

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-12-43-49
© Коллектив авторов, 2021

С. В. Горяинов*, В. А. Излев, С. В. Орлова, Е. А. Никитина, А. В. Шеремета,
В. Г. Васильев, Г. А. Калабин

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА НЕЗАДЕКЛАРИРОВАННЫХ ИНГИБИТОРОВ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ-5, КАК ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ, В СОСТАВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК К ПИЩЕ (ОБЗОР)

ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов", Россия, 117198, Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 6.
* e-mail: goryainovs@list.ru

В обзоре рассмотрены физико-химические методы выявления фармацевтически активных субстанций, в частности ингибиторов фосфодиэстеразы-5 (ФДЭ-5), в биологически активных добавках к пище. Показана необходимость использования наиболее информативных подходов для выявления зарегистрированных в качестве лекарственных средств ингибиторов ФДЭ-5, а также их структурно модифицированных аналогов с неустановленной безопасностью и эффективностью в составе БАД к пище.

Ключевые слова: идентификация; количественный анализ; ингибиторы ФДЭ-5; биологически активные добавки к пище; фальсификация.

В связи с тем, что в ряде случаев синтетические фармацевтические субстанции незаконно включают в состав биологически активных добавок (БАД), необходимы эффективные методы обнаружения синтетических субстанций, в частности, ингибиторов фосфодиэстеразы-5 (ФДЭ-5), в различных пищевых объектах, где их быть не должно.

Целью настоящей статьи является обзор и анализ существующих методов идентификации и количественного определения незадекларированных синтетических ингибиторов ФДЭ-5 в составе биологически активных добавок к пище.

В настоящее время используются различные методы для качественной оценки содержания незадекларированных ингибиторов ФДЭ-5 в составе БАД. В зависимости от оснащённости лаборатории и целей исследования могут быть использованы хроматографические, иммуноферментные методы, биотестирование, метод спектроскопии ионной подвижности, различные варианты колебательной спектроскопии или рентгеновская дифрактометрия, а также различные варианты масс-спектрометрии и спектроскопия ЯМР.

Спектрометрия ионной подвижности (СИП) — метод, предназначенный для разделения и идентификации химических веществ. Основан на различиях подвижности веществ в буферном газе-носителе. Подвижность ионов зависит от размера, формы и заряда молекулярного иона. Вследствие высокой скорости, чувствительности, селективности и низкой стоимости СИП был предложен как скрининг-метод для выявле-

ния примесей ингибиторов ФДЭ-5 и их аналогов [1, 2]. Для 8 ингибиторов ФДЭ-5 были установлены коэффициенты подвижности ионов (от 0,8257 до 1,2876 см²/(В · с)) и на основе полученных данных были проанализированы 26 добавок (15 образцов показали положительный результат на содержание ингибиторов ФДЭ-5). При сравнении результатов с данными, полученными при анализе тех же образцов методом хроматомасс-спектрометрии, было установлено, что результаты СИП и ВЭЖХ-МС полностью коррелируют [2]. Это открывает широкие возможности для применения СИП в качестве экспресс-метода оценки качества БАД. Следует отметить, что метод СИП не позволяет дифференцировать структурно схожие вещества, например, гомосилденафил и метилизосилденафил, однако дает однозначный ответ о наличии ингибиторов ФДЭ-5 в образце [1].

Различные варианты колебательной спектроскопии, такие как ИК-спектроскопия (инфракрасная спектроскопия), БИК-спектроскопия (спектроскопия в ближней инфракрасной области), ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием (FTIR), рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния) или их комбинации используются как скрининг-методы для выявления подделок зарегистрированных лекарственных средств (ЛС) — ингибиторов ФДЭ-5 [3]. Установление подлинности лекарственных средств также чрезвычайно актуально, поскольку, по данным Pfizer, 77 % образцов ЛС "Виагра", продаваемого через ин-

тернет, оказываются подделкой, содержащей менее 50 % от заявленного количества силденафила [4, 5].

БИК-спектроскопия обеспечивает более высокую вероятность определения и более простую пробоподготовку (по сравнению с ИК-спектроскопией). При использовании этого метода со статистической обработкой данных становится возможным создавать “отпечатки пальцев”, которые помогают дифференцировать подлинные и поддельные лекарственные средства, содержащие ингибиторы ФДЭ-5 [6]. На основании различий рамановских спектров вспомогательных веществ с помощью метода анализа главных компонент (РСА) проводилось определение оригинальных и поддельных форм ЛС “Виагра” [7].

Метод НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения) ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием был использован для выявления пропоксифенилаилденафила и пропоксифенилтиоаилденафила [8]. Преимуществом метода НПВО является то, что обычно не требуется проводить экстракцию образцов (производится лишь удаление воды), после чего растительные БАД или пищевые продукты могут быть проанализированы.

Методы колебательной спектроскопии играют важную роль в обнаружении ингибиторов ФДЭ-5 в составе оболочек капсул БАД. В 2012 г. в Нидерландах была разработана методика рамановской спектроскопии с визуализацией, которая позволила определять наличие тадалафила в содержимом и в растворенном виде в составе желатиновой матрицы капсулы [9]. Позднее был предложен способ выявления тадалафила с помощью НПВО ИК-спектроскопии [10].

В настоящее время также активно разрабатываются иммуноферментные методы быстрой оценки наличия примесей в БАД [11 – 13]. Для одновременного определения небольших, аналогичных по структуре молекул очень удобен непрямой иммуноферментный анализ (indirect ELISA) [11], основанный на использовании моноклональных антител, специфичных для общих структур определенных классов молекул. Было создано групповое специфическое моноклональное антитело для скрининга варденафила и двух его аналогов, пипериденафила и десульфоваарденафила. Достоинствами метода являются быстрота и чувствительность (предел обнаружения — 0,08 мг/г варденафила в растительных БАД). Его специфичность была подтверждена параллельными измерениями методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Антитело проявляло минимальную перекрестную реактивность с силденафилом и тадалафилом [11]. Также был разработан метод иммуноферментного анализа для быстрого определения силденафила в функциональных продуктах: для поликлонального антитела была характерна высокая специфичность и чувствительность, что позволяло обнаруживать до $0,60 \pm 0,02$ нг/мл силденафила [12]. В работе [13] сообщается о создании антител, специфичных для структуры тадалафила и его аналогов. Скрининг 60 образцов БАД к пище показал наличие ингибиторов ФДЭ-5 в 5 из них на уровне 10 – 20 мг/г,

правильность подтверждали анализом всей выборки проб методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС. Благодаря невысокой стоимости анализа, такие методы могут успешно применяться в дальнейшем для скрининга БАД на наличие синтетических примесей ингибиторов ФДЭ-5.

После разработки специальных наборов (PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay и др.) стало возможным проведение биотестирования, основанного на изменении активности фосфодиэстеразы (при наличии ингибиторов ФДЭ-5 в образце люминесценция раствора снижается) [14]. Если степень снижения соответствует или превосходит таковую стандартного раствора, содержащего силденафил, образец нуждается в дальнейшем исследовании [15]. Вместе с тем, при наличии в составе натуральных растительных ингибиторов ФДЭ-5 потенциально возможно получение ложноположительного результата.

Для выявления поддельных и контрафактных продуктов лицензированных ингибиторов ФДЭ-5, зарегистрированных в качестве лекарственных средств, применяли метод рентгеновской дифракционной спектроскопии (РДС) [16, 17]. РДС показала себя быстрым и надежным методом для выявления фальсификатов ЛС “Виагра” на основании определения активного вещества и наполнителей [16]. С помощью подхода, объединившего рентгенофлуоресцентную спектроскопию и методы статистической обработки данных, были установлены характерные неорганические “отпечатки пальцев” для 41 коммерческого образца, содержащего силденафила цитрат или тадалафил, а также для 56 их фальсификатов [17].

Метод масс-спектрометрии (МС), как правило, используется в сочетании с различными методами разделения сложных смесей (ГХ, ВЭЖХ, ВЭТСХ и др.). С помощью этого метода устанавливают молекулярную массу вещества и строение его молекул, определяют его элементный состав. Как аналитический метод МС обладает исключительно высокой чувствительностью и позволяет обнаруживать следовые количества ингибиторов ФДЭ-5 в сложных многокомпонентных матрицах, таких как БАД к пище. Метод основан на ионизации молекул, разделении ионов в газовой фазе, которое происходит в зависимости от соотношения массы и заряда и регистрации разделенных ионов. В процессе ионизации образуются молекулярные, псевдомолекулярные и кластерные ионы в зависимости от используемого метода ионизации. Фрагментные (осколочные, или дочерние) ионы — ионы, которые образуются при распаде молекулярных, псевдомолекулярных и кластерных ионов. Необходимо помнить, что интерпретация масс-спектров основывается целиком на эмпирическом подходе, т.е. на правилах и закономерностях фрагментации, выявленных при масс-спектрометрическом исследовании различных классов органических соединений. В зависимости от используемого метода ионизации приемы интерпретации данных существенно различаются.

Благодаря наличию различных видов масс-спектрометрических детекторов (квадрупольный, тройной

квадрупольный, типа “линейная ловушка”, времяпролетный и орбитальная ионная ловушка (Орбитрэп) и т.д.), а также появлению новых методов ионизации возможности МС постоянно расширяются.

Зарегистрированные с помощью “мягких” методов ионизации масс-спектры обычно либо не содержат, либо содержат незначительное число фрагментных ионов. С одной стороны, это существенно упрощает определение основной характеристики органического соединения — молекулярной массы (а при использовании масс-спектрометрии высокого разрешения и брутто-формулы), а с другой — практически не позволяет устанавливать структуру соединения. Дополнительную информацию о структуре можно получить из тандемных масс-спектров. Тандемный масс-спектрометр — масс-спектрометр, имеющий в своем составе несколько масс-анализаторов. При этом необходимо различать тандемную масс-спектрометрию в пространстве и тандемную масс-спектрометрию во времени. В первом случае такой масс-спектрометр физически обладает несколькими масс-анализаторами. К таким приборам относятся масс-спектрометры с тройным квадрупольным масс-анализатором (триплквэд, QQQ) и гибридные масс-спектрометры (например, масс-спектрометры, сочетающие квадрупольный и времяпролетный масс-анализаторы, Q-TOF). Тандемная масс-спектрометрия во времени подразумевает, что один и тот же масс-анализатор в различные промежутки времени может использоваться в различном качестве. К таким приборам можно отнести масс-спектрометры с различными типами ионных ловушек.

Изучение дочерних ионов позволяет существенно упростить идентификацию соединения, в настоящий момент существуют масс-спектральные базы данных, содержащие такие тандемные масс-спектры. Однако тандемные масс-спектры могут существенно варьироваться в зависимости от экспериментальных условий и типов применяемого оборудования. Выявление характеристичных дочерних ионов для неизвестных аналогов и уже изученных ингибиторов ФДЭ-5 позволяет с высокой долей вероятности предположить наличие определенных схожих фрагментов в их структуре.

Активно разрабатываются и вводятся в практику использования экспрессные масс-спектрометрические методы, предусматривающие ионизацию образца при атмосферном давлении, как, например, твердотельный анализ при атмосферном давлении (atmospheric solid analysis probe, ASAP) [3] или масс-спектрометрия DART [18], которые предоставляют возможность прямого анализа образцов без предварительной пробоподготовки. Эти методы удобно использовать для проведения скрининга, т.е. быстрого выявления синтетических ингибиторов ФДЭ-5 в сложной, как правило, многокомпонентной матрице БАД. В работе [19] менее чем за 20 мин были проанализированы 13 образцов БАД и лекарственных средств на наличие силденафила, тадалафила и варденафила. Однако эти методы не подходят для количественного определения анализируемых веществ и обнаружения примесей, со-

держащихся в следовых количествах [3]. В Фармакопее США метод масс-спектрометрии DART предложен для экспресс-определения незадекларированных ингибиторов ФДЭ-5 в составе БАД [15].

Для количественного анализа БАД на содержание ингибиторов ФДЭ-5 чаще всего применяется сочетание масс-спектрометрии с различными хроматографическими методами разделения.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) — простой и дешевый метод, применяемый для предварительной идентификации известных ингибиторов ФДЭ-5, для которых доступны стандартные образцы [20, 21]. Вместе с тем, сравнительно невысокая чувствительность ТСХ ограничивает возможности этого метода. В работе [21] предложена методика ТСХ для одновременного определения 8 ингибиторов ФДЭ-5, в том числе 3 наиболее распространенных (тадалафил, варденафил, силденафил), а также хонгденафила, гомосилденафила, гидроксигомосилденафила, псевдоварденафила и аминотадалафила.

Так как ингибиторы ФДЭ-5 содержат азот, соответствующие им зоны на ТСХ-пластине могут быть обнаружены путем обработки проявляющими реагентами, такими как реактив Драгендорфа [22, 23]. Для повышения чувствительности скрининга была разработана методика высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) ингибиторов ФДЭ-5 [24, 25]. При использовании ВЭТСХ эффективность разделения увеличивается как вследствие увеличения площади раздела подвижной и неподвижной фаз за счет уменьшения диаметра частиц сорбента, так и благодаря большей однородности размеров этих частиц, снижаются пределы обнаружения и количественного определения анализируемых веществ в 10 – 100 раз, а также появляется возможность оценки полуколичественного содержания ингибиторов ФДЭ-5 путем денситометрического анализа пятен [24, 25]. В целом, ТСХ и ВЭТСХ могут быть использованы для выявления известных ингибиторов ФДЭ-5 при обязательном наличии стандартных образцов определяемых соединений, однако эти методы неприменимы в случае идентификации новых аналогов, для которых не существует стандартных образцов. В Фармакопее США предлагается использовать ВЭТСХ в сочетании с видимым, УФ- и МС-детекторами [15].

Препаративная ТСХ используется как вспомогательный метод для выделения и очистки аналогов ингибиторов ФДЭ-5 с неустановленной структурой, которые затем исследуются комплексом всех имеющихся в наличии методов анализа при обязательном использовании различных комбинаций масс-спектрометрии высокого разрешения (в том числе тандемной) и спектроскопии ЯМР на различных ядрах [22, 26, 27].

Газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХ-МС), несмотря на более низкую по сравнению с ВЭЖХ-МС стоимость, редко используется для идентификации и количественного анализа ингибиторов ФДЭ-5 в БАД, что связано с низкой термолабильностью целевых соединений и сложностью получения пригодных для

анализа производных с помощью стандартных силилирующих реагентов [28]. Предложены методики обнаружения 3 ингибиторов ФДЭ-5 (силденафил, тадалафил и варденафил), а также ряда производных силденафила [29 – 31]. Проведенное исследование 26 растительных БАД к пище в Румынии показало наличие незадекларированных ингибиторов ФДЭ-5 в 23 % образцов [32]. Метод ГХ-МС предоставляет полезную информацию для установления структуры неизвестных ингибиторов ФДЭ-5 и может быть использован для подтверждения результатов идентификации наряду с ВЭЖХ-МС. ГХ-МС использовали для определения структуры пиперидинафила [33], норацетилденафила [34], метизосилденафила [35], десульфоварденафила [36] и тиометилизосилденафила [37].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с различными детекторами (диодно-матричным, рефрактометрическим, флуоресцентным, масс-спектрометрическим и др.) может использоваться как для качественного, так и для количественного анализа фальсификатов БАД, содержащих незадекларированные синтетические ингибиторы ФДЭ-5. Как правило, для разделения ингибиторов ФДЭ-5 применяют хроматографические колонки с обращено-фазовым сорбентом – октадецилсиликагелем (C18), в качестве мобильной фазы — смесь ацетонитрила и воды (предпочтительно с добавлением допантов, таких как муравьиная кислота, формиат аммония, ацетат аммония и т.д.) [38]. Успешное обнаружение ингибиторов ФДЭ-5 во многом зависит от правильной пробоподготовки. При выборе растворителя для экстракции необходимо учитывать, что тадалафил плохо растворим в воде и большинстве органических растворителей, за исключением хлороформа, в котором он растворим умеренно [3, 15].

К настоящему времени создана и постоянно пополняется библиотека УФ-спектров изученных ингибиторов ФДЭ-5. В Фармакопее США предлагается использовать колонку Zorbax SB-C18 (L1, 2,1 мм × 150 мм, 5 мкм) и смесь муравьиной кислоты в воде и муравьиной кислоты в ацетонитриле в качестве подвижной фазы, расход элюента — 0,2 мл/мин, аналитическая длина волны — 290 нм. При этих условиях определяются 64 ингибитора ФДЭ-5 [15]. Для их идентификации используются УФ-спектры, времена удерживания и относительные времена удерживания, совпадающие с таковыми для референтных ингибиторов ФДЭ-5. Набор этих дескрипторов позволяет идентифицировать соединения, например, структурно похожие ингибиторы, такие как гидроксиацетилденафил и ацетилденафил, имеют схожие УФ-спектры, но разное время удерживания [3]. Применение ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) позволяет значительно сократить время, необходимое для анализа: выявление 3 лекарственных ингибиторов и 5 аналогов ФДЭ-5 занимает менее 4,5 мин [39]. Вместе с тем, более высокая стоимость УВЭЖХ ограничивает возможность ее широкого применения. ВЭЖХ с УФ-детектированием способна эффективно обнару-

живать и проводить идентификацию лишь известных ингибиторов ФДЭ-5, однако в выявлении новых аналогов играет лишь вспомогательную роль.

Сочетание ВЭЖХ-МС является одним из ключевых методов для обнаружения известных и вновь созданных ингибиторов ФДЭ-5. Получило распространение использование в работе сочетания ВЭЖХ-УФ-МС [40]. Пределы обнаружения ингибиторов по разным методикам варьируется от 0,02 нг до 1,4 мг/г в зависимости от пробоподготовки, сложности матрицы и приборных возможностей [38]. Широко используется метод ионизации электрораспылением [20, 41, 42]. В Фармакопее США предлагается использовать масс-спектрометр типа “ионная ловушка” с ионизацией электрораспылением, подключенный последовательно после спектрофотометрического детектора [15].

Для установления структуры неизвестных аналогов применяются такие варианты масс-спектрометрии, как ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ с LTQ Orbitrap XL FTMS, ВЭЖХ с масс-анализатором ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦР) и др. [3, 26, 38, 41 – 45]. Активно используются различные режимы работы масс-спектрометров: регистрация выбранных ионов (selected ion monitoring, SIM), сканирование ионов-предшественников, сканирование ионов-продуктов, регистрация выбранных реакций (selected reaction monitoring, SRM) или мониторинг множественных реакций (multiple reactions monitoring, MRM) [44, 46].

Для идентификации лекарственных ингибиторов ФДЭ-5 силденафила, варденафила и их нелегализованных аналогов гомосилденафила, ацетилденафила и гидроксигомосилденафила в капсулах и в премиксах был использован метод ВЭЖХ-УФ-МС/МС в режиме MRM [44]. Структура двух аналогов тадалафила (2-гидроксипропилнортадалафил и *n*-бутилнортадалафил), обнаруженных при рутинном скрининге БАД, была установлена с помощью совокупности методов ВЭЖХ-МС/МС и спектроскопии ЯМР [47]. Во время рутинного скрининга образцов методом ВЭЖХ-УФ был обнаружен ингибитор ФДЭ-5, УФ-спектр которого был практически идентичен тадалафилу, однако последующий анализ с помощью ВЭЖХ-Q-TOF (МС/МС) и спектроскопии ЯМР позволил провести идентификацию нового аналога, получившего название транс-биспрегомотадалафил [48]. Структура ингибиторов ФДЭ-5 (пипериденафила, аилденафила и норацетилденафила) была установлена с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения [33, 34]. Масс-спектрометр типа “Орбитрэп” применяли для однозначной идентификации и отнесения структуры изомерным аналогам силденафила и тиосилденафила по точным массам фрагментных ионов [41]. С помощью масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР) была проведена однозначная идентификация силденафила, гидроксиацетилденафила и пиперидиноацетилденафила, имеющих схожие дочерние ионы в их tandemных масс-спектрах [49]. Высокая разрешающая способ-

ность и точность измерения массы делает масс-спектрометры с анализаторами “Орбитрэп” и ИЦР одними из наиболее перспективных методов установления элементного состава и точной молекулярной массы новых ингибиторов ФДЭ-5.

Для получения максимальной информации о структуре новых ингибиторов ФДЭ-5 разработана система информационно-зависимого сканирования (IDA, information dependent acquisition) [50]. IDA — система искусственного интеллекта, в которой два и более режима сканирования могут быть использованы последовательно. Сначала производится обзорное сканирование (мониторинг множественных реакций или сканирование ионов-предшественников) для создания “информации” на основе заданных критериев отбора ионов, а затем на основе информации, полученной при обзорном сканировании, проводится второе сканирование — ионов-продуктов. Вместе с идентификацией известных компонентов использование IDA позволяет сделать прогноз о структуре неизвестных аналогов. Такой масс-спектрометрический подход успешно опробован на 22 ингибиторах ФДЭ-5 [50]. Подход, сочетающий одновременную регистрацию молекулярных ионов с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения и тандемных спектров, а также использование созданной авторами библиотеки ингибиторов ФДЭ-5 предложены в работе [51].

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (спектроскопия ЯМР) является одним из наиболее эффективных методов для идентификации известных ингибиторов ФДЭ-5 и незаменима для обнаружения новых аналогов и определения их структуры. Этот метод обладает двумя достоинствами, недоступными никакому другому химическому или физическому методу анализа. Первое — каждый атом молекулы обеспечивает появление в спектре отдельного сигнала. Второе — площадь этого сигнала линейно связана с содержанием соответствующей компоненты в веществе, т.е. прямо пропорциональна числу ядер, ответственных за этот сигнал. Поэтому количественные измерения в ЯМР осуществляются прямым измерением площадей отдельных сигналов вещества или сравнением с площадями сигнала растворителя либо количественно введенной добавки. Метод количественной спектроскопии ЯМР официально признан первичным методом количественных измерений и рекомендован для широкого использования в этих целях.

В силу различных причин, в основном, из-за высокой стоимости оборудования, а также существенных затрат в обслуживании спектрометров ЯМР со сверхпроводящими магнитами этот метод используется реже, нежели хроматографические, масс-спектральные или иные методы. Для проведения анализа необходимо большее количество образца вследствие меньшей чувствительности оборудования [3]. Однако благодаря разработке новых методик регистрации спектров и обработки полученных данных, а также существенного улучшения характеристик спектрометров ЯМР (в частности, за счет использования криодат-

чиков) чувствительность метода возросла в последние годы на порядок.

Совместно с хроматомасс-спектрометрией спектроскопия ЯМР применяется для определения структуры обнаруженных веществ, схожих по хроматографическим характеристикам с известными ингибиторами ФДЭ-5 [45, 47, 52, 53]. Для идентификации и установления структуры аналогов ингибиторов ФДЭ-5 используются спектроскопия ЯМР ^1H и ^{13}C , одномерная спектроскопия 1D (DEPT, NOE), а также комплекс экспериментов с применением метода двумерной корреляционной спектроскопии ЯМР (COSY, NOESY, HMQC, HMBC и др.).

Отдельно следует упомянуть про использование диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР (diffusion ordered spectroscopy, DOSY). Спектры DOSY сортируют молекулы по их диффузии в растворе, поэтому индивидуальные компоненты в сложной смеси, обладающие различными коэффициентами диффузии, проявляются в спектрах ЯМР DOSY раздельно [54, 55]. Компоненты с высокой молекулярной массой имеют при этом более низкие коэффициенты диффузии. Таким образом, происходит некое “виртуальное фракционирование” образца. Двумерную протонную спектроскопию ЯМР DOSY предлагается использовать для представления фармацевтических препаратов и БАД к пище в качестве “отпечатков пальцев”. Такие “отпечатки пальцев” будут содержать информацию как об активных ингредиентах, так и о вспомогательных веществах и примесях, что делает DOSY методом, позволяющим анализировать лекарственные средства и БАД как единого целого [54, 55]. Помимо установления структуры веществ, спектроскопия ЯМР может быть использована для количественного определения содержания ингибиторов ФДЭ-5 без использования стандартных образцов определяемых соединений при условии установления их молекулярной массы. С помощью 2D- и 3D-DOSY ^1H ЯМР были проанализированы 17 растительных БАД, в 8 были обнаружены синтетические ингибиторы ФДЭ-5 [56]. Проведенный анализ 150 образцов БАД к пище показал наличие ингибиторов ФДЭ-5 в 61 % образцов и иных незадекларированных ЛС в 5,5 % случаев, причем в некоторых образцах было найдено до 4 различных ингибиторов ФДЭ-5 [57]. В Фармакопее США предлагается методика выявления лекарственных ингибиторов ФДЭ-5 в составе БАД с помощью спектроскопии ЯМР ^1H с использованием стандартных образцов силденафила цитрата, тадалафила и варденафила гидрохлорида [15].

Заключение

В связи с высоким потребительским спросом, относительно дешевой и простотой производства подделка лекарственных средств — ингибиторов ФДЭ-5 и продажа незадекларированных ингибиторов ФДЭ-5 под видом БАД к пище или функциональных продуктов питания стала широко распространенной в мире

проблемой. Для ее решения в большинстве стран Европы, Америки и Азии разработано множество различных методик идентификации ингибиторов ФДЭ-5 в сложных матрицах с использованием комплекса физико-химических методов (СИП, колебательная, рентгеновская и ЯМР-спектроскопия, иммунологический анализ, биотестирование, хроматография в сочетании с масс-спектрометрией или спектрофотометрией). Существующие методы позволяют проводить как качественное, так и количественное определение ингибиторов ФДЭ-5, а также тех их аналогов, для которых отсутствуют стандартные образцы. Идеальный подход к выявлению и количественному определению содержания ингибиторов ФДЭ-5 должен быть специфичным, чувствительным, воспроизводимым и недорогим, а также обеспечивать быстрое определение различных ингибиторов ФДЭ-5 и их аналогов с минимальной пробоподготовкой. Это предопределяет выбор стратегии для решения данной проблемы и использование тех или иных методов физико-химического анализа, в первую очередь, в зависимости от оснащенности аналитической лаборатории. Высокая стоимость и зачастую отсутствие стандартных образцов для многих аналогов ингибиторов ФДЭ-5 является серьезной преградой на пути решения проблемы. В настоящее время предпринимаются попытки создания международных баз данных, включающих химическую структуру и различные дескрипторы ингибиторов ФДЭ-5. Наиболее информативный подход к решению проблемы — использование совокупности методов масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР. Их возможность предоставлять ортогональную и комплементарную информацию и характеризовать образцы как на молекулярном, так и фрагментном уровне позволяет не только проводить идентификацию и устанавливать структуру новых аналогов ингибиторов ФДЭ-5, но и оценивать их количественное содержание в образцах при отсутствии стандартных образцов.

Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

ЛИТЕРАТУРА

- D. J. Mans, R. J. Callahan, J. D. Dunn, C. M. Gryniewicz-Ruzicka, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **75**, 153 – 157 (2012).
- C. M. Gryniewicz, J. C. Reepmeyer, J. F. Kauffman, L. F. Buhse, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**(3), 601 – 606 (2009).
- D. N. Patel, L. Li, C. L. Kee, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **87**, 176 – 190 (2014).
- URL: <http://www.covance.com/content/dam/covance/assetLibrary/articles/PDE5%20Inhibitors%20Jan%20Feb%202015.pdf>. Stakeholder Consensus. SMPRs approved for high-priority dietary supplements: phosphodiesterase type 5 inhibitors.
- P. H. J. Keizers, A. Wiegard, B. J. Venhuis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **131**, 133 – 139 (2016).
- F. Deconinck, P. Y. Sacré, D. Coomans, J. De Beer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **57**, 68 – 75 (2012).
- M. de Veij, A. Deneckere, P. Vandenabeele, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**, 303 – 309 (2008).
- C. L. Kee, X. Ge, H. L. Koh, M. Y. Low, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **70**, 265 – 272 (2012).
- B. J. Venhuis, J. Tan, M. J. Vredendregt, et al., *Forensic Sci. Int.*, **214**, e20 – e22 (2012).
- A. Lanzarotta, J. B. Crowe, M. Witkowski, B. M. Gamble, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **67** – 68, 22 – 27 (2012).
- J. B. Guo, Y. Xu, Z. B. Huang, et al., *Anal. Chim. Acta.*, **658**, 197 – 203 (2010).
- Y. Song, Y. Y. Wang, Y. Zhang, S. Wang, *Food Agric. Immunol.*, **23**, 338 – 351 (2012).
- J. B. Guo, W. P. Liu, H. L. Chen, et al., *Food Agric. Immunol.*, **28**(4), 652 – 667 (2017).
- URL: <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/PDE-Glo%20Phosphodiesterase%20Assay%20Protocol.pdf>.
- URL: <http://www.usppf.com/pf/Bzhelyansky> A. USP proposed General Chapter — Adulteration of Dietary Supplements with Drugs and Drug Analogs. General Chapter in United States Pharmacopeial Forum., **41**(3) (2015).
- J. K. Maurin, F. Pluciński, A. P. Mazurek, Z. Fijałek, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1514 – 1518 (2007).
- R. S. Ortiz, K. C. Mariotti, N. V. Schwab, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **58**, 7 – 11 (2012).
- E. C. Чернецова, Г. Е. Морлок, И. А. Ревельский, *Успехи химии*, **80**(3), 249 – 271 (2011).
- M. Twohig, S. J. Skilton, G. Fujimoto, et al., *Drug Test Anal.*, **2**, 45 – 50 (2010).
- S. Singh, B. Prasad, A. A. Savaliya, et al., *Trends Anal. Chem.*, **28**, 13 – 28 (2009).
- Y. Cai, T. G. Cai, Y. Shi, et al., *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.*, **33**, 1287 – 1306 (2010).
- T. Moriyasu, S. Shigeoka, K. Kishimoto, et al., *Yakugaku Zasshi*, **121**, 765 – 769 (2001).
- E. Mikami, T. Ohno, H. Matsumoto, *Forensic Sci Int.*, **130**, 140 – 146 (2002).
- E. Abourashed, M. S. Abdel-Kader, A. A. M. Habib, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, **18**, 372 – 376 (2005).
- T. S. Reddy, A. S. Reddy, P. S. Devi, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, **19**, 427 – 431 (2006).
- T. Hasegawa, M. Saijo, T. Ishii, et al., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **49**, 311 – 315 (2008).
- R. Martino, C. Menendez, S. Balayssac, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **135**, 31 – 49 (2017).
- K. Saisho, K. S. Scott, S. Morimoto, Y. Nakahara, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1384 – 1388 (2001).
- C. N. Man, N. M. Nor, R. Lajis, G. L. Harn, *J. Chromatogr. A*, **1216**(47), 8426 – 8430 (2009).
- S. U. Mokhtar, S. T. Chin, C. L. Kee, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **121**, 188 – 196 (2016).
- Y. Jeong, S. I. Suh, J. Y. Kim, et al., *Chromatographia*, **79**, 1671 – 1678 (2016).
- A. M. Popescu, G. L. Radu, T. Onisei, et al., *Romanian Biotechn. Lett.*, **19**(4), 9485 – 9492 (2014).
- J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, *J. Chromatogr. A*, **1125**, 67 – 75 (2006).
- J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 887 – 893 (2007).
- J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, D. A. d'Avignon, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1615 – 1621 (2007).
- Y. H. Lam, W. T. Poon, C. K. Lai, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**, 804 – 807 (2008).
- J. C. Reepmeyer, D. A. d'Avignon, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 145 – 150 (2009).
- Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material. Fourth edition. Pharmaceutical Press, 2609 (2011).
- P. Y. Sacré, E. Deconinck, P. Chiap, et al., *J. Chromatogr. A*, **1218**, 6439 – 6447 (2011).
- B. J. Venhuis, G. Zomer, M. Hamzink, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**, 735 – 741 (2011).
- C. L. Kee, X. Ge, M. Y. Low, *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **32**, 1737 – 1748 (2015).

42. S. Lee, D. Ji, M. Park, K. H. Chung, *Forensic Sci. Int.*, **257**, 182 – 188 (2015).
43. C. Bortolini, A. Pivato, S. Bogialli, P. Pastore, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**(20), 6207 – 6216 (2015).
44. P. Zou, S. S. Oh, P. Hou, et al., *J. Chromatogr. A*, **1104**, 113 – 122 (2006).
45. B. Guo, M. Wang, Y. Liu, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **63**(31), 6954 – 6967 (2015).
46. J. Sun, L. Cao, Y. Feng, L. Tan, *Se Pu*, **32**(11), 1187 – 1196(2014).
47. V. M. Toomey, J. J. Litzau, C. L. Flurer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **59**, 50 – 57 (2012).
48. J. H. Lee, H. J. Kim, S. Mandava, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **115**, 352 – 358 (2015).
49. S. R. Gratz, B. M. Gamble, R. A. Flurer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 2317 – 2327 (2006).
50. H. M. Lee, B. J. Lee, *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **28**, 396 – 407 (2011).
51. L. Vaclavik, J. R. Schmitz, J. F. Halbardier, K. Mastovska, *J. AOAC Int.*, **1**, 55 – 72 (2016).
52. N. Schramek, U. Wollein, W. Eisenreich, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **96**, 45 – 53 (2014).
53. G. Zhang, Y. Yu, X. Wu, J. Li, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **94**, 210 – 214 (2014).
54. S. Trefi, C. Routaboul, S. Hamieh, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 103 – 113 (2008).
55. S. Trefi, V. Gilard, S. Balayssac, et al., *Magn. Reson. Chem.*, **47**, S163 – S173 (2009).
56. S. Balayssac, S. Trefi, V. Gilard, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **50**, 602 – 612 (2009).
57. V. Gilard, S. Balayssac, A. Tinaugus, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **102**, 476 – 493 (2015).

Поступила 23.09.21

MODERN METHODS FOR IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF UNDECLARED PHOSPHODIESTERASE-5 INHIBITORS AS PHARMACEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN DIETARY SUPPLEMENTS (A REVIEW)

S. V. Goryainov^{1*}, V. A. Ivlev¹, S. V. Orlova¹, E. A. Nikitina¹, A. V. Sheremeta¹, V. G. Vasil'ev¹, and G. A. Kalabin¹

¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia

* e-mail: goryainovs@list.ru

This review is devoted to consideration of physicochemical methods for detection of pharmaceutically active substances, in particular, phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors present in dietary supplements. The necessity of using most informative approaches for the identification of PDE-5 inhibitors registered as drugs as well as their structurally modified analogs with unknown safety and efficacy characteristics in the composition of dietary supplements is emphasized.

Keywords: identification; quantitative analysis; PDE-5 inhibitors; dietary supplements; adulteration.