

# 用 HPLC、LC/MS 方法检测人尿中 Viagra 及其代谢物

刘 伟 沈 敏

(司法部司法鉴定科学技术研究所,上海 200063)

**[摘要]**建立了人体尿液中 viagra 及其代谢产物的 HPLC、LC/MS 检测方法,确认了志愿受试者服用 viagra 的尿液中的代谢产物,并对 viagra 原体及其羟基化代谢物在尿液中的消除进行了研究。结果表明:viagra 服用者尿液中检出三种代谢产物,其中尤以羟基化代谢物量为最大;viagra 原体及羟基化代谢物的检出时限分别为 24 小时和 36 小时。

**关键词:**viagra 代谢物 尿液 HPLC LC/MS

viagra 药物名称为枸橼酸西地那非(sildenafil citrate),香港将其命名为“伟哥”,在中国大陆上市时改名为“万艾可”,为 98 年由美国辉瑞制药有限公司生产的专治阳痿及改善性功能的药物。它作为一种性药,对治疗男性勃起功能障碍有很好的疗效,因而在世界范围内得到了患者的普遍欢迎。目前,viagra 已在 100 多个国家和地区上市,全世界有超过 800 万名患者接受 viagra 的治疗,在我国该药也得上市。随着 viagra 在我国的获准使用,由此引发的有关司法鉴定问题也有可能出现。有关体内 viagra 的检测国外已有报道<sup>[1,2]</sup>,但国内尚未有体内该药物的检测及代谢物研究报道。

本研究用 HPLC、LC/MS/MS 方法对受试者服用 viagra 的尿液进行了检测研究。用 LC/MS/MS 方法,确认了 viagra 在尿液中的三种代谢产物,并对 viagra 原体及其羟基化代谢物在尿液中的消除进行了初步研究。

## 1 实验材料

### 1.1 主要仪器

HP1090/DAD 液相色谱仪;Waters 2690/Micromass Quattro LC/MS 仪

### 1.2 主要试剂

标准溶液配制:精密称取 viagra 标准品,配制成 1 mg/mL 的甲醇溶液作储备液,临用前稀释;0.01 mol/L 乙酸铵缓冲溶液:精密称取分析纯乙酸铵(上海化学试剂总厂出品)0.77 g 于 1000 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度;乙腈:Fisher Scientific 公司提供,HPLC 级;

2001 - 08 - 21 收

第一作者简介:刘伟,女,副研,毒物分析专业,电话:021 - 62042955

水:重蒸水;其它试剂均为分析纯。

## 2 实验条件与方法

### 2.1 实验条件

#### 2.1.1 色谱条件

Supelcosil LC-18-DB 不锈钢柱(250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm), 流动相:乙腈:0.01 mol/L 乙酸铵缓冲溶液为 55:45, 流速为 0.8 mL/min; 柱箱温度 40 °C, 检测波长为 230 nm。

#### 2.1.2 质谱条件

电喷雾电离源 (ESI); 正离子方式; 电离电压:4.06 kV; 锥电压:60 V; 离子源温度:130 °C; 电子倍增器电压:650 V; 喷雾气流速:60 L/hr; 干燥气流速:401 L/hr; 四极杆区真空度: $7.3 \times 10^{-6}$  mBar; 碰撞室气体:氦气; 碰撞室真空度: $1.0 \times 10^{-3}$  mBar; 碰撞能量:15 eV。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 阳性尿液收集

健康志愿者一名,男,50岁,口服“伟哥”片剂 50 mg,分别于 0.5、1、2、4、8~12、12~24 小时收集尿样,计算 24 小时总尿液量,尿液于 -20 °C 下保存。

#### 2.2.2 尿液预处理

取尿液 2 mL 于 5 mL 具塞离心管中,加 1 滴 10% NaOH 溶液调节 pH 值约为 9,混匀后加入 2 mL 氯仿,涡旋混合 30 s 后,以 3000 r/min 离心 2 min,转移氯仿层至另一离心管中,在 60 °C 下用空气吹干,残留物用 30 μL 流动相溶解,同法提取两份,一份取 20 μL 进高效液相色谱仪进行分析,另一份进高效液相色谱/质谱联用仪分析。

在此条件下,尿样中 viagra 原体的保留时间为 6.95 min。尿液中提取物的总离子流色谱图见图 1,viagra 原体的质谱图如图 2 所示。

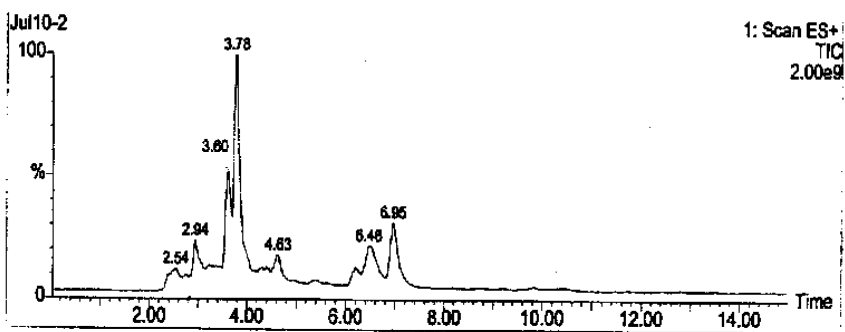


图 1 尿液中提取物的总离子流色谱图

## 3 结果与讨论

### 3.1 viagra 代谢产物的确认

根据 viagra 的化学结构(见图 3 中化合物 )及药物的一般代谢规律,本研究检测出三种代谢产物(见图 3 中代谢物 、 、 ),其相应的质子化分子离子的 m/z 分别为 491、

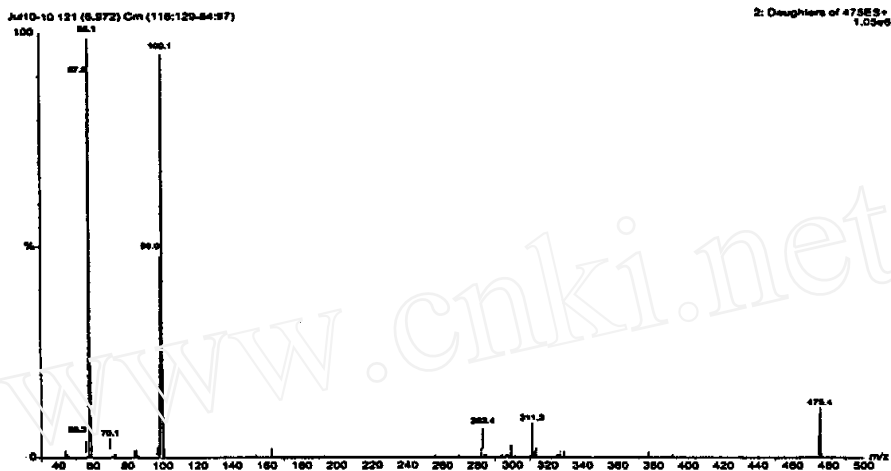


图 2 viagra 原体的质谱图

461 和 449, 采用 LS/MS 的质量扫描方法, 得到在保留时间为 3.78 min 的色谱峰的  $m/z$  为 491, 质谱图上有高丰度的  $m/z$  473 存在, 可认为系分子失水 ( $M - H_2O$ ) 形成, 结合相应的子离子扫描图 (见图 4), 故可推测此为母体吡唑环上烷烃的羟化产物 (见图 3 中代谢物); 保留时间为 6.46 min 的色谱峰的  $m/z$  为 449, 其相应裂解碎片与 N,N - 去乙基化代谢物 (见图 2 中代谢物) 的理论裂解相符从而得以确认 (见图 5)。如图 3 所示, 保留时间为 6.21 min 的色谱峰, 其  $m/z$  为 461, 对应的代谢物可能为代谢产物 或 , 即分别为原药母体中的吡唑环或哌嗪环上 N - 去甲基化的产物。其相应的分子离子峰的质荷比是相同的。采用 LC/MS/MS 对其裂解后的子离子扫描, 结果如图 6 所示, 参照有关的资料<sup>[2]</sup>, 该代谢产物的结构倾向于 而非 。色谱峰中各分子离子峰和相应裂解碎片的质荷比见表 1。

表 1 色谱峰中各分子离子峰和相应裂解碎片的质荷比

序号	保留时间 (min)	分子离子峰的质荷比	主要的裂解碎片的质荷比
1	6.95	475	311, 283, 100, 99, 58
2	6.46	449	418, 392, 361, 311, 283, 58
3	6.21	461	377, 311, 283, 86, 85, 56
4	3.78	491	473, 375, 310, 297, 281, 100, 99, 58

### 3.2 健康志愿者口服 viagra 后尿液中原体及主要代谢物的浓度变化

正常人单次口服 viagra 后, 尿液中 viagra 的浓度与实验者饮水量有关, 本实验未刻意控制实验者的饮食起居, 从而测得尿液中 viagra 原体最高浓度为 0.4847  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在该方法中, 尿中 viagra 检测的线性范围为 0.05 ~ 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 相关系数为 0.9988, 变异系数为 4.96%<sup>[3]</sup>。尿液中主要代谢物为羟化物, 因无 viagra 烷烃羟化物的标准品, 根据 HPLC - DAD 测定结果可折算尿液中代谢物的相对含量。以尿液中所含 viagra 的原体及其羟化物

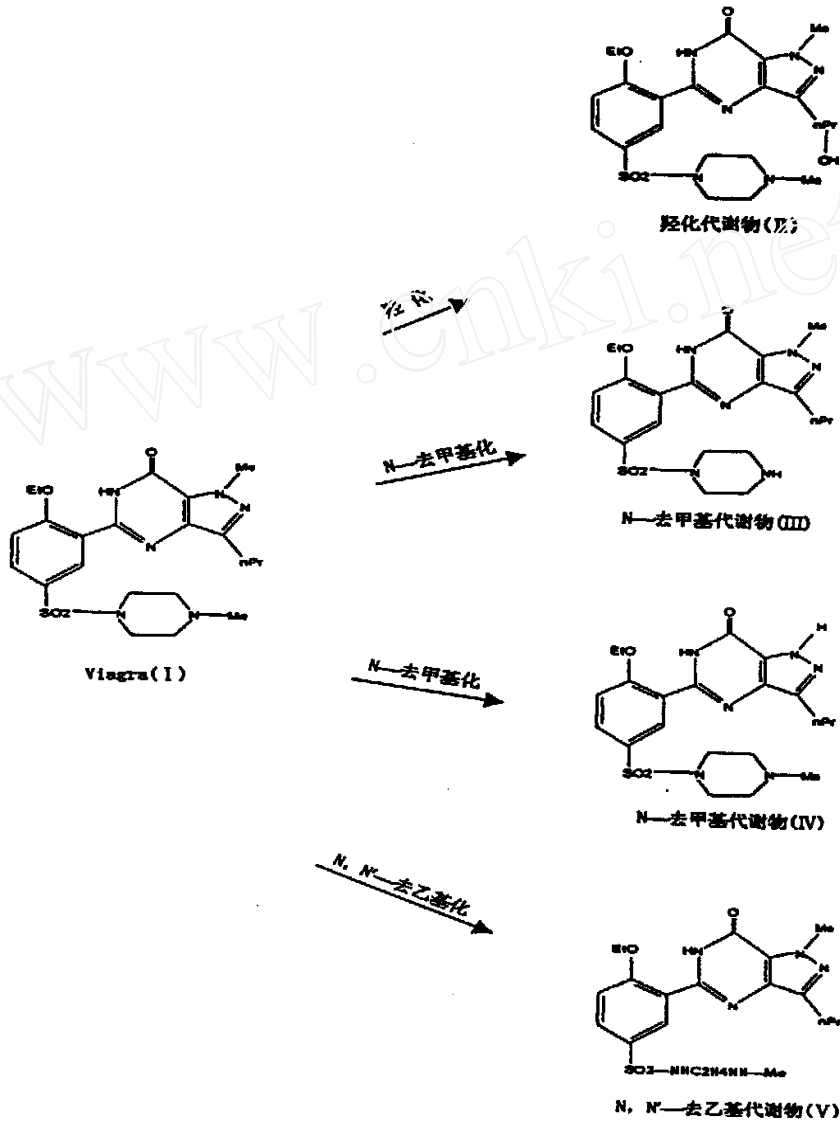


图 3 viagra 在人体内可能的代谢途径

的浓度对相应的阳性尿收集时间作图得到该药物的消除曲线,如图 7 所示。

从图 7 中可见,尿中 viagra 原体的排出高峰为用药后 2 小时,24 小时后即不能检出;服药后尿液中代谢物以羟化物(代谢物 II)为最高,其排出高峰为用药后 4 小时,且在用药后 36 小时仍能检出,此外尿液中亦检出哌嗪环上 N-去甲基化代谢物(代谢物 III)、N,N'-去乙基化代谢物(代谢物 V),它们的消除曲线与羟化物的相类似,但浓度较低。

致谢 本工作得到上海市疾病预防控制中心汪国权先生大力协助特此致谢。

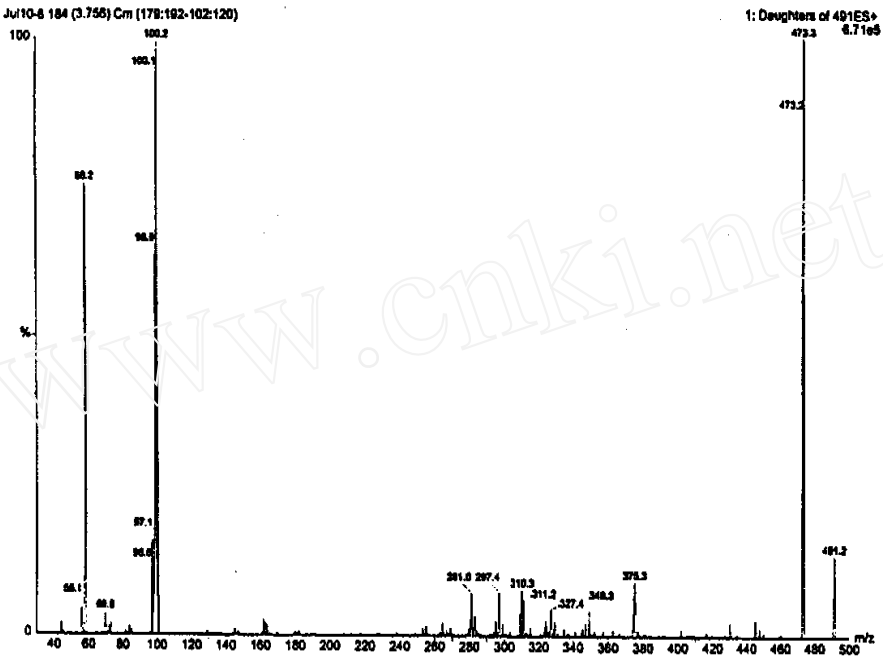


图 4 保留时间为 3.78 min 的色谱峰的质谱图

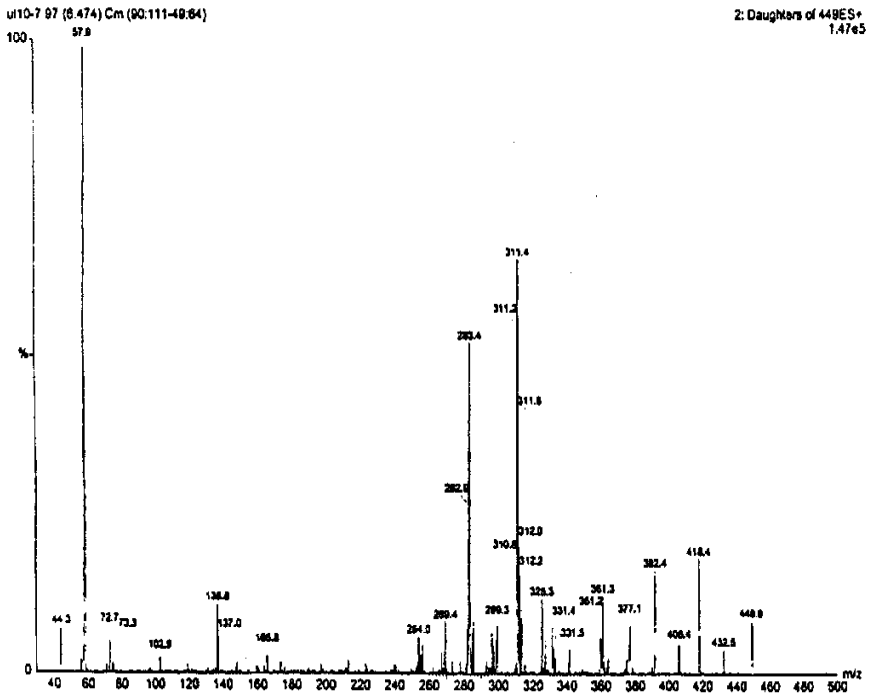


图 5 保留时间为 6.46 min 的色谱峰的质谱图

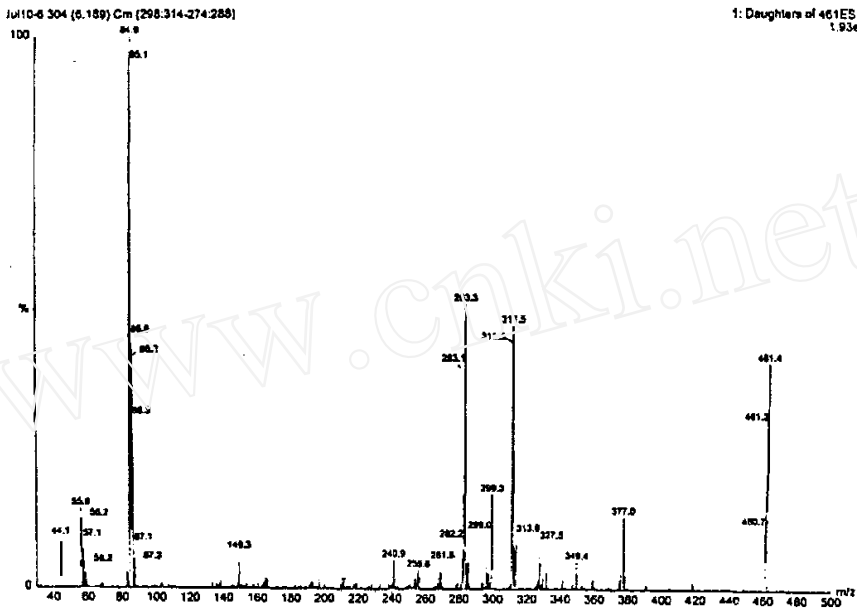


图 6 保留时间为 6.21 min 的色谱峰的质谱图

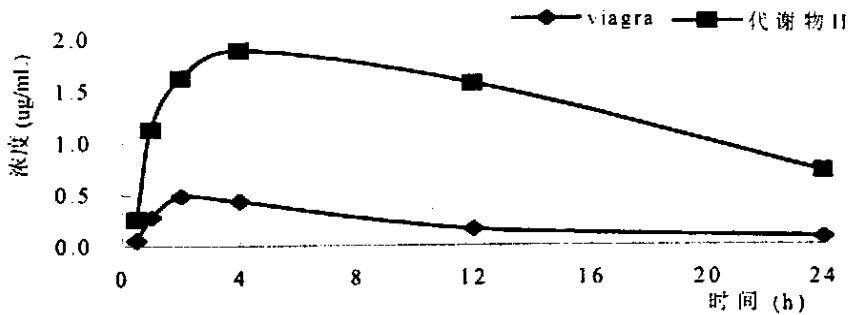


图 7 正常人口服 viagra 后尿中原体及代谢物 的消除曲线

### 参 考 文 献

- 1 Cooper J D , Muirhead D C , Taylor JE *et al.* Development of an Assay for the Simultaneous Determination of Sildenafil (Viagra) and its Metabolite (UK- 103 ,320) Using Automated Sequential Trace Enrichment of Dialysates and High - performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* , 1997 , Nov. 7 ;701(1) : 87 - 95
- 2 Walker D K , Ackland M J , James G C *et al.* Pharmacokinetics and Metabolism of Sildenafil in Mouse , Rat ,Rabbit , Dog and Man. *Xenobiotica*. 1999 Mar ; 29(3) : 297 - 310
- 3 刘伟,沈敏,吴何坚. 用高效液相色谱法检测尿液中的 Viagra 成分. 第三届全国毒物分析学术交流会议论文选,北京:中国人民公安大学出版社,2000

## Determination of Viagra and its Metabolites in Human Urine by HPLC、LC/MS

Liu Wei , Shen Min

(Institute of Forensic Sciences , Ministry of Justice , Shanghai 200053 ,China)

Received 2001 - 08 - 21

### Abstract

Method for the determination of Viagra and its metabolites in human urine by HPLC and LC/MS/MS were established. Three metabolites of Viagra were found in urine samples. The testable time for Viagra and its metabolite were 24 h and 36 h.

Key Words :Viagra , metabolite , urine , HPLC , LC/MS