

10. Pro zatverdzhennja chetvertogo vipusku Derzhavnogo formuljara likars'kih zasobiv ta zabezpechennja jogo dostupnosti

(2012). Ministerstvo ohoroni zdorov'ja Ukraini, 209. Available at: http://moz.gov.ua/ua/portal/dn_20120328_209.html

*Рекомендовано до публікації д-р мед. наук, професор Германюк Т. А.
Дата надходження рукопису 28.10.2016.*

Макаренко Ольга Володимирівна, доктор медичних наук, професор, кафедра соціальної медицини, організації та управління охороною здоров'я, ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України", вул. Дзержинського, 9, м. Дніпро, Україна, 49044
E-mail: olgamakarenko977@gmail.com

Кривов'яз Олена Вікторівна, кандидат фармацевтичних наук, доцент, завідувач кафедри, кафедра фармації, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018
E-mail: SK16124@rambler.ru

УДК 543.544+543.51

DOI: 10.15587/2519-4852.2016.87257

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СИЛДЕНАФИЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ (LC-MS/MS)

© И. Э. Кузнецов, Е. А. Науменко, Н. К. Резниченко, А. Ю. Костюк, Р. П. Савяк, Д. С. Олейников

Цель. Для изучения фармакокинетики спреевой формы силденафила (спрей оральный дозированный «Тегрум»), разработанной ООО «НПФ «Микрохим» (г. Рубежное, Украина) с целью улучшения фармакокинетических характеристик существующих твердых форм для орального применения был разработан и валидирован быстрый, простой и специфический метод количественного определения концентрации силденафила в плазме человека с применением внутреннего стандарта, меченного 8 атомами дейтерия – силденафила-d8.

Методы. Силденафил извлекался из плазмы прямой жидкость-жидкостной экстракцией и определялся в надосадочной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Разделение компонентов проводилось на хроматографической колонке Kinetex 2.6i C18, 50×4.6 мм, 2.6 мкм фирмы Phenomenex при 45 °С с изократическим режимом элюирования подвижной фазы, состоящей из 2 мМ водного раствора аммония ацетата (рН 5,45±0,05) и ацетонитрила (10/90, об./об.) при скорости элюирования 0,4 мл/мин. Ионизацию силденафила и силденафила-d8 проводили электрораспылением в положительном режиме (ESI, Positive). Для детектирования был использован мониторинг мультиреакций (MRM) выбранных материнских и дочерних ионов в следующих настройках масс-спектрометра: m/z 475,20/283,20 и 483,20/283,20 для силденафила и силденафила-d8 соответственно.

Результаты. Описанный выше метод был валидирован в линейном диапазоне 10,00–400,00 нг/мл с коэффициентом корреляции (r²) 0,99764 и показал надёжную правильность и воспроизводимость результатов.

Выводы. Разработанный экспресс-метод прямой жидкость - жидкостной экстракции из плазмы крови с одновременным осаждением белков, исключаяющий этапы упаривания и восстановления сухого остатка позволил достичь необходимую чувствительность метода и сократить время анализа. Использование дейтерированного внутреннего стандарта (силденафила-d8) позволило снизить предел количественного определения, достичь высокой чувствительности и специфичности, а также подавления матричного эффекта при достаточно высокой скорости определения, что позволяет использовать данную методику для рутинного определения количественного содержания силденафила в плазме крови при проведении фармакокинетических исследований.

Ключевые слова: силденафил, силденафил-d8, спрей, фармакокинетика, плазма крови, количественное определение, ВЭЖХ-МС/МС, выбор внутреннего стандарта, эффект матрицы, валидация аналитического метода

Purpose. For the study of pharmacokinetics of sildenafil oral spray “Tegrum”, developed by pharmaceutical company “Microkhim” (Rubezhnoe, Ukraine) with the aim to improve the pharmacokinetic characteristics of existing solid formulations for oral use it was worked out and validated a rapid, simple and specific method of quantitative determination of sildenafil concentration in human plasma using internal standard labeled with 8 deuterium atoms – sildenafil-d8.

Methods. Sildenafil was extracted from plasma by the liquid-liquid extraction, and quantitatively determined in supernatant by means of a high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method (HPLC-MS/MS). Separation of components was performed using the chromatographic column Kinetex 2.6u C18, 50×4.6 mm, 2.6 μm (Phenomenex) at 45 °C at isocratic elution mode and mobile phase, that consisted of 2 mM aqueous ammonium acetate solution (pH 5,45 ± 0,05) and acetonitrile (10/90, vol./vol.); flow rate equaled to 0.4 ml/min. Ionization of sildenafil and sildenafil-d8 was performed in the positive electrospray mode (ESI, Positive). Multi reactions monitoring (MRM) mode was used for selected daughter and parent ions detection with the following settings of the mass spectrometer: m/z 475,20/283,20 and 483.20/283.20 for sildenafil and sildenafil-d8 respectively.

Results. The method described above was validated in the linear range 10,00–400,00 ng/mL of sildenafil with a correlation coefficient (r^2) 0,99764 and demonstrated reliable accuracy and reproducibility of results.

Conclusions. Utilization of elaborated method of fast direct liquid – liquid sildenafil extraction from the blood plasma with simultaneous proteins precipitation, avoiding commonly used supernatant evaporation and subsequent restoration of dry residue at preanalytical stage allowed to achieve target sensitivity of determination and reduced the analysis runtime. Usage of the deuterated internal standard (sildenafil-d8) at analytical stage gave an opportunity to reduce the limit of quantification, to achieve high sensitivity and specificity, as well as suppress matrix effect. Rather high analytical characteristics of the method proposed allow its application in routine bioanalysis during pharmacokinetic studies.

Keywords: sildenafil, sildenafil-d8, oral spray, pharmacokinetics, blood plasma, quantification, HPLC-MS/MS, internal standard selection, matrix effect, analytical method validation

1. Введение

Силденафил – 1-(3-(6,7-дигидро-1-метил-7-оксо-3-пропил-1H-пироло[4,3-α] пиримидин-5-ил)-4-этоксифенил) сульфонил) пиперазина цитрат – селективный ингибитор цГМФ-зависимой фосфодиэстеразы 5-го типа, экспрессируемой, главным образом, в пещеристом теле полового члена, который применяется для лечения пациентов с эректильной дисфункцией [1]. Фармакокинетика таблетированных форм силденафила достаточно хорошо изучена: после приема внутрь силденафил быстро всасывается, биодоступность в среднем составляет 40 %. После однократного приема силденафила в дозе 100 мг средняя C_{max} свободного силденафила в плазме крови мужчин достигается в среднем в течение 60 мин. и составляет около 18 нг/мл (38 нМ), средний объем распределения – 105 л, степень связывания с белками плазмы крови составляет 96 % и не зависит от концентрации препарата. Силденафил метаболизируется, главным образом, в печени под действием СYP3A4 (основной путь) и СYP2C9 (минорный путь); около 80 % пероральной дозы выводится в виде метаболитов через кишечник и порядка 13 % – почками; $T_{1/2}$ в среднем составляет около 4 ч [2–4].

2. Постановка проблемы в общем виде, актуальность темы и ее связь с важными научными или практическими вопросами

Вопрос разработки современной методики количественного определения силденафила в плазме крови возник в связи с необходимостью изучения фармакокинетики спреевой формы силденафила (спрей оральный дозированный «Тегрум»), разработанной ООО «НПФ «Микрохим» (г. Рубежное, Украина) с целью улучшения фармакокинетических характеристик существующих твердых форм для орального

применения, которые связаны с низкой водной растворимостью силденафила цитрата, а также с целью повышения его биодоступности за счет частичной оромукозной абсорбции, позволяющей снизить долю действующего вещества, подвергающегося пресистемной элиминации в печени при первом прохождении.

3. Анализ последних исследований и публикаций, в которых начато решение данной проблемы и на которые опираются авторы

Опубликован ряд статей с описанием количественного определения силденафила в различных биологических субстратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым [2–4, 7] и электрохимическим [8] детектированием, а также методом газовой хроматографии [9]. К основным недостаткам этих методов следует отнести низкую чувствительность и недостаточную специфичность. Некоторого улучшения этих характеристик можно достичь путем многостадийной экстракции органическими растворителями с дальнейшим концентрированием экстракта (жидкость-жидкостная экстракция, ЖЖЭ), а также с помощью сорбционного концентрирования (твердофазная экстракция, ТЭ). Основными недостатками ЖЖЭ являются трудоемкость, времязатратность, большое количество манипуляций с образцом и, соответственно, более низкая воспроизводимость результатов; ТЭ – трудоемкость и относительная дороговизна [7].

Альтернативой является высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) – технология, революционизировавшая не только фармакокинетические исследования, но и ставшая золотым стандартом современной биоаналитики ввиду высокой селективности

и чувствительности, а также возможности количественного определения целевых соединений, присутствующих в малых объемах многокомпонентных смесей биополимеров (таких, как плазма крови) в нано- и пиколярных концентрациях [7].

При использовании ВЭЖХ-МС/МС помимо процедуры пробоподготовки и выбранных условий хроматографического разделения компонентов, критическим фактором, влияющим на чувствительность, правильность и воспроизводимость метода, является дрейф чувствительности масс-детектора. С целью нивелирования влияния погрешности прибора на результаты количественного определения аналита в пробу вводят внутренний стандарт (вещество с исчезающе малой вероятностью нахождения в пробе, близкое по свойствам к аналиту и сходным временем удерживания), что позволяет увеличить правильность и воспроизводимость методики. Правильный выбор внутреннего стандарта имеет ключевое значение при использовании ВЭЖХ-МС/МС методов. Внутренний стандарт должен иметь близкие к аналиту молекулярную массу, физико-химические и хроматографические свойства. Перечисленные условия идеально выполняются, если в качестве внутренних стандартов используются дейтерированные или меченые изотопами других элементов соединения.

В литературе имеется всего несколько публикаций [10–14], посвященных количественному определению силденафила в биологических жидкостях с использованием ВЭЖХ-МС/МС методов и применением различных видов внутренних стандартов. Так, в работах [10, 11] при определении силденафила в качестве внутренних стандартов использовали тадалафил и омепразол соответственно. Детектирование аналита проводилось на ВЭЖХ-МС/МС системе Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, Massachusetts), оснащенной Waters-Micromass Quattro Micro тандемным масс-спектрометром [8] и 2795 Alliance HPLC system, оснащенной Micromass ZQ-2000 (Waters, Milford, MA, USA) с источником ионизации ESI и квадрупольным масс-детектором [9]. Для проведения анализа в обоих случаях использовали 500 мкл плазмы. С целью повышения чувствительности методов в этих исследованиях применялась ЖЖЭ органическим растворителем с последующим упариванием экстракта в токе инертного газа и растворением сухого остатка. Объем проб, в которых определяли содержание силденафила, составлял 5 и 25 мкл раствора восстановленного остатка; линейный участок зависимости отклик прибора – концентрация силденафила в плазме находился в интервале 1–1000 нг/мл и 0,5–2000 нг/мл соответственно [10, 11].

В работе Zayed R. с соавт. описана методика количественного определения силденафила в плазме крови с применением тандемной LC-MS/MS системы, включавшей жидкостный хроматограф Shimadzu Prominence (Shimadzu, Япония) и масс-спектрометр API-3200 (MDS Sciex, США), где в качестве внутреннего стандарта использовался торасемид. Извлечение силденафила из 1,0 мл плазмы проводили прямой жидкость-жидкостной экстракцией 1,0 мл ацетонитрила, содержащего торасемид, без дальнейшего

концентрирования экстракта. Для количественного анализа 20 мкл надосадочной жидкости направлялось на хромато-масс-спектрометрическую детекцию [12].

4. Выделение не решенных ранее частей общей проблемы, которой посвящена статья

Наибольший интерес у нас вызвали работы, в которых использовали метод ВЭЖХ-МС/МС количественного определения силденафила с применением дейтерированной формы внутреннего стандарта, поскольку изотопно-меченый аналог аналита зачастую является лучшим внутренним стандартом ввиду пренебрежимо малых химических различий, обусловленных изотопным замещением, и совпадающей с аналитом способностью к образованию водородных связей с неподвижной фазой, т. е. фактически не оказывающий влияния на результаты выделения и обработки пробы [13, 14]. Такой подход не может быть использован в классической хроматографии с универсальными детекторами, так как определяемое вещество и внутренний стандарт трудно разделить хроматографически. Этот вариант возможен только с масс-селективным детектированием, когда неразделенные пики детектируются по их характеристическим ионам масс-спектра [5].

В качестве прототипа был использован метод ВЭЖХ-МС/МС определения силденафила, описанный в работе [13], который был модифицирован сотрудниками биоаналитической лаборатории ООО «КДЦ «Фармбиотест». Модификация состояла в том, что применялся экспресс-метод ЖЖЭ силденафила из плазмы крови с одновременным осаждением белков и последующим анализом 5 мкл надосадочной жидкости с помощью ВЭЖХ-МС/МС системы в составе модульного хроматографа Shimadzu (Shimadzu, Япония) и масс-спектрометра API-3000 (AB Sciex, США), оснащенного тройным квадрупольным масс-детектором. Для количественного определения концентрации силденафила применялся внутренний стандарт, меченый 8-ю атомами дейтерия – силденафил-d8. Химические структуры силденафила и силденафила-d8 представлены на рис. 1. Для проведения анализа использовали 150 мкл плазмы.

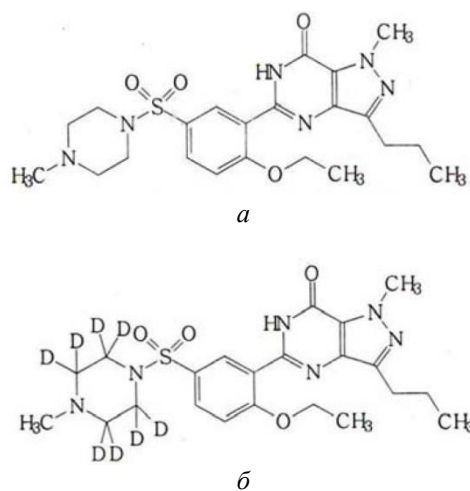


Рис. 1. Химическая структура: а – силденафила; б – силденафила-d8

5. Формулирование целей (задач) статьи

Цель исследования состояла в разработке и валидации методики количественного определения силденафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием в качестве внутреннего стандарта дейтерированного производного силденафила. Разработка и валидация данной методики была проведена в рамках изучения фармакокинетики препарата «Тегрум», спрей оральный дозированный во флаконах по 10 мл (12,5 мг/доза) производства ООО «НПФ «Микрохим» с участием здоровых добровольцев (I фаза, код исследования: SilS/PhI-PK) и предшествовала проведению клинического этапа исследования.

6. Изложение основного материала исследования (методов и объектов) с обоснованием полученных результатов

Экспериментальная часть количественного определения концентрации силденафила в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

6. 1. Реактивы

Стандарты:

1. Силденафила цитрат – фармакопейный стандартный образец ДФУ (рег. № CAS 171599-83-0, каталожный номер ФСО ДФУ S0371; аттестованное содержание силденафила цитрата 98,4 %).

2. Силденафил-d8 – силденафил, меченый стабильным изотопом водорода – дейтерием (рег. № CAS 951385-68-5; химическая чистота ≥ 98 %, изотопная чистота ≥ 98 atom % D; C/D/N Isotopes, Канада).

Растворители, реактивы, биологическая матрица:

Ацетонитрил (HPLC grade; «Merck», Германия); метанол (HPLC grade; «Merck», Германия); аммония ацетат (for analysis, ≥ 98,5 %; «Merck», Германия); кислота уксусная (х.ч., Украина).

Вода деионизованная, полученная с использованием установки обратного осмоса («Ardona Crystal B Bio», Латвия); бланковая плазма крови человека (содержащая K₂EDTA в качестве антикоагулянта).

6. 2. Инструментальный анализ

Использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф «Shimadzu Prominence» в составе: два насоса – LC-20AD_{XR}, автосамплер – SIL-20AC, термостат – CTO-20. В качестве детектора использовали масс-селективный детектор API-3000 (AB Sciex, США) с тройным квадрупольным анализатором и системой обработки данных.

Аналитическая колонка – Kinetex 2.6u C18, 50×4.6 mm, 2.6 μm фирмы Phenomenex – США, предколонка Security Guard Cartridges, C18, 4×3 mm фирмы Phenomenex – США. Подвижная фаза содержала 90 % элюента А (ацетонитрил) и 10 % элюента В (2 mM раствор аммония ацетата в воде, pH=5,45±±0,05). Элюирование проводилось в изократическом режиме при скорости потока подвижной фазы 0,4 мл/мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл. Температура разделения компонентов 45 °С. Продолжительность хроматографирования – 2,3 минуты. Время удерживания аналита (силденафила) и внутреннего стандарта (силденафила-d8) – 1,65 мин.

Для детектирования использовали мониторинг выбранных материнских и дочерних ионов в следующих настройках масс-спектрометра: первый квадруполь был настроен на пропускание материнского (молекулярного) иона с фиксированным значением m/z для силденафила и силденафила-d8; второй квадруполь был заполнен инертным газом (азотом), в котором происходила ударная диссоциация материнских ионов, в результате чего образовывались дочерние ионы; третий квадруполь фильтровал образованные дочерние ионы с фиксированным значением для силденафила и силденафила-d8.

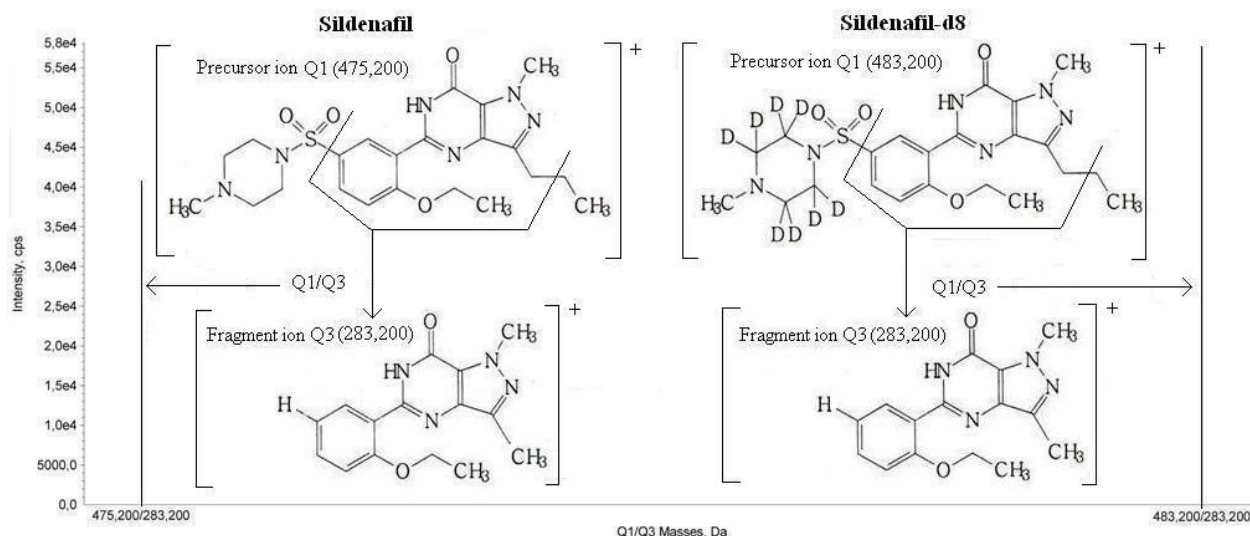


Рис. 2. Спектральный переход Q1/Q3 для силденафила и силденафила-d8

Выбранные дочерний и материнский ионы для

аналита и внутреннего стандарта обусловлены их

максимальной интенсивностью на соответствующих квадрупольных масс-спектрометра при исследовании раствора, содержащего стандартные образцы силденафила и силденафила-d8. Таким образом, как показано на рис. 2, были выбраны дочерние ионы с соотношением m/z для силденафила – 475,200 Да и для силденафила-d8 – 483,200 Да. Для силденафила и силденафила-d8 был выбран один общий дочерний ион – 283,200 Да.

Масс-селективный детектор фиксировал количество прошедших дочерних ионов в режиме мониторинга мультиреакций (MRM). Параметры работы детектора подбирались для достижения максимального сигнала в режиме MRM. Масс-спектрометрию проводили в режиме положительной ионизации электроспрея (ESI) при напряжении 5000 В. Скорость потока газа-распылителя (азота): 8 л/мин., температура интерфейса – 450 °С.

Для контроля оборудования и обработки хроматографических данных использовалось программное обеспечение Analyst 1.5.2 (AB Sciex, США).

6. 3 Приготовление основных и рабочих стандартных растворов

В качестве основного стандартного раствора использовали раствор силденафила цитрата в метаноле с концентрацией силденафила 0,100000 мг/мл. Из данного раствора методом независимых разбавлений готовили рабочие стандартные растворы силденафила в метаноле с концентрациями 100, 400, 800, 1200, 1800, 2400, 3000 и 4000 нг/мл. Полученные рабочие стандартные растворы применяли для приготовления калибровочных стандартов на плазме. Аналогичным образом готовили рабочие стандартные растворы силденафила в метаноле с концентрациями 100, 300, 1720 и 3200 нг/мл, которые использовали для приготовления образцов контроля качества (QC-образцов) на плазме.

Основной стандартный раствор силденафила-d8 в метаноле с концентрацией 0,0900 мг/мл разбавляли в 100 раз для получения рабочего стандартного раствора силденафила-d8 в метаноле с концентрацией 900 нг/мл.

Приготовленные основные и рабочие стандартные растворы силденафила и силденафила-d8 хранили в холодильной камере при температуре от +2 °С до +8 °С. Стабильность стандартных растворов была верифицирована в процессе валидации методики.

6. 4 Приготовление калибровочных стандартов и QC-образцов на плазме

Калибровочные стандарты и QC-образцы готовили на бланковой плазме из рабочих стандартных растворов силденафила с концентрациями 100, 400, 800, 1200, 1800, 2400, 3000, 4000 нг/мл и 100, 300, 1720, 3200 нг/мл соответственно. В ячейки глубоководного микропланшета (1,1 мл) вносили по 135 мкл бланковой плазмы, к которой прибавляли аликвоту 15 мкл соответствующего рабочего стандартного раствора силденафила. После заполнения лунок микропланшет на 1 мин. помещали на встряхиватель для перемешивания содержимого ячеек. Конечная концентрация силденафила в калибровоч-

ных стандартах и QC- образцах на плазме составляла 10, 40, 80, 120, 180, 240, 300, 400 нг/мл и 10, 30, 172, 320 нг/мл соответственно. Далее проводили процедуру экстракции силденафила из плазмы, начиная с прибавления 20 мкл рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта силденафила-d8 (см. ниже).

6. 5 Приготовление биообразцов для анализа

В ячейку глубоководного микропланшета (1,1 мл) помещали аликвоту 150 мкл плазмы крови, прибавляли 20 мкл рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта силденафила-d8 и перемешивали содержимое на встряхивателе в течение 1 мин. К полученному раствору плазмы прибавляли 580 мкл преципитирующего раствора (ацетонитрил/метанол, 75:25, об./об.) и содержимое вновь перемешивали на встряхивателе в течение 1 мин. Глубоководный микропланшет с подготовленными биообразцами помещали в предварительно охлажденную до 10 °С центрифугу (Eppendorf 5804 R) и центрифугировали при 3700 об./мин. (2250G) и температуре 10 °С в течение 15 минут. После центрифугирования глубоководный микропланшет с экстрагированными образцами передавали на этап хроматографирования. Полученный раствор вводили в петлю прибора в объёме 5 мкл. Определение концентрации силденафила проводили методом тандемной ВЭЖХ-масс-спектрометрии (см. раздел Инструментальный анализ). Каждая биопроба при проведении фармакокинетических исследований анализировалась однократно.

7. Результаты и их обсуждение

Как было указано выше, количественный анализ проводили методом внутреннего стандарта. Линейность калибровочной кривой оценивали методом взвешенной линейной регрессии наименьших квадратов, с весовой функцией $1/x^2$, в системе координат «отношение площадей хроматографических пиков силденафил/силденафил-d8 – концентрация». Линейная зависимость находилась в интервале концентраций 10,00–400,00 нг/мл силденафила в плазме крови человека. График описывался линейным уравнением

$$y=a \times x+b,$$

где y – отношение площадей пиков аналита и внутреннего стандарта; a – свободный член линейной зависимости, b – угловой коэффициент линейной зависимости, x – концентрация силденафила в плазме, нг/мл.

Средний коэффициент корреляции (r^2) составил 0,99764, что соответствует удовлетворительной аппроксимации [15].

Валидация метода была выполнена с соблюдением требований руководящих документов OECD/WHO по Надлежащей Лабораторной Практике [16–17], а также Руководств по валидации биоаналитических методик FDA [18], EMA [19] и Министерства здравоохранения Украины [20].

Селективность. Для определения селективности протестировано 6 образцов бланковой плазмы крови (с K_2EDTA) на возможность создания помех

потенциально мешающими веществами (антикоагулянт, эндогенные компоненты матрицы, метаболиты, продукты разложения и т. д.). Проведён анализ плазмы крови (с K₂EDTA), не содержащей силденафил и силденафил-d8, (рис. 3а) и образцов плазмы с

добавлением рабочего стандартного раствора силденафила и силденафила-d8 (рис. 3, б). На хроматограммах образцов бланковой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания силденафила и силденафила-d8.

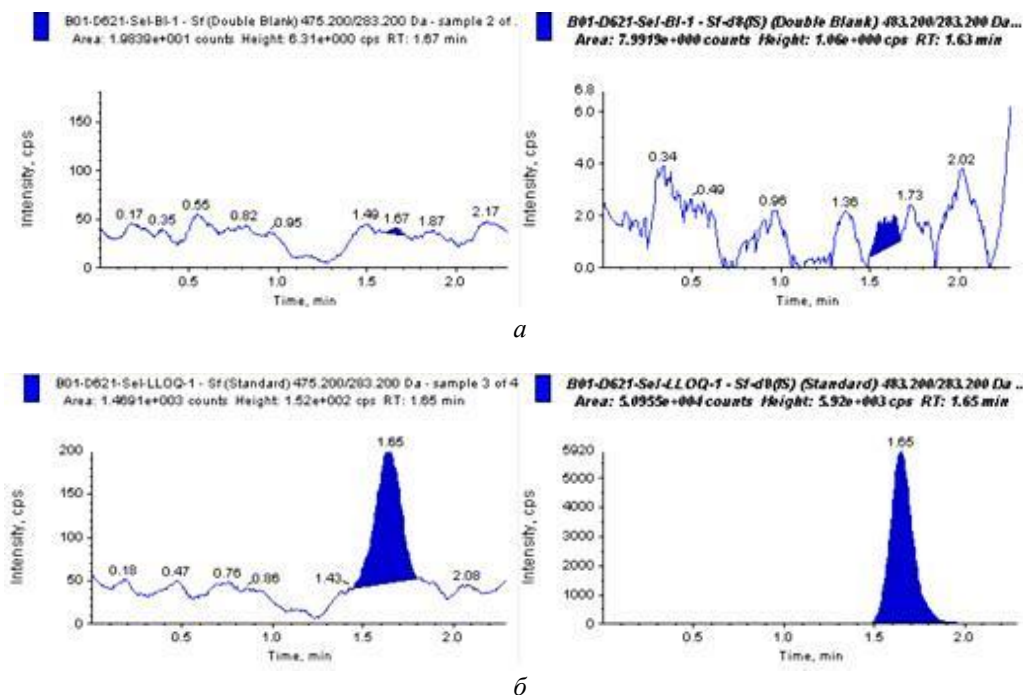


Рис. 3. Типичная хроматограмма плазмы крови, отобранной в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K₂EDTA: а – не содержащей силденафил (Sf) и силденафил-d8 (Sf-d8); б – содержащей силденафил в концентрации 10,00 нг/мл (слева) и силденафил-d8 в концентрации 120,00 нг/мл (справа)

Эффект матрицы. Эффект матрицы – это прямое или косвенное изменение (интерференция) в отклике прибора из-за присутствия других аналитов или веществ в образце. Целью валидации параметра «Эффект матрицы» является определение влияния биологической матрицы (плазмы крови) на эффективность ионизации аналита и внутреннего стандарта. Было исследовано шесть партий бланковой плазмы с K₂EDTA, полученной от шести разных доноров.

Влияние биологической матрицы на эффективность ионизации силденафила и силденафила-d8 определялось путем вычисления отношения площади пика компонента в образце биологической матрицы, к площади пика соответствующего компонента в чистом растворителе. Нормализованный по внутреннему стандарту эффект матрицы (MF_N) определялся для образцов QCL и QCN как отношение матричного эффекта аналита к матричному эффекту внутреннего стандарта. Результаты вычислений нормализованного по внутреннему стандарту эффекта матрицы представлены в табл. 1.

Согласно Руководств [18–20], коэффициент вариации матричного фактора, нормализованного по внутреннему стандарту (MF_N) для 6 партий плазмы, не должен превышать 15,00 %. Как видно из таблицы 1, что коэффициент вариации MF_N оказался более, чем в 3 раза ниже допустимого значения, т.е. полученные результаты соответствуют установленным критериям, что свидетельствует об отсутствии заметного влияния эндогенных компонентов плазмы крови

на эффективность ионизации силденафила и, соответственно, на конечный результат его количественного определения.

Таблица 1

Эффект матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту

Партия бланковой плазмы	Эффект матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, MF _N	
	QCL (30,00 нг/мл)	QCN (320,00 нг/мл)
1	0,95	0,97
2	0,99	0,97
3	1,05	0,99
4	1,06	0,96
5	1,01	0,97
6	1,05	0,97
MF _N ср., (n=6)	1,02	0,97
CV, %, (n=6)	4,23	1,01

Линейность. Линейность калибровочной кривой оценивали по калибровочным стандартам силденафила, внесенным в плазму крови, используя алгоритм вычисления параметров взвешенной линейной регрессии методом наименьших квадратов в системе координат «отношение площадей хроматографических пиков силденафил/силденафил-d8 – концентрация». Калибровочная кривая представлена на рис. 4.

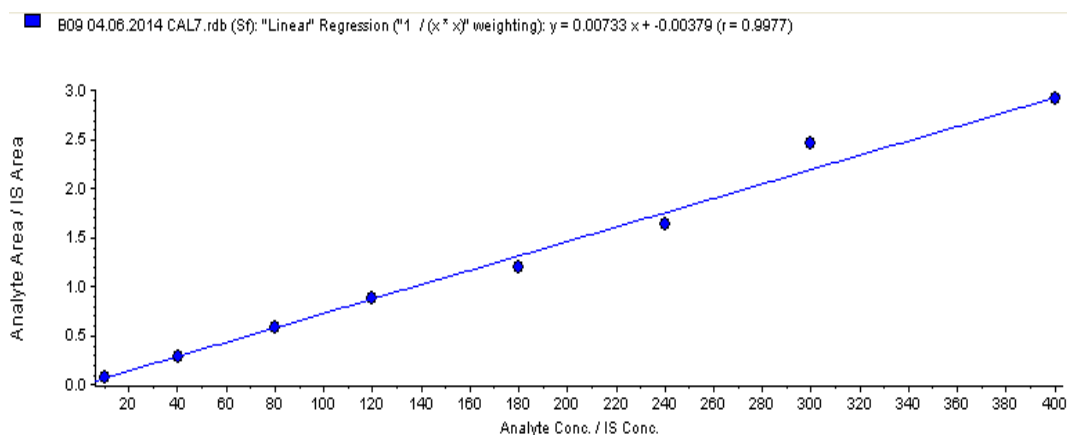


Рис. 4. Калибровочная кривая силденафила в плазме крови

Доказана линейная зависимость между отношением концентраций и площадями хроматографических пиков силденафила и силденафила-d8 в интервале от 10,00 нг/мл до 400,00 нг/мл. Коэффициент корреляции составил в среднем $r^2=0,99764$.

Нижний предел количественного определения. Нижний предел количественного определения – наименьшая концентрация анализируемого вещества, которая может быть обнаружена данным аналитическим методом с необходимой правильностью и прецизионностью. Масс-спектрометрический детектор,

оснащенный тройным квадрупольным анализатором, позволяет достичь необходимого нижнего предела количественного определения силденафила с хорошей воспроизводимостью результатов. Нижний предел количественного определения оценивали по результатам анализа 5 проб, содержащих силденафил, которые были приготовлены на плазме. Валидируемый нижний предел количественного определения составил 10,00 нг/мл. Результаты пятикратного определения силденафила в образцах «НПКО» представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты пятикратного определения аналита в образцах «НПКО»

Номер раствора «НПКО»	Площадь пика аналита	Площадь пика внутреннего стандарта	Отношение площадей пиков, y	Найденная концентрация, нг/мл
1	2981,20	49311,00	0,06046	10,20
2	2560,70	47946,00	0,05341	9,39
3	2622,90	45801,00	0,05727	9,83
4	2542,70	46649,00	0,05451	9,51
5	2290,40	48352,00	0,04737	8,69
Среднее	2599,58	47593,60	0,05462	9,52
SD	–	–	–	0,57
n	–	–	–	5
CV, %	–	–	–	5,94
RE, %	–	–	–	95,25

Правильность и прецизионность. Правильность и прецизионность методики оценивали в ходе анализа одной серии и между 3 сериями для каждого из четырех концентрационных уровней QC-образцов после анализа 5 растворов каждого уровня.

Правильность (RE, %) рассчитывалась, как процент отклонения найденной концентрации от номинального значения по формуле:

$$RE = \frac{C_{back} \times 100}{C_{ном}}$$

где RE – правильность, %; C_{back} – среднее арифметическое значение найденных концентраций силдена-

фила в QC-образцах, нг/мл; $C_{ном}$ – номинальная концентрация силденафила в QC-образцах, нг/мл.

Прецизионность выражалась в виде коэффициента вариации (CV, %) для каждой серии образцов согласно формулы:

$$CV = \frac{SD \times 100}{C_{cp}}$$

где CV – прецизионность определения, %; SD – стандартное отклонение среднего результата, нг/мл; C_{cp} – среднее арифметическое значение найденных концентраций, нг/мл.

Полученные данные межсерийной правильности и прецизионности представлены в табл. 3.

Таблица 3

Межсерийная правильность и прецизионность методики количественного определения силденафила в плазме крови

Номер образца	Уровни концентраций, в пределах диапазона калибровочной кривой			
	LLOQ (10,00 нг/мл)	QCL (30,00 нг/мл)	QCM (172,00 нг/мл)	QCH (320,00 нг/мл)
1-1	11,35	27,86	160,25	285,66
2-1	12,38	28,62	177,25	322,08
3-1	11,41	28,47	183,68	303,38
4-1	11,81	26,15	163,76	302,69
5-1	10,79	27,72	171,04	237,55
1-2	8,38	27,69	202,86	361,45
2-2	8,31	30,19	162,05	404,70
3-2	7,87	25,60	177,22	320,19
4-2	8,04	23,49	168,31	355,14
5-2	8,53	27,08	185,84	334,41
1-3	9,78	25,60	188,88	353,21
2-3	9,00	25,58	185,12	308,07
3-3	8,93	23,96	180,74	338,76
4-3	9,29	27,91	184,29	349,13
5-3	8,01	25,57	197,49	316,68
Среднее значение	9,62	26,77	179,25	326,36
SD	1,53	1,83	12,54	38,50
%, CV	15,86	6,84	6,99	11,80
RE, %	96,16	89,22	104,22	101,99

Примечание: LLOQ – нижний предел количественного определения; QCL – низкий QC (в пределах трехкратного LLOQ); QCM – средний QC (приблизительно 50 % от диапазона калибровочной кривой, QCH – высокий QC (не менее 75 % верхней границы диапазона калибровочной кривой)

Как видно из табл. 3, для образцов «НПКО» средняя концентрация находилась в пределах 20,00 % от номинального значения, для образцов QCL, QCM и QCH – 15,00 % от номинальных значений. Прецизионность, оцениваемая по показателю коэффициента вариации (CV), для LLOQ не превышала 20,00 %, для низких, средних и высоких образцов QC – 15,00 %, что свидетельствует о соответствии правильности и прецизионности метода требованиям регуляторных документов [18–20].

Степень извлечения. Степень извлечения силденафила из плазмы крови человека определялась сравнением площадей пиков проб, экстрагированных образцов, с площадями пиков неэкстрагированных образцов, принимаемых за 100 %. Для анализа использовалось по 5 QC-образцов концентрационных уровней L, M и H. Средняя степень извлечения силденафила из плазмы крови человека составила 101,04 %. Результаты определения степени извлечения силденафила из плазмы крови представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты определения степени извлечения силденафила из плазмы крови

Показатели	Уровни концентраций, в пределах диапазона калибровочной кривой		
	QCL (30,00 нг/мл)	QCM (172,00 нг/мл)	QCH (320,00 нг/мл)
Recovery, %	91,61	105,62	105,87
Среднее, нг/мл	101,04		
SD, нг/мл	8,16		
CV, %	8,08		

Стабильность. Были изучены следующие виды стабильности: пост-препаративная стабильность (стабильность в автосамплере), стабильность при замораживании-оттаивании, краткосрочная стабильность, долгосрочная температурная стабильность, стабильность основных и рабочих стандартных растворов силденафила и силденафила-d8. Изучение стабильности проводилось на модельных биообразцах с концентрациями QCL и QCH.

Пост-препаративная стабильность изучалась на QCL и QCH образцах, которые прошли этап экст-

ракции и затем хранились в автосамплере хроматографа в течение 52 ч при температуре +10 °С. Стабильность при замораживании-оттаивании была проверена после проведения трёх циклов: замораживание при температуре не выше минус 80 °С в течение не менее 12 часов, оттаивание – при комнатной температуре в течение не менее 3 часов. Кратковременная стабильность была изучена при выдерживании образцов в течение 5 часов при комнатной температуре, после чего образцы проходили этап экстракции и анализировались. Долговременную стабильность прове-

ряли после хранения модельных биообразцов в течение 30 суток при температуре не выше минус 80 °С.

Количественное определение концентрации силденафила в хранившихся биообразцах проводили по свежеприготовленным калибровочным стандартам. Стабильность оценивалась как отношение уста-

новленной концентрации хранившихся QC-образцов к установленной концентрации свежеприготовленных QC-образцов.

Результаты определения стабильности силденафила в QCL и QCH образцах представлены в табл. 5.

Таблица 5

Стабильность силденафила в модельных QCL и QCH образцах на плазме

Виды стабильности	Стабильность силденафила в образцах	
	QCL (30,00 нг/мл)	QCH (320,00 нг/мл)
Стабильность в автосамплере, (52 часа, -10 °С)	105,91 %	105,82 %
Стабильность в процессе замораживания/оттаивания, (3 цикла замораживания/оттаивания)	96,28 %	107,78 %
Краткосрочная стабильность, (5 часов, +21,3 °С)	102,83 %	102,65 %
Долгосрочная стабильность, (30 дней, -80 °С)	107,05 %	109,28 %

Как видно из табл. 5, для образцов QCL и QCH средняя концентрация хранившихся QC-образцов находилась в пределах (85,00–115,00) % от средней концентрации свежеприготовленных образцов, что соответствует критериям приемлемости, приведенным в регуляторных документах [16–20].

Стабильность основных и рабочих стандартных растворов силденафила и силденафила-d8 была изучена при хранении в течение 30 суток при температуре от +2 °С до +8 °С. Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Стабильность основных и рабочих стандартных растворов силденафила и силденафила-d8

Стандартный раствор	Концентрация компонента в растворе	Стабильность 30 суток от +2 °С до +8 °С
Основной раствор силденафила	0,100000 мг/мл	100,28 %
Рабочие растворы силденафила	300 нг/мл	106,39 %
	1720 нг/мл	99,42 %
	3200 нг/мл	98,63 %
Основной раствор силденафила-d8	0,0900 мг/мл	99,72 %
Рабочие растворы силденафила-d8	900 нг/мл	104,25 %

Полученные результаты по стабильности аналита и внутреннего стандарта в основных и рабочих стандартных растворах соответствуют установленным в БАЛ ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ» критериям приемлемости (90,00–110,00) %.

8. Выводы

Оценивая валидационные характеристики разработанной методики количественного определения силденафила в плазме крови следует отменить не только полное их соответствие требованиям национальных и международных регламентирующих документов, но и низкую вариабельность ряда ключевых показателей, таких, как эффект матрицы, нижний предел количественного определения, межсерийная правильность и прецизионность, а также степень извлечения аналита из плазмы, которые оказались в 2–3 раза ниже граничных значений. Сравнение разработанной нами биоаналитической методики количественного определения концентрации силденафила в плазме крови с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) и применением дейтерированного внутреннего стандарта (силденафила-d8) с опубликованными данными методик, разработанных в зарубежных лабораториях, свидетельствует о том, что представленная методика обладает

достаточной точностью, воспроизводимостью и простотой выполнения. Применяемый метод прямой жидкость – жидкостной экстракции, исключаящий этапы упаривания и восстановления сухого остатка, позволяет достичь необходимую чувствительность метода и сократить время анализа, что особенно актуально при проведении рутинных исследований. Низкий предел количественного определения, высокая чувствительность и специфичность, а также отсутствие заметного матричного эффекта (плазма крови, содержащая K₂EDTA в качестве антикоагулянта) и достаточно высокая скорость определения позволяет использовать данную методику для рутинного определения количественного содержания силденафила в плазме крови при проведении фармакокинетических исследований. Практическое применение данной методики в ходе изучения фармакокинетики препарата «Тегрум», спрей оральный дозированный во флаконах по 10 мл (12,5 мг/доза) производства ООО НПФ «МИКРОХИМ» подтвердило пригодность данной методики и ее высокие рабочие характеристики.

Литература

1. Горпинченко, И. И. Эректильная дисфункция [Текст] / И. И. Горпинченко, Я. О. Мирошников. – Львов: Медицина мира, 2003. – 88 с.

2. Kanjanawart, S. Bioequivalence and Pharmacokinetic Study of Sildenafil in Healthy Thai Male Volunteers [Text] / S. Kanjanawart, B. Kongyingoes, D. Gaysornsiri, P. Tangsucharit, P. Puapairoj, S. Vannaprasaht, S. Tiamkao et. al. // Srinagarind Medical Journal. – 2008. – Vol. 23, Issue 1. – P. 38–44.
3. Mahmoudian, M. Determination of pharmacokinetic parameters of sildenafil in Iranian volunteers by an HPLC method [Text] / M. Mahmoudian, H. Falahatpishe, L. Taiebi, E. Moghadam, B. Gholamine // Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol. 7, Issue 1. – P. 69–74.
4. Mahmoudian, M. Sildenafil Determination in Various Matrices: A Review [Text] / M. Mahmoudian // Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics. – 2005. – Vol. 4, Issue 2. – P. 72–75.
5. Dilek, I. Selection of Internal Standards for LC-MS/MS Applications [Text] / I. Dilek, J. Cooper, S. Aijaz // Mass Spectrometry Applications to the Clinical Lab (MSACL). – 2015. – Vol. 3. – P. 31–42.
6. Krishnamurthy, B. Quantitation of Sildenafil in Human Plasma by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography [Text] / B. Krishnamurthy, R. Shivaprakasha, G. Amitabha // Pharmacology online. – 2009. – Vol. 2. – P. 64–74.
7. Tripathi, A. S. Development and validation of RP-HPLC method for sildenafil citrate in rat plasma-application to pharmacokinetic studies [Text] / A. S. Tripathi, I. Sheikh, A. P. Dewani, P. G. Shelke, R. L. Bakal, A. V. Chandewar, P. M. Mazumder // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2013. – Vol. 21, Issue 3. – P. 317–321. doi: 10.1016/j.jsps.2012.09.003
8. Al-Ghazawi, M. Simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic study [Text] / M. Al-Ghazawi, M. Tutunji, S. AbuRuz // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2007. – Vol. 43, Issue 2. – P. 613–618. doi: 10.1016/j.jpba.2006.07.028
9. Berzas, J. J. Validation of a Capillary Gas Chromatographic Method for the Determination of Sildenafil Citrate in its Pharmaceutical Formulations (Viagra). Experimental Design for Evaluating the Ruggedness of the Method [Text] / J. J. Berzas, J. Rodriguez, M. J. Villasenor, A. M. Contento, M. P. Cabello // Chromatographia. – 2002. – Vol. 55, Issue 9–10. – P. 601–606. doi: 10.1007/bf02492908
10. Marcelin-Jimenez, G. Comparison of Fasting Bioavailability Among 100-mg Commercial, 100-mg Generic, and 50-mg Chewable Generic Sildenafil Tablets in Healthy Male Mexican Volunteers: A Single-Dose, 3-Period, Crossover Study [Text] / G. Marcelin-Jimenez, A. P. Angeles-Moreno, L. Contreras-Zavala, A. Garcia-Gonzalez, E. Ramirez-San Juan // Clinical Therapeutics. – 2012. – Vol. 34, Issue 3. – P. 689–698. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.01.021
11. Alkharfy, K. V. Simple and sensitive LC-ESI-MS method for the quantitation of sildenafil in plasma samples [Text] / K. V. Alkharfy // Journal of Separation Science. – 2009. – Vol. 32, Issue 22. – P. 3866–3870. doi: 10.1002/jssc.200900469
12. Zayed, R. An in vitro and in vivo comparative study of directly compressed solid dispersions and freeze dried sildenafil citrate sublingual tablets for management of pulmonary arterial hypertension [Text] / R. Zayed, A. O. Ka-mel, M. Shukur, A. E.-H. El-Shamy // Acta Pharmaceutica. – 2012. – Vol. 62, Issue 3. – P. 411–432. doi: 10.2478/v10007-012-0027-9
13. Challa, B. R. Sildenafil and N-desmethyl sildenafil quantification in human plasma by HPLC coupled with ESI-MS/MS detection: Application to bioequivalence study [Text] / B. R. Challa, B. Z. Awen, B. R. Chandu, M. Khagga, C. K. Bannoth, K. Kanala et. al. // Analytical Methods. – 2010. – Vol. 2, Issue 8. – P. 1043–1050. doi: 10.1039/c0ay00062k
14. Johnson, R. D. Identification of Sildenafil (Viagra®) and Its Metabolite (UK-103,320) in Six Aviation Fatalities [Text] / R. D. Johnson, R. J. Lewis // Federal Aviation Administration. – Washington, 2006. – 11 p.
15. Сычев, К. С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии [Текст] / К. С. Сычев. – М.: Техносфера, 2010. – 272 с.
16. Good Laboratory Practice. Oecd principles and guidance for compliance monitoring [Text]. – OECD, 2005.
17. Про затвердження документів з питань забезпечення якості лікарських засобів [Текст]. – Міністерство охорони здоров'я України, 2009. – № 95.
18. Bioanalytical method validation: Guidance for industry [Text]. – U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.
19. Guideline on bioanalytical method validation [Text]. – European Medicines Agency (EMA/CHMP/EWP/192217/2009), 2011.
20. Жукова, Н. А. Валидация биоаналитического метода [Текст]: метод. рек. / Н. А. Жукова, В. В. Либина, И. В. Кудрис, Н. Н. Падалко. – Киев, 2013. – 35 с.

References

1. Gorpichenko, I. I., Mirosnikov, Y. O. (2003). Erectile dysfunction. Lviv: Medical world, 88.
2. Kanjanawart, S., Kongyingoes, B., Gaysornsiri, D., Tangsucharit, P., Puapairoj, P., Vannaprasaht, S., Tiamkao, S. et. al. (2008). Bioequivalence and Pharmacokinetic Study of Sildenafil in Healthy Thai Male Volunteers. Srinagarind Medical Journal, 23 (1), 38–44.
3. Mahmoudian, M., Falahatpishe, H., Taiebi, L., Moghadam, E., Gholamine, B. (2010). Determination of pharmacokinetic parameters of sildenafil in Iranian volunteers by an HPLC method. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 7 (1), 69–74.
4. Mahmoudian, M. (2005). Sildenafil Determination in Various Matrices: A Review. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics, 4 (2), 72–75.
5. Dilek, I., Cooper, J., Aijaz, S. (2015). Selection of Internal Standards for LC-MS/MS Applications. Mass Spectrometry Applications to the Clinical Lab (MSACL), 3, 31–42.
6. Krishnamurthy, B., Shivaprakasha, R., Amitabha, G. (2009). Quantitation of Sildenafil in Human Plasma by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. Pharmacology online, 2, 64–74.
7. Tripathi, A. S., Sheikh, I., Dewani, A. P., Shelke, P. G., Bakal, R. L., Chandewar, A. V., Mazumder, P. M. (2013). Development and validation of RP-HPLC method for sildenafil citrate in rat plasma-application to pharmacokinetic studies. Saudi Pharmaceutical Journal, 21 (3), 317–321. doi: 10.1016/j.jsps.2012.09.003
8. Al-Ghazawi, M., Tutunji, M., AbuRuz, S. (2007). Simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic study. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43 (2), 613–618. doi: 10.1016/j.jpba.2006.07.028
9. Berzas, J. J., Rodriguez, J., Villasenor, M. J., Contento, A. M., Cabello, M. P. (2002). Validation of a capillary gas chromatographic method for the determination of Sildenafil Citrate in its pharmaceutical formulations (Viagra). Experimental design for evaluating the ruggedness of the method. Chromatographia, 55 (9–10), 601–606. doi: 10.1007/bf02492908
10. Marcelin-Jimenez, G., Angeles-Moreno, A. P., Contreras-Zavala, L., Garcia-Gonzalez, A., Ramirez-San Juan, E.

(2012). Comparison of Fasting Bioavailability Among 100-mg Commercial, 100-mg Generic, and 50-mg Chewable Generic Sildenafil Tablets in Healthy Male Mexican Volunteers: A Single-Dose, 3-Period, Crossover Study. *Clinical Therapeutics*, 34 (3), 689–698. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.01.021

11. Alkharfy, K. M. (2009). Simple and sensitive LC-ESI-MS method for the quantitation of sildenafil in plasma samples. *Journal of Separation Science*, 32 (22), 3866–3870. doi: 10.1002/jssc.200900469

12. Zayed, R., Kamel, A. O., Shukr, M., El-Shamy, A. E.-H. (2012). An in vitro and in vivo comparative study of directly compressed solid dispersions and freeze dried sildenafil citrate sublingual tablets for management of pulmonary arterial hypertension. *Acta Pharmaceutica*, 62 (3), 411–432. doi: 10.2478/v10007-012-0027-9

13. Challa, B. R., Awen, B. Z., Chandu, B. R., Khagga, M., Bannoth, C. K., Kanala, K. et. al. (2010). Sildenafil and N-desmethyl sildenafil quantification in human plasma by HPLC coupled with ESI-MS/MS detection: Application to bioequivalence study. *Analytical Methods*, 2 (8), 1043–1050. doi: 10.1039/c0ay00062k

14. Johnson, R. D., Lewis, R. J. (2006). Identification of Sildenafil (Viagra®) and Its Metabolite (UK-103,320) in Six Aviation Fatalities. Federal Aviation Administration. Washington, 11.

15. Sychev, K. S. (2010). Practical guidance on liquid chromatography. Moscow: Tehnosfera, 272.

16. Good Laboratory Practice. Oecd principles and guidance for compliance monitoring (2005). OECD.

17. On approval of documents on quality assurance of medicines (2009). The Ministry of Health of Ukraine, # 95.

18. Bioanalytical method validation: Guidance for industry (2001). U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM).

19. Guideline on bioanalytical method validation (2011). European Medicines Agency (EMA/ CHMP/ EWP/192217/2009).

20. Zhukova, N. A., Libina, V. V., Kudris, I. V., Padalko, N. N. (2013). Bioanalytical Method Validation. Kyiv, 35.

Дата надходження рукопису 02.11.2016

Кузнецов Игорь Эрнестович, доктор биологических наук, профессор, директор, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000
E-mail: kuznetsov@pharmbiotest.com

Науменко Елена Алексеевна, заместитель директора по качеству, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000
E-mail: naumenko@pharmbiotest.com

Резниченко Наталия Константиновна, заведующий лабораторией, Биоаналитическая лаборатория, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000
E-mail: reznichenko@pharmbiotest.com.ua

Костюк Андрей Юрьевич, ведущий инженер, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000
E-mail: kostyk.andrew@pharmbiotest.com.ua

Савяк Роман Прокопович, кандидат химических наук, консультант, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000
E-mail: savjakr-2@yandex.ru

Олейников Дмитрий Сергеевич, консультант, ООО «КДЦ «ФАРМБИОТЕСТ», ул. Орджоникидзе, 9, г. Рубежное, Украина, 93000
E-mail: oleynikovds@yandex.ua