УДК 615.2; 615.4
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-3-192-200

CC BY 4.0

ВЭЖХ-МС/МС методика количественного определения силденафила и его метаболита в плазме крови человека

Г. Г. Родионов[1,*], И. И. Шантырь[1], И. Э. Ушал[1], Е. В. Светкина[1], Е. А. Колобова[1], К. А. Захаров[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова»
Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям
и ликвидации последствий стихийных бедствий,
ул. Академика Лебедева, д. 4/2, Санкт-Петербург, 194044, Российская Федерация

[2] Общество с ограниченной ответственностью
«Научно-исследовательский центр Эко-Безопасность»,
пр-т Юрия Гагарина, д. 65, Санкт-Петербург, 196143, Российская Федерация

Резюме. В силу высокой востребованности препаратов на основе силденафила актуальна разработка методик определения силденафила в биосубстратах для обеспечения проведения фармакокинетического анализа при исследованиях биоэквивалентности лекарственных средств. Для разработки методики предложено использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) как высокочувствительный, селективный, обладающий высокой воспроизводимостью и производительностью. **Цель работы:** разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения силденафила и его активного метаболита N-десметилсилденафила в плазме крови человека. Апробация разработанной методики при изучении фармакокинетических профилей силденафила и N-десметилсилденафила у здоровых добровольцев в исследовании биоэквивалентности препарата силденафила в форме спрея. **Материалы и методы:** методика реализована на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 с тройным квадруполем Agilent 6440, хроматографическая колонка Poroshell 120 EC-C18 4,6 м × 150 мм × 2,7 мкм. Для приготовления калибровочных образцов использовались стандарты с чистотой 99,5 и 98,5% для силденафила цитрата и N-десметилсилденафила соответственно, в качестве внутреннего стандарта использовался варденафил. Изучение фармакокинетических профилей силденафила и N-десметилсилденафила проведено у 44 здоровых добровольцев мужского пола в рамках исследования биоэквивалентности препаратов, одобренного Минздравом России. Первичную обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Mass Hunter версия B 06.00, статистическую обработку — с помощью Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.1. **Результаты:** разработана и валидирована методика определения силденафила и его активного метаболита N-десметилсилденафила в плазме человека. Разработанная методика успешно использована для изучения фармакокинетических профилей указанных соединений у здоровых добровольцев. **Выводы:** разработанная методика определения силденафила и его активного метаболита N-десметилсилденафила в плазме крови человека является простой, воспроизводимой, быстрой и надежной. По результатам фармакокинетических исследований с использованием разработанной методики изучаемый препарат и препарат сравнения были признаны биоэквивалентными.

Ключевые слова: валидация; силденафил; N-десметилсилденафил; биоэквивалентность; ВЭЖХ-МС/МС

Для цитирования: Родионов ГГ, Шантырь ИИ, Ушал ИЭ, Светкина ЕВ, Колобова ЕА, Захаров КА. ВЭЖХ-МС/МС методика количественного определения силденафила и его метаболита в плазме крови человека. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2020;10(3):192–200. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-3-192-200
***Контактное лицо:** Родионов Геннадий Георгиевич; rodgengeor@yandex.ru

HPLC-MS/MS Method for Quantitation of Sildenafil and Its Active Metabolite in Human Plasma

G. G. Rodionov[1,*], I. I. Shantyr[1], I. E. Ushal[1], E. V. Svetkina[1], E. A. Kolobova[1], K. A. Zakharov[2]

[1] Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine,
4/2 Academician Lebedev St., Saint Petersburg 194044, Russian Federation

[2] Eco-Safety Research Center, LLC,
65 Yuri Gagarin Ave., Saint Petersburg 196143, Russian Federation

Abstract. A high demand for sildenafil-based drugs puts a premium on the development of methods for quantitation of sildenafil in bio-substrates to facilitate pharmacokinetic analysis in bioequivalence studies. High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was proposed for the method development due to its high sensitivity, selectivity, reproducibility, and performance. **The aim of the study** was to develop and validate an HPLC-MS/MS method for quantitative determination of sildenafil and its active metabolite N-desmethyl sildenafil in human plasma. Approbation of the developed technique in the study of the pharmacokinetic profiles of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in healthy volunteers in the study of the bioequivalence of the drug sildenafil in the form of a spray. **Materials and methods:** the method was implemented using the Agilent 1200 high-performance liquid chromatography system with the Agilent 6440 triple quadrupole system, and Poroshell 120 EC-C18 chromatographic column, 4.6 m × 150 mm × 2.7 μm. Calibration samples were prepared using sildenafil citrate and N-desmethyl

sildenafil reference standards with 99.5 and 98.5% purity, respectively. Vardenafil was used as an internal standard. Pharmacokinetic profiles of sildenafil and N-desmethyl sildenafil were studied in 44 healthy male volunteers as part of a bioequivalence study approved by the Ministry of Health of the Russian Federation. The primary data processing was performed using Mass Hunter software version B 06.00, and statistical processing was performed using Microsoft Office Excel 2010 and Statistica 6.1. **Results:** the authors developed and validated a method for quantitation of sildenafil and its active metabolite N-desmethyl sildenafil in human plasma. The developed method was used successfully to study pharmacokinetic profiles of the discussed compounds in healthy volunteers. **Conclusions:** the developed method of quantitative determination of sildenafil and its active metabolite N-desmethyl sildenafil in human plasma is simple, reproducible, fast, and robust. The results of the pharmacokinetic studies using the developed method demonstrated bioequivalence of the test product and the reference product.
Key words: validation; sildenafil; N-desmethyl sildenafil; bioequivalence; HPLC-MS/MS

For citation: Rodionov GG, Shantyr II, Ushal IE, Svetkina EV, Kolobova EA, Zakharov KA. HPLC-MS/MS method for quantitation of sildenafil and its active metabolite in human plasma. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(3):192–200. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-3-192-200
***Corresponding author:** Gennady G. Rodionov; rodgengeor@yandex.ru

Препараты для лечения эректильной дисфункции (ЭД) весьма востребованы. Ингибиторы фосфодиэстеразы 5-го типа (иФДЭ-5) остаются препаратом первой линии при лечении ЭД. В настоящее время на рынке представлено 4 препарата, относящихся к группе иФДЭ-5: силденафил, тадалафил, варденафил, уденафил [1].

В силу высокой востребованности препаратов на основе силденафила на российском рынке представлены воспроизведенные лекарственные средства с данным действующим веществом, что обуславливает необходимость в методиках определения силденафила в биосубстратах для обеспечения фармакокинетического анализа в рамках исследований биоэквивалентности.

Силденафил метаболизируется главным образом в печени под действием изофермента CYP3A4 (основной путь) и изофермента CYP2C9 (минорный путь). Основной циркулирующий активный метаболит, образующийся в результате N-деметилирования силденафила, подвергается дальнейшему метаболизму. Селективность действия этого метаболита в отношении фосфодиэстераз (ФДЭ) сопоставима с таковой силденафила, а его активность в отношении фосфодиэстеразы 5-го типа ФДЭ-5 *in vitro* составляет около 50% активности силденафила. Концентрация метаболита в плазме крови здоровых добровольцев составляет около 40% от концентрации силденафила[1].

Из-за высокого содержания активного метаболита в плазме крови при проведении исследований биоэквивалентности лекарственных форм силденафила предпочтительно изучать и фармакокинетическое поведение N-десметилсилденафила.

Количественный анализ действующего вещества и (или) его активных метаболитов в биологических образцах добровольцев является важным этапом проведения исследования биоэквивалентности. Для минимизации факторов, влияющих на результат анализа, уменьшения количества используемого образца, ускорения получения результатов определение вещества и его метаболитов желательно выполнять в рамках единой пробоподготовки и одного анализа. С этой целью оптимальным является использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в связи с его высокой чувствительностью, селективностью и воспроизводимостью.

Метод ВЭЖХ-МС/МС позволяет определять широкий спектр соединений и препаратов, в то время как другие методы, например основанные на взаимодействии определяемого вещества с моноклональными антителами к нему, требуют специальных наборов реагентов, которые позволяют определять лишь конкретные препараты и в основном разработаны для проведения количественного анализа веществ в рамках фармакологического мониторинга.

Реализация ряда существующих методик определения силденафила и его активного метаболита связана с использованием дорогостоящих и труднодоступных изотопно-меченых стандартов [2], времязатратной пробоподготовки — жидкостной-жидкостной экстракции [2–7], использованием дорогостоящей твердофазной экстракции [8], обладает недостаточно низким пределом количественного обнаружения [3] и (или) длительным временем анализа [3, 4, 7, 9, 10]. Кроме того, далеко не во всех методиках предусмотрено определение активного метаболита [3, 7, 8]. Разработка методики, сочетающей простую и надежную пробоподготовку, использование доступных внутренних стандартов, быстроту анализа и высокую чувствительность, а также позволяющей в рамках одного анализа определять силденафил и его активный метаболит, весьма актуальна.

Цель работы — разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения силденафила и его активного метаболита

[1] Виагра, таблетки, покрытые пленочной оболочкой. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения (от 23.05.2016). Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации.
CHMP assessment report for Sildenafil TEVA (Procedure No. EMEA/H/C/001073). EMA; 2009.

N-десметилсилденафила в плазме крови человека. Апробация разработанной методики при изучении фармакокинетических профилей силденафила и N-десметилсилденафила у здоровых добровольцев в исследовании биоэквивалентности препарата силденафила в форме спрея.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аналитическое оборудование: высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1200 с тройным квадруполем Agilent 6440 ВЭЖХ-МС/МС с системой ионизации «электроспрей» (ESI); хроматографическая колонка Poroshell 120 EC-C18 4,6 м × 150 мм × 2,7 мкм.

Оборудование для пробоподготовки: шкаф лабораторный в комплекте Koettermann 1800×900×2250; холодильник ATLANT; центрифуга Allegra 25R («Бекмен Культер», США); весы Sartorius R 200D (Германия) с измерением массы до 250 г с точностью 0,0001–0,00001 г; вихревая мешалка типа Vortex; автоматические дозаторы фирмы Biohit с дозируемым объемом 0,5–5000 мкл.

Расходные материалы: микропробирки типа «эппендорф»; полипропиленовые флаконы (виалы) для анализируемых и градуировочных растворов вместимостью 250 мкл с защелкивающимися крышками (Agilent).

Реактивы: силденафила цитрат — стандартный образец (99,5%, Hetero Drugs Limited, Индия, серия SC0200316); N-десметилсилденафил — стандартный образец (98,5%, Simson Lifescience Pvt Ltd, Мумбаи, серия SL-PRH-048-044); варденафил гидрохлорид (внутренний стандарт) — референсный стандарт, (90,5%, EDQM, Франция, серия 1.0, годен до N/A). Все стандарты имели сертификаты качества с указанием аттестованного количественного содержания аналита и примесей.

Вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия»); ацетонитрил (Baker HPLC Analyzed, HPLC Far UV/ Gradient Grade); метанол (Baker HPLC Analyzed, HPLC Gradient Grade); кислота муравьиная (G 2453-85060, Agilent, США).

Исследуемые образцы: образцы плазмы крови для количественного анализа были получены от 44 здоровых добровольцев в возрасте 18–45 лет мужского пола, включенных в исследование биоэквивалентности. Разрешение на проведение клинического исследования № 419 выдано Министерством здравоохранения РФ 1 августа 2017 г. по результатам экспертизы документов. Положительное решение Совета по этике Минздрава России вынесено 14 марта 2017 г. (выписка из протокола № 143), также проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом исследовательского центра (выписка № 4 из протокола заседания № 20 от 24 августа 2017 г. локального этического комитета ООО «Научно-исследовательский центр Эко-Безопасность»).

Исследуемый лекарственный препарат в лекарственной форме «спрей для приема внутрь дозированный» представлял собой спиртово-водный раствор силденафила. Так как различные лекарственные формы для приема внутрь с немедленным высвобождением в рамках изучения биодоступности признаются одной и той же лекарственной формой[2], в отношении спрея для приема внутрь дозированного возможно проведение исследования биоэквивалентности по фармакокинетическим конечным точкам в сравнении с лекарственным препаратом, представленном в твердой лекарственной форме для приема внутрь. В связи с вышеизложенным в качестве препарата сравнения использованы таблетки, покрытые пленочной оболочкой, Виагра®, 50 мг («Фарева Амбуаз», Франция). Поскольку одна доза исследуемого лекарственного препарата содержит 12,5 мг силденафила, то в рамках исследования биоэквивалентности с целью достижения дозы 50 мг (равной дозировке лекарственного препарата сравнения) необходимо было ввести 4 дозы спрея (4 нажатия на дозатор).

Для определения фармакокинетических показателей проводился отбор проб крови в течение 24 ч по следующей схеме: 0 (за 10–15 мин до приема лекарственного препарата), через 0,25; 0,5; 0,67; 0,83; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,33; 2,67; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16 и 24 ч. Промежуток времени между взятием крови и ее обработкой не превышал 20 мин. Плазму крови отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин и хранили не более трех недель при температуре не выше –20 °С до проведения анализа.

Анализ данных. Первичную обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Mass Hunter версия B 06.00 (Agilent Technologies, США). Фармакокинетические показатели на основании полученных результатов измерения концентраций силденафила и N-десметилсилденафила в плазме крови добровольцев для каждого испытуемого определены и/или вычислены с помощью программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.1.

Статистический анализ различий времени достижения максимальных концентраций силденафила и его активного метаболита в плазме крови добровольцев (T_{max}) проводился с помощью непараметрического Т-критерия Уилкоксона для парных выборок. Статистический анализ различий периода полувыведения препарата ($T_{1/2}$) и константы выведения (k_{el}) проводился с помощью параметрического двустороннего t-критерия Стьюдента для парных выборок.

[2] Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013.
Bioanalytical method validation (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009-Rev1, Corr.2). EMA; 2011.

Дисперсионный анализ (ANOVA) различий по площадям под фармакокинетической кривой (AUC_{0-t}, $AUC_{0-\infty}$), относительным скоростям всасывания (C_{max}/AUC_{0-t}, $C_{max}/AUC_{0-\infty}$) и максимальным измеренным значениям концентраций силденафила и N-десметилсилденафила в плазме крови добровольцев (C_{max}) проводился по логарифмически преобразованным данным (по натуральному логарифму ln). Отношения логарифмически преобразованных средних значений использовались в качестве точечной оценки исследуемого параметра, а 90% доверительный интервал служил для выводов о биоэквивалентности или неэквивалентности.

Таблица 1. Хроматографические условия измерения

Table 1. Chromatographic conditions

Параметры Parameters	Спецификация Specifications
Колонка Column	**Poroshell 120 EC-C18** **4,6 м × 150 мм × 2,7 мкм** Poroshell 120 EC-C18 4.6 m × 150 mm × 2.7 µm
Скорость элюирования Flow rate	**0,6 мл/мин** 0.6 mL/min
Подвижная фаза А Mobile phase A	**0,1% водный раствор муравьиной кислоты (70%)** 0.1% formic acid water solution (70%)
Подвижная фаза Б Mobile phase B	**Ацетонитрил (30%)** Acetonitrile (30%)
Режим элюирования Elution mode	**Изократический** Isocratic
Объем ввода Injection volume	**10 мкл** 10 µL

Таблица 2. Условия масс-спектрометрического детектирования

Table 2. Mass spectrometric conditions

Параметры Parameters	Спецификация Specifications
Тип ионного источника Type of ion source	**Электроспрей, регистрация положительных ионов** Electrospray, registration of positive ions
Режим детектирования Detection mode	**MRM (мониторинг реакций заданных ионов)** MRM (multiple reaction monitoring)
Параметры работы ионного источника: Parameters of the ion source: **Температура газа-носителя, °C** Gas temperature, °C **Скорость газа-носителя, л/мин** Gas flow rate, L/min, **Давление на распылителе, psi** Nebulizer pressure, psi **Напряжение на капилляре, В** Capillary voltage, V	 300 9 20 3000

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения фармакокинетического профиля препарата на основе данных научной литературы [2–10] разработана методика количественного определения концентрации силденафила и его активного метаболита N-десметилсилденафила в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

Пробоподготовка была реализована путем осаждения белков. К каждой пробе объемом 200 мкл добавляли 20 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта (варденафил 2 мкг/мл) и 400 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты в метаноле. Содержимое пробирок тщательно перемешивали с помощью перемешивающего устройства типа Vortex в течение 5 мин, после чего центрифугировали 10 мин со скоростью 4000 об/мин. 200 мкл надосадочного слоя переносили в пластиковые виалы и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС путем ввода 10 мкл образца. Данный вариант подготовки проб к анализу оказался значительно быстрее, чем использование жидкостной-жидкостной экстракции, в силу отсутствия необходимости сушить образцы на определенном этапе пробоподготовки, а также не требовал использования твердофазной экстракции, что сделало пробоподготовку экономичнее. При этом для обоих аналитов удалось добиться минимального влияния матричных компонентов и высокой чувствительности методики, экспериментально подобрав оптимальные условия хроматографического разделения, а также параметры масс-спектрометрического

Таблица 3. Параметры сканирования ионов

Table 3. Ion scanning parameters

Аналит Analyte	Ион-прекурсор Precursor ion	Ион-фрагмент Product ion	Напряжение на фрагменторе, В Fragmentor voltage, V	Энергия соударений, В Collision energy, V
Силденафил Sildenafil	475,2	58,2	220	30
N-десметилсилденафил N-desmethyl sildenafil	461,2	283,2	200	40
Внутренний стандарт Internal standard	489,2	151,1	170	40

детектирования, обеспечивающие максимальную интенсивность сигнала (табл. 1–3). Время удерживания аналитов составило 2,56 и 2,48 мин, а общее время анализа — 3,2 мин.

Валидация методики. Валидация проведена в соответствии с требованиями руководства по экспертизе лекарственных средств[3]. Она включала определение следующих параметров: линейность метода, пределы количественного определения, селективность, степень извлечения аналитов и внутреннего стандарта, эффект памяти, матричный эффект, влияния разбавления, точность и прецизионность результатов внутри одной серии и между сериями, а также стабильность аналитов в растворах и плазме при различных условиях хранения.

Линейность. Диапазон определяемых концентраций данной методики составил 1,8–1424 нг/мл для силденафила и 2,5–1000 нг/мл для N-десметилсилденафила, коэффициент корреляции калибровочной кривой (r^2) >0,99. Проанализированы стандартные образцы в 10 концентрациях и 3 повторениях. Тип калибровочной зависимости и весовой коэффициент определялись наименьшим значением стандартного отклонения и наименьшим количеством отброшенных точек с наибольшим коэффициентом корреляции. При этом обратный пересчет концентрации калибровочных стандартов и образцов контроля качества был в пределах ±15% от номинального значения. Таким образом, тип калибровочной зависимости — линейный, пересечение с началом координат — игнорируется, весовой коэффициент — $1/x$.

Нижний предел количественного определения данной методики — 1,8 нг/мл для силденафила и 2,5 нг/мл для N-десметилсилденафила. Аналиты в данной концентрации определяются в виде узкого симметричного пика с соотношением сигнал:шум не менее 10:1.

Контроль селективности методики. Для оценки селективности методики проанализированы пробы интактной плазмы крови, не содержащей аналиты, из 20 различных источников. Результаты контроля признаны удовлетворительными, так как на масс-хроматограммах отсутствовали пики при заданных переходах масс.

Оценка эффекта памяти системы. Для оценки эффекта памяти системы вводили пробы образцов интактной плазмы сразу после калибровочных образцов на верхнем уровне концентраций калибровочной кривой. Эффект памяти составил 0%.

Оценка матричного эффекта. Матричный эффект (MF) оценивался по формуле (1) как отношение аналитического сигнала определяемого соединения в образце экстракта биологической матрицы к отклику аналита в чистом растворителе:

$$\mathrm{MF} = S_1/S_2, \quad (1)$$

где S_1 — площадь пика для пробы с добавкой аналита в матрицу после ее пробоподготовки; S_2 — площадь пика для стандартного раствора.

При анализе 6 образцов с концентрациями, соответствующими образцам контроля качества QCA (образцы контроля качества с концентрациями 5,34 и 7,5 нг/мл силденафила и N-десметилсилденафила соответственно) и QCC (образцы контроля качества с концентрациями 1068 и 750 нг/мл силденафила и N-десметилсилденафила соответственно) для обоих аналитов не было выявлено значимых влияний матричных компонентов — коэффициент вариации для нормализованного матричного фактора не превышал 3,1%, а подавление ионизации не превышало 7,1%. Точность определения силденафила — 100,0–101,0% с прецизионностью 2,3–3,7%, а его активного метаболита — 92,9–98,0% с прецизионностью 3,1–3,8%.

Разбавление образцов. При разбавлении в два раза интактной плазмой крови образцов с номинальной концентрацией силденафила и N-десметилсилденафила 3216 и 1500 нг/мл, точность составила 97,8 и 98,5% с прецизионностью 0,4 и 2,2% соответственно.

Степень извлечения аналита из матрицы пробы. Степень извлечения (Recovery) силденафила, N-десметилсилденафила из матрицы пробы оценивалась на трех уровнях концентраций (5,34, 712, 1068 нг/мл для силденафила и 7,5, 500, 750 нг/мл для N-десметилсилденафила) по формуле (2):

$$\mathrm{Recovery} = S_x/S_0, \quad (2)$$

где S_x — площадь пика аналита при добавлении в пробу до пробоподготовки; S_0 — площадь пика аналита при добавлении в пробу после пробоподготовки.

Степень извлечения силденафила варьировалась от 89,7 до 95,0% с прецизионностью 1,2–3,5%, степень извлечения N-десметилсилденафила — от 96,6 до 99,6% с прецизионностью 1,5–2,9%.

Прецизионность и точность методики. Прецизионность и достоверность определения оценивали внутри одной аналитической серии (n = 5) и между сериями в 3 разных дня (n = 15). Точность и прецизионность растворов контроля качества силденафила и N-десметилсилденафила были определены по калибровочным кривым (табл. 4).

Контроль стабильности аналитов. Проведена оценка стабильности образцов силденафила и N-десметилсилденафила на двух уровнях концентраций — соответствующих QCA (5,34 нг/мл силденафила и 7,5 нг/мл N-десметилсилденафила) и QCC (1068 нг/мл силденафила и 750 нг/мл N-десметилсилденафила) при краткосрочном

[3] Руководство по экспертизе лекарственных средств. М.: Полиграф-Плюс; 2014.

Таблица 4. Прецизионность и достоверность метода в рамках одной аналитической серии и между сериями

Table 4. The intra-run and inter-run precision and accuracy of the method

Параметр Parameter	**Добавленная концентрация силденафила, нг/мл** Sildenafil, nominal concentration, ng/mL					
	внутри серии, *n* = 5 intra-run, *n* = 5			**между сериями, *n* = 15** inter-run, *n* = 15		
	QCA	QCB	QCC	QCA	QCB	QCC
	5,34	712	1068	5,34	712	1068
Расчет, среднее, нг/мл Calculation, mean, ng/mL	5,45	713	1064	5,32	708	1066
Прецизионность, % Precision, %	4,1	4,3	3,0	6,3	4,5	5,0
Точность, % Accuracy, %	102,0	100,1	99,7	99,7	99,5	99,8
Параметр Parameter	**N-десметилсилденафил, добавленная концентрация, нг/мл** N-desmethyl sildenafil, nominal concentration, ng/mL					
	внутри серии, *n* = 5 intra-run, *n* = 5			**между сериями, *n* = 15** inter-run, *n* = 15		
	QCA	QCB	QCC	QCA	QCB	QCC
	7,50	500	750	7,50	500	750
Расчет, среднее, нг/мл Calculation, mean, ng/mL	7,51	494	729	7,52	501	734
Прецизионность, % Precision, %	3,8	3,0	2,6	3,7	3,4	3,1
Точность, % Accuracy, %	100,1	98,8	97,2	100,3	100,1	97,8

Примечание. QCA — образец контроля качества с низкой концентрацией; QCB — образец контроля качества со средней концентрацией; QCC — образец контроля качества с высокой концентрацией.
Note. QCA—quality control sample with low concentration; QCB—quality control sample with average concentration; QCC—sample quality control with high concentration.

Таблица 5. Фармакокинетические параметры силденафила и N-десметилсилденафила

Table 5. Pharmacokinetic parameters of sildenafil and N-desmethyl sildenafil

Параметр Parameter	**Силденафил** Sildenafil		**N-десметилсилденафил** N-desmethyl sildenafil	
	исследуемый препарат test drug	**препарат сравнения** reference drug	**исследуемый препарат** test drug	**препарат сравнения** reference drug
C_{max}, **нг/мл** C_{max}, ng/mL	399 ± 236	434 ± 234	123,0 ±64,8	125,3 ±62,8
$AUC_{0-\infty}$, **нг×ч/мл** $AUC_{0-\infty}$, ng×h/mL	1161 ± 612	1367 ± 982	384,4 ± 93,4	424,5 ± 239,5
AUC_{0-t}, **нг×ч/мл** AUC_{0-t}, ng×h/mL	1147 ± 611	1361 ± 976	365,7 ± 194,6	403,6 ± 238,9
T_{max}, **ч** T_{max}, h	0,85 ± 0,52	1,04 ± 0,51	0,82 ± 0,47	1,01 ± 0,54
$T_{1/2}$, **ч** $T_{1/2}$, h	2,44 ± 0,32	2,57 ± 0,37	3,58 ± 0,67	3,81 ± 1,04

(8-часовом) и долгосрочном хранении (3 недели), после 3 циклов заморозки-разморозки, а также стабильность образцов, прошедших пробоподготовку, в автосамплере при комнатной температуре в течение 24 ч. Потери при хранении образцов в течение 8 ч при комнатной температуре не превышали 0,9% для обоих аналитов. При долгосрочном хранении в течение трех недель при температуре –18 °С максимальные потери для силденафила составили 1,6%, а для N-десметилсилденафила — 3,9%. После прохождения трех циклов заморозки-разморозки потери аналита не превышали 4,0% для силденафила и 1,9% для его активного метаболита.

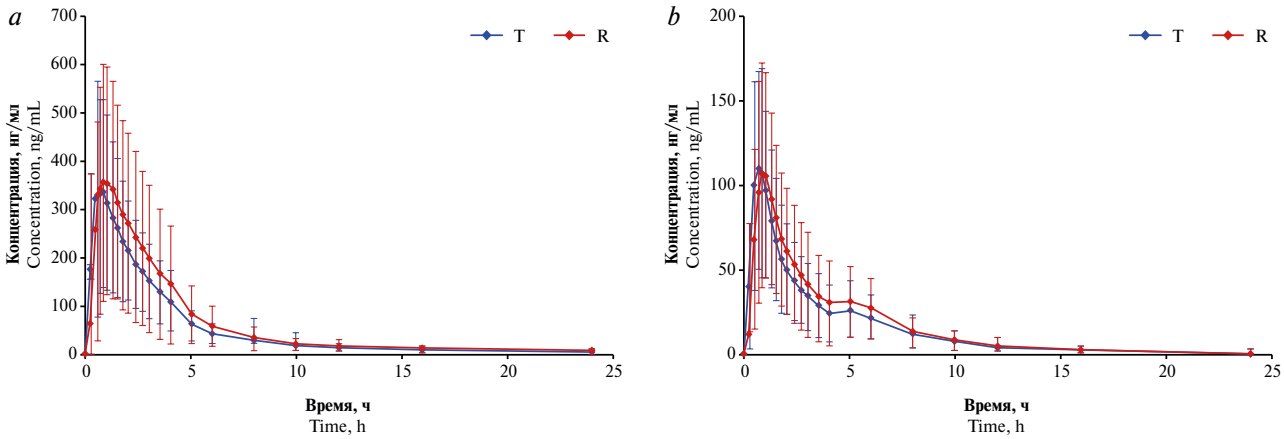

Рис. 1. *Динамика изменений концентраций силденафила (a) и N-десметилсилденафила (b) в крови добровольцев после однократного приема исследуемого препарата (T) и препарата сравнения (R) (на графиках приведены средние значения концентраций (точки) и стандартные отклонения (штрихи))*

Fig. 1. *Changes in the concentrations of sildenafil (a) and N-desmethyl sildenafil (b) in the blood of volunteers following a single dose of the test drug (T) and reference drug (R) (the graphs show mean concentration values (dots) and standard deviations (stripes))*

Таблица 6. 90% доверительные интервалы для отношений средних геометрических значений параметров $AUC_{0\text{-}t}$, C_{max} и $C_{max}/AUC_{0\text{-}t}$ силденафила и его активного метаболита N-десметилсилденафила

Table 6. 90% confidence intervals for the ratios of geometric means of $AUC_{0\text{-}t}$, $C_{max,}$ and $C_{max}/AUC_{0\text{-}t}$ of sildenafil and its active metabolite N-desmethyl sildenafil

Параметр Parameter	**Отношение средних значений, %** Ratio of the means, %	**90% доверительные интервалы** 90% confidence intervals
Силденафил Sildenafil		
$AUC_{0\text{-}t}$	90,95	81,90–101,01
C_{max}	93,13	82,41–105,26
$C_{max}/AUC_{0\text{-}t}$	102,40	94,65–110,77
N-десметилсилденафил N-desmethyl sildenafil		
$AUC_{0\text{-}t}$	95,69	86,09–106,35
C_{max}	102,07	88,62–117,56
$C_{max}/AUC_{0\text{-}t}$	106,67	97,73–116,43

Рабочие растворы оставались стабильны в течение 24 ч при хранении при температуре 6 ± 2 °C.

Разработанная методика соответствует всем требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам, используемым в исследованиях биоэквивалентности лекарственных препаратов.

Сочетание быстрой и простой пробоподготовки с высокой чувствительностью и специфичностью методики, а также быстрый анализ образцов с одновременным определением обоих аналитов обусловливает научную новизну методики.

Фармакокинетика. Фармакокинетические параметры рассчитывались внемодельными методами с использованием программы Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.1. Результаты расчетов фармакокинетических параметров силденафила и N-десметилсилденафила после приема исследуемого препарата и препарата сравнения представлены в таблице 5. Следует отметить, что характер зависимости «концентрация — время» силденафила и N-десметилсилденафила для сравниваемых препаратов практически не отличается (рис. 1).

Полученные 90% доверительные интервалы фармакокинетических параметров $AUC_{0\text{–}t}$, C_{max}, $C_{max}/AUC_{0\text{–}t}$ силденафила и его активного метаболита N-десметилсилденафила (табл. 6) лежат в пределах, установленных методическими указаниями Министерства здравоохранения Российской Федерации[4] (80–125%), что свидетельствует о биоэквивалентности исследуемых препаратов. По результатам данного исследования в России впервые зарегистрирован препарат силденафила в лекарственной форме «спрей».

[4] Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013.

ВЫВОДЫ

Разработана надежная, воспроизводимая, быстрая и простая методика определения силденафила и его активного метаболита N-десметилсилденафила в плазме крови человека, реализуемая с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС. Методика валидирована в соответствии с требованиями Евразийского экономического союза и Европейского агентства по лекарственным средствам и соответствует всем требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам, используемым в исследованиях биоэквивалентности лекарственных препаратов. Используемый способ осаждения белков при пробоподготовке и быстрое хроматографическое разделение аналитов и эндогенных компонентов плазмы крови позволяют получить приемлемый результат без каких-либо значимых эффектов наложения.

Разработанная методика успешно применена при проведении исследования биоэквивалентности двух лекарственных форм силденафила. На основании полученных данных, учитывая, что 90% доверительный интервал для отношения средних геометрических значений параметров AUC_{0-t}, C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} силденафила и его активного метаболита N-десметилсилденафила не выходит за пределы 80—125%, испытуемый препарат (спрей для приема внутрь дозированный, 12,5 мг/доза) и препарат сравнения (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 50 мг) являются биоэквивалентными.

По результатам данного исследования препарат силденафила в лекарственной форме «спрей» был впервые зарегистрирован в России.

Вклад авторов. ***Г. Г. Родионов*** — внес значительный вклад в планирование исследования, интерпретацию полученных данных, написание и доработку рукописи; ***И. И. Шантырь*** — внес существенный вклад в разработку дизайна и организацию исследования, интерпретацию полученных данных; ***И. Э. Ушал*** — внесла вклад в разработку методики, а также в получение экспериментальных данных, их статистический анализ и интерпретацию, подготовила первичный вариант рукописи; ***Е. В. Светкина*** — внесла вклад в получение лабораторных данных, выполняла градуировку оборудования, подготовку проб к анализу, принимала участие в работе с рукописью; ***Е. А. Колобова*** — внесла вклад в разработку методики, получение лабораторных данных, контролировала показатели приемлемости аналитических серий, выполняла статистический анализ полученных данных; ***К. А. Захаров*** — являлся главным клиническим исследователем, непосредственно участвовал в организации клинической части исследования, работе с добровольцами, принимавшими участие в исследовании биоэквивалентности, внес вклад в анализ и интерпретацию результатов исследования, работу с рукописью.

Authors' contributions. ***Gennady G. Rodionov***—played a major role in planning of the study, interpretation of the obtained data, writing and editing of the paper; ***Igor I. Shantyr***—made a significant contribution to elaboration of the study design, organising the study, interpretation of the obtained data; ***Inna E. Ushal***—contributed to the development of the methodology, obtaining of experimental data, statistical analysis and interpretation of experimental data, prepared the first version of the paper; ***Ekaterina V. Svetkina***—took part in obtaining of laboratory data, performed calibration of equipment, prepared samples for analysis, took part in writing of the paper; ***Ekaterina A. Kolobova***—contributed to the development of the methodology, obtaining of laboratory data, controlled the acceptance criteria of the analytical batches, performed statistical analysis of the obtained data; ***Konstantin A. Zakharov***—the main clinical researcher, was directly involved in organising the clinical part of the study, worked with volunteers who took part in the bioequivalence study, made a significant contribution to the analysis and interpretation of the study results, writing of the paper.

Благодарности. Исследование биоэквивалентности лекарственных форм силденафила проведено по Протоколу № ПТ-КИ-005-001-01 Версия 1.0 от 27.01.2017 г. «Открытое рандомизированное сбалансированное перекрестное исследование биоэквивалентности в двух периодах, двух последовательностях с однократным приемом внутрь 50 мг лекарственного препарата Джент, спрей для приема внутрь дозированный, 12,5 мг/доза, ООО НПО «ФармВИЛАР», Россия, и 50 мг лекарственного препарата Виагра®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 50 мг, Фарева Амбуаз, Франция (держатель РУ — Пфайзер Инк, США) у взрослых здоровых добровольцев натощак». Спонсор исследования ООО «Фармамед», Россия.

Acknowledgments. The bioequivalence study of sildenafil dosage forms was performed according to Protocol No. PT-KI-005-001-01 Version 1.0 of January 27, 2017. "An open-label, randomised, balanced, cross-over, single-dose, two-period, two-sequence bioequivalence study of 50 mg of Gent, metered-dose oral spray, 12.5 mg/dose, produced by OOO NPO FarmVILAR, Russia, and 50 mg of Viagra®, film-coated tablets, 50 mg, produced by Fareva Amboise, France (marketing authorisation holder—Pfizer Inc., USA) in adult healthy volunteers under fasting". The study was sponsored by Farmamed LLC, Russia.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ахвледиани НД, Матюхов ИП. Современное место силденафила в лечении эректильной дисфункции. *Урология.* 2018;(2):142–6. [Akhvlediani ND, Matyukhov IP. Current role of sildenafil in the management of erectile dysfunction. *Urologiya = Urology*. 2018;(2):142–6 (In Russ.)] https://doi.org/10.18565/urology.2018.2.142-146
2. Кузнецов ИЭ, Науменко ЕА, Резниченко НК, Костюк АЮ, Савяк РП, Олейников ДС. Разработка и валидация методики количественного определения силденафила и N-десметилсилденафила с помощью ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови человека. *ScienceRise: Pharmaceutical Science.* 2017;1(5):22–32. [Kuznetsov IE, Naumenko EA, Reznichenko NK, Kostyuk AYu, Savyak RP, Oleynikov DS. Development and validation of method for quantitative determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil by HPLC-MS/MS in human blood plasma. *ScienceRise: Pharmaceutical Science.* 2017;1(5):22–32 (In Russ.)] https://doi.org/10.15587/2519-4852.2017.92823
3. Tripathi AS, Sheikh I, Dewani AP, Shelke PG, Bakal RL, Chandewar AV, et al. Development and validation of RP-HPLC method for sildenafil citrate in rat plasma-application to pharmacokinetic studies. *Saudi Pharm J.* 2013;21(3):317–21. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.09.003
4. Reddy BPK, Reddy YR. Validation and stability indicating RP-HPLC method for the determination of sildenafil citrate in pharmaceutical formulations and human plasma. *J Chem.* 2008;5(S2):1117–22. https://doi.org/10.1155/2008/682924

5. Al-Ghazawi M, Tutunji M, AbuRuza S. Simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;43(2):613–8. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.028
6. Haque A, Kumar N. Pharmacokinetics studies of sildenafil and its metabolite piperazine N-desmethyl sildenafil by using LC-MS/MS in human plasma. *Int J Drug Dev Res.* 2014;6(2):130–5.
7. Samah SA, Bendas ER, Abdel-Fattah AA, Hegazy MA. Reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of sildenafil in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Bioeq Bioav Int J.* 2017;1(3):1–7. https://doi.org/10.23880/BEBA-16000113
8. Ярошенко ДВ, Григорьев АВ, Сидорова АА, Карцова ЛА. Хроматографическое определение силденафила в плазме крови с использованием спектрофотометрического и масс-спектрометрического детектирования. *Журнал аналитической химии.* 2013;68(9):886–94. [Yaroshenko DV, Grigoriev AV, Sidorova AA, Kartsova LA. Chromatographic determination of sildenafil in blood plasma using spectrophotometric and mass-spectrometric detection. *J Anal Chem.* 2013;68(9):801–8. https://doi.org/10.1134/S1061934813090128]
9. Simiele M, Pensi D, Pasero D, Ivaldi F, Rinaldi M, Di Perri G, et al. Development and validation of an ultra performance liquid chromatography tandem mass method for sildenafil and N-desmethyl sildenafil plasma determination and quantification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;1001:35–40. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.023
10. El-Bagary R, Azzazy HME, ElKady EF, Farouk F. Simultaneous determination of sildenafil citrate and some nitric oxide releasing drugs in human plasma using UPLC MS/MS. *Clin Biochem*. 2014;47(7–8):654–6. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.03.009

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Родионов Геннадий Георгиевич, д-р мед. наук, доцент. *Gennady G. Rodionov,* Dr. Sci. (Med.), Associate Professor. **SPIN-код РИНЦ:** 6471-3933
Шантырь Игорь Игнатьевич, д-р мед. наук, профессор. *Igor I. Shantyr,* Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** https://orcid.org/0000-0003-1840-5770
Ушал Инна Эдвардовна, канд. биол. наук. *Inna E. Ushal,* Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** https://orcid.org/0000-0001-5857-3627
Светкина Екатерина Владимировна. *Ekaterina V. Svetkina.* **SPIN-код РИНЦ:** 4224-5518
Колобова Екатерина Алексеевна, канд. хим. наук. *Ekaterina A. Kolobova,* Cand. Sci. (Chem.). **ORCID:** https://orcid.org/0000-0001-6369-4511
Захаров Константин Анатольевич, канд. мед. наук. *Konstantin A. Zakharov,* Cand. Sci. (Med.). **SPIN-код РИНЦ:** 2537-4635

Статья поступила 19.02.2020
После доработки 01.06.2020
Принята к печати 28.05.2020

Article was received 19 February 2020
Revised 1 June 2020
Accepted for publication 28 May 2020