

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-108-114
УДК 615.03

Разработка и валидация методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека

Д. С. Богданова^{1*}, Т. Н. Комаров¹, И. Е. Шохин¹, Е. С. Мельников^{2,3}, О. А. Мискив¹,
Ю. В. Медведев^{1,3}

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

2 – ГБУ города Москвы «Городская клиническая больница им. И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы», 119027, Россия, г. Москва, ул. Яузская, д. 11

3 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8

*Контактное лицо: Богданова Дана Салаватовна. E-mail: D.Bogdanova@cpha.ru

Статья получена: 30.04.2019. Статья принята к печати: 13.05.2019

Резюме

Введение. Тадалафил – лекарственный препарат, используемый для лечения эректильной дисфункции. Для количественного определения тадалафила в плазме крови человека при проведении аналитической части фармакокинетических исследований применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым и тандемным масс-спектрометрическим детектированием. В большинстве рассмотренных методик в качестве пробоподготовки применяется способ жидкость-жидкостной экстракции и в редких случаях применяют способ твердофазной экстракции. Данные способы являются в достаточной степени трудоёмкими и экономически затратными. Поэтому в настоящем исследовании в качестве пробоподготовки рассмотрен способ осаждения белков, являющийся более простым в исполнении, что актуально при анализе большого количества проб при проведении исследований биоэквивалентности.

Цель. Целью исследования является разработка методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием для проведения аналитической части фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение тадалафила в плазме крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая (линейность), точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения тадалафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 5,00–1000,00 нг/мл тадалафила в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики и биоэквивалентности воспроизводимых лекарственных средств, содержащих тадалафил.

Ключевые слова: тадалафил, плазма, ВЭЖХ-МС, количественное определение, валидация, биоэквивалентность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Богданова Д. С., Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мельников Е. С., Мискив О. А., Медведев Ю. В. Разработка и валидация методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(2): 108–114.

Development and Validation of Tadalafil Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method

D. S. Bogdanova¹, T. N. Komarov¹, I. E. Shohin¹, E. S. Melnikov¹, O. A. Miskiv¹, Yu. V. Medvedev^{1,2}

1 – LLC «CPhA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – Clinical Hospital. I. V. Davidovsky Department of Health of the city of Moscow, 11, Yauzskaya str. Moscow, 119027, Russia

3 – I. M. Sechenov First MSU MOH Russia (Sechenovskij University), 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Dana S. Bogdanova. E-mail: D.Bogdanova@cpha.ru

Received: 30.04.2019. Accepted: 13.05.2019

Abstract

Introduction. Tadalafil is a drug used to treat erectile dysfunction. For the quantitative determination of tadalafil in human plasma are used methods of high performance liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection, during the analytical part of pharmacokinetic studies. In the majority of the considered methods the method of liquid-liquid extraction and the method of solid-phase extraction are used, these methods are difficult and expensive. Therefore, the method of protein precipitation was considered as sample preparation. This method is simple and there is important to analysis a lot of clinical samples in bioequivalence studies.

Aim. The aim of this study is to develop method for the quantitative determination of tadalafil in human plasma by HPLC-MS for the analytical part of pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Quantitative determination of tadalafil in plasma by HPLC-MS. A sample was prepared using acetonitrile protein precipitation.

Results and discussion. This method was validated by next validation parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification, carry-over and stability.

Conclusion. The method of the quantitative determination of tadalafil in human plasma was developed and validated by HPLC-MS. The analytical range of the was 5,00–1000,00 ng/ml tadalafil in plasma. Method could be applied to determination of tadalafil in plasma for PK and BE studies.

Keywords: tadalafil, plasma, HPLC-MS, quantitative determination, validation, bioequivalence.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Bogdanova D. S., Komarov T. N., Shohin I. E., Melnikov E. S., Miskiv O. A., Medvedev Yu. V. Development and validation of tadalafil determination in human plasma by HPLC-MS method. *Drug development & registration.* 2019; 8(2): 108–114.

ВВЕДЕНИЕ

Тадалафил ((6R,12aR)-6-(1,3-Бензодиоксол-5-ил)-2-метил-2,3,6,7,12,12a-гексагидро метилпиразино[1',2':1,6]пиридо[3,4-b]индол-1,4-дион) – лекарственный препарат, используемый для лечения эректильной дисфункции. Тадалафил является обратимым селективным ингибитором специфической фосфодиэстеразы типа 5 (ФДЭ5) циклического гуанозин монофосфата (цГМФ). Структурная формула тадалафила приведена на рисунке 1.

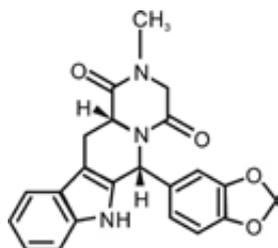


Рисунок 1. Структурная формула тадалафила

Figure 1. The structural formula of tadalafil

Фармакологическое действие тадалафила направлено на улучшение эректильной функции. Процесс эрекции опосредствован высвобождением оксида азота из нервных окончаний и эндотелиальных клеток пещеристых тел. Оксид азота стимулирует синтез циклического гуанозин монофосфата. При накоплении цГМФ происходит расслабление гладких мышц, что приводит к увеличению притока крови к кавернозным телам. Тадалафил ингибирует цГМФ-специфическую фосфодиэстеразу типа 5, которая ответственна за деградацию цГМФ в кавернозном теле. Ингибирование ФДЭ5 тадалафилем сопровождается увеличением количества цГМФ и усилением эректильной функции [1].

Отличительной фармакологической особенностью тадалафила является его более длительный период полувыведения (17,5 часа) по сравнению с силденафилом и варденафилом (4–5 часов). Данная особенность является основой современных исследований для использования тадалафила при легочной артериальной гипертензии в качестве терапии один раз в день [2].

Для количественного определения тадалафила в плазме крови человека применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) и tandemным масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС). В большинстве рассмотренных методик в качестве пробоподготовки применяется способ жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), в редких случаях применяют способ твердофазной экстракции (ТФЭ) (таблица 1). Данные способы являются в достаточной степени трудоёмкими и экономически затратными (расход раствори-

телей, картриджей для ТФЭ). В настоящем исследовании в качестве пробоподготовки рассмотрен способ осаждения белков, являющийся более простым в исполнении, что актуально при анализе большого количества проб при проведении исследований биоэквивалентности. Данный способ пробоподготовки в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием позволяет достичь необходимого и достаточного уровня НПКО методики для проведения исследований биоэквивалентности.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения тадалафила

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of tadalafil

Аналитический метод	Пробоподготовка	Аналитический диапазон, нг/мл	Ссылка
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	5,00–600,00	[3]
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	10,00–1000,00	[4]
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	10,00–2000,00	[5]
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	2,00–1000,00	[6]
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	2,00–1000,00	[7]
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	5,00–1000,00	[8]

Целью исследования является разработка методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ с одноквадрольным масс-спектрометрическим детектированием, для проведения аналитической части фармакокинетических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity II, оснащённом градиентным насосом, термостатом колонок, автосамплером и масс-спектрометрическим детектором 6125. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation, rev. C.01.07 Agilent Technologies, США.

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (LC-MS grade, Biosolve); муравьиная кислота (класс «for LC-MS», Merck Millipore); вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы тадалафила (USP reference standard, содержание 99,9%) и пропранолола гидрохлорида (USP reference standard, содержание 99,9%).

Исходные стандартные растворы тадалафила и внутреннего стандарта (ВС) пропранолола готовили

путем растворения навески субстанций в ацетонитриле, рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходный раствор, стандартный раствор и рабочие растворы хранили в морозильной камере при температуре -45°C . Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре -45°C .

Пробоподготовка

В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения белков ацетонитрилом, поскольку данный способ является менее трудоемким и длительным по сравнению с ЖЖЭ и ТФЭ.

К 300 мкл испытуемой плазмы крови (либо к 270 мкл интактной плазмы с прибавлением 30 мкл рабочего стандартного раствора тадалафила), помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта пропранолола (1000,00 нг/мл), затем прибавляли 900 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее надосадочную жидкость переносили в хроматографические виалы.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- ✓ Колонка: Phenomenex Luna C18, 50x4,6 мм, 5 мкм; предколонка: Phenomenex C18, 4x3,0 мм, 5 мкм.
- ✓ Температура термостата: 40°C .
- ✓ Подвижная фаза: элюент А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q (по объёму), элюент В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объёму).
- ✓ Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1.

Таблица 2. Градиентное элюирование

Table 2. Gradient elution

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00	90	10	1,20
0,50	90	10	
5,00	58	42	
5,10	0	100	
5,90	0	100	
6,00	90	10	
7,00	90	10	

- ✓ Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- ✓ Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0–7 мин.
- ✓ Положительная ионизация (тадалафил): (SIM), 390,2 m/z.
- ✓ Положительная ионизация (пропранолол): (SIM), 260,0 m/z.
- ✓ Параметры источника ионизации: распыляющий газ 250 кПА, осушающий газ 13 л/мин, температура источника 350°C , напряжение на капилляре 5 кВ.
- ✓ Время удерживания тадалафила: около 4,5 мин.
- ✓ Время удерживания пропранолола: около 2,5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [9], а также руководств FDA [10] и EMA [11] по следующим параметрам:

- селективность;
- эффект матрицы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность (стабильность исходных и рабочих растворов аналита и ВС; стабильность замороженного и размороженного аналита; краткосрочная стабильность аналита в матрице; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, и образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов тадалафила до концентрации 250,00 нг/мл, а также раствора внутреннего стандарта (пропранолола) до концентрации 30 нг/мл. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания тадалафила и пропранолола. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 2, 3.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением рабочих стандартных растворов тадалафила и пропранолола без влияния биологической матрицы (W_{u_x}), а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учёта влияния степени

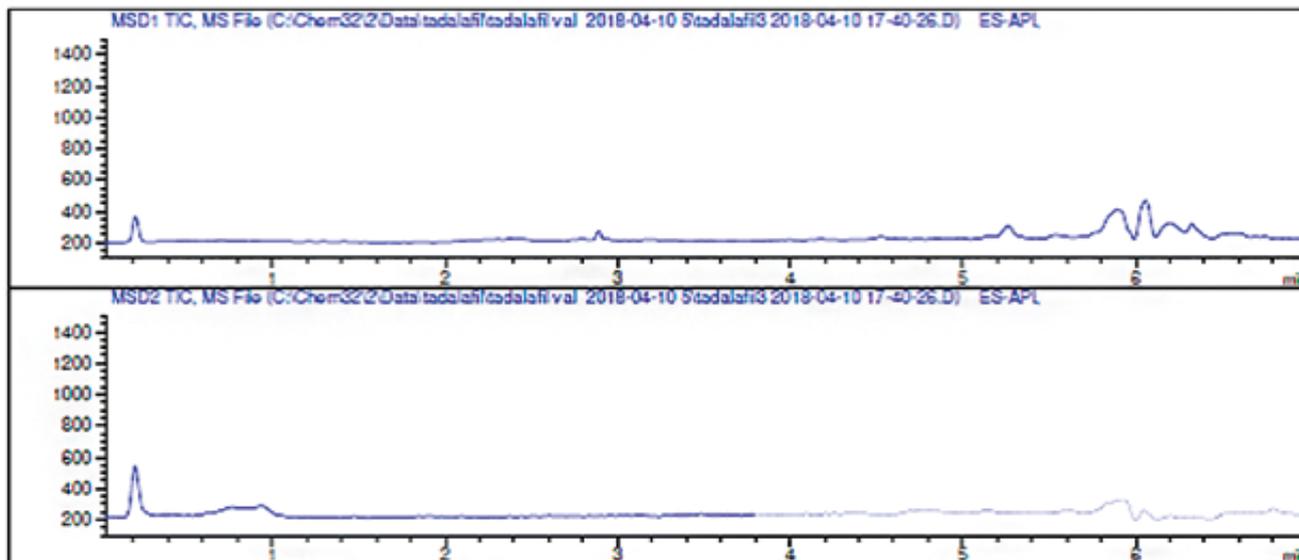


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 2. Chromatogram of a blank plasma sample

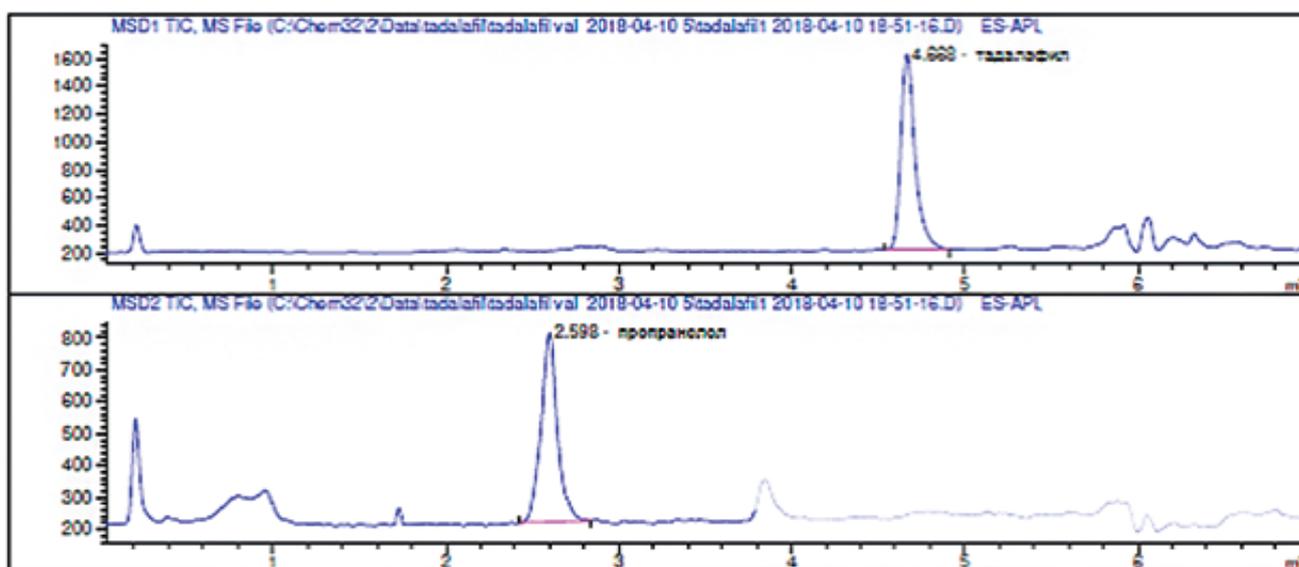


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови с прибавлением рабочего стандартного раствора до концентрации тадалафила 250,00 нг/мл и рабочего стандартного раствора пропранолола до концентрации 30 нг/мл

Figure 3. Chromatogram of a blank plasma sample with the addition of a standard solution to concentration of tadalafil 250,00 ng/ml and standard solution to concentration of propranolol 30 ng/ml

извлечения тадалафила и пропранолола из биологической матрицы (SA_u_x).

Эффект матрицы был оценен на нижнем и верхнем уровнях аналитического диапазона концентраций тадалафила (10,00 нг/мл и 1000,00 нг/мл). Для внутреннего стандарта (пропранолол) эффект матрицы был рассчитан на уровне 30 нг/мл. Данные представлены в таблицах 3–6.

Фактор матрицы рассчитывали, как отношение значения площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного на плазме после осаждения

белков, к значению площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы.

Фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, рассчитывали, как отношение значения фактора матрицы тадалафила к фактору матрицы пропранолола (внутренний стандарт). Рассчитанные значения коэффициента вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, соответствуют нормам, не более 15%.

Таблица 3. Расчёт влияния биологической матрицы на количественное определение тадалафила 10,00 нг/мл и 1000,00 нг/мл

Table 3. The effect of the biological matrix on the quantitative determination of tadalafil 10,00 ng/ml and 1000,00 ng/ml

Код пробы	Площадь пика на хроматограмме раствора без влияния биологической матрицы	Код пробы	Площадь пика на хроматограмме раствора, приготовленного на интактной плазме	Mf
W_2_1	375	SA_2_1	293	0,78
W_2_2	348	SA_2_2	299	0,86
W_2_3	305	SA_2_3	317	1,04
W_2_4	380	SA_2_4	317	0,83
W_2_5	397	SA_2_5	345	0,87
W_2_6	320	SA_2_6	263	0,82
W_9_1	33541	SA_9_1	31535	0,94
W_9_2	32954	SA_9_2	31122	0,94
W_9_3	33035	SA_9_3	31178	0,94
W_9_4	33441	SA_9_4	31983	0,96
W_9_5	34510	SA_9_5	31783	0,92
W_9_6	33689	SA_9_6	31577	0,94

Таблица 4. Расчёт влияния биологической матрицы на количественное определение пропранолола 30 нг/мл

Table 4. The effect of the biological matrix on the quantitative determination of propranolol 30 ng/ml

Код пробы	Площадь пика на хроматограмме раствора без влияния биологической матрицы	Код пробы	Площадь пика на хроматограмме раствора, приготовленного на интактной плазме	Mf
W_2_1	4614	SA_2_1	4354	0,94
W_2_2	4583	SA_2_2	4355	1,05
W_2_3	4457	SA_2_3	4352	0,98
W_2_4	4537	SA_2_4	4340	0,96
W_2_5	4479	SA_2_5	4402	0,98
W_2_6	4511	SA_2_6	4405	0,98
W_9_1	4412	SA_9_1	4371	0,99
W_9_2	4392	SA_9_2	4518	1,03
W_9_3	4365	SA_9_3	4550	1,04
W_9_4	4521	SA_9_4	4543	1,00
W_9_5	4410	SA_9_5	4500	1,02
W_9_6	4132	SA_9_6	4463	1,08

Калибровочная кривая

Проводили анализ 9 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего стандартного раствора пропранолола до концентрации 30 нг/мл и рабочих стандартных растворов тадалафила до получения концентраций: 5,00 нг/мл, 10,00 нг/мл, 25,00 нг/мл, 50,00 нг/мл, 100,00 нг/мл, 250,00 нг/мл, 500,00 нг/мл, 750,00 нг/мл, 1000,00 нг/мл (таблица 2). По полученным

значениям были построены калибровочные графики, приведенные на рисунке 4 совместно с уравнением калибровочной кривой.

Таблица 5. Расчёт фактора матрицы тадалафила (10,0 нг/мл), нормализованного по фактору матрицы пропранолола (30 нг/мл)

Table 5. The matrix factor of tadalafil (10,00 ng/ml), normalized by the matrix factor of propranolol (30 ng/ml)

№	Mf тадалафила	Mf пропранолола	Нормализованный Mf
1	0,78	0,94	0,83
2	0,86	1,05	0,82
3	1,04	0,98	1,07
4	0,83	0,96	0,87
5	0,87	0,98	0,88
6	0,82	0,98	0,84
Среднее			0,88
CV, %			10,44

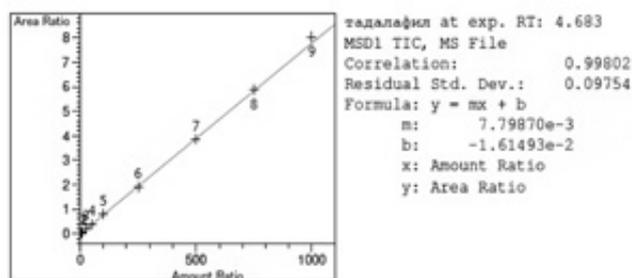


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости отношения площади пика тадалафила к площади пика пропранолола от отношения концентрации тадалафила к концентрации пропранолола в плазме крови

Figure 4. The calibration curve dependence of the ratio area peak of tadalafil to the propranolol on the concentration ratio of tadalafil to the propranolol in plasma

Таблица 6. Расчёт фактора матрицы тадалафила (1000,00 нг/мл), нормализованного по фактору матрицы пропранолола (30 нг/мл)

Table 6. The matrix factor of tadalafil (1000,00 ng/ml), normalized by the matrix factor of propranolol (30 ng/ml)

№	Mf тадалафила	Mf пропранолола	Нормализованный Mf
1	0,94	0,99	0,95
2	0,94	1,03	0,92
3	0,94	1,04	0,91
4	0,96	1,00	0,95
5	0,92	1,02	0,90
6	0,94	1,08	0,87
Среднее			0,92
CV, %			3,45

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в таблице 7.

Таблица 7. Отклонения концентраций тадалафила в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочный график № 1 (тадалафил)

Table 7. Deviations of tadalafil concentrations in calibration samples from their nominal values, calibration curve № 1 (tadalafil)

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма, не более %
5,00	5,28	5,31	20
10,00	9,76	-2,44	15
25,00	23,13	-8,06	15
50,00	47,17	-6,00	15
100,00	99,55	-0,45	15
250,00	264,21	5,38	15
500,00	500,33	0,07	15
750,00	711,86	-5,36	15
1000,00	1033,11	3,20	15

Точность и прецизионность

Проводили анализ образцов интактной плазмы крови с прибавлением стандартных растворов тадалафила до получения концентраций: 5,00 нг/мл, 10,00 нг/мл, 500,00 нг/мл, 1000,00 нг/мл и рабочего стандартного раствора пропранолола до концентрации 30 нг/мл. Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня концентраций тадалафила. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла), 2-й и 3-й последовательности (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), приведенные в таблицах 8–10.

Таблица 8. Точность и прецизионность методики (внутри цикла)

Table 8. Accuracy and precision of the method (inter-day)

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	SD, (n=5)	RSD, % (n=5)	E, %
5,00	5,97	0,06	1,01	19,42
10,00	9,83	0,90	9,20	-1,66
500,00	502,16	8,37	1,67	0,43
1000,00	1067,47	21,95	2,06	6,75

Таблица 9. Точность и прецизионность методики (между циклами 1)

Table 9. Accuracy and precision of the method (intra-day 1)

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	SD, (n=10)	RSD, % (n=10)	E, %
5,00	5,81	0,26	4,49	16,20
10,00	9,79	0,79	8,08	-2,07
500,00	504,54	10,07	2,00	0,91
1000,00	1051,24	23,50	2,24	5,12

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20% на уровне НПКО, не более 15% – для остальных точек).

Таблица 10. Точность и прецизионность методики (между циклами 2)

Table 10. Accuracy and precision of the method (intra-day 2)

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=15)	SD, (n=15)	RSD, % (n=15)	E, %
5,00	5,56	0,35	6,30	11,13
10,00	9,63	0,94	9,77	-3,75
500,00	503,48	7,96	1,58	0,70
1000,00	1048,75	19,14	1,82	4,88

Нижний предел количественного определения, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация тадалафила в плазме крови в диапазоне линейной зависимости, для которой возможно количественное определение тадалафила со значениями RSD и E не более 20%.

Нижний предел количественного определения методики составил 5,00 нг/мл. Хроматограмма плазмы крови с содержанием тадалафила на уровне НПКО приведена на рисунке 5. Отношение сигнал/шум по пику тадалафила на уровне НПКО, рассчитанное при помощи программного обеспечения ChemStation, составило 10,5. Предел обнаружения тадалафила для данной методики составил около 2,9 нг/мл.

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение рабочего дня), стабильность при 3-х кратной заморозке-разморозке, стабильность для стандартных растворов (при хранении в течение 60 дней при температуре -45 °C), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 60 дней при температуре -45 °C) тадалафила на уровне концентраций 10,00 нг/мл и 1000,00 нг/мл

Перенос пробы

При последовательном вводе пробы с концентрацией тадалафила 1000,00 нг/мл, пропранолола 30 нг/мл и образца интактной плазмы на хроматограмме образца интактной плазмы отсутствовали пики, соответствующие тадалафилу и пропранололу, с площадью более чем 20% от уровня НПКО. Перенос пробы отсутствовал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения тадалафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 5,00–1000,00 нг/мл тадалафила в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разра-

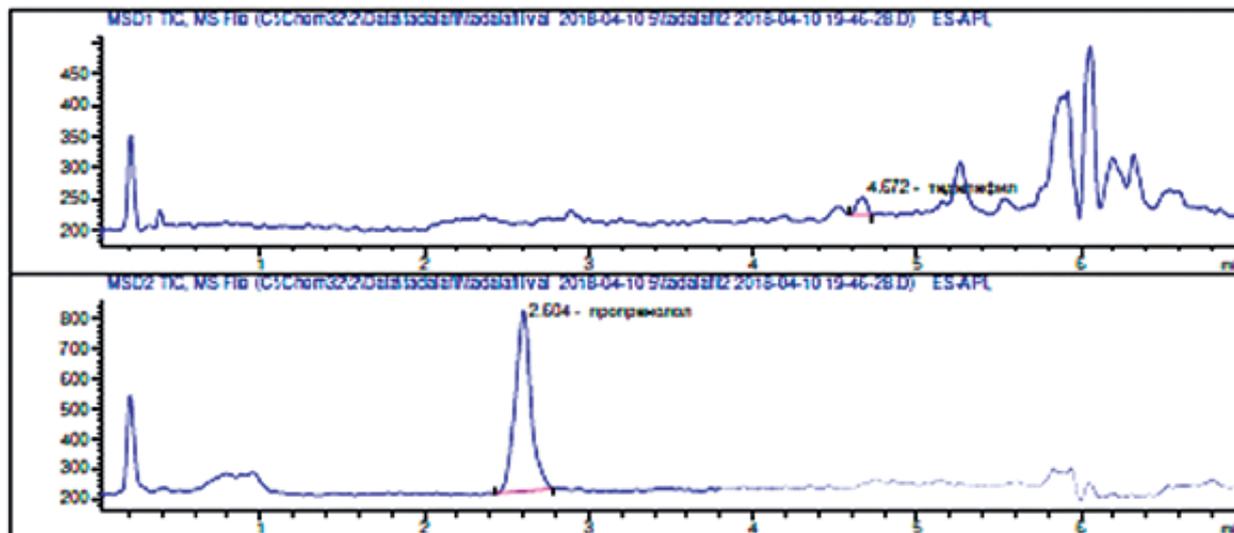


Рисунок 5. Хроматограмма образца интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов пропранолола и тадалафила на уровне НПКО

Figure 5. Chromatogram of a blank plasma sample with the addition of standard solutions of propranolol and tadalafil at the level LLOQ

ботанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики и биоэквивалентности воспроизводимых лекарственных средств, содержащих тадалафил.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств. Available at: http://www.rlsnet.ru/mnn_index
2. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00820>.
3. Shakya A. K., Abu-Awwad A. N., Arafat T. A., Melhim M. Validated liquid chromatographic-ultraviolet method for the quantitation of tadalafil in human plasma using liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B*. 2007; 852(1-2): 403–408. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.01.049.
4. Ramakrishna N. V. S., Vishwottam K. N., Puran, S., Koteswara M., Manoj S., Santosh, M., Sumatha B. Quantitation of tadalafil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*. 2004; 809(2): 243–249. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.06.026.
5. Cheng C. L., Chou C. H. Determination of tadalafil in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography B*. 2005; 822(1-2): 278–284. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.017.
6. Ma B., Shang X., Zhang Q., Li J., Liu Y., Cao X., Xu Q. Rapid analysis of tadalafil in human blood plasma and seminal plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013; 77: 149–157. Doi.org/10.1016/j.jpba.2013.01.019.
7. Yokoyama Y., Tomatsuri M., Hayashi H., Hirai K., Ono Y., Yamada Y., Itoh K. Simultaneous microdetermination of bosentan, ambrisentan, sildenafil, and tadalafil in plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014; 89: 227–232. Doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.007
8. Rust K. Y., Wilkens H., Kaiser R., Bregel D., Wilske J., Kraemer T. Detection and Validated Quantification of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, and 2 of Their Metabolites in Human Blood Plasma by LC-MS/MS – Application to Forensic and Therapeutic Drug Monitoring Cases. *Therapeutic drug monitoring*. 2012; 34 (6): 729–735. Doi.org/10.1097/FTD.0b013e31827318b8.
9. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К. 2013; 280 с.
10. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>

11. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>

REFERENCES

1. Register of medicines. Available at: http://www.rlsnet.ru/mnn_index (In Russ.).
2. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00820>.
3. Shakya A. K., Abu-Awwad A. N., Arafat T. A., Melhim M. Validated liquid chromatographic-ultraviolet method for the quantitation of tadalafil in human plasma using liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B*. 2007; 852(1-2): 403–408. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.01.049.
4. Ramakrishna N. V. S., Vishwottam K. N., Puran, S., Koteswara M., Manoj S., Santosh, M., Sumatha B. Quantitation of tadalafil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*. 2004; 809(2): 243–249. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.06.026.
5. Cheng C. L., Chou C. H. Determination of tadalafil in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography B*. 2005; 822(1-2): 278–284. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.017.
6. Ma B., Shang X., Zhang Q., Li J., Liu Y., Cao X., Xu Q. Rapid analysis of tadalafil in human blood plasma and seminal plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013; 77: 149–157. Doi.org/10.1016/j.jpba.2013.01.019.
7. Yokoyama Y., Tomatsuri M., Hayashi H., Hirai K., Ono Y., Yamada Y., Itoh K. Simultaneous microdetermination of bosentan, ambrisentan, sildenafil, and tadalafil in plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014; 89: 227–232. Doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.007
8. Rust K. Y., Wilkens H., Kaiser R., Bregel D., Wilske J., Kraemer T. Detection and Validated Quantification of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, and 2 of Their Metabolites in Human Blood Plasma by LC-MS/MS – Application to Forensic and Therapeutic Drug Monitoring Cases. *Therapeutic drug monitoring*. 2012; 34 (6): 729–735. Doi.org/10.1097/FTD.0b013e31827318b8.
9. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. М.: Grief and K. 2013; 280 p. (In Russ.).
10. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
11. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>