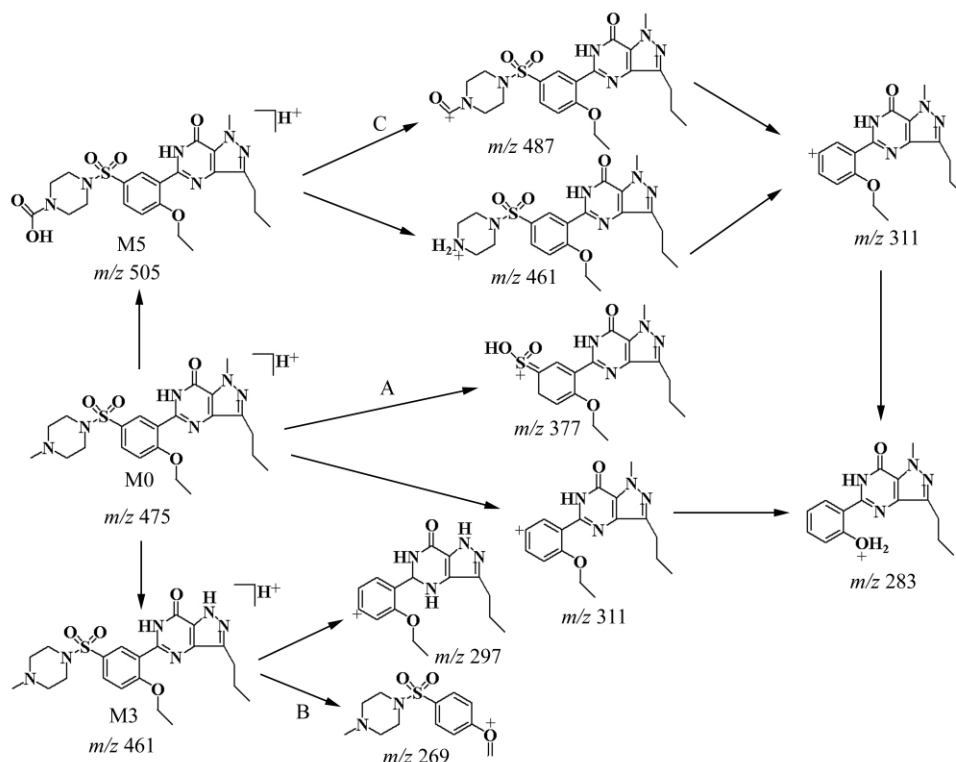


图 3 西地那非及其 2 种代谢物的裂解途径示意图

Fig. 3 Scheme of fragmentation pathways of sildenafil and its two metabolites

A. M0; B. M3; C. M5.

3.5 样品分析

采用本方法分析 2.3 节中的血液和尿样,均检出西地那非。血液中西地那非浓度为 358 $\mu\text{g/L}$ 。按照 2004 年 9 月国际法庭毒理组织 (TIAFT) 公布的血液中毒药物治疗、中毒浓度资料^[21],西地那非的治疗浓度在 0.05 ~ 0.5 mg/L ; 对于中毒浓度,则明确表示要依据其心血管系统功能。本案中死者的法医解剖发现冠状动脉粥样硬化性心脏病的病理学特征,因西地那非可引发低血压反应,从而诱发心脏疾病发作。在文献 [22-23] 报道的死亡案例中,血液中西地那非浓度分别为 105 和 6270 $\mu\text{g/L}$,浓度范围很宽。在实际个案的法医毒理学解释时,除需要考虑心血管系统功能因素外,死者的年龄、健康状况、服药时间、死亡时间、检材的采集时间、部位等因素都是十分重要的因素。运用高分辨质谱 LTQ-Orbitrap 在死者尿液中确认西地那非及 5 种代谢物。由于没有代谢物标准品,未能对代谢物进行定量分析。文献 [20] 表明,按 50 mg 剂量服药 24 h 后在尿中即检测不到西地那非原药。根据积分峰面积判断,原药在本案中尿液中的含量仍较大,结合血液中西地那非浓度,可推断该死者死亡时间应在服药后数小时之内。

本研究采用高质量精度的 LTQ-Orbitrap 质谱确认了尿液中西地那非的 5 种代谢物。由实际案例分析可见,综合运用三重四极串联质谱 (LC-MS/MS) 和电场轨道阱回旋共振组合质谱 (LTQ-Orbitrap) 技术,可更准确、可靠地进行生物检材中毒 (药物) 及其代谢物的定性定量分析及结果解释工作。

References

- 1 Weinmann W , Bohnert M , Wiedemann A , Renz M , Lehmann N , Pollak S. *Int. J. Legal. Med.* , **2001** , 114(4-5) : 252 ~ 258
- 2 Quintero A , Caldera A , Milano B , Odreman I , Hurtado A , Manzanares L , Villamizar J. *Pharmazie* , **2009** , 64(12) : 796 ~ 799
- 3 Al-Ghazawi M , Tutunji M , Aburuz S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **2007** , 43(2) : 613 ~ 618
- 4 Sheu M T , Wu A B , Yeh G C , Hsia A , Ho H O. *J. Chromatogr. B* , **2003** , 791(1-2) : 255 ~ 262
- 5 Saisho K , Scott KS , Morimoto S , Nakahara Y. *Biol. Pharm. Bull.* , **2001** , 24(12) : 1384 ~ 1388
- 6 Nevado J J , Flores J R , Penalvo G C , Farinas N R. *J. Chromatogr. A* , **2002** , 953(1-2) : 279 ~ 286
- 7 Alkharfy K M. *J. Sep. Sci.* , **2009** , 32(22) : 3866 ~ 3870
- 8 Tracqui A , Ludes B. *J. Anal. Toxicol.* , **2003** , 27(2) : 88 ~ 94
- 9 Wang Y , Wang J , Cui Y , Fawcett J P , Gu J. *J. Chromatogr. B* , **2005** , 828(1-2) : 118 ~ 121
- 10 Kim J , Ji H , Lee H W , Lee S S , Kim D S , Yoo M , Kim W B , Lee H S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **2003** , 32(2) : 317 ~ 322
- 11 YANG Shi-Yun , YUAN Zeng-Ping , QIAO Jing(杨士云 , 袁增平 , 乔 静) . *Chinese J. Forensic Med.* (中国法医学杂志) , **2009** , 24(6) : 392 ~ 394
- 12 XU Guo-Wang , YANG Jun(许国旺 , 杨 军) . *Chinese Journal of Chromatography*(色谱) , **2003** , 21(4) : 316 ~ 320
- 13 LIN Yan-Ping , SI Duan-Yun , LIU Chang-Xiao(林艳萍 , 司端运 , 刘昌孝) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2007** , 35(10) : 1535 ~ 1540
- 14 Peterman S M , Duczak N Jr , Kalgutkar A S , Lame M E , Soglia J R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* , **2006** , 17(3) : 363 ~ 375
- 15 Lim H K , Chen J , Sensenhauser C , Cook K , Subrahmanyam V. *Rapid Commun Mass Spectrom.* , **2007** , 21(12) : 1821 ~ 1832
- 16 Herebian D , Lamshoft M , Mayatepek E , Spiekerkoetter U. *Rapid Commun Mass Spectrom.* , **2010** , 24(6) : 791 ~ 800
- 17 Lewis R J , Johnson R D , Blank C L. *J. Anal. Toxicol.* , **2006** , 30(1) : 14 ~ 20
- 18 Kim J , Ji H , Kim S J , Lee H W , Lee S S , Yoo M , Kim W B , Lee H S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **2003** , 32(2) : 317 ~ 322
- 19 Walker D K , Ackland M J , James G C , Muirhead G J , Rance D J , Wastall P , Wright P A. *Xenobiotica* , **1999** , 29(3) : 297 ~ 310
- 20 LIU Wei , SHEN Min(刘 伟 , 沈 敏) . *Jouranal of Chinese Mass Spectrometry Society*(质谱学报) , **2001** , 22(3) : 36 ~ 42
- 21 http://www.gtfc.org/cms/images/stories/Updated_TIAFT_list_202005.pdf
- 22 Dumestre-Toulet V , Cirimele V , Gromb S , Belousoff T , Lavault D , Ludes B , Kintz P. *Forensic Sci. Int.* , **2002** , 126(1) : 71 ~ 76
- 23 Tracqui A , Miras A , Tabib A , Rabib A , Raul JS , Ludes B , Malicier D. *Hum. Exp. Toxicol.* , **2002** , 21(11) : 623 ~ 629

Determination of Sildenafil in Human Blood and Confirmation of Its Metabolites in Urine

CHEN Cong^{1 2} , XIANG Ping² , SHEN Bao-Hua² , ZHUO Xian-Yi^{* 2}

¹(Forensic Medicine Department of Shanghai Medical College of Fudan University , Shanghai 200032)

²(Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine , Institute of Forensic Science ,
Ministry of Justice , Shanghai 200063)

Abstract A method was developed to determine sildenafil in human blood by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS) and identify metabolites of sildenafil in human urine by linear trap quadrupole (LTQ) -Orbitrap. Body fluids were extracted with ethyl ether. Sildenafil in blood was separated using IBD column with a mobile phase consisting of acetonitrile and 20 mmol/L ammonium acetate

buffer including 0.1% formic acid(70: 30 , V/V) . The flow rate was 0.2 mL/min. Then the analyte was analyzed by LC-MS/MS in the positive ion mode; the incurred urine sample was separated by PLRP-S polymeric column. 0.1% formic acid(A) and acetonitrile(B) were used as mobile phase with elution gradient. The metabolites of sildenafil were analyzed by LTQ-Orbitrap. Sildenafil showed a good linear relationship over the range of 5 – 1000 $\mu\text{g/L}$ ($r=0.9972$) . The recovery of sildenafil was 81.3% – 103.3% and the RSD of intra-day and inter-day precision was less than 10% . The detection limit was 1 $\mu\text{g/L}$. Five metabolites were identified in human urine: *N-N*-desethylsildenafil(M1) , demethylsildenafil(M2 , M3) , propyl-oxidated sildenafil(M4) and CH_3 to COOH sildenafil(M5) . M3 and M5 were the first reported in the human body fluids.

Keywords Sildenafil; Metabolites; High performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry; Linear trap quadrupole-orbitrap mass spectrometry; Structure confirmation

(Received 19 October 2010; accepted 18 February 2011)

中国化学会第三届全国“公共安全领域中的化学问题”学术研讨会 (第二轮通知)

由中国化学会主办,首都师范大学、北京微量化学研究所、中国人民解放军防化研究院、中国人民公安大学共同承办的第三届全国“公共安全领域中的化学问题”学术研讨会,拟于 2011 年 8 月 14 ~ 18 日在山东省蓬莱市召开。会议主题是“科学发展与化学安全”,旨在进一步加强国防、公共安全、安全保卫、公众安全与健康等领域的合作与学术交流,为构建和谐社会、维护国家的长治久安作出贡献。热欢迎广大学者、相关单位代表及相关仪器厂商参会,具体事宜请与会务组联系。

一、征文范围

(1) 警务装备、侦查、禁毒、消防、重大活动安全保卫等; (2) 炸药与毒品等危险品的侦检及处置、恐怖预警与危害评估、人身防护材料等; (3) 化学防护、反化学恐怖、化学事故及救援、化武履约等; (4) 食品安全、环境安全、劳动保护、科研与生产安全等; (5) 相关领域的仪器装备研发。(6) 其他: 包括公共安全领域中的分析检测方法研究、非共识化学问题等。

二、会议有关事项

(1) 报到时间: 2011 年 8 月 14 日全天; (2) 报到地点: 山东省蓬莱市海泊西路 25 号, 东方瀚国际度假区(又称“中国湾大饭店”)。

三、会议联系人

刘明 地址: 北京市西三环北路 105 号, 首都师范大学生命科学学院, 邮编: 100048

电话: 010-68903381 转 608, 传真: 010-68904756 邮箱: dianalm@163.com

吴珍珠 地址: 北京市 2709 信箱, 中国化学会, 邮编: 100190

电话: 010-62625583, 传真: 010-62568157 邮箱: wzz@iccas.ac.cn