

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

**ОСИПЧУК ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА**

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

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ,  
ВАРДЕНАФІЛУ ТА ЇХ МЕТАБОЛІТІВ ПРИ КОМБІНОВАНИХ  
ОТРУЄННЯХ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук

Львів – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

**Науковий керівник:** кандидат фармацевтичних наук, доцент  
**ГАЛЬКЕВИЧ ІРИНА ЙОСИПІВНА**  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького, завідувач кафедри  
токсикологічної та аналітичної хімії

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, професор  
**КАПЛАУШЕНКО АНДРІЙ ГРИГОРОВИЧ**  
Запорізький державний медичний університет,  
завідувач кафедри фізколоїдної хімії

доктор фармацевтичних наук, доцент  
**ЛОГОЙДА ЛІЛІЯ СВЯТОСЛАВІВНА**  
Тернопільський національний медичний університет  
імені І. Я. Горбачевського,  
завідувач кафедри фармацевтичної хімії

Захист відбудеться «\_\_\_» грудня 2020 р. о \_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (79000, м. Львів, вул. Січових Стрільців, 6).

Автореферат розісланий «\_\_\_» листопада 2020 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради

І. В. Драпак

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 фосфодієстерази 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 нітровоазодилататорами (нітрогліцерином, мононітратом та динітратом ізосорбїду), а також з інгаляційними формами алкілнітритів – амілнітритом, бутилнітритом, ізобутилнітритом, з  $\alpha$ -адрено-блокаторами та гіпотензивними препаратами. В результаті потенціонування 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 загальнозживаних 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 рідинах 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 (№ державної реєстрації 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 екстракції;
- 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 осадкових та кольорових реакції. 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 депротейнізації 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-клинотилолітом, 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 Conference «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.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Розділ 1. Загальна характеристика фізико-хімічних, фармакологічних і токсикологічних властивостей силденафілу і варденафілу та методів їх визначення в біологічних пробах (огляд літератури).** Силденафіл та варденафіл – препарати із групи інгібіторів фосфодіестерази 5-го типу (ФДЕ-5) з вазодилатуючою дією. У хімічному відношенні силденафіл – це 5-[2-етокси-5-(4-метилпіперазин-1-л)сульфо]феніл]-1-метил-3-пропіл-1*H*,4*H*,7*H*-піразоло[4,3-*d*]піримідин-7-он.

Варденафіл за хімічною структурою – 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] триазин-4-он.

В першому розділі подається загальна характеристика силденафілу та варденафілу, їх фізико-хімічні властивості, фармакокінетика та можливі шляхи метаболізму, описуються їх побічні ефекти та токсична дія. Встановлено, що більшість побічних ефектів спостерігається у пацієнтів з факторами ризику із сторони серцево-судинної системи. Відмічено, що основним протипоказом є їх сумісне застосування з нітровазодилататорами, інгаляційними формами алкілнітритів,  $\alpha$ -адреноблокаторами та гіпотензивними препаратами, оскільки в результаті потенціонування вазодилатуючих ефектів вказаних засобів розвивається критична і неконтрольована гіпотензія, що може призвести до раптової смерті.

В результаті аналізу літературних джерел зроблено висновок про доцільність розробки експресних та чутливих методів виділення, ідентифікації та кількісного визначення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, що будуть придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу та при діагностиці станів гострої інтоксикації даними препаратами при комбінованих отруєннях.

**Розділ 2. Розробка методів ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу у розчинах.** Вивчено реакційну здатність силденафілу та варденафілу з рядом реагентів, які використовуються в судово-хімічній практиці для експрес-виявлення ксенобіотиків. За результатами експериментальних досліджень вибрано реакції з реагентами з межею виявлення 1-8 мкг силденафілу чи варденафілу в пробі: з калію дихроматом в присутності концентрованої сульфатної кислоти, хромотроповою кислотою, реактивами Фореста, Бушарда, Вагнера, Драгендорфа, Зонненшейна та сіллю Рейнеке.

Визначено рухливість силденафілу та варденафілу в 12 системах розчинників для ТШХ аналізу, які рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів (ТІАФТ). Опрацьовано склад підтверджуючих систем розчинників для розділення досліджуваних препаратів з основними структурними метаболітами: ацетон-хлороформ-діетиламін (5:6:1); етилацетат-ацетон-діетиламін (15:10:1); ацетон-гексан-діетиламін (30:19:1); толуен-діоксан-диметилформамід (10:38:2). Для візуалізації зон силденафілу та варденафілу на пластинках використано опромінення УФ-світлом ( $\lambda = 254$  нм) та обробку реактивом Драгендорфа.

Досліджено характер УФ-спектрів силденафілу та варденафілу в метанолі та 96 % етанолі, встановлено довжини хвиль максимумів поглинання. Для кількісного

визначення методом УФ-спектрофотометрії розраховані їх питомі та молярні показники поглинання (табл. 1).

Таблиця 1

**Питомі та молярні показники поглинання силденафілу і варденафілу та інтервал лінійності світлопоглинання (n = 5, P = 95%)**

Препарат	Розчинник	$\lambda_{\max}$ , нм	Інтервал лінійності концентрацій, мкг/мл	Питомий показник поглинання $A_{1\text{cm}}^{1\%}$	Молярний показник поглинання $\epsilon$	Відносна похибка визначення $\epsilon$ , %
Силденафіл	метанол	292	2,5-20,0	$271,69 \pm 3,92$	$12894,02 \pm 186,02$	1,52
	96 % етанол	292	2,5-20,0	$316,43 \pm 1,27$	$15017,21 \pm 60,42$	0,69
Варденафіл	метанол	221	2,0-20,0	$640,64 \pm 5,15$	$31302,07 \pm 212,51$	0,72
	96 % етанол	213	2,0-20,0	$813,15 \pm 5,53$	$39731,05 \pm 270,10$	0,43

Вивчено залежність інтенсивності природньої флуоресценції силденафілу і варденафілу від природи розчинника (рис. 1).

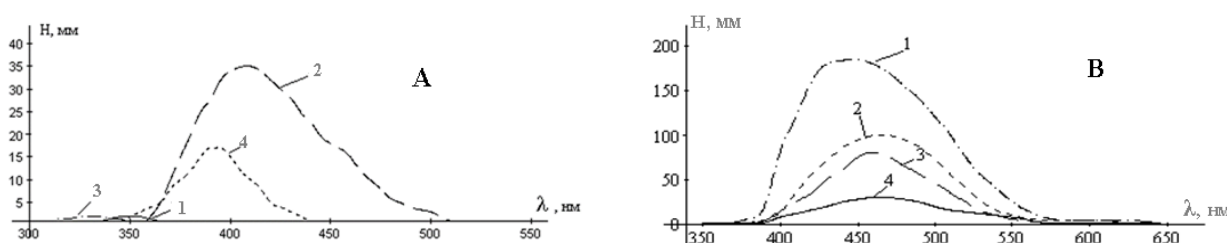


Рис. 1. Спектри флуоресценції силденафілу (А) та варденафілу (В) у:  
1 – ацетонітрилі; 2 – ізопропанолі; 3 – 96 % етанолі;  
4 – воді бідистильованій (концентрація препаратів 10 мкг/мл)

Встановлено, що найвища інтенсивність флуоресценції силденафілу спостерігається в ізопропанольних розчинах,  $\lambda_{36}/\lambda_{\text{випр}} = 360 \text{ нм}/410 \text{ нм}$ , межа виявлення становить 1 мкг/мл ( $Ч = 10$ ), а варденафілу – в ацетонітрильних розчинах,  $\lambda_{36}/\lambda_{\text{випр}} = 285 \text{ нм}/450 \text{ нм}$ , межа виявлення – 4 нг/мл ( $Ч = 10$ ). Розроблено методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу у вибраних розчинниках цим методом. У табл. 2 наведено статистичні параметри флуориметричного визначення силденафілу та варденафілу.

Таблиця 2

**Статистичні параметри кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом флуориметрії (n = 5, P = 95 %)**

Препарат	Інтервал лінійності	Коефіцієнти		Довірчі інтервали коефіцієнтів		Коефіцієнт кореляції (r)	Відносна похибка визначення $\epsilon$ , %
		a	b	$\Delta a$	$\Delta b$		
Силденафіл	2-50 мкг/мл	3,695	-0,888	0,036	0,866	0,9999	1,46
Варденафіл	5-100 нг/мл	0,231	-0,308	0,316	0,005	0,9998	1,55
	0,1-5 мкг/мл	19,948	0,190	0,272	0,110	0,9999	1,54

Вперше розроблено умови ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС без проведення дериватизації. Аналіз виконано на хроматографі Agilent 6890N. Встановлено, що на капілярній колонці RTX-5 (30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм) коефіцієнт розділення силденафілу та варденафілу становить 1,93. Умови хроматографування: початкова температура колонки 150 °С



(1,0 хв), подальше підвищення температури 30 °С/хв до 270 °С і 10 °С/хв до 300 °С. Ізотермічний режим при 300 °С витримували впродовж 40 хв. Температура інжектора – 270 °С, температура джерела випромінювання і квадруполя мас-детектора 230 °С і 150 °С, відповідно. Газ-носіє – гелій (3,0 мл/хв); об'єм введеної проби – 1 мкл. Час утримування силденафілу становив  $19,492 \pm 0,05$  хв, а варденафілу –  $22,769 \pm 0,04$  хв (рис. 2).

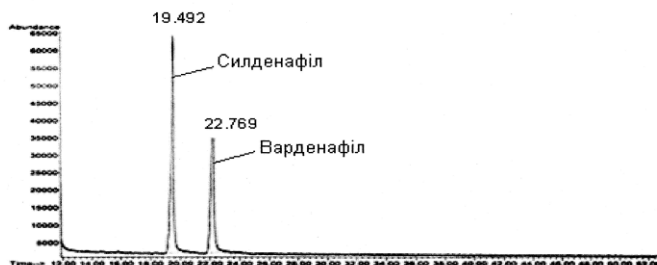


Рис. 2. Хроматограма силденафілу та варденафілу в суміші

Мас-спектр силденафілу характеризується сигналами при: 99, 404, 56, 311, 283, 381, 136, **474** m/z, а мас-спектр варденафілу характеризується сигналами при: 113, 70, 56, **488**, 283, 98, 311, 149 m/z. Межа виявлення силденафілу в модельних розчинах 5,0 нг/мл, а варденафілу – 20,0 нг/мл.

Градувальний графік для кількісного визначення силденафілу цим методом, в діапазоні концентрацій 7-500 нг/мл, описується залежністю  $Y = 7313,564 \cdot X - 2004,167$  ( $r = 0,9999$ ), а для варденафілу, в межах концентрацій 25-500 нг/мл, описується залежністю  $Y = 925,408 \cdot X + 250,277$  ( $r = 0,9999$ ), де: Y – площа піку, X – концентрація препарату, нг/мл. Відносна похибка кількісного визначення силденафілу методом ГХ/МС становить 0,48 %, а варденафілу – 0,67 %.

Опрацьовано умови ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ВЕРХ на колонці Zorbax SB-C18 (50 мм x 2,1 мм, 1,8 мкм).

Склад рухомої фази: 0,1 % водний розчин форміатної кислоти (розчин А), 0,1 % розчин форміатної кислоти в ацетонітрилі (розчин В). Об'ємне співвідношення розчинів А і В: з моменту старту по 10 хв – 95:5; з 10 хв по 15 хв – 0:100, наступні 15 хв – 100 % В (лінійний градієнтний режим подачі рухомої фази, швидкість 0,4 мл/хв). Температура термостата колонки 40 °С, об'єм введеної проби – 10 мкл.

Детекцію досліджуваних сполук проводили діодно-матричним детектором (DAD,  $\lambda = 254$  нм,  $t_R$  силд. =  $5,925 \pm 0,079$  хв,  $t_R$  вард. =  $5,454 \pm 0,092$  хв) та одноквадрупольним мас-спектрометром Agilent 6120 з іонізацією в електро-спреї ( $t_R$  силд. =  $6,004 \pm 0,052$  хв,  $t_R$  вард. =  $5,529 \pm 0,085$  хв). Характер отриманої хроматограми наведено на рис. 3, а мас-спектри, зняті в режимі SCAN – на рис. 4.

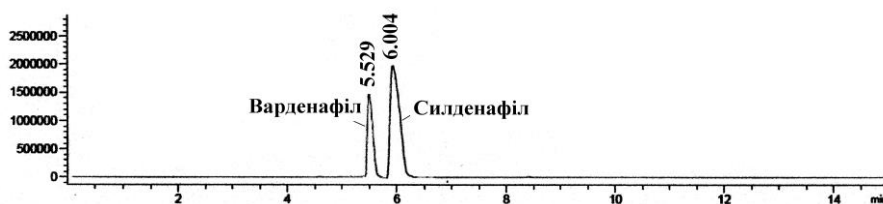


Рис. 3. Хроматограма розчинів силденафілу і варденафілу на колонці Zorbax SB-C18

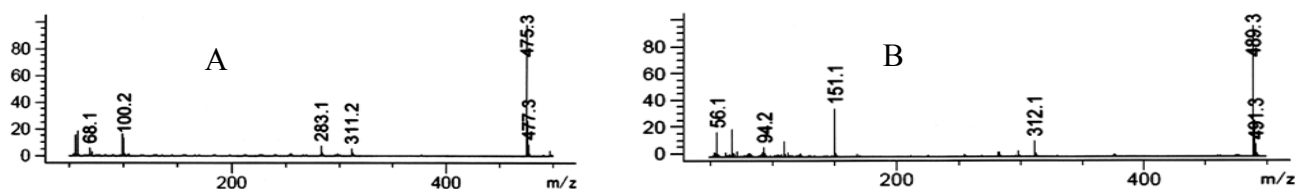


Рис. 4. Мас-спектри силденафілу (А) та варденафілу (В) при аналізі методом ВЕРХ

Межі виявлення та рівняння градувальних прямих для кількісного визначення силденафілу і варденафілу методом ВЕРХ на колонці Zorbax SB-C18 наведено в табл. 3.

Таблиця 3

**Інтервал лінійності кількісного визначення силденафілу та варденафілу на колонці Zorbax SB-C18 залежно від способу детектування**

Тип детектування	Межа виявлення нг/мл	Інтервал лінійності, нг/мл	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції, r
<b>Силденафіл</b>				
MS, режим SIM (m/z=475,3)	8	10 - 500	$Y = 11774,850 \cdot X + 437,222$	0,9999
MS, режим SCAN (50-500 m/z)	20	25 - 500	$Y = 4363,696 \cdot X - 136,481$	0,9999
DAD ( $\lambda = 254$ нм)	25	30 - 500	$Y = 0,612 \cdot X - 0,068$	0,9999
<b>Варденафіл</b>				
MS, режим SIM (m/z=489,3)	12	15 - 500	$Y = 9808,919 \cdot X + 1854,534;$	0,9999
MS, режим SCAN (50-500 m/z)	35	40 - 500	$Y = 3272,676 \cdot X + 1208,206$	0,9999
DAD ( $\lambda = 254$ нм)	45	50 - 500	$Y = 0,397 \cdot X - 0,089$	0,9999

Примітка\* Y – площа піку силденафілу чи варденафілу,

X – концентрація силденафілу чи варденафілу, нг/мл.

В результаті проведених досліджень встановлено, що на колонці Zorbax SB-C18 відносна похибка кількісного визначення силденафілу у розчинах не перевищує 0,66 %, а варденафілу – 0,63 %.

Для ідентифікації та кількісного визначення варденафілу опрацьовано умови ВЕРХ з УФ- та флуоресцентним детектуванням на колонці Luna<sup>®</sup> C18 (250 мм × 4,6 см, 5 мкм). Рухома фаза: ацетонітрил - 0,5 % триетиламін (30 : 70), рН 3,0. Детекцію варденафілу проведено при 214 нм (детектор UV-VIS-DAD,  $t_R = 7,697 \pm 0,09$  хв) та флуориметрично при  $\lambda_{36}/\lambda_{\text{випр}} = 285/450$  нм (детектор FLD, Dionex Ultimate 3000,  $t_R = 7,759 \pm 0,06$  хв) (рис. 5).

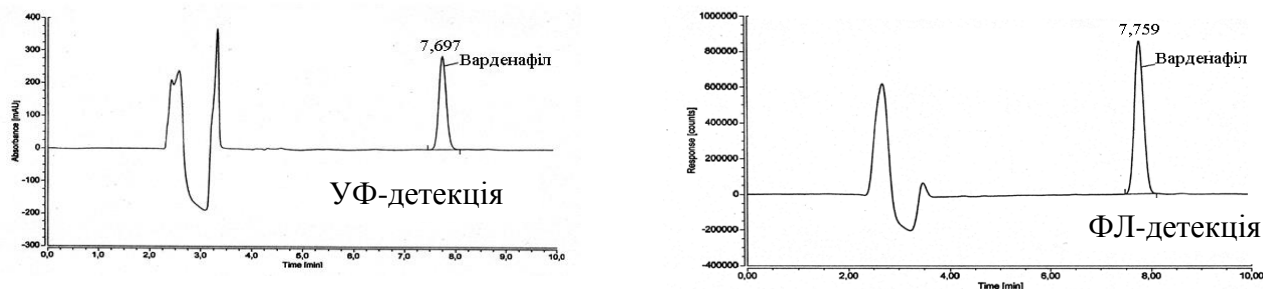


Рис. 5. Хроматограми варденафілу на колонці LUNA<sup>®</sup> C18

Межа виявлення варденафілу з УФ-детектуванням – 0,1 мкг/мл, а з використанням флуоресцентного детектора – 1 нг/мл.

Для кількісного визначення варденафілу в цих умовах з УФ-детекцією, в межах концентрацій від 0,5 до 100 мкг/мл, рівняння градувального графіку описується залежністю  $Y = 0,277 \cdot X - 0,018$  ( $r = 0,9999$ ), з флуоресцентним детектором, в межах концентрацій від 2 до 500 нг/мл –  $Y = 157,257 \cdot X - 26,289$  ( $r = 0,9999$ ), де:  $Y$  – площа піку,  $X$  – концентрація варденафілу (мкг/мл або нг/мл відповідно до способу детектування). Відносна похибка кількісного визначення варденафілу в розчинах при УФ- детектуванні складає 1,16 %, а при використанні флуоресцентного детектора – 0,77 %.

Для ідентифікації та кількісного визначення силденафілу розроблено умови аналізу із використанням одного з найсучасніших методів рідинної хроматографії – методом ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ). Дослідження проводили на хроматографі Waters: ACQUITY UPLC H-Classsystem, на колонці ВЕН С18 (2,1 × 50 мм, 1,7 мкм). Склад рухомої фази: 0,1 % водний розчин форміатної кислоти (розчин А), ацетонітрил (розчин В). Розчини А і В подавались в об'ємному співвідношенні: перші 60 сек – 75:25; наступні 60 сек – 40:60; і останні 60 сек – 75:25 (лінійний градієнтний режим подачі рухомої фази, швидкість 0,5 мл/хв).

MRM моніторинг проводився за масами іонів силденафілу  $475 \rightarrow 311$  m/z і  $475 \rightarrow 58$  m/z. УФ-детектування здійснювали DAD при 293 нм. Об'єм введеної проби 10 мкл. Час утримування силденафілу: при мас-детекції  $t_R = 1,69 \pm 0,03$  хв, а УФ- детекції –  $t_R = 1,83 \pm 0,04$  хв (рис. 6).

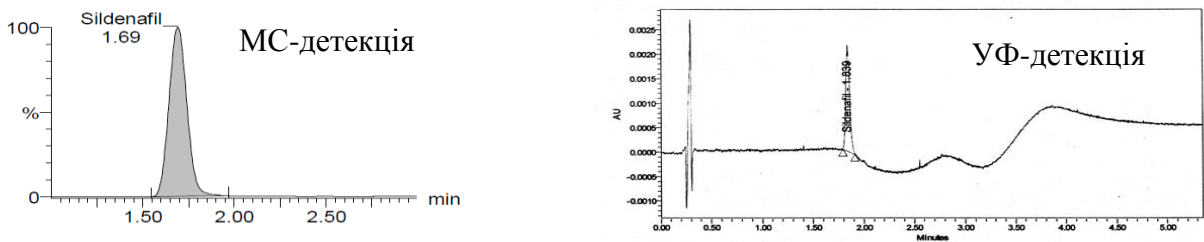


Рис. 6. Хроматограми силденафілу на колонці ВЕН С18

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

Рівняння градувальних графіків для кількісного визначення силденафілу з МС/МС детекцією, в межах концентрацій від 3 до 500 нг/мл, описується залежністю  $Y = 10,971 \cdot X + 0,296$  ( $r = 0,9999$ ), а з УФ-детектором, в межах концентрацій від 6 до 500 нг/мл –  $Y = 28,547 \cdot X + 4,304$  ( $r = 0,9999$ ), де:  $Y$  – площа піку,  $X$  – концентрація силденафілу, нг/мл. Відносна похибка кількісного визначення при аналізі УВЕРХ/МС/МС складає 0,45 %, а при УВЕРХ/УФ – 0,50 %.

Методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу в розчинах усіма розробленими методами валідовані за показниками лінійності, правильності і прецизійності, в результаті чого зроблено висновок про можливість їх використання для кількісного визначення досліджуваних препаратів в біологічних пробах.

**Розділ 3. Розробка умов концентрування силденафілу та варденафілу із водних розчинів.** Для опрацювання процесу пробопідготовки зразків біологічних рідин та витяжок із біологічного матеріалу розроблено умови концентрування силденафілу і варденафілу методами рідинної та твердофазної екстракції. Вивчено залежність ступеню екстракції силденафілу і варденафілу від рН середовища та природи органічних розчинників при рідинній екстракції. Експериментально

доведено, що найкращим органічним розчинником для екстракції силденафілу і варденафілу є 1,2-дихлоретан, яким при рН 8,0 (для силденафілу) і рН 7,5 (для варденафілу) екстрагується до 93-95 % досліджуваних сполук. Встановлено, що наявність електролітів зменшує ступінь екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів.

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

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 Н-клиноптилолітом ізолюється 82-83 % варденафілу та 84-85 % силденафілу, а в динамічних умовах – 90-91 % варденафілу та 93-94 % силденафілу. Елюент – 5 % розчин аміаку в 96 % етанолі.

#### **Розділ 4. Виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу.**

Для встановлення оптимальних умов вилучення силденафілу і варденафілу використовували модельні суміші біологічних матриць з досліджуваними препаратами. Тканини печінки отримували у Львівському обласному патолого-анатомічному бюро, а кров та плазму – у Львівському обласному центрі служби крові. Сечу відбирали в живих осіб. Кожний зразок біологічного матеріалу перевіряли на відсутність будь-яких лікарських препаратів.

Порівняно результати ізолювання силденафілу та варденафілу загальноприйнятими в токсикологічному аналізі методами. Зокрема, методом О.О. Васильєвої можливо виділити 25-28 % силденафілу та 26-28 % варденафілу, методом Стаса-Отто – 31-35 % варденафілу та 33-36 % силденафілу, а методом В.П. Крамаренка виділяється 33-37 % варденафілу та 35-38 % силденафілу.

Розроблено і запропоновано ефективну методику виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). Екстракцію силденафілу із кислих ацетонітрильних витяжок проводили 1,2-дихлоретаном при рН = 8, а варденафілу – при рН = 7,5. При використанні даної методики та з наступною пробопідготовкою до аналізу методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB із тканини печінки виділяється 46-48 % силденафілу та 45 - 48 % варденафілу.

Розроблено дві методики ізолювання силденафілу та варденафілу з крові. Встановлено, що після настоювання крові з сумішшю ацетонітрилу із 70 % перхлоратною кислотою (1:1) та екстракції досліджуваних сполук 1,2-дихлоретаном, ступінь виділення досліджуваних сполук становить 45-47 %. Після депротеїнізації крові 10 % розчином цинку сульфату та 96 % етанолом і ТФЕ проб на картриджах Oasis HLB, виділяється 59-60 % досліджуваних препаратів.

Опрацьовано експрес-методику ізолювання силденафілу та варденафілу з плазми крові методом ТФЕ. Встановлено, що із застосуванням картриджів Oasis HLB ізолюється до 89 % силденафілу та 88 % варденафілу, а на сорбційних колонках з Н- клиноптилолітом 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.

**Розділ 5. Валідація методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС в біологічних об'єктах.** В процесі проведення валідації методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС в біологічних матрицях визначались критерії, необхідні для забезпечення відтворюваності і надійності біоаналітичних методик: селективність/специфічність; лінійність/калібрувальна модель; правильність та прецизійність; матричний ефект; відтворюваність та стабільність. Як біологічні матриці на одне дослідження використано по 2 мл плазми, 5 мл сечі та 5 г тканини печінки.

При визначенні валідаційних критеріїв силденафілу у біологічних матрицях методом ГХ/МС готували проби із вмістом 20-2000 нг досліджуваної сполуки, а варденафілу – із вмістом 60-600 нг, при визначенні методом ВЕРХ/МС проби містили 25-2000 нг силденафілу і 40-600 нг варденафілу.

При визначенні параметрів селективність/специфічність аналізували зразки плазми, сечі та тканини печінки 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. Встановлено, що на хроматограмах контрольних проб плазми, сечі та печінки не виписувались піки із часом утримування ( $t_R$ ), які б відповідали  $t_R$  силденафілу та варденафілу при аналізі методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС і відповідні методики є коректними щодо валідаційних параметрів селективність/специфічність.

Для встановлення впливу матриці на результат визначення силденафілу та варденафілу, у проби, отримані при очищенні матриць методом ТФЕ, вносили досліджувані препарати у кількостях, які відповідають нижній межі кількісного визначення методом ГХ/МС чи ВЕРХ/МС. Коефіцієнт варіації (CV, %), розрахований для 6 серій матриці, не перевищував 1 %, що свідчить про відсутність впливу ендогенних компонентів на результати кількісного визначення силденафілу і варденафілу.

Для оцінки параметрів лінійності визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС готували проби, які у біологічній матриці містили по 20, 200, 500, 1000, 1500 та 2000 нг силденафілу, а вміст варденафілу відповідно становив 60, 100, 200, 400, 500 та 600 нг.

При оцінці лінійності визначення досліджуваних препаратів методом ВЕРХ/МС 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 лінійної залежності площ піків силденафілу чи варденафілу від їх вмісту в плазмі, сечі та печінці при дослідженні методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС наведено на рис. 7 та 8.

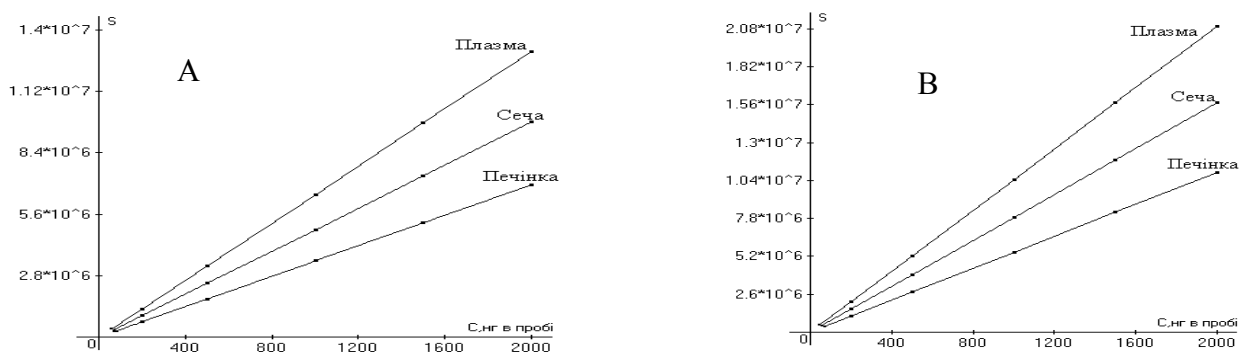


Рис. 7. Калібрувальні криві визначення лінійності силденафілу в біологічних матрицях методами ГХ/МС (А) та ВЕРХ/МС (В)

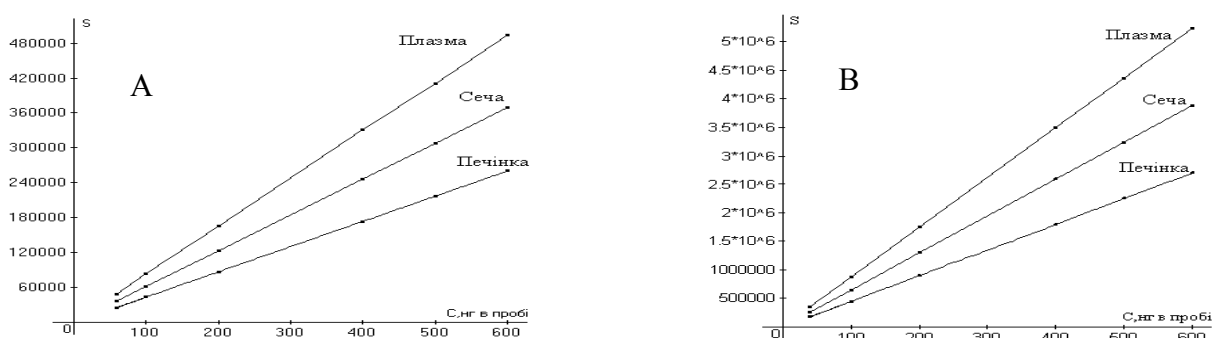


Рис. 8. Калібрувальні криві визначення лінійності варденафілу в біологічних матрицях методами ГХ/МС (А) та ВЕРХ/МС (В)

У табл. 4 наведено статистичні параметри лінійності методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу в модельних зразках біологічного матеріалу.

Таблиця 4

**Статистичні параметри лінійності методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу в модельних зразках біологічного матеріалу**

Препарат	Біологічний матеріал	Метод ГХ/МС		Метод ВЕРХ/МС	
		Коефіцієнти		Коефіцієнти	
		a	b	a	b
Силденафіл	Плазма	$6,509 \cdot 10^3$	$-4,351 \cdot 10^3$	$1,048 \cdot 10^4$	$-1,776 \cdot 10^3$
	Печінка	$3,472 \cdot 10^3$	$-3,169 \cdot 10^3$	$5,472 \cdot 10^3$	$3,871 \cdot 10^3$
	Сеча	$4,902 \cdot 10^3$	$-3,807 \cdot 10^3$	$7,888 \cdot 10^3$	$-4,221 \cdot 10^2$
Варденафіл	Плазма	$8,224 \cdot 10^2$	$8,600 \cdot 10^2$	$8,723 \cdot 10^3$	$1,833 \cdot 10^3$
	Печінка	$4,344 \cdot 10^2$	$-2,934 \cdot 10^2$	$4,495 \cdot 10^3$	$1,157 \cdot 10^3$
	Сеча	$6,167 \cdot 10^2$	$-2,438 \cdot 10^2$	$6,485 \cdot 10^3$	$-1,020 \cdot 10^2$

Правильність і прецизійність розроблених методик визначали на рівні нижньої межі кількісного визначення кожним із зазначених методів, середньої концентрації та верхнього рівня концентрації. При цьому значення коефіцієнта варіації (CV) в одній серії та між серіями не перевищувало 5 %, що свідчить про прецизійність та точність розроблених методик.

Паралельно визначали ступінь вивільнення силденафілу та варденафілу із проб біологічного матеріалу, на рівні концентрацій, що відповідали нижній і верхній межі визначень методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС (табл. 5).

**Результати визначення ступеня вивільнення силденафілу та варденафілу із плазми крові, 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

Межі виявлення та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС, виділених із біологічного матеріалу, наведено у табл. 6.

**Межі виявлення та кількісного визначення силденафілу та варденафілу, виділених із біологічного матеріалу, методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС**

Препарат	Біологічна матриця	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	9,0
	Печінка, 5 г	10,5	6,0	11,0	6,6
	Сеча, 5 мл	7,0	4,0	7,6	4,6

Стабільність силденафілу та варденафілу визначали у зразках плазми та сечі при різних умовах зберігання.

Отримані результати показують, що силденафіл і варденафіл в пробах плазми та сечі є стабільними при кімнатній температурі протягом 6 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.

Розроблені методики є простими у виконанні, точними та відтворюваними, тому можуть бути використані при хіміко-токсикологічних дослідженнях силденафілу та варденафілу, оскільки дозволяють визначати в біологічних пробах досліджувані сполуки, прийняті в однократній нижчій терапевтичній дозі.

**Розділ 6. Виявлення та визначення силденафілу, варденафілу і їх метаболітів в органах та біологічних рідинах тварин.** При дослідженні ефективності розроблених методик щодо можливості визначення силденафілу і варденафілу в присутності метаболітів в зразках біологічного матеріалу, а також вивчення органів їх локалізації, проведено серію досліджень із використанням щурів, яким вводили досліджувані препарати однократно у терапевтичній та вищій разовій дозі. Паралельно тварини отримували нітрогліцерин. Декапітацію тварин проводили через 3 год та через 24 год після однократного введення досліджуваних препаратів. Виділення їх з внутрішніх органів щурів, сироватки, формених елементів крові та сечі проводили згідно розроблених методик.

Для експрес-скринінгу силденафілу та варденафілу в присутності їх метаболітів у витяжках із біологічного матеріалу використано метод ТШХ. Встановлено, що у підтверджуючих системах розчинників силденафіл і варденафіл виявляються через 3 год у всіх відібраних на дослідження зразках біологічного матеріалу. Проте через 24 год силденафіл ідентифікується цим методом в печінці, шлунку та кишківнику і сечі, а варденафіл – в шлунку, кишківнику та сечі.

При дослідженні зразків методом ГХ/МС у пробах біологічного матеріалу, відібраних через 3 год на хроматограмах виписуються 4 метаболіти силденафілу, а через 24 год – лише 2 метаболіти (рис. 9). Із метаболітів силденафілу ідентифіковано:  $M_1$  – продукт деградації деметилсилденафілу за піперазиновим циклом,  $M_2$  – продукт деградації за піперазиновим циклом деметильованого за піразоловим циклом силденафілу,  $M_3$  – дегідрований продукт розщеплення силденафілу за піперазиновим циклом,  $M_4$  – гідроксильований за піперазиновим циклом силденафіл (рис. 10). Метаболіти силденафілу  $M_2$  та  $M_3$  присутні лише в пробах, отриманих через 3 год після введення препарату.

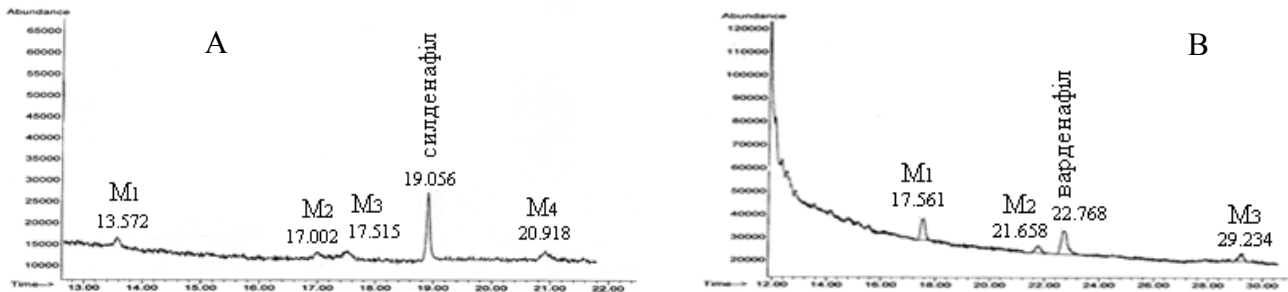


Рис. 9. Хроматограми силденафілу (А) і варденафілу (В) у суміші з метаболітами, виділеними із печінки щурів (метод ГХ/МС)

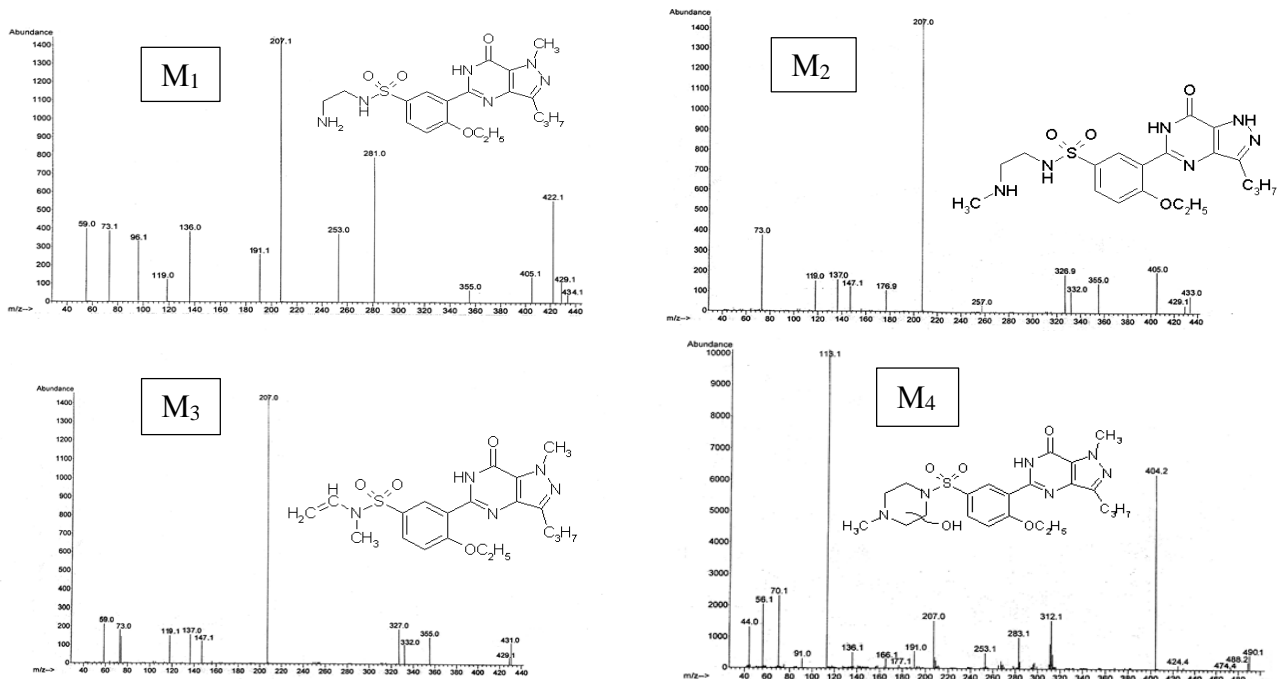


Рис. 10. Мас-спектри метаболітів силденафілу, ідентифіковані методом ГХ/МС



Із метаболітів варденафілу, методом ГХ/МС, ідентифіковано 3 метаболіти (рис. 9):  $M_1$  і  $M_2$  – продукти деградації деетилварденафілу за піперазиновим циклом,  $M_3$  – гідроксильований за піперазиновим циклом варденафіл (присутній лише в пробах отриманих через 24 год після введення препарату). Мас-спектри метаболітів варденафілу наведено на рис. 11.

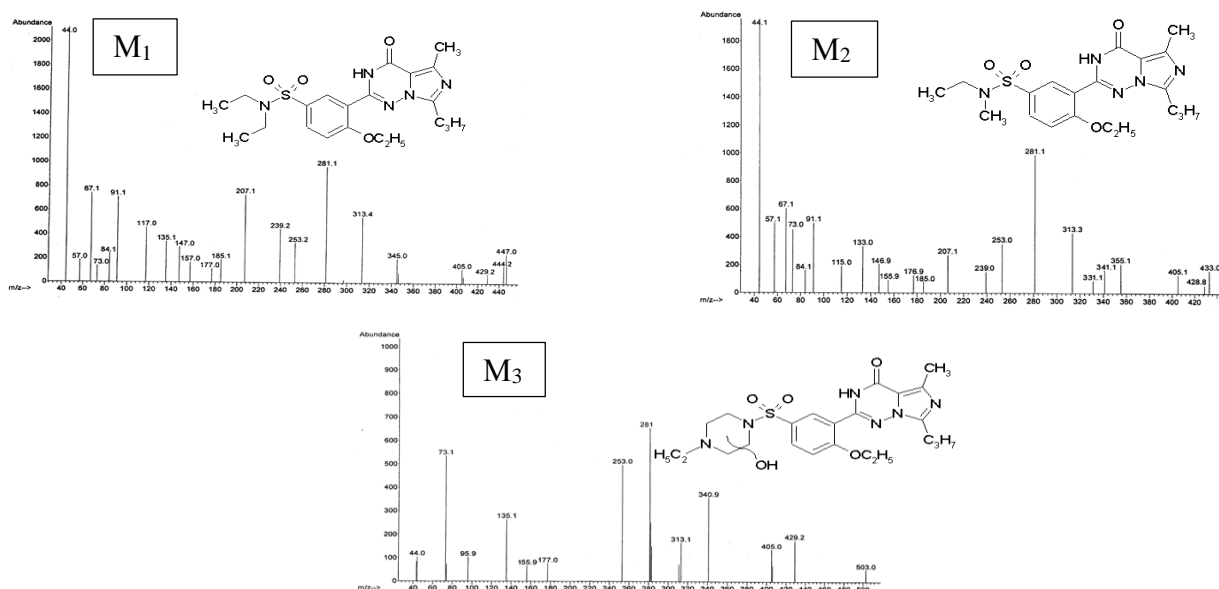


Рис. 11. Мас-спектри метаболітів варденафілу, ідентифіковані методом ГХ/МС

Методом ВЕРХ на колонці Zorbax SB-C18 силденафіл розділяється із 6 метаболітами, а варденафіл із 5 метаболітами (рис. 12).

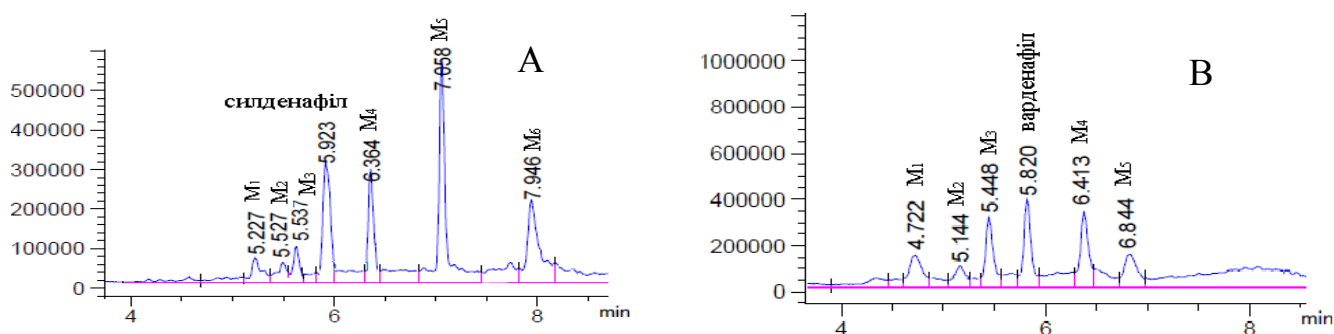


Рис. 12. Хроматограми силденафілу (А) та варденафілу (В) у суміші з метаболітами, виділеними з сечі щурів, через 24 год після введення препаратів (метод ВЕРХ/МС, колонка Zorbax SB-C18)

Шляхом фрагментації мас-спектрів в зразках біологічного матеріалу ідентифіковано наступні метаболіти силденафілу:  $M_1$  – деметилсилденафіл (виявлено в шлунку, кишківнику та сечі в пробах через 24 год після введення препарату);  $M_2$  – продукт деградації деметилсилденафілу за піперазиновим циклом;  $M_3$  – продукт деградації силденафілу за піперазиновим циклом;  $M_4$  – гідроксильований продукт деградації за піперазиновим циклом деметилсилденафілу;  $M_5$  – гідроксильований за піперазиновим циклом силденафіл;  $M_6$  – дегідровані форми гідроксильованого за пропільним радикалом силденафілу (рис.13).

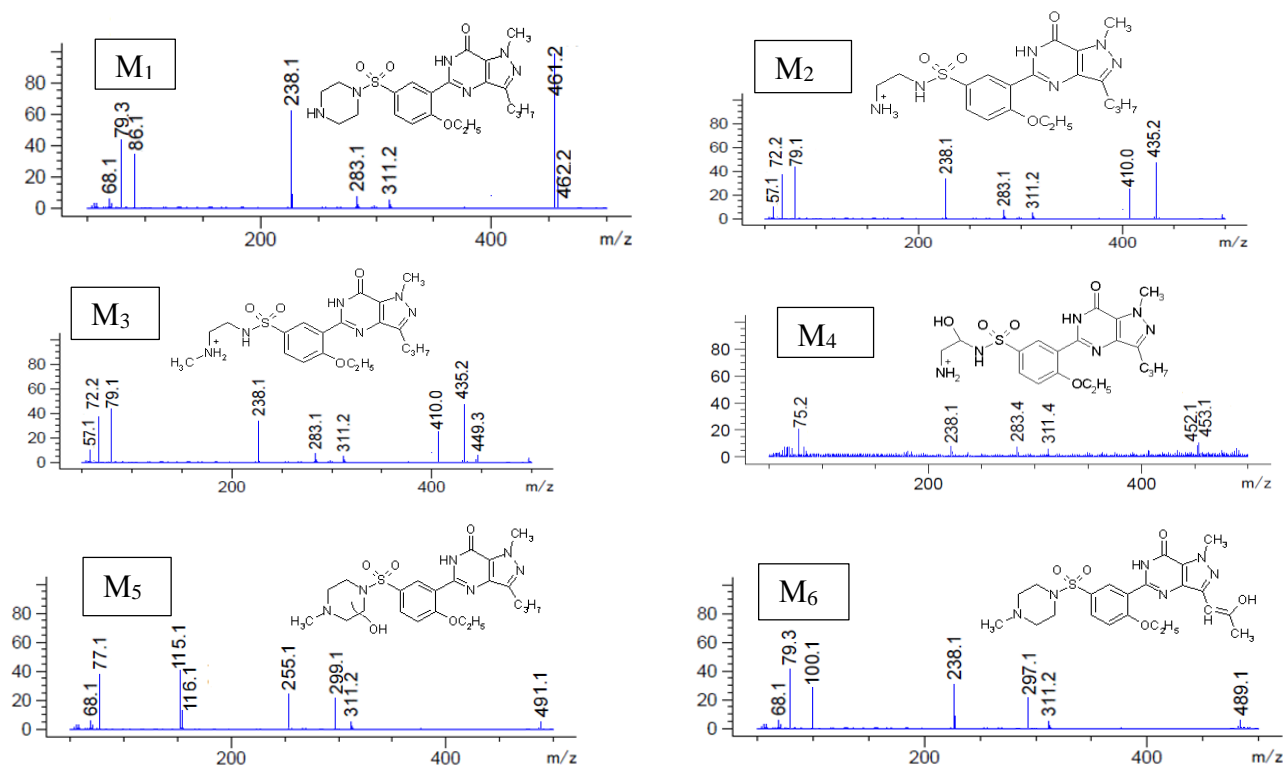


Рис. 13. Мас-спектри метаболітів силденафілу, ідентифіковані методом ВЕРХ/МС (колонка Zorbax SB-C18)

Із метаболітів варденафілу, методом ВЕРХ/МС, ідентифіковано 5 метаболітів: M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub> – гідроксильовані форми продуктів деградації деетилварденафілу за піперазиновим циклом; M<sub>2</sub> – деетилварденафіл; M<sub>3</sub> – деметилварденафіл (рис. 14).

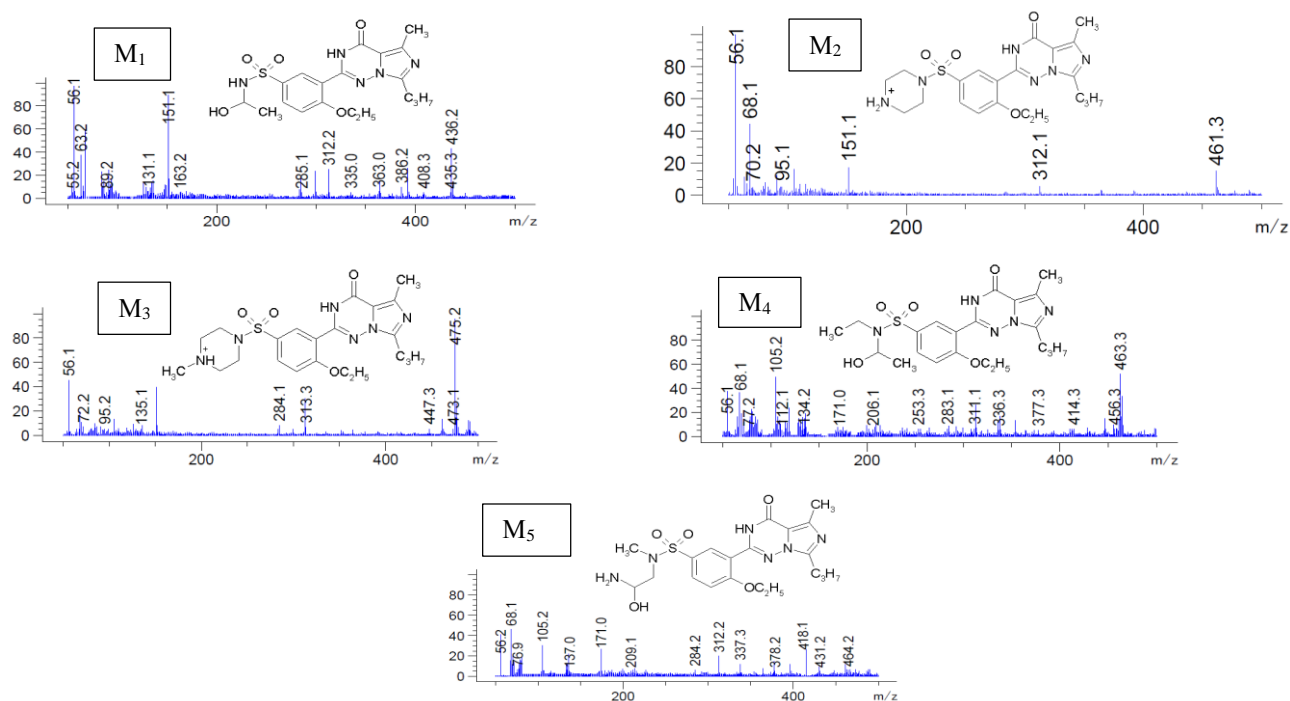


Рис. 14. Мас-спектри метаболітів варденафілу, ідентифіковані методом ВЕРХ/МС (колонка Zorbax SB-C18)

Встановлено, що методом ВЕРХ/МС, в сироватці крові, відібраний на дослідження через 24 год після введення препаратів, виявляються лише силденафіл і метаболіти  $M_1$  та  $M_2$  та варденафіл з метаболітами  $M_2$  та  $M_3$ . В тканині серця і мозку локалізовані лише силденафіл та варденафіл.

Методом УВЕРХ/МС/МС ідентифіковано силденафіл в присутності 5 метаболітів, а методом ВЕРХ/ФЛ (ВЕРХ/УФ) розділено варденафіл у суміші з 10 метаболітами. Типові хроматограми наведено на рис. 15.

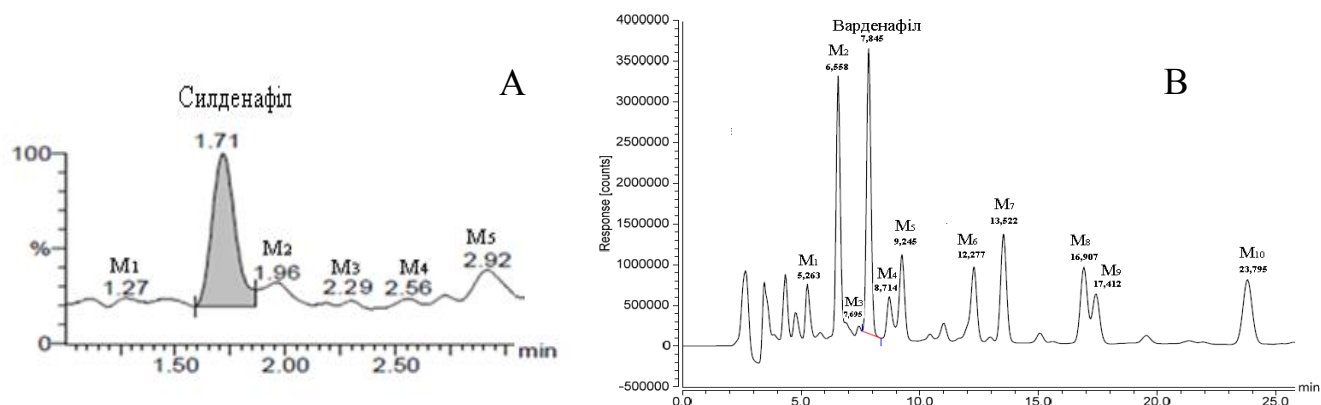


Рис. 15. Хроматограми силденафілу (А), виділеного з крові щурів (УВЕРХ/МС/МС) та варденафілу (В), виділеного з сечі щурів (ВЕРХ/ФЛ) у суміші з їх метаболітами

Із застосуванням методу внутрішньої нормалізації визначено, що через 24 год після введення силденафілу, найвищий вміст метаболітів спостерігається в печінці (до 55 %), сечі (до 50 %), легенях (до 45 %) та кишківнику (до 35 %), а після введення варденафілу, найвищий рівень концентрації метаболітів спостерігається в сечі (до 60 %), печінці (до 45 %) та легенях (до 40 %).

Порівняльну оцінку розподілу силденафілу та варденафілу в органах та біологічних рідинах щурів, при введенні вищої разової дози через 3 год та через 24 год після введення препаратів, наведено на рис. 16 та 17.



Рис. 16. Розподіл силденафілу (%) в органах щурів: А – через 3 год, В – через 24 год після введення препарату



Рис. 17. Розподіл варденафілу (%) в органах щурів: А – через 3 год,  
В – через 24 год після введення препарату

Встановлено, що 81-84 % від введеної дози силденафілу і 74- 78 % варденафілу, міститься в шлунку із кишківником.

У крові, відібраній через 24 год, рівень концентрації силденафілу та варденафілу є нижчим від рівня концентрації, який спостерігається через 3 год після введення.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що для клінічних лабораторних досліджень потрібно відбирати кров (сироватку) протягом перших 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.

## 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-клинотилолітом. 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ 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: 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 determination of vardenafil in rat urine / L. Osypchuk, I. Halkevych, S. Davydovych, Y. Vidnychenko. *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 отруень / 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.).

### Тези доповідей

1. 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.
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. І. Ідентифікація варденафіла методом УФ -спектрофотометрії. *Традиції і інновації фармацевтичної науки і практики: Матеріали Всеросійської научн. - практ. конф. с міжнародним 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 ІХ 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 *Медицина наука та практика XXI століття*, м. Київ, 1–2 лютого 2019 р. Київ: «Київський медичний науковий центр», 2019, С. 107.

### 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.

Дисертаційна робота присвячена розробці схеми хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях.

Для попереднього скринінгу силденафілу та варденафілу у біологічних пробах запропоновано чутливі реакції та склад систем розчинників для їх ідентифікації з метаболітами методом ТШХ. Розроблено умови виявлення та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методами УФ-спектрофотометрії, флуориметрії, ГХ/МС, ВЕРХ/МС, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/ФЛ, УВЕРХ/МС/МС, УВЕРХ/УФ. Вивчено залежність ступеня екстракції силденафілу та варденафілу різними розчинниками від рН середовища, залежність їх сорбції та десорбції Н-клинотиліолітом та картриджами Oasis HLB. Порівняно ефективність ізолювання силденафілу і варденафілу із біологічних тканин загальноприйнятими в токсикологічному аналізі методами та запропоновано ефективну методику їх виділення ацетонітрилом у суміші з 70 % перхлоратною кислотою. Опрацьовано експрес-методику ізолювання силденафілу та варденафілу з крові, плазми та сечі. Проведено валідацію методик кількісного визначення силденафілу і варденафілу в біологічних матрицях методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС. Вивчено розподіл силденафілу, варденафілу та їх ідентифікованих метаболітів в біологічному матеріалі щурів через 3 та через 24 год після введення одночасно з нітрогліцерином.

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

### АННОТАЦИЯ

**Осипчук Л. И.** Химико-токсикологическое исследование силденафила, варденафила и их метаболитов при комбинированных отравлениях. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, МОЗ Украины, Львов, 2020.



Диссертационная работа посвящена разработке схемы химико-токсикологического исследования силденафила, варденафила и их метаболитов при комбинированных отравлениях.

Для предварительного скрининга силденафила и варденафила в биологических пробах предложено чувствительные реакции и состав систем растворителей для их идентификации с метаболитами методом ТСХ. Разработаны условия обнаружения и количественного определения силденафила и варденафила методами УФ-спектрофотометрии, флуориметрии, ГХ/МС, ВЭЖХ/МС, ВЭЖХ/УФ, ВЭЖХ/ФЛ, УВЭЖХ/МС/МС, УВЭЖХ/УФ. Изучена зависимость степени экстракции силденафила и варденафила разными растворителями от рН среды, сорбции и десорбции Н-клинотилолитом и картриджами Oasis HLB. Проведено сравнение эффективности изолирования силденафила и варденафила из биологических тканей общепринятыми в судебной практике методами и предложена оптимальная методика их выделения смесью ацетонитрила с 70 % перхлоратной кислотой. Разработаны экспресс-методики изолирования силденафила и варденафила из крови, плазмы и мочи. Проведено валидацию методик количественного определения силденафила и варденафила в биологических матрицах методами ГХ/МС и ВЭЖХ/МС. Изучено распределение силденафила, варденафила и их идентифицированных метаболитов в биологическом материале крыс через 3 и через 24 часа после введения одновременно с нитроглицерином.

**Ключевые слова:** силденафил, варденафил, метаболиты, ТСХ, УФ-спектрофотометрия, флуориметрия, ГХ/МС, ВЭЖХ/МС, ВЭЖХ/УФ, ВЭЖХ/ФЛ, УВЭЖХ/МС/МС и УВЭЖХ/УФ, печень, кровь, моча.

## SUMMARY

**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 dissertation is devoted to the development of the scheme of chemical and toxicological study of sildenafil, vardenafil and their metabolites in combined poisoning. For the preliminary screening of sildenafil and vardenafil in biological samples, sensitive chromogenic reactions have been proposed, as well as the composition of solvent systems for their identification with metabolites by TLC.

Conditions for the detection and quantification of sildenafil and vardenafil were developed using the methods of UV spectrophotometry, fluorimetry, GC/MS, HPLC with mass-selective, UV and fluorescence detection, UPLC/MS/MS, and UPLC/UV. 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 were established. The dependence of the fluorescence intensity of sildenafil and vardenafil on the nature of the solvent (acetonitrile, isopropanol, 96 % ethanol and bidistilled water) 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 dependence of the degree of extraction of sildenafil and vardenafil on the pH and nature of organic solvents was studied. 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. The conditions of sildenafil and vardenafil purification from impurities of biological nature by SPE on Oasis HLB cartridges were developed; the dependence of sorption and desorption of sildenafil and vardenafil on the pH by H-clinoptilolite was studied. A comparative evaluation of sildenafil and vardenafil isolation by conventional methods of toxicological analysis was made. The optimal method of sildenafil and vardenafil and their metabolites isolation from biological material with a mixture of acetonitrile and 70 % perchloric acid (1:1) was developed. Express methods of isolation of sildenafil and vardenafil from blood, plasma and urine have been worked out.

Validation of the methods for the quantitative determination of sildenafil and vardenafil in plasma, urine, and liver tissue by GC/MS and HPLC/MS was performed. The criteriums 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. A validated technique can be used for chemical and toxicological analysis of sildenafil and vardenafil.

The distribution of sildenafil, vardenafil and their metabolites in the organs and biological fluids of animals (rats) after 3 and 24 hours administration was studied. 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 three 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, fluorimetry, GC/MS, HPLC/UV, HPLC/MS, HPLC/FL, UPLC-MS/MS, UPLC/UV, liver, blood, urine.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ВЕРХ/МС –	високоєфективна рідинна хроматографія мас-спектрометрія;
ВЕРХ/УФ –	високоєфективна рідинна хроматографія з ультрафіолетовим детектором;
ВЕРХ/ФЛ –	високоєфективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектором;
ГХ/МС –	газова хроматографія мас-спектрометрія;
ДФУ –	Державна фармакопея України;
ТФЕ –	твердофазна екстракція;
ТШХ –	тонкошарова хроматографія;
УВЕРХ/МС/МС–	ультрависокоєфективна рідинна хроматографія мас-спектрометрія/мас-спектрометрія;
УВЕРХ/УФ	ультрависокоєфективна рідинна хроматографія з ультрафіолетовим детектором;
ФДЕ-5–	фосфодіестераза 5-го типу;
УФ –	ультрафіолетовий (спектр);
Ч –	чутливість.

Підписано до друку: 09. 11.20 р.  
Формат 60x84/16. Папір офсетний.  
Друк на різнографі. Зам. № 09/11-1  
Умов. друк. арк. 0,9  
Наклад 100 прим.

Видавництво "Галич-Прес"  
Видавець ФОП Король І.В.  
м. Львів, вул Гнатюка, 17  
Ел. Пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. 096-59-88-924  
Свідоцтво ДК №5353 від 24.05.2017 р.