

*Prikaz bolesnika/
Case reports*

Correspondence to:

Dipl. bioh. Gordana Brajković,
specijalista toksikološke hemije
Vojnomedicinska akademija, Centar za
kontrolu trovanja, Beograd
Tel/Phone: +381-11-3609481

gocab@panet.rs

**ANALITIČKA POTVRDA SILDENAFILA
(VIAGRA) PRIMENOM METODE TEČNE
HROMATOGRAFIJE SA MS I PDA
DETEKCIJOM. Prikaz slučaja**

**ANALYTICAL CONFIRMATION OF SILDE-
NAFIL (VIAGRA) USING LIQUID CHRO-
MATOGRAPHY METHOD WITH PDA AND
MS DETECTION. Case reports**

Gordana Brajković, Vesna Kovačević, Vesna Kilibarda
Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Ključne reči

Sildenafil; toksikološko-hemijska analiza;
hromatografija; tečna; spektrometrija.

Key words

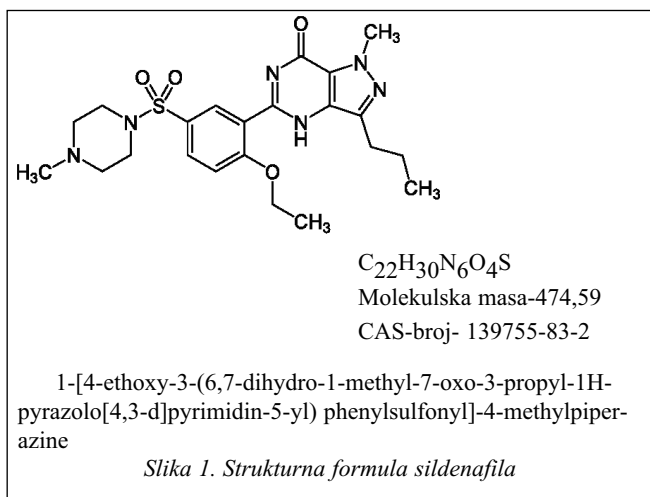
Sildenafil; toxicology-chemical analysis;
chromatography; liquid; spectrometry.

Abstract

The paper describes case of death, S.Đ., 27 years old who was found dead in his apartment. Toxicology-chemical analysis of blood, urine, gastric contents and body tissue samples proved the presence of morphine, 6-monoacetilmorfina and drug sildenafil, which was determined by liquid chromatography coupled with diode-array detection (DAD) and confirmed technique of liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS), where data are collected either in full-scan ES+ mode at m/z 100-450. Sildenafil was isolated from plasma or urine using a liquid- liquid extraction with chloroform-izopropanol (9:1) at pH 9.0 with satisfactory extraction recoveries. Separation was achieved on the Symmetry® C8 column with mobile phase acetonitrile: dihidrogen sodium phosphate 50 mM pH 3.6 in the gradient mode, and XTerra® RP18 column with a mobile phase: 5 mM ammonium acetate (pH 3.5): acetonitril with 0, 1% acetic acid. The method is validated blood and linear in the range of 20-1000 ng/mL ($r^2 > 0.99$). Limit of detection was 10 ng/mL and limit of quantification was 20 ng/mL. Because of its good sensitivity HPLC-PDA-MS is a reliable technique.

UVOD

Sildenafil je lek koji se koristi za lečenje erektilne disfunkcije i plućne arterijske hipertenzije. Razvila ga je farmaceutska kompanija Pfizer i dostupan je u prodaji od 1998. godine.



Sildenafil ima pirazilo pirimidil metilpiperazinsku strukturu (sl 1.). Sildenafil se brzo absorbuje iz gastro-intestinalnog trakta. Poluvreme absorpcije je 15 min. Pik maksimalne koncentracije u plazmi dostiže posle 0,5-2 sata u zavisnosti od uzimane hrane. Podležu metabolizmu u jetri pod dejstvom citohrom P450 i CYP3A4 (glavni put) i CYP2C9 (manji put) gde se deacetiluje u N-desmetilsildenafil (UK-103,320). Ako se uzima mastan obrok absorpcija se smanjuje. Veći deo sildenafil i njegovih metabolita se ekskretuje fecesom (oko 80% od unesene doze), a manji deo urinom (oko 13%), manje od 2% nepromenjen. Poluživot u plazmi za sildenafil je 3-5h, a za N-desmetilsildenafil 4h. Transportuje se 96% vezivanjem za proteine plazme. Doza koja se preporučuje je 50mg. Pri konzumiranju jedne tablete od 100mg koncentracija sildenafil u plazmi nakon 2-3h bila je od 0,296mg/L do 0,325mg/L, a koncentracija metabolita (UK-103,320) u plazmi od 0,116 mg/L do 0,160 mg/L. (1,3,4)

Mehanizam delovanja:

Polno uzbudenje uzrokuje povećano otpuštanje azot oksida s neholinergičnih i neadrenergičkih parasimpatičkih nervnih završetaka u zidovima arterija kavernoznog tela penisa. NO difunduje u ćelije glatkih mišića, zidove krvnih

sudova i stimuliše citoplazmatičnu guanil-ciklazu na povećanu produkciju cGMP-a. Povećanje cGMP-a uzrokuje erekciju. Nakon prestanka seksualne stimulacije spušta se količina NO te se smanjuje koncentracija cGMP-a u glatkim mišićima jer se smanjuje sinteza preko GC koja je u korelaciji sa njegovom razgradnjom preko PDE5. Promene u bilo kojem od faktora: psihološkom, hormonskom, neurološkom, vaskularnom ili kavernožnom uzrokuju nekih od koraka erekcijske disfunkcije u oko 50% muškaraca u dobi od 40 do 70 godina. Tkivne količine cGMP-a odedene su ravnotežom između guanil ciklaze (GC) koja katalizuje nastajanje cGMP-a iz guanozin trifosfata (GTP) i cikličnih nukleotid-fosfodiesteraza koje katalizuju razgradnju cGMP-a u GMP-a. Sildenafil podrazumeva oslobađanje NO u kavernožnom telu (*corpus cavernosum*) penisa. NO se vezuje za receptore enzima guanil ciklaze povećavajući cGMP-a, posredno time smanjuje količinu kalcijumovih jona u ćelijama glatkih mišića što rezultira relaksacijom muskulature i protoka krvi u penis dovodeći do erekcije. Sildenafil je snažan i reverzibilan inhibitor fosfodiesteraze tipa 5 (PDE5) koja je odgovorna za degradaciju cGMP-a, što uslovljava povećanje količine cGMP-a. Ova osobina sildenafilu iskorišćena je u lečenju patoloških stanja kao što je erekcijska disfunkcija i plućna hipertenzija uzrokovana hipoksijom koje su posledica smanjenja unutarćelijske količine cGMP-a što uzrokuje povećanu aktivnost PDE5. Sildenafil je kontraindikovano kod ljudi koji upotrebljavaju organske nitrate, jer povećana koncentracija može izazvati nagli pad krvnog pritiska.

Najčešće nuspojave vezane za ovaj lek poput glavobolje, dispepsije, laganog sniženja krvnog pritiska, ili kongestije nosne sluznice posledice su PDE5 inhibicije. Poremećaji vida uzrokovani su inhibicijom retinalne PDE6. Red selek-

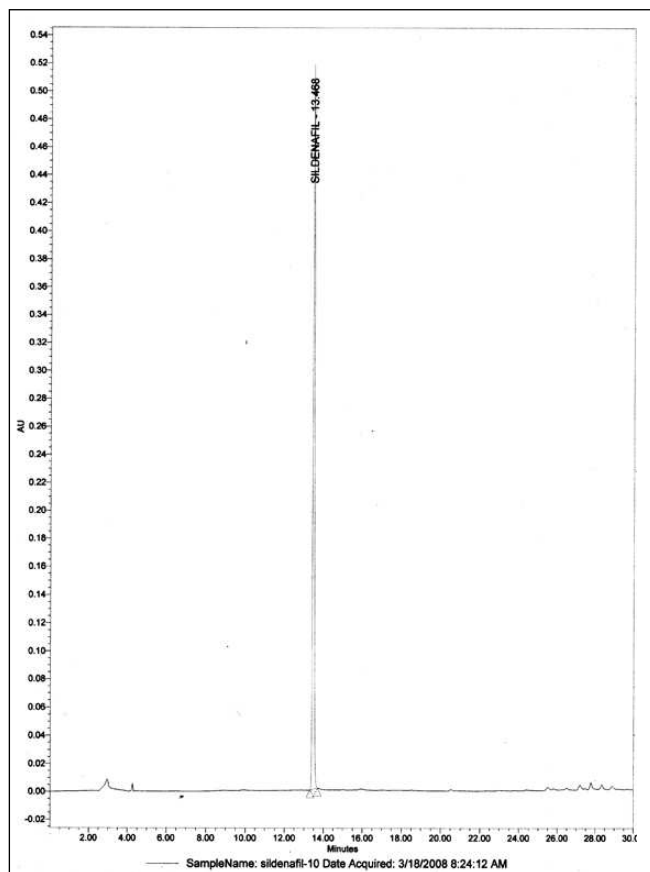
ktivnosti za pojedine PDE porodice PDE5 > PDE6 (10 puta manja) > PDE1 (80 puta manja) > PDE2, PDE4, PDE7, PDE8, PDE9, PDE10, PDE11 (700 puta manja) > PDE3 (4000 puta manja). PDE6 je u najbližjoj vezi sa PDE5 pa sildenafil inhibira obe porodice. Smetnje vida je jedna od nuspojava koja se javlja najčešće tek kada se prekorači maksimalna dnevna doza. Vrlo visoka selektivnost onemogućava delovanje na PDE3 uključena u kontrolu kontraktilnosti srčanog mišića. Inhibicija PDE5 sildenafilom povećava antiagregacijsku aktivnost NO u trombocitima, formiranje tromba i perifernu arterio-vensku dilataciju. (8,4)

Uz sildenafil se u terapiji erekcijske disfunkcije upotrebljavaju tadalafil i vardenafil koji su mu hemijski vrlo slični. Sildenafil se proizvodi u tabletama od 25mg, 50mg, 100mg. (2)

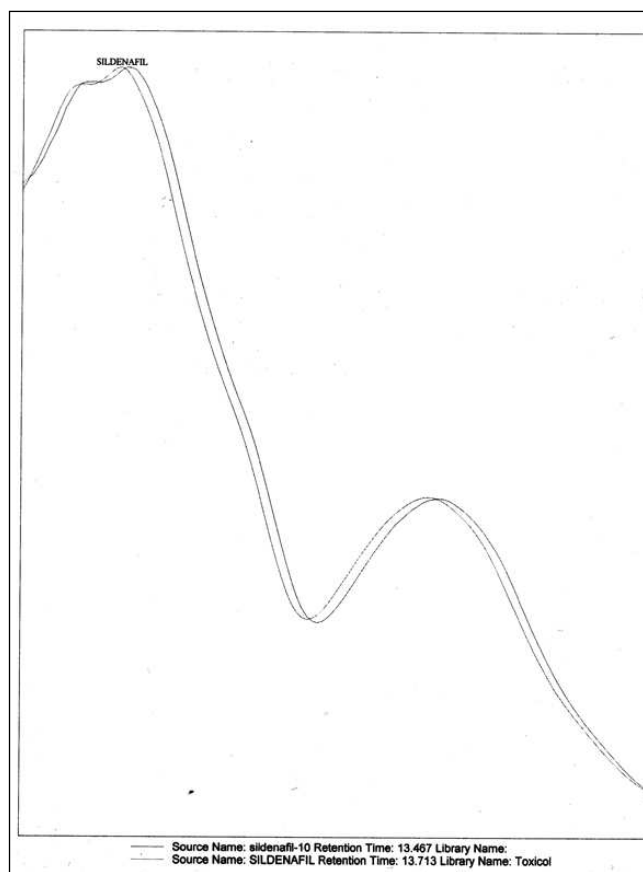
Akutno uzimanje opijata i sildenafilu proizvodi abnormalno visoke koncentracije cGMP-a u perifernim nervnim završecima, što rezultira u produženju erekcije i posle orgazma. Korisnici ga mešaju sa metilendioksimetamfetaminom (MDMA) ili ekstazijem. Naše odeljenje je imalo iskustva da je pacijent koristio kombinaciju sildenafilu sa kokainom. Mešanje sa amil nitritom može biti potencijalno smrtonosno. U literaturi su zabeleženi smrtni slučajevi pri koncentracijama od 6,27 µg/mL u krvi koji su bili udruženi sa oboljenjima dijabetes melitus, hipertenzijom, hroničnim alkoholizmom i poremećajem erekcije. (6)

Materijal i metode

Uzorci krvi, urina, želudačnog sadržaja i tkiva organa uzeti su od pokojnog S. Đ. Biološki uzorci (krv, urin i tkiva organa) uzimaju se i čuvaju na temperaturi od -20°C. Hloroform, amonijak, acetonitril i metanol (HPLC čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Nemačka, izopropanol od



Slika 2. UV hromatogram std sildenafilu opterećenju plazmi



Slika 3. UV spektar std sildenafilu u opterećenju plazmi

Sigma-Aldrich (HPLC čistoće). Reagensi mobilne faze: natrijum dihidrogen fosfat koji su korišćeni za analizu dobijeni su od *Sigma-Aldrich*, p.a. Sildenafil je određen tehnikom tečne hromatografije u sprezi sa PDA detektorom i bibliotekom UV spektara. Hromatografski uslovi za HPLC-PDA: Mobilna faza: acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 doteran sa H₃PO₄ (20%), Mobilna faza je filtrirana i degazirana preko membranskog filtra; kolona Symmetry® C8 4,6x250mm Waters sa pretkolonom Sentry Guard Symmetry® C18, temperatura kolone: 30°C, brzina protoka mobilne faze: 1-1,5 mL/min gradijent: PDA detektor: $\lambda = 230,0$ nm; retenciono vreme za sildenafil: Rt \approx 13,416.

Određivanje sildenafilu vršeno je tečnom hromatografijom sa maseno-spektrometrijskim detektorom LC-MS. Hromatografski uslovi za LC-MS: Tečno-maseni hromatograf Waters Alliance 2695, Mass Lynx, Kolona XTerra® RP18 3,5 μ m 2,1mm x 150mm, temperatura kolone 20°C. Mobilna faza: Komponenta A: 5 mM amonijum acetat pH 3,5 doteran sa sirćetnom kiselinom Komponenta B: acetonitril sa 0,1% sirćetnom kiselinom. Autosempler: temperatura 20°C, dužina analize 26min. Temperatura izvora 125°C, temperatura desolvatacije 430°C; Protok gasa: desolvatacioni 400L/h, konusni 50L/h

Protok mobilne faze: 0,2mL/min, gradijent; Napon na kapilari 4 kV. Maseni spektrometrijski detektor je optimiziran i podešen na pozitivan mod ES⁺, opseg masa od 100-500, scan time 1. retenciono vreme za sildenafil: Rt \approx 13,37.

Uzorci krvi, urina i želudačnog sadržaja dobijeni od pokojnika u zapremini 5ml zaalkalisani su sa 100 μ L NH₄OH (pH 9,0) i ekstrahovani sa tri puta većom zapreminom smeše hloroformom : izopropanol (9:1). Posle ekstrakcije suvi ostatak rekonstituisan je u mobilnoj fazi i analiziran HPLC-PDA metodom.

Uzorci tkiva organa homogenizovani, preliveni sa oko tri puta većom količinom 70% etanolom, profiltrirani, zaalkalisani sa 1-2ml NH₄OH do pH 9,0 i ekstrahovani u toku 24h sa dva puta većom količinom smeše rastvarača hloroformom : izopropanol (9:1). Organska faza (donji sloj) je prebačena u posudu za uparavanje i uparena do suvog ostatka u struji vazduha. Pomoću 3-4 mL smeše hloroform-izopropanola (9:1) kvantitativno je prenešen ekstrakt iz posudice u epruvetu, uparen do suvog ostatka u struji vazduha, rekonstituisan u 1 mL mobilne faze i hromatografisan. Određivanje koncentracije vršeno je poređenjem površine pikova analiziranih jedinjenja sa odgovarajućim pikovima plazme opterećenih standardnim rastvorima poznate koncentracije.

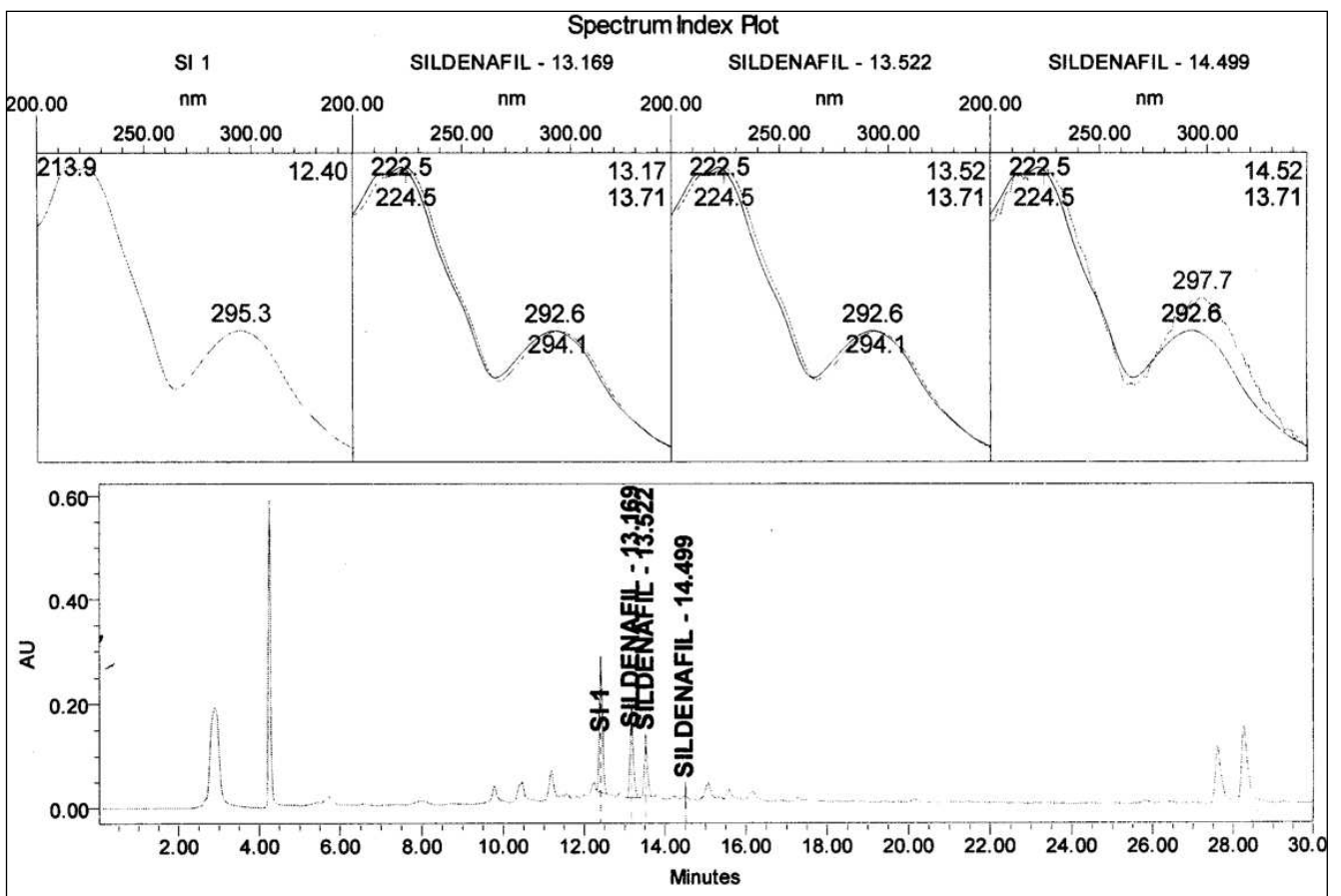
REZULTATI

Uvedene su metode HPLC/PDA-MS za dokazivanje i određivanje sildenafilu u biološkom materijalu.

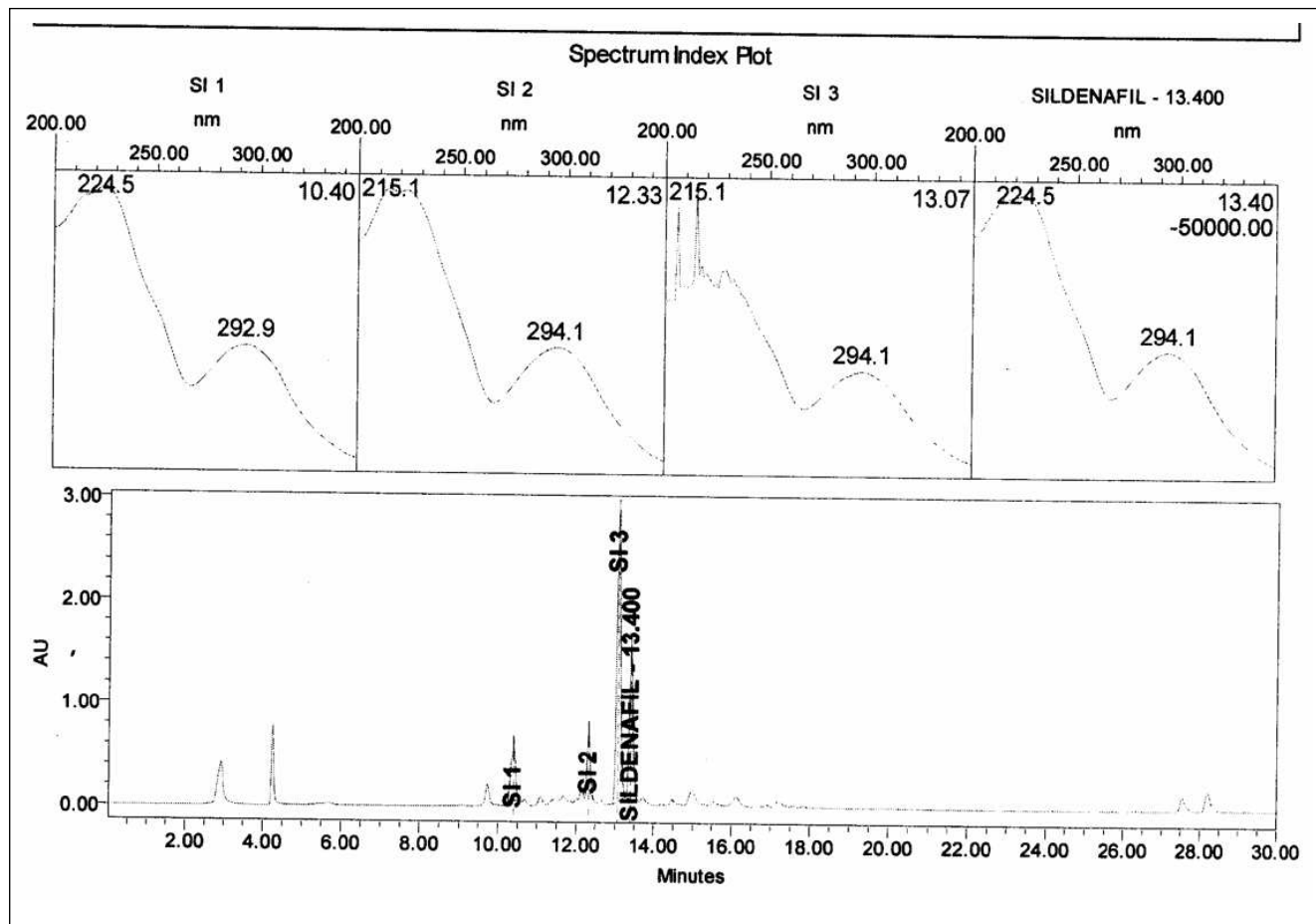
Na slikama 2-3 prikazani su hromatogram i UV spektar standarda sildenafilu koji se poklapa sa UV spektrom iz biblioteke spektara.

Na slikama 4, 5, 6, prikazani su hromatogrami i UV spektri sildenafilu i njegovih metabolita u tkivima organa tankog i debelog creva, jetre i bubrega. U ovim uzorcima predpostavlja se da je detektovano i prisustvo njegovih metabolita (kojih nema u UV toksikološkoj biblioteci spektara), a zbog slične hemijske strukture imaju veoma slične UV spektre sa sildenafilom.

Metoda je validovana i linearna u rasponu 50-2000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50ng/L sa prinosom od 74,5 – 91,2%. Korišćenjem veće zapremine uzorka od 5ml možemo postići LOD i LOQ 5 i 10 ng/ml.

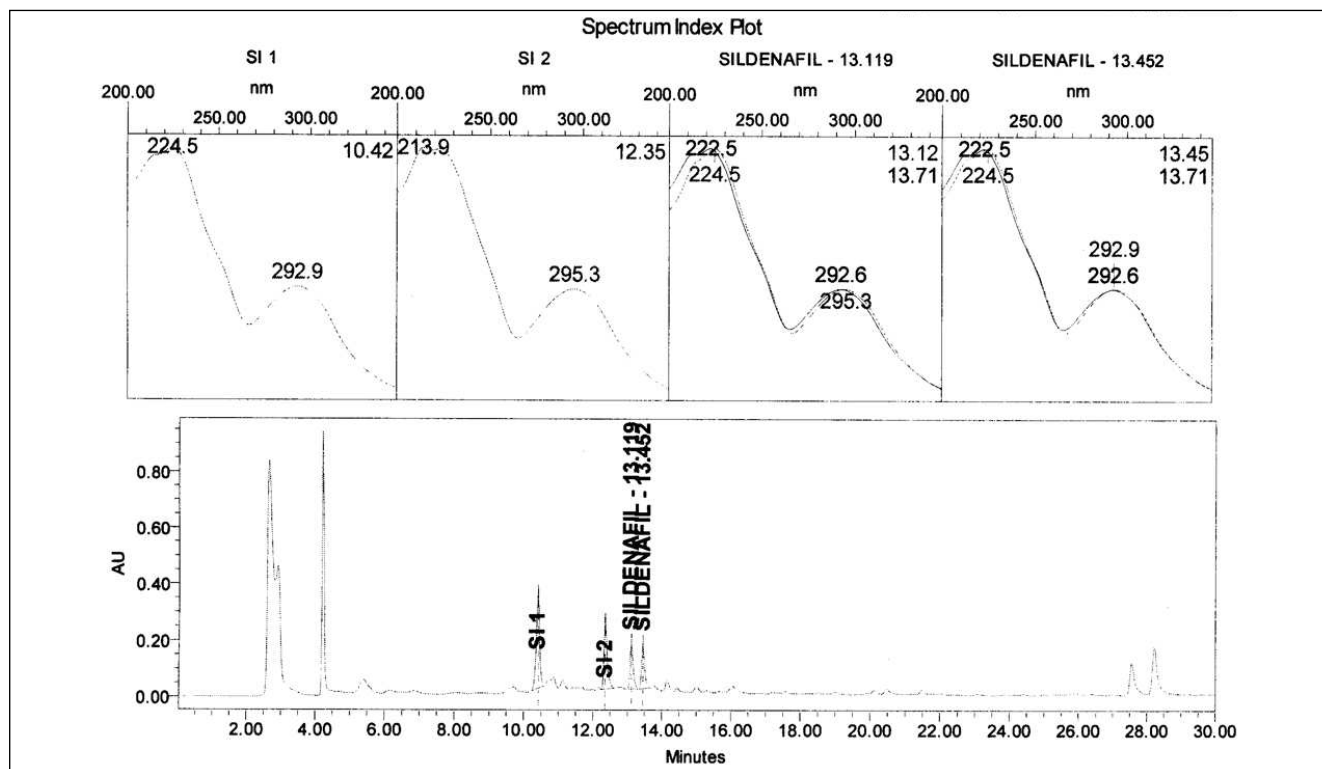


Slika 4. UV hromatogram i spektri Sildenafilu i njegovih metabolita iz uzorka tkiva organa tankog i debelog creva



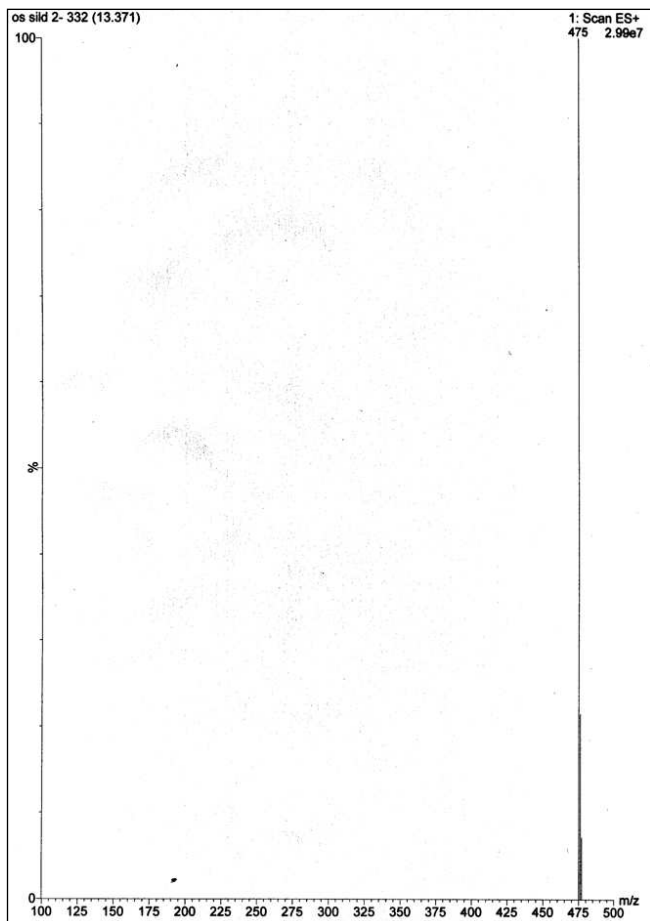
Slika 5. UV hromatogram i spektri sildenafili i njegovih metabolita iz uzorka tkiva organa jetre

68

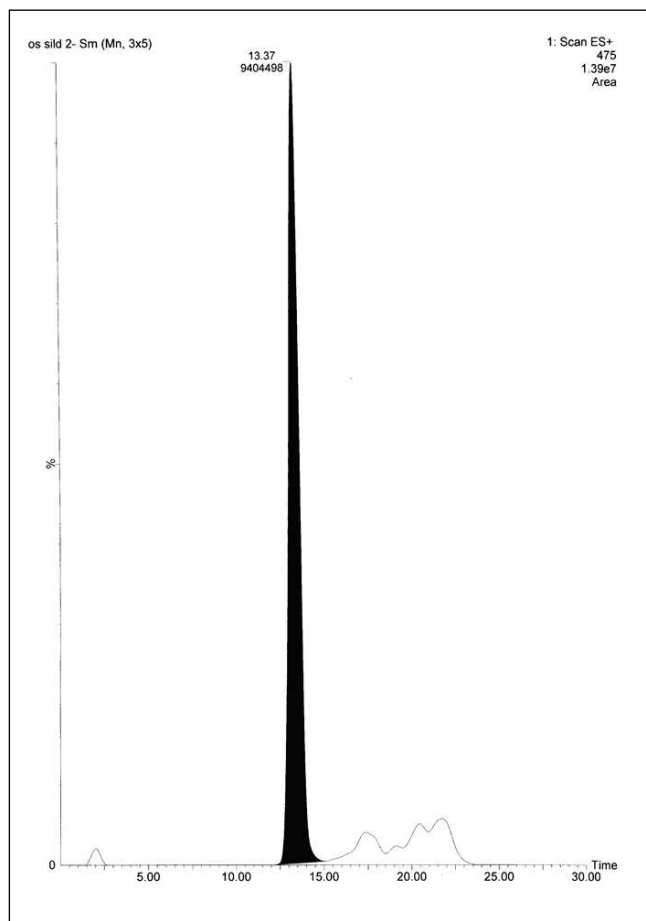


Slika 6. UV hromatogram i spektri sildenafili i njegovih metabolita iz uzorka tkiva organa bubrega

Na slikama 7-8 prikazani su hromatogram i MS spektar sildenafilu selektovan na jon 475.



Slika 7. Maseni spektar sildenafilu



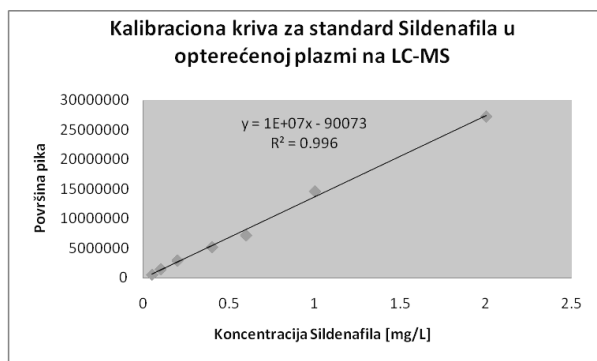
Slika 8. LC-MS hromatogram sildenafilu

Kalibracione krive za sildenafil su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, sa srednjim vrednostima površine pikova za svaku koncentraciju, korišćenjem programa Excel 5. Istim programom su izračunati koeficijenti korelacije (r) i jednačina prave $y = a \pm bx$.

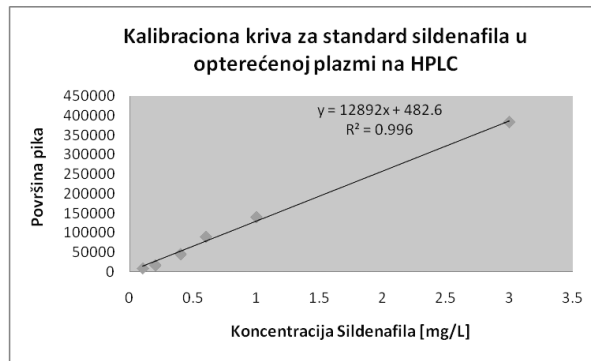
Na slikama 9-10 prikazane su kalibracione krive kolhicina na HPLC i LC-MS.

Primenom uvedenih metoda, izvršena je analiza uzoraka krvi, urina, želudačnog sadržaja i tkiva organa. HPLC-PDA metodom sildenafil je dokazan u uzorcima urina (0,84mg/L), želudačnom sadržaju (3,5mg/L), jetri i žučnoj kesi (1,1182mg/kg), bubregu (0,1359mg/kg), želucu (0,9834mg/kg), crevima (0,0692mg/kg), srcu, plućima i

slezini (0,0067mg/kg) čiji su UV spektri potvrđeni. U ovim uzorcima detektovano je i prisustvo njegovih metabolita. U uzorcima krvi i mozga nije detektovano prisustvo sildenafilu i metabolita. U uzorcima biološkog materijala dokazano je i prisustvo opijata i to u krvi morfin (2,6ng/L), urinu morfin (193,4ng/mL) i 6-monoacetilmorfin (684,2ng/mL); želudačnom sadržaju morfin (216,2ng/mL) i 6-monoacetilmorfin (588,6 ng/mL); jetri i žučnoj kesi morfin (11,6ng/kg); bubregu morfin (24,7ng/kg) i 6-monoacetilmorfin (79,1ng/kg); želucu morfin (8,4ng/kg) i 6-monoacetilmorfina (22,9ng/kg); crevima morfin (4,3ng/kg) što ukazuje na upotrebu heroína.



Slika 9. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećenu plazmu standardnim rastvorima sildenafilu



Slika 10. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećenu plazmu standardnim rastvorima sildenafilu

Prikaz slučaja

Prema podacima sa scene smrti, S.Đ., star 27 godina je nađen mrtav u svom stanu, u popodnevnim satima. U stanu nisu nađeni tragovi nasilnog upada, premetačine ni krađe, a nađene su manje količine heroina i marihuane.

Obdukcijom, u spoljašnjem nalazu, sem prisustva penusave crvenkaste tečnosti u ustima i nozdrvama, druge promene ni povrede na telu nisu nađene. U unutrašnjem makroskopskom nalazu, ustanovljeno je tečno stanje krvi, edem mozga i pluća, a edemska tečnost je bila prisutna i u celom disajnom putu.

Patološkohistološkim pregledom isečaka organa ustanovljen je akutni zastoj krvi u svim organima, cerebralni edem praćen fokalnim mikrohemoragijama i hemoragični edem pluća, praćen zonama akutnog plućnog emfizema.

Toksikološko-hemijskom analizom krvi, urina, želudačnog sadržaja i uzoraka organa dokazano je prisustvo morfina, a u urinu, želudačnom sadržaju i u uzorcima organa (jetra sa žučnom kesom, bubreg i želudac) i prisustvo 6-monoacetilmorfina. Lek sildenafil dokazan je u urinu, želudačnom sadržaju i tkivima organa (jetra sa žučnom kesom, bubreg, crevima i želudac).

Na osnovu patoanatomske i patološkohistološke analize (cerebralni edem venska kongestija i fokalne hemoragije zajedno sa plućnim edemom čine najčešću morfološku sliku smrti) uz toksikološko-hemijski nalaz 6-monoacetilmorfina u želudačnom sadržaju i uzorcima organa, zaključili smo da je smrt nastupila usled akutnog trovanja heronom i da je dokazano prisustvo leka sildenafil.

DISKUSIJA

U navedenom smrtnom slučaju toksikološko-hemijskom analizom krvi, urina, želudačnog sadržaja i uzoraka tkiva organa dokazano je prisustvo morfina, 6-monoacetilmorfina i leka sildenafil.

Sildenafil je određen u uzorcima urina (840ng/mL), želudačnom sadržaju (3500,0ng/mL), jetri i žučnoj kesi (1118,2ng/mL), bubregu (135,9ng/mL), želucu (983,4ng/mL), crevima (69,2ng/mL), srcu, plućima i slezini (6,7ng/mL) čiji su UV spektri potvrđeni. U ovim uzorcima je detektovano i prisustvo njegovih metabolita, U uzorku krvi i tkivu organa mozga nije dokazano njegovo prisustvo. U uzorcima biološkog materijala dokazano je i prisustvo opijata i to u krvi morfin (2,6ng/L), urinu morfin

(193,4ng/mL) i 6-monoacetilmorfin (684,2ng/mL); želudačnom sadržaju morfin (216,2ng/mL) i 6-monoacetilmorfin (588,6 ng/mL); jetri i žučnoj kesi morfin (11,6ng/kg); bubregu morfin (24,7ng/kg) i 6-monoacetilmorfin (79,1ng/kg); želucu morfin (8,4ng/kg) i 6-monoacetilmorfina (22,9ng/kg); crevima morfin (4,3ng/kg).

Primena tehnike tečne hromatografije sa PDA i MS detekcijom je od od velikog značaja u urgentnim i sudsko-medicinskim analizama. Metoda je validovana i linearna u rasponu 50-2000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25ng/mL, a limit kvantifikacije je 50ng/L sa prinosom od 74,5 – 91,2%. Korišćenjem veće zapremine uzorka od 5ml možemo postići LOD i LOQ 10 i 5 ng/ml.

Tečno-tečna ekstrakcija sa hloroform:izopropanolom (9:1) je brza i jednostavna za određivanje sildenafil. U radovima je prikazana tečno-tečna ekstrakcija sa dietil etrom:dihlormetanom (60:40) na HPLC-u, koje je linearno u opsegu 20-1000ng/mL, sa limitom detekcije i kvantifikacije od 10ng/mL odnosno 20ng/mL i u skladu je sa našim rezultatima. Detekcija sildenafil, izvršena tehnikama tečne hromatografije sa HPLC-DAD i granicom kvantifikacije 2,5-7,5ng/g i ESI-HPLC-MS granica kvantifikacije 3,3-8,9ng/g detekcijom koja je linearna je u opsegu 2,5-250 ng/g, sa prinosom ekstrakcije od 90%. Određivanje sildenafil, izvršeno veoma osetljivom tehnikom gasne hromatografije sa MS-MS detekcijom sa limitom kvantifikacije 0,1 ng/mL i sa tačnošću od 92-103 %. (2,6,7,9,11,12)

ZAKLJUČAK

Određivanje koncentracije sildenafil u uzorcima je značajno u urgentnoj toksikologiji zbog slučajnih trovanja koja su kod nas retka, praćenja terapije primenjenih kod erekcijske disfunkcije, plućne hipertenzije indukovane hipoksijom i drugih bolesti koje uključuju glatke mišiće, kao i u sudskoj medicini. Postupak pripreme je jednostavan a detekcija na HPLC-MS-PDA je precizna i specifična kojom se mogu pratiti terapijske i toksične koncentracije. Ova tehnika je razvijena za screening toksikološki značajnih jedinjenja u biološkom materijalu. Zahvaljujući biblioteci spektara koju poseduje, primenjuje se kao screening tehnika za istovremenu identifikaciju velikog broja toksikološki značajnih jedinjenja.

Apstrakt

U radu je opisan prikaz slučaja smrti, S.Đ., starog 27 godina koji nađen mrtav u svom stanu. Toksikološko-hemijskom analizom krvi, urina, želudačnog sadržaja i uzoraka organa dokazano je prisustvo morfina, 6-monoacetilmorfina i leka sildenafil, koji su određeni tehnikom tečne hromatografije sa UV detektorom koji apsorbuje u UV oblasti od 190-400 nm (HPLC-PDA) i tehnikom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS) gde su podaci prikupljeni u pozitivnom režimu ES+, opseg masa m/z 100-500. Sildenafil je izolovan tečno-tečnom ekstrakcijom u hloroform:izopropanolu (9:1) pri pH 9,0 sa zadovoljavajućim prinosom ekstrakcije. Razdvajanje je postignuto na koloni Symmetry® C8 sa mobilnom fazom acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 u gradijent modu i na koloni XTerra® RP18 sa mobilnom fazom:5 mM amonijum acetat (pH 3,5) : acetonitril sa 0,1% sirćetnom kiselinom. Metoda je validovana u krvi i linearna je u rasponu 50-2000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 50 ng/mL, a limit kvantifikacije je 25 ng/mL. Zbog svoje dobre osetljivosti HPLC-PDA-MS je pouzdana tehnika.

LITERATURA

1. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3 Edition, London, Pharmaceutical press 848-849.
2. De Orsi D, Pellegrini M, Marchei E, Nebuloni P, Gallinella B, Scaravelli G, Martufi A; Gagliardi L, Pichini S: High performance liquid chromatography-diode array and electro-spray-mass spectrometry analysis of vardenafil, sildenafil, tadalafil, testosterone and local anesthetics in cosmetic creams sold on the internet web sites; J Pharm Biomed Anal: 2009;15;50(3):362-9.
3. Krenzelok EP: Sildenafil: clinical toxicology profile J.Toxicol. Clin. Toxicol. 2000;38(6):645-51.
4. Langtry HD; Markham A: Sildenafil: a revive of its use in erectile dysfunction; Drugs 1999; 57(6):967-89.
5. Musicki B: Molecular mechanisms of penile erection and erectile dysfunction; Med Data Rev 2009;1(2):25-30.
6. Pagani S; Mirttela D; Mencarelli R; Rodriquez D; Cingolani M: Postmortem distribution of sildenafil in histological material; J Anal Toxicol; 2005;29(4):254-7.
7. Quintero A; Caldera A; Milano B; Odreman I; Hurtado A; Manzanares L; Villamizer J: Validation of an HPLC method for sildenafil citrate analysis in human plasma samples. Pharmazie. 2009; 64:12; 796-9.
8. Sincek B: Phosphodiesterase tipe 5 and sildenafil: Medicus 2004; 13(2); 125-129.
9. Tracqui A, Ludes B: HPLC-MS for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in biological fluids. Applikation to the salivary excretion of sildenafil after oral intake. J. Anal. Toxicol. 2003; 27(2): 88-94.
10. Tracqui A, Miras A, Tabib A, Raul JS, Ludis B, Malicier D: Fatal overdose with sildenafil citrate (Viagra): first report and review of the literature; 2002;21(11):623-9.
11. Vos RM, Chahbouni A, Siniewel A, Swart EL: Quantitative analysis of sildenafil and desmethylsildenafil in human serum by liquid chromatography-mass spectrometry with minimal simple pretreatment; J Chromatogr B. Analyt Technol Biomed Life Sci 2008;15;876(2):283-7.
12. Weinmann W, Bohnert M, Wiedemann A, Renz M, Lehmann N, Pollak S: Post-mortem detektion and indentifikation of sildenafil (Viagra) and its metabolites by LC/MS and LC/MS/MS Int. J. Legal. Med. 2001; 114(4-5); 252-8.

