

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Осипчук Людмила Іванівна

УДК: 615.256.4:547.861.3].099.07.073/.074+340.627

ДИСЕРТАЦІЯ

Хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Л. І. Осипчук

Науковий керівник:

Галькевич Ірина Йосипівна, кандидат фармацевтичних наук, доцент

Львів – 2020

АНОТАЦІЯ

Осипчук Л. І. Хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, Львів, 2020.

У дисертації викладено основні методики виділення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів із об'єктів біологічного походження, а також методи їх ідентифікації та кількісного визначення, які придатні для цілей клініко-токсикологічних та судово-хімічних досліджень.

Наводиться загальна характеристика силденафілу та варденафілу, їх фізико-хімічні властивості, особливості фармакокінетики та можливі шляхи метаболізму, описуються побічні ефекти та токсична дія даних препаратів. Показано, що більшість побічних ефектів, викликаних прийомом цих препаратів, спостерігається у пацієнтів з факторами ризику із сторони серцево-судинної системи. Відмічено, що основним протипоказом до застосування інгібіторів ФДЕ-5 є їх одночасне вживання з нітровоазодилаторами (нітрогліцерином, мононітратом та динітратом ізосорбїду), α -адреноблокаторами, а також поєднання з інгаляційними формами алкілнітритів – амілнітритом, бутилнітритом, ізобутилнітритом, оскільки в результаті потенціювання вазодилатуючих ефектів вказаних засобів розвивається критична та неконтрольована гіпотензія, що може викликати раптову смерть.

Для визначення силденафілу та варденафілу в біологічному матеріалі при комбінованих отруєннях необхідна розробка ефективних методів виділення та чутливих методик ідентифікації та кількісного визначення, які

придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу при встановленні причини летальних отруєнь та діагностиці станів гострих інтоксикацій даними препаратами при комбінованих отруєннях.

Представлені методики ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу в розчинах, які можна застосовувати при проведенні судово-хімічних досліджень.

Вивчено реакційну здатність досліджуваних сполук з рядом реагентів, які використовуються в судово-хімічній практиці для експрес-виявлення ксенобіотиків. За результатами експериментальних досліджень вибрано реакції з межею виявлення 1-8 мкг силденафілу та варденафілу в пробі.

Встановлено можливість ідентифікації силденафілу та варденафілу в системах розчинників, що рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів (TIAFT) та опрацьовано склад підтверджуючих систем, які можна використовувати для ТШХ-дослідження при отруєнні вказаними препаратами.

Вивчено УФ-спектри даних препаратів в метанолі та 96 % етанолі. Встановлено межі концентрацій, в яких поглинання силденафілу та варденафілу в метанольних та етанольних розчинах підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера.

Досліджено залежність інтенсивності флуоресценції силденафілу і варденафілу від природи розчинника (ацетонітрилу, ізопропанолу, 96 % етанолу та води бідистильованої). Описано умови кількісного визначення силденафілу та варденафілу за природньою флуоресценцією.

Досліджено можливість ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС без проведення дериватизації на капілярних колонках HP-1 та RTX-5. Встановлено, що використання колонки RTX-5 є придатним для ідентифікації та кількісного визначення обидвох препаратів у суміші.

Для ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу опрацьовано умови їх аналізу методом ВЕРХ, при цьому встановлено межі

виявлення та кількісного визначення при різних способах детекції (мас-, УФ- та флуоресцентному детектуванні). В роботі використано хроматографічні колонки Zorbax SB - C18 та LUNA[®] C18.

Розроблено умови ідентифікації та кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ з МС/МС детектуванням та УФ-детектуванням на колонці ВЕН C18.

Методики кількісного визначення силденафілу і варденафілу в розчинах методами УФ-спектрометрії, флуориметрії, ГХ/МС, ВЕРХ з мас-, УФ-детектуванням та флуоресцентним детектуванням і УВЕРХ/МС/МС валідовано за показниками лінійності, правильності та прецизійності.

Вивчено вплив природи органічних розчинників (1,2- дихлоретану, хлороформу, діетилового етеру, тетрахлорид карбону, гексану, толуену) та рН середовища на ступінь екстракції і коефіцієнт розподілу силденафілу та варденафілу. Встановлено, що найкращим органічним розчинником для екстракції даних препаратів з водних розчинів є 1,2-дихлоретан. Оптимальне значення рН середовища для екстракції силденафілу становить 8,0, а для варденафілу – 7,5. При даних значеннях рН екстрагується 93-95 % досліджуваних препаратів. Встановлено, що електроліти зменшують ступінь екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів.

Розроблено схему проведення твердофазної екстракції (ТФЕ) на картриджах Oasis HLB, при цьому ступінь вилучення силденафілу та варденафілу із водних розчинів становить 99,0-99,5 % та 98-99 % відповідно.

Вивчено вплив рН середовища на сорбцію силденафілу і варденафілу Н- клиноптилолітом в статичних умовах. Встановлено, що область максимуму сорбції двох препаратів цим сорбентом спостерігається при рН 5,5-7,8. В статичних умовах із колонок з Н-клиноптилолітом 5 % розчином аміаку в 96 % етанолі елююється до 82-83 % варденафілу та 84-85 % силденафілу. В динамічних умовах із Н-клиноптилоліту ізолюється до 90-91 % варденафілу та 93-94 % силденафілу.

Проведено порівняльну оцінку ізолювання силденафілу та варденафілу з використанням загальноприйнятих в токсикологічному аналізі методів. Зокрема, методом В.П. Крамаренка можна виділити 35-38 % силденафілу та 33-37 % варденафілу; методом О.О. Васильєвої – 25-28 % силденафілу та 26-28 % варденафілу; методом Стаса-Отто виділяється 31-35 % варденафілу та 33-36 % силденафілу.

Розроблено методику ізолювання силденафілу і варденафілу з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). При використанні даної методики і наступної очистки проб методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB із тканини печінки виділяється 46 - 48 % силденафілу та 45-48 % варденафілу.

Запропоновано методику ізолювання силденафілу та варденафілу з крові сумішшю ацетонітрилу із 70 % перхлоратною кислотою (1:1), при цьому виділяється 45-47 % силденафілу і варденафілу.

Встановлено, що після депротейнізації крові 10 % розчином цинку сульфату та 96 % етанолом, і наступної пробопідготовки методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB з цієї біологічної рідини ізолюється 59-60 % силденафілу і варденафілу.

Розроблено методику для ізолювання силденафілу та варденафілу з плазми крові методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB та на сорбційних колонках з Н-клинотилолітом. При застосуванні картриджів Oasis HLB із плазми ізолюється до 89 % силденафілу та до 88 % варденафілу, а на сорбційних колонках з Н-клинотилолітом ізолюється 78-79 % досліджуваних сполук.

Запропоновано методику ізолювання досліджуваних препаратів із сечі з використанням рідинної та твердофазної екстракції. При цьому виділяється 68-69 % силденафілу та 67-68 % варденафілу.

Проведена валідація розроблених методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу в біологічних об'єктах методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС. Визначали критерії, необхідні для забезпечення відтворюваності і

надійності аналітичних результатів: селективність/ специфічність, нижні межі виявлення та кількісного визначення в даному біологічному об'єкті, лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність, матричний ефект та відтворюваність. Вивчена стабільність силденафілу та варденафілу в пробах плазми і сечі при різних умовах зберігання.

Оскільки розроблені методи характеризуються точністю та відтворюваністю, їх запропоновано використовувати при хіміко-токсикологічних дослідженнях силденафілу та варденафілу.

Вивчено розподіл силденафілу та варденафілу в органах та біологічних рідинах щурів, яким вводили досліджувані препарати однократно в терапевтичній та вищій разовій дозі разом з нітрогліцерином. Біологічний матеріал досліджували через 3 та 24 год після введення.

Встановлено, що з використанням розроблених методів ізолювання опрацьованими хроматографічними методами аналізу, в усіх зразках відібраних тканин і біологічних рідин можна ідентифікувати силденафіл і варденафіл та їх метаболіти. Методом ГХ/МС у пробах виявлено 4 метаболіти силденафілу і 3 метаболіти варденафілу. Методом ВЕРХ/МС на колонці Zorbax SB-C18 у пробах виявлено 6 метаболітів силденафілу та 5 метаболітів варденафілу. Застосовуючи фрагментацію мас-спектрів ідентифіковано метаболіти силденафілу та варденафілу. Наявність метаболітів в пробах підтверджено також при УФ-детектуванні і флуориметричному детектуванні. Вивчено динаміку розподілу силденафілу і варденафілу в органах та біологічних рідинах. Встановлено, що найвищий вміст силденафілу спостерігається в шлунку із вмістом, кишківнику, печінці, легенях, серці та сечі, а варденафілу – в шлунку із вмістом, кишківнику, печінці, легенях та серці. Для клінічних лабораторних досліджень на аналіз потрібно відбирати кров та плазму протягом перших годин після прийому силденафілу та варденафілу.

Основними домінуючими метаболітами силденафілу є гідроксильований за піперазиновим циклом силденафіл та гідроксильований

продукт деградації за піперазиновим циклом деметилсилденафілу, а варденафілу – продукти деградації деетилварденафілу за піперазиновим циклом та їх гідроксильовані форми. При цьому через 24 год найвищий вміст метаболітів силденафілу та варденафілу спостерігається в легенях, печінці та сечі.

Ключові слова: силденафіл, варденафіл, метаболіти, ТШХ, УФ-спектрофотометрія, флуориметрія, ГХ/МС, ВЕРХ/МС, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ з флуоресцентним детектуванням, УВЕРХ/МС/МС, УВЕРХ/УФ, печінка, кров, сеча.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові статті

1. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вивчення умов екстракції силденафілу органічними розчинниками. *Фармацевтичний журнал*. 2008. №1. С. 83-87. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).*
2. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й., Кузьмицька А. Є. Експрес-методики ідентифікації силденафілу в судово-хімічній практиці. *Актуальні проблеми профілактичної медицини: зб. наукових праць, вип. 9, присвячується 95-річчю від дня народження професора В. П. Крамаренко*. Львів, 2011. С. 188-192. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).*
3. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Методи виділення силденафілу з біологічного матеріалу. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2013. №3-4. С.42-45. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).*

4. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2015. №1-2. С. 124-128. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).
5. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вплив рН середовища на ізолювання силденафілу з плазми Н-клинотилолітом. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24 (3). Київ. С. 127-132. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).
6. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові. *Одеський медичний журнал*. 2016. №2. С.16-20. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).
7. Осипчук Л. И., Галькевич И. И. Влияние типа сорбента метода твердофазной экстракции на степень выделения силденафила из плазмы крови. *Университетская наука: взгляд в будущее*: Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета (7 февраля 2020 года): в 2 т., Курский гос. мед. ун-т; под ред. В.А. Лазаренко. Курск: КГМУ, 2020. Т. I. С. 757-761. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).
8. Validation of an HPLC-MS method for the determinatin of vardenafil in rat urine / L. Osypchuk, I. Halkevych, S. Davydovych, Y. Bidnychenko. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019. Vol. 9 (08). P. 79-85. (Особистий

внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, участь у написанні статті).

Інформаційний лист

1. Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Інформаційний лист № 268-2017. Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2017 (Протокол № 102 від 19.04.2017 р.). *(Особистий внесок: планування і виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка до публікації).*

Тези доповідей

1. Osypchuk L. Determination of sildenafil in biological fluids. *Pharmaceutical Sciences in XXI Century: collection of scientific worcs II International Scientific Conferens*, 2-4 may, 2014. Tbilisi, Georgia, 2014. P. 157-158.
2. Osypchuk L. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood. The 6th international pharmaceutical conference *Science and practice 2015: Proc. Sci. pract. Conf.* November 5-6, 2015. Kaunas, Lithuania, 2015. P. 46.
3. Осипчук Л. І. Визначення силденафілу в сечі з використанням концентрування Н-клинотилолітом. *Природничі читання: матеріали II наук.-практ. конф. з міжнар. участю.* 14-17 травня 2015 р. Чернівці, 2016. С. 199.
4. Осипчук Л. І. Вплив рН середовища на ступінь ізолювання силденафілу Н-клинотилолітом. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2015: матеріали Всеукр. наук. - практ. конф. молодих вчених та студентів*, 26-27 березня 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 91.

5. Осипчук Л. И. Идентификация варденафила методом УФ-спектрофотометрии. *Традиции и инновации фармацевтической науки и практики*: Материалы Всероссийской научн.-практ. конф. с международным участием, посвященной 45-летию фармацевтического факультета КГМУ. Курск, 2011. С. 284- 286.
6. Осипчук Л. І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу. *Аналітична хімія у фармації*: матеріали II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф. 17 бер. 2016 р. Харків, 2016. С. 38.
7. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ГХ-МС. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій*: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених і студентів з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, 12-13 квітня 2018 р. Харків, 2018. С. 340.
8. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* (присвячена 60-річчю ТДМУ): підсумкова IX наук. – практ. конф., 14 червня 2017 р. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига» 2017, С. 341-342.
9. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з флуоресцентним детектором, збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції *Медична наука та практика XXI століття*, м. Київ, 1–2 лютого 2019 р. Київ: «Київський медичний науковий центр», 2019, С. 107.

ANNOTATION

Osypchuk L. I. Chemical-toxicological study of sildenafil, vardenafil and their metabolites in combined poisoning. – Qualifying scientific work as a manuscript.

The dissertation for Candidate's degree in Pharmaceutical Sciences in specialty 15.00.02 – Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2020.

The main methods of separation of sildenafil, vardenafil and their metabolites from biological objects, as well as methods of their identification and quantification, which are suitable for the purposes of clinical toxicological and forensic chemical investigation, are presented in the dissertation.

It is given a general description of sildenafil and vardenafil, their physicochemical properties, particular pharmacokinetics, and possible metabolic pathways, describes the side effects and toxic effects of these drugs. It is shown that most of the side effects caused by these drugs are observed in patients with risk factors from the cardiovascular system. It is noted that the main contraindication to the use of PDE inhibitors 5 is their simultaneous use with nitrovasodilators (nitroglycerin, mononitrate, and dinitrate of isosorbide), α -adrenoblockers, as well as combination with inhaled forms of alkyl nitrite – amyl nitrite, butyl nitrile means developing critical and uncontrolled hypotension that can cause sudden death.

For the determination of sildenafil and vardenafil in biological material in combined poisoning, it is necessary to develop effective methods of separation and sensitive identification and quantification methods, which are suitable for the purposes of chemical-toxicological analysis in establishing the cause of lethal poisoning and the diagnosis of acute toxic comorbidities.

Techniques for the identification and quantification of sildenafil and vardenafil in solutions that can be used in forensic-chemical investigation.

The reactivity of the studied compounds with several reagents used in forensic chemical practice for the express detection of xenobiotics was studied. According to the results of experimental studies, reactions with a detection limit of 1-8 µg of sildenafil and vardenafil in the sample were selected.

The possibility of identification of sildenafil and vardenafil in the solvent systems recommended by the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) has been established, and the composition of the confirmatory systems that can be used for TLC research for poisoning with these drugs has been worked out.

The UV spectra of these drugs in methanol and 96 % ethanol were studied. The concentration limits at which the absorption of sildenafil and vardenafil in methanolic and ethanol solutions are subject to the Beer-Lambert law.

The dependence of the fluorescence intensity of sildenafil and vardenafil on the nature of the solvent (acetonitrile, isopropanol, 96 % ethanol and water bidistilled) was investigated. Conditions for the quantitative determination of sildenafil and vardenafil by natural fluorescence are described.

The possibility of identification and quantification of sildenafil and vardenafil by the GC/MS method without derivatization on HP-1 and RTX-5 capillary columns was investigated. The use of the RTX-5 column was found to be suitable for the identification and quantification of both drugs in the mixture.

The conditions of sildenafil and vardenafil identification and quantification by the HPLC method were analyzed. Zorbax SB-C18 and LUNA® C18 chromatographic columns were used in the work.

Conditions for the identification and quantification of sildenafil by UPLC method with MS/MS and UV detection on a BEH C18 column were developed.

Methods for quantifying sildenafil and vardenafil in solutions by UV-spectrophotometry, fluorometry, GC/MS, HPLC/UV, HPLC/MS, HPLC/fluorescence detection and UPLC-MS/MS were validated for linearity, accuracy and precision.

The effect of the nature of organic solvents (1,2- dichloroethane, chloroform, diethyl ether, carbon tetrachloride, hexane and toluene) and the pH of the extraction

on the partition coefficient of sildenafil and vardenafil have been examined. It has been found that the best organic solvent for the extraction of these preparations from aqueous solutions is 1,2-dichloroethane. The optimum pH for sildenafil extraction is 8.0 and for vardenafil – 7.5. With these pH values are extracted 93.00-95.00 % of the studied drugs. Electrolytes have been found to reduce the degree of extraction of sildenafil and vardenafil from aqueous solutions.

A scheme for conducting Solid-Phase Extraction (SPE) on Oasis HLB cartridges was developed; the degree of extraction of sildenafil and vardenafil from aqueous solutions being 99.0-99.5 % and 98-99 %, respectively.

The influence of the pH on the sorption of sildenafil and vardenafil by H-clinoptilolite under static conditions was studied. It is established that the maximum sorption area of two drugs by this sorbent is observed at pH 5.5-7.8. Under static conditions, 5 % ammonia solution in 96 % ethanol is eluted from H-clinoptilolite columns to 82-83 % vardenafil and 84-85 % sildenafil. Under dynamic conditions, up to 90-91 % of vardenafil and 93-94 % of sildenafil are isolated from H-clinoptilolite.

A comparative evaluation of the isolation of sildenafil and vardenafil was performed using conventional methods for toxicological analysis. In particular, the V.P. Kramarenko method can be isolated 35-38 % sildenafil and 33-37 % vardenafil; by the O.O. Vasilyeva method – 25-28 % of sildenafil and 26-28 % of vardenafil; 31-35 % of vardenafil and 33-36 % of sildenafil are isolated by the Stas-Otto method.

A method of sildenafil and vardenafil isolation from biological material with a mixture of acetonitrile and 70 % perchloric acid (1: 1) was developed. Applying this technique and subsequent purification of SPE samples, 46-48 % of sildenafil and 45-48 % of vardenafil are released with Oasis HLB cartridges from liver tissue.

A method of sildenafil and vardenafil isolation from blood with a mixture of acetonitrile with 70 % perchloric acid (1: 1) is proposed; 45-47 % of sildenafil and vardenafil being isolated.

It was found that after deproteinization of blood with 10 % zinc sulfate solution and 96 % ethanol, and subsequent SPE sample preparation on Oasis HLB cartridges, up to 59-60 % of sildenafil and vardenafil were isolated.

This technique was developed to isolate sildenafil and vardenafil from the blood plasma by the SPE on Oasis HLB cartridges and on sorption columns with H- clinoptilolite. Up to 89 % of sildenafil and 88 % of vardenafil are isolated from plasma with Oasis HLB cartridges, and 78-79 % of the test compounds are isolated on sorption columns with H-clinoptilolite.

The method of isolation of the investigated preparations from urine, using liquid and solid phase extractions, is proposed. It allows isolating up to 68-69 % of sildenafil and 67-68 % of vardenafil to be extracted.

Validation of the developed methods for the quantitative determination of sildenafil and vardenafil in biological objects by the methods GC/MS and HPLC/MS was done. The criteria needed to ensure reproducibility and reliability of analytical results were determined: selectivity/specificity, lower limits of detection and quantification in a given biological object, linearity/calibration model, correctness and precision, matrix effect and reproducibility. The stability of sildenafil and vardenafil in plasma and urine samples under different storage conditions was studied.

As the developed methods are characterized by accuracy and reproducibility, ones are proposed to be used in chemical-toxicological investigation of sildenafil and vardenafil.

The distribution of sildenafil and vardenafil in the organs and biological fluids of rats injected with sildenafil and vardenafil together with nitroglycerin was examined. Sildenafil and vardenafil were administered to the animals once at therapeutic and higher single doses. The biological material was examined 3 and 24 hours after administration.

It has been established that sildenafil and vardenafil and their metabolites can be isolated using all the methods developed and identified by chromatographic analysis methods in all samples of tissues and biological fluids. The GC/MS method

revealed 4 metabolites of sildenafil and 3 metabolites of vardenafil in the samples. The HPLC/MS on the Zorbax SB-C18 column revealed 6 metabolites of sildenafil and 5 metabolites of vardenafil in the samples. Sildenafil and vardenafil metabolites have been identified using mass-spectra fragmentation. The presence of metabolites in the samples was confirmed by UV and fluorimetric detection.

The dynamics of sildenafil and vardenafil distribution in organs and biological fluids has been studied. It was found that the highest content of sildenafil is observed in the stomach with contents, intestines, liver, lungs, heart and urine, and vardenafil – in the stomach with contents, intestines, liver, lungs, and heart. For clinical laboratory testing, blood and plasma should be sampled for analysis within the first hours after administration sildenafil and vardenafil.

The dominant metabolites of sildenafil are hydroxylated piperazine cycle sildenafil and hydroxylated piperazine cycle desmethyl sildenafil, and vardenafil – degradation products of piperazine cycle desethyl vardenafil and their hydroxylated forms. In 24 hours, the highest content of metabolites of sildenafil and vardenafil is observed in the lungs, liver, and urine.

Keywords: sildenafil, vardenafil, metabolites, TLC, UV spectrophotometry, fluorometry, GC/MS, HPLC/UV, HPLC/MS, HPLC/fluorescence detection, UPLC/MS/MS, UPLC/UV, liver, blood, urine.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ, ФАРМАКОЛОГІЧНИХ І ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИЛДЕНАФІЛУ І ВАРДЕНАФІЛУ ТА МЕТОДІВ ЇХ ВИЗНАЧЕННЯ В БІОЛОГІЧНИХ ПРОБАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	28
1.1 Загальна характеристика силденафілу та варденафілу.....	28
1.2 Фармакокінетика та метаболізм силденафілу і варденафілу.....	31
1.3 Побічні ефекти та токсична дія силденафілу і варденафілу.....	36
1.4 Методи ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу.....	40
1.4.1 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу в дієтичних добавках та лікарських засобах на рослинній основі.....	40
1.4.2 Методи ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу в субстанціях та готових лікарських формах.....	41
1.4.3 Методи ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу в біологічних рідинах та тканинах.....	43
Висновки до розділу 1.....	51
РОЗДІЛ 2 РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ І ВАРДЕНАФІЛУ У РОЗЧИНАХ.....	52
2.1 Ідентифікація силденафілу та варденафілу з використанням хромогенних реактивів.....	52
2.2 Ідентифікація силденафілу та варденафілу методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту.....	55
2.3 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу у розчинах методом УФ-спектрофотометрії.....	59
2.3.1 Розробка умов ідентифікації силденафілу та варденафілу методом УФ-спектрофотометрії.....	59
2.3.2 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом УФ-спектрофотометрії.....	61
2.3.3 Валідація методики УФ-спектрофотометричного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах.....	67
2.4 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії.....	70
2.4.1 Розробка умов ідентифікації силденафілу та варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії.....	70

2.4.2 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії.....	73
2.4.3 Валідація методики визначення силденафілу та варденафілу у розчинах методом флуоресцентної спектрометрії.....	80
2.5 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу методом газової хроматографії з мас-спектрометрією.....	82
2.5.1 Розробка умов ідентифікації силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС.....	83
2.5.2 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС.....	87
2.5.3 Валідація методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС.....	92
2.6 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ.....	97
2.6.1 Розробка умов ідентифікації силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ/МС та ВЕРХ/УФ на колонці Zorbax SB-C18.....	98
2.6.2 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ/МС і ВЕРХ/УФ на колонці Zorbax SB-C18.....	103
2.6.3 Валідація методики кількісного визначення силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ з мас- та УФ-детектуванням на колонці Zorbax SB-C18.....	112
2.6.4 Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ на колонці LUNA [®] C18.....	119
2.6.5 Кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ на колонці LUNA [®] C18.....	123
2.6.6 Валідація методики кількісного визначення варденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектором на колонці LUNA [®] C18.....	127
2.7 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу методом ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ).....	132
2.7.1 Ідентифікація силденафілу методом УВЕРХ.....	132
2.7.2 Кількісне визначення силденафілу методом УВЕРХ.....	135
2.7.3 Валідація методики кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах методом УВЕРХ/МС/МС та з УФ- детектором.....	140
Висновки до розділу 2.....	144
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА УМОВ КОНЦЕНТРУВАННЯ СИЛДЕНАФІЛУ ТА ВАРДЕНАФІЛУ ІЗ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ.....	149
3.1. Вплив рН середовища і органічних розчинників на екстракцію силденафілу та варденафілу з водних розчинів.....	149

3.2 Вивчення впливу електролітів на екстракцію силденафілу та варденафілу з водних розчинів.....	157
3.3 Розробка умов концентрування силденафілу та варденафілу із водних розчинів методом твердофазної екстракції на картриджах Oasis HLB та картриджах з Н-клинотилолітом.....	158
3.3.1 Ізолювання силденафілу та варденафілу з водних розчинів методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB.....	159
3.3.2 Вплив рН середовища на сорбцію силденафілу та варденафілу Н-клинотилолітом.....	161
3.3.3 Десорбція силденафілу та варденафілу із Н-клинотилоліту в статичних та динамічних умовах.....	164
Висновки до розділу 3.....	166
РОЗДІЛ 4 ВИДІЛЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ ТА ВАРДЕНАФІЛУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.....	169
4.1 Виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу загальноприйнятими методами.....	169
4.2 Розробка методики виділення силденафілу та варденафілу з модельних проб печінки підкисленим ацетонітрилом.....	173
4.2.1 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу в модельних пробах печінки.....	176
4.3 Виділення силденафілу та варденафілу з біологічних рідин організму.....	178
4.3.1 Виділення силденафілу та варденафілу з використанням рідинної екстракції.....	179
4.3.2 Виділення силденафілу та варденафілу з крові методом ТФЕ.....	182
4.3.3 Виділення силденафілу та варденафілу з плазми методом ТФЕ на колонках з Н-клинотилолітом і картриджах Oasis HLB.....	184
4.4 Ізолювання силденафілу та варденафілу з сечі.....	187
Висновки до розділу 4.....	189
РОЗДІЛ 5 ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ ТА ВАРДЕНАФІЛУ МЕТОДАМИ ГХ/МС І ВЕРХ/МС В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ.....	192
5.1 Визначення валідаційних параметрів «селективність / специфічність» при кількісному визначенні силденафілу і варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС.....	193
5.2. Визначення валідаційного параметру «ефект матриці» при кількісному визначенні силденафілу і варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС.....	197

5.3. Визначення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» при кількісному визначенні силденафілу і варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС.....	199
5.4 Визначення валідаційних параметрів «правильність і прецизійність» для методик ГХ/МС та ВЕРХ/МС визначення силденафілу і варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки.....	202
5.5 Встановлення валідаційних параметрів «ступінь вивільнення, межа виявлення і кількісного визначення» при визначенні силденафілу та варденафілу в плазмі, сечі і тканині печінки методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС.....	205
5.6 Визначення критерію «стабільність» при дослідженні силденафілу та варденафілу у плазмі та сечі методом ВЕРХ/МС.....	206
Висновки до розділу 5.....	209
РОЗДІЛ 6 ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ, ВАРДЕНАФІЛУ І ЇХ МЕТАБОЛІТІВ В ОРГАНАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ТВАРИН.....	210
6.1 Виділення силденафілу та варденафілу з органів та біологічних рідин щурів.....	211
6.2 Ідентифікація силденафілу і варденафілу у суміші з метаболітами, методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту.....	212
6.3 Виявлення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів методом ГХ/МС в органах та біологічних рідинах щурів	216
6.4 Виявлення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів методом ВЕРХ/МС в органах та біологічних рідинах щурів	223
6.5 Ідентифікація варденафілу у присутності метаболітів методом ВЕРХ на колонці LUNA® C18 (з УФ- та флуоресцентною детекцією)...	229
6.6 Ідентифікація силденафілу у присутності метаболітів методом УВЕРХ.....	232
6.7. Кількісне визначення силденафілу та варденафілу в органах і біологічних рідинах щурів.....	234
Висновки до розділу 6.....	239
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	241
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	244
ДОДАТКИ.....	265

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

LOD –	межа виявлення;
LOQ –	межа кількісного визначення
RSD –	відносне стандартне відхилення
SD –	стандартне відхилення
TIAFT –	The International Association of Forensic Toxicologists;
АФІ –	активний фармацевтичний інгредієнт
ВЕРХ –	високоєфективна рідинна хроматографія;
ВЕРХ/ФЛ	високоєфективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектуванням
ВЕТТ –	висота, еквівалентна теоретичній тарілці;
ВЕТШХ	високоєфективна тонкошарова хроматографія
ГХ/МС –	газова хроматографія з мас-спектрометрією;
ДФУ –	Державна Фармакопея України;
ЕД –	еректильна дисфункція;
ЛАГ –	легенева артеріальна гіпертензія;
РЕ –	рідинна екстракція
РХ-ЕСІ-МС/МС –	рідинна хроматографія з електронною іонізацією та детектуванням із використанням тандемної мас- спектрометрії
РХ-МС/МС –	рідинна хроматографія з тандемною мас- спектрометрією
ТФЕ –	твердофазна екстракція;
ТШХ –	тонкошарова хроматографія;
УВЕРХ –	ультрависокоєфективна рідинна хроматографія
ФДЕ-5 –	фосфодіестераза 5-го типу;
ХТА –	хіміко-токсикологічний аналіз;
ШКТ–	шлунково-кишковий тракт.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Дисертаційна робота присвячена хіміко-токсикологічному дослідженню лікарських засобів силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях.

Силденафіл та варденафіл – це препарати із групи інгібіторів фосфодіестерази 5-го типу (ФДЕ-5) з вазодилатуючою дією. В медичній практиці інгібітори ФДЕ-5 призначають для лікування еректильної дисфункції. Силденафіл також використовується для лікування легеневої артеріальної гіпертензії, а варденафіл проходить клінічні випробовування стосовно застосування в медичній практиці для лікування цієї ж патології.

Інгібітори ФДЕ-5 є ефективними і досить безпечними лікарськими засобами при їх правильному використанні і дотриманні клінічних рекомендацій. Основними протипоказами є їх сумісне застосування з нітروазодилататорами (нітрогліцерином, мононітратом та динітратом ізосорбїду), а також з інгаляційними формами алкілнітритів – амілнітритом, бутилнітритом, ізобутилнітритом, з α -адреноблокаторами та гіпотензивними препаратами. В результаті потенціювання вазодилатуючих ефектів сумісне застосування інгібіторів ФДЕ-5 з вказаними засобами може викликати непередбачуване падіння артеріального тиску, розвиток критичної неконтрольованої гіпотензії та раптову смерть.

Силденафіл та варденафіл є недостатньо вивченими субстанціями в аспекті хіміко-токсикологічного дослідження. Зокрема, відсутні дані щодо їх поведінки в умовах загальноновживаних методик систематичного токсикологічного аналізу (ефективні способи пробопідготовки, хроматографічна поведінка в стандартних ТШХ-скринінгових системах, особливості виділення з біоматеріалу та інше).

Опрацюванню методик аналізу силденафілу та варденафілу присвячене обмежене число публікацій, в яких наведено методики їх визначення в

лікарських формах (Refat et al., 2013; Hafez et al., 2016) або в біологічних рідини́нах з метою дослідження їх фармакокінетичних характеристик (Tripathi et al., 2013; Liew et al., 2015; Кузнецов et al., 2017).

В літературі практично відсутні дані про методики ізолювання, виявлення та кількісного визначення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виділених з біологічного матеріалу, які придатні для судово-хімічного аналізу. Таким чином, розробка методик виділення, виявлення та кількісного визначення силденафілу та варденафілу в біологічних пробах та опрацювання схеми хіміко-токсикологічного дослідження цих лікарських засобів є актуальним і важливим завданням сучасної фармацевтичної науки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційна робота виконана згідно з планами проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (№ 0116U004500, шифр теми ІН 10.06.0001.16).

Мета і завдання дослідження

Метою дисертаційної роботи є розробка комплексу методів, що дозволяють ефективно і надійно вилучити, ідентифікувати та кількісно визначити силденафіл, варденафіл та їх метаболіти в зразках біологічного матеріалу в судово-хімічній чи клініко-токсикологічній практиці при діагностиці летальних і гострих комбінованих отруєнь.

Для досягнення вказаної мети були поставлені завдання:

- опрацювати дані літератури щодо фізико-хімічних, фармакологічних та токсикологічних властивостей силденафілу і варденафілу та сучасних методів їх аналізу при комбінованих отруєннях;
- для попереднього скринінгу силденафілу та варденафілу запропонувати чутливі реакції, вивчити їх роздільну здатність в умовах загальної схеми ТШХ-аналізу отрут органічної природи і запропонувати склад підтверджуючих систем для їх виявлення у суміші з метаболітами;

- розробити методики ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу сучасними хроматографічними та спектральними методами аналізу;
- розробити способи очистки силденафілу і варденафілу, виділених з біологічного матеріалу, методами рідинної та твердофазної екстракцій;
- провести порівняльний аналіз методик ізолювання силденафілу і варденафілу із біологічного матеріалу загальноприйнятими в судово-хімічній практиці методами і запропонувати ефективніші методики виділення досліджуваних сполук із біологічних рідин та тканин;
- провести валідаційну оцінку методик кількісного визначення досліджуваних препаратів в біологічних тканинах та рідинах;
- вивчити розподіл силденафілу і варденафілу та їх метаболітів, ідентифікованих методом мас-спектрометрії в органах та біологічних рідинах щурів в присутності нітрогліцерину;
- на підставі виконаних досліджень запропонувати алгоритм та методики хіміко-токсикологічного аналізу силденафілу та варденафілу при комбінованих отруєннях.

Об’єкти дослідження: лікарські засоби силденафіл та варденафіл.

Предмет дослідження: хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях.

Методи дослідження

Для ідентифікації силденафілу та варденафілу в модельних розчинах та витяжках з біологічного матеріалу використовували кольорові та осадкові реакції, методи ТШХ, УФ-спектрометрію, флуориметрію, ГХ/МС, ВЕРХ з мас-, УФ- та флуоресцентним детектуванням, УВЕРХ з УФ- та мас-детектуванням. Для кількісного визначення використовували хроматографічні методи: ВЕРХ з різним способом детектування, ГХ/МС, УВЕРХ/МС/МС і УВЕРХ/УФ; УФ-спектрометрію та флуориметрію. Ступінь ізолювання силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу визначали методами О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто, а також розробленим нами

методом. Очищення витяжок, отриманих з біологічних об'єктів, проводили методом рідинної (РЕ) та твердофазної екстракції (ТФЕ). Для оцінки експериментальних досліджень використовували методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше проведено системне хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виділених з біологічного матеріалу.

Для ідентифікації силденафілу та варденафілу, виділених з біологічного матеріалу, запропоновано ряд осадових та кольорових реакцій. Вперше запропоновано системи розчинників для проведення ТШХ, які дозволяють виявляти досліджувані препарати в суміші з метаболітами.

З метою виявлення та кількісного визначення силденафілу та варденафілу у витяжках з біологічного матеріалу розроблено умови методів УФ-спектрофотометрії; флуориметрії; ГХ/МС; ВЕРХ/МС, з УФ - та флуоресцентним детектуванням; УВЕРХ з МС/МС та УФ-детектуванням. Проведена валідація розроблених методик.

Вперше вивчено умови екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів в залежності від рН середовища і природи органічних розчинників, а також розроблено умови концентрування препаратів із водних розчинів методом твердофазної екстракції на картриджах Oasis HLB та картриджах з Н- клинотилолітом.

Вперше проведено порівняльну оцінку ізолювання силденафілу та варденафілу загальноприйнятими в токсикологічному аналізі методами, а також для виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу та крові запропоновано використання суміші ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). Для ізолювання силденафілу та варденафілу з крові також запропоновано метод ТФЕ на картриджах Oasis HLB, після депротеїнізації 10 % розчином цинку сульфату та 96 % етанолом. Для ізолювання силденафілу та варденафілу з плазми розроблено умови для ТФЕ на картриджах Oasis HLB

та на сорбційних колонках з Н-клиноптилолітом, а також запропоновано методику ізолювання досліджуваних препаратів із сечі.

Вивчено розподіл силденафілу та варденафілу в органах отруєних тварин після їх одночасного прийому з нітрогліцерином, що дозволяє вибрати біологічні об'єкти для проведення хіміко-токсикологічного аналізу.

Наукову новизну одержаних результатів підтверджено інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я № 268-2017 (2017 р.) «Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь».

Практичне значення отриманих результатів

На основі комплексних експериментальних досліджень обґрунтовано алгоритм та розроблено поетапну методику хіміко-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на вміст силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях. Розроблені методики ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу рекомендовано для впровадження в практичну роботу токсикологічних відділень судово-медичної експертизи при вирішенні питань щодо отруєння даними препаратами, клінічних лабораторій – з метою визначення їх в біологічних рідинах, а також для проведення аналізу активних фармацевтичних інгредієнтів та готових лікарських засобів.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу та варденафілу впроваджені в роботу Головного бюро судово-медичної експертизи МОЗ України та Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи (акти впровадження від 17.01.2018 та 30.01.2018), а також в навчальний процес і наукову роботу кафедри лікарської та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету, кафедри судової медицини Одеського національного медичного університету, кафедри фізикоїдної хімії Запорізького державного медичного університету, кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського

національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, кафедри хімії Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти (акти впровадження від 25.01.2016, 31.01.2018, 6.02.2018, 13.02.2018, 15.02.2018, 13.03.2018, 16.03.2018).

Особистий внесок здобувача

Дисертантом проведено огляд літератури щодо фізико-хімічних, фармакологічних і токсикологічних властивостей силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, а також методів аналізу, які можна використати для виділення, ідентифікації та кількісного визначення даних препаратів в біологічному матеріалі при комбінованих отруєннях. Особисто проведено експериментальні дослідження та статистичну обробку одержаних результатів, систематизовано отримані дані, сформульовано висновки роботи.

З науковим керівником визначено основні задачі, розроблено методичні підходи для проведення експериментальних досліджень даної роботи, проведено аналіз даних, отриманих в результаті власних експериментів. Науковий керівник є співавтором наукових праць.

Апробація результатів дисертації

Основні результати дисертаційної роботи викладені та обговорені на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Впровадження сучасних наукових досягнень в судову експертизу» (Харків, 2009), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 45-летию фармацевтического факультета КГМУ «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики» (Курск, 2011), II International Scientific Conferens «Pharmaceutical Sciences in XXI Century» (Tbilisi, 2014), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2015» (Запоріжжя, 2015), II міжнародній науково-практичній конференції «Природничі читання» (Чернівці, 2015), International Pharmaceutical Conference «Science and Practice 2015» (Lithuania, Kaunas),

II міжнародній науково-практичній інтернет конференції «Аналітична хімія у фармації» (Харків, 2016), підсумковій IX науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2017), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченій 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора Гайдукевича О. М. (Харків, 2018), міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика XXI століття (Київ, 2019).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 8 статей, із них 4 – у фахових виданнях України, 1 – в журналі, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus, 1 інформаційний лист, а також 9 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, 5 розділів власних експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та 8 додатків (27 с.). Загальний обсяг дисертації становить 292 сторінки. Основний текст дисертації викладено на 167 сторінках друкованого тексту. Робота ілюстрована 89 таблицями та 45 рисунками. Список використаних джерел нараховує 185 найменувань, з них кирилицею – 36 та латиницею – 149.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ, ФАРМАКОЛОГІЧНИХ І ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИЛДЕНАФІЛУ І ВАРДЕНАФІЛУ ТА МЕТОДІВ ЇХ ВИЗНАЧЕННЯ В БІОЛОГІЧНИХ ПРОБАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

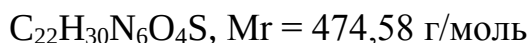
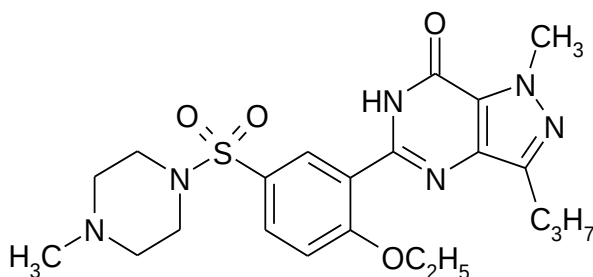
1.1 Загальна характеристика силденафілу та варденафілу

Силденафіл та варденафіл – препарати із групи інгібіторів фосфодіестерази 5-го типу (ФДЕ-5) з вазодилатуючою дією [10, 14].

В медичній практиці інгібітори ФДЕ-5 призначають для лікування еректильної дисфункції (ЕД) та легеневої артеріальної гіпертензії (ЛАГ) [48, 72, 74, 84, 147, 167, 178]. Механізм дії інгібіторів ФДЕ-5 пов'язаний з дією нітроген (II) оксиду на систему циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ). За рахунок блокади ФДЕ-5 і стабілізації цГМФ лікарські засоби цієї групи підсилюють ефект нітроген оксиду (II), який активує гуанілатциклазу, що призводить до підвищення рівня цГМФ, розслаблення гладких м'язів кавернозних тіл і притоку до них крові [63, 73, 95, 106].

В даний час відомо 7 фармакологічно активних представників інгібіторів ФДЕ-5, які представлені наступними сполуками: силденафіл, варденафіл, таданафіл, аванафіл, лоденафіл, міроденафіл і уденафіл. Із цих речовин найефективнішими для лікування ЕД є силденафіл, варденафіл та таданафіл [54, 62, 80, 126, 127].

У хімічному відношенні силденафіл є 5-{2-етокси-5-[(4-метилпіперазин-1-іл)сульфоніл]феніл}-1-метил-3-пропіл-1*H*,4*H*,7*H*-піразоло[4,3-*d*] піримідин-7-он:



Структурна формула силденафілу

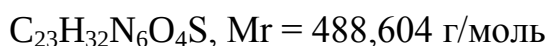
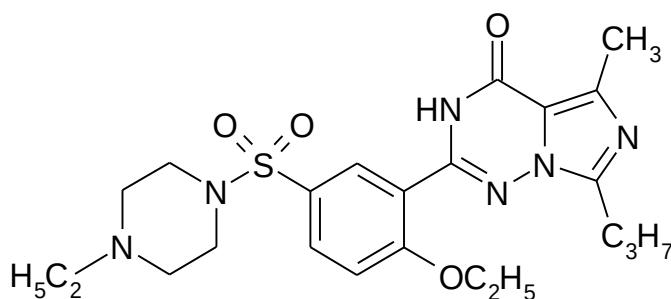
Субстанція силденафілу є білим, з кремовим відтінком, кристалічним порошком. Розчинність силденафілу у воді становить 3,5 мг/мл, в етанолі < 1 мг/мл, в метанолі та диметилформаміді – 14 мг/мл. Температура топлення силденафілу 187-189 °C [109].

Силденафіл запатентовано в 1996 році під торговою назвою «Віагра». В 1998 році цей препарат схвалено Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів (FDA, США) для лікування еректильної дисфункції [117]. У 2005 році таблетовані форми із вмістом силденафілу 20 мг (торгова назва «Revatio», Pfizer Canada Inc.) схвалено FDA та Європейським агенством з оцінювання лікарських препаратів (EMA) для лікування хворих з легеневою артеріальною гіпертензією [115, 118, 144]. В 2009 році затверджена інфузійна форма препарату «Revatio» [136]. На сьогоднішній день силденафіл з успіхом використовується для лікування портопультмональної гіпертензії [148], ідіопатичної дитячої легеневої гіпертензії [72, 146], лікування легеневої артеріальної гіпертензії, пов'язаної з вродженими вадами серця [37, 111, 161, 183], легеневої гіпертензії у немовлят [56, 145, 149, 170] та призначається після трансплантації серця у дітей [169].

В Україні силденафіл зареєстрований під торговими назвами: Ергос®, Камагра, Еротон®, Еросил, Адамакс, Силденафіл, Сігра, Новагра, Еро-лайф®, іГра®, Конегра делюкс, Конегра® класік, Сінегра, Пенімекс, Максігра, Філап, Супервіга, Потенціале, Тегрум, Динаміко, Факел®, Олнайт, Векта, Інфорс,

Віасил, Силдокад, Інтагра® IC, Віагра®, Віагра® ODT, Дженагра®, Могинин®, Візарсин, Вівайра, Форсаж, Ревацио. Вказані лікарські засоби містять силденафіл у формі цитрату. Випускається у дозах по 25, 50 або 100 мг у вигляді таблеток, вкритих оболонкою, а також у формі жувальних та диспергованих таблеток. Під назвою «Строндекс» (12,5 мг/дозу) – випускається у вигляді спрею для ротової порожнини [7].

У хімічному відношенні варденафіл – це: 2-{2-етокси-5-[(4-етилпіперазин-1-іл)сульфоніл]феніл}-5-метил-7-пропіл-1*H*,4*H*-імідазо[4,3-*f*][1,2,4]тріазин-4-он:



Структурна формула варденафілу

Субстанція варденафілу є білим, з кремовим відтінком, кристалічним порошком. Розчинність в воді 0,11 мг/мл, слабо розчиняється в ацетоні, добре розчиняється в метанолі і етанолі. Температура топлення варденафілу 192 °C [133].

Варденафіл випускається у формі гідрохлориду тригідрату.

Варденафіл запатентований у 2001 році. На фармацевтичний ринок поступає під торговою назвою «Левітра» (Bayer, GlaxoSmithKline). В 2003 році схвалено FDA та ЕМА як засіб для лікування еректильної дисфункції [76, 77]. В даний час варденафіл проходить клінічні випробовування стосовно застосування в медицині для лікування ЛАГ. Проведені експериментальні

дослідження з використанням моделі легеневої гіпертензії показують, що дана сполука ефективніша ніж силденафіл [44, 139, 177].

В Україні варденафіл представлений тільки брендовим препаратом «Левітра», Bayer Pharma, AG. Випускаються таблетки, вкриті оболонкою у дозі 5 та 20 мг, а також дисперговані таблетки Левітра® ОДТ у дозі 10 мг [7, 8].

1.2 Фармакокінетика та метаболізм силденафілу і варденафілу

Силденафіл – це вазоактивна сполука, яка використовується для лікування ЕД та ЛАГ. Під дією силденафілу індукується експресія ФДЕ 5-го типу в гіпертрофованих міоцитах правого шлуночка серця, у зв'язку з чим проявляється селективна дія силденафілу на міокард правого шлуночка та в легенях [123, 164].

Окрім інгібування ФДЕ 5-го типу, силденафіл також інгібує ФДЕ 6-го типу (в сітківці очей) та ФДЕ-3 типу (в міокарді). При цьому сітківкою очей змінюється сприйняття кольору, а у серці – посилюється скоротливість правого шлуночка [83, 107, 110].

Терапевтична разова доза силденафілу для дорослих – 50 мг 1 раз на добу. З урахуванням ефективності та переносимості вона може бути збільшена до 100 мг, або знижена до 25 мг. Максимальна разова доза – 100 мг.

Після перорального прийому силденафіл швидко всмоктується в шлунку і попадає в кров'яне русло. Біодоступність його ≤ 40 %. Максимальний рівень концентрації в плазмі спостерігається через 30 хв після вживання і тримається до 2-х годин. Препарат добре розподіляється в тканинах організму, оскільки середній рівноважний об'єм розподілу (V_d) становить близько 105 л [113, 162].

Характер їжі впливає на швидкість всмоктування силденафілу, при споживанні жирних продуктів всмоктування триває до 60 хв, а рівень біодоступності зменшується до 29 % [10, 14].

В організмі силденафіл метаболізує за участю ізоферментів 3A4 та 2C9 цитохрому P450 (CYP). Основний його метаболіт – N-деметилсилденафіл. Концентрація вільного силденафілу та N-деметилсилденафілу у плазмі є низькою, оскільки до 96 % цих сполук зв'язується з білками плазми. Зокрема, після одноразового перорального вживання 100 мг силденафілу, середня максимальна загальна плазмова концентрація силденафілу становить близько 440 нг/мл, а середня максимальна концентрація вільного силденафілу в плазмі досягає 18 нг/мл. Період піввиведення ($T_{1/2}$) силденафілу в середньому становить 3-5 годин. N-деметильований силденафіл піддається подальшому метаболізму, $T_{1/2} \approx 4$ год [53, 55, 121, 122].

N-деметильований силденафіл також є фармакологічно активним, проте його активність менша ніж силденафілу у 2 рази.

Окрім N-деметилсилденафілу в процесі метаболізму силденафілу утворюються продукти аліфатичного гідроксилування, деалкілювання та подальшого розщеплення [123, 124].

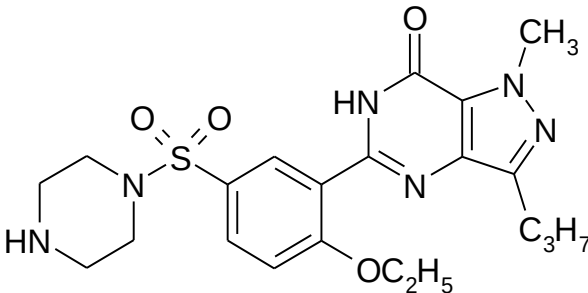
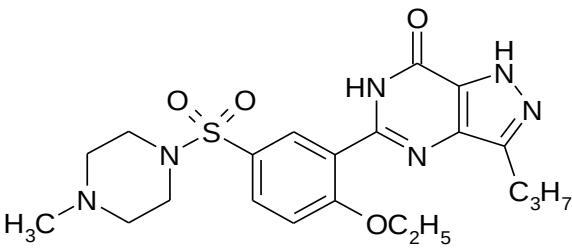
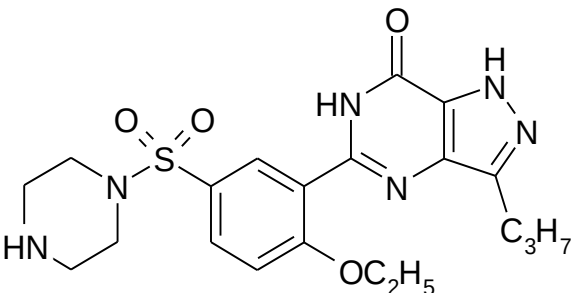
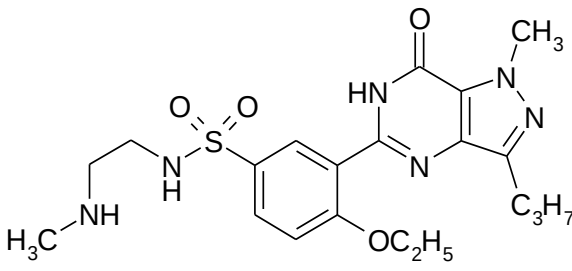
Основні продукти метаболізму силденафілу, які виявлено в органах лабораторних тварин і людини за даними D. K. Walker зі співавторами [124] наведено в табл 1.1.

При пероральному застосуванні силденафіл екскретується у вигляді метаболітів, головним чином кишківником (з фекаліями, приблизно 80 % прийнятої дози), що пояснюється високою ліпофільністю даного препарату, і меншою мірою – з сечею (близько 13 % прийнятої дози) [53, 121, 124].

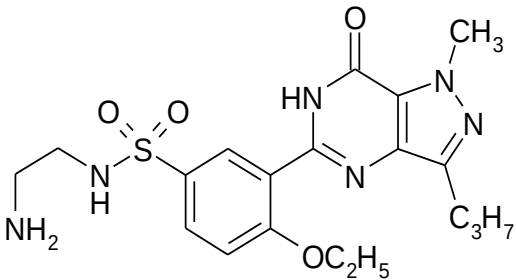
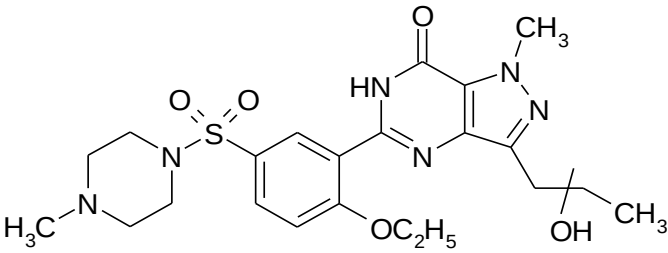
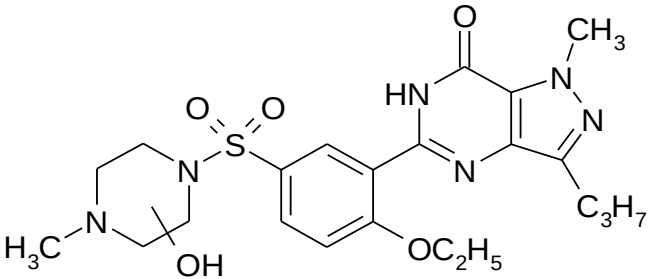
Представник цієї ж групи інгібіторів ФДЕ-5 – варденафіл, призначається лише для лікування ЕД. В терапевтичній дозі 10 мг його приймають за 25-60 хв до сексуального контакту, в деяких випадках дозу збільшують до 20 мг чи зменшують до 5 мг на добу. Максимальна рекомендована доза становить 20 мг один раз на добу [10, 55].

Таблиця 1.1

Основні продукти метаболізму силденафілу

№ п/п	Шлях метаболізму/ наявність метаболіту в організмі	Структурна формула метаболіту	М _г , г/моль
1	2	3	4
1.	Деметилювання за піперазиновим циклом / миші, щурі, кролі, собаки, людина		460,56
2.	Деметилювання за піразоловим циклом / щурі, собаки		460,56
3.	Деметилювання за піразоловим і піперазиновим циклом / щурі, собаки		446,53
4.	Розмикання піперазинового циклу деетилюванням / миші, щурі, кролі, собаки, людина		448,55

Продовж. табл. 1.1

1	2	3	4
5.	Деметилування і деетилування за піперазиновим циклом / миші, щурі, кролі, собаки, людина		434,52
6.	Гідроксилування аліфатичного радикалу / миші, щурі, кролі, людина		490,58
7.	Гідроксилування піперазинового циклу / щурі, собаки		490,58

Як і силденафіл, варденафіл зазнає метаболізму в печінці. В метаболізмі приймають участь наступні ізоферменти цитохрому P450: 3A4, 3A5, 2C9 [61, 63].

Основним метаболітом варденафілу є продукт деетилування варденафілу. Концентрації вільного варденафілу та деетильованого варденафілу у плазмі є досить низькими, оскільки до 95 % цих сполук зв'язується з білками плазми. Рівень концентрації N-деетильованого варденафілу в плазмі нижчий від рівня варденафілу $\approx$ в 4 рази.

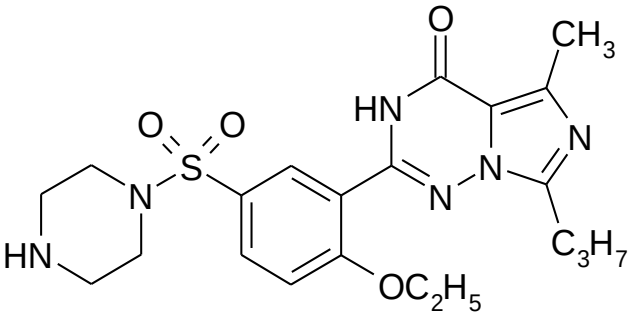
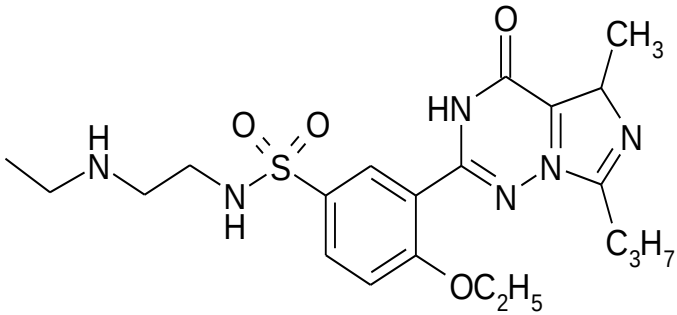
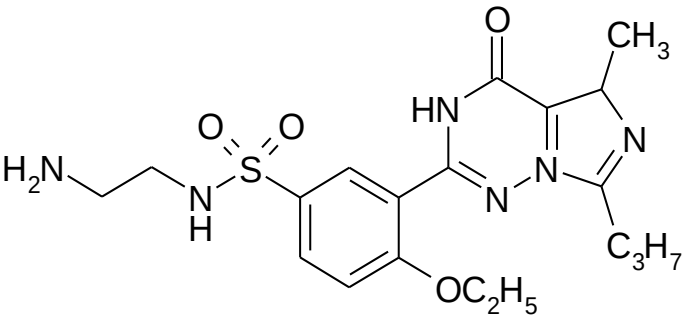
Варденафіл достатньо швидко всмоктується в ШКТ – абсолютна біодоступність близько 15 %, а при прийомі із їжею, багатою на жири,

біодоступність зменшується від 2 до 5 разів. Переважно максимальний рівень концентрації варденафілу в плазмі ($C_{\text{макс}}$) досягається через 60 хв після прийому (у 90 % випадків), проте є випадки, коли вже через 15 хв спостерігається максимальна концентрація в плазмі ($C_{\text{макс}} = 15-17$ нг/мл). Середній період піввиведення ($T_{1/2}$) варденафілу становить 4-5 годин, а деетилварденафілу – близько 4 годин.

Згідно з даними Bischoff E. [57] ідентифіковано 3 активні продукти метаболізму варденафілу, які виявлено в органах лабораторних тварин і людини. Формули цих метаболітів наведено в табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Основні продукти І-фази біотрансформації варденафілу

№ п/п	Шлях метаболізму	Структурна формула метаболіту	M_r , г/моль
1	2	3	4
1.	Деетилування за піперазиновим циклом		460,56
2.	Розмикання піперазинового циклу деетилуванням		462,57
3.	Деградація піперазинового циклу з деалкілуванням		434,52

На другій фазі біотрансформації утворюються кон'югати з глюкуроною кислотою. Зокрема, у крові міститься глюкуронід в формі кон'югату з деетилварденафілом. Фармакологічна активність неглюкуронового метаболіту становить 26 % від концентрації вихідної речовини [55, 57].

Після прийому всередину варденафіл та його метаболіти виводяться переважно шлунково-кишковим трактом (91-95 % дози), і меншою мірою нирками (2-6 % дози) [57, 76, 125].

1.3 Побічні ефекти та токсична дія силденафілу і варденафілу

Побічні ефекти, викликані застосуванням інгібіторів ФДЕ-5 і зокрема, силденафілом та варденафілом, в поодиноких випадках супроводжуються порушеннями зі сторони вестибулярного апарату та органів зору. Ці порушення носять легку форму і мають тимчасовий характер (розмитість зображення, контрастна зміна зору) [58, 83, 103].

Важкі побічні реакції з боку серцево-судинної системи після застосування інгібіторів ФДЕ-5 включають: інфаркт міокарда, нестабільну стенокардію, шлуночкову аритмію, цереброваскулярні крововиливи, транзиторні ішемічні атаки, гіпотензію, раптову серцеву смерть [94, 97, 102, 130, 131]. Більшість побічних ефектів спостерігається у пацієнтів з факторами ризику зі сторони серцево-судинної системи (під час статевого акту чи після нього) і лише незначна кількість проявляється у здорових пацієнтів [83, 95, 165, 185].

Є дані, що від передозування силденафілу, викликаного одноразовою дозою 250 мг, спостерігались ознаки рабдоміолізму та порушення візуального сприйняття [116].

Описаний випадок втрати зору на одне око в результаті передозування силденафілу [59].

Незважаючи на відносну безпечність інгібіторів ФДЕ-5, описані випадки їх використання з метою суїциду. При отруєнні великими дозами силденафілу спостерігається блювання, порушення зору, синусна тахікардія. При цьому дані симптоми отруєнь були викликані прийомом 6,5 г силденафілу на фоні алкогольного сп'яніння, а рівень концентрації силденафілу в плазмі через 24 год становив 22,4 мкг/мл [41].

В ряді випадків дані симптоми інтоксикації спостерігалися і при прийомі нижчих доз силденафілу. Зокрема при прийомі 1,5 г силденафілу спостерігалось порушення кольорового зору, тахікардія, пріапізм [58].

Доступність силденафілу в домашніх умовах також становить загрозу для життя дітей. Зокрема, описані випадки ненавмисного вживання силденафілу дітьми віком від 19-ти місяців. Основними симптомами інтоксикації були пріапізм та тахікардія, при цьому концентрація силденафілу в плазмі дитини через 7 годин після прийому препарату становила 3,9 мкг/мл та N- деметилсилденафілу – 1,7 мкг/мл [143].

Інгібітори ФДЕ-5 можна поєднувати з рядом лікарських засобів [104, 128, 157, 159, 168]. Проте не рекомендується їх застосовувати з нітровоазодилататорами (нітрогліцерином, мононітратом та динітратом ізосорбїду), а також поєднувати з інгаляційними формами алкілнітритів – аміннітритом, бутілнітритом, ізобутілнітритом [55, 93, 98, 121, 140]. В результаті потенціювання вазодилатуючих ефектів сумісне застосування інгібіторів ФДЕ-5 із гіпотензивними препаратами призводить до непередбачуваних падінь артеріального тиску, розвитку критичної неконтрольованої гіпотензії і раптової смерті [62, 83, 94, 108].

Щоб уникнути серйозних ускладнень та побічних ефектів перерва між прийомами силденафілу чи варденафілу та препаратами органічних нітратів має бути не менше 24 годин [87, 93, 165, 96, 166].

Зафіксовані смертельні випадки, викликані передозуванням силденафілу серед осіб, які окрім еректильної дисфункції, мали супутню патологію – цукровий діабет, гіпертонію [79].

Описані смертельні випадки, викликані одночасним вживанням силденафілу із верапамілом, триметазидином, йохімбіном, бромзаземом та нітрогліцерином [102].

Смертельні випадки спостерігалися і від гострої серцевої недостатності, викликані міокардіосклерозом на фоні регулярного вживання силденафілу [131].

Поєднання силденафілу із бета-адреноблокаторами та діуретиками також стало причиною смертельного випадку у пацієнта із хронічною серцевою недостатністю [130].

Значну небезпеку несе використання підроблених інгібіторів ФДЕ-5, кількість яких зростає через популярність даних засобів, оскільки вони доступні досить широкому колу осіб з ЕД [65, 163].

Підвищена увага до препаратів, що використовуються при лікуванні еректильної дисфункції, зумовила появу на фармацевтичному ринку великої кількості дієтичних добавок та лікарських засобів на рослинній основі, які в своєму складі замість анонсованих рослинних компонентів містять інгібітори ФДЕ-5, що не вказані в анотації.

Так, описаний випадок гепатотоксичної дії фальсифікованого лікарського засобу на рослинній основі «Tiger King», в якому було виявлено силденафіл, про вміст якого на етикетці не зазначено [38].

Під час аналізу 50 дієтичних добавок рослинного походження для лікування ЕД в Румунії в 11 із них виявлено силденафіл і тадалафіл (91 % фальсифікованих продуктів отримано з Китаю) [158].

Із 80 лікарських засобів на рослинній основі для лікування ЕД, які доступні на фармацевтичному ринку Ірану, у 27 % виявлено силденафіл, трамадол та діазепам [78].

Також 9 різних інгібіторів ФДЕ-5 виявлено у 23-х дієтичних добавках рослинного походження (із 71 проаналізованих), які доступні на фармацевтичному ринку Голандії, а у 3-х з них містились комбінації із декількох інгібіторів ФДЕ-5 [142].

Є інформація, що в м. Хартум (Судан) з тридцяти рослинних препаратів, які містять афродизіаки, дев'ять виявилися фальсифікованими силденафілу цитратом, а три – тадалафілом. Проведений аналіз показав, що в одній дозі фальсифікованого зразку міститься $165,46 \pm 0,79$ мг силденафілу та $60,76 \pm 0,60$ мг тадалафілу. Використання таких засобів може призвести до смертельних побічних ефектів, враховуючи, що максимальна добова доза для силденафілу і тадалафілу 100 мг і 20 мг відповідно [69].

У Франції, серед 150 дієтичних добавок для лікування ЕД, 61 % фальсифіковано інгібіторами ФДЕ-5 (27 % силденафілом, тадалафілом і варденафілом і 34 % – їх структурно модифікованими аналогами). Серед них 64 % містять лише один інгібітор ФДЕ-5, а у 36 % – міститься від двох до чотирьох компонентів, які є інгібіторами ФДЕ-5. 25 % проаналізованих дієтичних добавок містили інгібітори ФДЕ-5 в дозах, що значно перевищували максимально рекомендовані дози [66].

Під час контролю якості дієтичних добавок для лікування ЕД в Ємені у всіх із 21 проаналізованих продуктів були виявлені інгібітори ФДЕ-5: у 18 – силденафіл, у одному – тадалафіл, дві містили комбінацію силденафілу з тадалафілом та силденафілу з варденафілом і тадалафілом [47].

Тадалафіл, силденафіл та деметильований силденафіл виявлено у двох із 11-ти проаналізованих дієтичних добавок в Італії [50].

В енергетичному напої виявлено пропоксифенілсилденафіл [46].

При аналізі двох дієтичних добавок для лікування ЕД, придбаних через мережу Internet, виявлено не вказаний на етикетці силденафіл у дозуванні $13,87 \pm 1,79$ мг та $18,34 \pm 2,16$ мг на капсулу, а в таблетках Viagra® 100 мг, придбаних за оголошенням в мережі Internet, його вміст перевищував зазначену дозу на 35,80 % [49].

Можливість пацієнтів придбати дані засоби не лише в аптечних закладах, але й в інтернет-магазинах, а також непоінформованість про наявність в складі інгібіторів ФДЕ-5, може спровокувати негативні, а інколи і

летальні наслідки, особливо коли є протипокази до їх застосування [43, 60, 160, 179].

1.4 Методи ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу

1.4.1 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу в дієтичних добавках та лікарських засобах на рослинній основі

Для визначення вмісту інгібіторів ФДЕ-5 в дієтичних добавках та лікарських засобах на рослинній основі описані умови аналізу методами ТШХ [141]; ВЕТШХ [71]; РХ-ЕСІ-МС/МС [152]; ВЕРХ-МС/МС [153]; УВЕРХ/МС [154]; ВЕРХ з УФ- та ІЧ- спектроскопією [129].

Для визначення кофеїну, ацетамінофену, силденафілу, тадалафілу і варденафілу в складі лікарських засобів на рослинній основі розроблено умови аналізу методом ТШХ із денситометричним детектуванням. Розділення компонентів суміші на пластинках "Merck" проведено у системі розчинників: етилацетат-*n*-пропанол-25 % аміак (45:5:1). Межа виявлення силденафілу становить 0,1346 мкг/г, а варденафілу – 0,2047 мкг/г [141].

Описано розділення силденафілу, варденафілу, тадалафілу та восьми їх аналогів у дієтичних добавках методом ВЕТШХ у системі розчинників *трет*-бутилметиловий етер-метанол-25 % аміак (20:2:1), з наступною ідентифікацією розділених компонентів мас-спектрофотометрично [71].

Описано методики аналізу дієтичних добавок на наявність інгібіторів ФДЕ-5 методом ВЕРХ на колонках C-18 [152], Zorbax Eclipse XDB-C18 [153], Cosmosil 3C18-EB [154]; Prontosil Kromapluс C18 [129]. Рухомі фази в цих методах різняться своїм складом:

- водний розчин амонію форміату 2 мМ та ацетонітрил [152];
- 0,1 % водний розчин ацетатної кислоти та ацетонітрил [153];
- 0,1 % водний розчин форміатної кислоти та 0,1 % розчин цієї кислоти в ацетонітрилі [154];

– розведена сульфатна кислота та ацетонітрил [129].

При цьому встановлені межі виявлення силденафілу та варденафілу в 1 г чи 1 мл дієтичної добавки, а також інших компонентів, які відносяться до інгібіторів ФДЕ-5 чи є їх аналогами. Межа виявлення залежить від способу детектування та складу рухомої фази. Даними методами також встановлено наявність силденафілу та варденафілу у вищій кількості, ніж зазначено на етикетці, а також визначено їх вміст у дієтичних добавках, де вони не зазначені в складі.

1.4.2 Методи ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу в субстанціях та готових лікарських формах

Для визначення силденафілу цитрату і дапоксетину гідрохлориду в комбінованих лікарських формах запропоновано умови аналізу методом ВЕТШХ. Розділення проводили у системі розчинників гексан-метанол-діетиламін (9,2:1,6:1,2) на силікагелі 60 G F254. Денситометричне сканування проводили при $\lambda = 241$ нм, R_f силденафілу цитрату становить $0,21 \pm 0,02$. Межа виявлення силденафілу становить 210 нг в пробі, а межа кількісного визначення – 450 нг в пробі [132].

Запропоновано ряд методик спектрального аналізу силденафілу та варденафілу за вимірюванням поглинання досліджуваних речовин в УФ- та видимій ділянках спектру. Так, на вимірюванні світлопоглинання при $\lambda = 228$ нм базується УФ-спектрофотометричне визначення силденафілу у фармацевтичних препаратах [176]. При цьому авторами досліджено вплив гідролізу (кислого та лужного), нагрівання, процесів окиснення і фотолізу на характер спектральної кривої і інтенсивність поглинання, а лінійність поглинання силденафілу спостерігається в межах концентрацій 10-50 мкг/мл.

Описано метод кількісного визначення силденафілу в таблетках у видимій ділянці спектру. При цьому силденафіл вводили у реакції з 2,3-дихлор-5,6-диціано-*n*-бензохіноном (DDQ) і 3,6-дихлор-2,5-дигідрокси-*n*-бензохіноном

(p-CLA). Інтенсивність поглинання продуктів конденсації вимірювали при 460 нм (при використанні DDQ) та при 510 нм – (при використанні p-CLA). Будову отриманих комплексів досліджено методами елементного аналізу, ІЧ-, ¹H-ЯМР і мас-спектрометрії. Для комплексів силденафілу з DDQ лінійність поглинання спостерігалася в межах концентрацій 10-100 мкг/мл, а для комплексів p-CLA – 5-250 мкг/мл [134].

Для кількісного визначення варденафілу і тадалафілу в субстанціях та таблетках розроблено методику, яка ґрунтується на вимірюванні інтенсивності поглинання у видимій ділянці спектру залишкової кількості N - бромсукциніміду (NBS), який не вступив в реакцію окиснення варденафілу і тадалафілу. В цій методиці надлишкову кількість NBS вводили в реакції з барвниками (амарантовим, метиленовим синім, індиго карміновим або помаранчевим G) [150].

Кількісно визначали варденафіл в таблетках та плазмі спектрофлуориметрично в ацетонітрильних розчинах. Вимірювання проводилося при $\lambda_{\text{зб/л\text{ем}}} = 280/275$ нм, а лінійність градуувального графіку спостерігалась в межах концентрацій варденафілу 10-250 нг/мл. Межа виявлення варденафілу становила 3 нг/мл, а межа кількісного визначення – 10 нг/мл [172].

Описані методики визначення силденафілу методом ВЕРХ. Визначення вмісту силденафілу цим методом проведено на колонці YMC- Pack ODS AQ (150 мм x 4,6 мм, ID). В якості рухомої фази використовували фосфатний буферний розчин (10 мМ, рН 3,0) та ацетонітрil. Детектування проводили УФ-спектрофотометрично (при $\lambda = 220$ нм) [92].

Для визначення силденафілу цитрату в лікарських формах та спермі розроблено умови аналізу методом ВЕРХ на обернено-фазній колонці Waters Spherisorb® C18 (5 мкм × 4,6 x 250 мм). Детектування силденафілу здійснено УФ-спектрофотометрично при $\lambda = 230$ нм. При екстракції з сперми білки осаджували ацетонітрилом. При визначенні силденафілу в лікарських

формах лінійність спостерігається в діапазоні концентрацій 0,1-10 мкг/мл, а в спермі – 0,1-2 мкг/мл [137].

1.4.3 Методи ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу в біологічних рідинах та тканинах

Огляд наведених в літературі методів ізолювання силденафілу, варденафілу та їх метаболітів з проб біологічного матеріалу систематизовано у таблиці 1.3, а умови кількісного визначення із застосуванням хроматографічних методів аналізу наведено в таблиці 1.4.

Як видно з даних, наведених в таблиці 1.3, в основному виділення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів проводили з плазми крові, і лише незначна кількість робіт описує методики їх ізолювання із сечі та з біологічних тканин.

Ідентифікацію та кількісне визначення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виділених з біологічних рідин та тканин, проводять із застосуванням методів: ВЕРХ-УФ [42, 61, 68, 70], ВЕРХ/МС [33, 61], РХ - МС [67], РХ-МС/МС [86, 89, 90, 91, 105, 151], РХ-ЕСІ-МС/МС [175], УВЕРХ-МС/МС [173], УВЕРХ-ЕСІ/МС/МС [155]. Рідше застосовують метод ГХ; в усіх описаних методиках ГХ-аналіз проводився після дериватизації силденафілу та варденафілу [39, 40, 131].

Результати кількісного визначення досліджуваних препаратів в біологічному матеріалі залежать від способу ізолювання та методу визначення і характеризуються різним діапазоном лінійності.

Межа визначення силденафілу і варденафілу в біологічних пробах хроматографічними методами залежить від природи колонки, складу рухомої фази та способу детектування.

Таблиця 1.3

Методи ізолювання силденафілу, варденафілу та їх метаболітів із об'єктів біологічного походження

Препарат, метаболіти	Досліджуваний об'єкт, маса чи об'єм проби	Спосіб виділення	Метод визначення в біологічній пробі; інтервал лінійності, нг/мл	Автор [джерело]
1	2	3	4	5
Силденафіл, N-деметил- силденафіл	Плазма, 500 мкл	РЕ етилацетатом, після додавання 1н. NaOH.	ВЕРХ-УФ ($\lambda=230$ нм); 10-1000	B. Ramírez-Mendiola зі співавторами [42]
Силденафіл	Плазма, 500 мкл	ТФЕ на картриджах Sep – Pak Vac tC18, елюент – метанол.	ВЕРХ-УФ ($\lambda=290$ нм): 20-1000; ВЕРХ/МС: 5-1500	D.V. Yaroshenko зі співавторами [61]
Силденафіл, варденафіл	Плазма, 960 мкл	Дисперсійна рідинна мікроекстракція (ДРМЕ) у дві стадії.	ВЕРХ-УФ ($\lambda=254$ нм); силденафіл: 1-500; варденафіл: 2-2000	C. Xiao зі співавторами [68]
Силденафіл	Плазма, 100 мкл	РЕ сумішшю ацетонітрилу (300 мкл) і діетилового етеру (5 мл).	ВЕРХ-УФ ($\lambda=230$ нм); 100-6000	A.S. Tripathi зі співавторами [70]
Силденафіл, N-деметил- силденафіл	Плазма, 150 мкл	РЕ ацетонітрилом.	ВЕРХ/МС 5-1010	И. Э. Кузнецов зі співавторами [33]
Силденафіл, N-деметил силденафіл	Грудне молоко, 900 мкл	ТФЕ на катриджах Restek® Drug Prep1, білки осаджували ацетонітрилом, зразок доводили до рН 6, елюент: дихлорметан – метанол–амонію гідроксид (90:10: 2).	PX/МС; 0,5-10	U. Wollein зі співавторами [67]

Продовж. табл. 1.3

1	2	3	4	5
Силденафіл, N-деметил- силденафіл	Кров, сеча, скловидне тіло, жовч, печінка, селезінка, легені, серце, нирки, мозок, скелетні м'язи; 3 г або 3 мл	РЕ ацетонітрилом після гомогенізації проб з 1,0 % NaF; випаровування проби досуха; розчинення сухого залишку в 0,1 М фосфатному буфері (pH 6,0) і ТФЕ на картриджах Bond Elute Certify®, елюент – 2 % гідроксид амонію в етилацетаті.	PX-MC/MC; 0,78-800	R. D. Johnson, R. J. Lewis [89]; R. J. Lewis зі співавторами [105]
Варденафіл	Кров, жовч, печінка, нирки, серцевий м'яз, легені, скелетні м'язи; 3г або 3 мл	РЕ ацетонітрилом після гомогенізації проб з 1,0 % NaF; випаровування проби досуха; розчинення сухого залишку в 0,1 М фосфатному буфері (pH 6,0) і ТФЕ на картриджах Bond Elute Certify®, елюент – 2 % гідроксид амонію в етилацетаті.	PX-MC/MC; 0,39-200	R.D. Johnson зі співавторами [90, 91]
Силденафіл, варденафіл, N-деметил- силденафіл, деетильований силденафіл по етоксигрупі, N-деетил- варденафіл	Сироватка крові: 200 мкл; мозок: 100 мг.	Плазму центрифугували, мозок гомогенізували ультразвуком; додавали 1 % мурашину кислоту в ацетонітрилі та видаляли білки на картриджах Hybrid SPE™PPT.	PX-ECI-MC/MC; <u>сироватка:</u> силденафіл: 2,5-500; варденафіл: 2,5-1000; <u>мозок:</u> силденафіл: 5-1000, варденафіл: 5-2000	N. Uncetaa зі співавторами [175]

Продовж. табл. 1.3

1	2	3	4	5
Силденафіл варденафіл, N-деметилсилде- нафіл, N-деетил- варденафіл	Кров, сеча, 500 мкл	Пробу розводили водою, додавали 50 мМ амонію гідроксид (до pH 9,0), ТФЕ на картриджах Oasis HLB, елюент – хлороформ.	PX-MC/MC; 1-1000	К. Hasegawa зі співавторами [151]
Силденафіл, N-деметилсилде- нафіл	Плазма, 500 мкл	РЕ діетиловим етером.	УВЕРХ-ЕСІ/MC/MC силденафіл: 10-800; N-деметилсилденафіл: 10-600	К.В. Liew зі співавторами [155]
Силденафіл, піперазин n- деметилсилдена- філ	Плазма, 300 мкл	РЕ <i>трет</i> -бутилметиловим етером.	PX-MC/MC; силденафіл: 5-1000, метаболіт :1-200	А. Haque і N. Kumar [86]
Силденафіл, варденафіл	Кров, 500 мкл	ТФЕ на картриджах Oasis HLB, після розведення проби водою (1:2), елюент – метанол.	УВЕРХ-MC/MC; 5-1000	Р. Proença зі співавторами [173]
Варденафіл	Кров, 950 мкл	Доводили зразки до pH 6,0 0,1 М фосфатним буфером (pH 6,0), центрифугували; ТФЕ на картриджах Bond Elut LRC Certify, елюент: дихлорметан- ізопропанол-амонію гідроксид (85: 15: 2).	ГХ/MC; 2-200	І. Papoutsis зі співавторами [39]

Продовж. табл. 1.3

1	2	3	4	5
Силденафіл, варденафіл, деетильований силденафіл по етоксигрупі, піперазин N-деетил-силденафіл, піразол- N-деметил-силденафіл, піперазин N-деметил-силденафіл, ОН-силденафіл, N-деетилварденафіл	Сеча, 2 мл	Зразки обробляли фосфатним буфером (рН 7,2) і β-глюкоронідазою та інкубували, після охолодження та додавання карбонатного буфера (рН 9) проводили РЕ сумішшю <i>трет</i> -бутилметиловий естер-ізопропанол (80:20).	ГХ/МС; 25-1000	S. Strano-Rossi зі співавторами [40]
Силденафіл	Кров, жовч, сеча, вміст шлунка, мозок, серце, нирки, печінка, легені, селезінка; 5 мл або 5 г	Додавали 37 % HCl, обробляли УЗ, фільтрували, доводили 2 % NaOH до рН 10 та проводили РЕ сумішшю хлороформ-діетиловий етер (80:20).	ГХ/МС; 20-10000	S. Pagani зі співавторами [131]

Таблиця 1.4

Умови хроматографічних методів для кількісного визначення силденафілу та варденафілу у біологічних рідинах та тканинах

Препарат	Метод визначення	Колонка	Рухома фаза	Автори, джерело
1	2	3	4	6
Силденафіл	ВЕРХ/УФ	μ Bondapak C18 (3,9 мм $\times$ 150 мм, 5 мкм)	30 мМ (рН 6,0) розчин калію фосфату – ацетонітрил (53:47).	В. Ramírez-Mendiola зі співавторами [42]
Силденафіл Варденафіл	ВЕРХ/УФ	Shimadzu ODS RP-C18 (25 мм $\times$ 4,6 мм, 5 мкм)	Метанол – 1 % водний розчин ацетатної кислоти (40:60).	С. Хіао зі співавторами [68]
Силденафіл	ВЕРХ/УФ; ВЕРХ/МС	Agilent Eclipse Plus C18 (100 мм $\times$ 2,1 мм, 3,5 мкм)	Ацетонітрил – 40 мМ (рН 7,0) – амонійно-ацетатний буфер (40:60); ацетонітрил – 5 мМ розчин амонію форміату (40:60).	D. V. Yaroshenko зі співавторами [61]
Силденафіл	ВЕРХ/УФ	Prontosil C18 (150 мм $\times$ 4,6 мм, 5 мкм), пре-колонка Phenomenex C18 (4 мм $\times$ 2,0 мм)	Метанол-вода (85:15).	A.S. Tripathi зі співавторами [70]
Силденафіл	ВЕРХ/МС	PerfectSil 100 ODS (3,3 мкм $\times$ 100, 4,6 мм), пре-колонка Zorbax SB-C18 (4,6 x 12,5 мм)	Ацетонітрил і 10 мМ водний розчин амонію ацетату (рН 5,45 $\pm$ 0,05) (9:10).	И. Э. Кузнецов зі співавторами [33]

Продовж. табл. 1.4

1	2	3	4	6
Силденафіл	PX/MC	Luna C18 (150×2,0 мм, 3,0 мкм), пре-колонка – Phenomenex Security Guard C18 (4×20 мм)	0,1 % розчин форміатної кислоти у воді (А) та 0,1 % розчин форміатної кислоти в ацетонітрилі (В).	U. Wollein зі співавторами [67]
Силденафіл	PX/MC/MC	Atlantis LC-18 (150 мм × 4,6 мм, 3 мкм), пре-колонка Phenomenex C- 8 (4,0 x 3,0 мм, 3 мкм).	50,0 мМ форміатна кислота з рН 5,00 – ацетонітрил (98:2).	R. D. Johnson та R .J. Lewis [89]; R. J. Lewis зі співавторами [105]
Силденафіл	PX/MC/MC	Thermo Hypersil Gold (50 мм x 2,1 мм, 5 мкм).	0,02 % форміатна кислота – ацетонітрил (30:70).	A. Haque i N. Kumar [86]
Варденафіл	PX/MC/MC	Atlantis LC-18 (150 мм × 4,6 мм, 3 мкм), пре-колонка Phenomenex C- 8 (4,0 x 3,0 мм, 3 мкм).	50,0 мМ форміатна кислота з рН 5,00 – ацетонітрил (98:2).	R.D. Johnson зі співавторами [90, 91]
Силденафіл Варденафіл	PX/MC/MC	Zorbax Extend-C18 (75 мм×4,6 мм, 3,5 мкм) та пре-колонка Zorbax Eclipse Plus-C18 4-pack (12,5 мм × 1 мм, 5 мкм).	50 мМ розчин форміату амонію (рН 7,4).	K. Hasegawa зі співавторами [151]
Силденафіл Варденафіл	PX-ECI- MC/MC	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм)	20 мМ амонію форміат (А) – ацетонітрил (В).	N. Uncetaa зі співавторами [175]

Продовж. табл. 1.4

1	2	3	4	6
Силденафіл Варденафіл	УВЕРХ/МС/МС	Acquity UPLC HSS T3 (100 мм × 2,1 мм, 1,8 мкм)	ацетонітрил (А) – 0,1 % водний розчин форміатної кислоти (В).	Р. Проença зі співавторами [173]
Силденафіл	УВЕРХ-ЕСІ-МС/МС	Thermo Scientific Accucore C 18 (100 × 2,1 мм, 2,6 мкм), пре-колонка Guard 3PK Poroshell 120 EC-C18 (5 × 2,1 мм, 2,7 мкм)	0,1 % водний розчин форміатної кислоти – метанол (20:80).	К.В. Liew зі співавторами [155]
Варденафіл	ГХ/МС	DB-1 MS (Agilent, USA) (12 м × 0,2 мм)	газ-носії – гелій.	І. Papoutsis зі співавторами [39]
Силденафіл	ГХ/МС	CP-Sil 8CB MS (30 м × 0,25 мм)	газ-носії – гелій.	S. Pagani зі співавторами [131]
Силденафіл Варденафіл	ГХ/МС	J&W 5 % феніл-метилсилікон (CPS Analitica, Італія)	газ-носії – гелій.	S. Strano-Rossi зі співавторами [40]

Висновки до розділу 1

1. Сумісне застосування інгібіторів ФДЕ-5 з препаратами органічних нітратів, блокаторами альфа-адренорецепторів та гіпотензивними засобами призводить до непередбачуваного падіння артеріального тиску, розвитку критичної неконтрольованої гіпотензії і раптової смерті, що є результатом потенціювання вазодилатуючих ефектів.

2. Як показують наведені дані, у хіміко-токсикологічному аспекті силденафіл та варденафіл вивчені недостатньо, незважаючи на велику ймовірність виникнення побічних та токсичних проявів (в тому числі летальних). У літературі практично відсутні дані про методики виділення силденафілу та варденафілу і їх метаболітів із таких біологічних об'єктів, як печінка, легені, мозок, серце, кишківник.

3. Більшість методик ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ стосується їх визначення в лікарських формах, плазмі чи сечі. Методи ідентифікації і кількісного визначення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів в біологічних органах залишаються не вирішеними.

4. Силденафіл та варденафіл мають великий об'єм розподілу, підлягають посмертному перерозподілу з крові у внутрішні органи, в зв'язку з чим розробка ефективних і надійних методик їх ізолювання із зразків біологічного матеріалу, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу при отруєннях даними препаратами, є актуальною.

Виходячи із наведеного вище, розробка методів системного хіміко-токсикологічного аналізу силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, придатних для цілей клінічної та судово-хімічної токсикології, є актуальною.

РОЗДІЛ 2

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ І ВАРДЕНАФІЛУ У РОЗЧИНАХ

У розділі 1 зазначалося, що для ідентифікації силденафілу та варденафілу в фармацевтичних препаратах, дієтичних добавках і біологічних рідинах пропонується ряд методів [71, 92, 129, 132, 134, 137, 141, 150-154, 172, 176]. Проте в літературних джерелах описана обмежена кількість методик аналізу, які можна використати в судово-хімічній практиці. Тому одним із головних завдань нашого дослідження була розробка методик, придатних для виявлення та кількісного визначення силденафілу і варденафілу у біологічних пробах з метою діагностики гострої інтоксикації чи встановлення їх наявності в біологічному матеріалі при летальних випадках отруєть.

З цією метою нами вивчено реакційну здатність досліджуваних речовин з рядом реагентів, які використовуються в судово-хімічній практиці для експрес-виявлення ксенобіотиків, опрацьовано склад індивідуальних систем розчинників для їх виявлення методом ТШХ, розроблено умови виявлення та кількісного визначення в розчинах методами УФ- та флуоресцентної спектроскопії, ГХ/МС, ВЕРХ із використанням різних способів детекції.

2.1 Ідентифікація силденафілу та варденафілу з використанням хромогенних реактивів

В токсикологічних відділеннях бюро судово-медичних експертиз наявність ксенобіотику в досліджуваній пробі встановлюють за результатами попередніх випробовувань, до яких відносять хромогенні реакції та хроматографію в тонкому шарі сорбенту (ТШХ). Оскільки в літературних джерелах відсутні відомості про реакції, якими можна підтвердити наявність силденафілу та варденафілу, були використані реактиви, які рекомендовані

Clarke та іншими авторами [11, 109] для виявлення речовин кислотного та основного характеру. Склад реактивів та методики їх виготовлення описані в літературі [11, 13].

За результатами експериментальних досліджень були відібрані реакції з межею виявлення 1-8 мкг силденафілу чи варденафілу в пробі. При цьому забарвлені продукти отримуються при окисненні силденафілу та варденафілу калію дихроматом в присутності концентрованої сульфатної кислоти, хромотроповою кислотою, реактивом Фореста, а найчутливішими серед реакцій осадження є реакції з реактивами Бушарда, Вагнера, Драгендорфа, Зонненшейна та сіллю Рейнеке.

Для проведення реакцій використовували метанольні розчини силденафілу чи варденафілу з концентрацією кожного препарату 500 мкг/мл. Реакції проводили на фаянсових пластинках, в заглиблення яких вносили по 50 мкл метанольних розчинів кожного із препаратів. Розчинник випаровували, після чого в лунки вносили по 0,05 мл відповідних реактивів. Проби перемішували скляним капіляром і спостерігали за результатом реакції. Паралельно проводили контрольний дослід. Результати проведеного дослідження наведено в таблиці 2.1.

Також нами встановлено, що силденафіл та варденафіл флуоресціюють у водних та спиртових розчинах при $\lambda = 254$ нм. Силденафіл у розчинах флуоресціює фіолетово-голубим кольором, а варденафіл – голубим. Межа виявлення силденафілу та варденафілу за природною флуоресценцією у водних розчинах відповідно становить 10,0 мкг/мл та 5,0 мкг/мл; а у етанольних розчинах – 1,5 мкг/мл та 1,0 мкг/мл.

Таблиця 2.1

Результати реакцій виявлення силденафілу та варденафілу

Реактив	Силденафіл		Варденафіл	
	Аналітичний ефект реакції	Межа виявлення, мкг	Аналітичний ефект реакції	Межа виявлення, мкг
Реакції окиснення				
Калію дихромат і сульфатна кислота концентрована	Оливково-зелене забарвлення	1	Оливково-зелене забарвлення	1
Фореста (при нагріванні)	Голубувато-зелене забарвлення	5	Голубувато-зелене забарвлення	6
Хромотропова кислота в конц. сульфатній кислоті	Темно-фіолетове забарвлення	5	Темно-фіолетове забарвлення	6
Реакції осадження				
Бушарда	Коричневий осад	6	Червоно-коричневий осад	7
Вагнера	Коричневий осад	6	Червоно-коричневий осад	7
Драгендорфа	Оранжевий осад	3	Оранжевий осад	3
Зонненшейна	Жовто-зелений осад	8	Жовто-зелений осад	8
Сіль Рейнеке (мікрористалоскопічна реакція)	Осад у вигляді грон	3	Осад у вигляді грон	3

Виходячи з отриманих результатів, можна зробити висновок, що осадові і кольорові реакції, а також здатність аналізованих сполук до природної флуоресценції можливо використовувати лише для попереднього скринінгу наявності силденафілу та варденафілу в пробах біологічного матеріалу.

2.2 Ідентифікація силденафілу та варденафілу методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту

Скринінг лікарських сполук методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) в судово-хімічному аналізі проводиться в стандартизованих системах розчинників. Даний метод аналізу, у порівнянні з іншими фізико-хімічними методами, характеризується експресністю, доступністю та простотою виконання, а отриманий позитивний результат свідчить про необхідність проведення подальших досліджень [181].

В опрацьованих літературних джерелах методики виявлення силденафілу та варденафілу у суміші з метаболітами методом ТШХ висвітлені недостатньо [141]. Тому на першому етапі експериментальних досліджень нами вивчено залежність значень R_f силденафілу та варденафілу у системах розчинників, які використовуються у токсикологічних відділеннях вітчизняних бюро судово-медичних експертиз та системах розчинників, що рекомендуються Міжнародною асоціацією судових токсикологів (TIAFT) для виявлення лікарських речовин основного та кислотного характеру [109]. При виборі хроматографічних систем враховували фізико-хімічні властивості препаратів та полярність розчинників.

ТШХ-скринінг проводили на хроматографічних пластинках «Sorbfil» (силікагель ПТСХ-АФ-А-УФ, фракція 5-17 мкм, товщина шару 110 мкм, тип основи – алюміній, розмір пластинки 10×10 см). Шар сорбенту на пластинках очищали шляхом хроматографування в метанолі. Висушені пластинки зберігали в ексікаторі над шаром прожареного кальцію хлориду.

Хроматографування проводили в камерах об'ємом 1000 см³, а об'єм кожної із систем розчинників становив 50 мл. Насичення камери тривало 60 хв при кімнатній температурі.

На лінію старту (1 см від нижнього краю хроматографічної пластинки) за допомогою мікрошприца наносили у вигляді плям метанольні розчини силденафілу та варденафілу (концентрація кожного із препаратів у розчині

становила 500 мкг/мл). Фронт системи розчинників становив 8 см. Після хроматографування пластинки висушували при кімнатній температурі.

Для детектування зон силденафілу та варденафілу на пластинках їх опромінювали УФ-світлом ($\lambda = 254$ нм) та обробляли реактивом Драгендорфа.

Залежність значень R_f силденафілу та варденафілу від складу системи розчинників, рекомендованих ТІАФТ, наведено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Значення R_f силденафілу та варденафілу в системах розчинників для ТІХ, рекомендованих ТІАФТ (n=5)

№ системи	Склад системи розчинників	Значення R_f	
		силденафілу	варденафілу
1.	Метанол-25 % розчин аміаку (24,4:0,6)	0,71±0,01	0,75±0,01
2.	Ацетон-метанол (20:20)	0,71±0,02	0,76±0,01
3.	Етилацетат-ацетон-25 % розчин аміаку (30:17,5:2,5)	0,76±0,01	0,72±0,02
4.	Етилацетат-96 % етанол (1:1)	0,35±0,03	0,63±0,02
5.	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,06±0,02	0,09±0,02
6.	Хлороформ-метанол (90:10)	0,89±0,01	0,90±0,01
7.	Етилацетат-метанол-25 % розчин аміаку (85:10:5)	0,78±0,03	0,83±0,02
8.	Етилацетат-хлороформ-25 % розчин аміаку (10:14:1)	0,28±0,02	0,30±0,01
9.	Ацетон-метанол-діетиламін (39:10:1)	0,80±0,02	0,82±0,01
10.	Ізопропанол-хлороформ-діетиламін (15:15:2)	0,71±0,03	0,70±0,02
11.	Хлороформ-циклогексан-льодяна ацетатна кислота (40:40:20)	0	0
12.	Циклогексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0	0

Із результатів досліджень, наведених в таблиці 2.2, можна зробити висновок, що для виявлення силденафілу та варденафілу доцільно застосовувати системи до складу яких входять високополярні розчинники.

У системах розчинників, в яких виявляються сполуки з кислотними властивостями (системи № 5 і № 11), а також, до складу яких введено малополярні розчинники (система № 12), силденафіл та варденафіл залишаються на лінії старту або характеризуються малою рухливістю.

Значення R_f силденафілу та варденафілу у системах № 1, № 2, № 3, № 6, № 9 та № 10 практично однакові (відмінність у значеннях R_f 0,01-0,04), що не дозволяє однозначно ідентифікувати їх в суміші. У системі № 7 ступінь розділення двох препаратів 1,06 (R_f відрізняється на 0,05 одиниць). Найкраще розділення двох сполук спостерігається у системі етилацетат-96 % етанол (1:1), в якій ступінь розділення двох препаратів становить 1,8.

При опроміненні пластинок УФ-світлом зони, що відповідали силденафілу, флуоресціювали фіолетово-голубим кольором, а варденафілу – голубим кольором. При обробці реактивом Драгендорфа плями обох сполук забарвлюються в оранжевий колір.

Межа виявлення силденафілу за флуоресценцією плям на хроматографічних пластинках становить 15 мкг, а варденафілу – 10 мкг в пробі. Межа виявлення обох препаратів реактивом Драгендорфа становить 1 мкг в пробі.

У системах розчинників, рекомендованих для ТШХ, були проаналізовані також проби із біологічних рідин та органів щурів, які отримували силденафіл та варденафіл. При цьому у системах розчинників № 6, № 8, № 9 та № 10 досліджувані препарати практично не розділялись із метаболітами, на пластинках спостерігалася розмита зона. Тому для покращення розділення нами опрацьовано склад ще 4-х підтверджуючих систем розчинників, в яких спостерігалось значно краще розділення двох препаратів з їх структурними метаболітами.

Для цих досліджень використали пластинки «Sorbfil» (10×10 см, силікагель ПТСХ-АФ-А-УФ, на алюмінієвій основі), «Merck» (10×20 см, силікагель 60, UV 254, алюмінієва основа) та «Silufol» (15×15 см, сорбент Silpearl, UV 254, на алюмінієвій основі). Лінія старту на кожній пластинці

знаходилась на 1 см вище від нижнього краю. Лінія фронту системи розчинників знаходилася на 8 см вище лінії старту на пластинках «Sorbfil», а на пластинках «Merck» і «Silufol» – 10 см. На лінії старту наносили досліджувані препарати у вигляді плям (по 30 мкл метанольних розчинів з концентрацією 500 мкг/мл) та хроматографували у системах розчинників, склад яких наведено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Значення R_f силденафілу та варденафілу в підтверджуючих системах розчинників

№ п/п	Склад системи розчинників	Величина R_f на пластинках					
		«Silufol»		«Sorbfil»		«Merck»	
		Силденафіл	Варденафіл	Силденафіл	Варденафіл	Силденафіл	Варденафіл
1.	Ацетон-хлороформ-діетиламін (5:6:1) (система № 1)	0,40	0,33	0,60	0,56	0,65	0,59
2.	Етилацетат-ацетон-діетиламін (15:10:1) (система № 2)	0,47	0,40	0,47	0,43	0,44	0,39
3.	Ацетон-гексан-діетиламін (30:19:1) (система № 3)	0,40	0,46	0,53	0,56	0,51	0,57
4.	Толуен-діоксан-диметилформамід (10:38:2) (система № 4)	0,42	0,49	0,60	0,64	0,62	0,66

Як видно із даних досліджень, представлених в таблиці 2.3, в усіх запропонованих системах різниця у значеннях R_f між силденафілом та варденафілом становить 0,04–0,07. Проте у підтверджуючих системах розчинників спостерігається задовільне розділення досліджуваних препаратів із метаболітами (див. розділ 6.2). Підтверджуючі системи можна рекомендувати для ТШХ скринінгу силденафілу та варденафілу при дослідженні зразків біологічного матеріалу та внесення цих даних у загальну базу даних систем скринінгу на наявність силденафілу та варденафілу.

2.3 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу у розчинах методом УФ-спектрофотометрії

В хіміко-токсикологічних дослідженнях метод УФ-спектрофотометричного аналізу використовують з метою ідентифікації та кількісного визначення активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ) в таблетованих лікарських формах, порошках та розчинах. В ряді випадків цим методом визначають ксенобіотики у вмісті шлунку чи у пробах, які отримали при ізолюванні з біологічного матеріалу. При цьому проводять очистку аналізованих сполук від домішок біологічної природи, застосовуючи екстракційні методи або шляхом розділення компонентів проби з використанням хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

В літературних джерелах (розділ 1) описані дослідження, присвячені УФ-спектрофотометричному визначенню силденафілу та варденафілу в фармацевтичних препаратах [176]. Для визначення досліджуваних сполук у витяжках із біоматеріалу цей метод не застосовувався.

2.3.1 Розробка умов ідентифікації силденафілу та варденафілу методом УФ-спектрофотометрії

З метою ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом спектрофотометрії вивчено характер УФ-спектрів поглинання цих сполук в метанолі та 96 % етанолі. Для зняття УФ-спектрів поглинання використовували розчини силденафілу та варденафілу із концентрацією 10 мкг/мл кожного із препаратів у відповідному розчиннику.

УФ-спектри знімали за допомогою спектрофотометра СФ-56, у діапазоні довжин хвиль 200 – 350 нм, товщина поглинаючого шару 1 см. У якості розчинів порівняння використовували метанол або 96 % етанол.

Характер УФ-спектрів силденафілу та варденафілу в метанолі та 96 % етанолі представлено на рисунках 2.1 та 2.2.

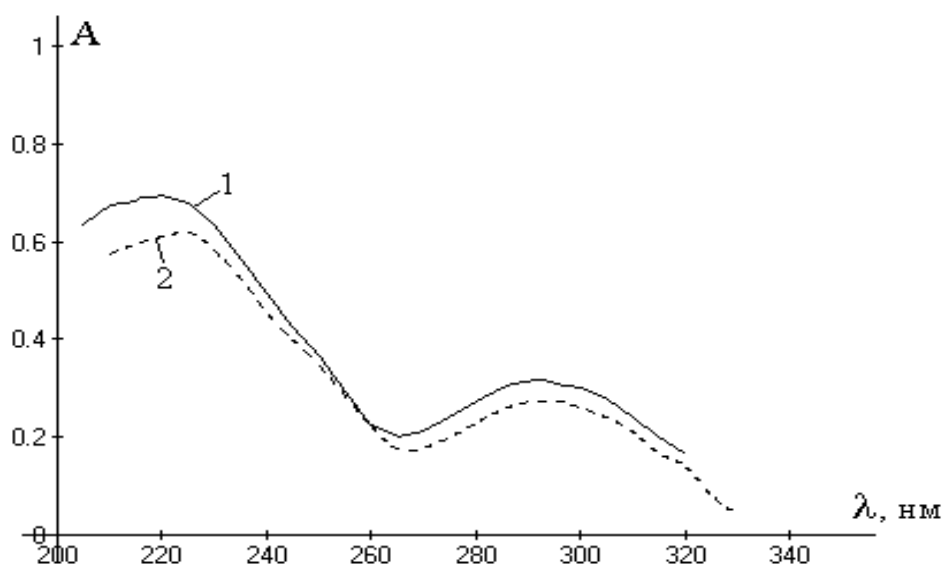


Рис. 2.1 УФ-спектри поглинання силденафілу в: 1 – 96 % етанолі, 2 – метанолі

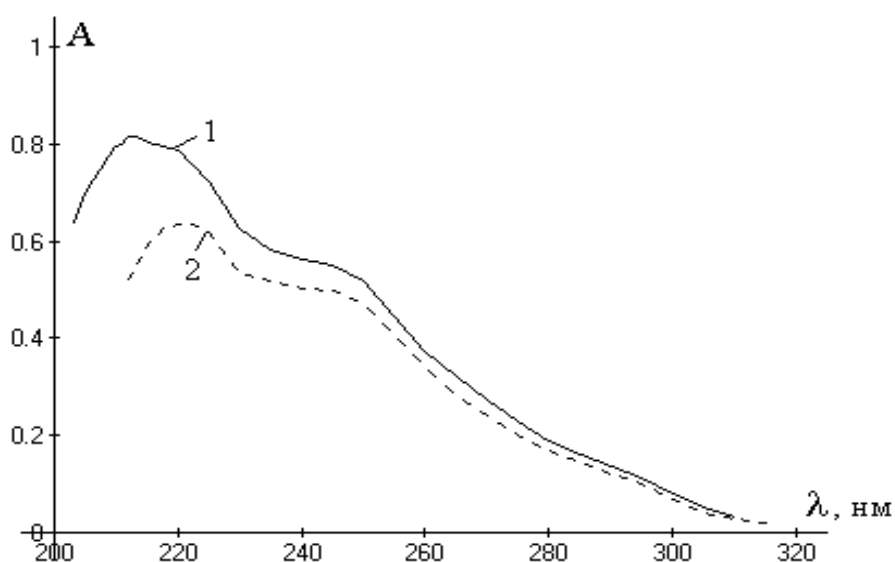


Рис. 2.2 УФ – спектри поглинання варденафілу в: 1 – 96 % етанолі, 2 – метанолі

Встановлено, що УФ-спектри силденафілу характеризуються двома смугами поглинання: в метанольному розчині максимумами поглинання спостерігаються при 222-224 нм та 291-293 нм. В етанольному розчині спостерігається незначне гіпсохромне зміщення на 2 нм першої смуги вбирання ($\lambda_{\max 1} = 219-221$ нм), а максимум поглинання другої смуги знаходиться при 291-293 нм (як і в метанольному розчині).

УФ-спектри варденафілу, на відміну від силденафілу, характеризуються лише однією інтенсивною смугою поглинання та плечем у обох розчинниках. У етанольних розчинах максимум смуги поглинання варденафілу знаходиться при довжинах хвиль 212-214 нм, а плече при 240-255 нм, в метанольних – максимум смуги поглинання спостерігається при 220-222 нм, а плече при – 245-250 нм. Інтенсивність поглинання варденафілу є вищою в етанольних розчинах.

Характеристику УФ-спектрів поглинання силденафілу та варденафілу в метанолі та 96 % етанолі наведено в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4

Характеристика УФ-спектрів поглинання силденафілу та варденафілу

Аналіт	Розчинник	$\lambda_{\max}$, нм	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	ϵ	Межа виявлення, мкг/мл
Силденафіл	Метанол	223	615,6±4,8	29217,2±225,9	1
		292	271,7±3,9	12894,1±186,0	1
	96 % етанол	220	696,4±3,9	33049,5±185,6	1
		292	316,4±1,6	15017,5±76,4	1
Варденафіл	Метанол	221	640,6±5,2	31301,9±251,6	1
	96 % етанол	213	814,2±3,7	39781,1±182,7	1

2.3.2 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом

УФ-спектрофотометрії

Для кількісного визначення силденафілу та варденафілу розраховані питомі ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) та молярні (ϵ) показники їх поглинання в метанольних та етанольних розчинах, а також встановлені межі концентрацій, у яких світлопоглинання підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера.

Показники поглинання силденафілу в метанольних та етанольних розчинах визначали при 292 нм, а варденафілу при 221 нм (для метанольних розчинів) і 213 нм (для етанольних розчинів).

Для розрахунку питомих та молярних показників поглинання готували по 5 паралельних серій розчинів силденафілу чи варденафілу у відповідному розчиннику.

Виготовлення стандартних розчинів силденафілу та варденафілу.

Для виготовлення стандартних розчинів досліджуваних препаратів на аналітичних вагах моделі Radwag AS 220/C зважували по 5,0 мг силденафілу цитрату (з вмістом діючої речовини $\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA, серія № PZ0003) або варденафілу гідрохлориду тригідрату (з вмістом діючої речовини $\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA, серія № SML2103). Наважки кількісно переносили у мірні колби об'ємом 10.0 мл та доводили метанолом або 96 % етанолом до позначки. Концентрація силденафілу чи варденафілу в отриманих розчинах становила 500 мкг/мл (**розчини А**). Вихідні стандартні розчини можна використовувати протягом 3-х місяців, зберігаючи при 4 °С в обгортці із чорного пергаментного паперу.

Виготовлення робочих розчинів силденафілу.

Готували робочі розчини силденафілу із концентраціями 1,0; 2,5; 4,0; 5,0; 7,5; 10; 15 та 20 мкг/мл у метанолі чи 96 % етанолі. Для цього в мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 20; 50; 80; 100; 150; 200; 300 та 400 мкл стандартного розчину силденафілу в метанолі чи 96 % етанолі (**розчин А**) та доводили відповідним розчинником до позначки.

Виготовлення робочих розчинів варденафілу.

Для виготовлення робочих розчинів варденафілу у мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 20; 40; 100; 160; 200; 300 та 400 мкл стандартних розчинів варденафілу у метанолі чи 96 % етанолі (**розчин А**). Об'єм розчинів в колбах доводили відповідним розчинником до позначки. Отримували серії робочих розчинів із концентраціями варденафілу 1,0; 2,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0 та 20,0 мкг/мл.

Вимірювали оптичну густину (А) кожного із розчинів при вибраних довжинах хвиль у кожному із розчинників, за отриманими даними розраховували питомий та молярний показники поглинання силденафілу та

варденафілу.

Для розрахунку питомого ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) і молярного (ε) показників поглинання користувались формулами [6]:

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{A}{l \cdot C} \quad (2.1);$$

$$\varepsilon = A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot \frac{M}{10} \quad (2.2),$$

де: A – оптична густина досліджуваного розчину;

C – концентрація варденафілу чи силденафілу у розчині, %;

l – товщина шару рідини в кюветі (1 см)

M – молярна маса силденафілу чи варденафілу (г/моль).

Отримані результати та їх статистичну обробку представлено в таблицях 2.5 та 2.6.

Таблиця 2.5

Результати визначення питомого та молярного показників поглинання силденафілу в метанолі та 96 % етанолі (n = 5, P = 95%)

Концентрація силденафілу, мкг/мл	Оптична густина, А	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Метрологічні характеристики для $A_{1\text{см}}^{1\%}$	ε	Метрологічні характеристики для ε
1	2	3	4	5	6
Метанол, $\lambda_{\text{max}} = 292$ нм					
1,0	0,026	262,50	$\bar{X} = 271,69$	12457,99	$\bar{X} = 12894,02$
2,5	0,069	276,00	$S = 4,7$	13098,68	$S = 222,94$
4,0	0,108	270,00	$S \bar{x} = 1,66$	12813,93	$S \bar{x} = 78,82$
5,0	0,137	274,00	$RSD_x = 1,73$	13003,77	$RSD_x = 1,73$
7,5	0,201	268,00	$\Delta X = \pm 3,92$	12719,01	$\Delta X = \pm 186,02$
10,0	0,272	272,00	$\varepsilon = 1,44 \%$	12908,85	$\varepsilon = 1,44 \%$
15,0	0,413	275,00		13051,23	
20,0	0,552	276,00		13098,68	

Продовж. табл. 2.5

1	2	3	4	5	6
96 % етанол, $\lambda_{\max} = 292$ нм					
1,0	0,032	320,00	$\bar{X} = 316,43$ $S = 1,53$ $S \bar{x} = 0,54$ $RSD_x = 0,48$ $\Delta X = \pm 1,27$ $\varepsilon = 0,40 \%$	15186,88	$\bar{X} = 15017,21$ $S = 72,41$ $S \bar{x} = 25,60$ $RSD_x = 0,48$ $\Delta X = \pm 60,42$ $\varepsilon = 0,40 \%$
2,5	0,079	316,00		14997,04	
4,0	0,126	315,00		14949,59	
5,0	0,158	316,20		15006,54	
7,5	0,236	316,00		14997,04	
10,0	0,316	316,30		15011,28	
15,0	0,473	315,40		14968,57	
20,0	0,633	316,50		15020,77	

Таблиця 2.6

Результати визначення питомого та молярного показників поглинання варденафілу в метанолі та 96 % етанолі (n = 5, P = 95%)

Концентрація варденафілу, мкг/мл	Оптична густина, А	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	Метрологічні характеристики для $A_{1\text{cm}}^{1\%}$	ε	Метрологічні характеристики для ε
Метанол, $\lambda_{\text{max}} = 221 \text{ нм}$					
1,0	0,065	650,00	$\bar{X} = 640,64$ $S = 4,70$ $S \bar{x} = 1,78$ $RSD_x = 0,73$ $\Delta X = \pm 5,15$ $\varepsilon = 0,68 \%$	31759,26	$\bar{X} = 31302,07$ $S = 229,49$ $S \bar{x} = 86,74$ $RSD_x = 0,73$ $\Delta X = \pm 212,51$ $\varepsilon = 0,68 \%$
2,0	0,128	640,00		31270,66	
5,0	0,320	640,00		31270,66	
8,0	0,510	637,500		31148,51	
10,0	0,640	640,00		31270,66	
15,0	0,963	642,00		31368,38	
20,0	1,270	635,00		31026,35	
96 % етанол, $\lambda_{\text{max}} = 213 \text{ нм}$					
1,0	0,080	800,00	$\bar{X} = 813,15$ $S = 5,97$ $S \bar{x} = 2,26$ $RSD_x = 0,73$ $\Delta X = \pm 5,53$ $\varepsilon = 0,68 \%$	39088,32	$\bar{X} = 39731,05$ $S = 291,68$ $S \bar{x} = 110,25$ $RSD_x = 0,73$ $\Delta X = \pm 270,103$ $\varepsilon = 0,68 \%$
2,0	0,163	815,00		39821,23	
5,0	0,408	816,00		39870,09	
8,0	0,651	813,75		39760,15	
10,0	0,814	814,00		39772,37	
15,0	1,225	815,33		39837,35	
20,0	1,636	818,00		39967,81	

Як видно з даних, наведених в таблицях 2.5 та 2.6, світлопоглинання силденафілу в метанольних та етанольних розчинах підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 2,5 мкг/мл до 20 мкг/мл, а варденафілу – в межах концентрацій від 2,0 мкг/мл до 20 мкг/мл. Межа виявлення досліджуваних препаратів у вказаних розчинниках становить 1 мкг/мл.

Даним методом визначали кількісний вміст силденафілу та варденафілу в модельних розчинах різних концентрацій.

Для кількісного визначення силденафілу готували модельні розчини препарату в метанолі та 96 % етанолі з концентраціями 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 та 20 мкг/мл.

Для кількісного визначення варденафілу готували модельні розчини препарату в метанолі та 96 % етанолі з концентраціями 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 та 20 мкг/мл. Методика приготування модельних розчинів така ж, як при виготовленні робочих розчинів кожного препарату.

Оптичну густину серії метанольних та етанольних розчинів силденафілу вимірювали при 292 нм, а варденафілу – при 221 нм (для метанольних розчинів) і при 213 нм (для етанольних розчинів).

Розрахунок концентрації силденафілу та варденафілу в модельних розчинах проводили за формулою 2.3 [6]:

$$C = \frac{A}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot l} \quad (2.3),$$

де: A – значення оптичної густини,

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання,

l – товщина поглинаючого шару, см,

C – концентрація речовини (%).

Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом УФ-спектрофотометрії в модельних розчинах та їх метрологічні характеристики наведено в таблицях 2.7 та 2.8.

Таблиця 2.7

**Результати кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах
методом УФ-спектрофотометрії (n = 5, P = 95%)**

Розчинник	Концентрація взятого препарату, мкг/мл	Концентрація знайденого препарату		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
Метанол	2,5	2,44	97,60	$\bar{X} = 98,91$ $S = 1,21$ $S_{\bar{x}} = 0,54$ $RSD_x = 1,22$ $\Delta X = \pm 1,5$ $\varepsilon = 1,52 \%$
	5,0	4,88	97,60	
	10,0	9,95	99,50	
	15,0	15,00	100,00	
	20,0	19,97	99,85	
96 % етанол	2,5	2,47	98,80	$\bar{X} = 99,42$ $S = 0,55$ $S_{\bar{x}} = 0,27$ $RSD_x = 0,56$ $\Delta X = \pm 0,69$ $\varepsilon = 0,69\%$
	5,0	4,94	98,90	
	10,0	9,95	99,50	
	15,0	15,00	100,00	
	20,0	19,98	99,90	

Таблиця 2.8

**Результати кількісного визначення варденафілу в модельних розчинах
методом УФ-спектрофотометрії (n = 5, P = 95%)**

Розчинник	Концентрація взятого препарату, мкг/мл	Концентрація знайденого препарату		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
Метанол	2,0	1,97	98,50	$\bar{X} = 99,22$ $S = 0,57$ $S_{\bar{x}} = 0,26$ $RSD_x = 0,58$ $\Delta X = \pm 0,71$ $\varepsilon = 0,72 \%$
	5,0	4,94	98,90	
	10,0	9,95	99,50	
	15,0	14,99	100,00	
	20,0	19,84	99,20	
96 % етанол	2,0	1,98	99,00	$\bar{X} = 99,58$ $S = 0,34$ $S_{\bar{x}} = 0,15$ $RSD_x = 0,34$ $\Delta X = \pm 0,42$ $\varepsilon = 0,43 \%$
	5,0	4,98	99,60	
	10,0	9,97	99,70	
	15,0	14,98	99,87	
	20,0	19,95	99,75	

Отримані результати свідчать, що відносна похибка кількісного визначення силденафілу методом УФ-спектрофотометрії в метанольному розчині становить 1,52 %, в етанольному – 0,69 %. Відносна похибка кількісного визначення варденафілу цим методом в метанольних розчинах становить 0,72 %, а в етанольних – 0,43 %. Результати кількісного визначення досліджуваних препаратів в обидвох розчинниках є достовірними, оскільки вони вкладаються в межі довірчих інтервалів.

Метод УФ-спектрофотометрії використовували для кількісного визначення силденафілу та варденафілу при вивченні умов їх концентрування із водних розчинів і при визначенні у витягах із модельних зразків біологічного матеріалу.

2.3.3 Валідація методики УФ-спектрофотометричного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах

Валідацію УФ-спектрофотометричного методу визначення силденафілу та варденафілу у метанольних та етанольних розчинах проводили за наступними параметрами: лінійність, прецизійність, правильність та відтворюваність [5, 6].

Залежність оптичної густини від концентрації силденафілу в метанольних та етанольних розчинах підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 2,5 мкг/мл до 20 мкг/мл, а варденафілу – в межах концентрацій від 2,0 мкг/мл до 20 мкг/мл. Відтворюваність запропонованого методу визначали розраховуючи збіжність та внутрішньолабораторну точність. Для перевірки збіжності послідовно вимірювали світлопоглинання шести стандартних розчинів силденафілу чи варденафілу із концентрацією 10 мкг/мл при вибраних довжинах хвиль, розраховували стандартне відхилення та відносне стандартне відхилення (RSD, %) оптичної густини досліджуваних розчинів у кожному із розчинників.

Для визначення внутрішньолaborаторної точності проводили триразове вимірювання оптичної густини шести розчинів силденафілу та варденафілу із концентрацією 10 мкг/мл в метанолі чи 96 % етанолі протягом одного дня, розраховували стандартне відхилення та відносне стандартне відхилення (RSD, %) оптичної густини досліджуваних розчинів.

Результати визначення збіжності та прецизійності представлено в таблиці 2.9.

Таблиця 2.9

**Збіжність та внутрішньолaborаторна прецизійність визначення
силденафілу та варденафілу методом УФ-спектрофотометрії
(n = 6, P = 95 %)**

Розчинник, довжина хвилі	Валідаційна характеристика	Вміст речовини, мкг/мл	Значення оптичної густини	± SD	RSD, %
Силденафіл					
Метанол, λ _{max} = 292 нм	Збіжність	10	0,272	0,0020	0,83
	Внутр.лаб. точність	10	0,272	0,0020	0,83
			0,272	0,0025	0,93
			0,273	0,0029	1,05
96 % етанол, λ _{max} = 292 нм	Збіжність	10	0,316	0,0022	0,71
	Внутр.лаб. точність	10	0,316	0,0022	0,71
			0,316	0,0025	0,79
			0,317	0,0030	0,86
Варденафіл					
Метанол, λ _{max} = 221 нм	Збіжність	10	0,640	0,0046	0,73
	Внутр.лаб. точність	10	0,640	0,0046	0,73
			0,641	0,0021	0,80
			0,643	0,0024	0,92
96 % етанол, λ _{max} = 213 нм	Збіжність	10	0,814	0,0041	0,51
	Внутр.лаб. точність	10	0,814	0,0041	0,51
			0,815	0,0044	0,53
			0,818	0,0046	0,57

Правильність методу визначали вимірюючи оптичну густину розчинів силденафілу та варденафілу в метанолі та 96 % етанолі на рівні 80 %, 100 %, 120 % від середньої концентрації з діапазону, що підлягає закону Бугера-Ламберта-Бера. Результати вимірювань представлено в таблиці 2.10.

Таблиця 2.10

**Правильність методики визначення силденафілу та варденафілу
методом УФ- спектрофотометрії (n = 3, P = 95 %)**

Розчинник, довжина хвилі	Концентра- ційний рівень	Додано препарату (мкг/мл)	Знайдено препарату (%)	± SD	CV, %	RSD %
Силденафіл						
Метанол, $\lambda_{\max} = 292$ нм	80 %	8	99,84	0,003	0,038	0,003
	100 %	10	99,91	0,002	0,020	0,002
	120 %	12	99,77	0,002	0,017	0,002
96 % етанол, $\lambda_{\max} = 292$ нм	80 %	8	99,86	0,003	0,038	0,003
	100 %	10	99,91	0,002	0,020	0,002
	120 %	12	99,83	0,003	0,025	0,003
Варденафіл						
Метанол, $\lambda_{\max} = 221$ нм	80 %	8	99,66	0,004	0,050	0,004
	100 %	10	99,91	0,003	0,030	0,003
	120 %	12	99,80	0,003	0,025	0,003
96 % етанол, $\lambda_{\max} = 213$ нм	80 %	8	99,78	0,003	0,038	0,003
	100 %	10	99,92	0,002	0,020	0,002
	120 %	12	99,81	0,002	0,017	0,002

Дані досліджень, наведені у таблицях 2.9 та 2.10 свідчать, що методика УФ-спектрофотометричного визначення силденафілу та варденафілу у метанольних та етанольних розчинах є прецизійною та правильною, оскільки відтворюваність та коефіцієнт варіації на кожному рівні концентрацій відповідають встановленим критеріям прийнятності.

2.4 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії

Метод флуоресцентної спектрометрії характеризується високою чутливістю та специфічністю і його широко використовують в практиці судово-хімічних досліджень [1, 34, 100].

Згідно літературних даних, силденафіл та варденафіл – це сполуки, які здатні до природньої флуоресценції, що було покладено в основу розробки методик їх кількісного визначення в лікарських формах [156, 172, 182]. Для підсилення інтенсивності флуоресценції кількісне визначення варденафілу проводили в присутності додецилсульфату натрію [156], а силденафілу – в присутності гексадецилтриметиламонію броміду та додецилсульфату натрію [182].

У зазначених роботах описано умови флуориметричного визначення силденафілу та варденафілу в лікарських формах, проте не наводяться дані стосовно можливості використання цього методу в практиці судово-хімічного аналізу.

2.4.1 Розробка умов ідентифікації силденафілу та варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії

З метою встановлення оптимальних умов виявлення силденафілу і варденафілу та подальшого їх кількісного визначення флуориметричним методом вивчено залежність інтенсивності їх флуоресценції від природи розчинника. В якості розчинників використано бідистильовану воду, 96 % етанол, ізопропанол та ацетонітрил (96 % етанол, ізопропанол та ацетонітрил відповідали кваліфікації «х.ч.»). Для зняття спектрів флуоресценції використовували розчини силденафілу чи варденафілу у відповідному розчиннику із концентрацією 10 мкг/мл.

Умови флуоресцентного аналізу.

Спектри флуоресценції досліджуваних сполук знімали з допомогою флуоресцентного спектрофотометра Hitachi MPF-4 (Японія), джерело випромінювання – ксенонова лампа; кювети – стандартні, розміром 10×10 мм. Ширина щілини монохроматора при знятті спектрів флуоресценції становила 10 нм, а емісії – 5 нм. Спектри флуоресценції силденафілу в кожному із розчинників знято при чутливості 10 ($\text{Ч} = 10$), а варденафілу при $\text{Ч} = 1$.

За отриманими спектрами встановлювали довжини хвиль при яких спостерігається збудження (λ_{ex}) та випромінювання (λ_{em}) силденафілу та варденафілу. Залежність інтенсивності флуоресценції силденафілу та варденафілу від природи розчинника наведено на рисунках 2.3 та 2.4.

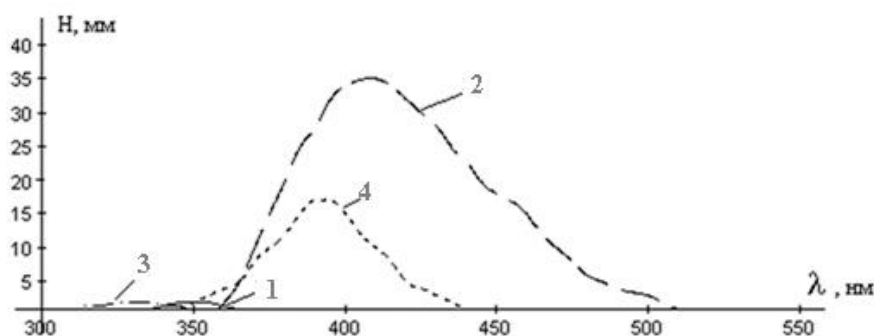


Рис. 2.3 Спектри флуоресценції силденафілу (10 мкг/мл) у: 1 – ацетонітрилі; 2 – ізопропанолі; 3 – 96 % етанолі; 4 – воді бідистильованій ($\text{Ч} = 10$)

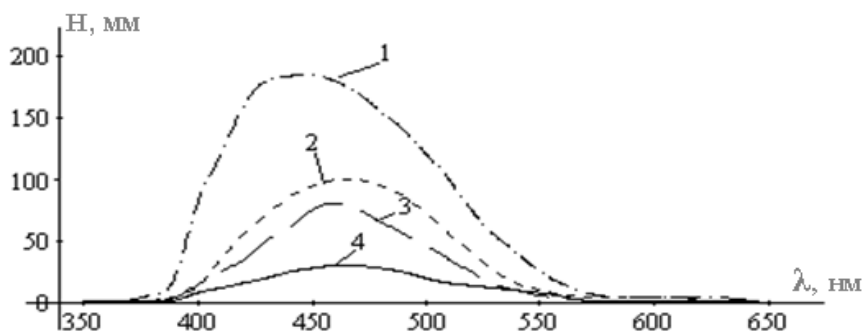


Рис. 2.4 Спектри флуоресценції варденафілу (10 мкг/мл) у: 1 – ацетонітрилі; 2 – ізопропанолі; 3 – 96 % етанолі; 4 – воді бідистильованій ($\text{Ч} = 1$)

Встановлено, що для ацетонітрильних та етанольних розчинів силденафілу спостерігається накладання спектрів розчинника із спектрами досліджуваних речовин при довжинах хвиль, які відповідають збудженню (λ_{ex}) та випроміненню (λ_{em}). В ацетонітрильних розчинах λ_{ex} силденафілу спостерігається при 295 нм, а λ_{em} при 350 нм; в етанольних розчинах $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ силденафілу відповідно становлять 295 нм / 330 нм. У водних розчинах для силденафілу $\lambda_{ex} = 342$ нм, а максимум флуоресценції спостерігається при довжинах хвиль 390-392 нм. В ізопропанольних розчинах силденафілу $\lambda_{ex} = 360$ нм, а $\lambda_{em} = 410$ нм.

Варденафіл, хоч і є структурним аналогом силденафілу, інтенсивно флуоресціює в усіх вибраних розчинниках. Найвища інтенсивність флуоресценції спостерігається у ацетонітрильному розчині. Встановлено, що у водних та етанольних розчинах варденафілу $\lambda_{ex} = 270$ нм, а λ_{em} має місце в діапазоні довжин хвиль 460-470 нм. В ацетонітрильних розчинах варденафілу $\lambda_{ex} = 285$ нм, а λ_{em} – при 448-452 нм, в ізопропанольних розчинах – $\lambda_{ex} = 280$ нм, а $\lambda_{em} = 460$ нм. Інтенсивність флуоресценції варденафілу залежить від природи розчинника. В ацетонітрильних розчинах вона у 2 рази вища, ніж в етанольному та ізопропанольному розчинах та у 6 разів вища інтенсивності у водних розчинах.

Спектри збудження та випромінювання силденафілу в ізопропанолі та варденафілу в ацетонітрилі представлено на рисунках 2.5 та 2.6.

Межа виявлення силденафілу за спектром флуоресценції в ізопропанольному розчині становить 1 мкг/мл ($Ч = 10$), а варденафілу в ацетонітрильному розчині – 4 нг/мл ($Ч = 10$).

Отримані результати використані нами для розробки умов кількісного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах та для визначення вмісту досліджуваних сполук у пробах із біологічного матеріалу.

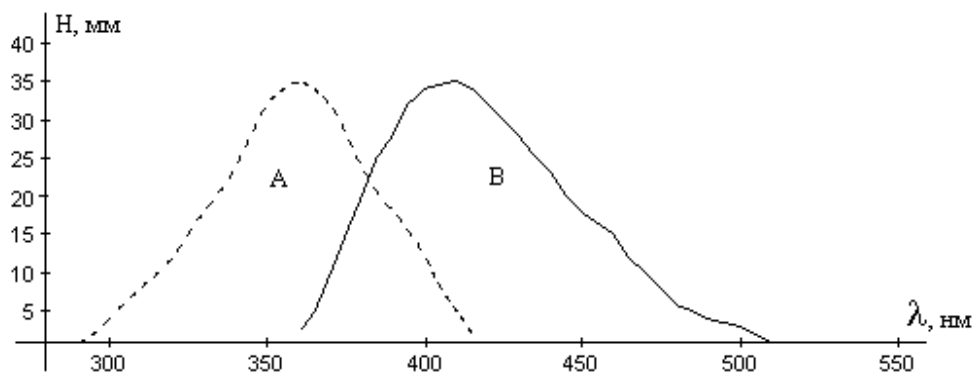


Рис. 2.5 Спектр збудження (А) та випромінювання (В) ізопропанольного розчину силденафілу (10 мкг/мл, Ч = 10)

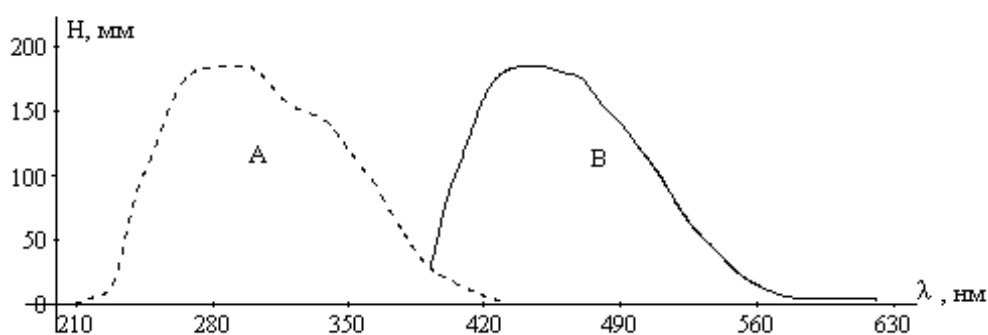


Рис. 2.6 Спектр збудження (А) та випромінювання (В) ацетонітрильного розчину варденафілу (10 мкг/мл, Ч = 1)

2.4.2 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії

Для встановлення меж концентрацій, в яких спостерігається прямолінійна залежність між інтенсивністю флуоресценції та концентрацією силденафілу чи варденафілу готували серію робочих розчинів. Розчини силденафілу готували в ізопропанолі, а варденафілу – в ацетонітрилі.

Виготовлення розчинів силденафілу.

Стандартний розчин силденафілу в ізопропанолі з концентрацією 500 мкг/мл готували шляхом розчинення 5 мг стандартного зразку

силденафілу цитрату (з вмістом діючої речовини $\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA, серія № PZ0003) у 10 мл ізопропанолу (**розчин А**). Для виготовлення розчину А використовували мірні колби місткістю 10.0 мл. Стандартний розчин можна використовувати протягом 3-х місяців, зберігаючи при 4 °С в обгортці із чорного пергаментного паперу.

Шляхом розведення стандартного розчину А ізопропанолом, готували робочі розчини силденафілу із концентрацією 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 та 50,0 мкг/мл. Для цього в ряд мірних колб місткістю 10.0 мл вносили по 40, 100, 200, 400 та 1000 мкл стандартного розчину А та доводили ізопропанолом до позначки.

Побудова градуувального графіку для кількісного визначення силденафілу методом флуоресцентної спектрометрії.

Інтенсивність флуоресценції розчинів силденафілу вимірювали при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ нм}/410 \text{ нм}$ ($\text{Ч} = 10$).

Результати визначення інтенсивності флуоресценції силденафілу в ізопропанольних розчинах наведено в таблиці 2.11.

Таблиця 2.11

Залежність інтенсивності флуоресценції силденафілу від концентрації в ізопропанолі (n=5)

Концентрація силденафілу, мкг/мл	Н сер, мм
2,0	7,0
5,0	18,0
10,0	35,0
20,0	73,0
50,0	184,0

Градуувальний графік залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації силденафілу в ізопропанольних розчинах представлено на рисунку 2.7.

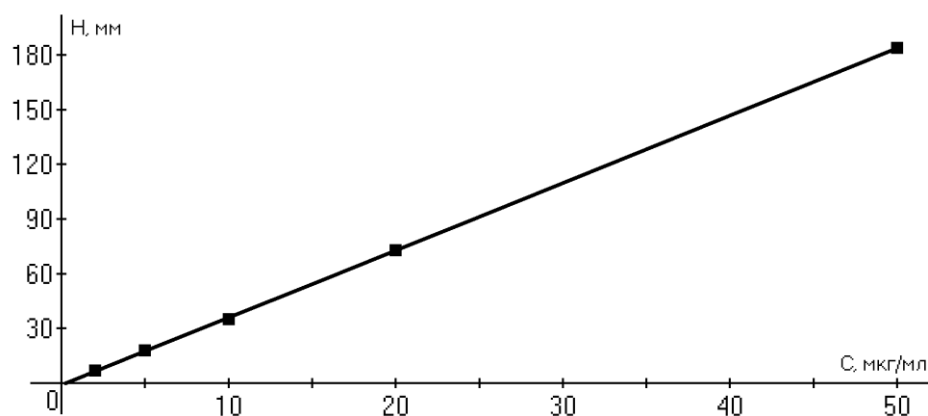


Рис. 2.7 Градувальний графік для кількісного визначення силденафілу методом флуоресцентної спектрометрії в діапазоні концентрацій 2,0-50,0 мкг/мл

Застосовуючи метод найменших квадратів, розраховано рівняння градувальної прямої, яким описується лінійність між інтенсивністю флуоресценції та концентрацією силденафілу в пробі. Параметри лінійної залежності рівняння регресії, розрахованого методом найменших квадратів, представлено в таблиці 2.12.

Таблиця 2.12

Статистичні параметри лінійності для кількісного визначення силденафілу методом флуоресцентної спектрометрії (n = 5, P = 95 %)

Інтервал лінійності, мкг/мл	Коефіцієнти		Довірчі інтервали коефіцієнтів		Коефіцієнт кореляції (r)
	a	b	Δa	Δb	
2,0-50,0	3,695	-0,888	0,866	0,036	0,9999

Встановлено, що в межах концентрацій силденафілу 2,0-50,0 мкг/мл, градувальний графік описується залежністю $Y = 3,695 \cdot X - 0,888$ ($r = 0,9999$), де Y – інтенсивність випромінюваної флуоресценції (мм), X – концентрація силденафілу в пробі (мкг/мл).

Кількісне визначення силденафілу в модельних розчинах методом флуоресцентної спектрометрії.

Для кількісного визначення силденафілу методом флуоресцентної спектрометрії готували серію його модельних розчинів з концентраціями 2; 5; 10; 20 та 50 мкг/мл в ізопропанолі. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градуовального графіку. Проведено п'ять паралельних вимірювань для кожного рівня концентрації силденафілу. Вміст препарату в пробах визначали за рівнянням регресії, яким описується залежність значення інтенсивності флуоресценції від концентрації силденафілу.

Основні характеристики методу флуоресцентної спектрометрії для кількісного визначення силденафілу в розчинах та їх статистичну обробку представлено в таблиці 2.13.

Таблиця 2.13

Результати кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах методом флуоресцентної спектрометрії (n = 5, P = 95%)

Концентрація взятого силденафілу, мкг/мл	Знайдено препарату		Метрологічні характеристики
	мкг/мл	%	
2	1,95	97,50	$\bar{X} = 98,80$ $S = 1,16$ $S_{\bar{x}} = 0,52$ $RSD_x = 1,70$ $\Delta X = \pm 1,44$ $\varepsilon = 1,46 \%$
5	4,93	98,50	
10	9,80	98,00	
20	20,00	100,00	
50	50,10	100,02	

Встановлено, що в ізопропанольних розчинах межа кількісного визначення силденафілу становить 2 мкг/мл.

Виготовлення розчинів варденафілу.

Стандартний розчин варденафілу з концентрацією 500 мкг/мл готували шляхом розчинення 5 мг стандартного зразку варденафілу (з вмістом діючої

речовини $\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA, серія № SML2103) у 10 мл ацетонітрилу (**розчин А**). Для виготовлення розчину А використовували мірні колби місткістю 10.0 мл. Вихідний стандартний розчин можна використовувати протягом 3-х місяців, зберігаючи при 4 °С в обгортці із чорного пергаментного паперу.

1000 мкл стандартного розчину А переносили в мірні колби місткістю 10.0 мл і доводили ацетонітрилом до позначки. Концентрація варденафілу в отриманому розчині 50 мкг/мл (**розчин В**).

Для виготовлення **розчину С** 1000 мкл розчину В переносили в мірну колбу місткістю 10.0 мл та доводили ацетонітрилом до позначки. В 1 мл розчину С міститься 5 мкг варденафілу.

Для виготовлення серії розчинів із концентрацією варденафілу від 5 нг/мл до 100 нг/мл використовували розчин С. Для цього в мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 10, 20, 100, 160 та 200 мкл розчину С та доводили ацетонітрилом до позначки. В 1 мл отриманих розчинів міститься по 5; 10; 50; 80 та 100 нг варденафілу.

Для виготовлення розчинів варденафілу із вмістом від 0,1 мкг/мл до 5 мкг/мл використовували розчин В. По 20, 100, 200, 400 та 1000 мкл розчину В переносили в мірні колби місткістю 10.0 мл та доводили ацетонітрилом до позначки. В 1 мл отриманих розчинів міститься по 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 та 5,0 мкг варденафілу.

Побудова градувального графіку для кількісного визначення варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії.

Інтенсивність флуоресценції серії ацетонітрильних розчинів варденафілу вимірювали при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 285 \text{ нм}/450 \text{ нм}$. При чутливості 10 вимірювали інтенсивність флуоресценції робочих розчинів з концентраціями варденафілу від 5 нг/мл до 100 нг/мл, а при чутливості 1 – серії робочих розчинів в межах концентрацій від 0,1–5,0 мкг/мл ($n = 5$).

Результати визначення інтенсивності флуоресценції варденафілу в ацетонітрильних розчинах наведено в таблиці 2.14.

Таблиця 2.14

Залежність інтенсивності флуоресценції варденафілу від концентрації в ацетонітрильних розчинах (n=5)

Концентрація варденафілу, нг/мл	Н сер, мм	Концентрація варденафілу, мкг/мл	Н сер, мм
5,0	1,0	0,1	2,5
10,0	2,0	0,5	10,0
50,0	11,0	1,0	20,0
80,0	18,0	2,0	40,0
100,0	23,0	5,0	100,0

Застосовуючи метод найменших квадратів розраховані рівняння регресій, якими описується лінійність між інтенсивністю флуоресценції та концентрацією варденафілу в пробі.

Параметри лінійної залежності рівнянь регресій, розрахованих методом найменших квадратів, представлено в таблиці 2.15.

Таблиця 2.15

**Статистичні параметри лінійності для кількісного визначення варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії
(n = 5, P = 95 %)**

Інтервал лінійності	Коефіцієнти		Довірчі інтервали коефіцієнтів		Коефіцієнт кореляції (r)
	a	b	Δa	Δb	
5-100 нг/мл	0,231	-0,308	0,316	0,005	0,9998
0,1-5,0 мкг/мл	19,948	0,190	0,272	0,110	0,9999

Встановлено, що в межах концентрацій варденафілу 5-100 нг/мл градувальний графік описується залежністю $Y = 0,231 \cdot X - 0,308$ ($r = 0,9998$), а в межах концентрацій від 0,1-5,0 мкг/мл – $Y = 19,948 \cdot X + 0,190$ ($r = 0,9999$), де Y – інтенсивність випромінюваної флуоресценції (мм), X – концентрація варденафілу в пробі (нг/мл або мкг/мл відповідно).

Градуювальні графіки залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації варденафілу в ацетонітрильних розчинах представлено на рисунку 2.8.

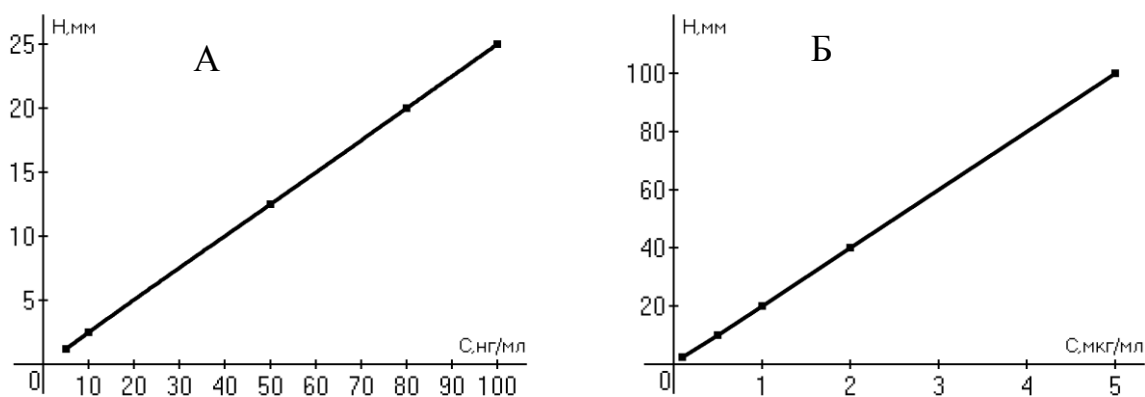


Рис. 2.8 Градуювальні графіки кількісного визначення варденафілу методом флуориметрії: А – межі концентрацій 5-100 нг/мл; Б – межі концентрацій 0,1-5,0 мкг/мл

Кількісне визначення варденафілу в модельних розчинах методом флуоресцентної спектрометрії.

Для кількісного визначення варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії готували дві серії модельних розчинів: з концентраціями по 5; 10; 50; 80 та 100 нг/мл та по 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 мкг/мл в ацетонітрилі. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градуального графіку. Проведено п'ять вимірювань для кожної концентрації варденафілу.

Вміст препарату в пробах визначали за рівняннями регресій, якими описується залежність значення інтенсивності флуоресценції від концентрації варденафілу.

Основні характеристики методу флуоресцентної спектрометрії для кількісного визначення варденафілу в розчинах та їх статистичну обробку наведено в таблиці 2.16.

Таблиця 2.16

**Результати кількісного визначення варденафілу в модельних
розчинах методом флуоресцентної спектрометрії
(n = 5, P = 95%)**

Діапазон концентрацій	Концентрація взятого варденафілу	Знайдено варденафілу		Метрологічні характеристики
		нг/мл або мкг/мл	%	
5–100 нг/мл	5 нг/мл	4,875 нг/мл	97,5	$\bar{X} = 98,67$ $S = 1,23$ $S \bar{x} = 0,55$ $RSD_x = 1,25$ $\Delta X = \pm 1,53$ $\varepsilon = 1,55\%$
	10 нг/мл	9,783 нг/мл	97,83	
	50 нг/мл	49,0 нг/мл	98,0	
	80 нг/мл	80,0 нг/мл	100,0	
	100 нг/мл	100,0 нг/мл	100,0	
0,1–5,0 мкг/мл	0,1 мкг/мл	0,096 мкг/мл	96,1	$\bar{X} = 97,67$ $S = 1,21$ $S \bar{x} = 0,54$ $RSD_x = 1,24$ $\Delta X = \pm 1,51$ $\varepsilon = 1,54\%$
	0,5 мкг/мл	0,485 мкг/мл	97,0	
	1,0 мкг/мл	0,975 мкг/мл	97,5	
	2,0 мкг/мл	1,975 мкг/мл	98,75	
	5,0 мкг/мл	4,950 мкг/мл	99,0	

Межа кількісного визначення варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії в ацетонітрильних розчинах становить 5 нг/мл.

Одержані дані використовувались для кількісного визначення силденафілу та варденафілу у пробах, отриманих при виділенні цих речовин з модельних зразків біологічного матеріалу (кров, сеча, тканина печінки) та визначенні їх вмісту у пробах при ТФЕ та рідинній екстракції.

2.4.3 Валідація методики визначення силденафілу та варденафілу у розчинах методом флуоресцентної спектрометрії

Спектри збудження та випромінювання є специфічними для силденафілу та варденафілу, тому дозволяють однозначно ідентифікувати досліджувані речовини в пробах.

Правильність та прецизійність (на рівні збіжності) методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу проводили з використанням модельних розчинів з трьома різними концентраціями, які охоплювали діапазон застосування методик: для силденафілу – 2-50 мкг/мл, а для варденафілу – 5-100 нг/мл та 0,1-5,0 мкг/мл.

Для оцінки правильності та прецизійності використовували відношення «знайдено/введено» у відсотках.

Результати визначення правильності та прецизійності розроблених методик представлено у таблицях 2.17. та 2.18.

Таблиця 2.17

Правильність і прецизійність визначення силденафілу методом флуоресцентної спектрометрії (n = 3, P = 95 %)

Силденафіл		Показники прецизійності та правильності		
Внесено, мкг/мл	Знайдено, %	Прецизійність		Правильність (RE, %)
		± SD	(RSD %)	
2	1,95	0,011	0,513	97,50
25	24,75	0,203	0,808	99,00
50	49,91	0,410	0,818	99,81

Таблиця 2.18

Правильність і прецизійність визначення варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії (n = 3, P = 95 %)

Діапазон концентрацій	Варденафіл		Показники прецизійності та правильності		
	Внесено	Знайдено	Прецизійність		Правильність (RE, %)
			± SD	(RSD %)	
5–100 нг/мл	5 нг/мл	4,88 нг/мл	0,003	0,054	97,50
	50 нг/мл	49,03 нг/мл	0,180	0,367	98,00
	100,0 нг/мл	100,00 нг/мл	0,100	0,100	100,00
0,1-5 мкг/мл	0,1 мкг/мл	0,09 мкг/мл	0,001	1,020	98,00
	3 мкг/мл	2,96 мкг/мл	0,041	1,385	98,50
	5 мкг/мл	4,95 мкг/мл	0,082	1,654	99,00

Представлені експериментальні дослідження свідчать про правильність і прецизійність методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії (на рівні збіжності) у вказаних діапазонах концентрацій.

Відносна похибка кількісного визначення силденафілу в ізопропанольних розчинах в діапазоні концентрацій від 2 мкг/мл до 50 мкг/мл становить 1,46 %. Відносна похибка кількісного визначення варденафілу в ацетонітрильних розчинах становить 1,55 % в діапазоні концентрацій від 5 до 100 нг/мл та 1,54 % в діапазоні концентрацій від 0,1-5,0 мкг/мл.

Запропонований метод не потребує особливої пробопідготовки, характеризується простотою та високою чутливістю, тому його можливо використовувати у практиці судово-хімічного аналізу.

2.5 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом газової хроматографії з мас-спектрометрією

Газова хроматографія є одним із експресних методів фізико-хімічного аналізу, який в судово-хімічній практиці використовується для ідентифікації та кількісного визначення ксенобіотиків, що стали причиною летальних та гострих отруєнь, характеризується високою чутливістю і дозволяє виявляти «слідові» кількості речовин – до 10^{-8} % [1].

Застосування в газовій хроматографії капілярних колонок та мас-спектрометричних детекторів розширює можливості даного методу для експрес-ідентифікації речовин в судово-хімічній практиці.

Для отримання достовірних даних при застосуванні методу ГХ/МС в судово-хімічному аналізі досліджувані проби мають бути очищені від сторонніх домішок, які можуть впливати на достовірність результатів аналізу [35].

Газо-хроматографічний аналіз силденафілу та варденафілу ускладнюється тим, що дані сполуки мають велику молекулярну масу, а у

своїй структурі містять атоми сульфуру. Як відомо з літературних джерел, переважно при ГХ-аналізі сульфурвмісні сполуки піддають дериватизації, з метою усунення процесів розкладу речовин при високих температурах [114]. Тому в методиках ГХ-аналізу, які описані в літературі, для ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу, застосовують попередню дериватизацію цих сполук.

В основному для проведення їх дериватизації використовують N-метил-N-*трет*-бутилдиметилсилілтрифторацетамід та *трет*-бутилдиметилсилілхлорид [39, 40, 131]. Цей процес є достатньо тривалим і у більшості випадків придатний для ідентифікації та контролю вмісту активного фармацевтичного інгредієнту в лікарських формах.

Враховуючи наведене вище, ми поставили за мету опрацювати умови ГХ/МС визначення силденафілу та варденафілу без проведення дериватизації.

2.5.1 Розробка умов ідентифікації силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС

Нами проведено серію експериментальних досліджень із вивчення впливу природи нерухомої фази та її кількісного вмісту в капілярній колонці на результат ГХ/МС-аналізу силденафілу та варденафілу, досліджено можливість ідентифікації силденафілу та варденафілу в пробах, отриманих із біологічного матеріалу цим методом.

Експериментальні дослідження проводили на газовому хроматографі моделі Agilent 6890N із мас-детектором 5978 В. В роботі застосовано дві капілярні колонки довжиною 30 м та внутрішнім діаметром 0,25 мм. Товщина плівки нерухомої фази в кожній колонці 0,25 мкм. Проте, у першому варіанті використовували колонку RTX - 5 (Restek, USA; колонка №1), а в другому – колонку HP-1 (Agilent, USA; колонка №2). Використані колонки відрізнялись складом нерухомої фази: у першому варіанті – 5 % фенілсилоксану у метилсилоксані, а у другому – лише метилсилоксан.

В результаті серії досліджень із вибору температурного режиму ГХ-аналізу та швидкості газу носія були вибрані умови, які дозволяють провести ідентифікацію силденафілу та варденафілу без попередньої дериватизації.

Умови газо-хроматографічного аналізу на колонці RTX-5.

Початкова температура колонки 150 °C (підтримувалася 1,0 хв), після чого підвищення температури становило 30 °C/хв до досягнення 270 °C. Наступне підвищення температури становило 10 °C/хв до досягнення 300 °C. Ізотермічний режим при 300 °C витримували впродовж 40 хв.

Температура інжектора – 270 °C. Температура джерела випромінювання і квадруполя мас-детектора встановлювались на рівні 230 °C і 150 °C відповідно. Газ-носій – гелій, швидкість подачі якого була сталою і становила 3,0 мл/хв. Об'єм введеної проби – 1 мкл. Загальний час аналізу триває 53 хв.

Мас-спектр знімали в режимі SCAN в межах 40–650 атомних одиниць маси (m/z), застосовуючи режим позитивної іонізації та вольтаж 70 В.

Умови газо-хроматографічного аналізу на колонці HP-1.

Початкова температура колонки становила 70 °C, протягом 0,75 хв. Подальше підвищення температури до 320 °C проводилося зі швидкістю 70 °C/хв. Кінцеву температуру (320 °C) витримували 10,0 хв. Температура інжектора – 270 °C. Температура джерела випромінювання і квадруполя мас-детектора встановлювались на рівні 230 °C і 150 °C, відповідно. Газ-носій (гелій) подавали із швидкістю 1,1 мл/хв. Об'єм введеної проби 1 мкл. Загальний час аналізу – 35 хв. Використовували режим позитивної іонізації при вольтажі 70 В, а сканування проводилося в режимі SCAN, в діапазоні 30- 550 атомних одиниць маси (m/z).

В обох випадках ГХ-аналізу обробка хроматограм проводилась з допомогою програмного забезпечення Agilent ChemStation (версія E.01.01.335). Силденафіл та варденафіл в пробах ідентифікували за часом утримування та мас-спектрами.

Хроматограма силденафілу і варденафілу в суміші, отримана при проведенні аналізу на колонці RTX-5 представлена на рисунку 2.9, а їх мас-спектри – на рисунку 2.10.

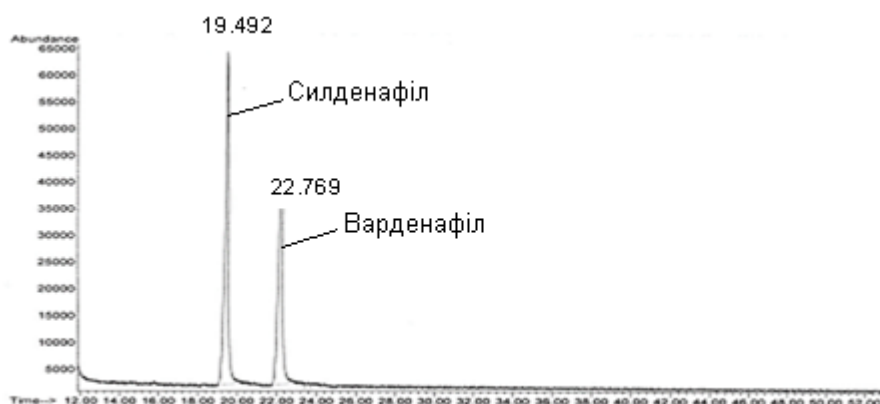


Рис. 2.9 Хроматограма силденафілу та варденафілу в суміші (концентрація кожної речовини 1 мкг/мл)

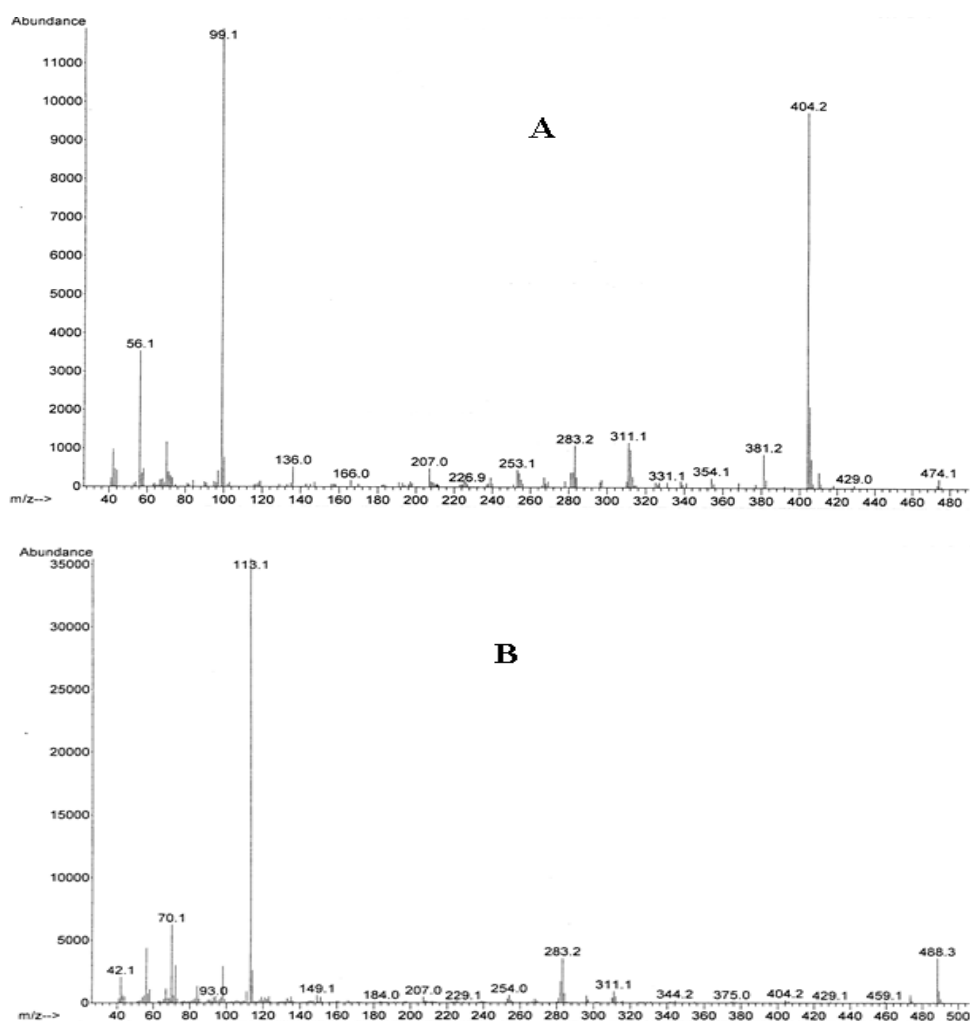


Рис. 2.10 Мас-спектри силденафілу (А) та варденафілу (В)

Для визначення ефективності колонок та придатності умов хроматографування для аналізу силденафілу та варденафілу визначали наступні параметри: число теоретичних тарілок (N), висоту, еквівалентну теоретичній тарілці (BETT) та фактор симетрії [6], які наведено в таблиці 2.19.

Таблиця 2.19

Основні хроматографічні параметри силденафілу та варденафілу

Параметри	Колонка RTX-5		Колонка HP-1	
	Силденафіл	Варденафіл	Силденафіл	Варденафіл
Число теоретичних тарілок (N)	74920	76478	86677	—
Висота, еквівалентна теоретичній тарілці (BETT), мм	0,4	0,39	0,35	—
Фактор симетрії	0,88	0,84	0,91	—
Ступінь розділення піків	1,93		—	

Як свідчать дані, наведені в таблиці 2.19, на колонці RTX-5 коефіцієнт розділення силденафілу та варденафілу 1,93, піки є достатньо симетричними. Усі параметри придатності системи для аналізу силденафілу та варденафілу на цій колонці знаходяться у межах норми. Час утримування силденафілу становить $19,492 \pm 0,05$ хв, а варденафілу – $22,769 \pm 0,04$ хв.

На колонці HP-1 виписується лише силденафіл, час утримування якого становить $13,742 \pm 0,04$ хв. Варденафіл на даній колонці не виписується, оскільки при кінцевій температурі 320 °C відбуваються процеси його термічного розкладу.

Мас-спектр силденафілу (рис. 2.10, А) характеризується сигналами при 99, 404, 56, 311, 283, 381, 136, **474** m/z (дані наведено в порядку зменшення інтенсивності сигналу).

Мас-спектр варденафілу (рис. 2.10, В) характеризується сигналами при 113, 70, 56, **488**, 283, 98, 311, 149 m/z (дані наведено в порядку зменшення інтенсивності сигналу).

Межа виявлення силденафілу методом ГХ/МС на обох колонках складала 5,0 нг/мл, а межа виявлення варденафілу на колонці RTX-5 – 20 нг/мл.

2.5.2 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС

Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС проводили на колонці RTX-5.

Виготовлення стандартних розчинів силденафілу та варденафілу.

Для приготування розчинів силденафілу використовували стандартний зразок силденафілу цитрату ($\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA, серія № PZ0003). Для приготування розчинів варденафілу використовували стандартний зразок варденафілу гідрохлориду тригідрату ($\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA, серія № SML2103).

На аналітичних вагах моделі Radwag AS 220/C зважували по 10 мг стандартного зразку силденафілу чи варденафілу. Наважки препаратів кількісно переносили в мірні колби місткістю 10.0 мл і розчиняли в метанолі (метанол відповідав кваліфікації для ВЕРХ grade, Merck). Об'єми розчинів доводили цим розчинником до позначки. В 1 мл кожного із стандартних розчинів містилось по 1 мг силденафілу чи варденафілу (**розчини А**).

Вихідні стандартні розчини можна використовувати протягом 3-х місяців, зберігаючи їх при $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ та обгортаючи колби чорним пергаментним папером.

Із стандартних розчинів А готували стандартні розчини силденафілу та варденафілу із вмістом 10 мкг/мл та 1 мкг/мл. Для виготовлення розчинів препаратів із концентрацією 10 мкг/мл по 100 мкл стандартних розчинів А

вносили у мірні колби місткістю 10.0 мл та доводили метанолом до позначки **(розчини В)**.

Для виготовлення розчинів із концентрацією силденафілу чи варденафілу 1 мкг/мл по 1000 мкл розчинів В вносили у мірні колби місткістю 10.0 мл та доводили метанолом до позначки **(розчини С)**.

Для встановлення значень межі виявлення (LOD) і межі кількісного визначення (LOQ) готували по п'ять паралельних серій розчинів кожного із препаратів.

Виготовлення серії робочих розчинів силденафілу.

В мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 50; 70; 200; 500 мкл стандартного розчину силденафілу С (1 мкг/мл) та по 100; 200 і 500 мкл стандартного розчину силденафілу В (10 мкг/мл). Об'єми розчинів доводили метанолом до мітки. В серії робочих розчинів концентрація силденафілу становила 5; 7; 20; 50; 100; 200 та 500 нг/мл.

Виготовлення серії робочих розчинів варденафілу.

В мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 200; 250; 500 та 1000 мкл стандартного розчину варденафілу із концентрацією 1 мкг/мл (розчин С) та по 200; 300 та 500 мкл стандартного розчину варденафілу із концентрацією 10 мкг/мл (розчин В). Об'єми розчинів в колбах доводили метанолом до позначки. Концентрація варденафілу у серії виготовлених робочих розчинів становила 20; 25; 50; 100; 200; 300 та 500 нг/мл.

Газо-хроматографічний аналіз проводили на колонці RTX-5, в умовах, зазначених в розділі 2.5.1. Об'єм введеної проби становив 1 мкл.

Межу виявлення силденафілу та варденафілу (LOD) методом ГХ/МС на хроматограмах визначали за співвідношенням сигнал-шум 3:1, а межу їх кількісного визначення (LOQ) за співвідношенням 5:1.

Градувальні графіки для кількісного визначення силденафілу та варденафілу будували методом абсолютної калібровки. Застосовуючи метод найменших квадратів розраховували рівняння регресій, які описують

залежність між площею піку та концентрацією силденафілу та варденафілу в пробі.

Залежність значень площ піків досліджуваних сполук від їх концентрації в розчині наведено в таблиці 2.20, а градувальні графіки для їх кількісного визначення методом ГХ/МС представлено на рис. 2.11 та 2.12.

Таблиця 2.20

Залежність між площею піку та концентрацією силденафілу та варденафілу при аналізі методом ГХ/МС (n=5)

Концентрація силденафілу, нг/мл	Площа піку силденафілу, $S_{\text{сер}}$	Концентрація варденафілу, нг/мл	Площа піку варденафілу, $S_{\text{сер}}$
7	$5,1015 \cdot 10^4$	25	$2,3193 \cdot 10^4$
20	$1,46161 \cdot 10^5$	50	$4,6381 \cdot 10^4$
50	$3,65333 \cdot 10^5$	100	$9,2783 \cdot 10^4$
100	$7,30890 \cdot 10^5$	200	$1,85546 \cdot 10^5$
200	$1,461773 \cdot 10^6$	300	$2,78339 \cdot 10^5$
500	$3,654433 \cdot 10^6$	500	$4,62614 \cdot 10^5$

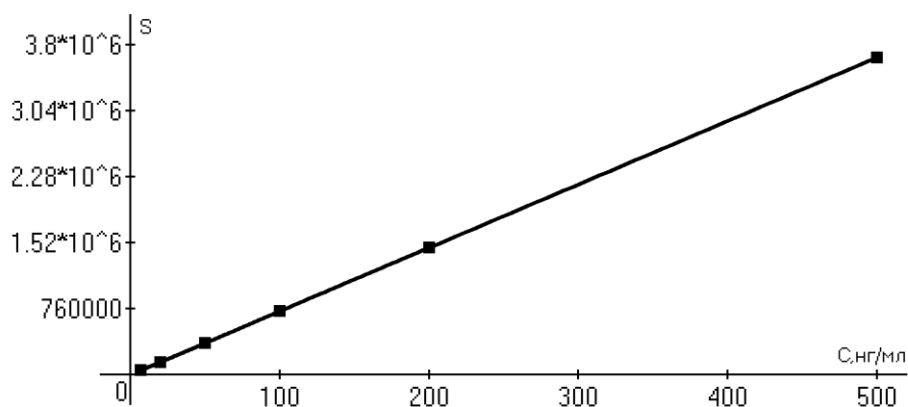


Рис. 2.11 Градувальний графік для кількісного визначення силденафілу методом ГХ/МС (діапазон концентрацій – 7-500 нг/мл)

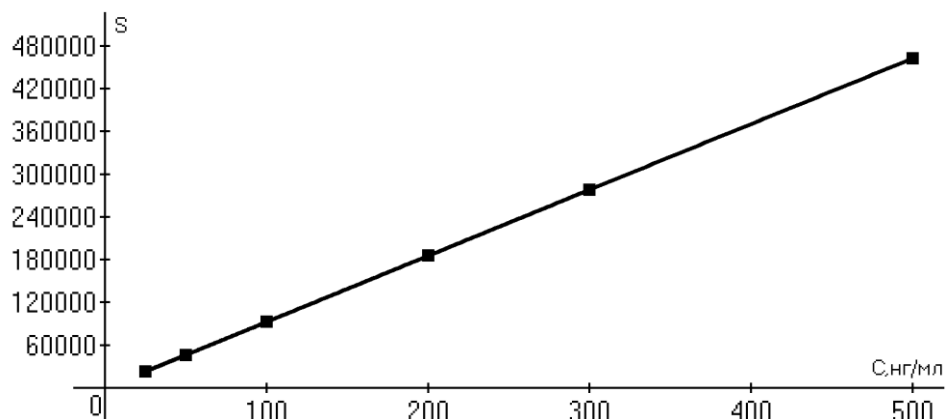


Рис. 2.12 Градувальний графік для кількісного визначення варденафілу методом ГХ/МС (діапазон концентрацій – 25-500 нг/мл)

Статистичні параметри визначення силденафілу та варденафілу у розчинах методом ГХ/МС наведено в табл. 2.21.

Таблиця 2.21

Статистичні параметри визначення силденафілу та варденафілу у розчинах методом ГХ-МС (n=5)

Препарат	Коефіцієнти		Довірчі інтервали коефіцієнтів		Коефіцієнт кореляції (r)	Інтервал лінійності, нг/мл
	a	b	Δa	Δb		
Силденафіл	7313,564	-2004,167	4,051	910,290	0,9999	7,0-500
Варденафіл	925,408	250,277	0,791	202,377	0,9999	25,0-500

Рівняння регресії для ГХ/МС визначення силденафілу у метанольних розчинах в межах концентрацій від 7 до 500 нг/мл описується залежністю $Y = 7313,564 \cdot X - 2004,167$, де: Y–площа піку, X–концентрація силденафілу, нг/мл.

Рівняння регресії для ГХ/МС варденафілу в метанольних розчинах в межах концентрацій від 25 до 500 нг/мл описується залежністю $Y = 925,408 \cdot X + 250,277$, де: Y–площа піку, X–концентрація варденафілу, нг/мл.

Кількісне визначення силденафілу в модельних розчинах методом ГХ/МС.

Для кількісного визначення силденафілу методом ГХ/МС готували серію модельних розчинів з концентраціями 7; 20; 50; 100; 200 та 500 нг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градувального графіку. Проведено п'ять вимірювань для кожної концентрації силденафілу. Вміст силденафілу в досліджуваних розчинах визначали, користуючись рівнянням регресії.

Результати кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах та їх статистичну обробку наведено в таблиці 2.22.

Таблиця 2.22.

Результати кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах методом ГХ/МС (n = 5, P = 95%)

Концентрація взятого силденафілу, нг/мл	Знайдено препарату		Метрологічні характеристики
	нг/мл	%	
7	6,96	99,4	$\bar{X} = 99,93$ $S = 0,45$ $S \bar{x} = 0,19$ $RSD_x = 0,46$ $\Delta X = \pm 0,48$ $\varepsilon = 0,48 \%$
20	19,90	99,5	
50	49,90	99,8	
100	100,00	100,0	
200	200,80	100,4	
500	502,50	100,5	

Кількісне визначення варденафілу в модельних розчинах методом ГХ/МС.

Для кількісного визначення варденафілу методом ГХ/МС готували серію модельних розчинів з концентраціями 25; 50; 100; 200 та 500 нг/мл.

Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градувального графіку. Проведено п'ять вимірювань для кожної концентрації варденафілу. Вміст варденафілу в досліджуваних розчинах визначали, користуючись рівнянням регресії.

Результати кількісного визначення варденафілу в розчинах та їх статистичну обробку наведено в таблиці 2.23.

Таблиця 2.23

**Результати кількісного визначення варденафілу в модельних розчинах
методом ГХ/МС (n = 5, P = 95%)**

Концентрація взятого варденафілу, нг/мл	Знайдено препарату		Метрологічні характеристики
	нг/мл	%	
25	24,78	99,1	$\bar{X} = 99,78$ $S = 0,54$ $S_{\bar{x}} = 0,24$ $RSD_x = 0,54$ $\Delta X = \pm 0,67$ $\varepsilon = 0,67 \%$
50	49,70	99,4	
100	99,80	99,8	
200	200,40	100,2	
500	502,00	100,4	

Межа кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах методом ГХ/МС на колонці RTX-5 – 7,0 нг/мл, відносна похибка кількісного визначення в діапазоні концентрацій від 7 до 500 нг/мл складає 0,48 %.

Межа кількісного визначення варденафілу в модельних розчинах методом ГХ/МС – 25,0 нг/мл, відносна похибка кількісного визначення в діапазоні концентрацій від 25 до 500 нг/мл складає 0,67 %. Усі результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в розчинах методом ГХ/МС є надійними, оскільки знаходяться в межах довірчого інтервалу.

2.5.3 Валідація методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС

Проведена валідація методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС.

Для проведення валідації методики кількісного визначення досліджуваних препаратів методом ГХ/МС використовували стандартні розчини силденафілу та варденафілу в метанолі з концентраціями 10 мг/мл та 1 мкг/мл. Зі стандартних розчинів готували по три серії розчинів із концентраціями 7, 200 та 500 нг/мл для силденафілу та 25, 200 та 500 нг/мл для варденафілу, які аналізували за методиками, описаними в розділах 2.5.1 та 2.5.2.

Таблиця 2.24

**Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій та площ піків
силденафілу та варденафілу у розчинах при аналізі методом ГХ/МС**

Силденафіл				Варденафіл			
Абсолютні значення		Нормалізовані значення		Абсолютні значення		Нормалізовані значення	
концентрація нг/мл	площа піку, S	концентрація нг/мл	площа піку, S	концентрація нг/мл	площа піку, S	концентрація нг/мл	площа піку, S
7	51015,850	3,5	3,490	25	23195,120	12,5	12,501
7	51015,900	3,5	3,490	25	23192,250	12,5	12,499
7	51015,950	3,5	3,490	25	23193,440	12,5	12,500
200	1461773,200	100	100,000	200	185545,000	100	99,999
200	1461773,210	100	99,999	200	185546,108	100	100,000
200	1461773,190	100	99,999	200	185548,100	100	100,001
500	3654433,400	250	250,000	500	462614,000	250	249,325
500	3654432,800	250	250,000	500	462613,001	250	249,325
500	3654434,900	250	250,000	500	462615,002	250	249,326

Таблиця 2.25

**Результати вивчення лінійності методики кількісного визначення
силденафілу та варденафілу у розчинах методом ГХ/МС**

Величина	Силденафіл			Варденафіл		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b	1,00004	—	—	0,9969	—	—
Стандартне відхилення s_b	$3,15 \cdot 10^{-4}$	—	—	$7,37 \cdot 10^{-4}$	—	—
Вільний член лінійної залежності a : $ a \leq \Delta_a$ (1), якщо не відповідає, то $ a \leq \frac{0,32 \cdot \Delta_{As} (\%)}{1 - (X \min / 100)}$ (2)	-0,0077	$\Delta_a = 0,0454$ $ a \leq \Delta_a$ (1)	Відповідає	0,140	$\Delta_a = 0,2900$ $ a \leq \Delta_a$ (1)	Відповідає
		$ a \leq 1,197$ (2)	Відповідає		$ a \leq 1,484$ (2)	Відповідає
Стандартне відхилення s_a	0,049	—	—	0,123	—	—
Залишкове стандартне відхилення s_o , $s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$	0,096	$s_o \leq 1,470$	Відповідає	0,144	$s_o \leq 1,470$	Відповідає
Максимальна невизначеність аналізу Δ_{As}	3,479	—	—	3,479	—	—
Коефіцієнт кореляції r	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає

Таблиця 2.26

**Результати вивчення правильності та прецизійності (на рівні збіжності) методики кількісного визначення
силденафілу та варденафілу у розчинах методом ГХ/МС**

Величина	Силденафіл			Варденафіл		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Середнє значення для відношення «знайдено/введено» $\bar{Z}$	99,905	—	—	99,910	—	—
Стандартне відхилення для відношення «знайдено/введено» s_z	0,051	—	—	0,048	—	—
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\%$: $\delta\% \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} \quad (1) \text{ , якщо не виконується, то } \delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} \quad (2)$	0,095	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = 0,039;$ $0,095 \geq 0,039 \quad (1),$ $0,095 \leq 1,113 \quad (2)$	Відповідає	0,090	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = 0,037;$ $0,090 \geq 0,037 \quad (1),$ $0,090 \leq 1,113 \quad (2)$	Відповідає
Однобічний довірчий інтервал Δ_z	0,116	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $0,116 = 3,479$	Відповідає	0,110	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $0,110 = 3,479$	Відповідає

Згідно ДФУ 2.0 [6] розрахунки валідаційних критеріїв проводили у нормалізованих координатах. Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій та площ піків силденафілу та варденафілу наведено в таблиці 2.24.

Показники лінійності, правильності та прецизійності методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах методом ГХ/МС представлено в таблицях 2.25 та 2.26.

Для перевірки лінійності оцінювали значення вільного члену «а» за двома критеріями: критерій статистичної незначущості та критерій практичної незначущості.

Вільний член «а» статистично не відрізняється від нуля, якщо він не перевищує свій довірчий інтервал Δ_a : $|a| \leq \Delta_a$, $\Delta_a = t(95\%, n-2) \cdot S_a$. Якщо перший критерій не виконується, то використовують критерій практичної незначущості для вільного члена: $|a| \leq (0,32 \cdot \Delta_{As} (\%)) / (1 - (X_{\min}/100))$, де $X_{\min}$ – мінімальна концентрація для діапазону, в якому валідується методика аналізу [6].

Як видно з таблиці 2.25, при аналізі силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС вільний член «а» відповідає вимогам критеріїв, тому розроблена методика є лінійною.

При перевірці методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах методом ГХ/МС визначено правильність за критерієм практичної незначущості. Оскільки систематична похибка не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу ($\delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$), то в обох випадках аналізу можливо стверджувати, що систематична похибка не буде впливати на правильність результатів.

Оскільки однобічний довірчий інтервал Δ_z не перевищує максимально припустимої невизначеності аналізу Δ_{As} силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС, запропоновані методики характеризуються достатньою прецизійністю (на рівні збіжності) в усьому діапазоні зазначених концентрацій.

Розроблені методики можуть використовуватись для кількісного визначення силденафілу та варденафілу, виділених з біологічних об'єктів.

2.6 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ

Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) – один із універсальних методів фізико-хімічного аналізу, який дозволяє проводити розділення багатокомпонентних сумішей, ідентифікувати кожен із компонентів та проводити їх кількісне визначення. За рахунок того, що рухома рідка фаза проходить через колонку під високим тиском, а самі зерна сорбенту, яким заповнена колонка мають діаметр до 10 мкм, досягається зменшення коефіцієнту молекулярної дифузії та скорочується тривалість аналізу. Завдяки цьому даний метод є одним із найбільш вживаних при різних видах досліджень [36].

Технічна можливість використання мас-спектроскопії для детекції аналізованих сполук дозволяє визначати невідомі компоненти досліджуваного зразка за їх молекулярними масами, а за фрагментами мас-спектру встановити структуру лікарських засобів та метаболітів, які ізолюються із біологічних систем при проведенні фармакодинамічних, токсикологічних та судово-хімічних досліджень [99].

Першим кроком при проведенні ВЕРХ/МС є сканування в усьому діапазоні мас, при цьому визначаються параметри утримування хроматографічних піків і сигнали мас-детектора для молекулярних іонів (режим SCAN). Для кількісного аналізу за мас-спектрами краще використовувати метод реєстрації сигналів окремих іонів (режим SIM), при якому для підвищення чутливості методу вибирають сигнали лише потрібних іонів [4].

Часто при проведенні ВЕРХ для детекції застосовують УФ-детектори, оскільки більшість органічних речовин поглинає світло при 210 нм ($C=O$) та

250 нм (ароматичні цикли), а також флуоресцентні детектори, які завдяки проведенню детектування від нульової інтенсивності флуоресценції забезпечують вищу чутливість у порівнянні з детекторами поглинання [4, 184].

В розділі 1 нами охарактеризовано методики, що наведені в літературі для визначення силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ в лікарських формах та дієтичних добавках [92, 129, 137, 153], а також визначення їх вмісту в біологічних рідинах (кров, плазма, сеча) [42, 61, 68, 70]. Проте, у літературних джерелах практично відсутні дані про використання методу ВЕРХ при проведенні хіміко-токсикологічного аналізу силденафілу та варденафілу.

2.6.1 Розробка умов ідентифікації силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ/МС та ВЕРХ/УФ на колонці Zorbax SB-C18

Експериментальні дослідження проводились на рідинному хроматографі Agilent 1260 Infinity HPLC System, обладнаному програмним забезпеченням OpenLAB CDS Software.

Хроматографічне розділення проводили на обернено-фазній колонці Zorbax SB-C18 (50 мм x 2,1 мм) з розміром частинок сорбенту 1,8 мкм. Нерухома фаза колонки диізобутил-*n*-октадецилсилан є хімічно стійкою, що забезпечує тривалу експлуатацію даної колонки при ВЕРХ аналізі, а носій Zorbax Silica послаблює адсорбцію на сорбенті речовин основного характеру (зокрема білків). В зв'язку з чим колонка Zorbax SB-C18 є стабільною обернено-фазною колонкою, яка дозволяє аналізувати широке коло речовин, що проявляють кислотні, основні та нейтральні властивості.

Дана колонка забезпечує симетричність піків в широкому діапазоні значень рН (від 2 до 9). Перевагою є широкий температурний режим роботи (до 90 °C). При цьому досягається висока чутливість при роботі з мас-детектором. Рухома фаза може включати як органічні розчинники, так і водні розчини.

Склад рухомої фази: 0,1 % водний розчин форміатної кислоти (розчин А), 0,1 % розчин форміатної кислоти в ацетонітрилі (розчин В). Рухома фаза є стабільною при $\text{pH} < 2$, що дозволяє проводити аналіз в кислих розчинах та забезпечує іонізацію речовин. Співвідношення між об'ємами розчинів А та В у рухомій фазі протягом аналізу наступні: з моменту старту по 10 хв – 95:5; з 10 хв по 15 хв – 0:100; 15 хв. – 100 % В. Рухома фаза подається в лінійному градієнтному режимі, зі швидкістю 0,4 мл/хв. Температура термостата колонки 40 °С. Тривалість аналізу 25 хв.

Джерело іонів для мас-спектрометричного детектування: API-ES. Температура азоту (газу-осушувача) – 300 °С; тиск на небулайзері 40 psi, швидкість азоту в джерелі іонів – 10 л/хв. Об'єм введеної проби – 10 мкл.

Детекцію досліджуваних сполук в пробах проводили з допомогою діодно-матричного детектора (DAD) та одноквадрупольного мас-спектрометра Agilent 6120 з іонізацією в електро-спреї (ESI).

При УФ-детектуванні були зняті УФ-спектри силденафілу та варденафілу в діапазоні 190 – 400 нм, з кроком 1 нм. Для встановлення межі виявлення силденафілу та варденафілу за УФ-спектром застосовували довжину хвилі 254 нм.

Мас-спектральний аналіз проводився в режимі SCAN (діапазон 50-500 m/z) з фрагментацією 50 m/z при позитивному режимі іонізації.

Для ідентифікації силденафілу в режимі SIM використовували сигнал при 475 m/z , а для варденафілу – 489 m/z .

Ідентифікацію силденафілу та варденафілу на хроматограмах проводили за абсолютним часом утримування $t_{\text{абс}}$, (час, потрібний для елюювання компоненту) і абсолютним об'ємом утримування $V_{\text{абс}}$ (об'єм рухомої фази, необхідний для елюювання компоненту, $V_{\text{абс}} = t_{\text{абс}} \cdot F$, де F -швидкість рухомої фази), УФ- та мас-спектрами [6].

Придатність хроматографічної системи для аналізу силденафілу та варденафілу визначали за коефіцієнтом симетрії піку (A_s) і коефіцієнтом ємності (k).

Коефіцієнт симетрії піку (A_s) розраховували за формулою [6]:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2d} \quad (2.4),$$

де: $W_{0,05}$ – ширина піка на одній двадцятій висоти піка;

d – відстань між перпендикуляром, опущеним з максимуму піка і передньою межею піка на одній двадцятій висоти піка.

Коефіцієнт ємності (k) розраховували за формулою [6]:

$$k = \frac{V_R - V_o}{V_o} \quad (2.5),$$

де: V_R – абсолютний об'єм утримування речовини, мл;

V_o – вільний об'єм колонки, мл.

Хроматографічні параметри силденафілу та варденафілу на колонці Zorbax SB-C18 при вибраних умовах хроматографування наведено в таблиці 2.27.

Таблиця 2.27

**Хроматографічні параметри силденафілу та варденафілу на колонці
Zorbax SB-C18**

Тип детектування	Параметри утримування				Силденафіл		Варденафіл	
	Силденафіл		Варденафіл		Коефіцієнт симетрії	Коефіцієнт ємності	Коефіцієнт симетрії	Коефіцієнт ємності
	$t_{абс}$, хв	$V_{абс}$, мл	$t_{абс}$, хв	$V_{абс}$, мл				
Мас-спектрометр	6,004±0,052	2,40	5,529±0,085	2,21	0,85	12,88	0,91	11,79
УФ-детектор	5,925±0,079	2,37	5,454±0,092	2,18	0,88	12,70	0,93	11,61

Як видно з даних, представлених в таблиці 2.27, значення коефіцієнтів симетрії піків та коефіцієнтів ємності знаходяться в межах норми, що свідчить про придатність хроматографічної системи для аналізу досліджуваних сполук.

На рисунку 2.13 наведено хроматограму силденафілу та варденафілу у суміші. Сигнали мас-детектора в режимі SIM та УФ-спектри силденафілу та варденафілу, для розчинів з концентраціями кожного із препаратів 10 мкг/мл, представлені на рисунках 2.14 та 2.15. Мас-спектри стандартних розчинів силденафілу та варденафілу, отриманих в режимі SCAN 50-500 m/z з фрагментацією 50 одиниць, наведено на рисунку 2.16.

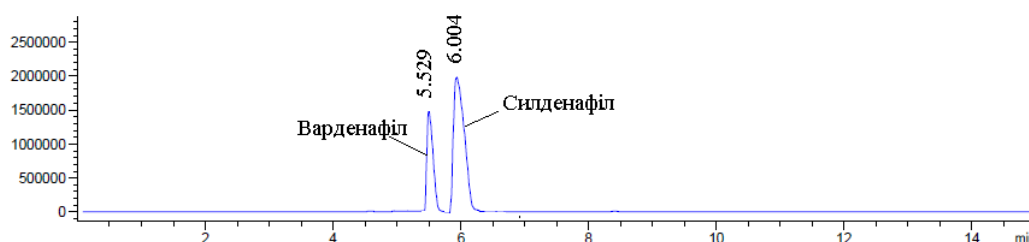


Рис. 2.13 Хроматограма розчину силденафілу та варденафілу у суміші (концентрація кожного із препаратів 1 мкг/мл), УФ-детекція при 254 нм

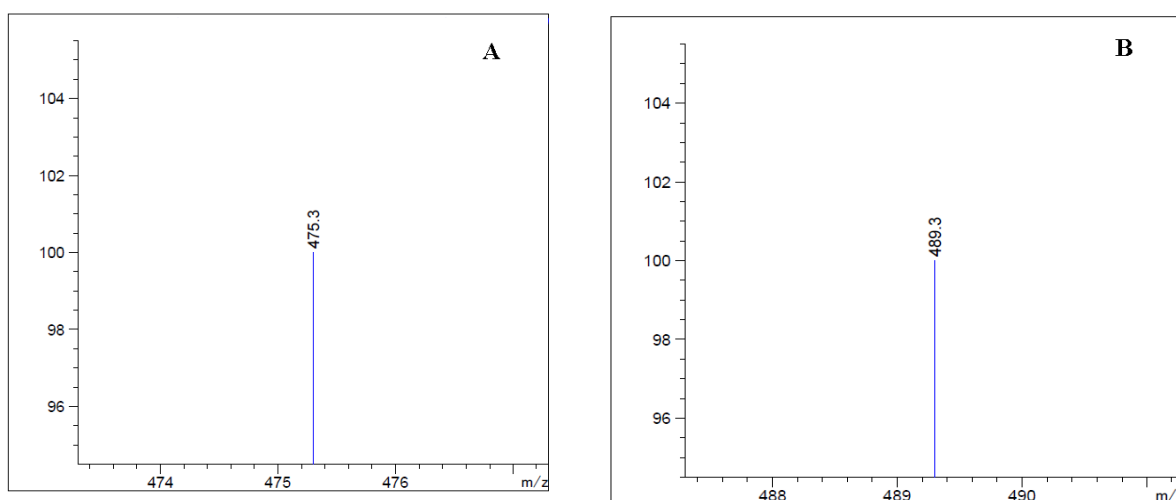


Рис. 2.14 Сигнали мас-детектора, зняті в режимі SIM: А – силденафіл, В – варденафіл

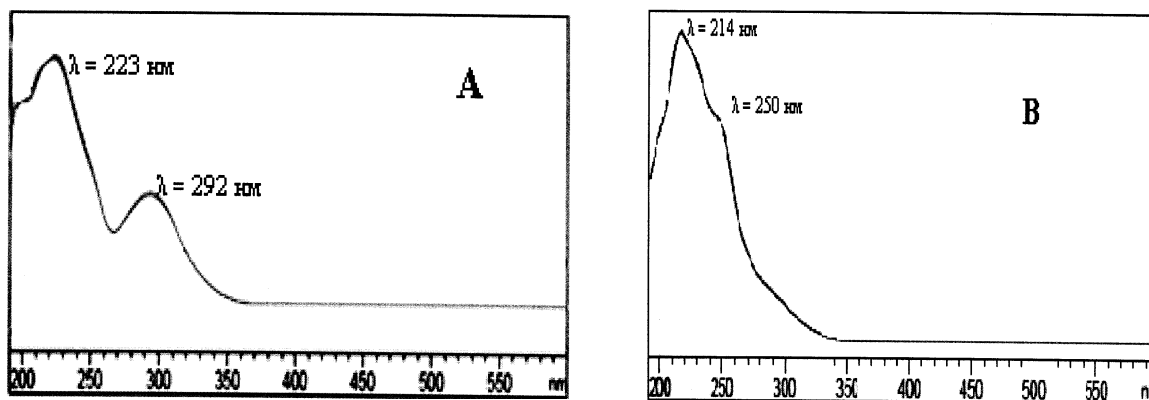


Рис. 2.15 УФ-спектри силденафілу (А) та варденафілу (В) при аналізі на колонці Zorbax SB-C18

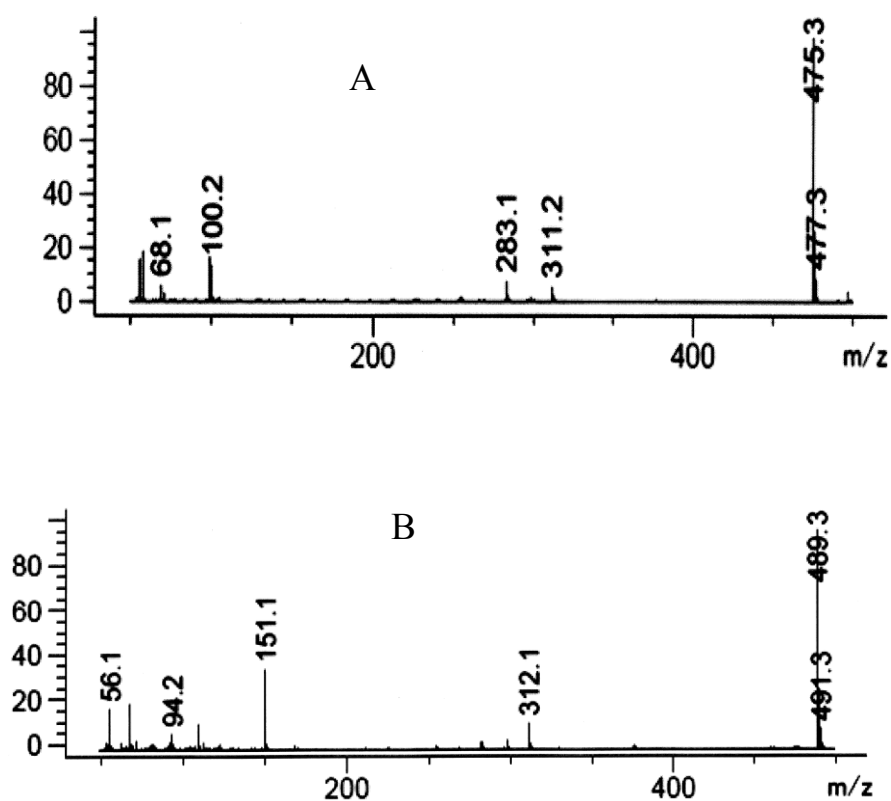


Рис.2.16 Мас-спектри силденафілу (А) та варденафілу (В), отримані в режимі SCAN 50-500 m/z (фрагментація 50 m/z)

В даних умовах хроматографічного аналізу мас-спектр силденафілу характеризується сигналами іонів при m/z : 475, 477, 100, 283, 311 та 68 m/z ; а мас-спектр варденафілу характеризується такими сигналами іонів – 489, 491, 151, 56, 312 та 94 m/z .

2.6.2 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ/МС і ВЕРХ/УФ на колонці Zorbax SB-C18

В розділі 2.6.1 представлені умови ідентифікації силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ/МС і ВЕРХ/УФ на колонці Zorbax SB-C18. Ці ж умови хроматографічного розділення використовували для кількісного визначення досліджуваних сполук даним методом.

Виготовлення стандартних розчинів силденафілу та варденафілу.

Для приготування розчинів силденафілу використовували стандартний зразок силденафілу цитрату ($\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA, серія № PZ0003).

Для приготування розчинів варденафілу використовували стандартний зразок варденафілу гідрохлориду тригідрату ($\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA, серія № SML2103).

На аналітичних вагах моделі Radwag AS 220/C зважували по 10 мг стандартного зразка силденафілу чи варденафілу. Наважки препаратів кількісно переносили в мірні колби місткістю 10.0 мл і розчиняли в метанолі (метанол відповідав кваліфікації для ВЕРХ grade (Merck)). Об'єми розчинів доводили цим розчинником до позначки. Концентрація кожного із препаратів становить 1 мг/мл силденафілу чи варденафілу (**розчини А**).

Вихідні стандартні розчини можна використовувати протягом 3-х місяців, зберігаючи їх при $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ та обгортаючи колби чорним пергаментним папером.

Із стандартних розчинів А готували стандартні розчини силденафілу та варденафілу із вмістом 10 мкг/мл та 1 мкг/мл.

Для виготовлення розчинів із концентрацією силденафілу чи варденафілу 10 мкг/мл по 100 мкл стандартних розчинів А вносили у мірні колби місткістю 10.0 мл та доводили метанолом до позначки (**розчини В**).

Для виготовлення стандартних розчинів із концентрацією силденафілу чи варденафілу 1 мкг/мл по 1000 мкл стандартних розчинів В вносили у мірні колби місткістю 10.0 мл та доводили метанолом до позначки (**розчини С**).

Для встановлення значень LOD і LOQ силденафілу методом ВЕРХ/МС з мас-детектором в режимі SIM готували по п'ять паралельних серій розчинів цього препарату в межах концентрацій 10-500 нг/мл, а для варденафілу готували аналогічну кількість серій робочих розчинів в межах концентрацій 15-500 нг/мл.

При визначенні в режимі SCAN готували по п'ять паралельних серій розчинів силденафілу в межах концентрацій 25-500 нг/мл, та варденафілу – в межах концентрацій 40-500 нг/мл.

Для встановлення значень LOD і LOQ силденафілу методом ВЕРХ/МС з УФ-детектором ($\lambda = 254$ нм) готували по п'ять паралельних серій розчинів цього препарату в межах концентрацій 30-500 нг/мл, а для варденафілу – аналогічну кількість серій робочих розчинів в межах концентрацій 50 - 500 нг/мл.

Виготовлення серії робочих розчинів силденафілу.

В мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 80; 100; 200; 250; 300; 500 і 1000 мкл стандартного розчину С та по 200; 300; 400; 500 мкл стандартного розчину В. Об'єми розчинів доводили метанолом до мітки. В серії робочих розчинів концентрація силденафілу становила 8; 10; 20; 25; 30; 50; 100; 200; 300; 400 та 500 нг/мл.

Виготовлення серії робочих розчинів варденафілу.

В мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 120; 150; 200; 350; 400; 450; 500; 1000 мкл стандартного розчину варденафілу із концентрацією 1 мкг/мл (розчин С) та по 200; 300; 400; 500 мкл стандартного розчину варденафілу із концентрацією 10 мкг/мл (розчин В). Об'єми розчинів в колбах доводили метанолом до позначки. Концентрація варденафілу в серії виготовлених робочих розчинів становила 12; 15; 20; 35; 40; 45; 50; 100; 200; 300; 400 та 500 нг/мл.

Об'єм введеної проби становив 10 мкл.

Межі виявлення силденафілу та варденафілу (LOD) методом ВЕРХ з мас-спектрометром та з УФ-детектором на хроматограмах визначали за співвідношенням сигнал-шум 3:1, а межу їх кількісного визначення (LOQ) за співвідношенням 5:1.

Залежність значень площ піків досліджуваних сполук від їх концентрації в розчині при використанні мас-детектора в режимах SIM та SCAN, а також при УФ-детектуванні наведено в таблицях 2.28 та 2.29, а градувальні графіки для їх кількісного визначення представлено на рисунках 2.17, 2.18 та 2.19.

Таблиця 2.28

Залежність площ хроматографічних піків від концентрації силденафілу в розчині на колонці Zorbax SB-C18 (n=5)

МС-детектор (режим SIM (m/z=475))		МС-детектор (режим SCAN (50-500 m/z))		УФ-детектування (λ = 254 нм)	
Концент- рація силдена- філу в розчині, нг/мл	Площа піку силденафілу S _{сер}	Концент- рація силдена- філу в розчині, нг/мл	Площа піку силденафілу, S _{сер}	Концент- рація силдена- філу в розчині, нг/мл	Площа піку силдена- філу, S _{сер}
10	1,17783·10 ⁵	25	1,0904·10 ⁵	30	18,27
50	5,88925·10 ⁵	50	2,1812·10 ⁵	50	30,46
100	1,17787·10 ⁶	100	4,3634·10 ⁵	100	61,16
200	2,355699·10 ⁶	200	8,7258·10 ⁵	200	122,31
300	3,533515·10 ⁶	300	1,308621·10 ⁶	300	183,47
400	4,711584·10 ⁶	400	1,744962·10 ⁶	400	244,62
500	5,886450·10 ⁶	500	2,182202·10 ⁶	500	305,78

Таблиця 2.29

**Залежність площ хроматографічних піків від концентрації варденафілу
в розчині на колонці Zorbax SB-C18 (n=5)**

МС-детектор (режим SIM (m/z=489))		МС-детектор (режим SCAN 50-500 m/z)		УФ-детектування ($\lambda = 254$ нм)	
Концентрація варденафілу в розчині, нг/мл	Площа піку варденафілу $S_{\text{сеп}}$	Концентрація варденафілу в розчині, нг/мл	Площа піку варденафілу $S_{\text{сеп}}$	Концентрація варденафілу в розчині, нг/мл	Площа піку варденафілу, $S_{\text{сеп}}$
15	$1,47405 \cdot 10^5$	40	$1,33338 \cdot 10^5$	50	19,65
50	$4,91493 \cdot 10^5$	100	$3,27595 \cdot 10^5$	100	39,64
100	$9,82766 \cdot 10^5$	200	$6,55191 \cdot 10^5$	200	79,28
200	$1,965472 \cdot 10^6$	300	$9,82787 \cdot 10^5$	300	118,92
400	$3,931156 \cdot 10^6$	400	$1,310282 \cdot 10^6$	400	158,56
500	$4,901118 \cdot 10^6$	500	$1,637977 \cdot 10^6$	500	198,20

Застосовуючи метод найменших квадратів, розраховували рівняння регресій, які описують залежність між площею піку та концентрацією силденафілу та варденафілу в пробі.

Рівняння регресії для кількісного визначення силденафілу методом ВЕРХ-МС у режимі SIM (m/z=475) в межах концентрацій від 10 до 500 нг/мл, описується залежністю $Y = 11774,850 \cdot X + 437,222$; в режимі SCAN в межах концентрацій від 25 до 500 нг/мл описується залежністю $Y = 4363,696 \cdot X - 136,481$, а при УФ-детектуванні, в межах концентрацій від 30 до 500 нг/мл, має вигляд $Y = 0,612 \cdot X - 0,068$; де: Y – площа піку силденафілу, X – концентрація силденафілу, нг/мл.

Рівняння регресії для кількісного визначення варденафілу методом ВЕРХ-МС у режимі SIM (m/z=489) в межах концентрацій від 15 до 500 нг/мл, описується залежністю $Y = 9808,919 \cdot X + 1854,534$; в режимі SCAN в межах концентрацій від 40 до 500 нг/мл: $Y = 3272,676 \cdot X + 1208,206$, а при використанні УФ-детектування в межах концентрацій від 50 до 500 нг/мл:

$Y = 0,397 \cdot X - 0,089$; де: Y – площа піку варденафілу, X – концентрація варденафілу, нг/мл.

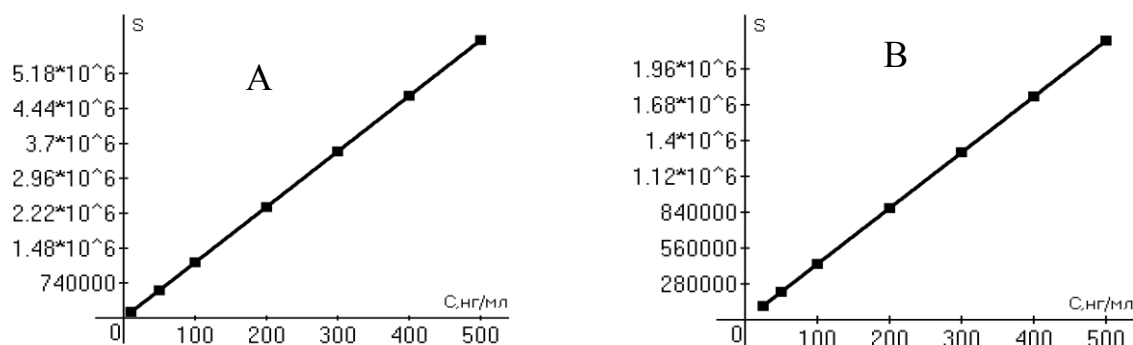


Рис. 2.17 Градувальні графіки кількісного визначення силденафілу методом ВЕРХ/МС, режим SIM (А) та режим SCAN (В) на колонці Zorbax SB-C18

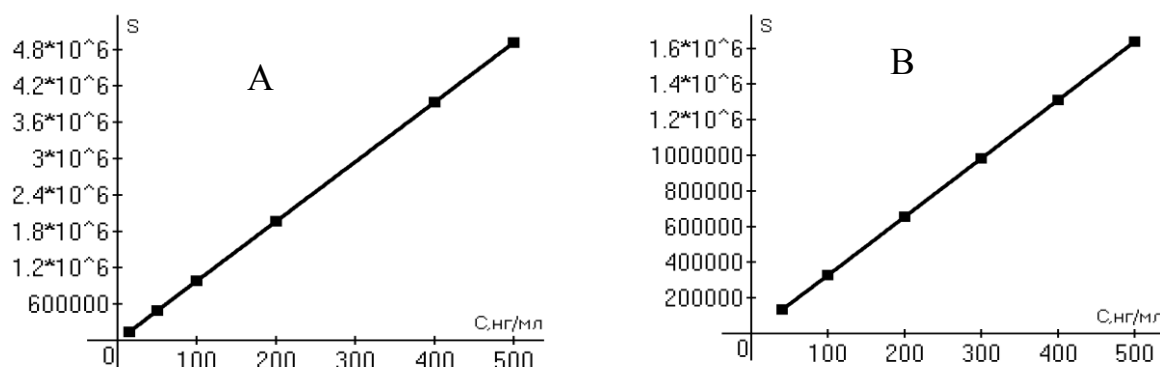


Рис. 2.18 Градувальні графіки кількісного визначення варденафілу методом ВЕРХ/МС, режим SIM (А) та режим SCAN (В) на колонці Zorbax SB-C18

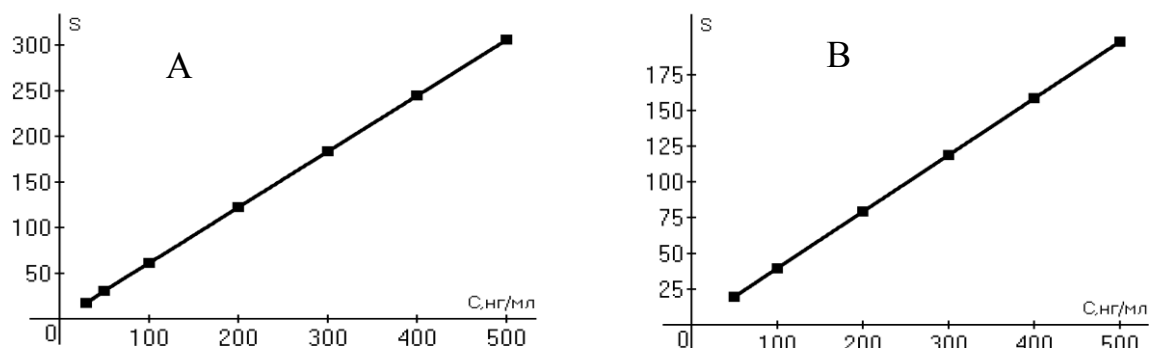


Рис. 2.19 Градувальні графіки кількісного визначення силденафілу (А) та варденафілу (В) методом ВЕРХ з УФ-детектуванням ($\lambda = 254$ нм) на колонці Zorbax SB-C18

Параметри лінійної залежності рівнянь регресій, розрахованих методом найменших квадратів для кількісного визначення силденафілу методом ВЕРХ/МС і ВЕРХ/УФ, представлено в таблиці 2.30, а для кількісного визначення варденафілу – у таблиці 2.31.

Таблиця 2.30

**Статистичні параметри лінійності для кількісного визначення
силденафілу методом ВЕРХ/МС і ВЕРХ/УФ на колонці
Zorbax SB-C18 (n = 5, P = 95 %)**

Тип детектування, інтервал лінійності	Коефіцієнти		Довірчі інтервали коефіцієнтів		Коефіцієнт кореляції (r)
	a	b	Δa	Δb	
ВЕРХ/МС режим SIM (m/z=475), 10-500 нг/мл	11774,850	437,222	$0,547 \cdot 10^3$	$0,195 \cdot 10^1$	0,9999
ВЕРХ/МС режим SCAN (50-500 m/z), 25-500 нг/мл	4363,696	-136,481	$0,199 \cdot 10^3$	$7,081 \cdot 10^{-1}$	0,9999
ВЕРХ з УФ- детектуванням ($\lambda = 254$ нм), 30-500 нг/мл	0,612	-0,068	$2,500 \cdot 10^{-2}$	$0,888 \cdot 10^{-4}$	0,9999

Таблиця 2.31

**Статистичні параметри лінійності для кількісного визначення
варденафілу методом ВЕРХ/МС і ВЕРХ/УФ на колонці Zorbax SB-C18
(n = 5, P = 95 %)**

Тип детектування, інтервал лінійності	Коефіцієнти		Довірчі інтервали коефіцієнтів		Коефіцієнт кореляції (r)
	a	b	Δa	Δb	
1	2	3	4	5	6
ВЕРХ/МС режим SIM (m/z=489), 15-500 нг/мл	9808,919	1854,534	$6,031 \cdot 10^3$	$0,217 \cdot 10^2$	0,9999

Продовж. табл. 2.31

1	2	3	4	5	6
ВЕРХ/МС режим SCAN (50-500 m/z), 40-500 нг/мл	3272,676	1208,206	$1,517 \cdot 10^3$	$0,500 \cdot 10^1$	0,9999
ВЕРХ з УФ- детектуванням ($\lambda = 254$ нм), 50-500 нг/мл	0,397	-0,089	$1,160 \cdot 10^{-1}$	$3,81 \cdot 10^{-4}$	0,9999

Межа виявлення силденафілу та варденафілу залежить від способу детектування. При використанні мас-спектрометра LOD силденафілу в режимі SIM становить 8 нг/мл, а в режимі SCAN – 20 нг/мл; при УФ-детекції – 25 нг/мл. LOD варденафілу при використанні цих способів детектування відповідно становить 12 нг/мл, 35 нг/мл та 45 нг/мл.

Межа кількісного визначення (LOQ) силденафілу в метанольних розчинах методом ВЕРХ/МС при детектуванні в режимі SIM ($m/z=475$) становить 10 нг/мл, а в режимі SCAN (50-500 m/z) – 25 нг/мл; при УФ-детекції ($\lambda = 254$ нм) – 30 нг/мл. Для варденафілу LOQ в метанольних розчинах методом ВЕРХ/МС при детектуванні в режимі SIM ($m/z=489$) становить 15 нг/мл, в режимі SCAN (50-500 m/z) – 40 нг/мл; при УФ-детекції ($\lambda = 254$ нм) – 45 нг/мл.

Оскільки визначення силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ/МС в режимі SIM є чутливішим за режим SCAN в 2,5 рази, при аналізі біологічних проб використано детекцію цих досліджуваних сполук із використанням режиму SIM.

Кількісне визначення силденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ з мас-детектором в режимі SIM ($m/z=475$). Для цього готували серію модельних розчинів силденафілу з концентраціями 10; 50; 100; 200 та 500 нг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при

побудові градууювального графіку. Детектування проводили в режим SIM ($m/z=475$).

Кількісне визначення силденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ з УФ-детектором ($\lambda = 254$ нм). Для цього готували серію модельних розчинів силденафілу з концентраціями 30; 50; 100; 200 та 500 нг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градууювального графіку.

Кількісне визначення варденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ з мас-детектором в режимі SIM ($m/z=489$). Готували серію модельних розчинів варденафілу з концентраціями 15; 50; 100; 200; 400 та 500 нг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градууювального графіку. Детектування проводили в режим SIM ($m/z=489$).

Кількісне визначення варденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ з УФ-детектором ($\lambda = 254$ нм). Готували серію модельних розчинів варденафілу з концентраціями 50; 100,0; 200; 300; 400 та 500 нг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градууювального графіку.

Проведено по п'ять вимірювань для кожної концентрації силденафілу та варденафілу для обох типів детекторів.

Для розрахунку вмісту досліджуваних препаратів в модельних розчинах використовували рівняння регресії, якими описується залежність значення площі піку від концентрації кожного із препаратів на даній колонці з відповідним способом детектування.

Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ/МС та з УФ-детектором та їх статистичну обробку наведено в таблиці 2.32.

Таблиця 2.32

**Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в
модельних розчинах методом ВЕРХ на колонці Zorbax SB-C18
(n = 5, P = 95%).**

Тип детек- тора	Концентрація взятого силде- нафілу, нг/мл	Знайдено силденафілу		Концентрація взятого варде- нафілу, нг/мл	Знайдено варденафілу	
		нг/мл	%		нг/мл	%
Мас- спект- рометр	10	9,89	98,90	15	14,85	99,0
	50	49,55	99,10	50	49,55	99,1
	100	99,80	99,80	100	99,90	99,9
	200	200,00	100,00	200	200,00	100,0
	500	500,10	100,02	500	500,05	100,01
	$\bar{X} = 99,56; S = 0,52;$ $S \bar{x} = 0,24; RSD_x = 0,53$ $\Delta X = \pm 0,66; \varepsilon = 0,66 \%$			$\bar{X} = 99,60; S = 0,51;$ $S \bar{x} = 0,23; RSD_x = 0,51$ $\Delta X = \pm 0,63; \varepsilon = 0,63 \%$		
УФ- детектор	30	29,67	98,91	50	49,50	99,00
	50	49,55	99,10	100	99,10	99,10
	100	99,80	99,80	200	199,80	99,90
	200	200,00	100,00	300	299,70	99,90
	500	500,00	100,00	500	500,00	100,00
	$\bar{X} = 99,56; S = 0,52;$ $S \bar{x} = 0,23; RSD_x = 0,52;$ $\Delta X = \pm 0,65; \varepsilon = 0,65 \%$			$\bar{X} = 99,58; S = 0,49;$ $S \bar{x} = 0,22; RSD_x = 0,49;$ $\Delta X = \pm 0,61; \varepsilon = 0,61 \%$		

Відносна похибка кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ/МС на колонці Zorbax SB-C18 в діапазоні концентрацій від 10 до 500 нг/мл складає 0,66 %, а при використанні УФ-детектора в діапазоні концентрацій від 30 до 500 нг/мл – 0,65 %.

Відносна похибка кількісного визначення варденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ/МС на колонці Zorbax SB-C18 в діапазоні концентрацій від 15 до 500 нг/мл складає 0,63 %, а при використанні УФ-детектора в діапазоні концентрацій від 50 до 500 нг/мл – 0,61 %.

Всі результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в розчинах методом ВЕРХ/МС та ВЕРХ/УФ є надійними, оскільки знаходяться в межах довірчого інтервалу.

2.6.3 Валідація методики кількісного визначення силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ з мас- та УФ-детектуванням на колонці Zorbax SB-C18

Проведена валідація методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ з використанням мас-детектора в режимі SIM та УФ-детектора ($\lambda = 254$ нм).

Для проведення валідації методики кількісного визначення досліджуваних препаратів методом ВЕРХ використовували стандартні розчини силденафілу та варденафілу в метанолі з концентраціями 10 мкг/мл та 1 мкг/мл. Зі стандартних розчинів готували по три серії розчинів, що відповідали нижній, середній та найвищій концентрації препаратів, які можна визначити методом ВЕРХ згідно методик, описаних в розділі 2.6.2.

Валідацію методики кількісного визначення силденафілу методом ВЕРХ/МС у режимі SIM ($m/z=475$) проводили на розчинах з концентраціями 10, 200 та 500 нг/мл, а при використанні УФ-детектора – на розчинах з концентраціями 30, 200 та 500 нг/мл.

Валідацію методики кількісного визначення варденафілу методом ВЕРХ/МС у режимі SIM ($m/z=489$) проводили на розчинах з концентраціями 15, 200 та 500 нг/мл, а при використанні УФ-детектора – на розчинах з концентраціями 50, 200 та 500 нг/мл.

Згідно ДФУ 2.0 [6] розрахунки валідаційних критеріїв проводили у нормалізованих координатах. Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій та площ піків силденафілу та варденафілу наведено в таблицях 2.33 та 2.36.

Показники лінійності, правильності та прецизійності методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах методом ВЕРХ/МС та ВЕРХ/УФ представлено в таблицях 2.34, 2.35, 2.37 та 2.38.

Для перевірки лінійності оцінювали значення вільного члену «а» за двома критеріями: критерій статистичної незначущості та критерій практичної незначущості.

Таблиця 2.33

Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій та площ піків силденафілу у розчинах при аналізі методом ВЕРХ/МС та з УФ-детектором на колонці Zorbax SB-C18

ВЕРХ/МС (режим SIM, m/z=475)				ВЕРХ з УФ-детектором ($\lambda = 254$ нм)			
Абсолютні значення		Нормалізовані значення		Абсолютні значення		Нормалізовані значення	
Концентрація силденафілу, нг/мл	площа піку, S	Концентрація силденафілу, нг/мл	площа піку, S	Концентрація силденафілу, нг/мл	площа піку, S	Концентрація силденафілу, нг/мл	площа піку, S
10	117785	5	5,000	30	18,300	15	14,960
10	117780	5	4,999	30	18,280	15	14,950
10	117784	5	4,999	30	18,220	15	14,900
200	2355699	100	100,000	200	122,310	100	100,000
200	2355698	100	99,999	200	122,300	100	99,991
200	2355700	100	100,000	200	122,310	100	100,000
500	5886780	250	249,895	500	305,780	250	250,004
500	5886520	250	249,884	500	305,770	250	249,996
500	5886050	250	249,864	500	305,790	250	250,012

Таблиця 2.34

**Результати вивчення лінійності методики кількісного визначення
силденафілу у розчинах методом ВЕРХ/МС та з УФ-детектором на колонці Zorbax SB-C18**

Величина	ВЕРХ/МС			ВЕРХ з УФ-детектором		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b	0,9995	—	—	1,0002	—	—
Стандартне відхилення s_b	$1,397 \cdot 10^{-4}$	—	—	$9,6 \cdot 10^{-5}$	—	—
Вільний член лінійної залежності a : $ a \leq \Delta_a$ (1), якщо не відповідає, то $ a \leq \frac{0,32 \cdot \Delta_{As} (\%)}{1 - (X \min / 100)}$ (2)	0,021	$\Delta_a = 0,057$ $0,021 \leq 0,057$ (1) $0,021 \leq 1,237$ (2)	Відповідає	-0,053	$\Delta_a = 0,060$ $0,053 \leq 0,060$ (1) $0,053 \leq 0,779$ (2)	Відповідає
Стандартне відхилення s_a	0,0217	—	—	0,0150	—	—
Залишкове стандартне відхилення s_o , $s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$	0,581	$s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$ $s_o \leq 1,470$	Відповідає	0,028	$s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$ $s_o \leq 1,470$	Відповідає
Максимальна невизначеність аналізу Δ_{As}	3,479	—	—	3,479	—	—
Коефіцієнт кореляції r	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає

Таблиця 2.35

Результати вивчення правильності та прецизійності (на рівні збіжності) методики кількісного визначення силденафілу у розчинах методом ВЕРХ/МС та з УФ-детектором на колонці Zorbax SB-C18

Величина	ВЕРХ/МС			ВЕРХ з УФ-детектором		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Середнє значення для відношення «знайдено/введено» $\bar{Z}$	99,984	—	—	99,855	—	—
Стандартне відхилення для відношення «знайдено/введено» s_z	0,008	—	—	0,087	—	—
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\%$: $\delta\% \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$ (1) , якщо не виконується, $\delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$ (2)	0,016	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}=0,006$ $0,016 \geq 0,006$ (1) $0,016 \leq 1,113$ (2)	Відповідає	0,145	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}=0,067$ $0,145 \geq 0,067$ (1) $0,145 \leq 1,113$ (2)	Відповідає
Однобічний довірчий інтервал Δ_z	0,019	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $\Delta_{As}=3,479$	Відповідає	0,200	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $\Delta_{As}=3,479$	Відповідає

Таблиця 2.36

Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій та площ піків варденафілу у розчинах при аналізі методом ВЕРХ/МС та з УФ-детектором на колонці Zorbax SB-C18

ВЕРХ/МС (режим SIM, m/z=489)				ВЕРХ з УФ-детектором ($\lambda = 254$ нм)			
Абсолютні значення		Нормалізовані значення		Абсолютні значення		Нормалізовані значення	
Концентрація варденафілу, нг/мл	площа піку, S	Концентрація варденафілу, нг/мл	площа піку, S	Концентрація варденафілу, нг/мл	площа піку, S	Концентрація варденафілу, нг/мл	площа піку, S
15	147410	7,5	7,499	50	19,65	25	24,785
15	147405	7,5	7,499	50	19,70	25	24,848
15	147400	7,5	7,499	50	19,61	25	24,735
200	1965473	100	100,000	200	79,27	100	99,987
200	1965472	100	100,000	200	79,28	100	100,00
200	1965471	100	99,999	200	79,29	100	100,01
500	4901125	250	249,361	500	198,19	250	249,987
500	4901120	250	249,360	500	198,2	250	250,000
500	4901110	250	249,360	500	198,2	250	250,000

Таблиця 2.37

**Результати вивчення лінійності методики кількісного визначення
варденафілу у розчинах методом ВЕРХ/МС та з УФ-детектором на колонці Zorbax SB-C18**

Величина	ВЕРХ/МС			ВЕРХ з УФ-детектором		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b	0,9997	—	—	1,0008	—	—
Стандартне відхилення s_b	$6,3 \cdot 10^{-4}$	—	—	$3,18 \cdot 10^{-4}$	—	—
Вільний член лінійної залежності a : $ a \leq \Delta_a$ (1), якщо не відповідає, то $ a \leq \frac{0,32 \cdot \Delta_{As} (\%)}{1 - (X \min / 100)}$ (2)	0,119	$\Delta_a = 0,286$ $0,119 \leq 0,286$ (1) $0,119 \leq 1,310$ (2)	Відповідає	-0,169	$\Delta_a = 0,178$ $0,169 \leq 0,178$ (1) $0,169 \leq 2,223$ (2)	Відповідає
Стандартне відхилення s_a	0,098	—	—	0,050	—	—
Залишкове стандартне відхилення s_o , $s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$	0,190	$s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$ $s_o \leq 1,470$	Відповідає	0,089	$s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$ $s_o \leq 1,470$	Відповідає
Максимальна невизначеність аналізу Δ_{As}	3,479	—	—	3,479	—	—
Коефіцієнт кореляції r	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає

Таблиця 2.38

Результати вивчення правильності та прецизійності (на рівні збіжності) методики кількісного визначення силденафілу у розчинах методом ВЕРХ/МС та з УФ-детектором на колонці Zorbax SB-C18

Величина	ВЕРХ/МС			ВЕРХ з УФ-детектором		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Середнє значення для відношення «знайдено/введено» $\bar{Z}$	99,914	—	—	99,719	—	—
Стандартне відхилення для відношення «знайдено/введено» s_z	0,045	—	—	0,154	—	—
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\%$: $\delta\% \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$ (1) , якщо не виконується , $\delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$ (2)	0,086	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}=0,034$ $0,086 \geq 0,034$ (1) $0,086 \leq 1,113$ (2)	Відповідає	0,281	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}=0,118$ $0,281 \geq 0,118$ (1) $0,281 \leq 1,113$ (2)	Відповідає
Однобічний довірчий інтервал Δ_z	0,019	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $\Delta_{As}=3,479$	Відповідає	0,355	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $\Delta_{As}=3,479$	Відповідає

Вільний член «а» статистично не відрізняється від нуля, якщо він не перевищує свій довірчий інтервал Δ_a : $|a| \leq \Delta_a$, $\Delta_a = t(95\%, n-2) \cdot S_a$. Якщо перший критерій не виконується, то використовують критерій практичної незначущості для вільного члена: $|a| \leq (0,32 \cdot \Delta_{As} (\%)) / (1 - (X_{\min}/100))$, де $X_{\min}$ – мінімальна концентрація для діапазону, в якому валідується методика аналізу [6].

При аналізі силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ вільний член «а» відповідає за обома критеріями, тому розроблені методики є лінійними.

При перевірці методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах методом ВЕРХ визначено правильність за критерієм практичної незначущості. Оскільки систематична похибка не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу ($\delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$), то в обох випадках можна стверджувати, що систематична похибка не буде впливати на правильність результатів.

Оскільки однобічний довірчий інтервал Δ_z не перевищує максимально припустимої невизначеності аналізу Δ_{As} силденафілу та варденафілу, запропоновані методики характеризуються достатньою прецизійністю (на рівні збіжності) в усьому діапазоні зазначених концентрацій.

Розроблені методики можуть використовуватись для кількісного визначення силденафілу та варденафілу, виділених з біологічних об'єктів.

2.6.4 Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18

Здатність варденафілу до природньої флуоресценції була використана нами при розробці умов ідентифікації та кількісного визначення цієї сполуки методом ВЕРХ з флуоресцентною детекцією.

Умови хроматографічного аналізу.

Хроматографічний аналіз проводили на колонці LUNA[®] C18 (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Даний тип колонки відноситься до обернено-фазових колонок

і дозволяє проводити ефективне розділення як полярних, так і неполярних сполук. Також вона характеризується високою продуктивністю та роздільною здатністю. Температура колонки в робочому стані 25 °C.

Хроматографічний аналіз проведено на рідинному хроматографі Thermo Dionex Ultimate 3000 UHPLC, обладнаному вакуумним насосом UltiMate 3000 RS pump та автосемплером UltiMate 3000 RS (Dionex, Switzerland).

В рухомих фазах використано ацетонітрил та ортофосфатну кислоту кваліфікації «для ВЕРХ», з вмістом діючої речовини $\geq 99,9\%$; триетиламін кваліфікації «для ВЕРХ», з вмістом діючої речовини $\geq 99,5\%$. Для виготовлення розчинів триетиламіну та ортофосфатної кислоти використовували бідистильовану воду, яку додатково очищували за допомогою H131450 Millipore Milli-Q Plus Water Purification System ZD 5211584.

Склад рухомої фази: ацетонітрил – 0,5 % водний розчин триетиламіну (30:70), pH = 3,0. Необхідне значення pH рухомої фази створювали, використовуючи для підкислення 0,1 М розчин ортофосфатної кислоти.

Рухому фазу подавали в ізократному режимі із швидкістю 1 мл/хв. Об'єм введеної проби – 5 мкл. Тривалість аналізу – 30 хв.

Детекцію варденафілу в аналізованих пробах проводили з допомогою УФ-детектора моделі UV-VIS-DAD (в діапазоні 190-350 нм) та флуоресцентного детектора (FLD) моделі Dionex Ultimate 3000.

При УФ-детекції $\lambda = 214$ нм, при флуоресцентній детекції $\lambda_{36} = 285$ нм, а $\lambda_{\text{випр}} = 450$ нм.

На рисунку 2.20 наведено хроматограми варденафілу на колонці LUNA[®] C18 із двома способами детектування, а УФ-спектр – на рисунку 2.21.

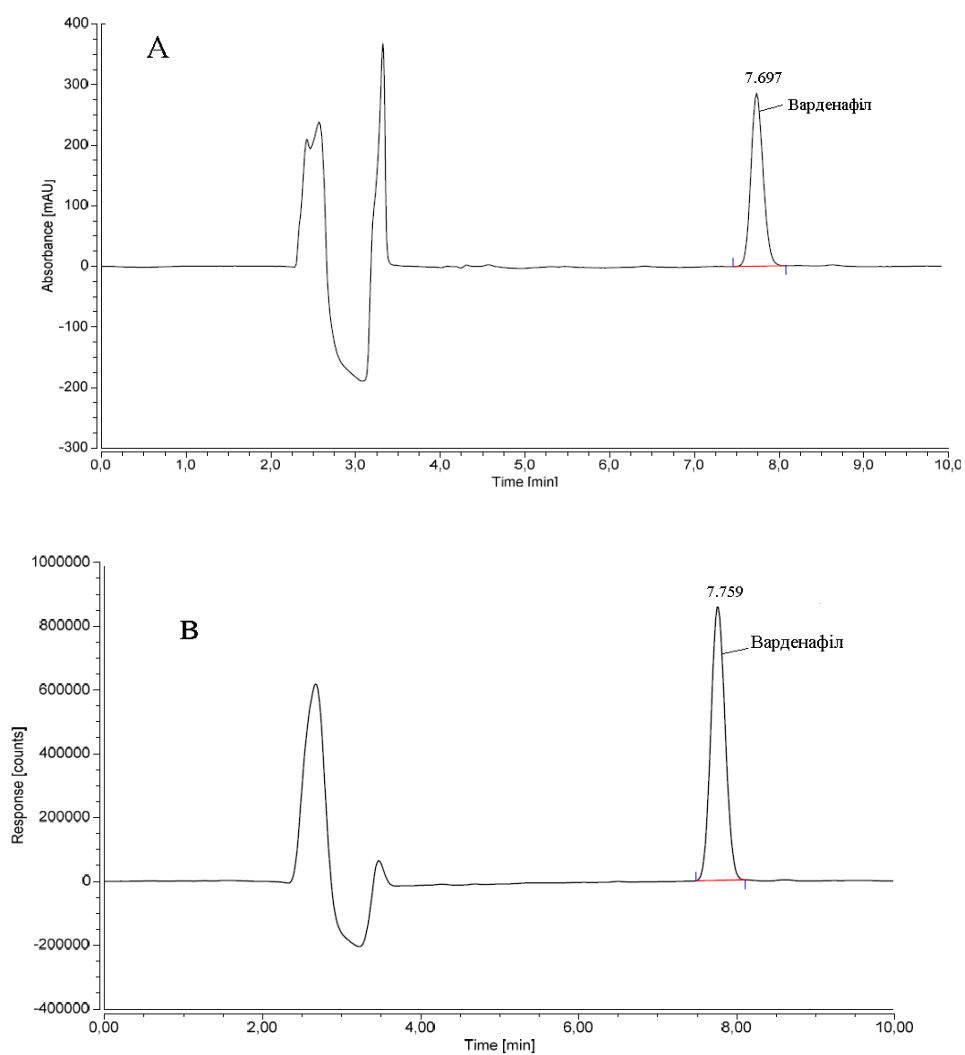


Рис. 2.20 Хроматограми варденафілу на колонці LUNA[®] C18 з використанням УФ-детектора (концентрація варденафілу 10 мкг/мл, А) та флуоресцентного детектора (концентрація варденафілу 1 мкг/мл, В)

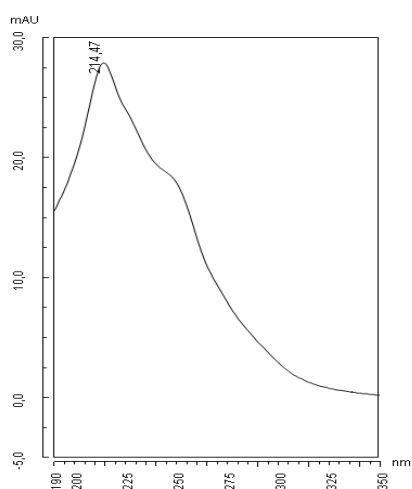


Рис. 2.21 УФ-спектр варденафілу отриманий при проведенні ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18 (10 мкг/мл)

Ідентифікацію варденафілу проводили за часом утримування ($t_{абс}$). Придатність хроматографічної системи для аналізу варденафілу визначали за коефіцієнтом симетрії піку (A_s) і коефіцієнтом ємності (k).

Обробку результатів аналізу проводили за допомогою програмного забезпечення Chromeleon® Chromatography Data System Software (Version 7.2.0.3765), виробник – Thermo Fisher Scientific.

Хроматографічні параметри варденафілу на колонці LUNA® C18, отримані при аналізі 10 проб варденафілу з різними детекторами, представлено в таблиці 2.39.

Таблиця 2.39

**Основні хроматографічні параметри варденафілу
на колонці LUNA® C18**

Хроматографічна характеристика	Значення	
	при детекції UV-DAD ($\lambda=214$ нм)	при флуоресцентній детекції ($\lambda_{зб}/\lambda_{ем}=285/450$ нм)
Час утримування, $t_{абс}$, хв	7,697 $\pm$ 0,09	7,759 $\pm$ 0,06
Об'єм утримування $V_{абс}$, мл	7,697	7,759
Коефіцієнт ємності	2,07	2,08
Коефіцієнт асиметрії	1,08	1,07
Число теоретичних тарілок (N)	13950	13985
Число теоретичних тарілок на 1 м колонки	55800	55940
Висота, еквівалентна теоретичній тарілці [BETT], (мм)	0,018	0,018
Межа виявлення	0,1 мкг/мл	1 нг/мл

Наведені в таблиці 2.39 дані свідчать, що при обох способах детектування коефіцієнти асиметрії піку і коефіцієнти ємності піку варденафілу на колонці LUNA® C18 є практично однаковими, що вказує на оптимальність розроблених умов хроматографування та селективність методики.

2.6.5 Кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18

В розділі 2.6.1 нами розроблені умови ідентифікації варденафілу методом ВЕРХ з використанням УФ- та флуоресцентного детектора на колонці LUNA[®] C18. Ці ж умови хроматографічного розділення використовували для кількісного визначення варденафілу даним методом.

Виготовлення стандартних розчинів варденафілу.

Метанольний стандартний розчин варденафілу із концентрацією 1 мг/мл, готували аналогічно, як описано в розділі 2.6.1 (розчин А).

Із стандартних розчинів А готували стандартні розчини варденафілу із вмістом 50 мкг/мл, 1 мкг/мл та 0,5 мкг/мл.

Для виготовлення стандартного **розчину В** з концентрацією 50 мкг/мл, 500 мкл розчину А вносили в мірну колбу місткістю 10.0 мл і доводили метанолом до позначки.

Розчин варденафілу із концентрацією 1,0 мкг/мл готували у мірних колбах місткістю 10.0 мл, для чого 200 мкл розчину В переносили у колбу і доводили метанолом до позначки (**розчин С**).

Для виготовлення стандартного **розчину D** 100 мкл розчину В переносили у колбу на 10.0 мл і доводили метанолом до позначки, концентрація варденафілу в отриманому розчині становила 500 нг/мл.

Для встановлення значень LOD і LOQ варденафілу при УФ-детектуванні готували по п'ять паралельних серій розчинів цього препарату в межах концентрацій 0,5-100 мкг/мл, а при флуоресцентному детектуванні готували аналогічну кількість серій робочих розчинів в межах концентрацій 2 - 500 нг/мл.

Виготовлення серії робочих розчинів варденафілу для ВЕРХ з УФ-детектуванням.

В мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 20 і 100 мкл розчину В та по 50; 100; 200; 500; 800 і 1000 мкл стандартного розчину А. Об'єми розчинів

доводили метанолом до мітки. В серії робочих розчинів концентрація варденафілу становила 0,1; 0,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 80,0 і 100,0 мкг/мл.

Виготовлення серії робочих розчинів варденафілу для ВЕРХ з флуоресцентним детектуванням.

В мірні колби місткістю 10.0 мл вносили по 20; 40 і 200 мкл стандартного розчину D, по 500 і 1000 мкл стандартного розчину C та по 40; 60 і 100 мкл стандартного розчину B. Об'єми розчинів в колбах доводили метанолом до позначки. Концентрація варденафілу у серії виготовлених робочих розчинів становила 1; 2; 10; 50; 100; 200; 300 та 500 нг/мл.

Серії виготовлених розчинів піддавали хроматографічному аналізу з відповідним детектором.

Об'єм введеної проби – 5 мкл.

Межу виявлення варденафілу (LOD) методом ВЕРХ на хроматограмах визначали за співвідношенням сигнал-шум 3:1, а межу кількісного визначення (LOQ) за співвідношенням 5:1.

Застосовуючи метод найменших квадратів, розраховували рівняння регресії, які описують залежність між площею піку та концентрацією варденафілу в пробі.

Залежність значень площ піків варденафілу від його концентрації у розчині при використанні флуоресцентного детектора та при УФ-детектуванні наведено в таблиці 2.40.

Таблиця 2.40

**Залежність площ хроматографічних піків від концентрації
варденафілу у розчині на колонці LUNA® C18 (n=5)**

УФ-детектор		Флуоресцентний детектор	
Концентрація варденафілу у розчині, мкг/мл	Площа піку варденафілу, $S_{сер}$	Концентрація варденафілу у розчині, нг/мл	Площа піку варденафілу, $S_{сер}$
1	2	3	4
0,5	0,137	2	305,533
5	1,383	10	1572,665

Продовж. табл. 2.40

1	2	3	4
10	2,765	50	7864,280
20	5,444	100	15727,750
50	13,825	200	31252,250
80	22,130	300	47183,250
100	27,640	500	78642,800

Рівняння регресії для кількісного визначення варденафілу в даних умовах аналізу з УФ-детекцією в межах концентрацій від 0,5 до 100 мкг/мл, описується залежністю $Y = 0,277 \cdot X - 0,018$ ($r = 0,9999$). Для кількісного визначення варденафілу з флуоресцентним детектором, в межах концентрацій від 2 до 500 нг/мл, рівняння регресії описується залежністю $Y = 157,257 \cdot X - 26,289$ ($r = 0,9999$). В обох рівняннях Y – площа піку, X – концентрація варденафілу (мкг/мл або нг/мл відповідно до способу детектування). Градувальні графіки залежності площі піку варденафілу від його концентрації в розчині представлені на рисунку 2.22.

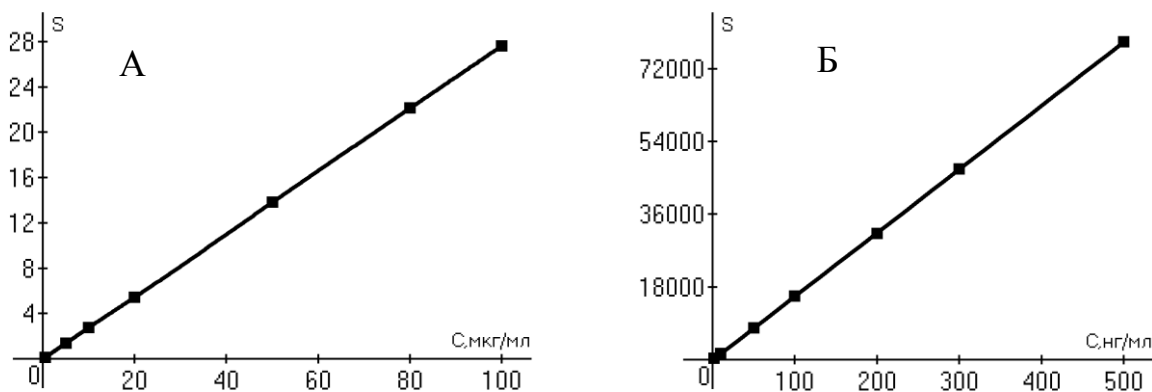


Рис. 2.22 Градувальні графіки кількісного визначення варденафілу методом ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18: А – з використанням УФ-детектора (0,5-100 мкг/мл); Б – з флуоресцентним детектором (2-500 нг/мл)

Параметри лінійної залежності рівнянь регресій, розрахованих методом найменших квадратів, для кількісного визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектуванням представлено в таблиці 2.41.

Таблиця 2.41

**Статистичні параметри лінійності для кількісного визначення
варденафілу методом ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18 (n = 5, P = 95 %)**

Детектор	Коефіцієнти		Довірчі інтервали коефіцієнтів		Коефіцієнт кореляції (r)	Інтервал лінійності
	a	b	Δa	Δb		
УФ-детектор	0,277	-0,018	$4,979 \cdot 10^{-2}$	$9,450 \cdot 10^{-4}$	0,9999	0,5-100 мкг/мл
Флуоресцентний детектор	157,256	26,289	$4,443 \cdot 10^1$	$1,876 \cdot 10^{-1}$	0,9999	2-500 нг/мл

Межа виявлення (LOD) варденафілу при ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18 з УФ-детектуванням – 0,1 мкг/мл, а з використанням флуоресцентного детектора – 1 нг/мл.

Межа кількісного визначення (LOQ) варденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ на даній колонці при УФ-детектуванні становить 0,5 мкг/мл, а при використанні флуоресцентного детектора – 2,0 нг/мл.

Кількісне визначення варденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ з УФ-детектором на колонці LUNA[®] C18. Для цього готували серію модельних розчинів з концентраціями 0,5; 10,0; 50,0; 80,0 та 100 мкг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градувального графіку.

Кількісне визначення варденафілу в модельних розчинах методом ВЕРХ з флуоресцентним детектором на колонці LUNA[®] C18. Готували серію модельних розчинів з концентраціями 2,0; 10,0; 50,0; 100,0; 200 та 500 нг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градувального графіку.

Проведено п'ять вимірювань для кожного рівня концентрації варденафілу. Вміст препарату в пробах визначали за допомогою рівнянь градувальних графіків.

Результати кількісного визначення варденафілу в розчинах та їх статистичну обробку наведено в таблиці 2.42.

Таблиця 2.42

**Результати кількісного визначення варденафілу в
модельних розчинах методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним
детектором на колонці LUNA[®] C18 (n = 5, P = 95%)**

Тип детектора	Концентрація взятого препарату	Знайдено препарату		Метрологічні характеристики
		мкг/мл або нг/мл	%	
УФ-детектор	5 мкг/мл	4,90 мкг/мл	98,0	$\bar{X} = 99,14$ $S = 0,93$ $S \bar{x} = 0,42$ $RSD_x = 0,94$ $\Delta X = \pm 1,15$ $\varepsilon = 1,16 \%$
	10 мкг/мл	9,83 мкг/мл	98,3	
	50 мкг/мл	49,75 мкг/мл	99,5	
	80 мкг/мл	79,92 мкг/мл	99,9	
	100 мкг/мл	100,0 мкг/мл	100,0	
Флуоресцентний детектор	2 нг/мл	1,97 нг/мл	98,5	$\bar{X} = 99,37$ $S = 0,73$ $S \bar{x} = 0,30$ $RSD_x = 0,73$ $\Delta X = \pm 0,76$ $\varepsilon = 0,77 \%$
	10 нг/мл	9,85 нг/мл	98,5	
	50 нг/мл	49,65 нг/мл	99,3	
	100 нг/мл	99,9 нг/мл	99,9	
	200 нг/мл	200,0 нг/мл	100	
	500 нг/мл	500,15 нг/мл	100,03	

Як видно з даних, наведених в таблиці 2.42, результати кількісного визначення варденафілу в розчинах методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектором на колонці LUNA[®] C18 знаходяться в межах довірчого інтервалу. Відносна похибка кількісного визначення при УФ-детектуванні складає 1,16 %, а при використанні флуоресцентного детектора – 0,77 %.

**2.6.6 Валідація методики кількісного визначення варденафілу в модельних
розчинах методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектором
на колонці LUNA[®] C18**

Проведена валідація методик кількісного визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектором на колонці LUNA[®] C18.

Для проведення валідації методики кількісного визначення з УФ-детектуванням використовували стандартні розчини варденафілу в метанолі із концентраціями 1 мг/мл та 50 мкг/мл, з яких готували по три серії розчинів із концентраціями 0,5, 50 та 100 мкг/мл. Для проведення валідації методики кількісного визначення варденафілу з флуоресцентним детектуванням використовували стандартні розчини варденафілу в метанолі із концентраціями 1 мкг/мл та 500 нг/мл, з яких готували по три серії розчинів із концентраціями 2, 200 та 500 нг/мл. Отримані розчини аналізували за методиками, описаними в розділах 2.6.4 та 2.6.5.

Згідно ДФУ 2.0 [6] розрахунки валідаційних критеріїв проводили у нормалізованих координатах. Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій та площ піків варденафілу наведено в таблиці 2.43. Показники лінійності, правильності та прецизійності методик кількісного визначення варденафілу у розчинах методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектуванням на колонці LUNA[®] C18 представлено в таблицях 2.44 і 2.45.

Для перевірки лінійності оцінювали значення вільного члену «а» за двома критеріями: критерій статистичної незначущості та критерій практичної незначущості.

Вільний член «а» статистично не відрізняється від нуля якщо він не перевищує свій довірчий інтервал Δa : $|a| \leq \Delta a$, $\Delta a = t(9\%, n-2) \cdot S_a$. Якщо перший критерій не виконується, то використовують критерій практичної незначущості для вільного члена: $|a| \leq (0,32 \cdot \Delta_{As} (\%)) / (1 - (X_{\min}/100))$, де $X_{\min}$ – мінімальна концентрація для діапазону, в якому валідується методика аналізу [6].

При аналізі варденафілу методом ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18 при обох способах детектування вільний член «а» відповідає за обома критеріями, тому розроблені методики є лінійними.

При перевірці методики кількісного визначення варденафілу у розчинах методом ВЕРХ визначено правильність за критерієм практичної незначущості.

Таблиця 2.43

**Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій та площ піків варденафілу при аналізі методом ВЕРХ з
УФ- та флуоресцентним детектуванням на колонці LUNA® C18**

ВЕРХ з УФ-детектором				ВЕРХ з флуоресцентним детектором			
Абсолютні значення		Нормалізовані значення		Абсолютні значення		Нормалізовані значення	
концентрація мкг/мл	площа піку, S	концентрація мкг/мл	площа піку, S	концентрація нг/мл	площа піку, S	концентрація нг/мл	площа піку, S
0,5	0,137	1	0,991	2	305,540	1,0	0,978
0,5	0,136	1	0,984	2	305,5310	1,0	0,978
0,5	0,138	1	0,998	2	305,529	1,0	0,978
50	13,824	100	99,993	200	31252,240	100	99,999
50	13,825	100	100,000	200	31252,250	100	100,000
50	13,826	100	100,007	200	31252,260	100	100,000
100	27,639	200	199,928	500	78642,620	250	251,638
100	27,641	200	199,934	500	78642,880	250	251,639
100	27,640	200	199,928	500	78642,900	250	251,639

Таблиця 2.44

**Результати вивчення лінійності методики кількісного визначення
варденафілу у розчинах методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектуванням на колонці LUNA® C18**

Величина	ВЕРХ з УФ-детектором			ВЕРХ з флуоресцентним детектором		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b	0,9997	—	—	1,0070	—	—
Стандартне відхилення s_b	0,2000	—	—	0,0011	—	—
Вільний член лінійної залежності a: $ a \leq \Delta_a$ (1), якщо не відповідає, то $ a \leq \frac{0,32 \cdot \Delta_{As} (\%)}{1 - (X \min / 100)}$ (2)	0,0115	$\Delta_a = 0,040$ $0,0115 \leq 0,0400$ (1) $0,0115 \leq 0,7330$ (2)	Відповідає	-0,2818	$\Delta_a = 0,3249$ $0,2818 \leq 0,3249$ (1) $0,2818 \leq 0,8884$ (2)	Відповідає
Стандартне відхилення s_a	0,0210	—	—	0,1715	—	—
Залишкове стандартне відхилення s_o , $s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$	0,1250	$s_o \leq 0,966$	Відповідає	0,3740	$s_o \leq 1,165$	Відповідає
Максимальна невизначеність аналізу Δ_{As}	2,281	—	—	2,750	—	—
Коефіцієнт кореляції r	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає

Таблиця 2.45

Результати вивчення правильності та прецизійності (на рівні збіжності) методики кількісного визначення варденафілу у розчинах методом ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектуванням на колонці LUNA® C18

Величина	ВЕРХ з УФ-детектором			ВЕРХ з флуоресцентним детектором		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Середнє значення для відношення «знайдено/введено» $\bar{Z}$	99,871	—	—	99,631	—	—
Стандартне відхилення для відношення «знайдено/введено» s_z	0,105	—	—	0,269	—	—
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\%$: $\delta\% \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$ (1), якщо не виконується, $\delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$ (2)	0,129	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = 0,080$; $0,129 \geq 0,080$ (1) $0,129 \leq 0,730$ (2)	Відповідає	0,369	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = 0,207$ $0,369 \geq 0,207$ (1) $0,369 \leq 0,880$ (2)	Відповідає
Однобічний довірчий інтервал Δ_z	0,241	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $\Delta_{As} = 2,281$	Відповідає	0,620	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $\Delta_{As} = 2,750$	Відповідає

Оскільки систематична похибка не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу: $\delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{\Delta_s}$, то в обох випадках аналізу можна стверджувати, що систематична похибка не буде впливати на правильність результатів.

Оскільки однобічний довірчий інтервал Δ_z не перевищує максимально припустимої невизначеності аналізу Δ_{Δ_s} варденафілу, запропоновані методики характеризуються достатньою прецизійністю (на рівні збіжності) в усьому діапазоні зазначених концентрацій.

Розроблені методики можуть використовуватись для кількісного визначення варденафілу, виділеного з біологічних об'єктів.

2.7 Ідентифікація та кількісне визначення силденафілу методом ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ)

2.7.1 Ідентифікація силденафілу методом УВЕРХ

Метод УВЕРХ достатньо широко використовується протягом останніх 30-ти років. Принцип методу розділення в УВЕРХ такий же, як і у ВЕРХ, тільки в цьому методі використовуються колонки з розміром частинок сорбенту до 2 мкм (найчастіше 1,8 мкм), щоб значно збільшити пропускну та роздільну здатність колонки в порівнянні із звичайними частинками з розміром до 5 мкм. УВЕРХ відноситься до експресних та високопродуктивних методів аналізу, оскільки суттєво скорочується тривалість аналізу (до 2-3 хв) [45, 88, 170].

Метод УВЕРХ рядом авторів використано для визначення силденафілу та варденафілу в дієтичних добавках та крові [50, 52, 173].

Проте, в літературних джерелах не описані методики визначення силденафілу цим методом в біологічних тканинах та сечі, не вивчено вплив залишків біологічної проби на результат визначення вмісту силденафілу.

Нашим завданням була розробка біоаналітичної методики визначення силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС, яка була б придатна для використання в токсикологічних та судово-хімічних дослідженнях даного препарату в біологічних пробах.

Умови аналізу силденафілу методом УВЕРХ.

Дослідження проводили на хроматографі Waters, система ACQUITY UPLC H-Classsystem: модель UPLC/MS/MS, на колонці ВЕН C18 (2,1 × 50 мм, 1,7 мкм). Для детектування використовували квадрупольний мас-детектор AcquityeLambda PDA.

Склад рухомої фази: 0,1 % водний розчин форміатної кислоти (розчин А), ацетонітрил (розчин В). Співвідношення між об'ємами розчинів А та В у рухомій фазі протягом аналізу наступні: перші 60 сек – 75:25; наступні 60 сек – 40:60; і останні 60 сек – 75:25. Загальний час аналізу – 3 хв. Рухома фаза подається в лінійному градієнтному режимі, зі швидкістю 0,5 мл/хв.

Аналіз здійснюється в режимі позитивної електронної іонізації. Напруга на капілярі – 2 кВ, температура джерела іонів – 120 °С, температура десольвації – 400 °С, швидкість потоку газу десольвації – 800 л/год, витрата газу на конусі – 25 л/год. MRM моніторинг проводився за масами утворених в ході аналізу іонів силденафілу 475 → 311 m/z і 475 → 58 m/z. УФ-спектральний аналіз проводився в діапазоні 205-350 нм, детектування здійснювали при цьому світлодіодним УФ-детектором при 293 нм.

Об'єм введеної проби 10 мкл.

Для перевірки правильності вибору умов хроматографування визначали коефіцієнти ємності та симетрії піку силденафілу. Хроматографічні параметри для аналізу силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС та з УФ-детектуванням представлено в таблиці 2.46, а хроматограми, отримані в результаті проведення аналізу, представлено на рисунку 2.23.

Таблиця 2.46

**Хроматографічні параметри для аналізу силденафілу методом
УВЕРХ/МС/МС та з УФ-детектуванням**

Мас-детекція				УФ-детекція			
Коефіцієнти		t_R , хв	V_R , мл	Коефіцієнти		t_R , хв	V_R , мл
симетрії	ємності			симетрії	ємності		
1,01	3,88	$1,69 \pm 0,03$	0,87	0,98	4,32	$1,83 \pm 0,04$	0,92

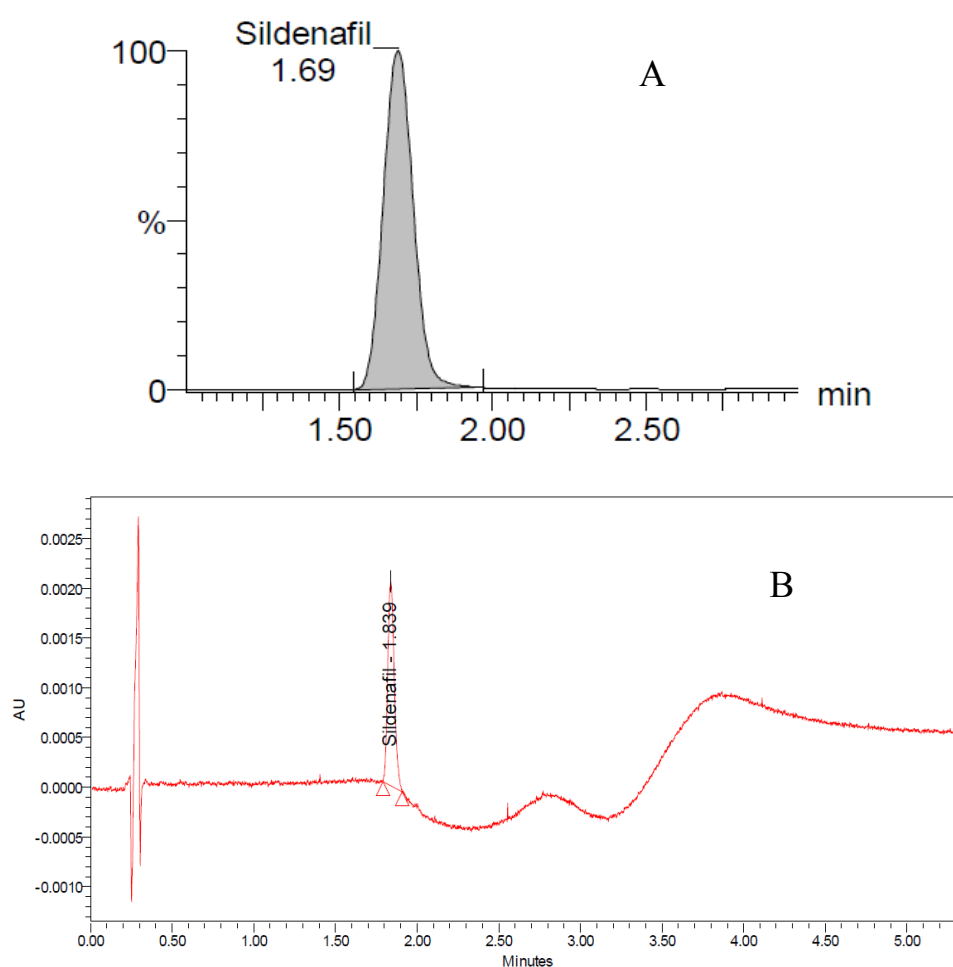


Рис. 2.23 Хроматограми силденафілу на колонці ВЕН C18: А – з мас-спектрометром, В – з УФ-детекцією (концентрація силденафілу 1 мкг/мл)

З наведених в таблиці 2.46 даних видно, що піки силденафілу при обох способах детектування є симетричними, оскільки коефіцієнт симетрії приблизно рівний 1. Оскільки значення коефіцієнтів ємності та симетрії піку силденафілу практично однакові в обох випадках, це вказує на оптимальність розроблених умов.

Ідентифікували силденафіл в пробах за абсолютним часом утримування. При використанні мас-спектрометра в даних умовах абсолютний час утримування становить $1,69 \pm 0,03$ хв.

Мас-спектр силденафілу характеризується сигналами при 47, 55, 58, 85, 99, 283, 311, 404 і 475 m/z.

При проведенні УФ-детектування абсолютний час утримування становить $1,839 \pm 0,04$ хв.

2.7.2 Кількісне визначення силденафілу методом УВЕРХ

В розділі 2.7.1 нами опрацьовано умови ідентифікації силденафілу методом УВЕРХ з використанням мас-спектрометра та з УФ-детектуванням. Ці ж умови хроматографічного розділення використовували для кількісного визначення силденафілу даним методом.

Виготовлення стандартних розчинів силденафілу.

Метанольний стандартний розчин силденафілу із концентрацією 1 мг/мл, готували аналогічно, як описано в розділі 2.6.1 (розчин А). Із стандартного розчину А готували стандартні розчини силденафілу із вмістом 10 мкг/мл та 1 мкг/мл. Для виготовлення розчину із концентрацією силденафілу 10 мкг/мл, 100 мкл стандартного розчину А вносили у мірну колбу місткістю 10.0 мл та доводили метанолом до позначки (розчин В). Для виготовлення стандартного розчину із концентрацією силденафілу 1 мкг/мл, 1000 мкл стандартного розчину В вносили у мірну колбу місткістю 10.0 мл та доводили метанолом до позначки (розчин С).

Для встановлення значень LOD і LOQ силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС готували по п'ять паралельних серій розчинів цього препарату в межах концентрацій 3,0-500 нг/мл; а при УФ- детектуванні – в межах концентрацій 6,0-500 нг/мл.

Виготовлення серії робочих розчинів силденафілу для УВЕРХ/МС/МС.

В ряд мірних колб на 10.0 мл вносили по 20; 30; 500 і 1000 мкл розчину С та по 200; 300 і 500 мкл розчину В та доводили метанолом до мітки. Отримали розчини силденафілу з концентраціями 2; 3; 20; 50; 100; 200; 300 та 500 нг/мл відповідно.

Виготовлення серії робочих розчинів силденафілу для УВЕРХ з УФ-детектуванням.

В ряд мірних колб на 10.0 мл вносили по 50; 60; 200; 500 і 1000 мкл розчину С та 200; 300 і 500 мкл розчину В та доводили метанолом до мітки. Отримали розчини силденафілу з концентраціями 5; 6; 20; 50; 100; 200; 300 та 500 нг/мл відповідно.

Кожну серію розчинів аналізували застосовуючи два способи детектування.

Об'єм введеної проби становив 10 мкл.

Межу виявлення силденафілу (LOD) методом УВЕРХ на хроматограмах визначали за співвідношенням сигнал-шум 3:1, а межу кількісного визначення (LOQ) за співвідношенням 5:1.

Залежність значень площ піків варденафілу від його концентрації в розчині при використанні мас-спектрометра та при УФ-детектуванні наведено в таблиці 2.47.

Градувальні графіки залежності площ піків силденафілу від його концентрації в розчині, у відповідності із способом детектування, представлено на рисунку 2.24.

Таблиця 2.47

**Залежність між площею піку та концентрацією силденафілу
при аналізі методом УВЕРХ (n=5)**

Мас-спектрометр		УФ- детектор	
Концентрація силденафілу у розчині, нг/мл	Площа піку силденафілу, $S_{\text{сер}}$	Концентрація силденафілу у розчині, нг/мл	Площа піку силденафілу, $S_{\text{сер}}$
3	32,769	6	170,573
20	219,394	20	582,530
50	548,486	50	1430,200
100	1099,431	100	2856,500
200	2193,944	200	5713,250
300	3290,917	300	8572,630
500	5485,9972	500	14276,153

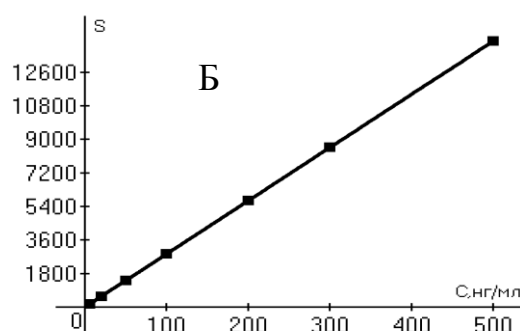
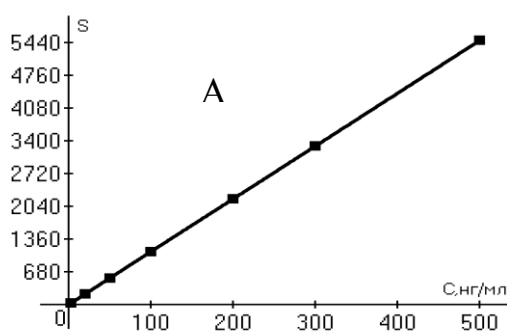


Рис. 2.24 Градувальні графіки кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ: А – з використанням мас-спектрометра (в діапазоні 3,0-500 нг/мл); Б – з УФ-детектором (в діапазоні

Застосовуючи метод найменших квадратів розраховували рівняння регресії, які описують залежність між площею піку та концентрацією силденафілу в пробі.

Рівняння регресії для кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС в межах концентрацій від 3 до 500 нг/мл, описується залежністю $Y = 10,971 \cdot X + 0,296$ ($r = 0,9999$), а для кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ з УФ-детектором ($\lambda = 293$ нм) в межах

концентрацій від 6 до 500 нг/мл, описується залежністю $Y = 28,547 \cdot X + 4,304$ ($r = 0,9999$), де: Y – площа піку, X – концентрація силденафілу, нг/мл.

Параметри лінійної залежності рівнянь регресій, розрахованих методом найменших квадратів для кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС та УВЕРХ/УФ, представлено в таблиці 2.48.

Таблиця 2.48

**Статистичні параметри лінійності для кількісного визначення
силденафілу при аналізі методом УВЕРХ (n = 5, P = 95 %)**

Детектор	Коефіцієнти		Довірчі інтервали коефіцієнтів		Коефіцієнт кореляції (r)	Інтервал лінійності, нг
	a	b	Δa	Δb		
Мас-спектрометр	10,971	0,296	0,493	0,002	0,9999	3-500
УФ-детектор	28,547	4,304	2,211	0,009	0,9999	6-500

Межа виявлення силденафілу методом УВЕРХ становить 2 нг/мл при використанні мас-спектрометра і 5 нг/мл при використанні УФ-детектора.

Межа кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС становить 3 нг/мл, а при УФ-детектуванні – 6 нг/мл.

Кількісне визначення силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС.

Для кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС готували серію модельних розчинів з концентраціями 3; 20; 50; 100; 200 та нг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу такі ж, що й при побудові градуовального графіку.

Кількісне визначення силденафілу методом УВЕРХ з УФ-детектором.

Для кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ з УФ-детектором готували серію модельних розчинів з концентраціями 6; 20; 50; 100; 200 та нг/мл. Методика приготування розчинів та умови аналізу ті ж, що й при побудові градуовального графіку.

Вміст силденафілу в пробах визначали за відповідними рівняннями регресій.

Результати кількісного визначення силденафілу в розчинах та їх статистичну обробку наведено в таблиці 2.49.

Таблиця 2.49

Результати кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах при аналізі методом УВЕРХ (n = 5, P = 95%)

Тип детектора	Концентрація взятого препарату, нг/мл	Знайдено препарату		Метрологічні характеристики
		нг/мл	%	
Мас-спектрометр	3,0	2,98	99,2	$\bar{X} = 99,67$
	20,0	19,84	99,2	$S = 0,43$
	50,0	49,75	99,5	$S \bar{x} = 0,18$
	100,0	99,90	99,9	$RSD_x = 0,43$
	200,0	200,04	100,02	$\Delta X = \pm 0,45$
	500,0	501,00	100,20	$\varepsilon = 0,45 \%$
УФ-детектор	6,0	5,99	99,3	$\bar{X} = 99,93$
	20,0	19,90	99,5	$S = 0,47$
	50,0	49,90	99,8	$S \bar{x} = 0,19$
	100,0	100,20	100,20	$RSD_x = 0,47$
	200,0	200,80	100,4	$\Delta X = \pm 0,50$
	500,0	502,00	100,4	$\varepsilon = 0,50 \%$

Дані, які наведені в таблиці 2.49, свідчать про те, що результати кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах методом УВЕРХ/МС/МС та з УФ-детектором на колонці ВЕН C18 знаходяться в межах довірчого інтервалу. Відносна похибка кількісного визначення при аналізі УВЕРХ/МС/МС складає 0,45 %, а при УВЕРХ/УФ – 0,50 %.

2.7.3 Валідація методики кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах методом УВЕРХ/МС/МС та з УФ-детектором

Проведена валідація методик кількісного визначення силденафілу в модельних розчинах методом УВЕРХ/МС/МС та з УФ-детектором. Для проведення валідації методики кількісного визначення використовували стандартні розчини силденафілу в метанолі із концентраціями 10 мкг/мл та 1 мкг/мл. Зі стандартних розчинів готували по три серії розчинів із концентраціями, які відповідали нижній, середній та найвищій концентрації препарату, які можна визначити вказаним методом.

При проведенні детектування мас-спектрометром готували розчини силденафілу з концентраціями 3, 200 та 500 нг/мл, а при використанні УФ-детектора – з концентраціями 6, 200 та 500 нг/мл, які аналізували за методиками, описаними в розділах 2.7.1 та 2.7.2.

Згідно ДФУ 2.0 [6] розрахунки валідаційних критеріїв проводили у нормалізованих координатах. Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій та площ піків силденафілу наведено в таблиці 2.50. Показники лінійності, правильності та прецизійності методик кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС та з УФ-детектором представлено в таблицях 2.51 та 2.52.

Для перевірки лінійності оцінювали значення вільного члену «а» за двома критеріями: критерій статистичної незначущості та критерій практичної незначущості. Як видно з даних, наведених в таблиці 2.51, методика є лінійною, оскільки значення вільного члену «а» відповідає двом критеріям: статистичної та практичної незначущості.

Правильність також оцінювали за критерієм статистичної незначущості та критерієм практичної незначущості. Оскільки $\delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$, то можна стверджувати, що систематична похибка не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу і не має значного впливу на його результати.

Таблиця 2.50

**Абсолютні та нормалізовані значення концентрацій і площ піків силденафілу у розчинах при аналізі
методом УВЕРХ**

УВЕРХ/МС/МС				УВЕРХ з УФ-детектором			
Абсолютні значення		Нормалізовані значення		Абсолютні значення		Нормалізовані значення	
концентрація нг/мл	площа піку, S	концентрація нг/мл	площа піку, S	концентрація нг/мл	площа піку, S	концентрація нг/мл	площа піку, S
3	32,658	1,5	1,489	6	169,920	3	2,974
3	32,765	1,5	1,493	6	170,950	3	2,992
3	32,885	1,5	1,498	6	170,850	3	2,990
200	2193,944	100	99,999	200	5713,250	100	100,000
200	2193,944	100	100,000	200	5713,260	100	100,000
200	2193,944	100	100,000	200	5713,240	100	99,999
500	5486,444	250	250,072	500	14276,000	250	249,875
500	5485,990	250	250,051	500	14276,310	250	249,881
500	5485,557	250	250,032	500	14276,150	250	249,877

Таблиця 2.51

Результати вивчення лінійності методики кількісного визначення силденафілу у розчинах методом УВЕРХ

Величина	УВЕРХ/МС/МС			УВЕРХ з УФ-детектором		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b	1,0002	—	—	0,9995	—	—
Стандартне відхилення s _b	8,022·10 ⁻⁵	—	—	3,18·10 ⁻⁴	—	—
Вільний член лінійної залежності a: $ a \leq \Delta a$ (1), якщо не відповідає, то $ a \leq \frac{0,32 \cdot \Delta A_s (\%)}{1 - (X \min / 100)}$ (2)	-0,0134	$\Delta a = 0,0315$ $0,0134 \leq 0,0315$ (1) $0,0134 \leq 1,147$ (2)	Відповідає	0,0096	$\Delta a = 0,0676$ $0,0096 \leq 0,0676$ (1) $0,0096 \leq 1,184$ (2)	Відповідає
Стандартне відхилення s _a	0,0125	—	—	0,0494	—	—
Залишкове стандартне відхилення s _o , $s_o \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$	0,025	$s_o \leq 1,470$	Відповідає	0,097	$s_o \leq 1,470$	Відповідає
Максимальна невизначеність аналізу Δ_{As}	3,479	—	—	3,479	—	—
Коефіцієнт кореляції r	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає	0,9999	$r \geq 0,9999$	Відповідає

Таблиця 2.52

Результати вивчення правильності та прецизійності (на рівні збіжності) методики кількісного визначення силденафілу у розчинах методом УВЕРХ

Величина	УВЕРХ/МС/МС			УВЕРХ з УФ-детектором		
	Значення	Критерій	Висновок	Значення	Критерій	Висновок
Середнє значення для відношення «знайдено/введено» $\bar{Z}$	99,865	—	—	99,823	—	—
Стандартне відхилення для відношення «знайдено/введено» s_z	0,098	—	—	0,099	—	—
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\%$: $\delta\% \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$ (1), якщо не виконується: $\delta\% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$ (2)	0,135	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = 0,025$ $0,135 \geq 0,025$ (1) $0,135 \leq 1,113$ (2)	Відповідає	0,177	$\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = 0,077$ $0,177 \geq 0,077$ (1) $0,177 \leq 1,113$ (2)	Відповідає
Однобічний довірчий інтервал Δ_z	0,076	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $\Delta_{As} = 3,479$	Відповідає	0,231	$\Delta_z \leq \Delta_{As}$ $\Delta_{As} = 3,479$	Відповідає

Оскільки однобічний довірчий інтервал Δz не перевищує максимально припустимої невизначеності аналізу Δ_{As} силденафілу, запропоновані методики характеризуються достатньою прецизійністю (на рівні збіжності) у всьому діапазоні зазначених концентрацій.

Розроблені методики можуть використовуватись для кількісного визначення силденафілу, виділеного з біологічних об'єктів.

Дані дослідження та їх результати описано нами у публікаціях [16, 23-26, 28, 29, 174].

Висновки до розділу 2

1. Для ідентифікації силденафілу та варденафілу хромогенними реакціями вибрані реактиви, якими можна виявити досліджувані речовини у кількостях від 1 до 8 мкг в пробі. Встановлено, що силденафіл та варденафіл також можна виявити за природньою флуоресценцією (при $\lambda = 254$ нм).

2. Встановлено, що системи розчинників, до складу яких входять кислоти чи малополярні органічні розчинники є непридатними для виявлення силденафілу і варденафілу методом ТШХ. За результатами досліджень встановлено, що із систем розчинників, які рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів (TIAFT) для виявлення лікарських речовин основного характеру, найвищий коефіцієнт розділення силденафілу та варденафілу (1,8) спостерігається у системі розчинників етилацетат-96 % етанол (1:1). Опрацьовано склад 4-х підтверджуючих систем розчинників для розділення та виявлення силденафілу і варденафілу у суміші з метаболітами.

3. Вивчено характер УФ-спектрів та розраховані показники поглинання силденафілу і варденафілу в метанольних і етанольних розчинах. Встановлені межі концентрацій в яких поглинання силденафілу і варденафілу у цих розчинниках характеризується лінійністю. Методику УФ-

спектрофотометричного визначення силденафілу і варденафілу валідовано за параметрами лінійності, прецизійності, правильності і відтворюваності.

4. Вивчено залежність між інтенсивністю флуоресценції силденафілу і варденафілу та природою розчинника. Встановлено, що найінтенсивніше силденафіл флуоресціює в ізопропанольних розчинах при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ нм}/410 \text{ нм}$, в цьому розчиннику лінійність градуовального графіку знаходиться в межах концентрацій 2-50 мкг/мл.

Варденафіл найінтенсивніше флуоресціює в ацетонітрильних розчинах ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 285 \text{ нм}/450 \text{ нм}$), а градуовальні графіки кількісного визначення варденафілу характеризуються лінійністю в межах 5-100 нг/мл та 0,1- 5,0 мкг/мл. Відносна похибка кількісного визначення силденафілу у розчинах методом флуориметрії 1,46 %, а варденафілу – 1,55 % та 1,54 %.

В межах лінійності методики кількісного визначення силденафілу і варденафілу флуориметричним методом відповідають валідаційним критеріям правильності та прецизійності.

5. Вперше запропоновані умови ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС на колонці RTX-5. Межа виявлення силденафілу (LOD) становить 5 нг/мл, а варденафілу – 20 нг/мл. Градуовальні графіки характеризуються лінійністю в діапазоні концентрацій для силденафілу 7-500 нг/мл, а для варденафілу – 25-500 нг/мл. Для визначення вмісту силденафілу і варденафілу в розчинах розраховані рівняння регресій в діапазоні лінійності і проведено валідацію методик за критеріями лінійності, правильності та прецизійності. Відносна похибка кількісного визначення силденафілу складає 0,48 %, а відносна похибка кількісного визначення варденафілу – 0,67 %.

6. Розроблено умови ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ на колонці Zorbax SB-C18. Детекцію досліджуваних сполук проведено УФ-спектрометрично і мас-спектрометрично в режимі SCAN і SIM.

LOD силденафілу в режимі SIM ($m/z=475$) становить 8 нг/мл, а в режимі SCAN – 20 нг/мл.

Для варденафілу LOD в режим SIM ($m/z=489$) становить 12 нг/мл, а в режимі SCAN – 35 нг/мл. При УФ-детектуванні ($\lambda = 254$ нм) LOD силденафілу – 25 нг/мл, а варденафілу – 45 нг/мл.

Розраховані рівняння регресій, якими описуються діапазони лінійності кількісного визначення силденафілу: 10-500 нг/мл (режим SIM, $m/z=475$), 25 - 500 нг/мл (режим SCAN) та 30-500 нг/мл (УФ-детектування, $\lambda = 254$ нм).

Встановлено, що для варденафілу лінійність спостерігається в межах 15 - 500 нг/мл (режим SIM, $m/z=489$), 40-500 нг/мл (режим SCAN) та 50 - 500 нг/мл (УФ-детектування, $\lambda = 254$ нм).

Методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ валідовані за критеріями: лінійність, правильність та прецизійність. Відносна похибка кількісного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах при мас-детектуванні становить відповідно 0,66 % та 0,63 %, а при УФ-детектуванні – 0,65 % та 0,61 %.

7. Розроблено умови ідентифікації та кількісного визначення варденафілу методом ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18 з використанням рухомої фази ацетонітрил – 0,5 % водний розчин триетиламіну (30:70) з двома типами детекторів – флуоресцентним та діодно-матричним. LOD для варденафілу при УФ-детектуванні – 0,1 мкг/мл і 1 нг/мл – при флуоресцентному детектуванні ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 285/450$ нм).

Градувальний графік кількісного визначення варденафілу при УФ-детектуванні ($\lambda = 214$ нм) характеризується лінійністю в межах концентрацій 0,5-100 мкг/мл, яка описується залежністю $Y = 0,277 \cdot X - 0,018$, а з флуоресцентним детектуванням лінійність спостерігається в межах 2 - 500 нг/мл та описується залежністю $Y = 157,257 \cdot X - 26,289$. Відносна похибка кількісного визначення при УФ-детекції варденафілу у розчинах 1,16 %, а флуоресцентній детекції – 0,77 %. Методики кількісного визначення валідовані за параметрами лінійності, правильності та прецизійності.

8. Розроблено умови кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ/МС/МС на колонці ВЕН С18. МRM моніторинг проводився при $475 \rightarrow 311 \text{ m/z}$ та $475 \rightarrow 58 \text{ m/z}$, а УФ-детектування здійснювалось в діапазоні 205-350 нм.

Встановлено, що в межах концентрацій 3,0-500 нг/мл рівняння регресії описується залежністю $Y = 10,971 \cdot X + 0,296$ при МС/МС-детектуванні, а при УФ-детектуванні ($\lambda = 293 \text{ нм}$) в межах 6 - 500 нг/мл, графік описується залежністю $Y = 28,547 \cdot X + 4,304$, де: Y – площа піку, X – концентрація силденафілу. Відносна похибка кількісного визначення при аналізі УВЕРХ/МС/МС складає 0,45 %, а при УВЕРХ/УФ – 0,50 %.

За параметрами лінійності, правильності та прецизійності методики кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ відповідають вимогам ДФУ 2.0.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й., Кузьмицька А.Є. Експрес-методики ідентифікації силденафілу в судово-хімічній практиці. *Актуальні проблеми профілактичної медицини*: зб. наукових праць, вип. 9, присвячується 95-річчю від дня народження професора В.П. Крамаренко. Львів, 2011. С. 188-192. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).
2. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові. *Одеський медичний журнал*. 2016. №2. С. 16-20. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).
3. Validation of an HPLC-MS method for the determinatin of vardenafil in rat urine / L. Osypchuk, I. Halkevych, S. Davydovych, Y. Bidnychenko. *Journal*

- of Applied Pharmaceutical Science*. 2019.Vol. 9(08). P. 79–85. (*Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, участь у написанні статті*).
4. Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Осипчук Л.І., Галькевич І.Й. Інформаційний лист № 268-2017. Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2017 (Протокол № 102 від 19.04.2017 р.)
 5. Осипчук Л. И. Идентификация варденафила методом УФ-спектрофотометрии. *Традиции и инновации фармацевтической науки и практики*: Материалы Всероссийской научн. – практ. конф. с международным участием, посвященной 45-летию фармацевтического факультета КГМУ. Курск, 2011. С. 284- 286.
 6. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ): підсумкова ІХ наук. – практ. конф., 14 червня 2017 р. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига» 2017, С. 341-342.*
 7. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ГХ-МС. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій*: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених і студентів з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, 12-13 квітня 2018 р. Харків, 2018. С. 340.
 8. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з флуоресцентним детектором, збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції *Медична наука та практика XXI століття*, м. Київ, 1–2 лютого 2019 р. Київ: «Київський медичний науковий центр», 2019, С. 107.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА УМОВ КОНЦЕНТРУВАННЯ СИЛДЕНАФІЛУ ТА ВАРДЕНАФІЛУ ІЗ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ

Процес судово-токсикологічного аналізу включає стадію концентрування, суть якої зводиться до вилучення мікрокількостей досліджуваної речовини із великого об'єму чи маси біологічної матриці. В процесі операції концентрування паралельно відбувається і очищення досліджуваного компонента від білкових та жирових складових матриці, усувається вплив ферментів та інших біологічних сполук. Найчастіше вживаними способами концентрування є методи екстракції, зокрема рідинної екстракції та екстракції твердою фазою [82, 101].

3.1. Вплив рН середовища і органічних розчинників на екстракцію силденафілу та варденафілу з водних розчинів

У більшості випадків при виконанні процедури пошуку невідомої лікарської речовини в досліджуваній пробі, отриманій при аналізі біологічної матриці, перевага надається методу рідинної екстракції. При виконанні даного процесу в органічну фазу переходить речовина в неіонізованій формі. Для розрахунку неіонізованої форми речовини, при відповідному значенні рН користуються формулами [101]:

$$a_b = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (3.1)$$

$$a_a = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (3.2)$$

де: a_b – частка неіонізованої форми основи;

a_a – частка неіонізованої форми кислоти;

pK_a – константа іонізації речовини.

Користуючись вищенаведеними формулами, орієнтовно можна розрахувати частку аналізованої речовини, яка переходить в органічну фазу залежно від рН водної фази.

Для визначення значень рН, при яких екстрагуються силденафіл та варденафіл, нами теоретично були розраховані коефіцієнти розподілу для стандартної системи октанол-вода в межах рН від 0 до 14.

Теоретичний розрахунок коефіцієнтів розподілу двох досліджуваних речовин проводили, використовуючи програму ChemAxon. При цьому брали до уваги значення pK_a силденафілу, яке рівне 5,99 (Strongest Basic) і 10,92 (Strongest Acidic), а для варденафілу $pK_a = 6,21$ (Strongest Basic) і 8,01 (Strongest Acidic), отримані з даних бази Drugbank.

Характер отриманих кривих наведено на рис.3.1.

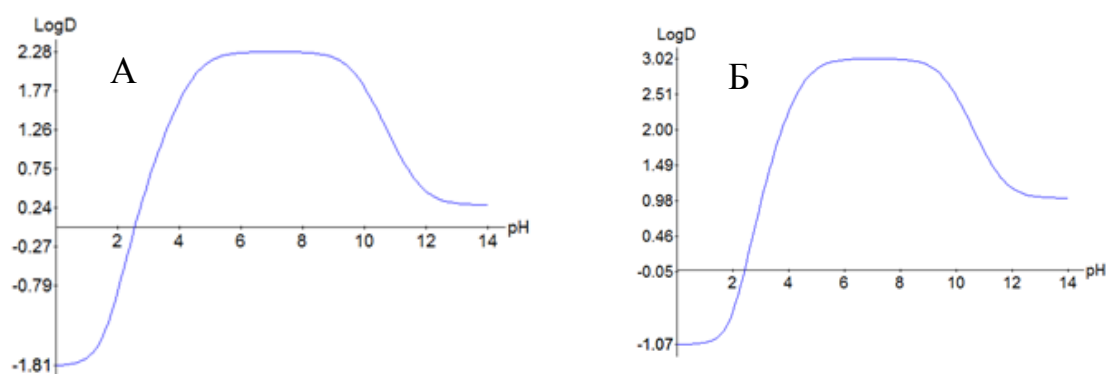


Рис. 3.1 Залежність значень коефіцієнтів розподілу силденафілу (А) та варденафілу (Б) у системі октанол-вода від рН середовища

Практичні результати свідчать, що коефіцієнт розподілу (D) і ступінь екстракції (R) залежать від природи розчинника, іонної сили розчину, наявності сторонніх домішок, температури та інших чинників [112]. У зв'язку з цим ми провели експериментальні дослідження, що дозволили вибрати оптимальні екстрагенти для вилучення досліджуваних сполук з біологічних витяжок.

Для екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів використовували наступні розчинники: 1,2-дихлоретан, діетиловий етер, хлороформ, карбон тетрахлорид, гексан, толуен. Також проведено

дослідження із вивчення впливу електролітів, якими проводиться осадження білкових компонентів з витяжок (натрію хлорид і амонію сульфат), на ступінь екстракції та коефіцієнт розподілу даних препаратів з водних розчинів.

Розрахунок ступеня однократної екстракції ($R, \%$) рівним об'ємом органічної фази, проводили за формулою [11]:

$$R = \frac{A}{N} \cdot 100 \% \quad (3.3),$$

де: R – ступінь однократної екстракції, %;

A – екстраговано силденафілу чи варденафілу фазою органічного розчинника (мкг);

N – початковий вміст силденафілу чи варденафілу у водній фазі (мкг).

Коефіцієнт розподілу (D) розраховували за співвідношенням сумарної аналітичної концентрації силденафілу чи варденафілу у фазі органічного розчинника до аналітичної концентрації кожного з препаратів у водній фазі в рівноважному стані [11]:

$$D = \frac{C_o}{C_b} \quad (3.4),$$

де: D – коефіцієнт розподілу;

C_o – аналітична концентрація силденафілу чи варденафілу у фазі органічного розчинника, моль/л;

C_b – аналітична концентрація силденафілу чи варденафілу у водній фазі, моль/л.

При проведенні екстракції необхідне значення рН середовища досягали використанням універсальної буферної суміші Бріттона-Робінсона [13]. Застосовували буферні розчини з інтервалом значень рН 2-11, рН контролювали рН-метром ОР-110 (Угорщина).

Для екстракції використовували водні розчини силденафілу та варденафілу із вмістом кожної речовини 100 мкг/мл.

Методика екстракції.

В ділильні лійки вносили по 9 мл універсальної буферної суміші з відповідним значенням рН (інтервал рН від 2 до 11), по 1 мл водного розчину силденафілу або варденафілу з концентрацією 100 мкг/мл та по 10 мл відповідного органічного розчинника. Екстракцію проводили з використанням механічного струшувача (модель ЛАБ-ПУ-02). Тривалість екстракції 10 хвилин. Після розділення фаз відбирали по 5 мл органічної фази і органічний розчинник випаровували досуха в ротаційному випаровувачі (при 40° С).

Сухі залишки розчиняли в 5 мл метанолу. В отриманих розчинах кількісно визначали вміст силденафілу та варденафілу методом УФ-спектрометрії. Для цього вимірювали оптичну густину метанольних розчинів силденафілу при $\lambda_{\max} = 292$ нм ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 272$), а для варденафілу при $\lambda_{\max} = 221$ нм ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 641$).

Проводили по три паралельні екстракції кожним із органічних розчинників.

За одержаними даними розраховували ступінь однократної екстракції (R) та коефіцієнт розподілу (D) для кожного із препаратів.

Кількості силденафілу чи варденафілу в метанольних розчинах розраховували за формулою:

$$m = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 10^4}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot l \cdot V_2} \quad (3.5),$$

де: m – вміст досліджуваної речовини, мкг;

A – оптична густина метанольного розчину силденафілу чи варденафілу;

V_1 – об'єм органічної фази, взятої для однократної екстракції, мл;

V_3 – об'єм метанольного розчину сухого залишку препарату, мл;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання силденафілу чи варденафілу;

l – товщина поглинаючого шару (1 см);

V_2 – об'єм відібраної органічної фази, мл.

Результати експериментальних досліджень наведено в таблиці 3.1. Залежність ступеня екстракції силденафілу та варденафілу від рН середовища і природи органічних розчинників зображено на рис. 3.2.

Таблиця 3.1

Значення ступеня і коефіцієнтів екстракції силденафілу і варденафілу в залежності від рН та природи органічного розчинника (n=3)

Органічний розчинник	рН середовища	Силденафіл		Варденафіл	
		Ступінь екстракції, R, %	Коефіцієнт розподілу, D	Ступінь екстракції, R, %	Коефіцієнт розподілу, D
1	2	3	4	5	6
Хлороформ	2,09	57,97	1,389	19,98	0,250
	3,02	59,99	1,499	24,98	0,333
	4,10	66,07	1,947	28,02	0,389
	5,11	68,82	2,207	33,01	0,493
	6,03	73,98	2,843	40,97	0,695
	7,05	77,85	3,513	42,07	0,726
	8,02	78,95	3,751	40,90	0,692
	9,08	78,95	3,751	39,02	0,640
	10,15	78,03	3,552	38,01	0,613
	11,06	74,53	2,926	34,03	0,516
1,2-дихлоретан	2,09	59,99	1,499	34,97	0,538
	3,02	69,93	2,236	38,01	0,615
	4,10	85,02	5,676	40,58	0,683
	5,11	89,07	8,149	51,98	1,082
	6,03	94,04	15,78	81,01	4,266
	7,05	94,23	16,331	93,97	15,584
	8,02	95,15	19,619	93,89	15,347
	9,08	92,94	13,160	92,95	13,184
	10,15	80,97	4,255	89,99	8,990
	11,06	74,90	2,984	84,99	5,662
Діетиловий етер	2,09	34,97	0,538	25,05	0,334
	3,02	46,93	0,884	29,97	0,428
	4,10	57,05	1,328	39,10	0,642
	5,11	71,04	2,453	48,00	0,923

Продовж. табл.3.1

1	2	3	4	5	6
Діетиловий етер	6,03	82,08	4,580	71,02	2,451
	7,05	84,29	5,365	92,02	11,531
	8,02	85,21	5,761	91,94	11,407
	9,08	82,63	4,757	91,00	10,111
	10,15	71,40	2,497	88,97	8,066
	11,06	64,04	1,781	75,00	3,000
Карбон тетрахлорид	2,09	20,06	0,251	8,04	0,087
	3,02	27,05	0,371	9,99	0,111
	4,10	36,99	0,538	12,02	0,137
	5,11	39,93	0,665	14,99	0,176
	6,03	44,90	0,815	20,99	0,266
	7,05	53,92	1,170	21,15	0,268
	8,02	54,66	1,206	21,07	0,267
	9,08	54,29	1,188	19,98	0,250
	10,15	54,11	1,179	18,03	0,220
	11,06	50,98	1,040	11,00	0,124
Гексан	2,09	0,37	0,004	0,16	0,002
	3,02	0,37	0,004	0,16	0,002
	4,10	0,37	0,004	0,16	0,002
	5,11	0,37	0,004	0,16	0,002
	6,03	0,37	0,004	0,24	0,002
	7,05	0,37	0,004	0,24	0,002
	8,02	0,37	0,004	0,24	0,002
	9,08	0,37	0,004	0,16	0,002
	10,15	0,37	0,004	0,16	0,002
	11,06	0,37	0,004	0,16	0,002
Толуен	2,09	0,70	0,007	0,62	0,006
	3,02	0,70	0,007	0,62	0,006
	4,10	0,70	0,007	0,62	0,006
	5,11	0,70	0,007	0,62	0,006
	6,03	0,70	0,007	0,78	0,008
	7,05	0,92	0,009	0,78	0,008
	8,02	0,92	0,009	0,78	0,008
	9,08	0,70	0,007	0,62	0,006
	10,15	0,70	0,007	0,62	0,006
	11,06	0,70	0,007	0,62	0,006

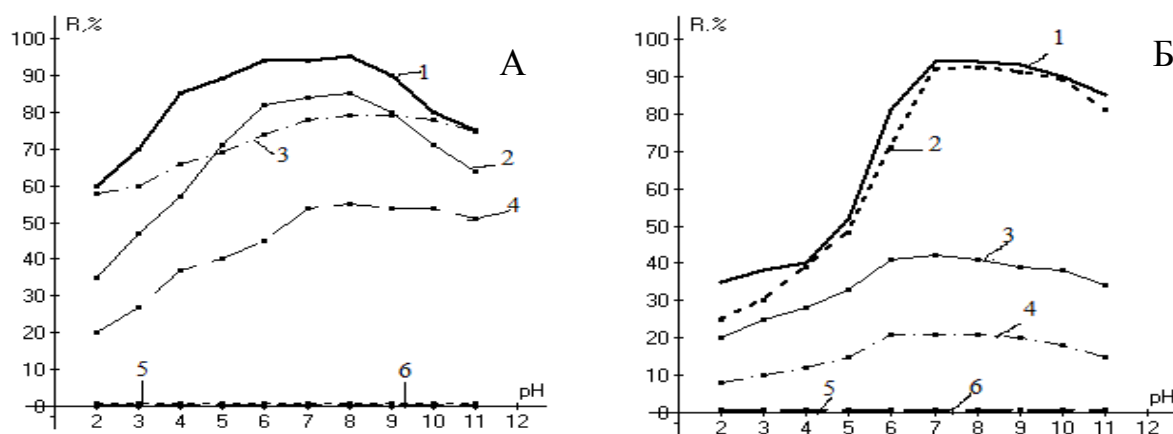


Рис. 3.2 Залежність ступеня екстракції (R) силденафілу (А) та варденафілу (Б) від рН середовища і природи органічних розчинників: 1 – 1,2-дихлоретан, 2 – діетиловий етер, 3 – хлороформ, 4 – карбон тетрахлорид, 5 – толуен, 6 – гексан

Дані, які представленні в таблиці 3.1 і на рисунку 3.2 показують, що максимальні кількості силденафілу екстрагуються в інтервалі рН 6-9. Оптимальним розчинником для екстракції силденафілу є 1,2-дихлоретан, яким при рН 6-8 екстрагується до 94-95 % цієї сполуки. Дещо нижче значення ступеня екстракції силденафілу діетиловим етером – 84-85 % (в діапазоні рН 7-8). До 78-79 % екстрагується силденафілу хлороформом при рН 7-10, а карбону тетрахлоридом можна виєкстрагувати лише до 55 % цієї сполуки при рН 7-10.

Аналогічно як і силденафіл, варденафіл найкраще екстрагується 1,2- дихлоретаном (93-94 %) та діетиловим етером (91-92 %) при рН 7-9. При рН 6-8 хлороформом екстрагується до 42 % варденафілу, а карбону тетрахлоридом – до 21 %.

Гексаном та толуеном силденафіл та варденафіл, в інтервалі рН 2-11, практично не екстрагуються.

Для подальшої екстракції силденафілу та варденафілу із витяжок біологічного матеріалу, крові та сечі ми використовували 1,2-дихлоретан.

Достовірність результатів екстракції силденафілу та варденафілу 1,2- дихлоретаном вивчали із використанням їх водних розчинів різної концентрації.

Для цього в ряд ділительних лійок вносили по 9 мл універсальної буферної суміші (рН = 8,0 для силденафілу, рН = 7,5 для варденафілу), додавали по 1,0 мл водного розчину силденафілу або варденафілу з концентрацією 10, 20, 50, 75 і 100 мкг/мл та по 10 мл 1,2-дихлоретану. Вміст лійок струшували протягом 10 хвилин і залишали для розділення фаз. Водну фазу відділяли від фази органічного розчинника, який випаровували досуха в ротаційному випаровувачі (при 40° С). Сухі залишки розчиняли в 4 мл метанолу. В отриманих розчинах кількісно визначали вміст кожного із досліджуваних препаратів методом УФ-спектрометрії.

За одержаними даними розраховували ступінь однократної екстракції (R) для кожного із препаратів.

Результати експериментальних досліджень наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

**Результати ізолювання силденафілу та варденафілу методом
рідинної екстракції (n=5)**

Аналiт	Концентрація внесеного аналіту, мкг	Екстраговано аналітів з водних розчинів		RSD, %
		мкг $\pm$ SD	% $\pm$ SD	
Силденафіл	10	9,32 $\pm$ 0,08	93,20 $\pm$ 0,84	0,90
	20	18,74 $\pm$ 0,14	93,69 $\pm$ 0,67	0,71
	50	47,26 $\pm$ 0,21	94,51 $\pm$ 0,41	0,44
	75	71,10 $\pm$ 0,35	94,80 $\pm$ 0,46	0,39
	100	95,06 $\pm$ 0,24	95,06 $\pm$ 0,24	0,21
Варденафіл	10	9,30 $\pm$ 0,10	93,18 $\pm$ 1,00	1,08
	20	18,70 $\pm$ 0,16	93,69 $\pm$ 0,81	0,86
	50	46,77 $\pm$ 0,21	94,52 $\pm$ 0,42	0,45
	75	71,12 $\pm$ 0,34	94,83 $\pm$ 0,39	0,39
	100	94,06 $\pm$ 0,25	95,00 $\pm$ 0,25	0,27

Як видно з даних, представлених в таблиці 3.2, з водних розчинів 1,2-дихлоретаном можна виєкстрагувати до 93-95 % силденафілу та варденафілу.

3.2 Вивчення впливу електролітів на екстракцію силденафілу та варденафілу з водних розчинів

У деяких методиках, які використовуються при дослідженні зразків біологічного матеріалу, проводиться осадження білкових компонентів із витяжок, плазми та крові з допомогою електролітів. При внесенні електролітів також можливе співосадження і досліджуваних речовин.

Досліджено, що природа електроліту та його концентрація впливають на розчинність речовини у водній фазі, тобто при висолюванні досліджуваної речовини електролітами ступінь екстракції підвищується, а при всолюванні – знижується. З метою зменшення втрат досліджуваних речовин при екстракції їх з біологічних матриць, ми вивчили вплив концентрації та природи електролітів на ступінь екстракції силденафілу та варденафілу при значеннях рН, що відповідали максимуму екстракції.

В якості електролітів застосовували 5 % та 25 % розчини натрію хлориду та 5 %, 25 % та 50 % розчини амонію сульфату в буферних розчинах. Вивчали вплив концентрації електроліту на величину ступеня екстракції силденафілу (при рН=8) та варденафілу (при рН=7,5). Екстракцію проводили 1,2- дихлоретаном.

Методика виконання.

В ділильні лійки вносили по 9 мл універсальної буферної суміші, що містила 5 % і 25 % натрію хлориду та 5 %, 25 % і 50 % амонію сульфату, по 1,0 мл водних розчинів силденафілу або варденафілу (100 мкг/мл) і по 10 мл 1,2- дихлоретану. Вміст лійок збовтували протягом 10 хв в механічному струшувачі і залишали на 10 хв для розділу фаз. Відбирали 5 мл органічної фази, яку випаровували досуха в ротаційному випаровувачі ($t=40^{\circ}\text{C}$). Сухі залишки розчиняли в 4 мл метанолу.

Вміст силденафілу та варденафілу в метанольних розчинах визначали УФ-спектрофотометрично (див. розділ 3.1.1). За отриманими даними

розраховували ступінь однократної екстракції препаратів (R) в присутності електролітів. Отримані результати представлено на рис. 3.3.

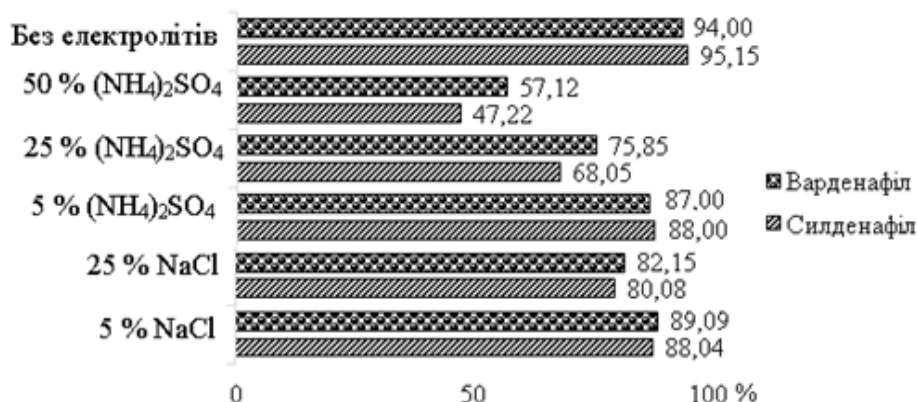


Рис. 3.3 Залежність ступеня екстракції силденафілу (pH = 8) та варденафілу (pH = 7,5) від концентрації та природи електроліту, (n=3)

Із отриманих результатів можна зробити висновок, що із зростанням концентрації електролітів ступінь екстракції обох досліджуваних сполук зменшується.

3.3 Розробка умов концентрування силденафілу та варденафілу із водних розчинів методом твердофазної екстракції на картриджах Oasis HLB та картриджах з Н-клиноптилолітом

Спосіб підготовки проби для аналізу з використанням методу твердофазної екстракції (ТФЕ) широко застосовується при проведенні хімічного, біохімічного, токсикологічного та інших аналізів. В основу даного методу покладено принцип розподілу цільового компонента між рухомою і нерухомою фазами за рахунок сорбційних чи іонообмінних процесів, що проходять між досліджуваною речовиною та сорбентом. Перевагами ТФЕ, у порівнянні з рідинною екстракцією, є скорочення тривалості аналізу та зменшення витрат розчинників [82, 136].

У методі ТФЕ розрізняють три основні механізми процесів розділення: обернено-фазовий (ОФ), нормальний фазовий (НФ) та іонного обміну [180].

Методика проведення ТФЕ складається з етапів:

1. активування сорбенту – промивання необхідним розчинником або сумішшю розчинників. При проведенні НФ екстракції використовують безводні неполярні розчинники, для ОФ екстракції – полярні або малополярні (рідко неполярні), а розчини електролітів і буферні розчини – для іонообмінних сорбентів;
2. кондиціонування – промивання сорбенту розчинником, в якому розчинений зразок;
3. пропускання досліджуваного розчину через сорбент;
4. промивання сорбенту розчинником для видалення домішок досліджуваної проби;
5. висушування сорбенту в потоці інертного газу ;
6. елюювання проби.

Схему етапів процесу ТФЕ представлено на рисунку 3.4.



Рис. 3.4 Схема проведення твердофазної екстракції.

В даній роботі ми використовували картриджі Oasis HLB (30 mg, Waters, USA) з обернено-фазовим механізмом розділення і сорбційні колонки, що містили по 0,6 г Н-клинотиліоліту (фракція 0,22-0,31 мм).

3.3.1 Ізолювання силденафілу та варденафілу з водних розчинів методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB

Картриджі Oasis HLB характеризуються тим, що дозволяють проводити екстракцію полярних та неполярних речовин, при цьому досягається висока

відтворюваність і високий вихід речовини. Сорбент цих катриджів виявляє спорідненість до гідро- і ліпофільних речовин, в результаті чого екстракти характеризуються високим ступенем очищення, до мінімуму зводиться матричний ефект і вплив іонної супресії.

Через катриджі пропускали по 1,0 мл розчинів силденафілу чи варденафілу із концентрацією 10; 20; 50; 75 та 100 мкг/мл.

Визначення ступеня ізолювання силденафілу та варденафілу на катриджах Oasis HLB складалось з наступних етапів:

1. Кондиціонування сорбенту 1 мл 96 % етанолу та 1 мл води ;
2. Завантаження 1,0 мл водного розчину силденафілу чи варденафілу;
3. Промивання сорбенту 2 мл універсального буферного розчину (рН 7,4) та 1 мл води дистильованої;
4. Висушування сорбенту в потоці азоту;
5. Елюювання речовин 2 мл 96 % етанолу.

Швидкість пропускання усіх рідин через сорбент 1мл/хв.

Кількість силденафілу та варденафілу в елюатах визначали УФ-спектрофотометрично. Для цього етанольні розчини випаровували в потоці азоту до сухого залишку, який розчиняли в 4 мл метанолу. Оптичну густину метанольних розчинів силденафілу вимірювали при 292 нм ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 272$), а варденафілу при 221 нм ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 641$).

Вміст силденафілу і варденафілу (мкг) в метанольних розчинах визначали за формулою:

$$m = \frac{A \cdot V \cdot 10^4}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot l} \quad (3.6),$$

де: m – вміст досліджуваної речовини, мкг;

A – оптична густина метанольного розчину силденафілу ($\lambda = 292$ нм) чи варденафілу ($\lambda = 221$ нм);

V – об'єм метанольного розчину сухого залишку препарату, мл;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання силденафілу чи варденафілу;

l – товщина поглинаючого шару (1 см);

Результати виділення силденафілу та варденафілу на картриджах Oasis HLB представлено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

**Результати ізолювання силденафілу та варденафілу методом
ТФЕ на картриджах Oasis HLB (n = 5)**

Аналіт	Концентрація взятого аналіту, мкг	Ізольовано аналітів з водних розчинів		RSD, %
		мкг $\pm$ SD	% $\pm$ SD	
Силденафіл	10	9,90 $\pm$ 0,06	99,04 $\pm$ 0,61	0,62
	20	19,9 $\pm$ 0,09	99,04 $\pm$ 0,45	0,46
	50	49,58 $\pm$ 0,18	99,16 $\pm$ 0,36	0,36
	75	74,40 $\pm$ 0,16	99,20 $\pm$ 0,21	0,17
	100	99,35 $\pm$ 0,09	99,35 $\pm$ 0,09	0,09
Варденафіл	10	9,81 $\pm$ 0,06	98,11 $\pm$ 0,61	0,62
	20	19,84 $\pm$ 0,06	98,77 $\pm$ 0,36	0,38
	50	49,47 $\pm$ 0,16	98,94 $\pm$ 0,33	0,33
	75	74,31 $\pm$ 0,27	99,08 $\pm$ 0,35	0,29
	100	99,15 $\pm$ 0,10	99,15 $\pm$ 0,10	0,10

Отримані результати свідчать, що з водних розчинів, застосовуючи елюентом 96 % етанол, на картриджах Oasis HLB (30 mg Waters, USA) ступінь екстракції силденафілу становить 99,0-99,5 %, а варденафілу – 98-99 %.

3.3.2 Вплив рН середовища на сорбцію силденафілу та варденафілу Н-клиноптилолітом

Природні цеоліти є перспективними сорбентами для концентрування лікарських препаратів, які також можна використовувати в хіміко-токсикологічному аналізі [32]. Іонообмінні властивості цеолітів визначаються особливостями хімічної спорідненості іонів речовини з кристалічною структурою цеоліту.

Враховуючи цей фактор, ми розробили умови твердофазної екстракції силденафілу та варденафілу модифікованим клиноптилолітом. У роботі

використовувався клиноптилоліт із родовища с. Сокирниця Хустського р-ну Закарпатської області, Україна. Для дослідження використовували фракцію із розміром зерен 0,22-0,31 мм.

Н-клиноптилоліт отримували шляхом обробки природного цеоліту 1 М розчином HCl протягом 6 год. Після чого сорбент промивали водою до негативної реакції на хлорид-іони, висушували при 60 °C та зберігали в ексикаторі.

Попередньо вивчали вплив рН середовища на ступінь сорбції силденафілу та варденафілу з водних розчинів даним сорбентом в статичних умовах.

На одне дослідження відбирали по 0,06 г Н-клиноптилоліту, відважену наважку сорбенту вносили в хімічний стакан місткістю 20 мл.

До сорбенту вносили по 5,0 мл водних розчинів силденафілу чи варденафілу із концентраціями кожної із сполук 100 мкг/мл. рН водних розчинів досліджуваних сполук попередньо доводили до 2,0; 5,0; 5,5; 7,0; 7,4; 7,8; 8,0 та 10,0. Для створення необхідного значення рН водних розчинів силденафілу і варденафілу використовували 0,1 М розчини NaOH чи HCl, рН контролювали рН-метром ОР-110.

Перед внесенням розчинів силденафілу чи варденафілу сорбент промивали 3 мл 96 % етанолу та 4 мл води дистильованої. Після внесення водних розчинів силденафілу чи варденафілу, доведених до відповідного рН, проби поміщали у механічний струшувач і струшували протягом 10 хв.

У водній фазі визначали несорбовані кількості силденафілу та варденафілу методом УФ-спектрофотометрії.

Для цього із кожного стакану відбирали по 4,0 мл водного розчину, який випаровували досуха при 40 °C. Сухі залишки розчиняли в 4 мл метанолу.

Оптичну густину метанольних розчинів силденафілу вимірювали при 292 нм ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 272$), а варденафілу при 221 нм ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 641$).

Ступінь сорбції (S, %) кожної із досліджуваних сполук розраховували за формулою:

$$S = \frac{C_{вих} - C_{н.с.}}{C_{вих}} \cdot 100 \% \quad (3.7),$$

де: $C_{вих}$ – концентрація силденафілу або варденафілу в вихідному розчині, мкг/мл;

$C_{н.с.}$ – концентрація силденафілу або варденафілу в розчині після сорбції Н-клиноптилолітом, мкг/мл.

Результати проведених досліджень представлено в таблиці 3.4

Таблиця 3.4

**Результати сорбції силденафілу та варденафілу з водних розчинів
Н-клиноптилолітом в залежності від рН середовища (n=5)**

Внесено препарату, мкг	рН середовища	Сорбовано препарату, мкг	Ступінь сорбції препарату (S), %
Силденафіл, 500 мкг	2,0	300,0	60,0
	5,0	431,5	86,3
	5,5	451,0	90,2
	7,0	484,0	96,8
	7,4	485,5	97,1
	7,8	450,0	90,0
	8,0	152,5	30,5
	10,0	50,0	10,0
Варденафіл, 500 мкг	2,0	293,0	58,6
	5,0	420,0	84,0
	5,5	450,0	90,0
	7,0	483,5	96,7
	7,4	485,0	97,0
	7,8	452,5	90,5
	8,0	146,0	29,2
	10,0	48,0	9,6

Результати, наведені в таблиці 3.4 свідчать, що область максимуму сорбції силденафілу і варденафілу Н-клиноптилолітом має місце в інтервалі рН 5,5-7,8. В статичних умовах із водних розчинів Н-клиноптилолітом сорбується 90-97 % досліджуваних речовин.

3.3.3 Десорбція силденафілу та варденафілу із Н-клиноптилоліту в статичних та динамічних умовах

Залежність ступеня десорбції силденафілу та варденафілу із сорбенту (Н-клиноптилоліту) вивчали в статичних та динамічних умовах. Для цього на одне дослідження відбирали по 0,06 г Н-модифікованого клиноптилоліту.

При проведенні аналізу в статичних умовах наважку цеоліту вносили в хімічний стакан місткістю 20 мл. При аналізі в динамічних умовах готували сорбційні колонки. В якості сорбційної колонки брали медичні шприци об'ємом 2 см³ (внутрішній діаметр 1 см). Сорбент у шприцах знаходився між двома фільтрами, виготовленими із фільтрувального паперу.

Сорбцію силденафілу та варденафілу із водних розчинів проводили при рН = 7,4. В якості елюенту вибрано 5 % розчин аміаку в 96 % етанолі.

Вивчали залежність ступеня екстракції силденафілу та варденафілу Н- клиноптилолітом при рН 7,4. Для цього готували водні розчини силденафілу та варденафілу із концентраціями 5; 10; 20; 50 та 100 мкг кожної сполуки в 1 мл розчину. Необхідне значення рН створювали додаванням 0,1 М NaOH.

Дослідження десорбції силденафілу та варденафілу у статичних умовах.

Перед внесенням силденафілу чи варденафілу до сорбенту, його промивали 3 мл 96 % етанолу та 4 мл води дистильованої, після чого вносили по 5,0 мл водних розчинів силденафілу чи варденафілу із концентрацією кожного препарату 5; 10; 20; 50 та 100 мкг/мл. Стакани поміщали в механічний струшувач на 10 хв. Після цього водну фазу зливали, а сорбент в хімічному стакані промивали 4 мл води та 2 мл водно-етанольної суміші (1 об : 1 об) та висушували досуха.

Із сорбенту двічі елюювали силденафіл та варденафіл 5 % розчином аміаку в 96 % етанолі порціями по 2 мл. Елюати об'єднували і промивали сорбент ще 1 мл 5 % розчину аміаку в 96 % етанолі. Промивну рідину

об'єднували з елюатом. При необхідності об'єм елюату доводили елюентом до 5 мл.

Дослідження десорбції силденафілу та варденафілу в динамічних умовах.

Підготовлені колонки, кондиціонували 3 мл 96 % етанолу та 4 мл води дистильованої. Після цього пропускали 5,0 мл водного розчину силденафілу чи варденафілу із концентрацією кожного із препаратів 5; 10; 20; 50 та 100 мкг/мл. Сорбент промивали 4 мл води та 2 мл водно-етанольного розчину (1 об:1 об) і висушували досуха в потоці азоту. Елюювали препарати 4 мл 5 % розчину аміаку в 96 % етанолі. Усі розчини пропускали через сорбційну колонку із швидкістю 1 мл/хв.

Кількість силденафілу та варденафілу в елюатах визначали методом УФ-спектрофотометрії. Оптичну густину розчинів силденафілу вимірювали при 289 нм, а варденафілу – при 215 нм. При цьому враховували, що при довжинах хвиль, при яких проводилось вимірювання, для силденафілу $A_{1\text{см}}^{1\%} = 236$, а для варденафілу – $A_{1\text{см}}^{1\%} = 729$.

Результати досліджень наведено в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Залежність десорбції силденафілу та варденафілу із Н-клиноптилоліту в статичних та динамічних умовах (n = 5)

Концентрація препарату у водному розчині, мкг/мл	Концентрація ізольованого препарату в динамічних умовах		RSD, %	Концентрація ізольованого препарату в статичних умовах		RSD, %
	мкг/мл ±SD	% ±SD		мкг/мл ±SD	% ±SD	
1	2	3	4	5	6	7
Силденафіл						
5	4,67±0,04	93,36±0,88	0,95	4,91±0,03	83,93±0,80	0,95
10	9,35±0,07	93,51±0,07	0,74	9,90±0,06	83,98±0,70	0,83
20	19,02±0,09	94,17±0,65	0,69	19,90±0,09	84,86±0,56	0,66

Продовж. табл. 3.5

1	2	3	4	5	6	7
50	47,2±0,22	94,42±0,43	0,46	49,58±0,18	84,94±0,51	0,60
100	94,71±0,44	94,71±0,44	0,46	85,20±0,42	85,20±0,42	0,49
Варденафіл						
5	4,49±0,04	89,79±0,74	0,82	4,11±0,04	82,19±0,89	0,89
10	9,06±0,07	90,62±0,69	0,76	8,26±0,06	82,62±0,56	0,68
20	18,02±0,13	90,87±0,36	0,70	16,69±0,08	82,96±0,40	0,49
50	45,51±0,31	91,02±0,62	0,68	41,57±0,2	83,14±0,39	0,47
100	91,20±0,43	91,20±0,43	0,47	83,38±0,37	83,38±0,37	0,45

Дані, наведені в таблиці 3.5 свідчать, що ступінь вилучення силденафілу та варденафілу Н-клиноптилолітом залежить від умов аналізу. При цьому в статичних умовах із даного сорбенту 5 % розчином аміаку в 96 % етанолі елююється 82-83 % варденафілу та 84-85 % силденафілу. При проведенні досліджень в динамічних умовах із колонок з Н-клиноптилолітом можна вилучити 90-91 % варденафілу та 93-94 % силденафілу.

Дані дослідження та їх результати описано нами в публікаціях [17, 18, 20-22, 30, 120].

Висновки до розділу 3

1. Вивчено вплив рН середовища та природи органічних розчинників (1,2-дихлоретану, діетилового етеру, хлороформу, карбону тетрахлориду, гексану та толуену) на ступінь екстракції та коефіцієнт розподілу силденафілу та варденафілу з водних розчинів.

2. Встановлено, що найкращим органічним розчинником для екстракції даних препаратів з водних розчинів є 1,2-дихлоретан. Оптимальне значення рН середовища для екстракції силденафілу рівне 8,0, а для варденафілу – 7,5. При вказаних значеннях рН 1,2-дихлоретаном екстрагується 93-95 % досліджуваних препаратів.

3. Вивчено вплив розчинів електролітів (5 % та 25 % натрію хлориду і 5 %, 25 % та 50 % амонію сульфату) на ступінь екстракції досліджуваних

речовин 1,2-дихлоретаном при значеннях рН, що відповідають максимуму екстракції. Встановлено, що електроліти зменшують ступінь екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів.

4. Розроблено схему проведення ТФЕ на картриджах Oasis HLB (30 mg Waters, USA). Встановлено, що при використанні даних картриджів, ступінь вилучення силденафілу та варденафілу з водних розчинів становить 99,0 - 99,5 % та 98-99 % відповідно.

5. Вивчено вплив рН середовища на сорбцію силденафілу і варденафілу Н-клинотилітом в статичних умовах. Встановлено, що область максимуму сорбції двох препаратів цим сорбентом спостерігається при рН 5,5-7,8.

6. Встановлено, що оптимальним елюентом для вилучення силденафілу і варденафілу із Н-клинотиліту є 5 % розчин аміаку в 96 % етанолі. Даним елюентом в статичних умовах із сорбенту вилучається 82-83 % варденафілу і 84-85 % силденафілу, а в динамічних умовах ізолюється 90-91 % варденафілу і 93-94 % силденафілу.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вивчення умов екстракції силденафілу органічними розчинниками. *Фармацевтичний журнал*. 2008. №1. С. 83 - 87. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).*
2. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2015. №1-2. С. 124-128. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).*

3. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вплив рН середовища на ізолювання силденафілу з плазми Н-клинотилолітом. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24 (3). Київ. С. 127 - 132. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
4. Осипчук Л.И., Галькевич И. И. Влияние типа сорбента метода твердофазной экстракции на степень выделения силденафила из плазмы крови. *Университетская наука: взгляд в будущее: Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета (7 февраля 2020 года): в 2 т., Курский гос. мед. ун-т; под ред. В.А. Лазаренко. Курск: КГМУ, 2020. Т. I. С. 757-761. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
5. Осипчук Л. І. Вплив рН середовища на ступінь ізолювання силденафілу Н-клинотилолітом. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2015: матеріали Всеукр. наук. - практ. конф. молодих вчених та студентів, 26-27 березня 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 91.*
6. Осипчук Л. І. Визначення силденафілу в сечі з використанням концентрування Н-клинотилолітом. *Природничі читання: матеріали II наук.-практ. конф. з міжнар. участю. 14-17 травня 2015 р. Чернівці, 2016. С. 199.*
7. Osypchuk L. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood. The 6th international pharmaceutical conference *Science and practice 2015: Proc. Sci. pract. Conf. November 5-6, 2015. Kaunas, Lithuania, 2015. P. 46.*

РОЗДІЛ 4

ВИДІЛЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ ТА ВАРДЕНАФІЛУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Особливістю проведення хіміко-токсикологічного аналізу є те, що досліджуються біологічні об'єкти з низьким рівнем концентрації токсичних речовин. Тому надзвичайно важливим при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень є процес виділення ксенобіотиків із біологічної матриці [11, 135].

Нашим завданням була розробка ефективних методик ізолювання силденафілу і варденафілу та їх метаболітів з біологічних об'єктів (органів та біологічних рідин).

Спочатку ми вивчили ефективність методик виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу класичними методами, якими проводиться ізолювання лікарських отрут та алкалоїдів у вітчизняних токсикологічних відділеннях бюро судово-медичної експертизи: О.О. Васильєвої (екстракція водою, підкисленою оксалатною кислотою), Стаса-Отто (екстракція спиртом, підкисленим оксалатною кислотою), В.П. Крамаренка (екстракція водою, підкисленою сульфатною кислотою). Нами також розроблено експресний та ефективний метод ізолювання силденафілу та варденафілу сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). Паралельно опрацьовано методики виділення силденафілу і варденафілу з біологічних рідин (кров, плазма, сеча).

4.1 Виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу загальноприйнятими методами

Для виділення препаратів класичними методами нами була проведена незначна їх модифікація, яка полягала у зменшенні наважок біологічного

матеріалу до 20 г. Екстракцію силденафілу і варденафілу із отриманих витяжок проводили 1,2-дихлоретаном, а процеси проціджування через марлю та фільтрування було замінено на центрифугування.

Апробацію даних методик проводили із використанням тканини печінки, яку отримували у Львівському обласному патолого-анатомічному бюро. Кожний зразок біологічного матеріалу перевіряли на відсутність лікарських препаратів.

Методика приготування модельних сумішей.

Для досліджень брали по 20 г подрібненої печінки. В кожную порцію біологічного матеріалу вносили по 500 мкг силденафілу або варденафілу, проби перемішували і досліджували через 24 год. Паралельно готували контрольні проби із даним біологічним матеріалом. Ізолювання силденафілу і варденафілу проводили за наведеними нижче методиками.

Ізолювання силденафілу та варденафілу водою, підкисленою оксалатною кислотою (метод О. О. Васильєвої).

У підготовлені модельні зразки вносили дистильовану воду (до повного покриття частинок біологічного матеріалу) та насичений розчин оксалатної кислоти до рН 2-3. Контроль рН здійснювали універсальним індикаторним папірцем.

Біологічний матеріал настоювали 2 год при використанні механічного струшувача. Кислі водні витяжки зливали, а біологічний матеріал ще двічі настоювали з водою, підкисленою насиченим розчином оксалатної кислоти (по 1 год при струшуванні).

Кислі витяжки із кожної порції біологічного матеріалу зливали, об'єднували і центрифугували (15 хв при 5000 об/хв). Центрифугати переносили у ділительні лійки і доводили 25 % розчином аміаку до рН 8,0 (за універсальним індикатором). Екстракцію силденафілу чи варденафілу проводили 1,2-дихлоретаном (тричі, порціями по 10 мл). Тривалість однієї екстракції 10 хв.

Ізолювання силденафілу та варденафілу 96 % етанолом, підкисленим оксалатною кислотою (метод Стаса-Отто).

Метод Стаса-Отто застосовують у практиці вітчизняних токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи, як правило, для ізолювання лікарських отруйних речовин із гнилого біологічного матеріалу. У зв'язку з чим дану методику ми використали для встановлення ступеня ізолювання силденафілу та варденафілу з біологічних проб.

У модельні проби біологічного матеріалу вносили 96 % етиловий спирт (до покриття твердих частинок) та підкислювали 10 % етанольним розчином оксалатної кислоти до рН 2-3 (за універсальним індикатором). Біологічний матеріал настоювали 24 год при кімнатній температурі і періодичному перемішуванні. Кислі витяжки зливали, а біологічний матеріал ще двічі (по 24 год) настоювали з 96 % етиловим спиртом, підкисленим 10 % етанольним розчином оксалатної кислоти. Спиртові витяжки об'єднували і центрифугували протягом 15 хв при 5000 об/хв. Центрифугати переносили у фарфорові чашки і випаровували на водяному грівнику (40°C) до густоти сиропу. Осадження білкової фракції проводили абсолютним етиловим спиртом, до припинення випадання осаду від додавання етанолу. Утворений осад відокремлювали центрифугуванням.

До очищеного залишку вносили 10 мл дистильованої води. Кислу водно-спиртову витяжку поміщали в ділильну лійку та доводили 25 % розчином аміаку до рН 8,0, після чого проводили трикратну екстракцію 1,2- дихлоретаном (порціями по 10 мл).

Ізолювання силденафілу та варденафілу водою, підкисленою сульфатною кислотою (метод В. П. Крамаренка).

У проби біологічного матеріалу вносили 0,02 М розчин сульфатної кислоти. При необхідності рН водної фази доводили 20 % розчином сульфатної кислоти до рН 2,0-3,0 (за універсальним індикатором). Проби настоювали 2 год при струшуванні. Кислі водні витяжки зливали, а біологічний матеріал ще двічі настоювали з 0,02 М розчином сульфатної

кислоти (рН 2,0-3,0) протягом 1 години (при струшуванні), після цього об'єднані витяжки центрифугували (15 хв при 5000 об./хв).

Надосадові рідини переносили в ділительні лійки і доводили 20 % розчином натрію гідроксиду до рН 8,0 (за універсальним індикатором) та тричі екстрагували 1,2-дихлоретаном (порціями по 10 мл).

Кількісне визначення силденафілу і варденафілу у пробах із біологічного матеріалу.

Дихлоретанові екстракти із кожної порції біологічного матеріалу об'єднували і використовували для кількісного визначення силденафілу і варденафілу.

Силденафіл в отриманих пробах визначали УФ-спектрофотометрично. Для цього 5 мл дихлоретанових екстрактів випаровували в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5 мл метанолу і вимірювали оптичну густину при $\lambda = 292 \text{ нм}$ ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 272$) (див. розділ 2.3.2).

Кількісне визначення варденафілу проводили методом флуориметрії. Для цього 2 мл дихлоретанових екстрактів випаровували в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5 мл ацетонітрилу і вимірювали інтенсивність флуоресценції при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 285/450 \text{ нм}$ (див. розділ 2.4.2).

Ступені виділення силденафілу та варденафілу із модельних проб печінки класичними методами наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Ступені виділення силденафілу та варденафілу із модельних зразків печінки (n=5)

Метод виділення	Виділено силденафілу, %	Метрологічні характеристики	Виділено варденафілу, %	Метрологічні характеристики
1	2	3	4	5
Метод О.О. Васильєвої	25,00 26,43 27,00 27,20 28,30	$\bar{X} = 26,79$ $S = 1,21$; $S_{\bar{x}} = 0,54$ $RSD_x = 4,51$ $\Delta X = \pm 1,50$; $\varepsilon = \pm 5,6 \%$	26,06 26,45 27,18 27,55 28,05	$\bar{X} = 27,06$ $S = 0,81$; $S_{\bar{x}} = 0,36$ $RSD_x = 2,99$ $\Delta X = \pm 1,00$; $\varepsilon = \pm 3,71 \%$

Продовж. табл. 4.1

1	2	3	4	5
Метод В.П. Кра- маренка	34,90	$\bar{X} = 36,98$	33,24	$\bar{X} = 35,30$
	36,20	$S = 1,41; S_{\bar{x}} = 0,63$	34,30	$S = 1,66; S_{\bar{x}} = 0,74$
	37,50	$RSD_x = 3,82$	35,10	$RSD_x = 4,69$
	38,00	$\Delta X = \pm 1,75$	36,50	$\Delta X = \pm 2,06$
	38,30	$\varepsilon = \pm 4,73 \%$	37,36	$\varepsilon = \pm 5,83\%$
Метод Стаса-Отто	33,00	$\bar{X} = 33,41$	31,76	$\bar{X} = 33,41$
	33,12	$S = 1,33; S_{\bar{x}} = 0,59$	32,40	$S = 1,32; S_{\bar{x}} = 0,59$
	34,50	$RSD_x = 3,86$	33,66	$RSD_x = 3,96$
	36,00	$\Delta X = \pm 1,65$	34,23	$\Delta X = \pm 1,65$
	36,20	$\varepsilon = \pm 4,8 \%$	35,00	$\varepsilon = \pm 4,92 \%$

Виходячи з даних, представлених в таблиці 4.1, можна зробити висновок, що водою, підкисленою сульфатною кислотою (метод В.П. Крамаренка) ізолюється 35-38 % силденафілу і 33-37 % варденафілу; водою, підкисленою оксалатною кислотою (метод О.О. Васильєвої), ізолюється 25-28 % силденафілу та 26-28 % варденафілу. Методом Стаса-Отто (підкисленим етанолом) виділяється 33-36 % силденафілу та 31-35 % варденафілу. Оскільки з використанням класичних методів ступінь виділення силденафілу і варденафілу є невисоким, нами опрацьовано оптимальну методику виділення цих сполук, яку можна використати при направленому хіміко-токсикологічному аналізі на дані речовини.

4.2 Розробка методики виділення силденафілу та варденафілу з модельних проб печінки підкисленим ацетонітрилом

З метою розробки оптимальної методики виділення силденафілу та варденафілу із біологічного матеріалу ми вивчили вплив природи ізолюючої рідини на ступінь їх виділення. Як ізолюючі рідини були взяті 30 % розчин ацетатної кислоти, ацетонітрил, ацетонітрил у суміші з 30 % ацетатною кислотою (1:3), ацетонітрил у суміші з 35 % перхлоратною кислотою, взятих

у об'ємних співвідношеннях 1:1 та 1:3, і ацетонітрил у суміші з 70 % перхлоратною кислотою (1:1).

Ізолювання силденафілу і варденафілу проводили з модельних проб печінки масою по 20 г кожна, в які вносили по 500 мкг силденафілу чи варденафілу. Зразки біологічного матеріалу із внесеними препаратами досліджували через 24 год.

Біологічний матеріал настоювали 2 рази по 1 год з відповідною ізолюючою рідиною, після чого витяжки доводили 30 % розчином натрію гідроксиду до рН = 8,0 (при дослідженні проб із силденафілом) і рН = 7,5 (при дослідженні проб із варденафілом). Контроль рН здійснювали рН-метром моделі ОР-110. Екстрагували досліджувані речовини 1,2-дихлоретаном (двічі, порціями по 10 мл).

Дихлоретанові екстракти із кожної порції біологічного матеріалу об'єднували і використовували для кількісного визначення силденафілу і варденафілу.

Силденафіл в отриманих пробах визначали УФ-спектрофотометрично. Для цього 5 мл дихлоретанових екстрактів випаровували в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5 мл метанолу і вимірювали оптичну густину при $\lambda = 292$ нм ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 272$) (див. розділ 2.3.2).

Кількісне визначення варденафілу проводили методом флуориметрії. Для цього 2 мл дихлоретанових екстрактів випаровували в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5 мл ацетонітрилу і вимірювали інтенсивність флуоресценції при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 285/450$ нм (див. розділ 2.4.2).

Результати експериментальних значень наведено в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Вплив природи ізолюючої рідини на ступінь виділення силденафілу та варденафілу із зразків біологічного матеріалу (n = 5)

Препарат	Ступінь виділення, %					
	30 % CH ₃ COOH	ацето- нітрил	ацето- нітрил- 30 % CH ₃ COOH (1:3)	ацето- нітрил- 35 % HClO ₄ (1:3)	ацето- нітрил- 35 % HClO ₄ (1:1)	ацето- нітрил- 70 % HClO ₄ (1:1)
Силденафіл	17,23	21,15	23,10	40,20	35,30	47,00
Варденафіл	14,35	20,00	18,44	37,05	34,10	45,25

Представлені результати свідчать, що максимальні кількості силденафілу та варденафілу ізолюються з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1), яка була використана нами в подальших дослідженнях.

Методика виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1).

Для ізолювання силденафілу та варденафілу готували модельні суміші, що містили по 20 г подрібненої тканини печінки, в які вносили по 100, 200, 300, 400 та 500 мкг кожного із препаратів. Проби біологічного матеріалу витримували при 4 °С протягом 24 год, після чого досліджували.

В модельні проби вносили по 10 мл ацетонітрилу і 70 % перхлоратної кислоти, взятих в об'ємних співвідношеннях 1:1. Досліджувані проби поміщали в механічний струшувач. Настоювання біологічного матеріалу тривало 1 год.

Після цього витяжку зливали, а біологічний матеріал повторно настоювали 1 годину при струшуванні з 10 мл суміші ацетонітрилу з 70 % перхлоратною кислотою (1:1). Витяжки об'єднували і центрифугували (15 хв при 5000 об/хв). Центрифугати переносили в ділительні лійки, доводили 30 % розчином натрію гідроксиду до рН 8,0 (для силденафілу) і до рН 7,5 (для

варденафілу). Контроль рН здійснювали рН-метром моделі ОР-110. Екстракцію силденафілу і варденафілу проводили 1,2-дихлоретаном (двічі, порціями по 10 мл, тривалість однієї екстракції 10 хв). Дихлоретанові фракції відокремлювали, об'єднували та випаровували досуха у вакуумному випаровувачі (при 40 °С). Сухі залишки кількісно розчиняли в 5 мл метанолу.

Очистка метанольних розчинів сухих залишків на картриджах Oasis.

Метанольний розчин сухого залишку об'ємом 2 мл упарювали в потоці азоту до об'єму 0,4 мл, після чого розводили пробу водою до 2 мл. Очищення отриманого розчину проводили на картриджах Oasis HLB наступним чином:

1. кондиціонування сорбенту 1 мл 96 % етанолу та 1 мл води дистильованої;
2. завантаження всього зразка;
3. промивання сорбенту 2 мл універсального буферного розчину (рН = 7,4) та 1 мл води дистильованої; після чого сорбент висушували в потоці азоту;
4. елюювання силденафілу чи варденафілу 2 мл 96 % етанолу.

Швидкість пропускання всіх рідин через сорбент 1мл/хв.

4.2.1 Кількісне визначення силденафілу та варденафілу в модельних пробах печінки

Кількісний вміст силденафілу та варденафілу в етанольних елюатах визначали методом ГХ/МС; а також силденафіл визначали методом УФ-спектрофотометрії, а варденафіл – методом флуориметрії.

Визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС: по 0,5 мл етанольних елюатів, отриманих після очищення проб методом ТФЕ, випаровували досуха в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5 мл метанолу.

Для аналізу проб методом ГХ/МС по 200 мкл метанольного розчину розводили метанолом до 2000 мкл. В отриманих розчинах кількісно визначали силденафіл та варденафіл методом ГХ/МС (див. розд. 2.5.2).

УФ-спектрофотометричне визначення силденафілу в елюаті: по 1,5 мл етанольних елюатів, отриманих після очищення проб методом ТФЕ, доводили 96 % етанолом до 4 мл та вимірюли значення оптичної густини отриманого розчину при 292 нм ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 316$). За значенням оптичної густини розраховували кількість силденафілу у пробі (див. розділ 2.3.2).

При проведенні флуориметричного визначення варденафілу по 0,5 мл етанольних елюатів, отриманих при очищенні проб методом ТФЕ, випаровували досуха в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5 мл ацетонітрилу. Інтенсивність флуоресценції ацетонітрильних розчинів вимірювали при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 285/450$ нм. Кількісний вміст варденафілу розраховували за рівнянням $Y = 19,948 \cdot X + 0,190$, де: Y – інтенсивність випромінюваної флуоресценції (мм), X – концентрація варденафілу в пробі (мкг/мл) (див. розділ 2.4.2).

Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в пробах модельних зразків біологічного матеріалу представлено в таблицях 4.3 та 4.4.

Таблиця 4.3

Результати виділення силденафілу з модельних зразків тканини печінки ацетонітрилом у суміші з 70 % перхлоратною кислотою (n=5)

Внесено силденафілу до 20 г біологічного матеріалу, мкг	Визначено			
	Методом УФ-спектрофотометрії		Методом ГХ/МС	
	мкг	%	мкг	%
1	2	3	4	5
100	46,07	46,07	46,50	46,50
200	92,98	46,49	92,96	46,48
300	143,82	47,94	143,88	47,96
400	192,24	48,06	192,28	48,07
500	243,00	48,60	243,20	48,64

Продовж. табл. 4.3

1	2	3	4	5
		$\bar{X} = 47,43$ $S = 1,09$ $S_{\bar{x}} = 0,49$ $RSD_x = 2,30$ $\Delta X = \pm 1,36$ $\varepsilon = \pm 2,86 \%$		$\bar{X} = 47,53$ $S = 0,98$ $S_{\bar{x}} = 0,44$ $RSD_x = 2,07$ $\Delta X = \pm 1,22$ $\varepsilon = \pm 2,57\%$

Таблиця 4.4

Результати виділення варденафілу з модельних зразків тканини печінки ацетонітрилом у суміші з 70 % перхлоратною кислотою (n=5)

Внесено варденафілу до 20 г біологічного матеріалу, мкг	Визначено			
	Методом флуориметрії		Методом ГХ/МС	
	мкг	%	мкг	%
100	45,50	45,50	45,75	45,75
200	92,04	46,02	92,00	46,00
300	139,02	46,34	139,05	46,35
400	190,52	47,63	190,60	47,65
500	240,00	48,00	240,15	48,03
		$\bar{X} = 46,70$ $S = 1,07$ $S_{\bar{x}} = 0,48$ $RSD_x = 2,29$ $\Delta X = \pm 1,33$ $\varepsilon = \pm 2,85 \%$		$\bar{X} = 46,76$ $S = 1,02$ $S_{\bar{x}} = 0,46$ $RSD_x = 2,18$ $\Delta X = \pm 1,27$ $\varepsilon = \pm 2,72\%$

Як видно з результатів, представлених в таблицях 4.3 та 4.4, з модельних зразків біологічного матеріалу ацетонітрилом у суміші з 70 % перхлоратною кислотою (1:1) та підготовці проб до аналізу з використанням методу ТФЕ, можна виділити 46-48 % силденафілу та 45-48 % варденафілу.

4.3 Виділення силденафілу та варденафілу з біологічних рідин організму

Проведено дослідження із вибору оптимальних умов ізолювання силденафілу та варденафілу із біологічних рідин. Як біологічні рідини було

використано цільну кров, плазму та сечу. При розробці методик ізолювання враховували їх універсальність, тобто можливість використання для виявлення та кількісного визначення силденафілу і варденафілу, як при проведенні клінічних, токсикологічних, так і судово-хімічних досліджень.

Цільну кров та плазму отримували у Львівському обласному центрі служби крові. Кров не містила консервантів і відразу використовувалась для виготовлення модельних проб. Плазму зберігали в замороженому вигляді при -30°C .

Сечу брали в осіб, які не приймали лікарських засобів і зберігали її при $4-8^{\circ}\text{C}$ не більше 7 діб.

4.3.1 Виділення силденафілу та варденафілу із крові з використанням рідинної екстракції

Приготування модельних сумішей крові. До 5 мл крові вносили по 1,0 мл водних розчинів силденафілу із концентрацією 30; 50; 100; 150 і 200 мкг/мл. Аналогічним чином готували модельні проби крові із варденафілом. Дослідження модельних зразків проводили через 2 год після їх виготовлення. При цьому проби зберігали при 4°C .

Паралельно готували контрольні проби, що містили 5 мл крові та 1 мл води.

Методика виділення силденафілу та варденафілу з крові. У модельні зразки вносили по 5 мл дистильованої води та по 10 мл суміші ацетонітрилу з 70 % перхлоратною кислотою (1:1). Пробі настоювали протягом 1 години при струшуванні. Суміші центрифугували (15 хв при 5000 об/хв), центрифугат зливали, а осад ще раз настоювали протягом 30 хв з 5 мл суміші ацетонітрилу з 70 % перхлоратною кислотою (1:1) і знову центрифугували. Центрифугати об'єднували та доводили 30 % розчином натрію гідроксиду до рН 8,0 (для силденафілу) і до рН 7,5 (для варденафілу). Контроль рН здійснювали рН-метром. Із підлужнених проб екстрагували силденафіл та варденафіл

1,2- дихлоретаном двічі, порціями по 10 мл. Дихлоретанові фракції об'єднували та випаровували досуха у вакуумному випаровувачі при 40 °С.

Сухі залишки розчиняли в 2 мл метанолу. Метанольні розчини упарювали до 0,4 мл, вносили по 1,6 мл дистильованої води та отримані розчини додатково очищали на картриджах Oasis HLB за схемою, описаною в розділі 4.2. Елюювали досліджувані сполуки із сорбенту етанолом. Кінцевий об'єм етанольних елюатів становив 2 мл.

В отриманих елюатах кількісно визначали силденафіл і варденафіл методом ГХ/МС, а також проводили визначення силденафілу методом УФ-спектрофотометрії, а варденафілу – методом флуоресцентної спектрометрії.

При визначенні силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС по 0,5 мл етанольних елюатів, отриманих після очищення проб методом ТФЕ, випаровували досуха в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5 мл метанолу. Для аналізу проб методом ГХ/МС по 200 мкл метанольного розчину розводили метанолом до 2000 мкл. В отриманих розчинах кількісно визначали силденафіл та варденафіл методом ГХ/МС (див. розд. 2.5.2).

При визначенні варденафілу методом флуоресцентної спектрометрії 0,5 мл етанольного елюату випаровували досуха в потоці азоту, а сухий залишок розчиняли в 4 мл ацетонітрилу. В отриманих пробах визначали варденафіл методом флуориметрії так, як описано в розділі 2.4.2.

Для кількісного визначення силденафілу методом УФ-спектрофотометрії до 1,5 мл етанольного елюату вносили 2,5 мл 96 % етанолу і вимірювали оптичну густину цих розчинів при 292 нм. За отриманим значенням оптичної густини визначали вміст силденафілу у пробі (див. розділ 2.3.2).

Результати кількісного визначення силденафілу і варденафілу в пробах, отриманих при ізолюванні досліджуваних сполук з крові ацетонітрилом у суміші з 70 % перхлоратною кислотою (1:1) представлено в таблицях 4.5 та 4.6.

Таблиця 4.5

Результати ізолювання силденафілу з модельних зразків крові сумішшю ацетонітрилу з 70 % перхлоратною кислотою (n=5)

Внесено силденафілу до 5 мл крові, мкг	Визначено силденафілу			
	Методом УФ- спектрофотометрії		Методом ГХ/МС	
	мкг	%	мкг	%
30	13,65	45,50	13,70	45,67
50	22,98	45,96	23,01	46,02
100	47,00	47,00	46,88	46,88
150	70,59	47,06	70,65	47,10
200	94,96	47,48	95,30	47,65
		$\bar{X} = 46,60$		$\bar{X} = 46,66$
		$S = 0,83$		$S = 0,81$
		$S_{\bar{x}} = 0,37$		$S_{\bar{x}} = 0,36$
		$RSD_x = 1,78$		$RSD_x = 1,73$
		$\Delta X = \pm 1,03$		$\Delta X = \pm 1,00$
		$\varepsilon = \pm 2,22 \%$		$\varepsilon = \pm 2,15\%$

Таблиця 4.6

Результати ізолювання варденафілу з модельних зразків крові сумішшю ацетонітрилу з 70 % перхлоратною кислотою (n=5)

Внесено варденафілу до 5 мл крові, мкг	Визначено варденафілу			
	Методом флуориметрії		Методом ГХ/МС	
	мкг	%	мкг	%
30	13,60	45,35	13,63	45,43
50	22,83	45,65	22,85	45,70
100	46,08	46,08	46,12	46,12
150	70,50	47,00	70,55	47,03
200	94,40	47,20	94,44	47,22
		$\bar{X} = 46,26$		$\bar{X} = 46,30$
		$S = 0,81$		$S = 0,70$
		$S_{\bar{x}} = 0,36$		$S_{\bar{x}} = 0,36$
		$RSD_x = 1,76$		$RSD_x = 1,72$
		$\Delta X = \pm 1,01$		$\Delta X = \pm 0,99$
		$\varepsilon = \pm 2,19 \%$		$\varepsilon = \pm 2,14\%$

Як видно з результатів, представлених в таблицях 4.5 та 4.6, із модельних зразків крові ацетонітрилом у суміші з 70 % перхлоратною кислотою (1 об:1об) виділяється 45-47 % силденафілу та варденафілу.

4.3.2 Виділення силденафілу та варденафілу з крові методом ТФЕ

Для проведення цих досліджень готували модельні проби, які містили в 1 мл крові по 50, 100, 200, 300 та 400 нг силденафілу та варденафілу. Модельні проби досліджували через 2 год після виготовлення, при цьому їх зберігали при 4 °С. Паралельно досліджували контрольні проби крові.

Для депротейнізації використовували 10 % розчин цинку сульфату та 96 % етанол. Після осадження білкових компонентів очистку проб проводили на картриджах Oasis HLB (30 mg Waters, USA).

Підготовка модельних зразків крові для проведення твердофазної екстракції на картриджах Oasis HLB.

У модельні зразки проб крові вносили по 1 мл універсального буферного розчину (рН = 7,4). Проби гомогенізували 5 хв, після чого до гомогенізату вносили 0,4 мл 96 % етанолу та 0,2 мл 10 % розчину цинку сульфату. Отриманий осад відокремлювали центрифугуванням (15 хв при 10000 об/хв). Надосадову рідину піддавали очистці методом ТФЕ за схемою, описаною в розділі 4.2.

Отримані етанольні елюати випаровували досуха в потоці азоту, сухі залишки розчиняли в 500 мкл метанолу (кваліфікація «для ВЕРХ grade» (Merck)). В отриманих розчинах паралельно визначали кількості силденафілу і варденафілу методами ГХ/МС (колонка RTX-5) та ВЕРХ/МС (колонка Zorbax SB-C18, режим SIM). Умови кількісного визначення силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ/МС описано в розділі 2.6.2, а методом ГХ/МС – в розділі 2.5.2.

Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в пробах крові, очищених лише методом ТФЕ, представлено в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

**Результати ізолювання силденафілу та варденафілу з модельних зразків
крові методом ТФЕ (n=5)**

Препарат	Внесено препарату до 1 мл крові, нг	Визначено			
		Методом ВЕРХ/МС		Методом ГХ/МС	
		нг	%	нг	%
Силденафіл	50	29,75	59,05	29,45	58,90
	100	59,20	59,20	59,00	59,00
	200	119,60	59,80	119,80	59,90
	300	179,70	59,90	179,70	59,90
	400	240,04	60,01	240,00	60,00
			$\bar{X} = 59,59$		$\bar{X} = 59,54$
			$S = 0,44$		$S = 0,54$
			$S_{\bar{x}} = 0,19$		$S_{\bar{x}} = 0,24$
			$RSD_x = 0,73$		$RSD_x = 0,91$
			$\Delta X = \pm 0,54$		$\Delta X = \pm 0,67$
			$\varepsilon = \pm 0,91 \%$		$\varepsilon = \pm 1,13\%$
Варденафіл	50	29,35	58,70	29,40	58,80
	100	58,95	58,95	58,90	58,90
	200	118,86	59,43	118,46	59,23
	300	179,70	59,90	179,85	59,95
	400	239,80	59,95	240,16	60,04
			$\bar{X} = 59,39$		$\bar{X} = 59,38$
			$S = 0,56$		$S = 0,58$
			$S_{\bar{x}} = 0,24$		$S_{\bar{x}} = 0,30$
			$RSD_x = 0,94$		$RSD_x = 0,98$
			$\Delta X = \pm 0,69$		$\Delta X = \pm 0,72$
			$\varepsilon = \pm 1,17 \%$		$\varepsilon = \pm 1,22\%$

Результати, представлені в таблиці 4.7, свідчать, що після депротейнізації крові 10 % розчином цинку сульфату та 96 % етанолом, з наступною очисткою на картриджах Oasis HLB, виділяється до 59-60 % силденафілу і варденафілу.

4.3.3 Виділення силденафілу та варденафілу з плазми методом ТФЕ на колонках з Н-клиноптилолітом і картриджах Oasis HLB

Підготовка плазми до аналізу методами ВЕРХ/МС та ГХ/МС ґрунтувалась на очищенні проб на картриджах Oasis HLB та сорбційних колонках з Н-клиноптилолітом.

Виготовлення модельних сумішей плазми з силденафілом та варденафілом.

Готували модельні проби, які містили 2 мл плазми і суміш силденафілу та варденафілу. Вміст силденафілу і варденафілу в кожній пробі становив 50, 100, 200, 300 та 400 нг. Отримані проби перемішували 2 хв у змішувачі типу «Vortex». Паралельно готували контрольні проби плазми.

Проведення ТФЕ на картриджах Oasis HLB (30 mg).

Кондиціонування сорбенту проводили 1 мл 96 % етанолу та 1 мл води дистильованої. Пропускали модельні суміші плазми із внесеними кількостями досліджуваних препаратів, після чого сорбент промивали 2 мл універсального буферного розчину (рН = 7,4) та 1 мл води дистильованої. Елюювання досліджуваних сполук проводили 2 мл 96 % етанолу після попереднього висушування сорбенту в потоці азоту.

Швидкість пропускання всіх рідин через сорбент 1мл/хв.

Проведення ТФЕ на сорбційних колонках з Н-клиноптилолітом.

Сорбційні колонки, заповнені Н-клиноптилолітом, кондиціонували 3 мл 96 % етанолу та 4 мл води дистильованої. Підготовка сорбенту і колонок описана у розділі 3.3.2. Пропускали підготовлену пробу плазми з препаратами, після чого сорбент промивали 4 мл води та 2 мл водно-етанольного розчину (1 об : 1 об). Елюювали препарати 4 мл 5 % розчину аміаку в 96 % етанолі. Швидкість пропускання усіх розчинів та плазми через сорбційну колонку 1 мл/хв.

Етанольні елюати і аміачно-етанольні елюати випаровували досуха в струмені азоту, сухі залишки розчиняли в 1000 мкл метанолу (кваліфікація

«для ВЕРХ grade» (Merck)). В отриманих розчинах кількісно визначали силденафіл та варденафіл методом ВЕРХ/МС (колонка Zorbax SB-C18, див. розділ 2.6.2) і методом ГХ/МС (колонка RTX-5, див. розділ 2.5.2).

Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в плазмі наведено в таблицях 4.8 і 4.9.

Таблиця 4.8

**Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу
в плазмі при пробопідготовці на картриджах Oasis HLB (n=5)**

Аналіт	Внесено аналіту, нг	Визначено аналіту			
		Методом ВЕРХ/МС		Методом ГХ/МС	
		нг	%	нг	%
Силденафіл	50	44,17	88,34	44,16	88,32
	100	88,60	88,60	88,55	88,55
	200	178,14	89,07	178,06	89,03
	300	268,95	89,65	268,35	89,45
	400	359,44	89,86	359,12	89,78
			$\bar{X} = 89,10$		$\bar{X} = 89,03$
			$S = 0,65$		$S = 0,61$
			$S_{\bar{x}} = 0,29$		$S_{\bar{x}} = 0,27$
			$RSD_x = 0,73$		$RSD_x = 0,68$
			$\Delta X = \pm 0,81$		$\Delta X = \pm 0,75$
			$\varepsilon = \pm 0,91\%$		$\varepsilon = \pm 0,85\%$
Варденафіл	50	44,07	88,14	44,10	88,20
	100	88,40	88,40	88,45	88,45
	200	177,80	88,90	177,94	88,97
	300	268,05	89,35	268,20	89,40
	400	358,24	89,56	358,64	89,66
			$\bar{X} = 88,87$		$\bar{X} = 88,94$
			$S = 0,60$		$S = 0,62$
			$S_{\bar{x}} = 0,27$		$S_{\bar{x}} = 0,28$
			$RSD_x = 0,68$		$RSD_x = 0,69$
			$\Delta X = \pm 0,75$		$\Delta X = \pm 0,77$
			$\varepsilon = \pm 0,86\%$		$\varepsilon = \pm 0,86\%$

Таблиця 4.9

**Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу
в плазмі при пробопідготовці на колонках з Н-клинотилолітом (n=5)**

Аналіт	Внесено аналіту, нг	Визначено аналіту			
		Методом ВЕРХ/МС		Методом ГХ/МС	
		нг	%	нг	%
Силденафіл	50	38,94	77,88	38,73	77,46
	100	78,35	78,35	77,97	77,97
	200	157,34	78,67	157,20	78,60
	300	238,95	79,65	238,20	79,40
	400	320,24	80,06	320,00	80,00
			$\bar{X} = 78,92$		$\bar{X} = 78,69$
			$S = 0,91$		$S = 1,03$
			$S_{\bar{x}} = 0,41$		$S_{\bar{x}} = 0,46$
			$RSD_x = 1,15$		$RSD_x = 1,31$
			$\Delta X = \pm 1,13$		$\Delta X = \pm 1,28$
			$\varepsilon = \pm 1,43 \%$		$\varepsilon = \pm 1,63 \%$
Варденафіл	50	38,53	77,06	38,50	77,00
	100	77,86	77,86	77,75	77,75
	200	156,00	78,00	156,00	78,00
	300	236,25	78,75	235,50	78,50
	400	316,40	79,10	316,40	79,10
			$\bar{X} = 78,15$		$\bar{X} = 78,07$
			$S = 0,80$		$S = 0,79$
			$S_{\bar{x}} = 0,36$		$S_{\bar{x}} = 0,35$
			$RSD_x = 1,02$		$RSD_x = 1,01$
			$\Delta X = \pm 0,99$		$\Delta X = \pm 0,98$
			$\varepsilon = \pm 1,27 \%$		$\varepsilon = \pm 1,26 \%$

Як видно з даних, наведених в таблицях 4.8 і 4.9, при ізолюванні силденафілу та варденафілу з плазми на картриджах Oasis HLB (30 mg) виділяється до 89 % силденафілу та до 88 % варденафілу, а на сорбційних колонках з Н-клинотилолітом ступінь виділення двох досліджуваних сполук становить 78-79 %.

4.4 Ізолювання силденафілу та варденафілу з сечі

Згідно даних літератури з сечею виводиться до 13 % силденафілу та 2 - 6 % варденафілу від кількості прийнятої перорально дози, тому рівень концентрації силденафілу та варденафілу в цій біологічній матриці є досить низьким [55, 121].

Сеча не вимагає особливих умов підготовки проб, оскільки містить незначну кількість білкових компонентів. За рахунок невисокої метаболічної активності в сечі концентрація досліджуваних речовин зберігається значно довше, ніж в інших рідинах та органах.

Виготовлення модельних сумішей сечі. До 5 мл сечі вносили по 50, 100; 200, 300 та 400 нг силденафілу чи варденафілу. Проби перемішували 3 хв у змішувачі типу «Vortex», після чого інкубували при 37 °С протягом 60 хв.

Паралельно готували контрольні проби сечі.

Методика ізолювання силденафілу та варденафілу з модельних сумішей сечі. Сечу доводили 30 % розчином натрію гідроксиду до рН 8,0 (для силденафілу) і до рН 7,5 (для варденафілу). Контроль рН здійснювали рН-метром. Із підлужнених проб екстрагували силденафіл та варденафіл 1,2- дихлоретаном двічі, порціями по 5 мл, тривалість однократної екстракції 10 хв. Об'єднані дихлоретанові фракції випаровували досуха. Сухий залишок розчиняли в 0,4 мл метанолу та доводили водою дистильованою до 2 мл. Весь об'єм метанольно-водного розчину очищали на картриджах Oasis HLB (30 mg) за схемою, наведеною в розділі 4.2.

Отриманий етанольний елюат випаровували досуха в потоці азоту та розчиняли в 1000 мкл метанолу (кваліфікація «для ВЕРХ grade» (Merck)).

В отриманому розчині кількісно визначали силденафіл та варденафіл методом ВЕРХ/МС (колонка Zorbax SB-C18, див. розділ 2.6.2) і методом ГХ/МС (колонка RTX-5, див. розділ 2.5.2).

Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в отриманих пробах наведено в таблицях 4.10 і 4.11.

Таблиця 4.10

Результати ізолювання силденафілу з модельних проб сечі (n=5)

Внесено силденафілу, нг	Визначено			
	Методом ВЕРХ/МС		Методом ГХ/МС	
	нг	%	нг	%
50	34,18	68,36	34,08	68,16
100	68,86	68,86	68,60	68,60
200	138,00	69,00	137,90	68,95
300	207,45	69,15	207,30	69,10
400	277,60	69,40	277,30	69,30
		$\bar{X} = 68,95$ $S = 0,39; S_{\bar{x}} = 0,17$ $RSD_x = 0,56$ $\Delta X = \pm 0,48$ $\varepsilon = \pm 0,70 \%$		$\bar{X} = 68,82$ $S = 0,45; S_{\bar{x}} = 0,20$ $RSD_x = 0,65$ $\Delta X = \pm 0,56$ $\varepsilon = \pm 0,81 \%$

Таблиця 4.11

Результати ізолювання варденафілу з модельних проб сечі (n=5)

Внесено варденафілу, нг	Визначено			
	Методом ВЕРХ/МС		Методом ГХ/МС	
	нг	%	нг	%
50	33,67	67,34	33,58	67,16
100	67,50	67,50	67,60	67,60
200	135,70	67,85	135,74	67,87
300	200,00	68,00	204,00	68,00
400	274,00	68,50	273,80	68,45
		$\bar{X} = 67,84$ $S = 0,45; S_{\bar{x}} = 0,20$ $RSD_x = 0,67$ $\Delta X = \pm 0,57$ $\varepsilon = \pm 0,83 \%$		$\bar{X} = 67,82$ $S = 0,48; S_{\bar{x}} = 0,21$ $RSD_x = 0,71$ $\Delta X = \pm 0,59$ $\varepsilon = \pm 0,88 \%$

Як видно з даних, наведених в таблицях 4.10 і 4.11, при використанні рідинної екстракції у поєднанні із ТФЕ на картриджах Oasis HLB з сечі можна виділити 68-69 % силденафілу та 67-68 % варденафілу.

Дані дослідження та їх результати описано нами в публікаціях [16, 19-20, 22, 26-27, 30, 119-120, 174].

Висновки до розділу 4

1. Порівнюючи результати, отримані при ізолюванні силденафілу та варденафілу із тканини печінки класичними методами встановлено, що водою, підкисленою сульфатною кислотою (метод В.П. Крамаренка) і підкисленим етиловим спиртом (метод Стаса-Отто) виділяється 35-38 % і 33-36 % силденафілу. Варденафіл за цими методиками виділяється у кількостях 33 - 37 % та 31-35 % відповідно. Менший ступінь виділення досліджуваних сполук водою, підкисленою оксалатною кислотою (метод О.О. Васильєвої) – при цьому із тканини печінки виділяється до 28 % силденафілу і варденафілу.

2. Розроблено ефективну і експресну методику виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу ацетонітрилом у суміші із 70 % перхлоратною кислотою (1:1). Очищення витяжок проведено методом рідинної екстракції та ТФЕ на картриджах Oasis HLB. В зазначених умовах із тканини печінки виділяється до 48 % силденафілу та варденафілу.

3. Розроблено дві методики ізолювання силденафілу та варденафілу із крові, придатні для цілей судово-хімічного аналізу і клінічних лабораторних досліджень. При ізолюванні досліджуваних сполук із крові ацетонітрилом у суміші з 70 % перхлоратною кислотою, виділяється 45-47 % силденафілу і варденафілу. Із застосуванням осадження білкової фракції 10 % цинку сульфатом та 96 % етанолом і наступною пробопідготовкою методом ТФЕ з крові ізолюється до 59- 60 % силденафілу і варденафілу.

4. Розроблено методики ізолювання силденафілу та варденафілу з плазми крові методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB (30 мг) та на сорбційних колонках з Н-клиноптилолітом. Із застосуванням картриджів Oasis HLB із плазми ізолюється до 89 % силденафілу та 88 % варденафілу, а на сорбційних колонках з Н-клиноптилолітом ізолюється 78-79 % досліджуваних сполук.

5. Запропоновано методику ізолювання досліджуваних препаратів із сечі з використанням рідинної та твердофазної екстракції. При цьому із сечі виділяється 68-69 % силденафілу та 67-68 % варденафілу.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Методи виділення силденафілу з біологічного матеріалу. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2013. №3-4. С.42-45. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
2. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вплив рН середовища на ізолювання силденафілу з плазми Н-клиноптилолітом. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24 (3). Київ. С. 127 - 132. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
3. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2015. №1-2. С. 124-128. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
4. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові. *Одеський медичний журнал*. 2016. №2. С.16-20. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
5. Validation of an HPLC-MS method for the determinatin of vardenafil in rat urine / L. Osypchuk, I. Halkevych, S. Davydovych, Y. Bidnychenko. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019.Vol. 9(08). P. 79–85. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, участь у написанні статті)*.

6. Осипчук Л.И., Галькевич И. И. Влияние типа сорбента метода твердофазной экстракции на степень выделения силденафила из плазмы крови. *Университетская наука: взгляд в будущее*: Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета (7 февраля 2020 года): в 2 т., Курский гос. мед. ун-т; под ред. В.А. Лазаренко. Курск: КГМУ, 2020. Т. I. С. 757-761. (*Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті*).
7. Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Осипчук Л.І., Галькевич І.Й. Інформаційний лист № 268-2017. Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2017 (Протокол № 102 від 19.04.2017 р.).
8. Osypchuk L. Determination of sildenafil in biological fluids. *Pharmaceutical Sciences in XXI Century: collection of scientific worcs II International Scientific Conferens*, 2-4 may, 2014. Tbilisi, Georgia, 2014. P. 157-158.
9. Osypchuk L. 4. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood. The 6th international pharmaceutical conference *Science and practice 2015*: Proc. Sci. pract. Conf. November 5-6, 2015. Kaunas, Lithuania, 2015. P. 46.
10. Осипчук Л. І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу. *Аналітична хімія у фармації*: матеріали II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф. 17 бер. 2016 р. Харків, 2016. С. 38.

РОЗДІЛ 5

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ ТА ВАРДЕНАФІЛУ МЕТОДАМИ ГХ/МС І ВЕРХ/МС В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

Проведена валідація методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС в біологічних об'єктах. В процесі проведення валідації визначались критерії, необхідні для забезпечення відтворюваності і надійності аналітичних результатів: селективність/специфічність, лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність, матричний ефект, відтворюваність та стабільність [6, 9, 31, 51].

Дослідження проводились у відповідності до положень та рекомендацій МОЗ України [3], FDA [81] і ЕМА [85]. Визначення проводили із використанням біологічних матриць: плазми (2 мл), сечі (5 мл) та печінки гомогенізованої до 1-2 мм (5 г).

При кожному із визначень готували по 3 паралельні проби із внесеними кількостями силденафілу і варденафілу та контрольні проби.

При вивченні валідаційних критеріїв кількісного визначення силденафілу методом ГХ/МС в зразки біологічних матриць вносили від 20 до 2000 нг препарату на пробу, а методом ВЕРХ/МС – від 25 до 2000 нг препарату на пробу.

При вивченні валідаційних критеріїв кількісного визначення варденафілу готували проби біологічних матриць, які містили від 60 до 600 нг (при дослідженні методом ГХ/МС) та від 40 до 600 нг (при визначенні методом ВЕРХ/МС) даної сполуки.

Виділення силденафілу та варденафілу із відібраних біологічних об'єктів проводили за методиками, описаними у розділах 4.2, 4.3.3 та 4.4.

Підготовку проб із біологічних матриць до аналізу методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС здійснювали методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB (див. розд. 4.2). Отримані етанольні елюати випаровували досуха, сухі залишки розчиняли в 1000 мкл метанолу класу для ВЕРХ grade (Merck). Для дослідження проб методом ГХ/МС та ВЕРХ/МС використовували по 500 мкл отриманих метанольних розчинів. При цьому визначали кількості досліджуваних сполук у всій пробі біологічної матриці.

5.1 Визначення валідаційних параметрів «селективність/специфічність» при кількісному визначенні силденафілу і варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС

Селективність – це властивість методу визначати досліджуваний аналіт, в присутності інших компонентів біологічної проби (продуктів розпаду білкової природи, гормонів, ферментів, жирів, тощо) запропонованими методами аналізу.

При визначенні селективності аналізували зразки плазми (2 мл), сечі (5 мл) та тканини печінки (5 г) без внесених препаратів, а також із внесеними силденафілом та варденафілом. При дослідженні проб методом ГХ/МС вміст силденафілу у відповідній біологічній матриці становив 20 нг, а варденафілу – 60 нг. При аналізі проб методом ВЕРХ/МС вміст силденафілу становив 25 нг, а варденафілу – 40 нг у відповідній біологічній матриці.

Результати визначення параметрів селективність/специфічність при аналізі проб плазми, сечі та тканини печінки наведено в таблиці 5.1.

Хроматограми контрольних проб та модельних зразків біологічного матеріалу з досліджуваними сполуками, отримані при аналізі методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС, наведено в додатку А.

Таблиця 5.1

Валідаційні параметри селективність/специфічність методик ГХ/МС та ВЕРХ/МС визначення силденафілу та варденафілу у плазмі, сечі та тканині печінки

Біологічний об'єкт	Метод аналізу	№ проби	Силденафіл (нижня межа кількісного визначення)			Варденафіл (нижня межа кількісного визначення)		
			площа піку	час утримування, хв	% впливу	площа піку	час утримування, хв	% впливу
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Плазма	ГХ/МС	1	$1,29058 \cdot 10^5$	19,491	відсутній	$2,5463 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		2	$1,29060 \cdot 10^5$	19,493	відсутній	$2,5465 \cdot 10^4$	22,770	відсутній
		3	$1,29061 \cdot 10^5$	19,492	відсутній	$2,5464 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		4	$1,29063 \cdot 10^5$	19,493	відсутній	$2,5462 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
		5	$1,29058 \cdot 10^5$	19,491	відсутній	$2,5461 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		6	$1,29061 \cdot 10^5$	19,492	відсутній	$2,5464 \cdot 10^4$	22,770	відсутній
		7	$1,29059 \cdot 10^5$	19,493	відсутній	$2,5463 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		8	$1,29062 \cdot 10^5$	19,492	відсутній	$2,5466 \cdot 10^4$	22,770	відсутній
		9	$1,29059 \cdot 10^5$	19,491	відсутній	$2,5465 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		10	$1,29062 \cdot 10^5$	19,492	відсутній	$2,5462 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
	ВЕРХ/МС	1	$2,59126 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$3,49078 \cdot 10^5$	5,529	відсутній
		2	$2,59127 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$3,49077 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		3	$2,59128 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$3,49079 \cdot 10^5$	5,530	відсутній
		4	$2,59126 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$3,49077 \cdot 10^5$	5,529	відсутній
		5	$2,59127 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$3,49078 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		6	$2,59128 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$3,49079 \cdot 10^5$	5,530	відсутній

Продовж. табл 5.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сеча		7	$2,59127 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$3,49078 \cdot 10^5$	5,529	відсутній
		8	$2,59126 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$3,49077 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		9	$2,59127 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$3,49078 \cdot 10^5$	5,530	відсутній
		10	$2,59128 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$3,49079 \cdot 10^5$	5,529	відсутній
	ГХ/МС	1	$9,7051 \cdot 10^4$	19,492	відсутній	$4,9033 \cdot 10^4$	22,770	відсутній
		2	$9,7052 \cdot 10^4$	19,491	відсутній	$4,9036 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
		3	$9,7053 \cdot 10^4$	19,492	відсутній	$4,9036 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		4	$9,7052 \cdot 10^4$	19,493	відсутній	$4,9035 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
		5	$9,7049 \cdot 10^4$	19,491	відсутній	$4,9034 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		6	$9,7049 \cdot 10^4$	19,492	відсутній	$4,9032 \cdot 10^4$	22,770	відсутній
		7	$9,7051 \cdot 10^4$	19,491	відсутній	$4,9034 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		8	$9,7050 \cdot 10^4$	19,493	відсутній	$4,9035 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
		9	$9,7051 \cdot 10^4$	19,491	відсутній	$4,9034 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		10	$9,7049 \cdot 10^4$	19,492	відсутній	$4,9036 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
	ВЕРХ/МС	1	$1,94345 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$2,58779 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		2	$1,94346 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$2,58780 \cdot 10^5$	5,530	відсутній
		3	$1,94344 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$2,58778 \cdot 10^5$	5,529	відсутній
		4	$1,94343 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$2,58779 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		5	$1,94356 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$2,58780 \cdot 10^5$	5,530	відсутній
		6	$1,94343 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$2,58779 \cdot 10^5$	5,529	відсутній
		7	$1,94342 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$2,58780 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		8	$1,94344 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$2,58778 \cdot 10^5$	5,530	відсутній

Продовж. табл 5.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Печінка		9	$1,94345 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$2,58778 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		10	$1,94342 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$2,58779 \cdot 10^5$	5,530	відсутній
	ГХ/МС	1	$6,7967 \cdot 10^4$	19,492	відсутній	$3,6630 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
		2	$6,7965 \cdot 10^4$	19,491	відсутній	$3,6631 \cdot 10^4$	22,770	відсутній
		3	$6,7962 \cdot 10^4$	19,492	відсутній	$3,6632 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		4	$6,7966 \cdot 10^4$	19,493	відсутній	$3,6633 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
		5	$6,7966 \cdot 10^4$	19,491	відсутній	$3,6631 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
		6	$6,7965 \cdot 10^4$	19,492	відсутній	$3,6629 \cdot 10^4$	22,770	відсутній
		7	$6,7964 \cdot 10^4$	19,493	відсутній	$3,6630 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		8	$6,7963 \cdot 10^4$	19,491	відсутній	$3,6631 \cdot 10^4$	22,770	відсутній
		9	$6,7963 \cdot 10^4$	19,491	відсутній	$3,6632 \cdot 10^4$	22,768	відсутній
		10	$6,7966 \cdot 10^4$	19,492	відсутній	$3,6629 \cdot 10^4$	22,769	відсутній
	ВЕРХ/МС	1	$1,35453 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$1,79649 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		2	$1,35453 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$1,79652 \cdot 10^5$	5,530	відсутній
		3	$1,35452 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$1,79651 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		4	$1,35454 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$1,79649 \cdot 10^5$	5,530	відсутній
		5	$1,35452 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$1,79650 \cdot 10^5$	5,529	відсутній
		6	$1,35452 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$1,79650 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		7	$1,35453 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$1,79649 \cdot 10^5$	5,530	відсутній
		8	$1,35454 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$1,79650 \cdot 10^5$	5,529	відсутній
		9	$1,35453 \cdot 10^5$	6,004	відсутній	$1,79651 \cdot 10^5$	5,528	відсутній
		10	$1,35454 \cdot 10^5$	6,005	відсутній	$1,79649 \cdot 10^5$	5,530	відсутній

Встановлено, що на хроматограмах контрольних проб плазми, сечі та печінки не виписувались піки з часом утримування, які б відповідали силденафілу чи варденафілу при аналізі методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС, тому розроблені методики є коректними щодо валідаційного параметру селективність/специфічність.

5.2. Визначення валідаційного параметру «ефект матриці» при кількісному визначенні силденафілу та варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС

Ефект матриці – це пряма або непряма зміна в сигналі приладу через присутність інших сполук, які впливають на іонізацію аналіту.

При дослідженні даного критерію готували по 6 паралельних проб, що містили по 2 мл плазми, по 5 мл сечі та по 5 г тканини печінки. Підготовка проб до аналізу проводилась згідно розроблених методик (див. розд. 4.2; 4.3.3; 4.4).

Для встановлення впливу матриці на результат визначення силденафілу та варденафілу, у проби, отримані після їх очищення методом ТФЕ (див. розд. 4.2) вносили силденафіл та варденафіл у кількостях, які відповідають нижній межі кількісного визначення методом ГХ/МС чи ВЕРХ/МС.

На отриманих хроматограмах визначали площі піків проб із внесеними стандартними розчинами препаратів та площі піків чистих стандартних розчинів вказаних концентрацій.

Ефект матриці (ME) розраховували за формулою [3]:

$$ME = \frac{A_1}{A_{ст}} \cdot 100 \% \quad (5.1),$$

де: A_1 – площа піку проби із внесеною сполукою після її підготовки до аналізу;

$A_{ст}$ – площа піку стандартного розчину силденафілу чи варденафілу.

Результати вивчення матричного ефекту наведено в таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Значення матричного ефекту при визначенні вмісту силденафілу та варденафілу методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС в біологічних матрицях

Біологічна матриця	Номер проби	Матричний ефект, %			
		Силденафіл		Варденафіл	
		ГХ/МС	ВЕРХ/МС	ГХ/МС	ВЕРХ/МС
Плазма	1	99,32	99,85	99,44	99,84
	2	100,06	100,00	100,04	99,65
	3	99,43	99,56	99,56	100,00
	4	100,03	100,00	100,03	100,05
	5	99,68	100,03	99,42	99,40
	6	99,45	99,45	99,15	99,92
ME _{сер.} , %		99,66 ± 0,34	99,82 ± 0,26	99,61 ± 0,38	99,81 ± 0,26
CV, %		0,32	0,26	0,36	0,25
Печінка	1	99,1	98,56	99,16	98,92
	2	98,04	99,33	98,75	99,18
	3	98,23	98,00	98,67	98,68
	4	99,37	98,30	99,56	98,51
	5	98,46	98,43	98,19	98,43
	6	99,43	99,03	99,45	99,56
ME _{сер.} , %		98,77 ± 0,63	98,61 ± 0,51	98,96 ± 0,55	98,88 ± 0,45
CV, %		0,61	0,50	0,53	0,44
Сеча	1	99,11	99,13	99	99,28
	2	100,11	100	100,12	100,02
	3	99,64	99,67	99,5	99,8
	4	100,00	100,05	100,05	100,00
	5	99,55	99,4	99,05	99,53
	6	99,23	99,92	99,33	99,9
ME _{сер.} , %		99,61 ± 0,42	99,70 ± 0,39	99,50±0,51	99,76±0,31
CV, %		0,40	0,39	0,49	0,29

Коефіцієнт варіації CV, %, розрахований для 6 серій матриці, не має перевищувати 15 %.

Отримані нами результати свідчать, що даний спосіб підготовки біологічних проб до аналізу і очищення дозволяє практично повністю усунути

вплив ендогенних компонентів на результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу методами ГХ/МС чи ВЕРХ/МС.

5.3. Визначення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» при кількісному визначенні силденафілу та варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС

Лінійність - це наявність лінійної залежності аналітичного сигналу від кількості речовини, що визначається в аналізованій пробі в межах досліджуваного даною методикою діапазону концентрацій.

При оцінці лінійності розроблених методик кількісного визначення силденафілу і варденафілу в плазмі крові, сечі та печінці готували модельні суміші. Для цього до 2 мл плазми, 5 мл сечі чи 5 г печінки, гомогенізованої до 1-2 мм, вносили необхідні кількості препаратів.

При оцінці лінійності визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС готували проби із зазначеними біологічними матрицями із вмістом силденафілу 20, 200, 500, 1000, 1500 та 2000 нг (в одній пробі), а вміст варденафілу відповідно становив 60, 100, 200, 400, 500 та 600 нг.

При оцінці лінійності визначення досліджуваних препаратів методом ВЕРХ/МС (режим SIM) вміст силденафілу в кожній із проб біологічної матриці становив 25, 200, 500, 1000, 1500 та 2000 нг, а варденафілу – 40, 100, 200, 400, 500 та 600 нг.

Калібрувальні криві визначення аналітів у різних біологічних матрицях методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС (режим SIM) наведено на рисунках 5.1 та 5.2.

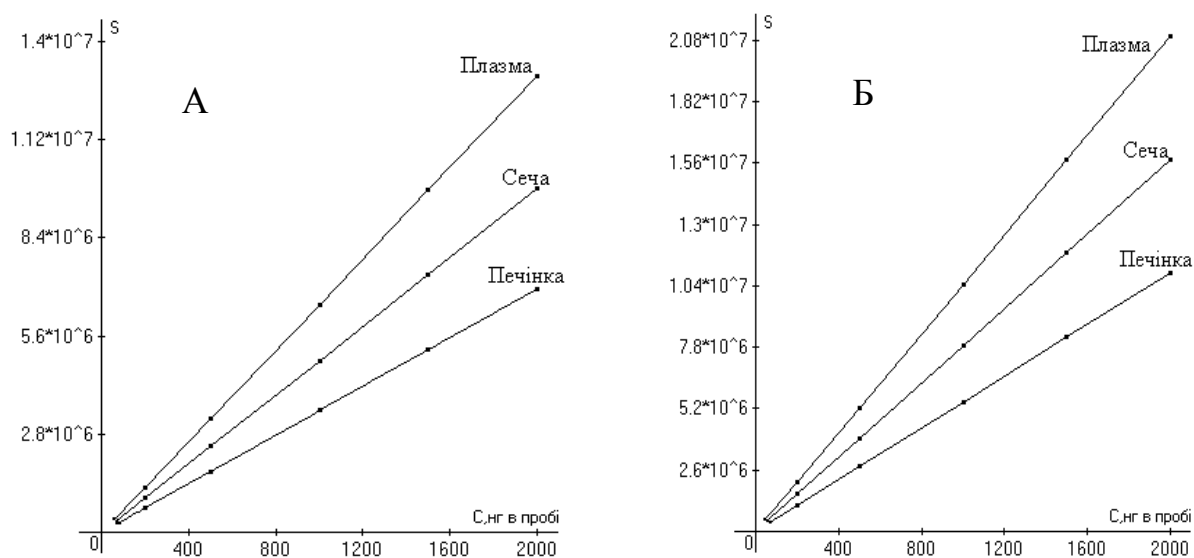


Рис. 5.1 Калібрувальні криві визначення силденафілу в біологічних матрицях методами ГХ/МС (А) та ВЕРХ/МС (Б)

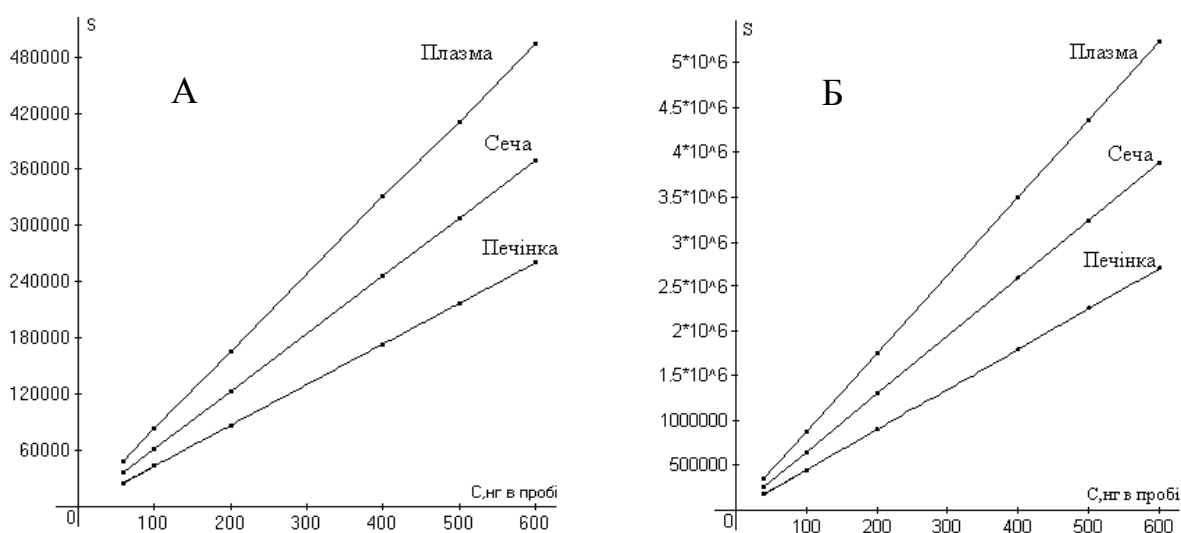


Рис. 5.2 Калібрувальні криві визначення варденафілу в біологічних матрицях методами ГХ/МС (А) та ВЕРХ/МС (Б)

Статистичні параметри визначення досліджуваних препаратів у біологічних матрицях методом ГХ/МС та ВЕРХ/МС наведено в таблицях 5.3 та 5.4.

Таблиця 5.3

**Статистичні параметри визначення силденафілу методами
ГХ/МС та ВЕРХ/МС в біологічних матрицях (n = 5, P = 95 %)**

Метод визначення	Біологічний матеріал	Коефіцієнти		Коефіцієнт кореляції
		a	b	
ГХ/МС	Плазма	$6,509 \cdot 10^3$	$-4,351 \cdot 10^3$	0,9999
	Печінка	$3,472 \cdot 10^3$	$-3,169 \cdot 10^3$	0,9999
	Сеча	$4,902 \cdot 10^3$	$-3,807 \cdot 10^3$	0,9999
ВЕРХ/МС	Плазма	$1,048 \cdot 10^4$	$-1,776 \cdot 10^3$	0,9999
	Печінка	$5,472 \cdot 10^3$	$3,871 \cdot 10^3$	0,9999
	Сеча	$7,888 \cdot 10^3$	$-4,221 \cdot 10^2$	0,9999

Таблиця 5.4

**Статистичні параметри визначення варденафілу методами
ГХ/МС та ВЕРХ/МС в біологічних матрицях (n = 5, P = 95 %)**

Метод визначення	Біологічний матеріал	Коефіцієнти		Коефіцієнт кореляції
		a	b	
ГХ/МС	Плазма крові	$8,224 \cdot 10^2$	$8,600 \cdot 10^2$	0,9999
	Печінка	$4,344 \cdot 10^2$	$-2,934 \cdot 10^2$	0,9999
	Сеча	$6,167 \cdot 10^2$	$-2,438 \cdot 10^2$	0,9999
ВЕРХ/МС	Плазма крові	$8,723 \cdot 10^3$	$1,833 \cdot 10^3$	0,9999
	Печінка	$4,495 \cdot 10^3$	$1,157 \cdot 10^3$	0,9999
	Сеча	$6,485 \cdot 10^3$	$-1,020 \cdot 10^2$	0,9999

Отже, при ГХ/МС визначенні силденафілу в плазмі (2 мл), сечі (5 мл) та тканині печінки (5 г) лінійна залежність спостерігається в межах концентрацій 20-2000 нг, а при визначенні варденафілу – в межах 60-600 нг препарату в пробі.

При визначенні силденафілу в біологічних матрицях методом ВЕРХ/МС лінійність спостерігається в межах 25-2000 нг в пробі, а для варденафілу – від 40 до 600 нг препарату в пробі.

Отримані результати свідчать, що силденафіл та варденафіл можна кількісно визначати в даних об'ємах чи масі біологічної матриці на рівні

концентрацій, які відповідають вмісту досліджуваних сполук в даних біологічних матрицях при прийомі однократної терапевтичної дози, однократної вищої разової дози та супратерапевтичної дози.

5.4 Визначення валідаційних параметрів «правильність і прецизійність» для методик ГХ/МС та ВЕРХ/МС визначення силденафілу і варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки

Правильність (RE) – відображає близькість знайденого за даною методикою значення концентрації досліджуваного препарату до його номінального значення (виражають у відсотках).

Прецизійність – описує ступінь близькості значень повторних вимірювань аналіту. Прецизійність виражається як коефіцієнт варіації (CV).

Правильність та прецизійність оцінювали на зразках біологічних матриць однієї серії та між трьома серіями.

Для визначення правильності і прецизійності в біологічні матриці (плазма крові, сеча та тканини печінки), вносили кількості силденафілу та варденафілу, які відповідали нижній межі кількісного визначення кожним із зазначених методів, середній концентрації та верхньому рівню концентрації.

Вміст препаратів в зразках біологічних матриць вираховували за рівняннями градувальних графіків, побудованих при встановленні лінійності, після чого отримані значення концентрацій порівнювали з їх номінальним значенням (див. розділ 5.3). Отримані результати наведено в таблицях 5.5 та 5.6.

Як видно з наведених в таблицях 5.5 та 5.6 даних, значення коефіцієнта варіації (CV) та правильність (RE) в проведених дослідженнях не перевищують 15 %, що свідчить про прецизійність та точність розроблених методик.

Таблиця 5.5

**Результати вивчення правильності та прецизійності методик кількісного визначення силденафілу в плазмі,
печінці та сечі методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС**

Метод визначення	Біологічна матриця	Внесено силденафілу в пробу, нг	Визначено силденафілу в пробі, нг	CV в одній серії, %	CV між серіями, %	Правильність, RE %
ГХ/МС	плазма крові (2 мл)	20	19,62 ± 0,54	2,21	2,23	-1,90
		1000	990,11 ± 11,49	0,93	0,96	-0,99
		2000	1989,38 ± 8,27	0,33	0,35	-0,53
	печінка (5 г)	20	19,57 ± 0,87	3,56	3,61	-2,15
		1000	989,86 ± 12,44	1,01	1,08	-1,01
		2000	1991,32 ± 10,57	0,43	0,48	-0,43
	сеча (5 мл)	20	19,50 ± 0,73	3,02	3,10	-2,50
		1000	989,44 ± 11,89	0,97	1,05	-1,05
		2000	1988,48 ± 8,80	0,36	0,40	-0,58
ВЕРХ/МС	плазма крові (2 мл)	25	24,53 ± 0,58	1,89	1,91	-1,88
		1000	989,99 ± 11,47	0,93	0,95	-1,00
		2000	1990,27 ± 10,64	0,43	0,45	-0,49
	печінка (5 г)	25	24,17 ± 1,21	4,04	4,11	-3,32
		1000	988,40 ± 13,45	1,09	1,15	-1,16
		2000	1989,88 ± 10,94	0,44	0,50	-0,51
	сеча (5 мл)	25	24,52 ± 0,86	2,81	2,83	-1,92
		1000	988,94 ± 12,63	1,03	1,13	-1,11
		2000	1988,94 ± 10,03	0,42	0,48	-0,55

Таблиця 5.6

Результати вивчення правильності та прецизійності методик кількісного визначення варденафілу в плазмі, печінці та сечі методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС

Метод визначення	Біологічна матриця	Внесено варденафілу в пробу, нг	Визначено варденафілу в пробі, нг	CV в одній серії, %	CV між серіями, %	Правильність, RE %
ГХ/МС	плазма крові (2 мл)	60	59,09 ± 1,18	1,61	1,70	-1,52
		300	298,12 ± 1,97	0,53	0,60	-0,63
		600	598,56 ± 1,80	0,24	0,29	-0,24
	печінка (5 г)	60	58,17 ± 1,71	2,37	2,50	-3,05
		300	297,42 ± 1,15	0,92	1,15	-0,86
		600	595,10 ± 5,40	0,73	0,85	-0,82
	сеча (5 мл)	60	58,77 ± 1,09	1,49	1,55	-2,05
		300	298,26 ± 2,08	0,56	0,63	-0,58
		600	597,01 ± 2,54	0,34	0,40	-0,50
ВЕРХ/МС	плазма крові (2 мл)	40	39,51 ± 0,60	1,23	1,29	-1,22
		300	298,87 ± 2,01	0,54	0,64	-0,38
		600	599,16 ± 1,55	0,21	0,25	-0,14
	печінка (5 г)	40	38,92 ± 1,18	2,44	2,51	-2,70
		300	298,54 ± 2,64	0,71	0,77	-0,49
		600	598,08 ± 2,25	0,30	0,35	-0,32
	сеча (5 мл)	40	39,23 ± 0,90	1,84	1,89	-1,92
		300	298,55 ± 2,30	0,62	0,66	-0,48
		600	598,35 ± 2,01	0,27	0,31	-0,27

5.5 Встановлення валідаційних параметрів «ступінь вивільнення, межа виявлення і кількісного визначення» при визначенні силденафілу та варденафілу в плазмі, сечі і тканині печінки методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС

Ступінь вивільнення визначали шляхом розрахунку співвідношення кількості силденафілу чи варденафілу, що виділяється із біологічної проби до кількості, яку вносять в сухий залишок контрольної проби.

Для визначення ступеня вивільнення силденафілу і варденафілу у біологічні матриці вносили досліджувані препарати у кількостях, що відповідали нижній і верхній межі, при якій спостерігається лінійність визначень методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС (див. розділ 5.3).

В табл. 5.7 наведено результати визначення ступеня вивільнення силденафілу та варденафілу із плазми крові, сечі і тканини печінки.

Таблиця 5.7

Результати визначення ступеня вивільнення силденафілу та варденафілу із плазми, сечі та тканини печінки (n=5)

Біологічна матриця	Ступінь вивільнення (середнє), %			
	Силденафіл		Варденафіл	
	ГХ/МС	ВЕРХ/МС	ГХ/МС	ВЕРХ/МС
плазма	89,10 ± 0,74	89,81 ± 0,75	88,95 ± 0,80	88,96 ± 0,81
печінка	47,30 ± 1,25	47,28 ± 1,24	46,38 ± 1,27	46,40 ± 1,28
сеча	68,48 ± 0,81	68,50 ± 0,76	67,05 ± 0,70	67,04 ± 0,71

Межу виявлення силденафілу та варденафілу (LOD) в біологічних матрицях визначали за співвідношенням сигнал-шум 3:1, а *межу їх кількісного визначення* (LOQ) за співвідношенням 10:1.

Межі виявлення та кількісного визначення силденафілу і варденафілу, виділених із досліджуваних біологічних матриць, при визначенні методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС, наведено в таблиці 5.8.

Таблиця 5.8

**Межі виявлення та кількісного визначення силденафілу і варденафілу,
виділених із біологічного матеріалу при визначенні методами
ГХ/МС та ВЕРХ/МС**

Препарат	Орган або біологічна рідина	Межа виявлення (нг/г чи нг/мл)		Межа кількісного визначення (нг/г чи нг/мл)	
		ГХ/МС	ВЕРХ/МС	ГХ/МС	ВЕРХ/МС
Силденафіл	Плазма, 2 мл	3,5	5,5	4,0	6,0
	Печінка, 5 г	3,0	4,0	3,2	4,4
	Сеча, 5 мл	2,0	2,5	2,2	3,0
Варденафіл	Плазма, 2 мл	14,0	8,5	14,5	9
	Печінка, 5 г	10,5	6,0	11,0	6,6
	Сеча, 5 мл	7,0	4,0	7,6	4,6

5.6 Визначення критерію «стабільність» при дослідженні силденафілу та варденафілу у плазмі та сечі методом ВЕРХ/МС

Стабільність силденафілу та варденафілу визначали у зразках плазми та сечі при різних умовах зберігання. Вивчали короткотермінову стабільність, тривалу стабільність, стабільність препаратів при швидкому заморожуванні і розморожуванні і стабільність в автосемплері для трьох рівнів концентрацій силденафілу та варденафілу.

Результати цих досліджень наведено в табл. 5.9. і 5.10.

Отримані результати показують, що силденафіл і варденафіл в пробах плазми та сечі є стабільними при кімнатній температурі протягом 6 год та 24 год і при - 80 °С протягом 30 днів. Аналіти також стабільні в автосемплері при 20 °С протягом 24 год і показали стабільність при швидкому заморожуванні і розморожуванні підготовлених проб до аналізу при -80 °С три цикли.

Дані дослідження та їх результати описано нами в публікаціях [174].

Таблиця 5.9

Вивчення стабільності силденафілу та варденафілу в плазмі в залежності від умов зберігання (n=5)

Стабільність	Умови зберігання (температура, час)	Визначено силденафілу в пробі, нг		CV, %	Ассурасу, %	Визначено варденафілу в пробі, нг		CV, %	Ассурасу, %
		після виготовлення проби	у зразку при вивченні стабільності			після виготовлення проби	у зразку при вивченні стабільності		
Коротко-термінова стабільність	Кімнатна t 6 год	24,86	24,82	0,19	99,84	39,55	39,52	0,15	99,92
		990,80	990,68	0,03	99,99	298,90	298,87	0,02	99,99
		1991,85	1991,74	0,01	99,99	599,40	599,36	0,03	99,99
	Кімнатна t 24 год	24,82	24,75	0,30	99,72	39,50	39,48	0,14	99,95
		990,75	990,63	0,03	99,99	298,88	298,86	0,02	99,99
		1991,85	1991,70	0,01	99,99	599,40	599,33	0,01	99,99
Автосемплер	20 °С 24 год	24,84	24,70	0,43	99,44	39,51	39,44	0,15	99,82
		990,90	990,63	0,03	99,97	298,91	298,81	0,02	99,97
		1991,82	1991,66	0,02	99,99	599,38	599,30	0,02	99,99
Цикли заморожування / розморожування	При -80 °С три цикли	24,85	24,58	0,76	98,91	39,55	39,40	0,20	99,62
		990,70	990,55	0,02	99,98	298,90	298,74	0,02	99,95
		1991,82	1991,30	0,01	99,97	599,39	599,27	0,02	99,98
Тривалий період	-80 °С через 30 днів	24,83	24,11	1,15	97,10	39,51	39,12	0,60	99,01
		990,95	989, 54	0,04	99,86	298,91	297,86	0,07	99,65
		1991,80	1990,24	0,02	99,92	599,40	599,22	0,03	99,97

Таблиця 5.10

Вивчення стабільності силденафілу та варденафілу в сечі в залежності від умов зберігання (n=5)

Стабільність	Умови зберігання (температура, час)	Визначено силденафілу в пробі, нг		CV, %	Ассурасу, %	Визначено варденафілу в пробі, нг		CV, %	Ассурасу, %
		після виготовлення проби	у зразку при вивченні стабільності			після виготовлення проби	у зразку при вивченні стабільності		
Коротко-термінова стабільність	Кімнатна t 6 год	24,56	24,54	0,58	99,92	39,25	39,24	0,25	99,97
		989,08	989,02	0,04	99,99	298,55	298,53	0,05	99,99
		1990,10	1989,99	0,03	99,99	598,41	598,38	0,01	99,99
	Кімнатна t 24 год	24,55	24,52	0,49	99,88	39,25	39,20	0,20	99,87
		989,10	989,00	0,04	99,99	298,55	298,52	0,05	99,99
		1990,10	1989,98	0,04	99,99	598,40	598,34	0,01	99,98
Автосемплер	20 °С 24 год	24,56	24,50	0,52	99,76	39,23	39,18	0,14	99,87
		989,09	988,96	0,05	99,99	298,54	298,50	0,06	99,99
		1990,08	1989,93	0,04	99,99	598,40	598,33	0,01	99,99
Цикли заморожування / розморожування	При -80 °С три цикли	24,55	24,48	0,11	99,71	39,24	39,13	0,20	99,72
		989,10	988,81	0,07	99,97	298,55	298,43	0,07	99,96
		1990,10	1989,78	0,03	99,98	598,39	598,28	0,01	99,98
Тривалий період	-80 °С через 30 днів	24,56	24,47	0,06	99,63	39,23	39,05	0,60	99,54
		989,08	988,75	0,04	99,97	298,53	298,37	0,08	99,95
		1990,08	1989,71	0,02	99,98	598,40	598,18	0,02	99,96

Висновки до розділу 5

1. Проведена валідація ГХ/МС і ВЕРХ/МС методів кількісного визначення силденафілу та варденафілу в пробах, отриманих після ізолювання досліджуваних сполук із зразків печінки, плазми та сечі.

2. Валідаційні параметри методик кількісного визначення силденафілу і варденафілу в біологічних пробах за показниками лінійності/калібрувальної моделі, правильності, відтворюваності, специфічності/селективності відповідають вимогам національних та міжнародних регламентуючих документів, що стосуються валідації біоаналітичних методів аналізу.

3. Вказані методики є простими у виконанні, точними та відтворюваними, тому можуть бути застосовані при хіміко-токсикологічних дослідженнях силденафілу та варденафілу.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в публікації:

1. Validation of an HPLC-MS method for the determinatin of vardenafil in rat urine / L. Osypchuk, I. Halkevych, S. Davydovych, Y. Bidnychenko. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019.Vol. 9(08). P. 79-85. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, участь у написанні статті).*

РОЗДІЛ 6

ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ, ВАРДЕНАФІЛУ І ЇХ МЕТАБОЛІТІВ В ОРГАНАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ТВАРИН

Апробацію розроблених методик ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу у суміші із метаболітами в біологічних пробах проведено із використанням біологічного матеріалу лабораторних тварин (щурів).

Дослідження на лабораторних тваринах проводилися при дотриманні принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 2010/63/EU, Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [2, 12, 15, 64, 75].

Для експериментальних досліджень відібрано щурів (самців), масою 190-200 г та віком 2-3 місяці. Тварини утримувались у віварії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького згідно санітарно-гігієнічних норм.

Формували вісім дослідних груп та дві контрольні групи (по 5 тварин у кожній). Дослідним групам тварин вводили силденафіл та варденафіл у кількостях, які відповідали терапевтичній та вищій разовій дозі кожного із препаратів.

Терапевтична доза силденафілу для людини становить 0,71 мг/кг, а вища разова доза – 1,42 мг/кг. Для варденафілу однократна терапевтична доза знаходиться на рівні 0,14 мг/кг, а вища разова доза – 0,28 мг/кг [55, 121]. Паралельно досліджувана група тварин отримувала нітрогліцерин із розрахунку 7 мкг/кг, оскільки поєднання інгібіторів ФДЕ-5 з нітратами зумовлює різку гіпотензію [60, 83, 94, 108].

Силденафіл, варденафіл та нітрогліцерин вводили тваринам одноразово, через зонд, у вигляді водних розчинів, які готували розчиненням у воді таблеток Віагра (25 мг, Pfizer, Франція), Левітра (5 мг, Bayer, Німеччина) та нітрогліцерину (0,5 мг, Мікрохім, Україна). Після введення досліджуваних сполук тварини мали вільний доступ до їжі та води.

Контрольні групи тварин препарати не отримували.

Декапітацію тварин проводили через 3 год і через 24 год після введення відповідної дози кожного із досліджуваних препаратів (під ефірним наркозом).

Для досліджень відбирали мозок, серце, легені, печінку, шлунок, кишківник, кров та сечу. Сечу тварин збирали протягом 3-х та 24 год, починаючи з моменту введення препаратів. Паралельно відбирали ці ж біологічні рідини та органи з контрольних груп.

Кожен орган зважували, а для біологічних рідин – вимірювали їх об'єм. При необхідності біологічний матеріал зберігали при -20 °С.

6.1 Виділення силденафілу та варденафілу із органів та біологічних рідин щурів

Ізолювання силденафілу та варденафілу із органів та біологічних рідин проводили згідно розроблених методик, описаних у розділі 4.

Відібрані органи подрібнювали та ізолювали досліджувані сполуки і їх метаболіти сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). Екстракцію виділених сполук проводили 1,2-дихлоретаном при відповідному значенні рН (див. розділ 4.2). Дихлоретанові екстракти з кожної проби біологічного матеріалу об'єднували та вимірювали їх об'єм.

При дослідженні крові проводили ізолювання із сироватки та еритроцитарної маси. Для цього відібрану кров центрифугували 20 хв при 15000 об/хв для відокремлення сироватки від еритроцитарної маси. Відокремлену сироватку піддавали очищенню методом ТФЕ на картриджах

Oasis HLB (див. розділ 4.3.3), а до еритроцитарної маси вносили 5 мл дистильованої води і проби перемішували у змішувачі типу «Vortex».

Отримані водні суміші використовували для ізолювання силденафілу, варденафілу і їх метаболітів за методикою, описаною в розділі 4.3.2.

Виділення досліджуваних препаратів та їх метаболітів із проб сечі, зібраної протягом 3 год та 24 год після введення досліджуваних препаратів, проводили згідно методики, описаної у розділі 4.4.

6.2 Ідентифікація силденафілу і варденафілу у суміші з метаболітами методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту

По 1/5 об'єму дихлоретанових екстрактів, отриманих після екстракції силденафілу, варденафілу та їх метаболітів із органів, сечі, еритроцитарної маси та 1/5 об'єму етанольного елюату, отриманого при підготовці сироватки щурів, випаровували досуха в потоці азоту. Сухі залишки розчиняли в 50,0 мкл метанолу. Отримані проби аналізували методом ТШХ на пластинках „Sorbfil” та „Merck” у системах розчинників, склад яких наведено у розділі 2.2. Для цього по 10 мкл отриманих розчинів наносили у вигляді плям на хроматографічні пластинки. Паралельно на пластинки наносили контрольні проби.

Проявлення зон силденафілу, варденафілу і їх метаболітів проводилось за флуоресценцією, при опроміненні пластинок УФ-світлом ($\lambda = 254$ нм), з наступною обробкою реактивом Драгендорфа.

При проявленні пластинок в УФ-світлі метаболіти силденафілу флуоресціюють фіолетово-голубим кольором, метаболіти варденафілу – голубим кольором, а з реактивом Драгендорфа – плями забарвлені в оранжево-жовтий колір.

Отримані результати показали, що з систем, рекомендованих TIAFT для виявлення речовин основного характеру, найкраще розділення досліджуваних

препаратів з метаболітами спостерігається у системі розчинників: ацетон-метанол (20:20).

Після цього проводили ТШХ-аналіз в підтверджуючих системах розчинників. Проведені дослідження показали, що силденафіл та варденафіл розділяються з метаболітами у всіх підтверджуючих системах розчинників.

Величини R_f силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, які ідентифіковані методом ТШХ в органах та біологічних рідинах щурів, відібраних на дослідження через 24 години після введення однократної терапевтичної дози у системах розчинників ацетон-метанол (20:20) та толуен-діоксан-ДМФА (10:38:2) наведено в таблиці 6.1. В додатку Б наведено значення R_f виявлених сполук в зразках біологічного матеріалу у підтверджуючих системах розчинників № 1-№ 3.

За результатами ТШХ-скринінгу встановлено, що при прийомі однократної терапевтичної дози силденафіл і варденафіл ідентифікуються у всіх пробах біологічного матеріалу тварин, відібраних на дослідження через 3 години, при цьому значення R_f виділених сполук співпадають із відповідними значеннями чистих речовин. Метаболіти силденафілу і варденафілу у відібраних зразках біологічного матеріалу виявлено у сироватці, печінці та легенях.

У біологічному метеріалі, відібраному на дослідження через 24 год після введення тваринам препаратів у кількості, що відповідає однократній терапевтичній дозі, методом ТШХ, силденафіл виявлено у печінці, шлунку, кишківнику та сечі, а варденафіл – у пробах із шлунку, кишківника та сечі. Метаболіти силденафілу та варденафілу при цьому ідентифіковано в легенях, печінці, шлунку, кишківнику та сечі.

У пробах із мозку, серця, сироватки та еритроцитарної маси, відібраних на дослідження через 24 год після введення однократної терапевтичної дози силденафілу чи варденафілу, методом ТШХ досліджуваних препаратів та їх метаболітів не виявлено.

Таблиця 6.1

Значення величини R_f силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виділених із тканин та біологічних рідин щурів (через 24 год після введення однократної терапевтичної дози)

Дослід- жуваний орган чи біологічна рідина	Система розчинників	Величини R_f							
		Пластинка „Sorbfil”				Пластинка „ Merck ”.			
		Силденафіл		Варденафіл		Силденафіл		Варденафіл	
		дослід- жувана сполука	мета- боліти	дослід- жувана сполука	мета- боліти	дослід- жувана сполука	мета- боліти	дослід- жувана сполука	мета- боліти
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Легені	Ацетон-метанол (20:20)	—	0,53; 0,66; 0,81	—	0,67; 0,82	—	0,56; 0,67; 0,79	—	0,76; 0,85
	Толуен-діоксан- диметилформамід (10:38:2)	—	0,45; 0,54; 0,64	—	0,57; 0,71	—	0,48; 0,52 0,66	—	0,55; 0,71
Печінка	Ацетон-метанол (20:20)	0,71	0,52; 0,66; 0,80	—	0,66; 0,82	0,73	0,55; 0,66; 0,80	—	0,76; 0,87
	Толуен-діоксан- диметилформамід (10:38:2)	0,60	0,44; 0,52; 0,65	—	0,58; 0,72	0,62	0,49; 0,53; 0,68	—	0,56; 0,72

Продовж. табл.6.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Шлунок	Ацетон-метанол (20:20)	0,70	0,52; 0,66; 0,80	0,75	0,66; 0,82	0,73	0,55; 0,66; 0,80	0,80	0,76; 0,87
	Толуен-діоксан- диметилформамід (10:38:2)	0,60	0,45; 0,50; 0,64	0,63	0,57; 0,71	0,61	0,48; 0,53; 0,66	0,67	0,55; 0,71
Кишківник	Ацетон-метанол (20:20)	0,70	0,52; 0,66; 0,80	0,75	0,66; 0,82	0,73	0,55; 0,66; 0,80	0,80	0,76; 0,87
	Толуен-діоксан- диметилформамід (10:38:2)	0,61	0,46; 0,51; 0,65	0,64	0,58; 0,73	0,63	0,49; 0,53; 0,66	0,68	0,56; 0,73
Сеча	Ацетон-метанол (20:20)	0,71	0,48; 0,67; 0,81	0,75	0,82	0,73	0,49; 0,64; 0,81	0,80	0,87
	Толуен-діоксан- диметилформамід (10:38:2)	0,60	0,41; 0,53; 0,65	0,63	0,72	0,62	0,43; 0,53; 0,68	0,67	0,73

6.3 Виявлення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів методом ГХ/МС в органах та біологічних рідинах щурів

Для досліджень використовували по 2/5 об'єму дихлоретанових екстрактів із кожного органу чи біологічної рідини. Органічний розчинник випаровували досуха в потоці азоту, сухі залишки розчиняли в 2 мл метанолу. Метанольні розчини упарювали до 0,4 мл, після чого в кожну пробу вносили дистильовану воду до об'єму 2 мл. Отримані розчини піддавали очищенню методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB. Схема очищення проб на даних картриджах описана у розділі 4.2.

Етанольні елюати, отримані після очищення, випаровували досуха в потоці азоту, сухі залишки розчиняли в 500 мкл метанолу (кваліфікація «для ВЕРХ grade», Merck). Отримані розчини аналізували методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС.

Для аналізу методом ГХ/МС використовували по 250 мкл метанольних розчинів. Аналіз проб методом ГХ/МС проводили за умов, описаних у розділі 2.5. Ідентифікацію силденафілу, варденафілу та їх метаболітів на хроматограмах проводили за часом утримування та мас-спектрами. Метаболіти силденафілу та варденафілу у досліджуваних пробах ідентифікували шляхом фрагментації їх мас-спектрів.

Репрезентативні хроматограми проб, отриманих при ізолюванні силденафілу і варденафілу з печінки щурів, відібраної на дослідження через 3 год і через 24 год після введення препаратів, наведено на рисунку 6.1.

Мас-спектри метаболітів силденафілу і варденафілу, виявлених методом ГХ/МС у зразках біологічного матеріалу тварин, наведено на рисунках 6.2 та 6.3. Органи локалізації досліджуваних препаратів, характерні сигнали ідентифікованих метаболітів силденафілу та варденафілу наведено в таблицях 6.2 та 6.3.

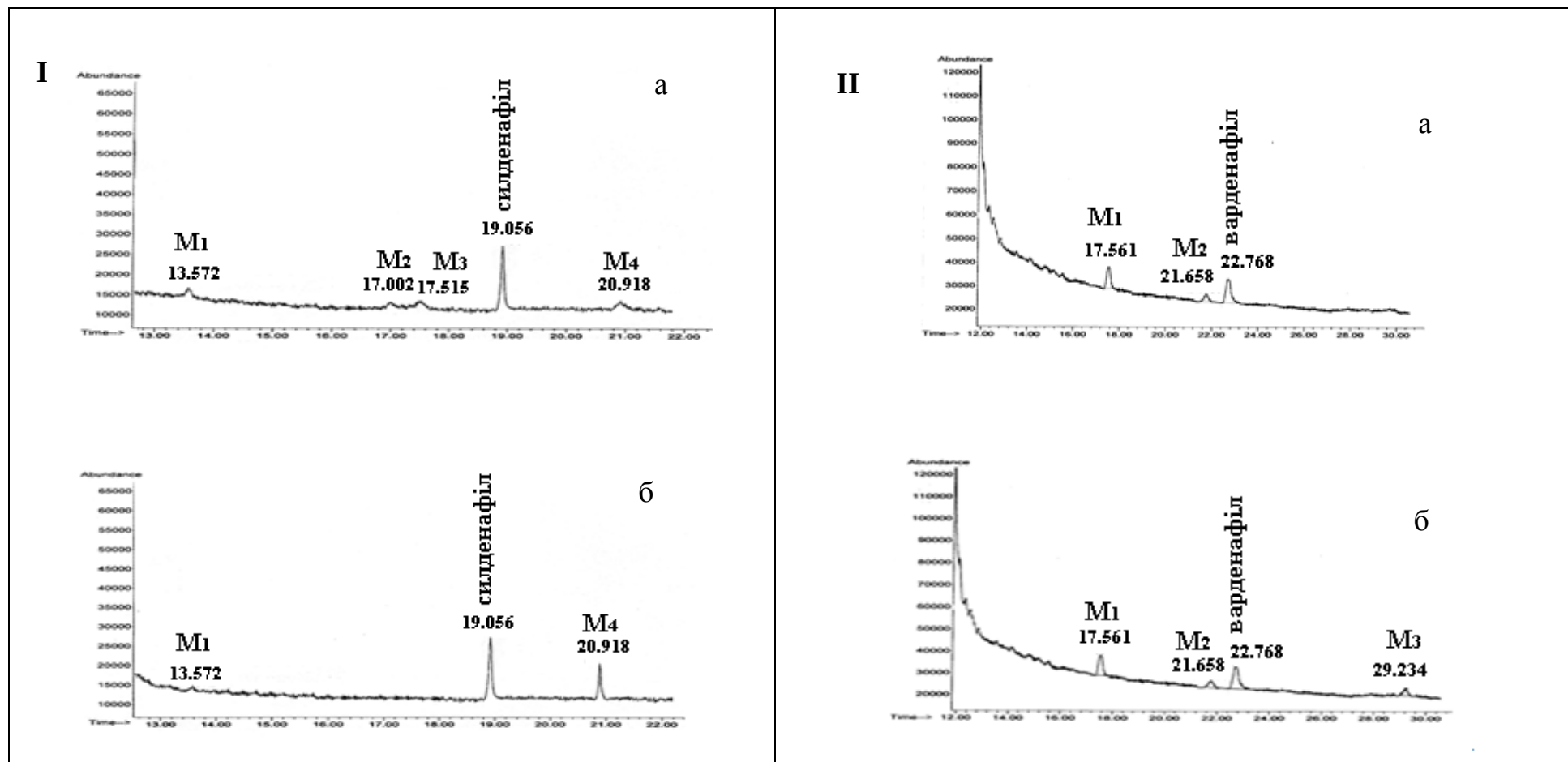


Рис. 6.1 Хроматограми проб, отриманих після ізолювання силденафілу (I) та варденафілу (II) з печінки щурів: а – через 3 год після введення препаратів, б – через 24 год після введення препаратів

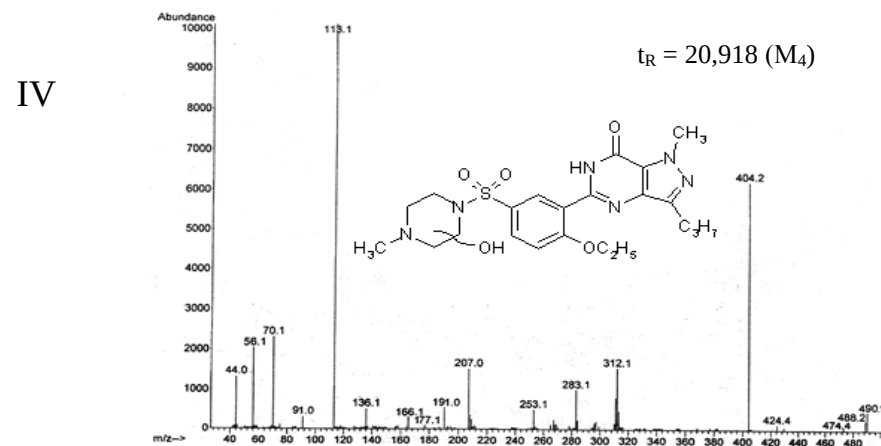
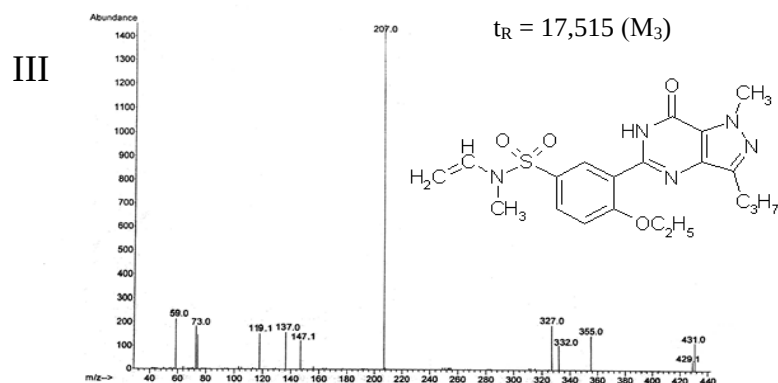
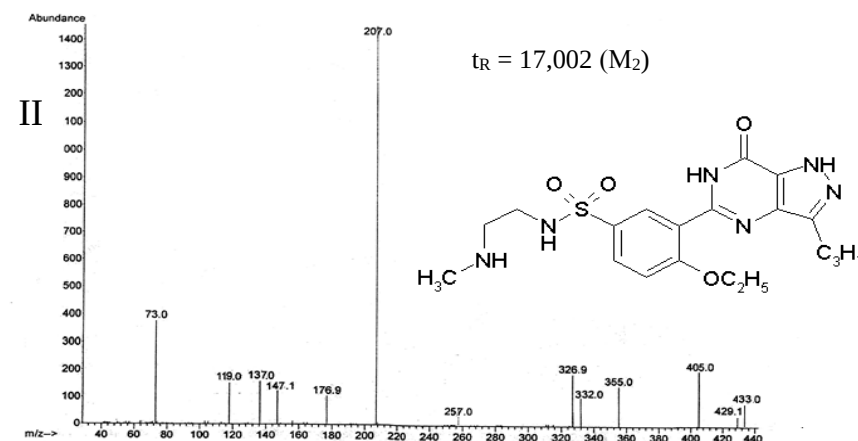
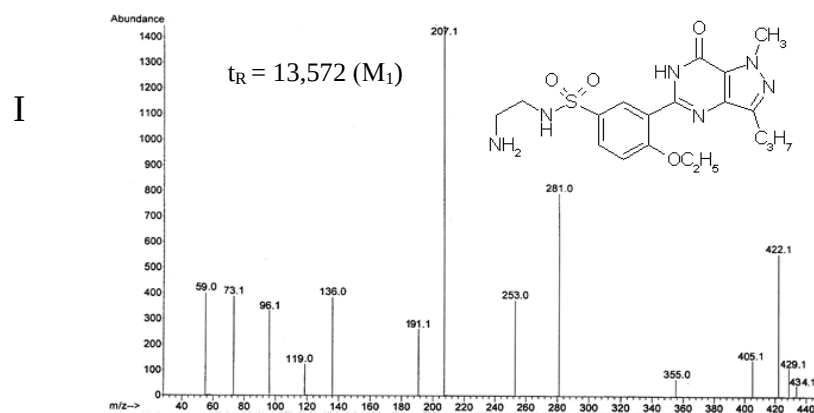


Рис. 6.2. Мас-спектри метаболітів силденафілу, ідентифікованих методом ГХ/МС у біологічному матеріалі щурів: M_1 – продукт деградації деметилсилденафілу за піперазиновим циклом (I), M_2 – продукт деградації за піперазиновим циклом деметильованого за піразоловим циклом силденафілу (II), M_3 – дегідрований продукт розщеплення силденафілу за піперазиновим циклом (III), M_4 – гідроксильований за піперазиновим циклом силденафіл (IV)

Таблиця 6.2

Характеристичні сигнали мас-спектрів силденафілу і його метаболітів, виявлених в органах і біологічних рідинах щурів, при аналізі методом ГХ/МС

Виявлені сполуки	Час утримування, хв	Виявлено в органах		Основні сигнали мас-спектру (m/z)
		через 3 год після прийому	через 24 год після прийому	
Силденафіл	19,250±0,275	мозок, серце, легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	мозок, серце, легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	56, 71, 99, 134, 136, 166, 253, 283, 312, 354, 381, 404, 429, 474
Продукт деградації деметил-силденафілу за піперазиновим циклом (M₁)	13,521±0,097	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	59, 73, 96, 119, 136, 191, 253, 281, 282, 355, 405, 422, 429, 434
Продукт деградації за піперазиновим циклом деметильованого за піразоловим циклом силденафілу (M₂)	17,002±0,018	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	—	73, 119, 137, 147, 177, 257, 327, 332, 355, 405, 429, 433
Дегідрований продукт розщеплення силденафілу за піперазиновим циклом (M₃)	17,498±0,020	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	—	59, 74, 119, 137, 147, 327, 332, 355, 429, 431
Гідроксильований за піперазиновим циклом силденафіл (M₄)	21,029±0,202	легені, печінка, шлунок, кишківник	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	44, 56, 70, 91, 113, 136, 166, 177, 191, 253, 283, 312, 404, 424, 474, 488, 490

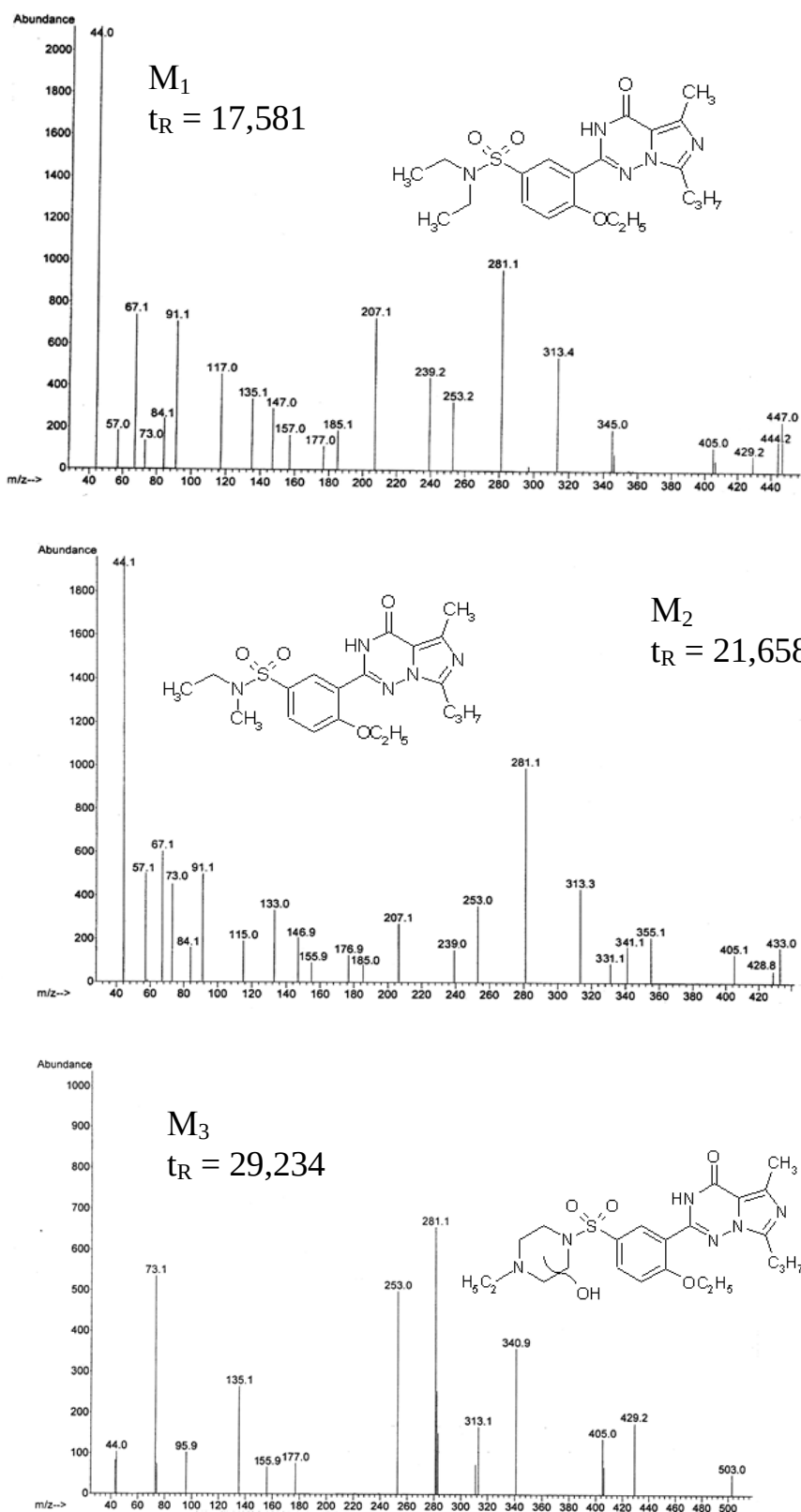


Рис. 6.3. Мас-спектри метаболітів варденафілу, виявлених методом ГХ/МС в біологічному матеріалі щурів: M₁ і M₂ – продукти деградації деетилварденафілу за піперазиновим циклом, M₃ – гідроксильований за піперазиновим циклом варденафіл

Таблиця 6.3

Характеристичні сигнали мас-спектрів варденафілу і його метаболітів, виявлених в органах і біологічних рідинах щурів, при аналізі методом ГХ/МС

Виявлені сполуки		Час утримування, хв	Виявлено в органах		Основні сигнали мас-спектру (m/z)
			через 3 год після прийому	через 24 год після прийому	
Варденафіл		22,720±0,059	мозок , серце, легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	мозок, серце, легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	42, 56, 57, 70, 84, 93, 98, 113, 149, 184, 254, 283, 311, 341, 404, 405, 432, 487, 488
Продукти деградації деетилварденафілу за піперазиновим циклом	M₁	17,581±0,023	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	44, 57, 67, 73, 84, 91, 117, 135, 147, 157, 177, 185, 239, 253, 281, 313, 345, 405, 429, 444, 447
	M₂	21,656±0,058	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	44, 57, 67, 73, 84, 91, 115, 133, 147, 156, 177, 185, 239, 253, 281, 313, 331, 341, 355, 405, 429, 433
Гідроксильований за піперазиновим циклом варденафіл (M₃)		29,161±0,085	—	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	44, 73, 96, 135, 156, 177, 253, 281, 313, 341, 405, 429, 503

Враховуючи можливі шляхи метаболізму силденафілу, шляхом фрагментації отриманих мас-спектрів, на хроматограмах ідентифіковано наступні його метаболіти: гідроксильований за піперазиновим циклом силденафіл (M_4 , є в переважаючій кількості) та продукт деградації деметилсилденафілу за піперазиновим циклом (M_1). Дані метаболіти виявлені у пробах біологічного матеріалу через 3 та через 24 год після введення однократної терапевтичної дози. У пробах з біологічного матеріалу, відібраному на дослідження через 3 год після введення силденафілу, методом ГХ/МС також виявлено продукт деградації за піперазиновим циклом деметильованого за піразоловим циклом силденафілу (M_2) та продукт дегідрування силденафілу за піперазиновим циклом (M_3). Через 24 год після прийому силденафілу в біологічному матеріалі щурів метаболіти M_2 та M_3 не виявлено.

При дослідженні усіх зразків відібраних біологічних проб встановлено, що найвищий рівень концентрації метаболітів силденафілу спостерігається в легенях. В пробах із мозку та серця досліджуваних тварин методом ГХ/МС можна виявити лише силденафіл.

Варденафіл виявлено методом ГХ/МС в усіх органах та біологічних ріדיнах, які відібрано на дослідження через 3 год і через 24 год після введення препарату.

Методом ГХ/МС також ідентифіковано 3 метаболіти варденафілу. Зокрема, через 3 год після введення даного препарату метаболіти M_1 та M_2 ідентифіковані як продукти деградації за піперазиновим циклом деетилварденафілу (див. рис. 6.1, II, рис. 6.3). В пробах біологічного матеріалу, які відбирались на дослідження через 24 год, методом ГХ/МС виявлено також гідроксильований за піперазиновим циклом варденафіл (M_3).

6.4 Виявлення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів методом ВЕРХ/МС в органах та біологічних рідинах щурів

У другій частині метанольного розчину сухих залишків (250 мкл), отримання якого описане в розділі 6.2, виявляли силденафіл, варденафіл та їх метаболіти методом ВЕРХ/МС. Аналіз проб проведено на колонці Zorbax SB- C18 при умовах, описаних у розділі 2.6.1. Ідентифікацію силденафілу, варденафілу та їх метаболітів на отриманих хроматограмах проводили за мас-спектрами та часом утримування.

Репрезентативні хроматограми проб із сечі щурів, відібраної на дослідження протягом 3 год та 24 год після введення препаратів, наведено на рис. 6.4. Хроматограми, отримані при аналізі проб із легень та сироватки щурів наведено в додатку В.

Характерні сигнали мас-спектрів силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виявлених в органах та біологічних рідинах щурів, наведено в таблицях 6.4 та 6.5, а мас-спектри ідентифікованих метаболітів – на рисунках 6.5 та 6.6.

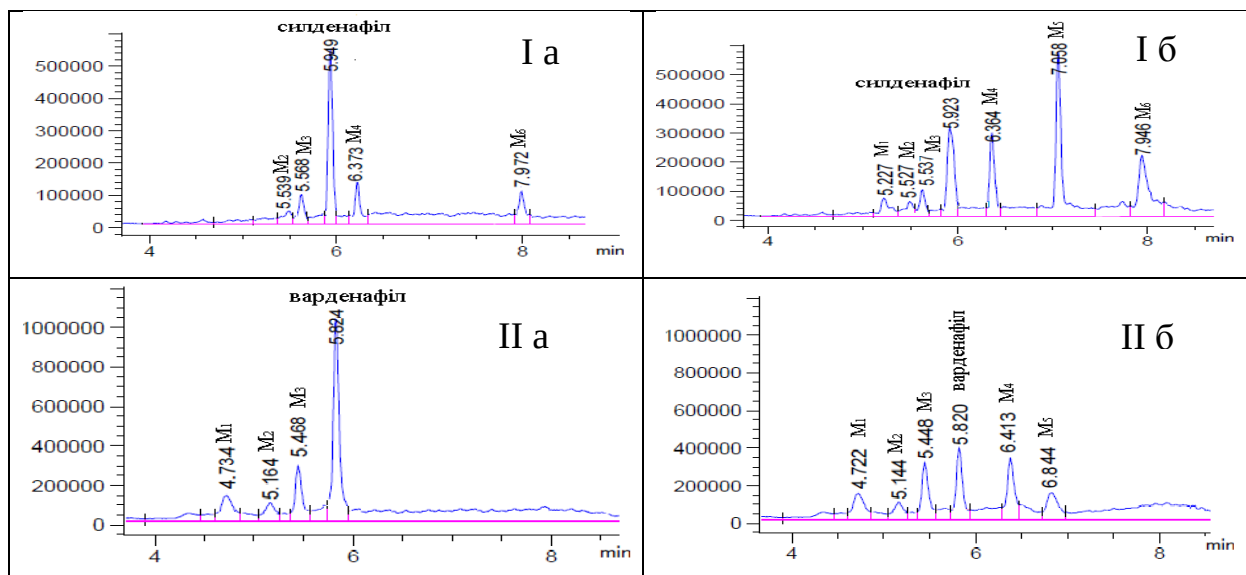


Рис. 6.4 Хроматограми проб, отриманих після ізолювання силденафілу (I) та варденафілу (II) з сечі щурів через 3 год (а) та через 24 год (б) після введення препаратів (M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ та M₆ – ідентифіковані метаболіти)

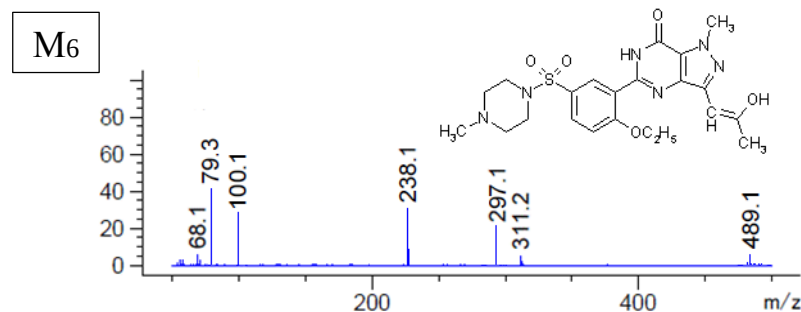
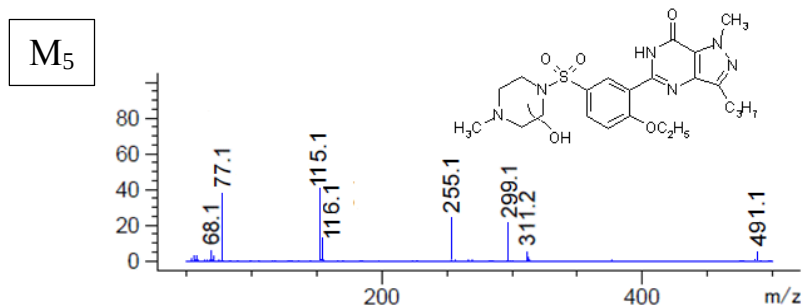
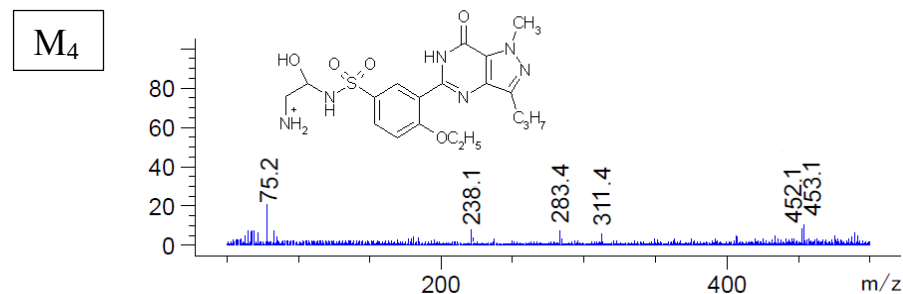
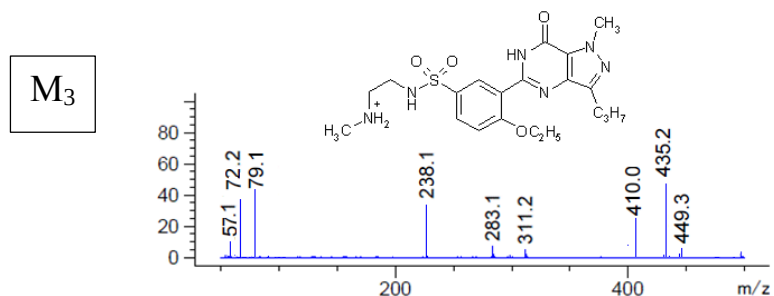
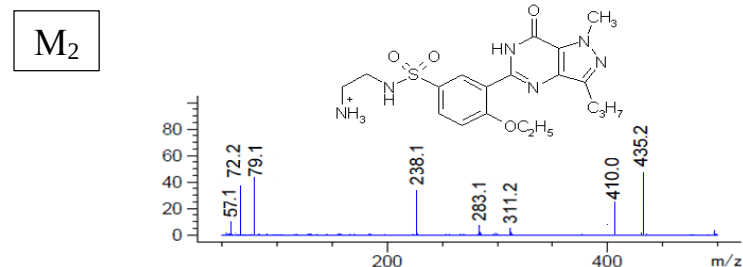
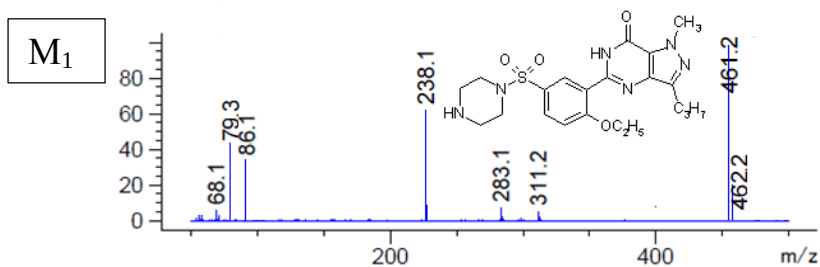


Рис. 6.5 Мас-спектри метаболітів силденафілу, ідентифікованих методом ВЕРХ/МС в біологічному матеріалі щурів

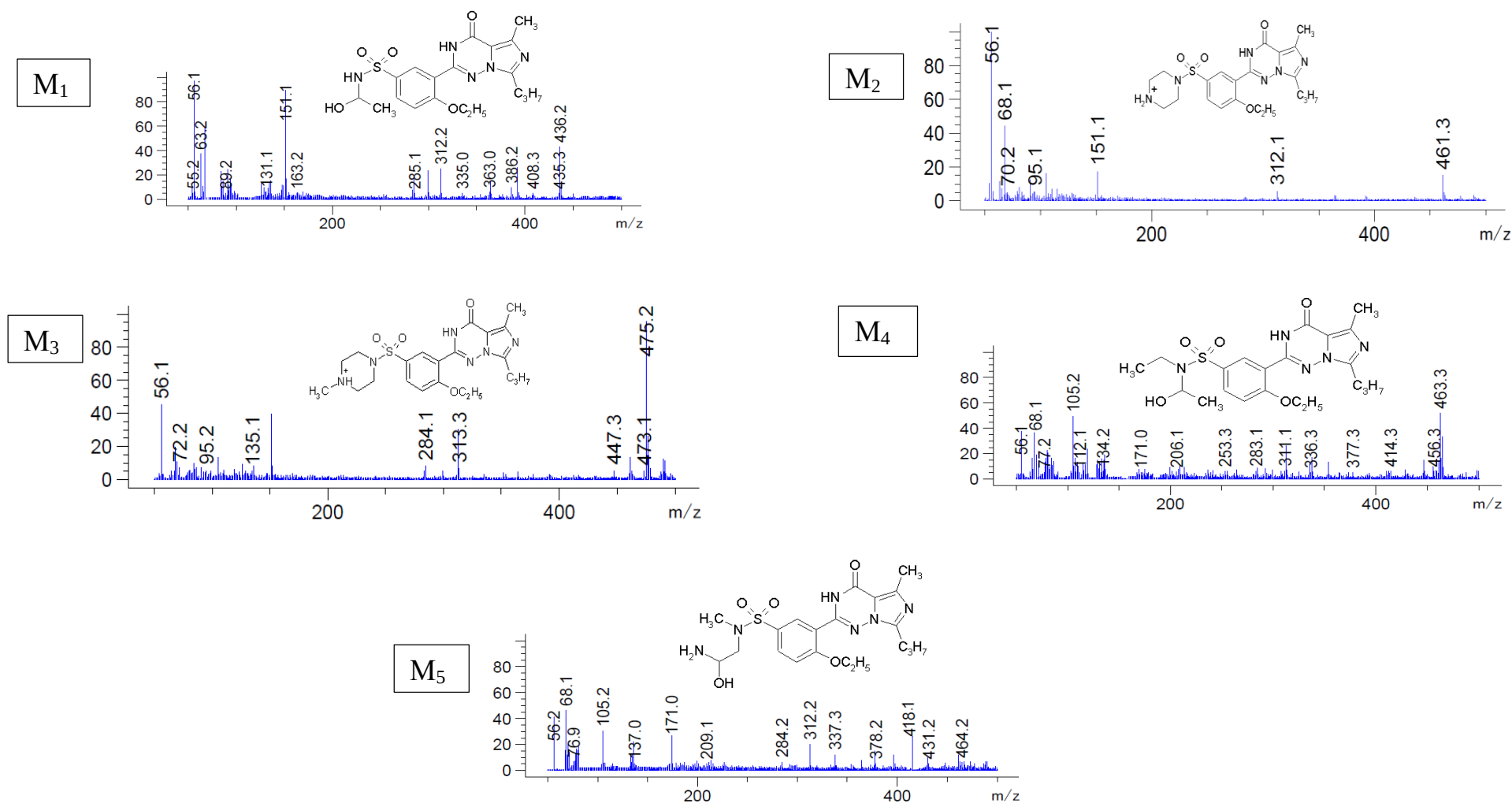


Рис. 6.6 Мас-спектри метаболітів варденафілу, ідентифікованих методом ВЕРХ/МС в біологічному матеріалі щурів

Таблиця 6.4

Характеристичні сигнали мас-спектрів силденафілу і його метаболітів, виявлених в органах і біологічних рідинах щурів методом ВЕРХ/МС

Виявлені сполуки	Час утримування, хв	Виявлено в органах		Основні сигнали мас-спектру (m/z)
		через 3 год після прийому	через 24 год після прийому	
Силденафіл	5,995±0,183	мозок, серце, легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	мозок, серце, легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	68, 79, 100, 238, 293, 311, 475, 477
Деметилсилденафіл (M₁)	5,224±0,177	—	шлунок, кишківник, сироватка, сеча	68, 79, 86, 238, 283, 311, 461, 462
Продукт деградації деметилсилденафілу за піперазиновим циклом (M₂)	5,520±0,102	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	57, 72, 79, 238, 283, 311, 410, 435
Продукт деградації силденафілу за піперазиновим циклом (M₃)	5,535±0,104	печінка, шлунок, кишківник, сеча	печінка, шлунок, кишківник, сеча	57, 72, 79, 238, 283, 311, 410, 435, 449
Гідроксильований продукт деградації за піперазиновим циклом деметилсилденафілу(M₄)	6,356±0,150	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	75, 238, 283, 311, 452, 453
Гідроксильований за піперазиновим циклом силденафіл (M₅)	7,054±0,206	легені, печінка, шлунок, кишківник	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	68, 77, 115-116, 255, 299, 311, 491
Дегідровані форми гідроксильованого за пропільним радикалом силденафілу (M₆)	7,933±0,185	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	68, 79, 100, 238, 297, 311, 489

Таблиця 6.5

Характеристичні сигнали мас-спектрів варденафілу і його метаболітів, виявлених в органах і біологічних рідинах щурів методом ВЕРХ/МС

Виявлені сполуки		Час утримування, хв	Виявлено в органах		Основні сигнали мас-спектру (m/z)
			через 3 год після прийому	через 24 год після прийому	
Варденафіл		5,890±0,210	мозок, серце, легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	мозок, серце, легені, печінка, шлунок, кишківник, сироватка, сеча	56, 68, 99, 151, 312, 489, 491
Гідроксильовані продукти деградації деетилварденафілу за піперазиновим циклом	M ₁	5,030±0,315	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	56, 55, 63, 89, 131, 151, 163, 285, 312, 335, 363, 386, 408, 435, 436
	M ₄	6,423±0,250	—	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	56, 68, 77, 105, 112, 134, 206, 253, 283, 311, 336, 377, 414, 462, 463
	M ₅	7,136±0,355	—	печінка, шлунок, кишківник, сеча	56, 68, 77, 105, 137, 171, 209, 284, 312, 337, 378, 418, 431, 464
Деетилварденафіл (M ₂)		5,392±0,251	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	шлунок, кишківник, сироватка, сеча	56, 63, 70, 89, 95, 131, 151, 163, 285, 312, 335, 363, 386, 408, 436, 460, 461
Деметилварденафіл (M ₃)		5,780±0,350	легені, печінка, шлунок, кишківник, сеча	легені, печінка, шлунок, сироватка, кишківник, сеча	56, 72, 95, 135, 284, 313, 447, 473, 449

Аналіз отриманих хроматограм та мас-спектрів дозволив зробити наступні висновки.

В пробах біологічного матеріалу щурів, яким вводили силденафіл, виявлено наступні метаболіти:

M_1 – деметилсилденафіл (виявляється тільки в пробах з шлунку, кишківника, сироватки та сечі, отриманих через 24 год після введення препарату);

M_2 – продукт деградації деметилсилденафілу за піперазиновим циклом;

M_3 – продукт деградації силденафілу за піперазиновим циклом (відсутній в легенях та сироватці);

M_4 – гідроксильований продукт деградації за піперазиновим циклом деметилсилденафілу;

M_5 – гідроксильований за піперазиновим циклом силденафіл;

M_6 – дегідровані форми гідроксильованого за пропільним радикалом силденафілу.

В сироватці щурів, відібраної на дослідження через 24 год після введення силденафілу, циркулюють лише метаболіти M_1 та M_2 .

В пробах біологічного матеріалу щурів, яким вводили варденафіл, виявлено наступні метаболіти:

M_1 , M_4 , M_5 – гідроксильовані форми продуктів деградації деетилварденафілу за піперазиновим циклом;

M_2 – деетилварденафіл;

M_3 – деметилварденафіл.

Метаболіти варденафілу M_4 та M_5 виявляються лише через 24 год після введення варденафілу у пробах, отриманих із печінки, шлунку, кишківника та сечі, метаболіт M_4 також виявлено в пробах, отриманих із легень.

В сироватці щурів, відібраної на дослідження через 24 год після введення варденафілу, циркулюють лише метаболіти M_2 та M_3 .

Метаболітів силденафілу та варденафілу не виявлено в пробах із мозку та серця.

6.5 Ідентифікація варденафілу у присутності метаболітів методом ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18 (з УФ- та флуоресцентною детекцією)

Для проведення відповідного дослідження взято 1/5 об'єму дихлоретанових екстрактів, які після випаровування очищено методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB (див. розділ 4.2). Метанольні елюати випаровували досуха, а сухі залишки кількісно розчиняли в 500 мкл метанолу.

Проби аналізовано методом ВЕРХ на колонці LUNA[®] C18 при умовах, описаних у розділі 2.6.4.

Детекцію здійснювали за допомогою УФ-детектора ($\lambda = 200$ нм) та флуоресцентного детектора ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 285/450$ нм).

Об'єм введеної проби 5 мкл.

Ідентифікували варденафіл на хроматограмах за часом утримування та УФ-спектром.

В даних умовах аналізу час утримування варденафілу при УФ-детекції становив $7,653 \pm 0,235$ хв, а при флуоресцентній детекції – $7,845 \pm 0,155$ хв.

Для виявлення метаболітів варденафілу порівнювали хроматограми контрольних проб із хроматограмами, отриманими при дослідженні проб із біологічного матеріалу щурів, яким вводили досліджуваний препарат, а також ідентифікували метаболіти за УФ-спектрами.

Репрезентативні хроматограми проби, отриманої при виділенні варденафілу із сечі щура, зібраної протягом 24 годин після введення препарату у вищій терапевтичній дозі, при УФ- та флуоресцентному детектуванні наведено на рисунку 6.7. Хроматограми, отримані при аналізі проб із печінки та сироватки щурів наведено в додатку Г.

УФ-спектри метаболітів варденафілу наведено на рисунку 6.8.

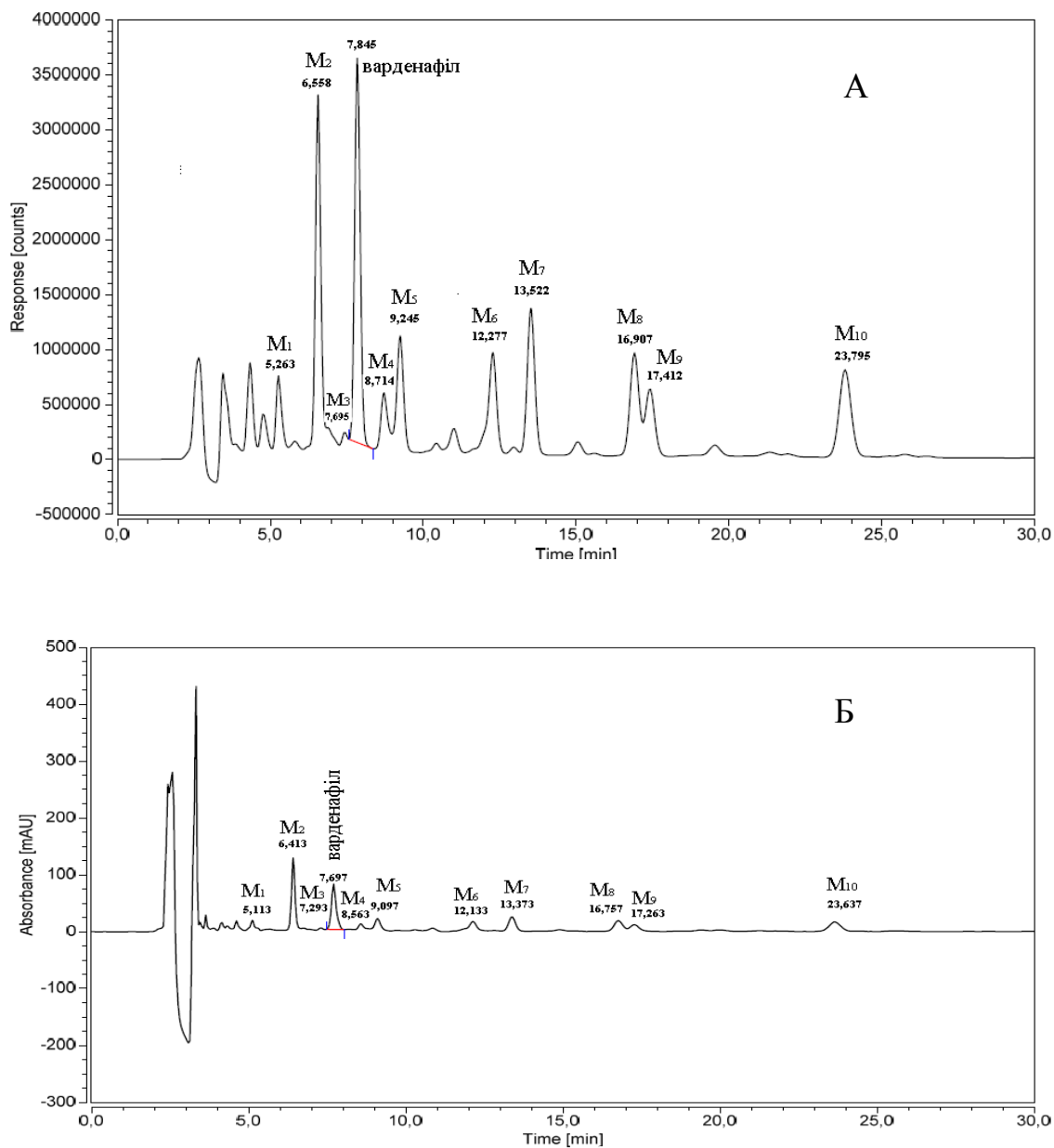


Рис. 6.7 Хроматограми проби із сечі щура, якому вводили варденафіл у вищій терапевтичній дозі: А – флуоресцентна детекція, Б – УФ-детекція при 200 нм (M₁, M₂, M₃, M₄, M₅, M₆, M₇, M₈, M₉, M₁₀ – метаболіти варденафілу)

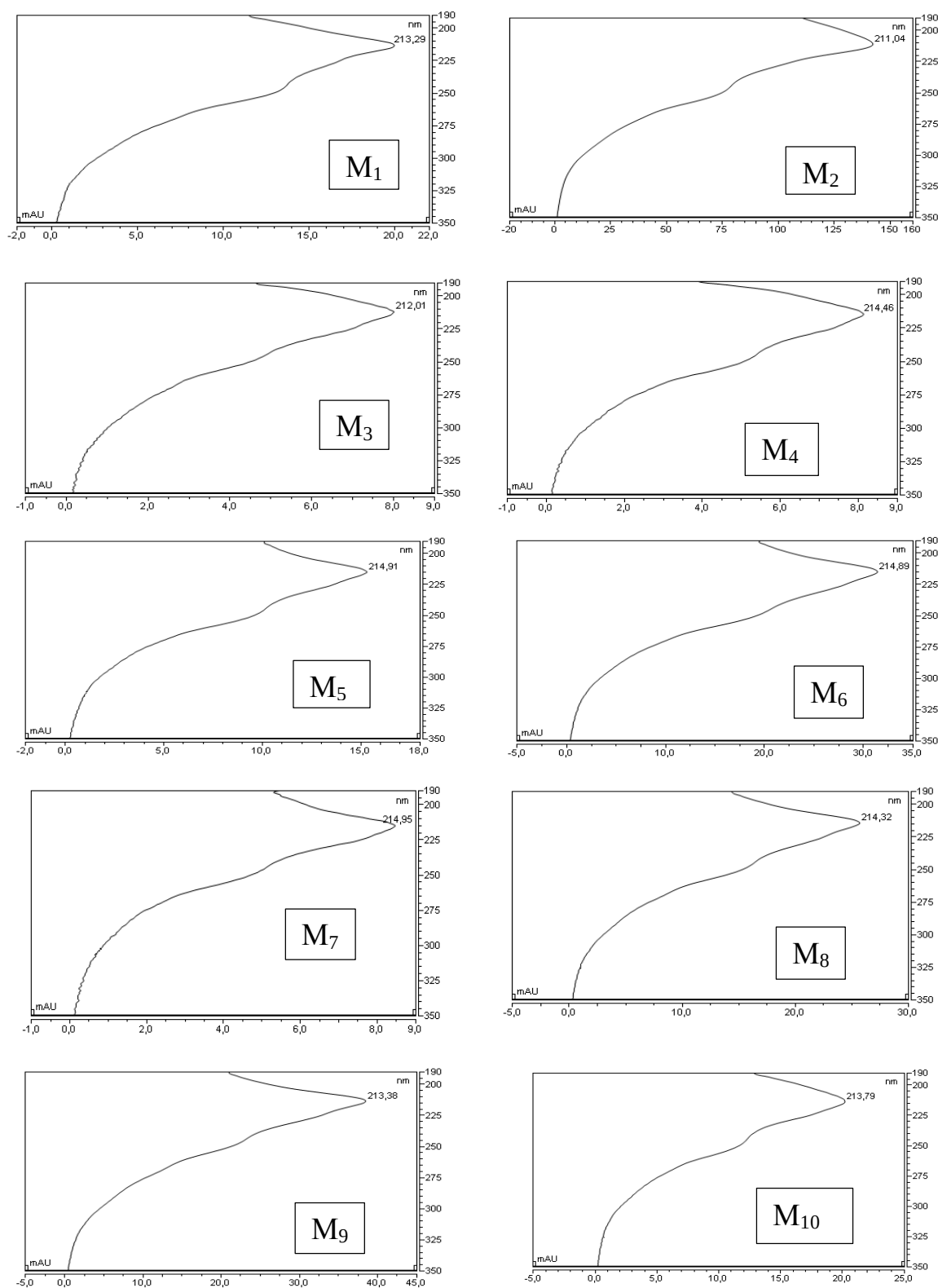


Рис. 6.8 УФ-спектри метаболітів варденафілу, розділених на колонці LUNA[®] C18

УФ-спектри метаболітів варденафілу характеризуються однією смугою поглинання з максимумом в межах 211-215 нм, а також спостерігається плече в діапазоні 255-260 нм (див. рис. 6.8).

При проведенні аналізу методом ВЕРХ на колонці LUNA® C18 і використанні УФ- та флуоресцентної детекції, по 10 метаболітів варденафілу виявлено в пробах, отриманих із легень, кишківника та сечі, які відібрані для аналізу через 24 години після введення препарату у вищій терапевтичній дозі. В пробах, отриманих з шлунку, виявлено 7 метаболітів варденафілу (M_1 , M_2 , M_5 , M_6 , M_7 , M_8 та M_{10}), а в пробах з печінки – лише 4 метаболіти: M_2 , M_4 , M_6 та M_7 .

В сироватці крові даним методом можна виявити та кількісно визначити варденафіл та два його циркулюючі метаболіти M_2 та M_4 . В еритроцитарній масі дані сполуки визначаються лише при флуоресцентному детектуванні.

Через 24 год після введення варденафілу у вищій терапевтичній дозі найбільшу концентрацію препарату визначено в пробах, отриманих з шлунку та кишківника щурів.

Даний метод використано для визначення кількісного вмісту варденафілу і сумарної кількості метаболітів.

6.6 Ідентифікація силденафілу у присутності метаболітів методом УВЕРХ

Для проведення відповідного дослідження взято 1/5 об'єму дихлоретанових екстрактів, які після випаровування очищено методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB (див. розділ 4.2). Метанольні елюати випаровували досуха, а сухі залишки кількісно розчиняли в 500 мкл метанолу (кваліфікація «для ВЕРХ grade», Merck).

Аналіз методом УВЕРХ проведено на колонці ВЕН C18 ($2,1 \times 50$ мм, 1,7 мкм), умови аналізу описано у розділі 2.7.1.

На хроматограмах ідентифікували силденафіл за часом утримування, а метаболіти – за УФ-спектрами.

Репрезентативні хроматограми силденафілу, виявленого в крові через 24 год після введення препарату в одноразовій терапевтичній дозі, з використанням різних способів детекції, наведено на рисунку 6.9.

УФ-спектри метаболітів силденафілу, виявленого в крові методом УВЕРХ, представлено на рисунку 6.10.

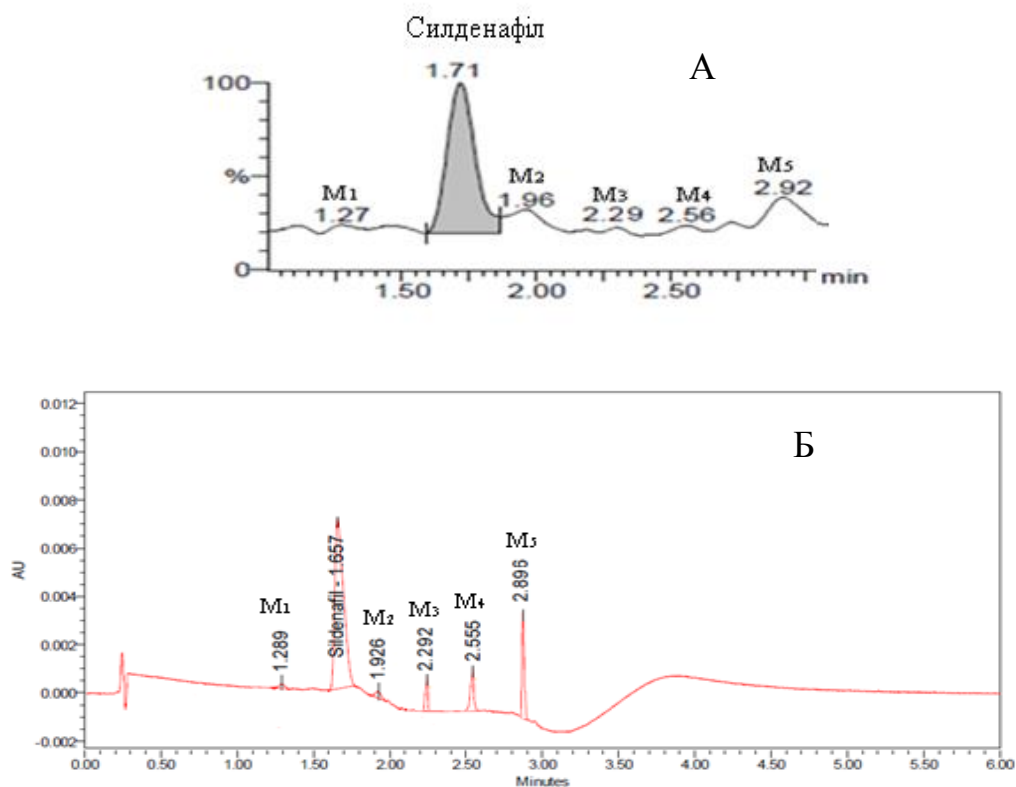


Рис. 6.9 Хроматограма крові щурів при дослідженні на силденафіл з МС/МС детекцією (А) та УФ- детекцією (Б) (M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ – метаболіти силденафілу)

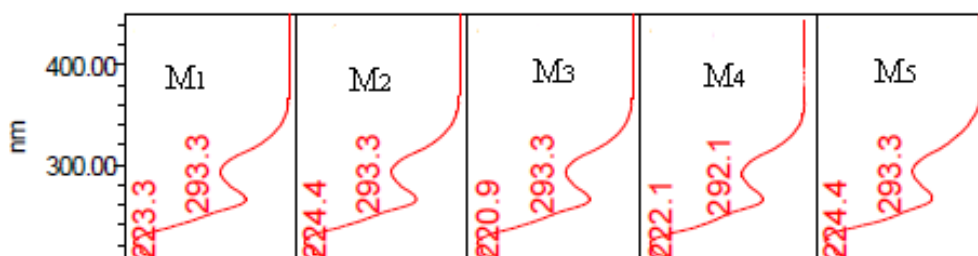


Рис. 6.10 УФ-спектри метаболітів силденафілу, виявлені на хроматограмах в пробах крові щурів

При цьому встановлено, що УФ-спектри метаболітів силденафілу характеризуються двома смугами поглинання. Максимум першої смуги знаходиться в діапазоні довжин хвиль 220-225 нм, а другої – 292-295 нм. УФ-спектральні криві усіх метаболітів силденафілу, які виявлено в органах та біологічних рідинах щурів, подібні до УФ-спектра силденафілу.

Найвищий рівень концентрації силденафілу, як і в попередніх методах аналізу, спостерігається у пробах із кишківника, шлунку, печінки та сечі щурів.

6.7. Кількісне визначення силденафілу та варденафілу в органах і біологічних рідинах щурів

Визначення вмісту силденафілу та варденафілу в пробах із органів та біологічних рідин щурів, відібраних на дослідження через 3 год та через 24 год після введення препаратів, проводили методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС (див. розділи 6.3 і 6.4).

Загальний вміст силденафілу і варденафілу в крові отримували шляхом сумування кількостей препаратів, визначених в сироватці крові та еритроцитарній масі.

Результати визначення рівня концентрації силденафілу та варденафілу в тканинах і біологічних рідинах щурів, відібраних на дослідження через 24 год після введення препаратів у вищій разовій дозі, наведено в таблиці 6.6 та таблиці 6.7.

Результати кількісного визначення досліджуваних препаратів, після введення тваринам в однократній терапевтичній дозі – представлено на рисунку 6.11.

Таблиця 6.6

**Результати кількісного визначення силденафілу в органах щурів,
відібраних через 24 год після введення препарату
у вищій разовій дозі (n=5)**

Орган	Маса органу, г (мл)	Визначено силденафілу			
		ГХ/МС		ВЕРХ/МС	
		у взятому об'єкті, мкг	у перерахунку на 1 г (1мл) об'єкту, мкг	у взятому об'єкті, мкг	у перерахунку на 1 г (1мл) об'єкту, мкг
Мозок	1,4±0,81	0,90	0,62	0,92	0,64
Серце	0,86±0,13	0,96	1,12	0,98	1,14
Легені	2,05±0,53	2,56	1,25	2,58	1,26
Печінка	6,96±1,15	12,95	1,85	13,16	1,88
Шлунок із вмістом	2,05±0,51	22,88	11,16	22,86	11,15
Кишківник	9,02±2,04	74,32	8,24	74,42	8,25
Кров	5,10±1,3	3,62	0,71	3,62	0,71
Сеча	13,24±3,5	18,80	1,42	18,80	1,42

Таблиця 6.7

**Результати кількісного визначення варденафілу в органах щурів,
відібраних через 24 год після введення препарату
у вищій разовій дозі (n=5)**

Орган	Маса органу, г (мл)	Визначено варденафілу			
		ГХ/МС		ВЕРХ/МС	
		у взятому об'єкті, мкг	у перерахунку на 1 г (1мл) об'єкту, нг	у взятому об'єкті, мкг	у перерахунку на 1 г (1мл) об'єкту, нг
Мозок	1,21± 0,84	0,22	180	0,22	180
Серце	1,11± 0,08	0,26	230	0,26	231
Легені	1,85± 0,53	0,57	310	0,57	310
Печінка	6,90± 1,13	2,35	340	2,35	341
Шлунок із вмістом	1,54± 0,41	3,77	2450	3,77	2448
Кишківник	6,29± 2,88	10,13	1610	10,14	1612
Кров	5,15± 1,30	0,25	50,10	0,26	50,12
Сеча	30,05± 3,80	0,40	13,43	0,40	13,45

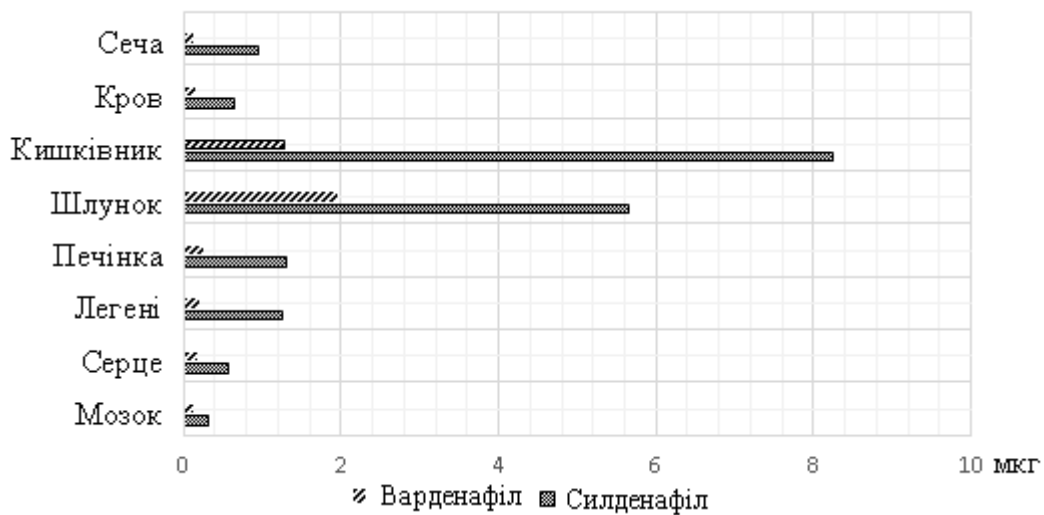


Рис. 6.11 Результати кількісного визначення силденафілу та варденафілу в органах шурів, відібраних через 24 год після введення препарату у разовій терапевтичній дозі (n=5)

Порівняльну оцінку розподілу силденафілу та варденафілу в органах та біологічних рідинах шурів при введенні вищої разової дози, у пробах біологічного матеріалу, відібраного на дослідження через 3 год та 24 год після введення препаратів, наведено на рисунках 6.12 та 6.13.

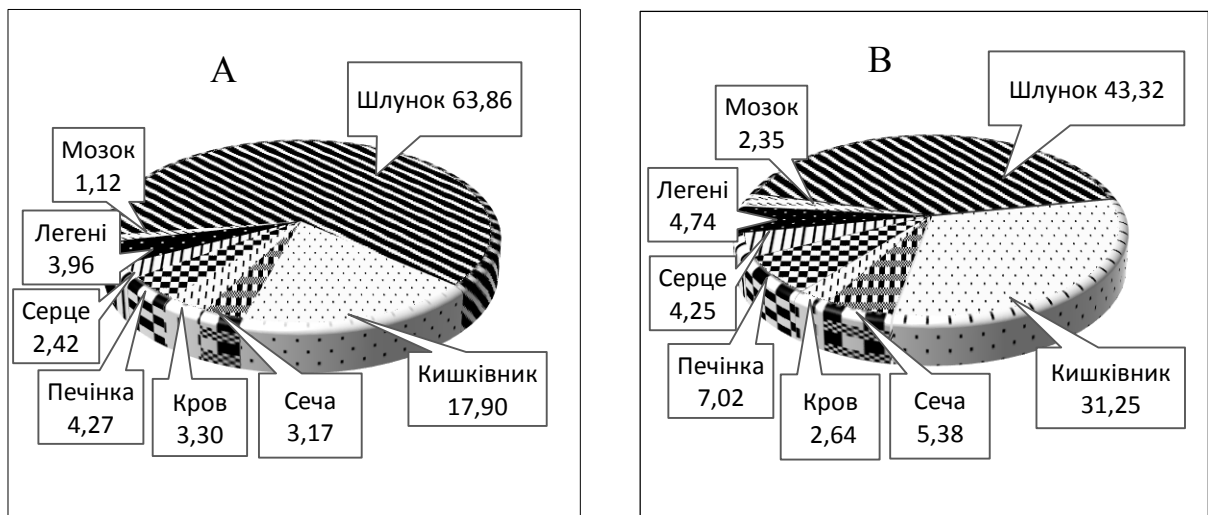


Рис. 6.12 Розподіл силденафілу (%) в органах шурів, при дослідженні біологічного матеріалу: А – через 3 год, В – через 24 год після введення препарату

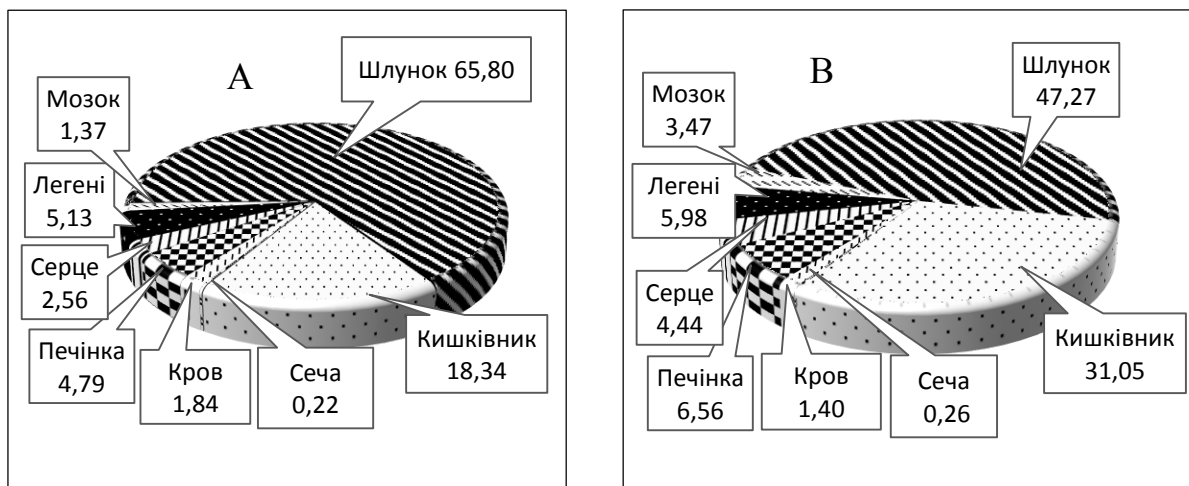


Рис. 6.13 Розподіл варденафілу (%) в органах щурів, при дослідженні біологічного матеріалу: А – через 3 год, В – через 24 год після введення препарату

На рисунках 6.14 та 6.15 представлено співвідношення між загальними кількостями досліджуваних препаратів та їх структурними метаболітами в пробах із органів та біологічних рідин щурів, відібраних на дослідження через 24 год після введення вищих разових доз.

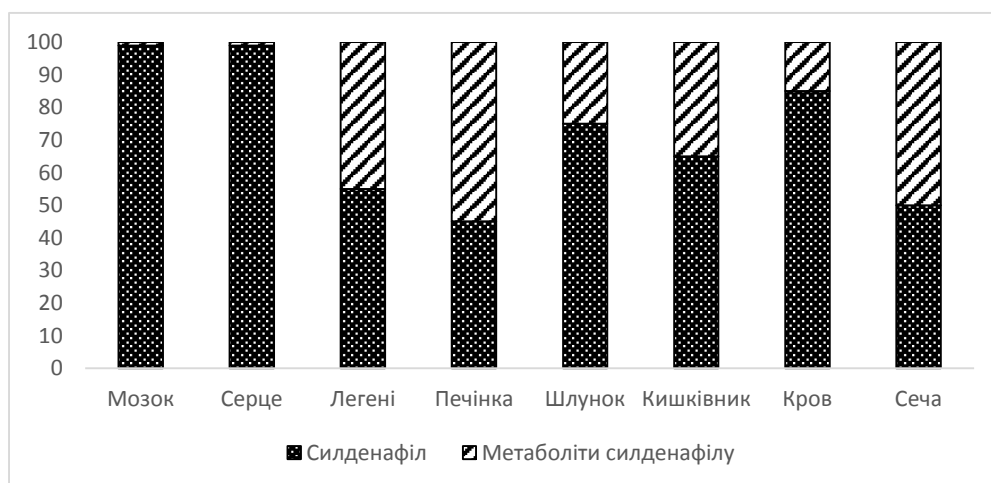


Рис. 6.14 Співвідношення між рівнем концентрації силденафілу та його метаболітів в органах та біологічних рідинах (через 24 год після введення вищої разової дози)

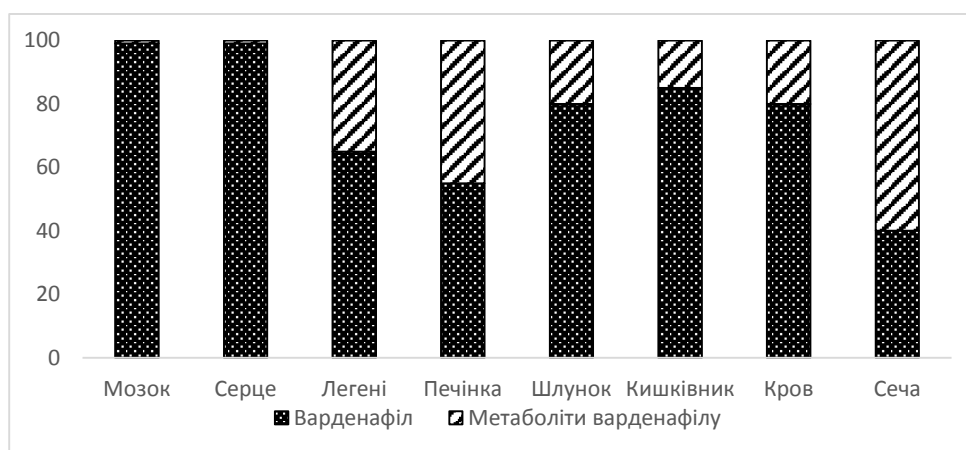


Рис. 6.15 Співвідношення між рівнем концентрації варденафілу та його метаболітів в органах та біологічних рідинах (через 24 год після введення вищої разової дози)

Оскільки силденафіл та варденафіл є ліпофільними речовинами, основна частина введеної дози у незміненому вигляді знаходиться в шлунку та кишківнику.

В сечі вміст силденафілу і варденафілу є низьким, при чому більшу кількість (до 50 %) для силденафілу і (до 70 %) варденафілу становлять їх метаболіти.

У крові, відібраній на дослідження через 3 год після введення препаратів, рівень концентрації силденафілу і варденафілу вищий за рівень концентрації, який спостерігається через 24 год після введення досліджуваних препаратів, що можна пояснити невеликим періодом піввиведення ($T_{1/2}$) даних препаратів – в середньому 3-5 годин.

Отримані результати свідчать про те, що для клінічних лабораторних досліджень на аналіз потрібно відбирати кров (сироватку) протягом перших трьох годин після прийому силденафілу та варденафілу.

Для цілей судово-хімічного аналізу при летальних отруєннях силденафілом рекомендовано на дослідження відправляти шлунок із вмістом, кишківник, печінку, легені, серце та сечу, а варденафілом – шлунок із вмістом, кишківник, печінку, легені та серце.

Дані дослідження та їх результати описані нами в публікаціях [174].

Висновки до розділу 6

1. Вивчено розподіл силденафілу і варденафілу в органах та біологічних рідинах щурів через 3 год і 24 год після введення досліджуваних препаратів та нітрогліцерину у кількостях, які відповідають однократній терапевтичній та вищій разовій дозі.

2. Запропоновано умови поетапного виявлення та визначення силденафілу і варденафілу та їх метаболітів у біологічному матеріалі щурів із використанням розроблених методик хроматографічного аналізу.

3. У відібраних зразках біологічного матеріалу мас-спектрометрично ідентифіковано будову 4 метаболітів силденафілу і 3 метаболітів варденафілу при аналізі методом ГХ/МС, при аналізі методом ВЕРХ/МС ідентифіковано 6 метаболітів силденафілу і 5 метаболітів варденафілу.

4. Методом УВЕРХ/МС/МС і УВЕРХ/УФ визначено кількості силденафілу в біологічному матеріалі в присутності 5 метаболітів, а методом ВЕРХ/УФ та ВЕРХ/ФЛ визначено кількості варденафілу в біологічних пробах в присутності 10 структурних метаболітів.

5. Визначено кількісне співвідношення між силденафілом та варденафілом і їх метаболітами в органах та біологічних рідинах щурів. Найвищий вміст метаболітів силденафілу та варденафілу спостерігається в сечі, печінці та легенях.

Високий рівень концентрації силденафілу і варденафілу в крові спостерігається протягом перших 3-х годин після їх введення, що дозволяє використати ці дані для клінічних лабораторних досліджень.

Для судово-хімічних досліджень при летальних отруєннях силденафілом рекомендовано відправляти шлунок із вмістом, кишківник, печінку, легені, серце та сечу, а варденафілом – шлунок із вмістом, кишківник, печінку, легені та серце.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в публікації:

1. Validation of an HPLC-MS method for the determinatin of vardenafil in rat urine / L. Osypchuk, I. Halkevych, S. Davydovych, Y. Bidnychenko. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019.Vol. 9(08). P. 79–85. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, участь у написанні статті).*

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та практичне вирішення наукового завдання, яке полягає у формуванні комплексного підходу до розробки методик виділення і визначення представників інгібіторів ФДЕ-5 – силденафілу та варденафілу в біологічних рідинах (сечі, крові, плазмі) та біологічних тканинах із використанням хроматографічних методів аналізу. На основі проведеного дослідження вперше запропоновано систематичний хіміко-токсикологічний аналіз силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виділених з біологічного матеріалу.

1. Для попереднього скринінгу силденафілу і варденафілу в біологічному матеріалі запропоновано чутливі реакції та розроблено склад 4-х підтверджуючих систем розчинників для розділення досліджуваних сполук у суміші з їх метаболітами при ТШХ аналізі.

2. Розроблено способи ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу в розчинах методами УФ- та флуоресцентної спектрометрії, ГХ/МС, ВЕРХ та УВЕРХ. Встановлено, що за показниками лінійності, правильності та прецизійності дані методи придатні для визначення силденафілу і варденафілу у розчинах та витяжках з біологічного матеріалу.

3. Вивчено вплив природи органічних розчинників та рН середовища на ступінь екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів, що дозволило рекомендувати 1,2-дихлоретан як ефективний екстрагент силденафілу при рН 8,0 і варденафілу при рН 7,5. Опрацьовано умови очищення проб методом твердофазної екстракції на картриджах Oasis HLB.

Вперше встановлено, що при рН 5,5-7,8 силденафіл та варденафіл ефективно сорбуються з водних розчинів Н-клиноптилолітом. Пробопідготовку біологічних матриць цим сорбентом рекомендовано проводити в динамічних умовах, при цьому з водних розчинів ізолюється 90 - 91 % варденафілу та 93-94 % силденафілу.

4. Вперше проведено ізолювання силденафілу та варденафілу з біологічних тканин загальноприйнятими в токсикологічному аналізі методами: О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто, при цьому ступінь ізолювання силденафілу становить 25-38 %, а варденафілу – 28-37 %.

5. Розроблено ефективні методики виділення силденафілу та варденафілу з біологічних тканин та крові сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). Із тканини печінки даним методом виділяється 45 - 48 %, а з крові – 45 - 47 % досліджуваних сполук. До 59-60 % силденафілу і варденафілу виділяється із крові, після осадження білкової фракції 10 % розчином цинку сульфату та 96 % етанолом і очищенні проб методом ТФЕ. З плазми на картриджах Oasis HLB ізолюється до 89 % силденафілу і до 88 % варденафілу, а на сорбційних колонках з Н-клинотилолітом – ізолюється 78 - 79 % досліджуваних сполук. Застосовуючи рідинну і твердофазну екстракції з сечі виділяється 68-69 % силденафілу та 67-68 % варденафілу.

6. Проведена валідація методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС в плазмі, сечі та тканині печінки за критеріями: селективність/специфічність, лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність, матричний ефект, відтворюваність та стабільність. Встановлено, що дані методи повністю відповідають затвердженим вимогам національних та міжнародних регламентуючих документів, характеризуються правильністю, є точними та відтворюваними і можуть використовуватись для проведення хіміко-токсикологічних і клінічних досліджень силденафілу та варденафілу.

7. Вивчено розподіл силденафілу і варденафілу в органах та біологічних рідинах щурів (через 3 год та через 24 год після введення препаратів одночасно з нітрогліцерином) на рівні концентрацій, які відповідають одноразовій терапевтичній та вищій разовій дозі. Встановлено, що при прийомі силденафілу з органічними нітратами, через 24 год найвищий вміст силденафілу спостерігається в шлунку, кишківнику, печінці, легенях, серці та сечі, а варденафілу – в шлунку, кишківнику, печінці, легенях та серці.

Найвищий вміст метаболітів силденафілу та варденафілу спостерігається в сечі, печінці та легенях.

Для клінічних лабораторних досліджень на аналіз потрібно направляти кров (сироватку) протягом перших 3 год після прийому силденафілу та варденафілу в кількостях, що відповідають однократній терапевтичній дозі.

8. Запропоновано умови поетапного виявлення і визначення силденафілу та варденафілу у суміші із метаболітами в біологічних пробах хроматографічними методами аналізу: ГХ/МС, ВЕРХ/МС, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/ФЛ, УВЕРХ/МС/МС, УВЕРХ/УФ. Методом ВЕРХ/МС ідентифіковано 6 структурних метаболітів силденафілу та 5 варденафілу, методом ГХ/МС – 4 метаболіти силденафілу та 3 метаболіти варденафілу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. Москва: Мир, 1987. 462 с.
2. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: методичні рекомендації / Резніков О. Г., Соловйов А. І, Добреля Н. В., Стефанов О. В. Київ, 2006. 28 с.
3. Валидация биоаналитического метода: методические рекомендации / Жукова Н. А. и другие. Киев, 2013. 35 с.
4. Варинський Б. О. Розвиток ВЕРХ-МС як методу оцінювання чистоти і підтвердження молекулярної маси нових біоактивних речовин. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2014. №2(15). С. 85-88.
5. Грызодуб А. И. Стандартизированные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Харьков. Г.П. «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016. 396 с.
6. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 1. 1128 с.; Т. 2. 724 с.; Т. 3. 732 с.
7. Державний реєстр лікарських засобів України / М-во охорони здоров'я України. <http://www.drlz.kiev.ua> (дата звернення 10. 01 2018).
8. Дорошкевич І.О. Фармакоепідеміологія інгібіторів фосфодіестерази 5. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2014. №1(1), Т. 18. С. 21-24.
9. Клименко Л. Ю. Комплексний підхід до розробки та валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в хіміко-токсикологічному аналізі: дис. на здобуття д-ра фарм. наук: 15.00.02/ НФаУ. Харків, 2015. 816 с.

- 10.Компедиум 2016-лекарственные препараты / под ред. В.Н. Коваленко. К.: Морион, 2015. 1408 с.
- 11.Крамаренко В. П. Токсикологічна хімія. Київ: Вища школа, 1995. 423 с.
- 12.Кундієв Ю., Резніков О. Розвиток біоетики в Україні *.Вісник фармакології і фармації.* 2004. № 4. С. 2-5.
- 13.Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. 6-ое изд., перераб. и доп. Москва: Химия, 1989. 448 с.
- 14.Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2016, 1216 с.
15. Методичні рекомендації по утриманню лабораторних тварин та роботі з ними / Кожем'якін Ю., Хромов О., Філоненко М., Сайфетдінова Г. Київ: Авіцена, 2002. 156 с.
- 16.Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Осипчук Л.І., Галькевич І.Й. Інформаційний лист № 268-2017. Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2017. (Протокол № 102 від 19.04.2017 р.).
- 17.Осипчук Л. І. Визначення силденафілу в сечі з використанням концентрування Н-клинотилолітом. *Природничі читання: матеріали II наук.-практ. конф. з міжнар. участю. 14-17 травня 2015 р. Чернівці, 2016.* С. 199.
- 18.Осипчук Л. І. Вплив рН середовища на ступінь ізолювання силденафілу Н-клинотилолітом. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2015: матеріали Всеукр. наук. - практ. конф. молодих вчених та студентів, 26-27 березня 2015 р. Запоріжжя, 2015.* С. 91.
- 19.Осипчук Л. І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу. *Аналітична хімія у фармації: матеріали II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф. 17 бер. 2016 р. Харків, 2016.* С. 38.
- 20.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація.* 2015. №1-2. С. 124-128.

- 21.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вивчення умов екстракції силденафілу органічними розчинниками. *Фармацевтичний журнал*. 2008. №1. С. 83-87.
- 22.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вплив рН середовища на ізолювання силденафілу з плазми Н-клиноптилолітом. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24(3). Київ. С.127- 132.
- 23.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ГХ-МС. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених і студентів з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, 12-13 квітня 2018 р. Харків, 2018. С. 340.*
- 24.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ): підсумкова IX наук. – практ. конф., 14 червня 2017 р. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига» 2017, С. 341-342.*
- 25.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з флуоресцентним детектором, збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції *Медична наука та практика XXI століття*, м. Київ, 1–2 лютого 2019 р. Київ: «Київський медичний науковий центр», 2019, С. 107.
- 26.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові. *Одеський медичний журнал*. 2016. №2. С.16-20.
- 27.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Методи виділення силденафілу з біологічного матеріалу. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2013. №3-4. С.42-45.
- 28.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й., Кузьмицька А.Є. Експрес-методики ідентифікації силденафілу в судово-хімічній практиці. *Актуальні проблеми*

- профілактичної медицини*: зб. наукових праць, вип. 9, присвячується 95-річчю від дня народження професора В.П. Крамаренко. Львів, 2011. С. 188- 192.
- 29.Осипчук Л. И. Идентификация варденафила методом УФ-спектрофотометрии. *Традиции и инновации фармацевтической науки и практики: Материалы Всероссийской научн.-практ. конф. с международным участием, посвященной 45-летию фармацевтического факультета КГМУ. Курск, 2011. С. 284- 286.*
 - 30.Осипчук Л.И., Галькевич И. И. Влияние типа сорбента метода твердофазной экстракции на степень выделения силденафила из плазмы крови. *Университетская наука: взгляд в будущее: Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета (7 февраля 2020 года): в 2 т., Курский гос. мед. ун-т; под ред. В.А. Лазаренко. Курск: КГМУ, 2020. Т. I. С. 757-761.*
 - 31.Придатність аналітичних методів для конкретного застосування. Настанова для лабораторій з валідації методів та суміжних питань / за ред. Б. Магнуссона та У. Ернемарка: переклад другого видання 2014 р. Київ: ТОВ "Юрка Любченка", 2016. 92 с.
 - 32.Примиська С.О., Решетіловський В.П. Вивчення структури пор природніх цеолітів. *Восточно-Европейский журнал передовых технологий*. 2013. Т. 2, №6. С.62-64.
 - 33.Разработка и валидация методики количественного определения силденафила и N-десметил силденафила с помощью ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови человека / И. Э. Кузнецов, Е. А. Науменко, Н. К. Резниченко и др. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2017. Т. 1(5). С.22-32.
 - 34.Спектральный анализ чистых веществ / под ред. Зильберштейна Х.И. Санкт-Петербург: Химия, 1994. 336 с.

- 35.Хроматографические методы в аналитическом обеспечении создания и контроля качества лекарственных средств в Украине / под ред. Член-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского – Харьков: изд. НТМТ, 2016. – 288 с.
- 36.Шатц В. Д., Сахартова О. В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига:Зинатне, 1988. 390 с.
- 37.2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) / N. Galiè, M. Humbert, J. L. Vachiery et al. *Eur Heart J*. 2016. Vol. 37(1). P.67-119.
- 38.A case of hepatotoxicity induced by adulterated "Tiger King", a chinese herbal medicine containing sildenafil / R. Nissan, A. Poperno, G. Y. Stein et al. *Curr Drug Saf*. 2016. Vol. 11(2). P. 184-188.
- 39.A fully validated method for the determination of vardenafil in blood using gas chromatography/mass spectrometry / I. Papoutsis, P. Nikolaou, S.Athanaselis et al. *J. Mass. Spectrom*. 2011. Vol. 46(1). P. 71–76.
- 40.A gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil and their metabolites in human urine / Strano-Rossi S., Anzillotti L., de la Torre X., Botrè F. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010. Vol. 24(11). P. 1697-706.
- 41.A non-fatal self-poisoning attempt with sildenafil / V. Matheeussen, K. E. Maudens, K. Anseeuw et al. *J Anal Toxicol*. 2015. Vol. 39(7). P. 572-576.
- 42.A reliable method to quantify sildenafil and its metabolite N-demethylsildenafil by HPLC in plasma of children / B. Ramírez-Mendiola, C. Flores-Pérez, R. García-Álvarez et al. *Drug Res (Stuttg)*. 2013. Vol. 63(9). P. 473-476. DOI: 10.1055/s-0033-1345183.

43. A review of methods for the simultaneous detection of illegal ingredients in food supplements / M. J Walker, D. P Naughton , N. Deshmukh, D.T.Burnsc. *Journal of the Association of Public Analysts*. 2016. Vol. 44. P. 51-56
44. Acute effects of vardenafil on pulmonary artery responsiveness in pulmonary hypertension / E. Karasu-Minareci, I. H. Ozbudak, G. Ozbilim, G. Sadan. *The Scientific World Journal*. 2012, Article ID 718279, 6 p. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/718279>
45. Alan Xu Q. Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its applications. WILEY, 2013. 304 p.
46. Alp M., Coşkun M., Göker H. Isolation and identification of a new sildenafil analogue adulterated in energy drink: propoxyphenyl sildenafil. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. Vol. 72(18). P. 155-158.
47. Al-Tahami K. Determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements sold in the Yemeni market. *International Journal of Scientific Research*. 2014. Vol. 3(4). P. 403-405.
48. An update on pharmacological treatment of erectile dysfunction with phosphodiesterase type-5 inhibitors / R. Bruzziches, D. Francomano, P. Gareri et al. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2013. Vol. 14(10). P. 1333–1344.
49. Analysis of dietary supplements and drugs for erectile dysfunction by HPLC- UV / A. Tero-Vescan, C. E. Vari, C. Filip et al. *Acta Medica Transilvanica*. 2014. Vol. 19(4). P. 297-299.
50. Analysis of illicit dietary supplements sold in the Italian market: identification of a sildenafil thioderivative as adulterant using UPLC-TOF/MS and GC/MS / F. Damiano, C. Silva, A. Gregori et al. *Science & Justice*. 2014. Vol. 54(3). P. 228-237.
51. Analytical method validation and instrument performance verification / C. C. Chan, H. Lam, Y. C. Lee, X.-M. Zhang. A John Wiley & Sons, INC., 2004. 303 p.
52. Azimi S., Mistry N., Wood M. UPLC/MS/MS for the screening, confirmation, and quantification of drugs illegally added to herbal / dietary supplements for the

enhancement of male sexual performance. Waters Corporation, U.S.A. 2012. 6p.
<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004511en.pdf> (дата
 звернення 15.03.2019). Назва з екрану.

53. Bae S. H., Bae S. K., Lee M. G. Effect of hepatic CYP inhibitors on the metabolism of sildenafil and formation of its metabolite, N-desmethylsildenafil, in rats in vitro and in vivo. *J Pharm Pharmacol*. 2009. Vol. 61(12). P. 1637 - 1642.
54. Balhara Y. P., Sarkar S., Gupta R. Phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Indian J. Endocrinol. Metab*. 2015. Vol. 19(4). P. 451-461.
55. Bayer Inc. LEVITRA[®] (vardenafil tablets 5 mg, 10 mg, 20 mg of vardenafil, as vardenafil hydrochloride). Product Monograph. Mississauga, Ontario. 2015, 52 p. <https://www.bayer.ca/omr/online/levitra-pm-en.pdf> (дата звернення 18.05.2018). Назва з екрану.
56. Bialkowski A., Moenkemeyer F., Patel N. Intravenous sildenafil in the management of pulmonary hypertension associated with congenital diaphragmatic hernia. *Eur. J. Pediatr. Surg*. 2015. Vol. 25(2). P. 171–176.
57. Bischoff E. Vardenafil preclinical trial data: potency, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and adverse events. *Int. J. Impot. Res*. 2004. Vol. 16(1). P. 34 - 37.
58. Blue Vision and sinus tachycardia: sildenafil citrate overdose / S. Güler, İ. Gökçek, İ. Güven et al. *JAEMCR*. 2015. Vol. 6. P. 87-89. DOI: 10.5152/jaemcr.2015.1232.
59. Case report: association of combined nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION) and obstruction of cilioretinal artery with overdose of Viagra / R. Akash, D. Hrishikesh, P. Amith, S. Sabah. *J. Ocul. Pharmacol. Ther*. 2005. Vol. 21(4). P. 315-317.

- 60.Characteristics, behaviors, and attitudes of men bypassing the healthcare system when obtaining phosphodiesterase type 5 inhibitors / G. Schnetzler, I. Banks, M. Kirby et al. *J. Sex. Med.* 2010. Vol. 7(3). P. 1237-1246.
- 61.Chromatographic determination of sildenafil in blood plasma using spectrophotometric and mass-spectrometric detection / D. V. Yaroshenko, A. V. Grigoriev, A. A. Sidorova, L. A. Kartsova. *Journal of Analytical Chemistry.* 2013. Vol. 68(9). P. 801-808.
- 62.Comparative effectiveness and safety of oral phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction: a systematic review and network meta-analysis / J. Yuan, R. Zhang, Z. Yang et al. *Eur. Urol.* 2013. Vol. 63(5). P. 902-912.
63. Corbin J. D. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction International. *Journal of Impotence Research.* 2004. Vol. 16. P. 4-7.
- 64.Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities.* 2010. L 276. P. 33 – 79.
- 65.Counterfeit phosphodiesterase type 5 inhibitors pose significant safety risks / G. Jackson, S. Arver, I. Banks, V. J. Stecher. *Int. J. Clin. Pract.* 2011. Vol. 64(4). P. 497-504.
- 66.Detection, identification and quantification by ¹H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance / V. Gilard, S. Balayssac, A. Tinaugus et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. Vol. 102. P. 476-493.
- 67.Determination and quantitation of sildenafil and its major metabolite in the breast milk of a lactating woman / U. Wollein, B. Schech B, J. Hardt, N. Schramek. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. Vol. 120. P. 100-105.
- 68.Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection / C. Xiao, M. Tang, J. Li et al. *Journal of Chromatography B.* 2013. Vol. 931. P. 111-116.

- 69.Determination of undeclared sildenafil citrate and tadalafil in aphrodisiac herbal preparations by TLC and HPLC / S. M. A. Saeed, M. A. Mohamed, S. W. Shantier et al. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015. Vol. 3(6). P. 688-696.
- 70.Development and validation of RP-HPLC method for sildenafil citrate in rat plasma-application to pharmacokinetic studies / A.S. Tripathi, I. Sheikh, A.P. Dewani et al. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013. Vol. 21(3). P. 317–321.
- 71.Do T. K, Theocharis G., Reich E. Simultaneous detection of three phosphodiesterase type 5 inhibitors and eight of their analogs in lifestyle products and screening for adulterants by High-PerformanceThin-Layer Chromatography. *Journal of AOAC International*. 2015. Vol. 98(5). P. 1226-1233.
- 72.Effectiveness of transition from intravenous epoprostenol to oral/inhaled targeted pulmonary arterial hypertension therapy in pediatric idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension / L. Melnick, R.J. Barst, C.A Rowan et al. *Am. J. Cardiol*. 2010. Vol. 105(10). P. 1485-1489.
- 73.Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes / S. A. Ballard, C.J. Gingell, K. Tang et al. *J Urol*. 1998. Vol. 159(6). P. 2164-2171.
- 74.Efficacy and safety of vardenafil in patients with erectile dysfunction. Results of the Mexican Multicentric Study / M. Sotomayor-de-Zavaleta, E. Rubio-Aurioles, G. Feria-Bernal et al. *Rev Invest Clin*. 2004. Vol. 56(5). P. 572-579.
- 75.European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg. 1986. 52 p.
- 76.European Medicines Agenc. Levitra (International Nonproprietary Name: vardenafil). CHMP assessment report, London. 2010, 39 p.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-

[Assessment Report - Variation/human/000475/WC500097073.pdf](#) (дата звернення 18.05.2018). Назва з екрану.

77. Eve D. Drug profile: Levitra. *Medicine discovery*. May 2009. URL: <http://www.discoverymedicine.com/David-Eve/2009/05/23/drug-profile-levitra> (дата звернення 08.11.2018). Назва з екрану.
78. Fard H. H., Akhgari M. Analytical perspectives of chemical adulterants in herbal sexual enhancer drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2018. Vol.6(1). P. 45-53.
79. Fatal overdose with sildenafil citrate (Viagra): first report and review of the literature / A. Tracqui, A. Miras, A. Tabib et al. *Hum. Exp. Toxicol*. 2002 Vol. 21(11). P. 623-629.
80. Ferguson J. E., Carson C. C. Phosphodiesterase type 5 inhibitors as a treatment for erectile dysfunction: Current information and new horizons. *Arab. J. Urol*. 2013. Vol. 11(3). P. 222-229.
81. Food, Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research (FDA). Guidance for industry-bioanalytical method validation, center for drug evaluation and research. *US Department for Health and Human Services*, 2013, Silver Spring, MD, 2001.
82. Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction (Forensic Science and Medicine). Telepchak M. J., August T. F., Chaney G.: Humana Press; 2004, 370 p.
83. French D. D., Margo C. E, Campbell R. R. Enhancing postmarketing surveillance: continuing challenges. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2015. Vol. 80(4). P. 615-617.
84. Gamidov S. I., Iremashvili V.V., Popova A. I. Modernity in the treatment of erectile dysfunction: Levitra (vardenafil) in the form of oral dispersible tablet. *Urologiia*. 2013. Vol. 3. P. 102-106.
85. Guideline on bioanalytical method validation. *European Medicines Agency* (EMA/CHMP/EWP/192217/2009), 2011.

- 86.Haque A., Kumar N. Method development and validation of Lc-Ms/Ms method for the estimation of sildenafil and its metabolite piperazine n-desmethyl sildenafil in human plasma. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014. Vol. 6(5). P. 677-682.
- 87.Huang S. A., Lie J. D. Phosphodiesterase-5 (PDE 5) inhibitors in the management of erectile dysfunction. *J. P&T.* 2013. Vol. 38(7). P. 407-419.
- 88.Hussain S., Shaikh T. Ultra high performance liquid chromatography (UPLC): a new trend in analysis. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 2016. Vol. 5(3). P. 387.
- 89.Johnson R. D., Lewis, R. J. Identification of sildenafil (Viagra®) and its metabolite (Uk-103,320) in six aviation fatalities. *Federal Aviation Administration: Final Report.* Washington, 2006. 11 p.
- 90.Johnson R.D., Lewis R. J., Angier M. K. The LC/MS quantitation of vardenafil (Levitra) in postmortem biological specimens. *Federal Aviation Administration: Final Report.* Washington, 2006. 10 p.
- 91.Johnson R.D., Lewis R. J., Angier M. K. The postmortem distribution of vardenafil (Levitra) in an aviation accident victim with an unusually high blood concentration. *J. Anal. Toxicol.* 2007. Vol. 31(6). P. 328-333.
- 92.Kannappan N., Yada D., Shashikanth M.R. Method development and validation of stability indicating methods for assay of tadalafil and sildenafil citrate by HPLC. *International Journal of ChemTech Research.* 2010. Vol. 2(1). P. 329- 333.
- 93.Katlowitz N. M., DeRosalio A. Phosphodiesterase type 5 inhibitors and nitrates: Is concomitant use safe? Are there alternatives?. *Current Sexual Health Reports.* 2007. Vol. 4(2). P. 59-63.
- 94.Kloner R. A. Cardiovascular risk and sildenafil. *American Journal of Cardiology.* 2000. Vol. 86(2). P. 57-61.
- 95.Kloner R. A. Novel phosphodiesterase type 5 inhibitors: assessing hemodynamic effects and safety parameters. *Clin. Cardiol.* 2004. Vol. 27(1). P. 20-25.

96. Kloner R. A. Pharmacology and drug interaction effects of the phosphodiesterase 5 inhibitors: focus on alpha-blocker interactions. *American Journal of Cardiology*. 2005. Vol. 96(12). P. 42-46.
97. Kloner A. R., Henderson L. Sexual function in patients with chronic angina pectoris. *American Journal of Cardiology*. 2013. Vol. 111(11). P. 1671-1676.
98. Krenzelok E. P. Sildenafil: clinical toxicology profile. *Clinical Toxicology*. 2000. Vol. 38(6). P. 645–651.
99. Kumar A. HPLC: highly accessible instrument in pharmaceutical industry for effective method development. *Pharm. Anal. Acta*. 2012 Vol. 3 (1). 9 p. DOI:10.4172/2153-2435.1000147
100. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. Boston: Springer, 1999. 698 p.
101. Lakshmana Prabu S, Suriyaprakash T. N. K. Extraction of drug from the biological matrix: a review. *Applied Biological Engineering – Principles and Practice*. 2012. P. 479-506 DOI: 10.5772/32455
102. Last performance with VIAGRA: post-mortem identification of sildenafil and its metabolites in biological specimens including hair sample / V. Dumestre-Toulet, V. Cirimele, S. Gromb et al. *Forensic Sci Int*. 2002. Vol.26(1). P. 71-76.
103. Laties A., Sharlip I. Ocular safety in patients using sildenafil citrate therapy for erectile dysfunction. *J. Sex. Med*. 2006. Vol. 3(1). P. 12-27.
104. Lee M. Focus on phosphodiesterase inhibitors for the treatment of erectile dysfunction in older men. *Clin. Ther*. 2011. Vol. 33(11). P. 1590-1608.
105. Lewis R.J., Johnson R.D., Blank C. Quantitative determination of sildenafil (Viagra) and its metabolite (UK-103,320) in fluid and tissue specimens obtained from six aviation fatalities. *J. Anal. Toxicol*. 2006. Vol.30(1). P. 14-20.
106. Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension / E. D. Michelakis, W. Tymchak, M. Noga et al. *Circulation*. 2003. Vol. 108(17). P. 2066–2069.

107. Lowe G., Costabile R. A. 10-year analysis of adverse event reports to the food and drug administration for phosphodiesterase type-5 inhibitors. *J. Sex. Med.* 2012. Vol. 9(1). P. 265–270.
108. Management of sexual dysfunction in patients with cardiovascular disease: recommendations of the Princeton Consensus Panel / R. DeBusk, Y. Drory, I. Goldstein et al. *Am. J. Cardiol.* 2000. Vol. 86(2). P. 175-181.
109. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2609 p.
110. Moschos M., Nitoda E. Pathophysiology of visual disorders induced by phosphodiesterase inhibitors in the treatment of erectile dysfunction. *Drug. Des. Devel. Ther.* 2016. Vol. 10. P. 3407–3413.
111. Nair J., Lakshminrusimha S. Update on PPHN: mechanisms and treatment. *Semin. Perinatol.* 2014. Vol. 38(2). P. 78-91.
112. New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis / J. Peng, F. Tang, R. Zhou et al. *Acta Pharm. Sin. B.* 2016. Vol. 6(6): P. 540–551.
113. Nichols D. J., Muirhead G. J., Harness J. A. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *Br. J. Clin.* 2002. Vol. 53(1). P. 5-12.
114. Nollet L. M., Lambropoulou D. A. Gas chromatography–mass spectrometry. Chromatographic analysis of the environment: mass spectrometry based approaches. Fourth edition. 2017. Chapter 1. P. 3-25.
115. Novel mechanisms of sildenafil in pulmonary hypertension involving cytokines/chemokines, MAP kinases and Akt / T. Kiss, K. Kovacs, A. Komocsi et al. *PLoS One.* 2014. Vol. 9(8). P. 1-10.
116. Oh D. J. Sildenafil overdose can cause rhabdomyolysis and subjective visual perception changes. *Nephrology.* 2014. Vol. 19(4). P. 258.
117. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group / I. Goldstein, T. Lue, H. Padma-Nathan et al. *N. Engl. J. Med.* 1998. Vol. 338(20). P. 1397-1404.

118. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension / E. Michelakis, W. Tymchak, D. Lien et al. *Circulation*. 2002. Vol. 105(20). P. 2398-2403.
119. Osypchuk L. Determination of sildenafil in biological fluids. *Pharmaceutical Sciences in XXI Century: collection of scientific works II International Scientific Conference*, 2-4 may, 2014. Tbilisi, Georgia, 2014. P. 157-158.
120. Osypchuk L. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood. The 6th international pharmaceutical conference *Science and practice 2015*: Proc. Sci. pract. Conf. November 5-6, 2015. Kaunas, Lithuania, 2015. P. 46.
121. Pfizer Inc. VIAGRA* (sildenafil as sildenafil citrate), tablets 25 mg, 50 mg and 100 mg. Product Monograph. Kirkland, Quebec, Canada. 2015, 49 p. https://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10037206/f/201710/VIAGRA_PM_E.pdf. (дата звернення 17.05.2018). Назва з екрану.
122. Pharmacokinetic drug interactions of phosphodiesterase-5 inhibitors mediated by cytochrome P450 3A4 isoform / S. Pentyala, A. Rahman, S. Mishra. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2011. Vol. 3(2). P. 22- 31.
123. Pharmacokinetic evaluation of sildenafil as a pulmonary hypertension treatment / M. C. Chaumais, S. Perrin, O. Sitbon et al. *Journal Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2013. Vol. 9(9). P. 1193-1205.
124. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man / D. K. Walker, M. J. Ackland, G. C. James et al. *Xenobiotica*. 1999. Vol. 29. P. 297-310.
125. Pharmacokinetics of a new orodispersible tablet formulation of vardenafil: results of three clinical trials / R. Heinig, B. Weimann, H. Dietrich, M. F. Böttcher. *Clin. Drug. Investig.* 2011. Vol. 31(1). P. 27-41.
126. Pharmacotherapy for erectile dysfunction / I. Eardley, C. Donatucci, J. Corbin et al. *J. Sex. Med.* 2010. Vol. 7. P. 524-540.

127. Pharmacotherapy for erectile dysfunction: recommendations from the fourth international consultation for sexual medicine / K. Hatzimouratidis, A. Salonia, G. Adaikan et al. *The Journal of Sexual Medicine*. 2016. Vol. 13(4). P. 465-488.
128. Phosphodiesterase type 5 inhibitor treatment for erectile dysfunction in patients with end-stage renal disease receiving dialysis or after renal transplantation / F. Lasaponara, O. Sedigh, G. Pasquale et al. *J. Sex. Med.* 2013. Vol. 10(11). P. 2798-2814.
129. Podder A. K., Chakrabarty J. K., Faroque A. B. M. Qualitative and quantitative analysis of sildenafil in traditional medicines and dietary supplements. *Asian. J. Pharm. Clin. Res.* 2014. Vol. 7(2). P. 25-30.
130. Post-mortem detection and identification of sildenafil (Viagra) and its metabolites by LC/MS and LC/MS/MS / W. Weinmann, M. Bohnert, A. Wiedemann et al. *Int. J. Legal. Med.* 2001. Vol. 114(4-5). P. 252-258.
131. Postmortem Distribution of Sildenafil in Histological Material / S. Pagani, D. Mirtella, R. Mencarelli et al. *Journal of Analytical Toxicology*. 2005. Vol. 29. P. 254-257.
132. Prajapati C. A, Patel B. S., Badmanaban R. Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of sildenafil citrate and dapoxetine hydrochloride in combined dosage form. *Pharma Tutor*. 2014. Vol. 2(10) P. 142- 152.
133. Profiles of drug substances, excipients and related methodology, Vol. 39 / H. G. Brittain. Academic Press, Elsevier. 2014. 562 p.
134. Refat M.S., Mohamed G.G., A. Fathi A. Spectrophotometric determination of sildenafil citrate drug in tablets. Spectroscopic characterization of the solid charge transfer complexes. *Bulgarian Chemical Communications*. 2013. Vol. 45(2). P. 250-262.
135. Rendle D.F. Advances in chemistry applied to forensic science. *Chem. Soc. Rev.* 2005. Vol. 34(12). P. 1021-30.

136. Retention mechanisms applied in solid phase extraction for some polar compounds. Bacalum E., A. Tanase A., V. David. *Analele Universităţii din Bucureşti – Chimie*. 2010. Vol. 19(2). P. 61-68
137. Revatio / European Medicines Agency, 2011. URL: https://www.ema.europa.eu/documents/variation-report/revatio-h-c-638-ii-0028-epar-assessment-report-variation_en.pdf (дата звернення 07. 12. 2018). Назва з екрану.
138. RP-HPLC method development for estimation of sildenafil citrate in tablets and in seminal fluid / N. Sharma, P. Rajput, A. Thakkar, G. S. Sarma. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012. Vol. 2(5). P. 172-178.
139. Sandqvist A. Vardenafil and methylarginines in pulmonary hypertension. Umea, Sverige: Umea University, 2016. 73 с.
140. Schellack N., Agoro A. A review of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *S. Afr. Fam. Pract.* 2014. Vol. 56(2). P. 96-101.
141. Septiani R., Damayanti S. Simultaneous identification of caffeine, acetaminophen, sildenafil citrate, tadalafil and vardenafil HCl in aphrodisiac traditional herbal medicines by Thin Layer Chromatography-Densitometry. *Der. Pharma Chemica*. 2015. Vol. 7(5). P. 335-341.
142. Sildenafil and analogous phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors in herbal food supplements sampled on the Dutch market / N. M. Reeuwijk, B. J. Venhuis, D. de Kaste et al. *Food Addit Contam: Part A*. 2013. Vol. 30(12). P. 2027-2034.
143. Sildenafil citrate ingestion and prolonged priapism and tachycardia in a pediatric patient / B. K. Wills, C. Albinson, M. Wahl et al. *Clin. Toxicol.* 2007. Vol. 45(7). P. 798-800.
144. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension / N. Galiè, H. A. Ghofrani, A. Torbicki et al. *Engl J Med*. 2005. Vol. 353(20). P. 2148-2157.
145. Sildenafil exposure in neonates with pulmonary hypertension after administration via a nasogastric tube / M. J. Ahsman, B. C. Witjes, E.D. Wildschut et al. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* 2010. Vol 95(2). P. 109 114.

146. Sildenafil for the treatment of pulmonary hypertension in pediatric patients / A. J. Huddleston, C. A. Knoderer, J. L. Morris, E. S. Ebenroth. *Pediatr. Cardiol.* 2009. Vol. 30(7). P. 871-882.
147. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial / H.A. Ghofrani, R. Wiederman, F. Rose et al. *Lancet.* 2002. Vol. 360(9337). P. 895-900.
148. Sildenafil treatment for portopulmonary hypertension / F. Reichenberger, R. Voswinckel, E. Steveling et al. *Eur Respir J.* 2006. Vol. 28(3) P. 563-567.
149. Simonca L., Tulloh R. Sildenafil in infants and children. *Children.* 2017. Vol. 4(7). P. 60-65.
150. Simple spectrophotometric methods for the determination of two phosphodiesterase type 5-inhibitors in pure and tablets dosage forms using N-bromosuccinimide as an oxidant / E. M Hafez, R. E. Shiekh, A. S Amin, A. A Gouda. *Chem. Sci. Trans.* 2016 Vol. 5(4). P. 836-851. DOI:10.7598/cst2016.1271.
151. Simultaneous analysis of sildenafil, vardenafil, tadalafil, and their desalkyl metabolites in human whole blood and urine by isotope dilution LC–MS–MS / K. Hasegawa, O. Suzuki, K. Gonmori et al. *Forensic Toxicol.* 2012. Vol. 30. P. 25-32.
152. Simultaneous determination of 38 phosphodiesterase-5 inhibitors in illicit erectile dysfunction products by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry / E. S. Lee, J. H. Lee, K. M. Han. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. Vol. 83. P. 171-178.
153. Simultaneous determination of yohimbine, sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / Y. Zhang, Z. Huang, L. Ding et al. *J. Sep. Sci.* 2010. Vol. 33(14). P. 2109-2114.
154. Simultaneous Identification of 18 illegal adulterants in dietary supplements by Using High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry /

- T. Tagami, A. Aoyama, A. Takeda. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 2014. Vol. 55(1). P. 34-40.
155. Simultaneous quantification of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by UFLC coupled with ESI-MS/MS and pharmacokinetic and bioequivalence studies in Malay population / K. B. Liew, G. O. Loh, Y. T. Tan., K. K. Peh. *Biomed. Chromatogr.* 2015. Vol. 29(6). P. 953-960. <https://doi.org/10.1002/bmc.3378> (дата звернення 28.10.2018). Назва з екрану.
 156. Soliman S. M., El-Agizy H. M. Y., Bayoumi A. E. Derivative synchronous fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of dapoxetine hydrochloride and vardenafil in binary mixtures. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2014. Vol. 81(3). P. 509-518.
 157. SOP conservative (medical and mechanical) treatment of erectile dysfunction / H. Porst, A. Burnett, G. Brock et al. *J. Sex. Med.* 2013. Vol. 10(1). P. 130-171.
 158. Spectroscopic and spectrometric methods used for the screening of certain herbal food supplements suspected of adulteration / C. Mateescu, A. M. Popescu, G. L. Radu et al. *Adv. Pharm. Bull.* 2017. Vol. 7(2). P. 251- 259.
 159. Sperling H, Schneider T., Hanisch J.U. ACceptance of therapy in vardenafil-treated patients with erectile dysfunction (active): a noninterventional study in Germany. *Int. J. Impot. Res.* 2010. Vol. 22(1). P. 61-67.
 160. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs / S. Singh, B. Prasad, A. A. Savaliya et al. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009. Vol. 28(1). P.13-28.
 161. Substantially increased sildenafil bioavailability after sublingual administration in children with congenital heart disease: Two case reports / A. Carls, J. Winter, Y. Enderle et al. *J. Med. Case. Rep.* 2014. Vol. 8. P. 171-182.

162. Sussman D.O. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2004. Vol. 104(3). P. 11-15.
163. The dangers of sexual enhancement supplements and counterfeit drugs to "treat" erectile dysfunction / J. Chiang, F. A. Yafi, P. J. Dorsey, W. J. Hellstrom. *Transl. Androl. Urol.* 2017. Vol. 6(1). P. 12-19.
164. The immediate effect of sildenafil on right ventricular function in patients with heart failure measured by cardiac magnetic resonance: a randomized control trial / A. S. Fernandes, A. C. Andrade, N. D. Barroso et al. *PLoS One.* 2015; Vol. 10(3) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4368670/#> (дата звернення 21. 05. 2018). Назва з екрану.
165. The Princeton III consensus recommendations for the management of erectile dysfunction and cardiovascular disease / A. Nehra, G. Jackson, M. Miner et al. *Mayo. Clin. Proc.* 2012. Vol. 87(8). P. 766-778.
166. The role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in phosphodiesterase-5 inhibitor therapy / N. Mehrotra, M. Gupta, A. Kovar, B. Meibohm. *J. Impot. Res.* 2007. Vol. 19(3). P. 253-264.
167. The safety and efficacy of PDE5-inhibitors-vardenafil on treating diabetes mellitus erectile dysfunction. A protocol for systematic review and meta analysis / J. He, X. Li, H.-H. Dai et al. *Medicine.* 2019. Vol. 98(51) 5 p <https://dx.doi.org/10.1097%2FMD.00000000000018361> (дата звернення 10.01. 2020). Назва з екрану.
168. The safety of phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction / E. Ventimiglia, P. Capogrosso, F. Montorsi, A. Salonia. *Expert. Opin. Drug. Saf.* 2016. Vol. 15(2). P. 141-152.
169. The use of oral sildenafil for management of right ventricular dysfunction after pediatric heart transplantation / R.K. Singh, M.E Richmond, W.A. Zuckerman et al. *Am. J. Transplant.* 2014. Vol.14(2). P. 453-458.

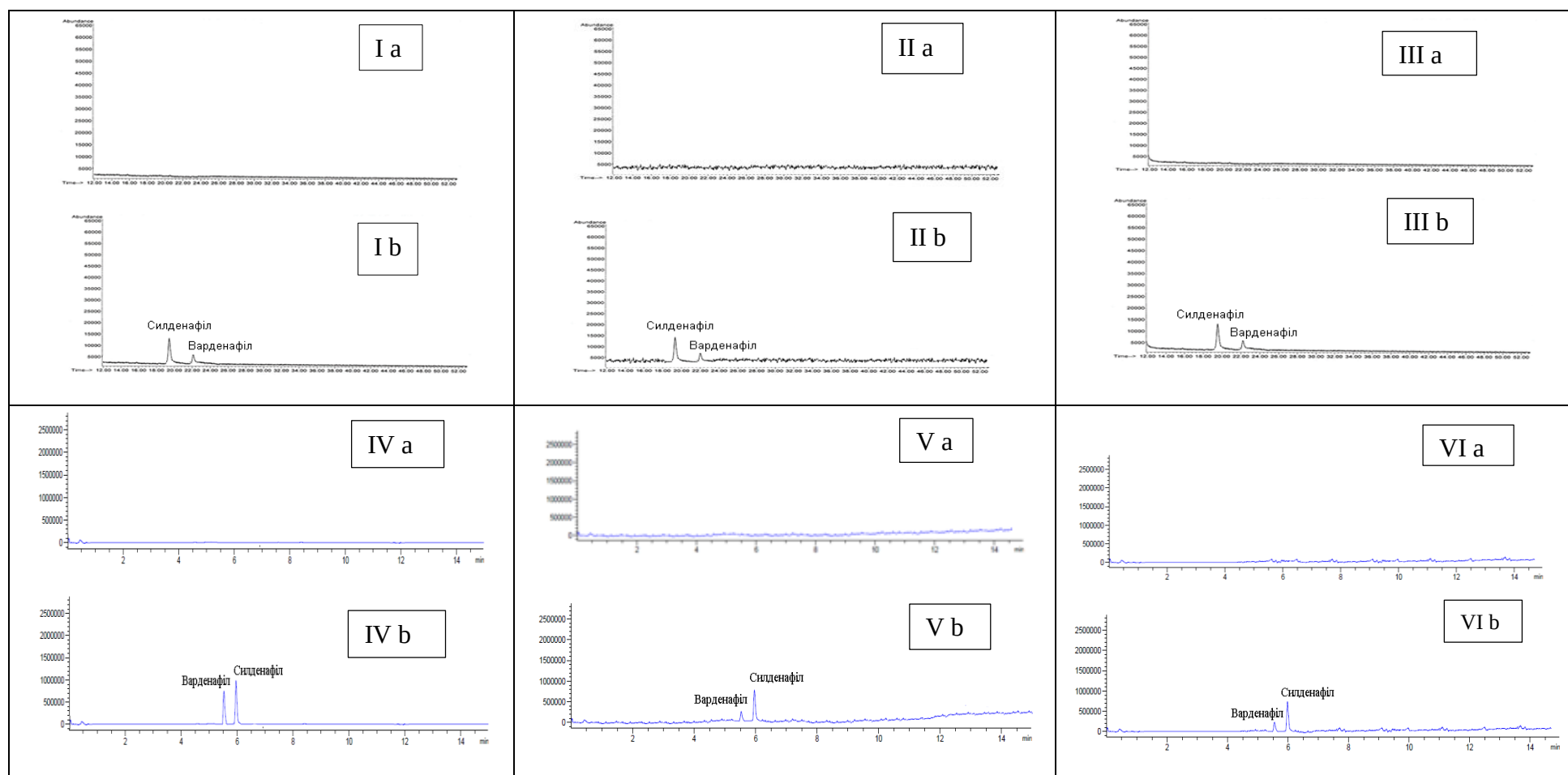
170. The utility of sildenafil in pulmonary hypertension: a focus on bronchopulmonary dysplasia / A. J. Wardle, R. Wardle, K. Luyt, R. Tulloh. *Arch. Dis. Child.* 2013. Vol. 98(8). P. 613–617.
171. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – a review / M. Taleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani et al. *Austin. J. Anal. Pharm. Chem.* 2015; Vol. 2(6), 5 p <https://www.austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v2-id1056.php> (дата звернення 04.02.2019). Назва з екрану.
172. Validated spectrofluorimetric method for determination of two phosphodiesterase inhibitors tadalafil and vardenafil in pharmaceutical preparations and spiked human plasma / M.A. El-Enin, M.E. Al-Ghaffar Hammouda, D.T. El-Sherbiny et al. *Luminescence.* 2016. Vol. 31. P. 173-178. <https://doi.org/10.1002/bio.2941> (дата звернення 04.02.2019). Назва з екрану.
173. Validated UPLC-MS/MS assay for the determination of synthetic phosphodiesterase type-5 inhibitors in postmortem blood samples / P. Proença, C. Mustra, M. Marcos et al. *Forensic Leg. Med.* 2013. Vol. 20(6). P. 655-658.
174. Validation of an HPLC-MS method for the determinatin of vardenafil in rat urine / L. Osypchuk, I. Halkevych, S. Davydovych, Y. Bidnychenko. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2019. Vol. 9 (8). P. 79-85.
175. Validation of an LC–ESI-MS/MS method for the quantitation of phosphodiesterase-5 inhibitors and their main metabolites in rat serum and brain tissue samples / N. Uncetaa, L. Echeazarrab, M. Montaña et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2012. Vol. 70. P.529- 533.
176. Validation of simple and rapid UV-Spectrophotometric method with stress degradation study for sildenafil citrate / S. Baokar, V. Pawar, R. N. Patil et al. *Research J. Pharm. and Tech.* 2012. Vol. 5(2). P. 214- 218.
177. Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study / Z. C. Jing, Z. X. Yu, J. Y. Shen et al. *Am. Respir. Crit. Care Med.* 2011. Vol. 183(12). P. 1723-1729.

178. Vardenafil, a new phosphodiesterase type 5 inhibitor, in the treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a multicenter double-blind placebo-controlled fixed-dose study / I. Goldstein, J. Youn, J. Fischer et al. *Diabetes Care*. 2003. Vol. 26(3). P. 777-783.
179. Veronin M. A., Nutan M. T., Dodla U. K. Quantification of active pharmaceutical ingredient and impurities in sildenafil citrate obtained from the Internet. *Ther. Adv. Drug Saf.* 2014. Vol. 5(5). P. 180-189.
180. Walker V., Mills G. A. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. *Ann. Clin. Biochem.* 2002. Vol. 39. P. 464-477
181. Wall P. E. Thin-Layer Chromatography: a modern practical approach. Royal society of chemistry, 2005. 184 p.
182. Wanga C. C., Fernandez L. Spectrofluorimetric determination of sildenafil: a new analytical alternative for its analysis. *JCMRD*. 2012. Vol. 1(2). P. 54-60.
183. Wardle A. J., Tulloh R. M. Paediatric pulmonary hypertension and sildenafil: current practice and controversies. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 2013. Vol. 98(4). P. 141-147.
184. Wilson I.D. High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS)-based drug metabolite profiling. *Methods. Mol. Biol.* 2011. Vol. 708. P. 173-190.
185. Yafi F. A., Sharlip I. D., Becher E. F. Update on the safety of phosphodiesterase type 5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction. *Sex. Med. Rev.* 2018. Vol. 6(2). P. 242-252.

ДОДАТКИ

Додаток А

Хроматограма контрольних (а) та модельних (b) зразків біологічного матеріалу із силденафілом та варденафілом при аналізі методом ГХ/МС: плазма (I), печінка (II) та сеча (III) і методом ВЕРХ/МС: плазма (IV), печінка (V) та сеча (VI)



Додаток Б

Значення величини R_f силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виділених із тканин та біологічних рідин щурів (через 24 год після введення однократної терапевтичної дози) у підтверджуючих системах розчинників

Дослід- жуваний орган чи біологічна рідина	Підтверджуюча система розчинників	Величини R_f							
		Пластика „Sorbfil”				Пластика „Merck”			
		Силденафіл		Варденафіл		Силденафіл		Варденафіл	
		дослід- жувана сполука	метаболіти	дослід- жувана сполука	метаболіти	дослід- жувана сполука	метаболіти	дослід- жувана сполука	метаболіти
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Легені	Система № 1	–	0,47; 0,53 0,65	–	0,49; 0,63	–	0,51; 0,56; 0,70	–	0,48; 0,65
	Система № 2	–	0,32; 0,40; 0,52	–	0,36; 0,51	–	0,31; 0,35; 0,50	–	0,30; 0,44
	Система № 3		0,38; 0,45; 0,57		0,50; 0,63		0,38; 0,41; 0,58		0,46; 0,63
Печінка	Система № 1	0,60	0,46; 0,52; 0,64	–	0,49; 0,63	0,65	0,52; 0,56; 0,71	–	0,47; 0,64
	Система № 2	0,47	0,31; 0,40; 0,53	–	0,36; 0,51	0,44	0,30; 0,35; 0,50	–	0,31; 0,45
	Система № 3	0,53	0,38; 0,44; 0,58		0,50; 0,63	0,51	0,37; 0,41; 0,57		0,46; 0,63

Продовж .дод. Б

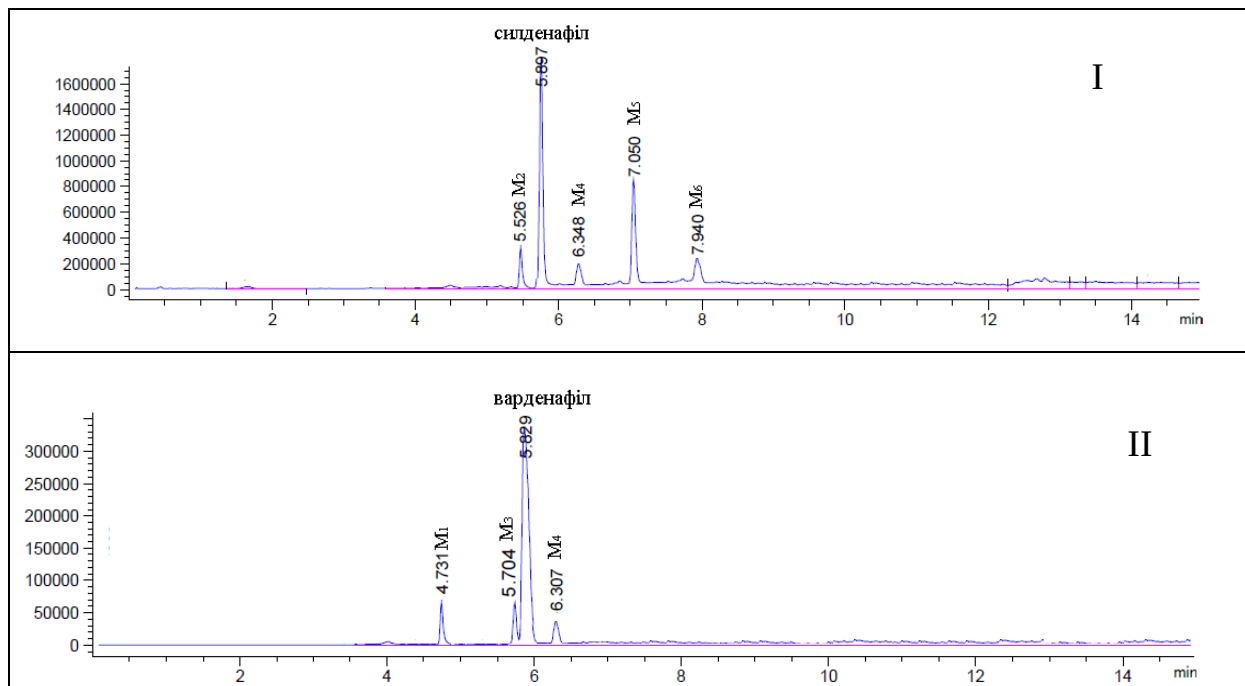
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Шлунок	Система № 1	0,61	0,46; 0,51; 0,65	0,56	0,49; 0,63	0,66	0,53; 0,56; 0,72	0,59	0,48; 0,65
	Система № 2	0,48	0,32; 0,40; 0,54	0,43	0,36; 0,51	0,45	0,31; 0,36; 0,52	0,39	0,30; 0,43
	Система № 3	0,53	0,39; 0,44; 0,59	0,56	0,50; 0,63	0,51	0,38; 0,41; 0,57	0,57	0,46; 0,63
Кишківник	Система № 1	0,60	0,46; 0,52; 0,64	0,56	0,49; 0,63	0,65	0,51; 0,56; 0,70	0,60	0,47; 0,64
	Система № 2	0,47	0,31; 0,40; 0,53	0,44	0,36; 0,51	0,44	0,31; 0,35; 0,50	0,39	0,31; 0,45
	Система № 3	0,53	0,38; 0,44; 0,58	0,57	0,50; 0,63	0,51	0,38; 0,41; 0,58	0,58	0,46; 0,63
Сеча	Система № 1	0,61	0,46; 0,51; 0,66	0,55	0,63	0,64	0,50; 0,55; 0,69	0,59	0,65
	Система № 2	0,47	0,40; 0,52; 0,64	0,43	0,52	0,44	0,31; 0,36; 0,51	0,40	0,45
	Система № 3	0,54	0,30; 0,45; 0,60	0,57	0,64	0,50	0,37; 0,40; 0,56	0,57	0,64

Примітка* система № 1 – ацетон-хлороформ-діетиламін (5:6:1);
система № 2 – етилацетат-ацетон-діетиламін (15:10:1);
система № 3 – ацетон-гексан-діетиламін (30:19:1).

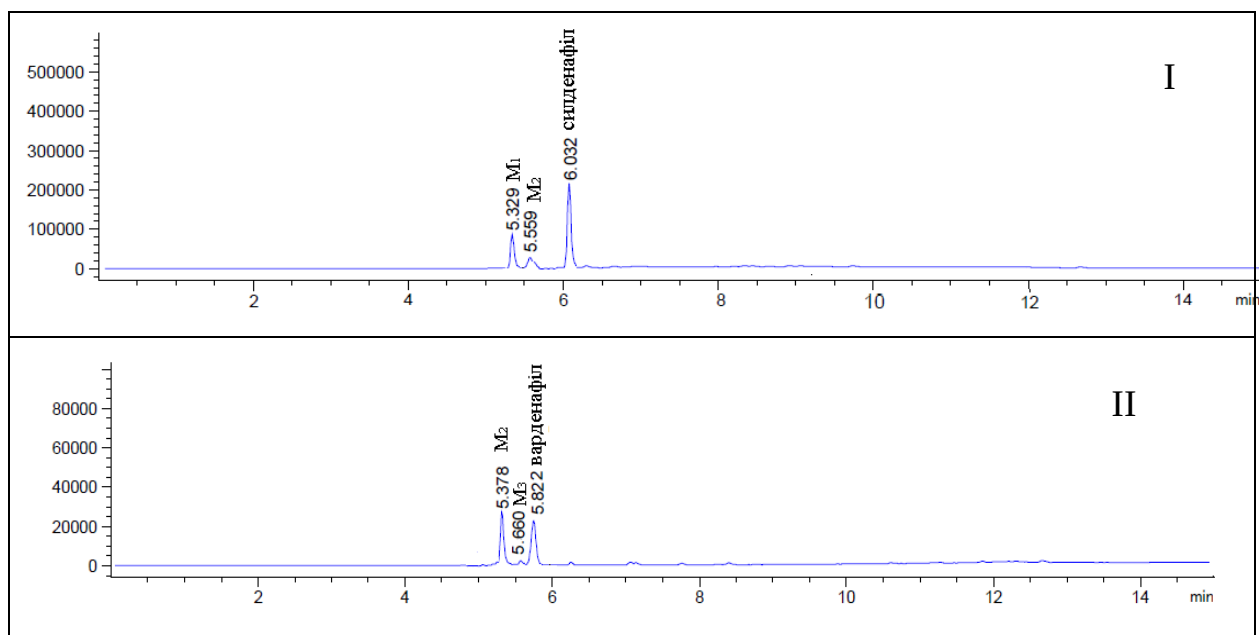
Додаток В

Хроматограми силденафілу (I) та варденафілу (II), виділених з легень та сироватки щурів через 24 год після введення препаратів (колонка Zorbax SB-C18)

Хроматограми зразків легень

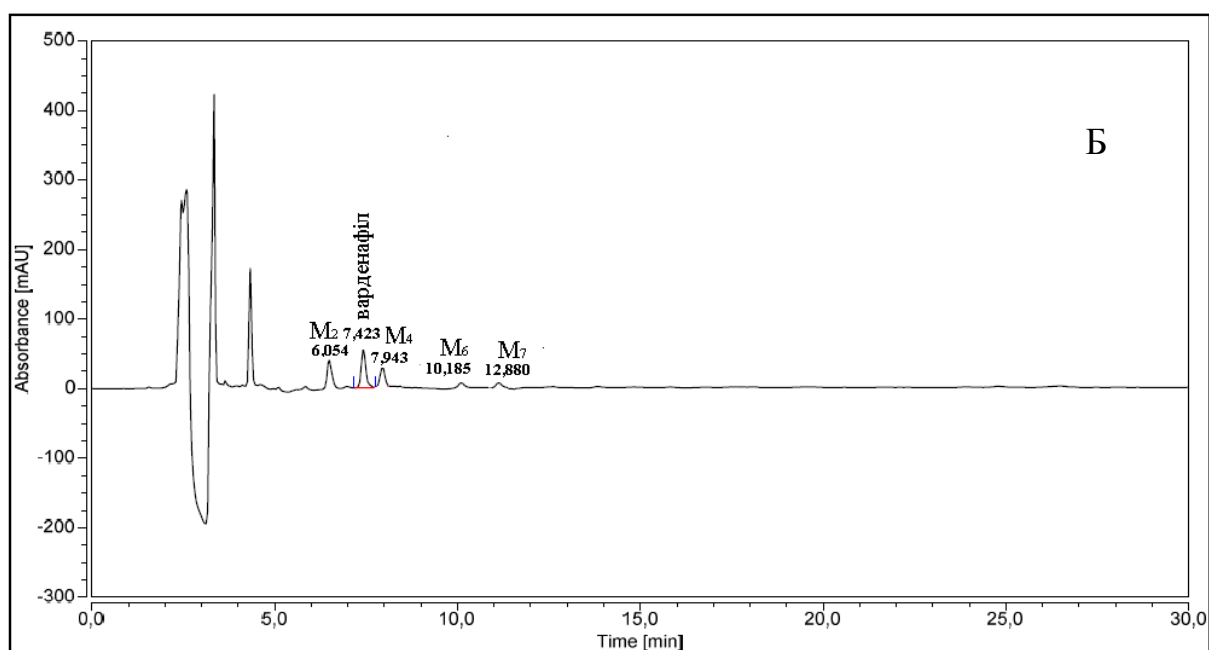
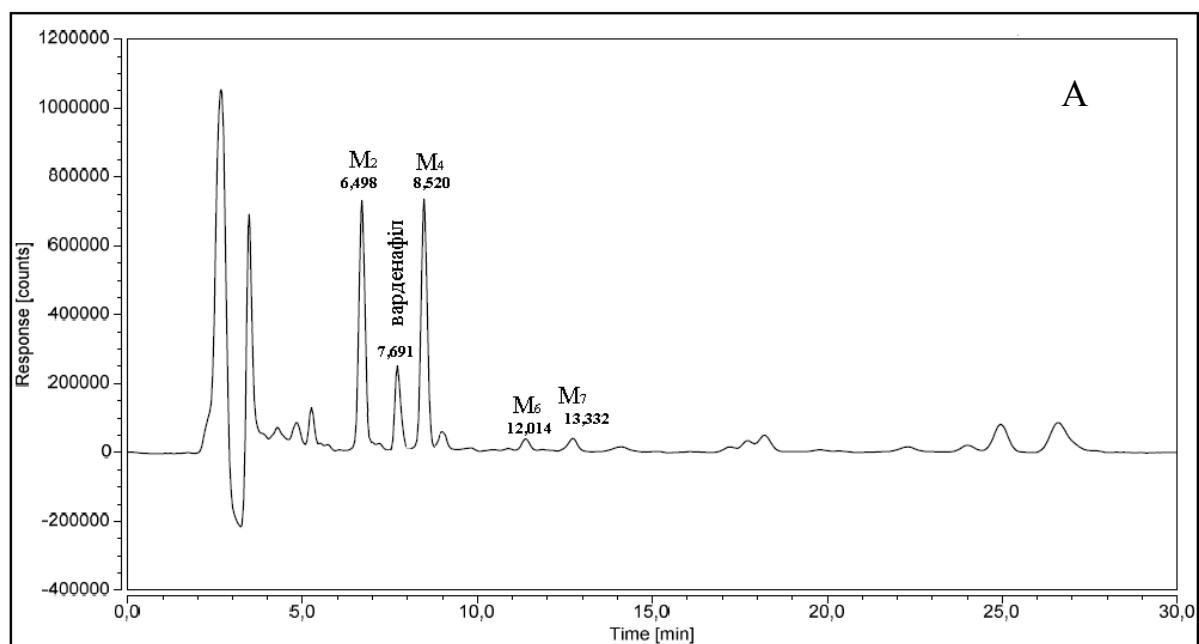


Хроматограми зразків сироватки



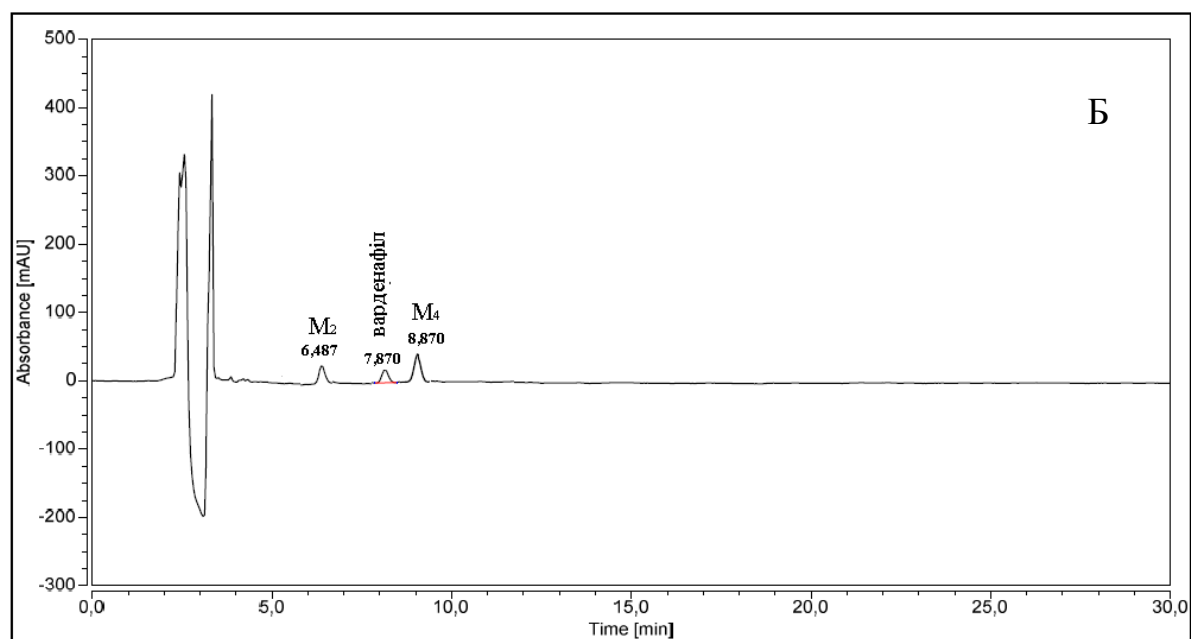
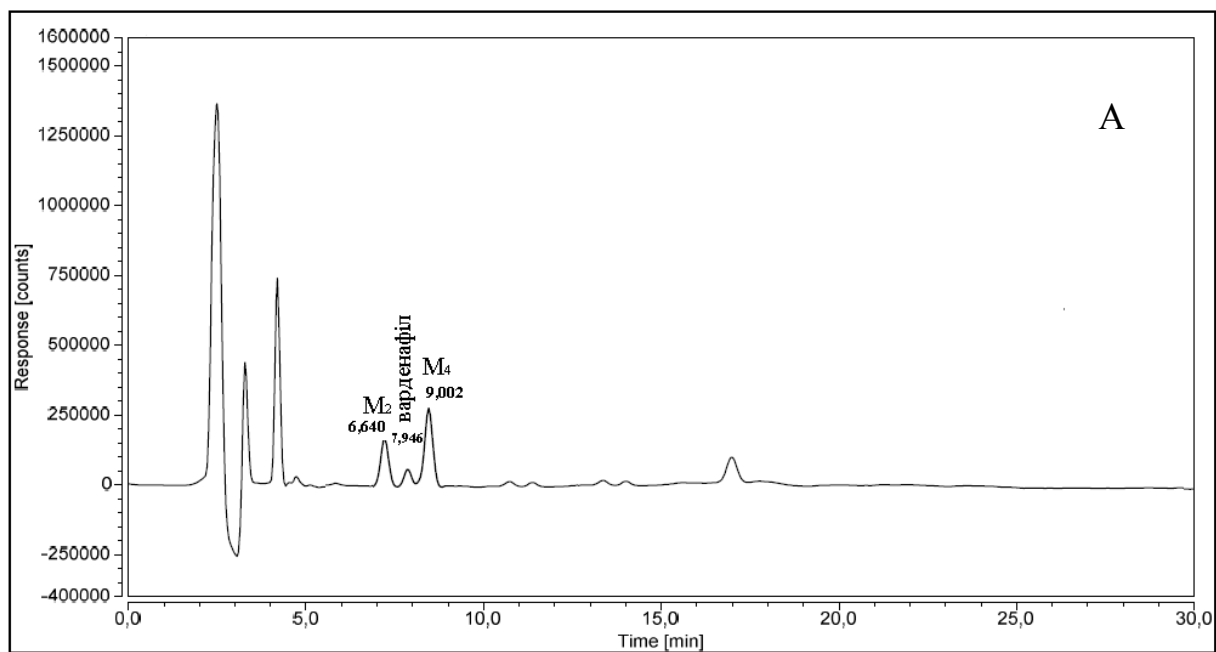
Додаток Г

Хроматограми проб варденафілу, виділеного з печінки щурів через 24 год після введення препарату: А – флуоресцентна детекція, Б – УФ-детекція (колонка Luna C18)



Продовж. дод. Г

Хроматограми проб варденафілу, виділеного сироватки щурів через 24 год
після введення препарату: А – флуоресцентна детекція,
Б – УФ-детекція (колонка Luna C18)



Додаток Д

Список публікацій здобувача

1. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вивчення умов екстракції силденафілу органічними розчинниками. *Фармацевтичний журнал*. 2008. №1. С. 83-87. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
2. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й., Кузьмицька А. Є. Експрес-методики ідентифікації силденафілу в судово-хімічній практиці. *Актуальні проблеми профілактичної медицини*: зб. наукових праць, вип. 9, присвячується 95-річчю від дня народження професора В. П. Крамаренко. Львів, 2011. С. 188-192. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
3. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Методи виділення силденафілу з біологічного матеріалу. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2013. №3-4. С.42-45. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
4. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2015. №1-2. С. 124-128. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.
5. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Вплив рН середовища на ізолювання силденафілу з плазми Н-клиноптилолітом. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24 (3). Київ. С. 127- 132. *(Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті)*.

Продовж. дод. Д

6. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові. *Одеський медичний журнал*. 2016. №2. С.16-20. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).
7. Осипчук Л. И., Галькевич И. И. Влияние типа сорбента метода твердофазной экстракции на степень выделения силденафила из плазмы крови. *Университетская наука: взгляд в будущее: Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета (7 февраля 2020 года): в 2 т., Курский гос. мед. ун-т; под ред. В.А. Лазаренко. Курск: КГМУ, 2020. Т. I. С. 757-761. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, написання статті).*
8. Validation of an HPLC-MS method for the determinatin of vardenafil in rat urine / L. Osypchuk, I. Halkevych, S. Davydovych, Y. Bidnychenko. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019. Vol. 9 (08). P. 79-85. (Особистий внесок: планування і проведення експериментальних досліджень, обробка і узагальнення результатів, участь у написанні статті).
9. Osypchuk L. Determination of sildenafil in biological fluids. *Pharmaceutical Sciences in XXI Century: collection of scientific worcs II International Scientific Conferens*, 2-4 may, 2014. Tbilisi, Georgia, 2014. P. 157-158.
10. Osypchuk L. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood. The 6th international pharmaceutical conference *Science and practice 2015: Proc. Sci. pract. Conf.* November 5-6, 2015. Kaunas, Lithuania, 2015. P. 46.

Продовж. дод. Д

- 11.Осипчук Л. І. Визначення силденафілу в сечі з використанням концентрування Н-клинотилолітом. *Природничі читання: матеріали II наук.-практ. конф. з міжнар. участю. 14-17 травня 2015 р. Чернівці, 2016. С. 199.*
- 12.Осипчук Л. І. Вплив рН середовища на ступінь ізолювання силденафілу Н-клинотилолітом. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2015: матеріали Всеукр. наук. - практ. конф. молодих вчених та студентів, 26-27 березня 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 91.*
- 13.Осипчук Л. І. Идентификация варденафила методом УФ-спектрофотометрии. *Традиции и инновации фармацевтической науки и практики: Материалы Всероссийской научн. – практ. конф. с международным участием, посвященной 45-летию фармацевтического факультета КГМУ. Курск, 2011. С. 284- 286.*
- 14.Осипчук Л. І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу. *Аналітична хімія у фармації: матеріали II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф. 17 бер. 2016 р. Харків, 2016. С. 38.*
- 15.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ГХ-МС. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених і студентів з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, 12-13 квітня 2018 р. Харків, 2018. С. 340.*
- 16.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ): підсумкова IX наук. – практ. конф., 14 червня 2017 р. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига» 2017, С. 341-342.*

Продовж. дод. Д

- 17.Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з флуоресцентним детектором, збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції *Медична наука та практика XXI століття*, м. Київ, 1–2 лютого 2019 р. Київ: «Київський медичний науковий центр», 2019, С. 107.
- 18.Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Осипчук Л.І., Галькевич І. Й. Інформаційний лист № 268-2017. Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2017 (Протокол № 102 від 19.04.2017 р.).

Додаток Е

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. II International Scientific Conferens «Pharmaceutical Sciences in XXI Century»: (Tbilisi, may 2-4, 2014); форма участі – публікація тез.
2. The 6th international pharmaceutical conference «Science and practice 2015» (Kaunas, november 5-6, 2015); форма участі – постерна доповідь.
3. II Науково-практична конференція «Природничі читання» (Чернівці, 14-17 травня 2015 р.); форма участі – публікація тез.
4. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 26-27 березня 2015р.); форма участі – публікація тез.
5. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 45-летию фармацевтического факультета КГМУ «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики» (Курск, 2011); форма участі – публікація тез.
6. Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Аналітична хімія у фармації» (Харків, 17 березня 2016 р.); форма участі – публікація тез.
7. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених і студентів з міжнародною участю присвячена 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» (Харків, 12-13 квітня 2018 р.); форма участі – публікація тез.
8. Підсумкова IX науково-практична конференція присвячена 60-річчю ТДМУ «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 14 червня 2017 р.); форма участі – публікація тез.
9. Міжнародна науково-практична конференція «Медична наука та практика XXI століття», (Київ, 1–2 лютого 2019 р.); форма участі – публікація тез.

Додаток Є

Інформаційний лист

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи
(Укрмедпатентінформ)

ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ

ПРО НОВОВВЕДЕННЯ В СФЕРІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

№268 - 2017

Випуск 20 з проблеми
«Фармація»
Підстава: : Рішення ПК
«Фармація»
Протокол № 102 від 19.04.2017 р.

НАПРЯМ ВПРОВАДЖЕННЯ:
ФАРМАЦІЯ, СУДОВО-МЕДИЧНА
ЕКСПЕРТИЗА

**ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ВИЯВЛЕННЯ ДІЮЧОЇ РЕЧОВИНИ
СИЛДЕНАФІЛУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ПРИ ДІАГНОСТИЦІ
КОМБІНОВАНИХ ОТРУЄНЬ**

УСТАНОВИ-РОЗРОБНИКИ:

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

А В Т О Р И:

канд. фарм. наук., доц. ГАЛЬКЕВИЧ І. Й.,
ОСІПЧУК Л. І.

УКРМЕДПАТЕНТІНФОРМ
МОЗ УКРАЇНИ

м. Київ

Додаток Ж

Акти впровадження

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник ДУ «Головне бюро
судово-медичної експертизи
МОЗ України»
Кондратенко В. Л.

« 14 » 01 2018 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Виявлення та кількісне визначення силденафілу, виділеного з біологічних рідин хроматографічними методами.
2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й..
3. Джерело інформації:
 - Осипчук Л.І. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація– 2015.- №1-2.-С. 124-128.
 - Osypchuk, I.J. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood / L.I. Osypchuk, I.J. Halkevych // International Pharmaceutical Conference "Science and Practice 2015" - Lithuania, Kaunas, P. 46.
 - Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я. – К.: Укрмедпатентінформ, 2017. – № 268.
4. Де впроваджено: наукові дослідження співробітників ДУ «Головне бюро судово-медичної експертизи МОЗ України».
5. Форма впровадження: наукові дослідження співробітників ДУ «Головне бюро судово-медичної експертизи МОЗ України».
6. Ефект від впровадження: поглиблення знань співробітників ДУ «Головне бюро судово-медичної експертизи МОЗ України» з питань судово-токсикологічного дослідження силденафілу.
7. Термін впровадження 2017 рік
« 14 » 01 2018 р.

Відповідальний за впровадження

Кахановський Фелікс Миколайович.
Лікар-судово-медичний експерт,
завідувач відділення судово-медичної
токсикології ДУ «Головне бюро
судово-медичної експертизи МОЗ
України»

Продовж. дод. Ж



1. Найменування пропозиції для впровадження: Спосіб виявлення та визначення силденафілу у плазмі крові методом UEPX з мас-селективним детектором.
2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
3. Джерело інформації: Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я. – К.: Укрмедпатентінформ, 2017. – № 268.
4. Де впроваджено: в робочий процес та наукові дослідження співробітників Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи.
5. Форма впровадження: наукові дослідження співробітників Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи.
6. Ефект від впровадження: поглиблення знань співробітників бюро судово-медичної експертизи з питань судово-токсикологічного дослідження силденафілу.
7. Термін впровадження 2017 рік
8. Зауваження, пропозиції: немає.

«30» 01 2018 р.

Відповідальний за впровадження
 Зав. кафедри судової медицини,
 д. мед. н., проф. Г.Ф. Кривда

Продовж. дод. Ж



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Підготовка плазми крові для визначення силденафілу методом твердофазної екстракції Н-клинотилолітом
(найменування пропозиції для впровадження)
2. Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
(установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові авторів)
3. Джерело інформації Осипчук Л.І. Вплив рН середовища на ізолювання силденафілу з плазми Н-клинотилолітом / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика – 2015 – Вип. 24, ч. 3.–С.127-132.
4. Впроваджено в навчальний процес.
5. Термін впровадження вересень-грудень 2015 р.
6. Загальна кількість спостережень вісім.
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними у джерелі інформації (п.3).

Показники	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
Скорочення тривалості аналізу Відтворюваність результатів Підтвердження достовірності результатів дослідження	Позитивний результат	Позитивний результат
	Позитивний результат	Позитивний результат
	Позитивний результат	Позитивний результат

8. Зауваження пропозиції немає.

«15» січня 2016 р.
Відповідальний за впровадження
Зав. каф. токсикологічної хімії НФаУ,
д.х.н., проф. І.О. Журавель
Посада, підпис, ім'я, по-батькові, прізвище

Продовж. дод. Ж



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Національного
фармацевтичного університету,
доп. Крутьких Т.В.
«25» _____ 2016 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Виділення силденафілу з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1)
(найменування пропозиції для впровадження)
2. Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
(установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові авторів)
3. Джерело інформації Осипчук Л.І. Методи виділення силденафілу з біологічного матеріалу / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація – 2013 – №3-4 – С. 42-45.
4. Впроваджено в навчальний процес.
5. Термін впровадження вересень-грудень 2015 р.
6. Загальна кількість спостережень вісім.
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними у джерелі інформації (п.3).

Показники	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
Скорочення тривалості аналізу Відтворюваність результатів Підтвердження достовірності результатів дослідження	Позитивний результат	Позитивний результат
	Позитивний результат	Позитивний результат
	Позитивний результат	Позитивний результат

8. Зауваження пропозиції немає.

«25» _____ 2016 р.

Відповідальний за впровадження
Зав. каф. токсикологічної хімії НФаУ,
д.х.н., проф. І.О. Журавель

Посада, підпис, ім'я, по-батькові, прізвище

Продовж. дод. Ж



ПРИТВЕРДЖУЮ»

д. мед. наук, доцент з наукової роботи
Навчального фармацевтичного
університету
д. мед. наук, проф. Крутьких Т.В.

02 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Ізолювання та концентрування силденафілу з біологічних рідин методом твердофазної екстракції для кількісного визначення методами ГХ-МС та УЕРХ-МС.

Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.

2. Джерело інформації:
 - Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я. – К.: Укрмедпатентінформ, 2017. – № 268.
 - Осипчук Л.І. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація– 2015.-№1-2.-С.124-128.
3. Де впроваджено: в навчальний процес та наукові дослідження кафедри лікарської та аналітичної токсикології НФаУ.
4. Форма впровадження: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри лікарської та аналітичної токсикології НФаУ.
5. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу.
6. Термін впровадження 2017-2018 навчальний рік
7. Зауваження, пропозиції: немає.

«12» лютого 2018 р.

Відповідальний за впровадження
Зав. каф. лікарської та аналітичної
токсикології НФаУ,
док.фарм.наук. С.В. Баюрка

Продовж. дод. Ж



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Методи ідентифікації та кількісного визначення варденафілу, виділеного з біологічного матеріалу.
2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
3. Джерело інформації:
 - Осипчук Л.І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу / Л.І. Осипчук // Тези доповідей II Міжнародної науково-практичної інтернет конференції „Аналітична хімія у фармації”. – Харків, 17 березня 2016 р. С 38.
 - Осипчук Л.І. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Одеський медичний журнал – 2016.-№2.- С.16-20.
 - Осипчук Л.І. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Тези доповідей Підсумкової IX науково-практичної конференції „Здобутки клінічної та експериментальної медицини”, 14 червня, 2017 Т.: „Укрмедкнига” 2017. – С. 341.
4. Де впроваджено: в навчальний процес та наукові дослідження кафедри судової медицини ОНМедУ.
5. Форма впровадження: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри судової медицини ОНМедУ.
6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження варденафілу.
7. Термін впровадження 2016-2017 навчальний рік
8. Зауваження, пропозиції: немає.

«30» 01 2018 р.

Відповідальний за впровадження
Зав. кафедри судової медицини,
д.мед. н., проф. Г.Ф. Крива

Продовж. дод. Ж

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Львівського державного
 медичного університету,
 д. мед. н., проф. Туманський В. О.

2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ



1. Найменування пропозиції для впровадження: Використання твердофазної екстракції для ізолювання силденафілу з біологічних рідин.
2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
3. Джерело інформації:
 - Осипчук Л.І. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація – 2015. - №1-2. - С. 124-128.
 - Osypchuk, I.J. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood / L.I. Osypchuk, I.J. Halkevych // International Pharmaceutical Conference "Science and Practice 2015" - Lithuania, Kaunas, P. 46
 - Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я. – К.: Укрмедпатентінформ, 2017. – № 268.
4. Де впроваджено: в навчальний процес та наукові дослідження кафедри фізикоїдної хімії ЗДМУ (від 31 січня 2018 року, протокол засідання кафедри №7).
5. Форма впровадження: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри фізикоїдної хімії ЗДМУ.
6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу.
7. Термін впровадження 2016-2017 навчальний рік

« 13 » 02 2018 р.

Відповідальний за впровадження
 Зав. каф. фізикоїдної хімії,
 доц. А.Г. Каплаушенко

Продовж. дод. Ж



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова
проф. мед.н. Власенко О.В.

02 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція до впровадження: Використання твердофазної екстракції для ізолювання силденафілу з біологічних рідин

2. Установа, автори: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.

3. Джерела інформації:

- Осипчук Л.І. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація – 2015. - №1-2. - С. 124-128.
- Osypchuk, I.J. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood / L.I. Osypchuk, I.J. Halkevych // International Pharmaceutical Conference "Science and Practice 2015" - Lithuania, Kaunas, P. 46
- Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я. – К.: Укрмедпатентінформ, 2017. – № 268.

4. Де впроваджено: кафедра фармацевтичної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова.

5. Форма впровадження: наукова робота та навчальний процес.

6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу.

7. Термін впровадження: з 2017/2018 навчального року.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, протокол № 5 від 14 лютого 2018 р.

Відповідальний за впровадження,
зав. кафедри фармацевтичної хімії

доц. Ющенко Т.І.

Продовж. дод. Ж



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова
проф. д-р мед.н. **Власенко О.В.**

15 02 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція до впровадження: Методи ідентифікації та кількісного визначення варденафілу, виділеного з біологічного матеріалу

2. Установа, автори: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.

3. Джерела інформації:

- Осипчук Л.І. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Одеський медичний журнал – 2016.- №2.-С.16-20.
- Осипчук Л.І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу / Л.І. Осипчук // Тези доповідей II Міжнародної науково-практичної інтернет конференції „Аналітична хімія у фармації”. – Харків, 17 березня 2016 р. С 38.
- Осипчук Л.І. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Тези доповідей Підсумкової IX науково-практичної конференції „Здобутки клінічної та експериментальної медицини”, 14 червня, 2017 Т.: „Укрмедкнига” 2017. – С. 341.

4. Де впроваджено: кафедра фармацевтичної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова.

5. Форма впровадження: наукова робота та навчальний процес.

6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження варденафілу.

7. Термін впровадження: з 2017/2018 навчального року.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, протокол № 5 від 14 лютого 2018 р.

Відповідальний за впровадження,
зав. кафедри фармацевтичної хімії

доц. Ющенко Т.І.

Продовж. дод. Ж

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського державного
медичного університету
ім. І.Я.Горбачевського,
д-бюл.н., проф. Кліш І. М.



«13» 03 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Розробка умов ізолювання та концентрування силденафілу з біологічних рідин Н-клинотилолітом.
2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
3. Джерело інформації:
 - Осипчук Л.І. Вплив рН середовища на ізолювання силденафілу з плазми Н-клинотилолітом / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупика – 2015 – Вип. 24, ч. 3, – С.127-132.
 - Осипчук Л.І. Визначення силденафілу в сечі з використанням концентрування Н-клинотилолітом. Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції "Природничі читання". – Чернівці, 14-17 травня 2015 р., С.199
 - Осипчук Л.І. Вплив рН середовища на ступінь ізолювання силденафілу Н-клинотилолітом / Л.І. Осипчук // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів "Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2015". – Запоріжжя, 26-27 березня 2015 р. С.91
4. Де впроваджено: в навчальний процес та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії фармацевтичного факультету ТДМУ.
5. Форма впровадження: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії фармацевтичного факультету ТДМУ.
6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу.
7. Термін впровадження 2017-2018 навчальний рік
8. Зауваження, пропозиції: немає.

«12» 03 2018 р.

Відповідальний за впровадження
зав. каф. фарм. хімії ТДМУ, канд.
фарм. н., доц. О. Б.Поляк
Відповідальний за курс
токсикологічної хімії, доц. каф. фарм.
хімії ТДМУ, канд. фарм.н.
Н. В. Горлачук

Продовж. дод. Ж

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
 Тернопільського державного
 медичного університету
 ім. І.Я. Горбачевського,
 д.біол.н., проф. Кліш І. М.
 «13» 03 2018 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу, виділеного з біологічного матеріалу, методом ВЕРХ з УФ-детектором
2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
3. Джерело інформації:
 - Осипчук Л.І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу / Л.І. Осипчук // Тези доповідей II Міжнародної науково-практичної інтернет конференції „Аналітична хімія у фармації”. – Харків, 17 березня 2016 р. С 38.
 - Осипчук Л.І. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Тези доповідей Підсумкової IX науково-практичної конференції „Здобутки клінічної та експериментальної медицини”, 14 червня, 2017 Т.: „Укрмедкнига” 2017. – С. 341.
4. Де впроваджено: в навчальний процес та наукові дослідження кафедри дослідження кафедри фармацевтичної хімії фармацевтичного факультету ТДМУ.
5. Форма впровадження: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії фармацевтичного факультету ТДМУ.
6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження варденафілу.
7. Термін впровадження 2016-2017 навчальний рік
 «12» 03 2018 р.

Відповідальний за впровадження
 зав. каф. фарм. хімії ТДМУ, канд.
 фарм. н., доц. О. Б. Поляк
 Відповідальний за курс
 токсикологічної хімії, доц. каф. фарм.
 хімії ТДМУ, канд. фарм.н.
 Н. В. Горлачук

Продовж. дод. Ж

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Івано-Франківського
національного медичного
університету

д.х.н., проф. Вакалюк І.П.

« 05 » березня 2018 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Методи ідентифікації та кількісного визначення варденафілу, виділеного з біологічного матеріалу.
2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
 - Джерело інформації:
 - Осипчук Л.І. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Одеський медичний журнал– 2016.- №2.-С.16-20.
 - Осипчук Л.І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу / Л.І. Осипчук // Тези доповідей II Міжнародної науково-практичної інтернет конференції „Аналітична хімія у фармації”. – Харків, 17 березня 2016 р. С 38.
 - Осипчук Л.І. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Тези доповідей Підсумкової IX науково-практичної конференції „Здобутки клінічної та експериментальної медицини”, 14 червня, 2017 Т.: „Укрмедкнига” 2017. – С. 341.
3. Де впроваджено: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри хімії фармацевтичного факультету ІФНМУ.
4. Форма впровадження: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри хімії фармацевтичного факультету ІФНМУ.
5. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження варденафілу.
6. Термін впровадження 2016-2017 навчальний рік
7. Зауваження, пропозиції: немає.

« 15 » березня 2018 р.

Відповідальний за впровадження
зав. каф. хімії фарм. факультету ІФНМУ
д.х.н., доц. А.О. Стецьків

Продовж. дод. Ж

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи Івано-
Франківського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
д.х.н., проф. Закарлюк І.П.



2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції
2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
3. Джерело інформації
 - Osypchuk, I.J. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood / L.I. Osypchuk, I.J. Halkevych // International Pharmaceutical Conference "Science and Practice 2015" - Lithuania, Kaunas, P. 46
 - Осипчук Л.І. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація – 2015.-№1-2.-С.124-128.
4. Де впроваджено: в навчальний процес та наукові дослідження кафедри хімії фармацевтичного факультету ІФНМУ.
5. Форма впровадження: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри хімії фармацевтичного факультету ІФНМУ.
6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу.
7. Термін впровадження 2016-2017 навчальний рік
8. Зауваження, пропозиції: немає.

«15» березня 2018 р.

Відповідальний за впровадження
зав. каф. хімії фарм. факультету ІФНМУ
д.х.н., доц. А.О. Стецьків

Продовж. дод. Ж

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Ректор Харківської медичної
 академії післядипломної освіти,
 д. мед. н., проф. Хвасюк О.М.
 « 02 » жовтня 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Використання твердофазної екстракції для ізолювання силденафілу з біологічних рідин.
2. **Установа, автор:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
3. **Джерело інформації:**
 - Осипчук Л.І. Вибір реагента-осаджувача при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація– 2015.- №1-2.-С. 124-128.
 - Osypchuk, L.I. Influence of reagent-precipitant on quantitative determination of sildenafil in blood / L.I. Osypchuk, I.I. Halkevych // International Pharmaceutical Conference "Science and Practice 2015" - Lithuania, Kaunas, P. 46
 - Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я. – К.: Укрмедпатентінформ, 2017. – № 268.
4. **Де впроваджено:** в навчальний процес та наукові дослідження кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації ХМАПО.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації ХМАПО.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань слухачів та аспірантів з питань хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу.
7. **Термін впровадження** 2016-2017 навчальний рік

Відповідальний за впровадження:

Зав. каф. клінічної біохімії,
 судово-медичної токсикології та фармації,
 д. хім. н., проф.



Журавель І.О.

Продовж. дод. Ж

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Ректор Харківської медичної
 академії післядипломної освіти,
 д. мед. н., проф. Хвилюк О.М.
 « 6 » _____ 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Методи ідентифікації та кількісного визначення варденафілу, виділеного з біологічного матеріалу.
2. **Установа, автор:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, м. Львів, 79010, вул. Пекарська, 69, Осипчук Л.І., Галькевич І.Й.
3. **Джерело інформації:**
 - Осипчук Л.І. Ізолювання варденафілу з біологічного матеріалу / Л.І. Осипчук // Тези доповідей II Міжнародної науково-практичної інтернет конференції „Аналітична хімія у фармації”. – Харків, 17 березня 2016 р. С 38.
 - Осипчук Л.І. Кількісне визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Одеський медичний журнал – 2016.- №2.-С.16-20.
 - Осипчук Л.І. Ідентифікація та кількісне визначення варденафілу методом ВЕРХ з УФ-детектором / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Тези доповідей Підсумкової IX науково-практичної конференції „Здобутки клінічної та експериментальної медицини”, 14 червня, 2017 Т.: „Укрмедкнига” 2017. – С. 341.
4. **Де впроваджено:** в навчальний процес та наукові дослідження кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації ХМАПО.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації ХМАПО.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань слухачів та аспірантів з питань хіміко-токсикологічного дослідження варденафілу.
7. **Термін впровадження** 2016-2017 навчальний рік
8. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Зав. каф. клінічної біохімії,
 судово-медичної токсикології та фармації,
 д. хім. н., проф.



Журавель І.О.