

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ФОСФОДИЕСТЕРАЗ – 5
(ТАДАЛАФИЛА, СИЛДЕНАФИЛА, ВАРДЕНАФИЛА) В
БИОАКТИВНЫХ ДОБАВКАХ ПО МЕТОДУ ВЭЖХ-УФДМ**

На современном фармацевтическом рынке, где границы между лекарственным средством и биоактивными добавками не всегда четко определены, важным аспектом является наличие валидированных аналитических методов, с помощью которых будет возможно быстрое, селективное определение присутствия химических компонентов и их количественное содержание в биологически активных добавках (БАД). Согласно нормам всемирной организации здравоохранения, лекарственные вещества и их аналоги запрещены к использованию в составе БАД. Ввиду сложившейся ситуации вопрос об усовершенствовании процедуры обнаружения посторонних веществ, не заявленных в составе БАД, стоит достаточно остро. Однако на сегодняшний день в литературных источниках отсутствует какая-либо информация по процедуре контроля БАД на наличие сильнодействующих веществ или лекарственных средств, в то время как в практике судебно-химических исследований имеются факты обнаружения данных веществ в биологически активных добавках к пище.

Цель исследования: Разработка и валидация метода определения синтетических ингибиторов фосфодиэстераз-5 (Тадалафила, Силденафила, Варденафила) в БАД по методу ВЭЖХ.

Ключевые слова: валидация, биологически активные добавки (БАД), тадалафил, силденафил, варденафил, ВЭЖХ.

Реактивы и приборы, которые использовались в исследовании:

Вода для ВЭЖХ

Трифторуксусная кислота (TFAAC)
Carl Roth

Метанол, Rotisolv â HPLC Grade Carl Roth

Ацетонитрил, Rotisolv â HPLC Grade
Carl Roth

Центрифуга Universal, HETTICH-
Zentrifugen

Весы AE240S, Mettler GmbH

Система высокоэффективного жидкостного хроматографирования с диодной матрицей SHIMADZU 2010DIODE ARRAY DETECTION (HPLC_DAD)

Фильтр для пробоподготовки: 0.45 µm
Millipore Millex-HV

Условия ВЭЖХ

Прибор: HPLC-DAD SHIMADZU 2010EV

Система сбора и обработки результатов: LS Solution Software Quick Manual

Подвижная фаза: MeCN: H₂O: TFAAC

Скорость потока подвижной фазы:
1 мл/мин

Колонка: RP C18, 250x4.6mm, 5µm

Объём инъекции пробы: 20µl

Температура колонки: 40 °C

Длина волны детектирования: основной сигнал при 285 nm

Приготовление стандартных растворов и построение калибровочного графика

При проведении предварительной калибровки для количественного определения тадалафила, силденафила, варденафила использовались растворы стандартов в следующих концентрациях:

Тадалафил: – 1.012; 0.506; 0.253; 0.1012;

0.0506; 0.0253 мг/мл

Варденафил: – 1.012; 0.506; 0.253; 0.1012;
0.0506; 0.0253 мг/мл

Силденафил: – 1.024; 0.512; 0.256; 0.1024;
0.0512; 0.0256 мг/мл (рис.1,2).

Приготовление исходных растворов:

1. Взвесили 75.9 мг (точная навеска) стандартного образца тадалафила (working standard, № 2) в 25мл-мерной колбе, растворили в 2 мл ацетонитриле, довели метанолом до метки.
2. Взвесили 75.9 мг стандартного образца варденафила (working standard, № 1) в 25 мл- мерной колбе, растворили и довели мета-

нолом до метки.

3. Взвесили 76.8 мг стандартного образца силденафила (working standard, № 5) в 25 мл- мерной колбе, растворили и довели метанолом до метки.

Рабочий стандартный раствор получили, смешивая по 10 мл исходных стандартных растворов. Для определения точности, правильности, линейности и воспроизводимости аналитического метода осуществлено четырехкратное введение 6 различных доз стандартного раствора тадалафила, силденафила, варденафила и определено относительное отклонение и корреляционный фактор калибровочной кривой.

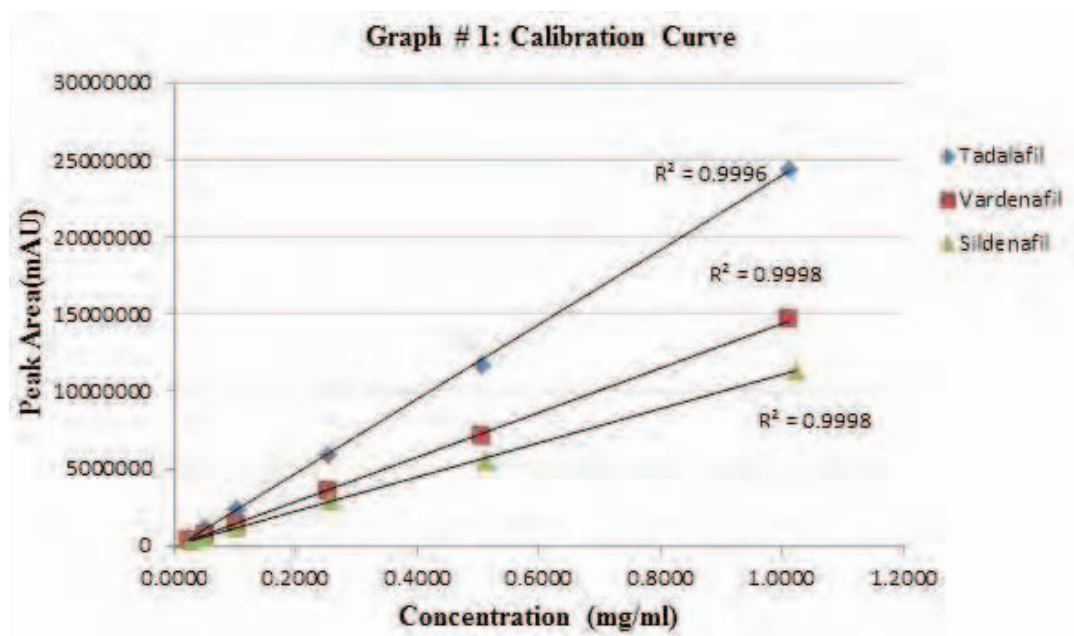


Рис.1. Калибровочные графики фосфодиестераз-5

Квадрат линейного коэффициента корреляции (R^2) характеризует степень соответствия между регрессионной моделью и исходными данными. В данном случае изменение зависимой переменной описывается регрессионным уравнением. Коэффициент корреляции $R^2 = 0.9996$; 0.9998 ; 0.9998 , что свидетельствует о наличии прямой линейной зависимости

между площадью пика испытуемых компонентов и их концентраций в образце.

Полученные данные, внесенные в систему ВЭЖХ, использовались при расчете концентрации во время линейности. Проводилось как внутридневные, так и средидневные проверки точности и воспроизводимости метода (схема 1.2).

Схема 1.

Результаты внутрисуточных проверки точности и воспроизводимости

Inter-day accuracy and precision (Day)	Found concentration (mg/ml) of Tadalafil,				Схема 2	
	0.0253	0.0506	0.1012	0.253	0.506	1.012
1	0.0244	0.0515	0.1001	0.2316	0.4770	1.0620
2	0.0250	0.0502	0.1076	0.2455	0.4987	1.2141
3	0.0241	0.0497	0.1027	0.2500	0.4965	0.9887
4	0.0252	0.0512	0.0976	0.2609	0.5123	0.9765
5	0.0251	0.0509	0.0958	0.2412	0.4759	0.9655
Mean (n=5)	0.0248	0.0507	0.1008	0.2458	0.4921	1.0414
SD	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.10
%CV	1.95	1.46	4.59	4.40	3.15	9.96
Criteria for %CV	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%
% accuracy	97.86561265	100.1976285	99.5652174	97.1699605	97.24901	102.90119
Criteria for accuracy, %	100±10%	100±10%	100±10%	100±10%	100±10%	100±10%

Схема 2.

Результаты среднесуточной проверки точности и воспроизводимости

Intra-day Accuracy and Precision	Found concentration (mg/ml) of Tadalafil					
	0.0253	0.0506	0.1012	0.253	0.506	1.012
1	0.0241	0.0496	0.1073	0.2515	0.5030	1.0059
2	0.0250	0.0483	0.0965	0.2479	0.4959	0.9918
3	0.0245	0.0481	0.0992	0.2657	0.5313	1.0626
4	0.0241	0.0491	0.0982	0.2414	0.4827	0.9654
5	0.0250	0.0516	0.0961	0.2378	0.4756	0.9513
Mean (n=5)	0.025	0.049	0.099	0.249	0.498	0.995
SD	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.04
%CV	1.78	2.87	4.56	4.35	4.35	4.35
Criteria for %CV	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%
% accuracy	97.080	97.480	98.280	98.360	98.360	98.360
Criteria for accuracy, %	100±10%	100±10%	100±10%	100±10%	100±10%	100±10%

Полученные значения % CV свидетельствуют о достаточной степени соответствия между истинным значением определяемого вещества и его значением, рассчитанным по данной методике.

При работе с БАД сложной стороной пробоподготовки является многокомпонентная матрица, и порой трудно с точностью определить подлинность со-

держащихся компонентов. Использование УФ детектора с диодной матрицей (УФДМ) позволяет наилучшим образом изучить УФ спектр обнаруживаемых компонентов и сравнить с УФ спектром стандартного образца для окончательного подтверждения присутствия данного химического компонента (рис. 2,3).

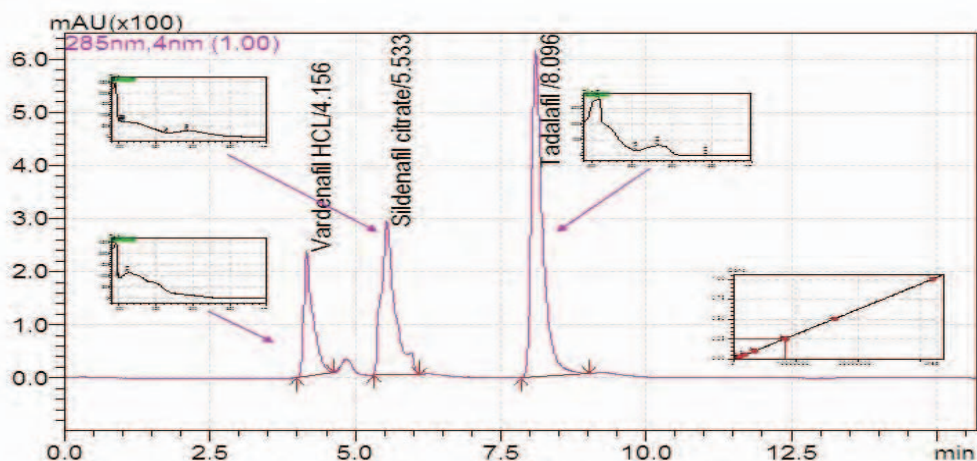


Рис.2. Хроматограмма растворов стандартного образца тадалафила, варденафила, силденафила в метаноле, детектирование при 285 нм

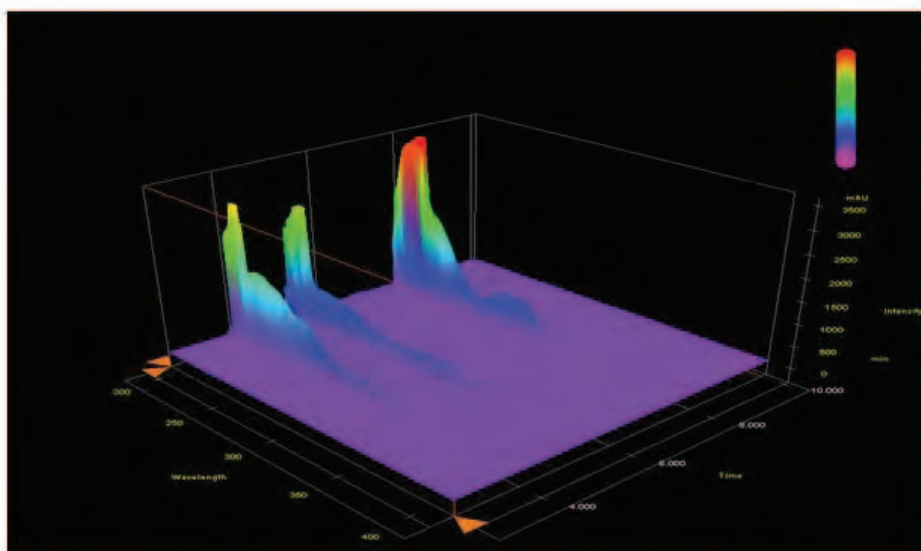


Рис. 3. 3-D изображение стандартного раствора тадалафила, варденафила, силденафила

После окончания валидации аналитического метода была проведена его апробация для анализа различных БАД как в Армении, так и за рубежом. При подготовке проб из порошка биологически активной добавки (БАД) для определения тадалафила, варденафила, силденафила взвесили 35 мг порошка из таблеток БАД в 25 мл-мерной колбе и добавили 15 мл ацетонитрила, смесь интенсивно встряхивали, поставили в ультразвуко-

вую баню на 15–20 мин., затем охладили и добавили ацетонитрила до метки. Центрифугировали и фильтровали супернатант с помощью 0.45 μm Millex-HV фильтра и определили концентрацию тадалафила, варденафила, силденафила методом ВЭЖХ.

В испытуемых образцах БАД растительного происхождения были обнаружены тадалафил 37.5 мг/таб (рис. 4,5).

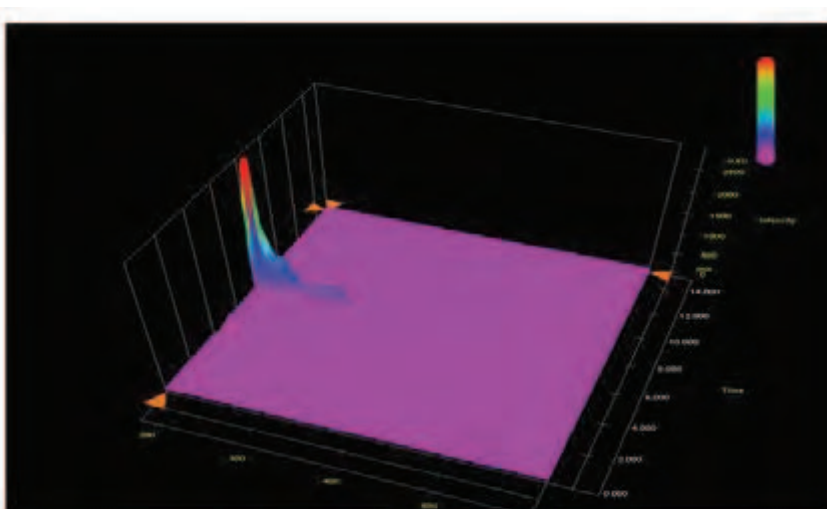


Рис. 3. 3-D изображение тадалафила в хроматограмме растительного происхождения БАД

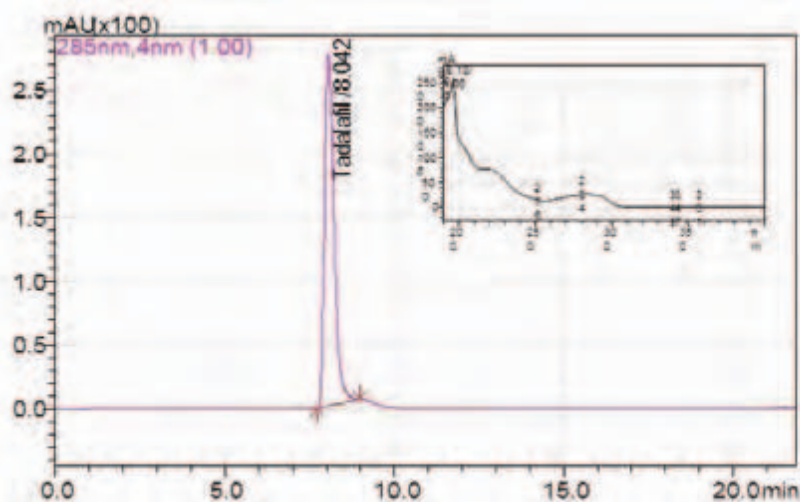


Рис. 4. хроматограмма тадалафила в БАД растительного происхождения

Результаты и их обсуждение:

В настоящей статье предложена методика определения содержания синтетических ингибиторов фосфодиэстераз – 5 (Тадалафила, Силденафила, Варденафила) в БАД по методу ВЭЖХ. Валидацию разработанной методики осуществляли по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, повторяе-

мость, чувствительность, пригодность хроматографической системы и устойчивость. Предлагаемая методика характеризуется высокой эффективностью, хорошей разрешающей способностью и специфичностью. Правильность находится в пределах от 97.08 % до 102.9 % . Методика показала линейный характер зависимости истинного от найден-

ного значения содержания в диапазоне концентраций 0.025 мг/мл – 1.012 мг/мл ($R^2=0.9998$). Относительная погрешность определения тадалафила, силденафила, варденафила составляет от 1.75 % до 4.35 %. Параметры системы практически не подвержены влиянию небольших изменений в хроматографических условиях ($\pm 3.0\%$ органической фазы).

При разработке методики были подобраны оптимальные хроматографические условия для эффективного разделения веществ и полного выхода из колонки компонентов. При выборе состава подвижной фазы были исследованы смеси различных растворителей (метанол, ацетонитрил, трифторуксусная кислота) с водой в различных соотношениях и при разном потоке элюирования. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве подвижной фазы 60% воды, 35% ацетонитрила и 0.5% ТФУ при скорости потока подвижной фазы 1.0 мл/мин, температура колонки– 40 °С, преимуществами использования которых также являются стабильность полученных результатов и доступность для закупки

необходимых реактивов на территории РА. Важным аспектом также являлся правильный выбор растворителя для полного экстаргирования синтетических ингибиторов фосфодиестераз – 5 из БАД. Было доказано, что ацетонитрил является наилучшим растворителем для вышеобнаруживаемых компонентов указанных компонентов. Использование УФ детектора с диодной матрицей позволяет наилучшим образом изучить УФ спектр и сравнить с УФ спектром стандартного образца для окончательного подтверждения присутствия данного химического компонента.

Таким образом, разработан и валидирован высокочувствительный, селективный, специфичный и воспроизводимый аналитический метод для определения содержания синтетических ингибиторов фосфодиестераз – 5, в частности, тадалафила, силденафила, варденафила в биоактивных добавках по методу ВЭЖХ, который с успехом может быть использован для анализа фосфодиестераз в различных биологически активных добавках.

Дата представления статьи: 25.02.2015

ЛИТЕРАТУРА

1. «Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection» Peng Zou, Sharon Sze-Yin Oh, Peiling Hou 2005
2. Валидация методов контроля качества // Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. Быковского С. Н. и др. – М. : Перо, 2014.
3. FDA (1994) Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance: Validation of
4. Chromatographic Methods, Rockville, MD [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf> – Загл. с экрана.
5. ICH (1995) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures (Q2A) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073381.pdf> /. – Загл. с экрана.
6. ICH (1996) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Industry. Validation of Analytical Procedures: Methodology (Q2B) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/>
7. В.А. Шелехова, Е.А. Краснов. Разработка и валидация методики количественного определения мидобора [downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073384.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073384.pdf) /. – Загл. с экрана.

8. USP 37-NF 32 ,Tadalafil Tablets, ChromatographicColumns <http://www.uspnf.com/uspnf/pub/idx?usp=37&nf=32&s=2&officialOn=December%201,%202014>

ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՐԵՆ ԱԿՏԻՎ ՀԱՎԵԼՈՒՄՆԵՐՈՒՄ ՖՈՍՈՐԴԻԵՍԹԵՐԱԶ-5-Ի ԻՆՀԻԲԻՏՈՐՆԵՐ՝ ՏԱԴԱԼԱՖԻԼԻ, ՎԱՐԴԵՆԱՖԻԼԻ ԵՎ ՍԻԼԴԵՆԱՖԻԼԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ՄԵԹՈԴԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ ԵՎ ՀԱՍՏԱՏՈՒՄԸ (ՎԱԼԻԴԱՑԻԱՆ) HPLC-DAD-Ի ՄԻՋՈՑՈՎ

ԱՂԱՎՆԻ ԳԻՆՈՍՅԱՆ

*ՀՀ ԳԱԱ, Գիտակրթական միջազգային կենտրոն,
Դեղագործական քիմիայի ֆակուլտետ*

Հոդվածում ներկայացված է բարձր արդյունավետ հեղուկային քրոմատագրով (ԲԱՀՔ) ֆոսֆոդիեսթերազ-5-ի ինհիբիտորներ՝ տադալաֆիլի, վարդենաֆիլի և սիլդենաֆիլի, որակական և քանական որոշման մեթոդը: Առաջարկվող մեթոդը օժտված է բարձր արդյունավետությամբ, վերարտադրելիությամբ և ճշգրտությամբ: Ճշգրտությունը տատանվում է 97.08% -ից մինչև 102.9%: Մեթոդի գծայնության սահմաններն են 0.025մգ/մլ-1.012մգ/մլ, հարաբերակցության (կորելացիայի) գործակիցը՝ $R^2 = 0.9998$, ստացված արդյունքների հարաբերական սխալը (% RSD) կազմել է 1.75% - 4.35%: Մեթոդը կայուն է քրոմատագրական համակարգի պայմանների որոշակի փոփոխությունների նկատմամբ և հաջողությամբ կիրառվում է մի շարք կենսաակտիվ հավելումներում՝ նշված միացությունների որակական և քանական որոշման համար:

Հոդվածի ներկայացման ամսաթիվը՝ 25.02.2015

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINING SYNTHETIC INHIBITORS PHOSPHODIESTERASE-5 (TADALAFIL, SILDENAFIL, VARDENAFIL) IN BIOACTIVE SUPPLEMENTS BY HPLC-DAD

AGAVNI GINOSYAN

*International Scientific-Educational Center of the National Academy of Sciences of the RA,
Department of Pharmaceutical Chemistry*

The present study suggests the method for determining the content of 5-phosphodiesterase inhibitors in biologically active supplements by HPLC-DAD. The proposed method is characterized by high efficiency, good resolution and specificity. The accuracy range is from 97.08% to 102.9%. The method showed that the dependence of real content from observed content of 5-phosphodiesterase is linear in the concentration range from 0.025mg/ml to 1.012 mg/ml with correlation coefficients of $R^2 = 0.9998$. The relative error (%RSD) of tadalafil, vardenafil, sildenafil content determination deviates from 1.75% to 4.35%. The parameters of the system were stable to the influence of small changes in chromatographic conditions, except for the retention time of studying peaks.

Article submission date: 25.02.2015