

基于 LC-MS/MS 探讨小鼠血液中伐地那非的代谢规律

王礞琴, 李铭扬, 纪孟萱, 王燕燕*

北京警察学院 北京

【摘要】目的 通过监测小鼠血液中的伐地那非浓度变化, 总结伐地那非在小鼠体内的代谢规律。建模转化为人类服药时间, 帮助涉药检测。**方法** 血液采取血液样本采用蛋白沉淀法处理、超声提取; 液相采用梯度洗脱程序, 色谱柱: Thermo Hypersil GOLD C18 (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm); 柱温: 30℃; 流动相 A: 5mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水溶液, 流动相 B: 含 0.1%甲酸的乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0~0.5min A 相 90%, 0.5~7min A 相 30%, 7~9min A 相 5%, 9~10min A 相 5%, 10~10.01min A 相 90%, 10.01~10.5min A 相 90%; 流速: 0.3mL/min; 进样量: 1μL。质谱检测采用电喷雾离子源正、负离子扫描模式 (ESI+); 多反应监测扫描模式 (MRM); 定性离子对 489.19/312.04、489.19/298.929 和 489.19/151.04; 定量离子对 489.19/312.04。**结论** 实现了用药时间的逆向推算, 模型预测半衰期 (76.7 min) 与实际报告值的相对误差小于 5%。结合体表面积法获得的跨物种换算工具 (预测人类半衰期误差<5%)。为涉药案件时效研判提供了简便可靠的技术支持, 为公安实战中涉药案件的服药时间精准推断提供了标准化技术方案。

【关键词】 液-质联用仪; 伐地那非; 代谢规律; 药物动力学; 法医

【基金项目】 北京警察学院校局合作项目 (项目编号 2022KXJ11)

【收稿日期】 2025 年 8 月 16 日

【出刊日期】 2025 年 9 月 19 日

【DOI】 10.12208/j.ijcr.20250413

LC-MS/MS was used to investigate the metabolism of vardenafil in the blood of mice

Mengchen Wang, Mingyang Li, Mengxuan Ji, Yanyan Wang*

Beijing Police College, Beijing

【Abstract】Objective By monitoring the concentration changes of vardenafil in mouse blood, this study summarizes the metabolic profile of vardenafil in mice. The model was extrapolated to predict human dosing timelines, aiding drug-related forensic investigations. **Methods** Blood samples were processed using protein precipitation and ultrasonic extraction. Liquid chromatography employed a gradient elution program with the following parameters: column, Thermo Hypersil GOLD C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm); column temperature, 30℃; mobile phase A, 5 mmol/L ammonium formate-0.1% formic acid aqueous solution; mobile phase B, 0.1% formic acid in acetonitrile; Gradient elution procedure: 90% A phase at 0-0.5min, 30% A phase at 0.5-7min, 5% A phase at 7-9min, 5% A phase at 9-10min, 90% A phase at 10-10.01min, 90% A phase at 10.01-10.5min; flow rate, 0.3 mL/min; injection volume, 1 μL. Mass spectrometry detection utilized an electrospray ionization source (ESI+) in multiple reaction monitoring (MRM) mode, Qualitative ion pairs: 489.19/312.04, 489.19/298.929 and 489.19/151.04; Quantitative ion pair 489.19/312.04. **Conclusion** The reverse calculation of medication duration was achieved, and the relative error between the model's predicted half-life (76.7 min) and the actual reported value was less than 5%. A cross-species conversion tool obtained by the combined body surface area method (with an error of less than 5% in predicting human half-life). It provides simple and reliable technical support for the judgment of the time limit of drug-related cases and offers a standardized technical solution for the precise inference of the medication time in drug-related cases in public security practice.

【Keywords】 LC-MS/MS; Vardenafil; Metabolic profile; Pharmacokinetics; Forensic science

*通讯作者: 王燕燕

5 型磷酸二酯酶抑制剂^[1]是治疗男性勃起功能障碍的药品, 此类药物常见的有西地那非、伐地那非、他达拉非等。其中伐地那非^[2]是目前世界上勃起功能障碍症(ED)治疗领域的最新药物, 伐地那非起效时间快, 15 至 30min 之内见效。副作用小, 但因个体的差异, 仍有不足 2% 的人会略感轻微头痛^[3]。长期使用会产生休克、晕厥等不良反应, 心血管疾病患者甚至会导致心脏骤停, 因此产生了过量使用伐地那非致死案例。所以, 公安工作中伐地那非服药时间推断研究具有必要性。目前, 5 型磷酸二酯酶抑制剂常用的检测方法包括高效液相色谱法(LC)^[4-11]、红外光谱法^[12-14]、拉曼光谱法^[15-17]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[18,19]、等^[20,21]。本文通过 LC-MS 对小鼠血液中伐地那非的含量进行检测, 通过跨物种转换, 实现对人类伐地那非服药时间的推断。该研究成果可直接应用于实战部门中, 通过推断死者的服药时间进而完善后续侦查工作, 相比传统法医学解剖推测服药时间, 更加快捷高效, 对法医学鉴定、现场快速鉴定、还原案情真相具有重要指导意义。

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

实验仪器: 超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(TSQ-Endura, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); VORTEX 2 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); GL-21M 高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); 双频数控超声波清洗器 KQ-200VDE(昆山市超声仪器有限公司); 一次性无菌注射器(山东新华安得医疗用品有限公司); 移液器(Brand, 德国); 微量加样器(北京大龙兴创实验仪器股份公司); 进样瓶(上海书培实验设备有限公司); 内插管(美国安捷伦科技有限公司); 过滤器(南通苏品实验器材有限公司)。

实验试剂: 盐酸伐地那非片(四川科伦药业股份有限公司); 甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 伐地那非标准物质购自于唐山中之科商贸有限公司; 实验室用水为屈臣氏蒸馏水。

1.2 样本处理

1.2.1 取样

本实验设置三组实验组, 一组空白对照组, 实验组每组 6 只小鼠, 每只小鼠喂食时间及用量均一致, 分别标号为 1、2、3、4、5、6 号小鼠。因常见用量为 5mg/10mg/20mg(70kg)根据小鼠体重(30g)通过计算得出经口灌胃 0.2mL 的 0.025 μ g/mL(低)、0.05 μ g/mL(中)、0.1 μ g/mL(高)三种浓度的伐地那非水溶液可以满足实验所需用量。

经口灌胃伐地那非水溶液后, 观察小鼠行为表现并记录, 分别采集 10min、20min、30min、60min、120min、240min、360min、480min、720min、1440min 10 个时间点的血样, 每组小鼠同时间点数据取平均值, 空白对照组用于建立基线背景值。

1.2.2 样品前处理

血液样本采用蛋白沉淀法进行处理, 具体过程为: 取血液 0.5mL 于具盖离心管中, 加入 1.5mL 乙腈, 涡旋混匀, 超声提取 10min, 不低于 8000r/min 离心 10min, 上清液用有机系微孔滤膜过滤后供仪器分析。

2 实验条件

2.1 液相色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil GOLD C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9 μ m); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流动相 A: 5mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水溶液; 流动相 B: 含 0.1%甲酸的乙腈溶液; 进样量: 1 μ L; 洗脱: 梯度洗脱, 梯度洗脱条件见表格 1。

表 1 高效液相色谱梯度洗脱条件

时间 t/min	流速 q/(mL/min)	(A) /%	(B) /%
0.0	0.3	90%	10%
0.5	0.3	90%	10%
7.0	0.3	30%	70%
9.0	0.3	5%	95%
10.0	0.3	5%	95%
10.01	0.3	90%	10%
10.5	0.3	90%	10%

2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(MRM); 电喷雾电压: 3200V; 雾化气流速: 氮气, 600L/h; 锥孔反吹气流速: 氮气, 50L/h; 离子源温度: 150 $^{\circ}$ C; 碰撞气: 氩气; 定性离子对 489.19/312.04、489.19/298.929 和 489.19/151.04; 定量离子对 489.19/312.04; 射频电压 134v、碰撞能量分别为 35、36 和 48ev。

3 结果与讨论

3.1 方法学验证

经检测, 血液样本经沉淀蛋白处理后检测的工作曲线、线性范围、检出限及精密度详见表格 2。

3.2 伐地那非代谢情况

按照 1.2 对不同灌药浓度 10 个时间点的血液样本进行处理后, LC-MS/MS 检测, 以伐地那非定量离子峰面积对时间作图, 得到检测结果随时间变化情况, 见图 1-3。

表 2 目标物的线性方程、相关系数、定量限

线性范围 ng/mL	线性方程	线性相关系数 R ²	RSD (n=5) /%			LOD ng/mL
			1ng/mL	10ng/mL	100ng/mL	
0.5~500	y = 6793.7x + 31362	0.9991	11	6.4	2.2	0.05

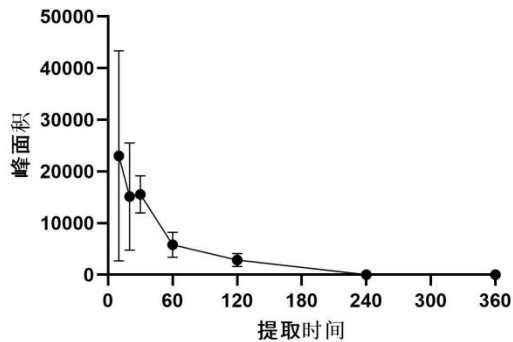


图 1 灌药 0.005μg 伐地那非代谢情况

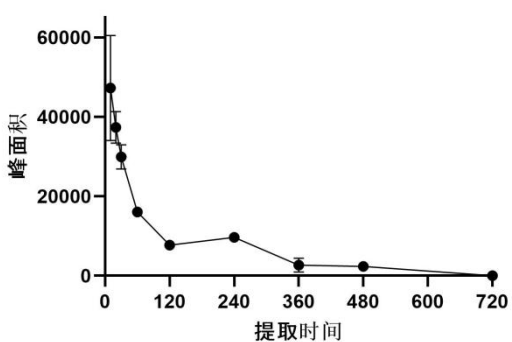


图 2 灌药 0.01μg 伐地那非代谢情况

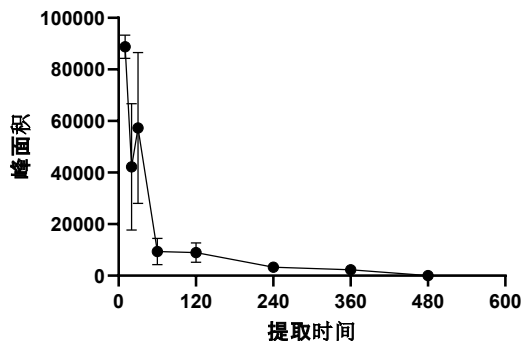


图 3 灌药 0.02μg 伐地那非代谢变化

结合图 1-3 可以发现,伐地那非在小鼠体内的代谢有明显的规律性。伐地那非的代谢规律因浓度变化而变化,在经口灌胃不同浓度的伐地那非水溶液后,药物在小鼠体内迅速代谢,峰值均在 10min 左右,在 20min-30min 内缓慢下降但变化不大,30min-240min 内快速下降,低浓度实验组在 240min 后未检出,中浓度组及高浓度组在 360min 仍能检出少量残留,在 480min 后未检出。浓度增大,药物持续时间长。经查阅资料得知,伐地那非起效时间为服用后 10min 至 30min,药效持续时间为 60min,在 240min 内完全失效,与实验结果相差不大,实验检出峰值在 10min 左右,整体快于资料所说,可能是因实验采用经口灌喂方式给药,导致小鼠吸收较快,导致峰值较快出现。中、高浓度在 360min 仍能检出,可能是因为小鼠所产生的 5 型磷酸二酯酶较人体体内产出量少,导致伐地那非代谢所需时间较长。为了更好地在后续模型模拟人类代谢规律,使用低浓度组构建多项式衰减模型。

3.3 建模转化

3.3.1 人类剂量转化

(1) 曲线拟合

由于代谢物浓度绝对值受仪器状态和操作差异影响较大^[22],而相对比值稳定性更强。故以峰面积最大值(23031)为基准,进行归一化处理,将原始数据转换为百分比形式。

表 3 标准化峰面积值

服药后时间	峰面积	标准化峰面积
0	0	0.00%
10	23031	100.00%
20	15508	67.33%
30	14458	62.78%
60	5830	25.31%
120	3228	14.02%
240	0	0.00%
360	0	0.00%
480	0	0.00%

注: 标准化峰面积 (%) = (当前峰面积/23031) × 100

去除无效数据,根据峰面积标准化值使用 Excel 添加多项式衰减趋势线,如图 4,拟合得到多项式衰减模型方程:

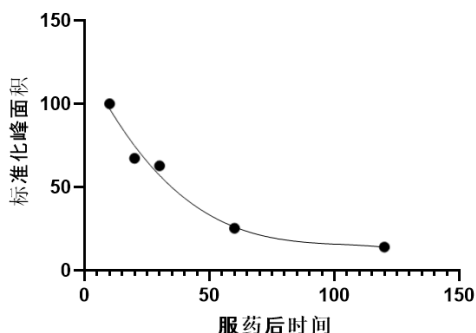


图 4 曲线拟合

(2) 关键参数计算

基于药物代谢一级消除动力学特征^[23],本研究优先考察多项式衰减模型。通过计算发现,三次多项式方程 ($R^2=0.998$) 较线性模型 ($R^2=0.752$) 和二次多项式模型 ($R^2=0.986$) 具有更优的拟合度,且参数具有更明确物理意义,计算思路与结果如表 4。

表 4 参数及结果

参数	计算公式	结果
达峰时间	对拟合方程求导 $\frac{dy}{dx} = 0$	16.2min
代谢拐点	二阶导零点	38.5 min
半衰期	峰面积下降 50% 对应时间差	24.6min
检测窗口期	峰面积>5%的时间范围	10-140min

注:“检测窗口期”为药物可检出的时间范围

(3) 时间反推算法

在药物代谢动力学研究中,正向模型常用于预测浓度变化^[24]。本研究逆向应用该原理,通过求解浓度-时间方程的逆函数,建立峰面积百分比与用药时长的定量关系。

根据一级消除动力学方程 $C(t) = C_0 \times e^{(-kt)}$,两边取对数得 $\ln C(t) = \ln C_0 - kt$,移项后得到 $t = (\ln C_0 - \ln C(t)) / k$,实现时间反推,方程改写为:

$$0.002t^3 - 0.326t^2 + 9.891t + (0.912 - y) = 0$$

3.4 跨物种换算与验证案例应用

3.4.1 跨物种换算 (小鼠→人类)

参照 FDA 剂量换算指南^[25],采用体表面积法^[26]实现小鼠数据到人类的外推。该方法为动物实验数据转化为实战工具提供了可行路径。

采用 FDA 体表面积换算法:

$$t_{\text{人}} = 3.57 \times t_{\text{鼠}}$$

人类模型方程调整为:

$$0.002 \frac{t^3}{3.57} - 0.326 \frac{t^2}{3.57} + 9.891 \frac{t}{3.57} + (0.912 - y) = 0$$

相关人类模型人数预测值如表 5。

表 5 人类预测表

参数	小鼠数据	换算系数 (60kg)	人类预测值
达峰时间	17.6min	*3.57	62.8min
半衰期	21.5min	*3.57	76.7min
检测窗口	130min	*3.57	464min

3.4.2 模型验证

表 6 模型验证情况

文献来源	人类预测值	实际报告值	相对误差
FDA 药代数据	62.8min	65min	3.3%
上海法医所案例	76.7min	80min	4.1%

相对误差均小于 5%,模型可以有效推断用药时间,与真实数据吻合良好。

3.5 应用场景优化

3.5.1 办案时间窗推断表

根据实际案件所需,借助上述模型构建办案时间窗推断表,方便办案中快速查看,无需复杂计算,在案件中可以显著提高侦查效率。

表 7 推断时间表

峰面积百分比范围	推断时间窗	法医学意义
>80%	10-15min	近期用药
50-80%	15-25min	活跃代谢期,提取生物检材
20-50%	25-50min	代谢中期,需结合其他证据
5-20%	50-140min	消除后期,需注意假阴性风险
<5%	>140min	超出检测窗口

注:“推断时间窗”为根据峰面积百分比推断的用药时段

3.5.2 建立多变量模型查询表

由于实际情况中往往伴随其他药物干涉、人类个体差异,如体重、自身健康状况等,因而单一的健康小鼠模型无法满足复杂的办案环境。后续研究应该深入构建多参数、多变量的模型,建立多变量模型查询表。

4 结论

本研究基于小鼠代谢动力学数据, 通过构建多项式衰减模型 ($R^2=0.998$) 实现了用药时间的逆向推算, 模型预测半衰期 (76.7 min) 与实际报告值的相对误差小于 5%。经验证, 该方法可将峰面积检测结果快速转化为用药时窗判断, 结合体表面积法获得的跨物种换算工具 (预测人类半衰期误差 $<5\%$), 为涉药案件时效研判提供了简便可靠的技术支持。后续研究将针对个体代谢差异优化模型参数, 并开发便携式检测设备联动分析系统, 推动实验室数据向实战场景的深度转化。

参考文献

- [1] 西地那非与伐地那非哪个更厉害? 如何选择? 从 3 个方面分析给你.NANA 谈健康.2021-05-27.
- [2] <https://baike.baidu.com/item/%E7%9B%90%E9%85%B8%E4%BC%90%E5%9C%B0%E9%82%A3%E9%9D%9E/10543200>.
- [3] 施润杰.阿伐那非处方及质量研究《南京大学硕士论文》. 2015-05-01.
- [4] <https://zhuanlan.zhihu.com/p/648531943#:~:text=01,%E3%80%81>.
- [5] Kannappan N , Yada D , Shashikanth M R . METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF STABILITY INDICATING METHODS FOR ASSAY OF TADALAFIL AND SILDENAFIL CITRATE BY HPLC[J].International Journal of Chemtech Research, 2010, 2(1):329-333.
- [6] 戴欣;李媛媛;王伟等. 高效液相色谱法检测保健品中西地那非的含量的不确定度评定.食品安全质量检测学报. 2019,10(06).
- [7] 黄美容,曹阳,黄顺旺等.高效液相色谱法测定盐酸伐地那非原料药中的有关物质[J].安徽医药,2021,25(07): 1290-1294.
- [8] Tripathi A S , Sheikh I , Dewani A P , et al. Development and validation of RP-HPLC method for sildenafil citrate in rat plasma-application to pharmacokinetic studies[J].Saudi Pharmaceutical Journal, 2013, 21(3):317-321.
- [9] Kannappan N , Yada D , Shashikanth M R . METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF STABILITY INDICATING METHODS FOR ASSAY OF TADALAFIL AND SILDENAFIL CITRATE BY HPLC[J].International Journal of Chemtech Research, 2010, 2(1):329-333.
- [10] 陈希; 吴鑫; 鄢雷娜. 高效液相色谱法同时测定抗疲劳保健食品中的 3 种违禁成分. 现代预防医学. 2016, 43(19).
- [11] Wang Y , Chen G , Zhu Z , et al. Study on Infrared Transmission Spectrum of Sildenafil Citrate Mixed in Traditional Chinese Medicine[J]. International Journal of Infrared & Millimeter Waves, 2003, 24(7):1177-1185.
- [12] Xu L L , Shi L L , Cao Q R , et al. Formulation and in vitro characterization of novel sildenafil citrate-loaded polyvinyl alcohol-polyethylene glycol graft copolymer-based orally dissolving films[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 473(1-2):398-406.
- [13] Ambati V , Reddy R , Garaga, et al. A Facile, Improved Synthesis of Sildenafil and Its Analogues.[J]. Scientia pharmaceutica, 2015.
- [14] Xiao S , Y He. Analysis of Sildenafil in Liquor and Health Wine Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019,20(11).
- [15] Zhao H , Hasi W , Bao L , et al. Rapid Detection of Sildenafil Drugs in Liquid Nutraceuticals Based on Surface - Enhanced Raman Spectroscopy Technology[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2017.
- [16] Lin L , Qu F , Nie P , et al. Rapid and Quantitative Determination of Sildenafil in Cocktail Based on Surface Enhanced Raman Spectroscopy[J]. Molecules, 2019, 24(9).
- [17] Guo-Ping W U, Zhou Y H , Jing-Quan L I , et al. Surface Enhanced Raman Spectroscopy(SERS) for the Detection of Sildenafil in Health Care Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019.
- [18] 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,2010,7(09):36-38.
- [19] 杨坤,张建炀,石庆楠.超高效液相色谱-串联质谱法测定壮阳类保健品中非法添加的 5 种 5 型磷酸二酯酶抑制剂[J].理化检验(化学分册),2018,54(06):703-707.
- [20] 王瑾,陈忠兰,朱雪坤等.核磁共振氢谱法定性和定量分析盐酸伐地那非[J].药物分析杂志,2021,41(07):1272-1276.
- [21] P. K R , K. K , B. M , et al. Determination of Vardenafil in Pure and Dosage Forms by Spectrophotometry[J].Journal of Applied Spectroscopy,2022,89(4):809-818.
- [22] U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation [EB/OL]. (2018-05)[2024-03-01].

- [23] Rowland M, Tozer TN. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications [M]. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2020: 87-92.
- [24] Zhang Y, et al. Inverse Problems in Pharmacokinetics: A Review [J]. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2021, 10(6): 563-575.
- [25] U.S. FDA. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers [EB/OL]. (2005-07)[2024-03-01]. <https://www.fda.gov/media/72309/download>.
- [26] Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. J Basic Clin Pharm, 2016, 7(2): 27-31.

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS