

VALIDATED HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF SILDENAFIL IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS

Z. Poposka, M. Shishovska, K. Starkoska, Z. Arsova-Sarafinovska

Institute for Public Health of the Republic of Macedonia, 50 Divizija 6, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Sildenafil is oral drug used primarily to treat male sexual function problems (impotence or erectile dysfunction) since becoming available in 1998. It is a potent and selective inhibitor of cGMP specific phosphodiesterase type 5 (PDE5) in the *corpus cavernosum*, where PDE5 is responsible for degradation of cGMP. Sildenafil has a peripheral site of action on erections. This substance has no direct relaxant effect on isolated human *corpus cavernosum* but potently enhances the relaxant effect of NO on this tissue.

However, there is no analytical method for determination of this active compound in pharmaceutical preparations in the current European and US Pharmacopoeia.

The aim of this study was to develop and validate HPLC method for sildenafil analysis in pharmaceutical dosage forms.

MATERIALS AND METHODS

HPLC analysis was performed using a Shimadzu LC-2010 chromatographic system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of a LC-20AT Prominence liquid chromatograph pump with DGU-20A5 Prominence degasser, a SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, RF 10AXI fluorescence detector and a SIL-20 AC Prominence auto sampler. Data analyses were done using Class VP 7.3 Software. The elution was carried out on a column Hypersil BDS-C18 (125 x 4 mm i.d., 5 mm), mobile phase consisted of phosphate buffer (20 mM, pH 2.8)-acetonitrile (71:29, V/V), flow rate 1.5 mL min⁻¹, at controlled temperature (25°C) and autosampler temperature at 4°C. Detection of sildenafil was carried out at 285 nm. Commercially available, film-coated tablets, containing 50 mg sildenafil as sildenafil citrate, were used in this study.

RESULTS AND DISCUSSION

The method was fully validated according to the ICH (International Conference on Harmonization) guidelines by determination of linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantification. Linearity of the method was tested in the range of: 2 – 100 mg mL⁻¹ sildenafil (Fig. 1). Experimental data showed high level of linearity which was proved with the value for the correlation coefficient ($R^2 = 0.9994$).

Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method were tested in the range of: 20 – 200 ng mL⁻¹ sildenafil. The results were: 0.23 ng and 0.68 ng for LOD and LOQ, respectively (9.2 ng mL⁻¹ and 27.2 ng mL⁻¹ for LOD and LOQ, respectively, obtained with 25 mL injected).

Selectivity of the method was proved with the chromatographic peak resolution obtained between sildenafil and tadalafil ($R_s = 10, 5$)

(Fig. 2) and the characteristic UV-spectrum.

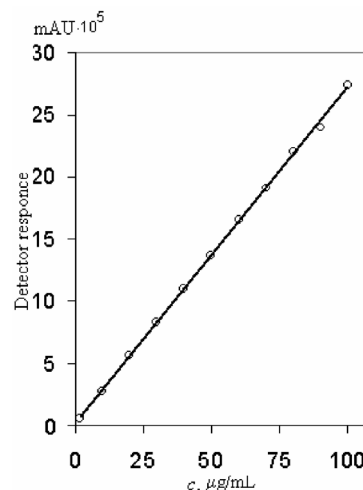


Fig. 1. A typical sildenafil calibration line, with regression line $Abs = 27066 \text{ conc.} + 14033$, and $R^2 = 0.9994$

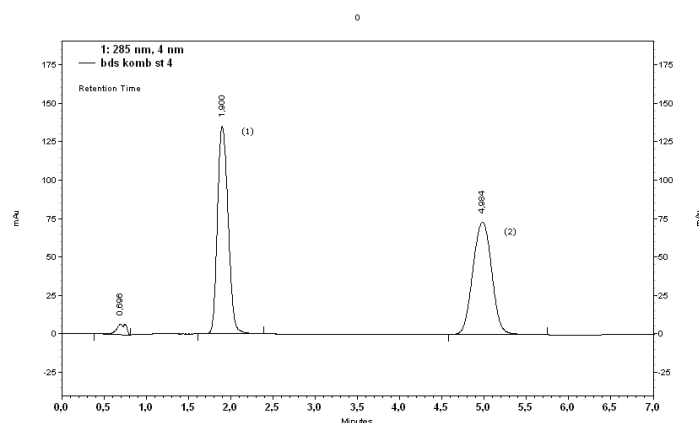


Fig. 2: Typical chromatogram obtained from a mixed standard solution: sildenafil (1), tadalafil (2).

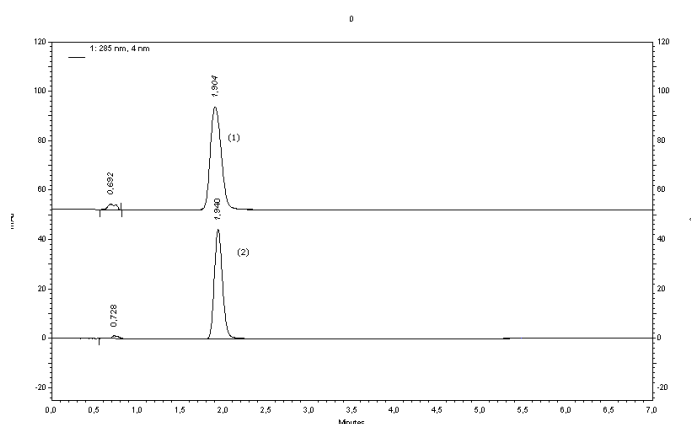


Fig. 3: Typical chromatogram obtained from sildenafil in: standard solution (1), test solution (2).

Mean recovery for sildenafil was between 99,74% and 100,88% indicating that the developed method was accurate for determination of sildenafil in pharmaceutical formulation.

The proposed method was successfully applied for determination of sildenafil in film-coated tablets, containing 50 mg sildenafil as sildenafil citrate (Fig. 3).

CONCLUSIONS

The results of the validation demonstrated that the proposed analytical procedure is accurate, precise and reproducible for sildenafil analysis in pharmaceutical dosage forms. Furthermore, this procedure is relatively inexpensive and simple and is particularly suitable for routine analyses when tandem mass spectrometric detection is not available. Additionally, it is important to mention that decreased consumption of organic solvent considerably reduces the laboratory expenses.

REFERENCES

1. Vardi M, Nini A (2007). Phosphodiesterase inhibitors for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD002187. doi:10.1002/14651858.CD002187.pub3. PMID 17253475.
2. Pomeranz HD and Bhavsar AR (2005). Nonarteritic ischemic optic neuropathy developing soon after use of sildenafil (Viagra): a report of seven new cases. *J. Neuroophthalmol.* 25 (1): 9-13. PMID 15756125.
3. Webb DJ, Freestone S, Allen MJ, Muirhead GJ. (March 4, 1999). Sildenafil citrate and blood-pressure-lowering drugs: results of drug interaction studies with an organic nitrate and a calcium antagonist. *Am. J. Cardiol.* 83 (5A): 21C-28C. doi:10.1016/S0002-9149(99)00044-2. PMID 10078539.
4. Francis SH, Morris GZ, Corbin JD. Molecular mechanisms that could contribute to prolonged effectiveness of PDE5 inhibitors to improve erectile function. *Int. J. Impot. Res.* 2008 Jul-Aug;20(4):333-42.
5. ICH Q2R1: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Proceeding of the International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996.

ВАЛИДИРАН HPLC МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СИЛДЕНАФИЛ ВО ДОЗИРАНИ ФАРМАЦЕВТСКИ ФОРМИ

Ж. Попоска, М. Шишовска, К. Старкоска, З. Арсова-Сарафиновска

Институт за јавно здравје на Република Македонија, Сектор за испитување и контрола и на лекови, 50 Дивизија Бр. 6, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

Силденафил е лек кој се користи првенствено за лекување на проблеми со импотенција или еректилна дисфункција, од моментот кога станува комерцијално достапен во 1998 година. Силденафил е потентен и селективен инхибитор на ензимот cGMP-специфична фосфодиестераза тип 5 (PDE5) во *corpus cavernosum* каде PDE5 ензимот е одговорен за деградација на cGMP. Силденафил поседува периферен механизам на дејство. Оваа супстанција нема директен ефект на опуштање на *corpus cavernosum*, но има силен ефект на релаксација на NO на оваа ткиво.

Меѓутоа, во важечкото издание на европската и американската фармакопеја не постои аналитички метод за одредување на оваа активна компонента во фармацевтските препарати.

Целта на ова истражување беше да се развие и валидира HPLC метод за анализа на силденафил во фармацевтски дозирани форми.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

HPLC анализата беше изведена на хроматографски систем Shimadzu LC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) составен од: 20AT Prominence пумпа, DGU-20A5 Prominence дегазер, SPD-M20A Prominence DAD детектор, RF 10AXI флуоресцентен детектор и SIL-20 AC Prominence автосемплер. Анализата на податоците се врши со користење на софтвер Class VP 7.3. Хроматографската сепарација беше изведена на колона Hypersil BDS-C18 (125 x 4 mm i.d., 5 mm), со мобилна фаза составена од фосфатен пуфер (20 mM, pH 2.8)-ацетонитрил (71:29, V/V), со проток од 1.5 mL min⁻¹, на температура од 25°C и температура на автосемплер од 4°C. Детекцијата на силденафил беше изведена во 285 nm.

Во ова истражување беа користени комерцијално достапни, филм-обложени таблети, кои содржат 50 mg силденафил во облик на силденафил цитрат.

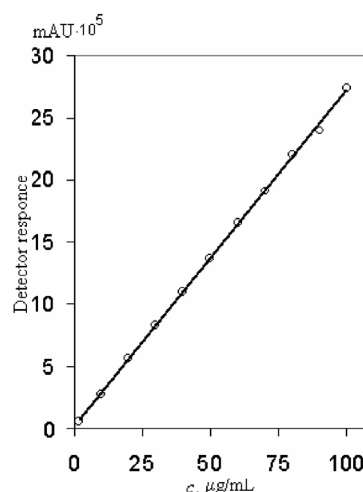
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Методот беше комплетно валидиран во согласност со насоките на ICH (Меѓународна конференција за хармонизација), преку определување на линеарност, прецизност, точност, лимит на детекција и квантификација.

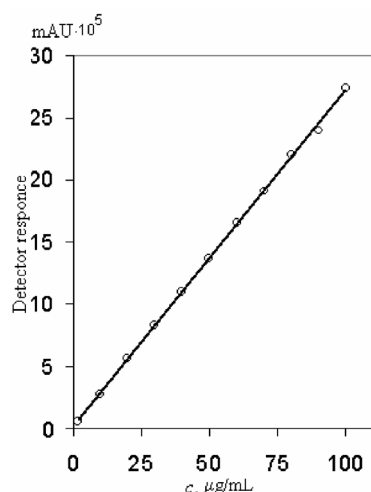
Линеарноста на методот беше испитана во опсег од: 2 – 100 mg mL⁻¹ силденафил. (Фигура 1). Експерименталните податоци покажаа високо ниво на линеарност, што се потврдува и со вредноста на коефициентот на корелација ($R^2 = 0.9994$).

Лимитот на детекција (LOD) и квантификација (LOQ) на методот беа испитани во опсег од: 20 – 200 ng mL⁻¹ силденафил. Добиените вредности се: 0.23 ng и 0.68 ng за LOD и LOQ, соодветно (9.2 ng mL⁻¹ и 27.2 ng mL⁻¹ за LOD и LOQ, соодветно, добиени со инјектирање на 25 mL).

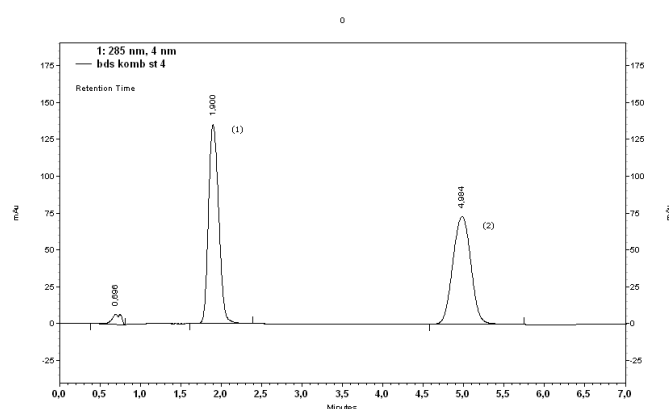
Селективноста на методот беше потврдена со резолуцијата добиена помеѓу пикот на силденафил и пикот на тадалафил ($R_s = 10, 5$) (Фигура 2) и карактеристичниот UV-спектар.



Фиг. 1. Типичен баждарен дијаграм за силденафил, со равенка на регресија $Abs = 27066 \text{ conc.} + 14033$, и $R^2 = 0,9994$



Фиг. 2. Типичен хроматограм добиен од мешан стандарден раствор: силденафил (1), тадалафил (2).



Фиг. 3. Типичен хроматограм добиен од силденафил во: стандарден раствор (1), пробен раствор (2).

Просечниот аналитички принос за силденафил беше од 99,74% до 100,88% што покажува дека предложениот метод е точен за определување на силденафил во фармацевтски препарати. Предложениот метод беше успешно применет за определување на силденафил во дозирни фармацевтски форми (Фигура 3).

ЗАКЛУЧОЦИ

Резултатите од студијата за валидација покажуваат дека предложениот аналитички метод е точен, прецизен и репродуцибилен за анализа на силденафил во фармацевтски препарати. Дополнително, оваа аналитичка постапка е релативно евтина и едноставна и е особено погодна за рутински анализи кога масена спектрометрија не е на располагање. Исто така, важно е да се спомне дека намалената потрошувачка на органски растворувач значително ги намалува лабораториските трошоци.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vardi M, Nini A (2007). Phosphodiesterase inhibitors for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev (1): CD002187. doi:10.1002/14651858.CD002187.pub3. PMID 17253475.
2. Pomeranz HD and Bhavsar AR (2005). Nonarteritic ischemic optic neuropathy developing soon after use of sildenafil (Viagra): a report of seven new cases. J. Neuroophthalmol. 25 (1): 9-13. PMID 15756125.
3. Webb DJ, Freestone S, Allen MJ, Muirhead GJ. (March 4, 1999). Sildenafil citrate and blood-pressure-lowering drugs: results of drug interaction studies with an

organic nitrate and a calcium antagonist. Am. J. Cardiol. 83 (5A): 21C-28C. doi:10.1016/S0002-9149(99)00044-2. PMID 10078539.

4. Francis SH, Morris GZ, Corbin JD. Molecular mechanisms that could contribute to prolonged effectiveness of PDE5 inhibitors to improve erectile function. Int. J. Impot. Res. 2008 Jul-Aug;20(4):333-42.

5. ICH Q2R1: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Proceeding of the International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996.

EFFECT OF HYDRODYNAMICS ON THE DISSOLUTION TEST OF BCS CLASS II ACTIVE COMPONENT FORMULATED AS SOLID DOSAGE FORM WITH IMMEDIATE RELEASE

Irena Brašnarska, Nataša Karaliја, Suzan Memed-Sejfulah, Sanja Simeonovska, Gjorgji Petruševski, Ema Kikovska-Stojanovska, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

The *in vitro* dissolution test in the last few decades of drug product development has distinguished as important physicochemical tool for evaluation of the pharmaceutical quality and bioavailability of the product. Dissolution method development must be considered as a continuing process that needs to adapt to changes as the product changes. Specific drug substance information like: solubility, pKa, stability as a function of pH and BCS classification give directions to the research team to develop product specific discriminatory dissolution method. Different rotation speeds, different mediums and different apparatus must be evaluated to define dissolution method that can provide appropriate measure of product performance, but also have sufficient discriminatory power to detect changes in the formulation. Film-coated tablets with immediate release and incorporated BCS Class II active component [1] (low solubility, high permeability), pKa ~ 4.5 were evaluated in this study. The active component has a pH dependent solubility and increase of the pH would enhance its solubility and consequently the dissolution rate, particularly at pH > pKa of the compound. (Fig.1) Solubility of the active substance was determined by shake-flask method in three different media. The results were 0.00385 mg/ml, 0.0113 mg/ml and 0.143 mg/ml for pH 2.2, pH 4.5 and pH 6.8, respectively. The active component is completely ionized and rapidly dissolved in the intestinal region with an average of pH ~ 6.5. As a result, phosphate buffer pH 6.8 [2] was chosen as physiologically relevant and in accordance with the regulatory requirements.

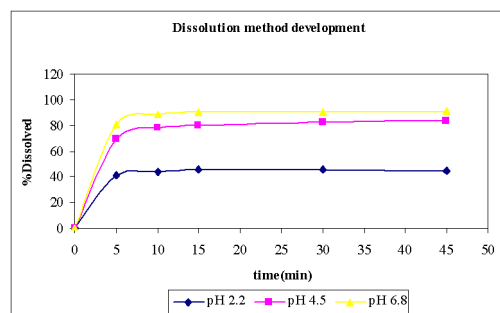


Figure1. Dissolution profiles at different pH media