

Xây dựng quy trình định lượng Sildenafil citrat trong viên nén bằng kỹ thuật sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Nguyễn Hoàng Thảo My*, Lê Quang Hạnh Thu

Khoa Kỹ thuật Xét nghiệm Y học - Đại học Nguyễn Tất Thành
nhtmy@ntt.edu.vn*

Tóm tắt

Mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng quy trình để xác định lượng Sildenafil citrat trong viên nén bao phim Viagra (Pfizer). Chất phân tích được tách hoàn toàn và được định lượng bằng đầu dò PDA (bước sóng phát hiện 230 nm) sử dụng kết hợp 60 % methanol và 30 % acetonitril và 10 % nước làm pha động. Phương pháp này cho khả năng thu hồi tốt hơn, độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) thấp hơn và chính xác hơn so với các phương pháp đã có. Tính phù hợp hệ thống với RSD% về thời gian lưu và diện tích đỉnh lần lượt là 0,69 % và 0,13 %. Độ đặc hiệu đạt yêu cầu theo chuẩn ICH với các mẫu, phương trình tuyến tính ghi nhận: $y = 11997x - 25221$ ($R^2 = 0,9998$) và các tham số thỏa mãn và nằm trong phạm vi tuyến tính. Độ chính xác có RSD% thời gian lưu, diện tích đỉnh tương ứng với (0,22, 1,60) %. Tỷ lệ phục hồi: (98 đến 102) % và RSD% ≤ 2 % đạt yêu cầu chung trong thẩm định về độ đúng. Kết quả cho thấy phân tích định lượng bằng HPLC là phương pháp hiệu quả để xác định hàm lượng Sildenafil citrat trong viên nén, đảm bảo an toàn khi sử dụng thuốc.

Nhận 20.09.2021
Được duyệt 17.10.2021
Công bố 10.11.2021

Từ khóa
sildenafil citrat, HPLC, định lượng, viên nén, thẩm định

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Sildenafil citrat - một trong những loại thuốc hỗ trợ điều trị cương dương đang được quan tâm và sử dụng rộng rãi trên thế giới [1]. Doanh số bán Viagra chiếm 92 % thị trường thuốc chữa rối loạn cương dương toàn cầu. Sildenafil, chất ức chế PDE-5 tổng hợp đầu tiên được cấp phép sử dụng trên lâm sàng, có khả năng tăng cường sự thư giãn của thể hang và do đó có khả năng cải thiện chức năng cương dương ở nam giới [2 - 4]. Ngoài ra, Sildenafil cũng được sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh tăng áp động mạch phổi [5]. Sildenafil citrat có nhiều dạng bào chế như viên nén bao phim, hỗn dịch lỏng, dung dịch tiêm, viên bao phim tan trong miệng. Tuy nhiên, hầu hết được bào chế dưới dạng viên nén vì dạng bào chế này có nhiều ưu điểm vượt trội hơn so với các dạng khác. Viên nén là dạng bào chế đơn liều với liều lượng chính xác, ổn định, độ chính xác cao và ít biến đổi nhất [6].

Kỹ thuật sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC – High-performance Liquid Chromatography) là một kỹ thuật phân tích quen thuộc và nhiều ưu điểm trong phân tích thành phẩm thuốc, nhất là lĩnh vực kiểm nghiệm [7]. Nhóm nghiên cứu thực hiện xây dựng quy trình định lượng Sildenafil citrat trong viên nén bằng kỹ thuật sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) nhằm khảo sát các điều kiện sắc kí để định lượng Sildenafil citrat góp phần cho công tác kiểm định chất lượng thuốc.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu đối chiếu: Sildenafil citrat chuẩn thứ cấp (Tiêu chuẩn SDN Citrat) số C0419265.04 (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương Hà Nội, Việt Nam) được dùng làm chất chuẩn nội và được sử dụng trong phân tích hóa lí và định lượng.

- Mẫu thử: viên nén bao phim Viagra – Pfizer (Sildenafil citrat trong đường 50 mg Sildenafil)

Các mẫu được phân tích bằng hệ thống Shimadzu Prominence-i HPLC (Trung Sơn Shimadzu Corporation, Nhật Bản), kết nối đầu dò dây diod quang (PDA)

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát điều kiện sắc kí

Khảo sát dung môi

Đầu tiên tiến hành hệ dung môi MeOH : H₂O tỷ lệ 90:10 vì đây là pha động được đa số sử dụng để phân tích định lượng Sildenafil citrat bằng phương pháp HPLC. Chạy tiếp tục với tỉ lệ 70:30 và 50:50 của hệ thống pha động này. Thực hiện các bước tương tự với các tỉ lệ trên, hệ dung môi thay MeOH bằng acetonitril. Sau đó, thay nước bằng dung môi acid phosphoric (H₃PO₄) 0,1 % kết hợp với MeOH theo tỉ lệ 90:10, 70:30 và 50:50. Sau quá trình, chọn hệ tối ưu với tỉ lệ dung môi kết hợp MeOH: ACN: H₂O (60:30:10).

Khảo sát tốc độ dòng

Tiến hành với tốc độ dòng 0,8 mL/min và 1,0 mL/min. Khảo sát kết quả sắc kí và hệ thống bơm áp suất với cột nhiệt độ 40 °C. Thể tích tiêm là 20 µL, thời gian chạy là 15 phút và thời gian lưu ghi nhận của hoạt chất khoảng (6 – 8) phút.

Khảo sát điều kiện sắc kí hoàn thiện

Mẫu chuẩn: 20 mg Sildenafil citrat chuẩn được cân chính xác bằng cân phân tích 4 chữ số và chuyển vào bình định mức 20 mL. Thêm 5 mL methanol trong bể siêu âm cho đến khi hòa tan hoàn toàn (trong 10 phút). Thêm pha động đến vạch mức để được vừa đủ 20 mL dung dịch và lắc đều. Dung dịch có nồng độ 1 000 µg/mL này hiện là dung dịch chuẩn đối chiếu thứ cấp Sildenafil citrat. Pha loãng 10 lần để có nồng độ 100 µg/mL để phân tích định lượng (pha loãng 200 lần).

Mẫu thử: Tính khối lượng trung bình của 20 viên và nghiền thành bột mịn để phân tích.

Cân một lượng bột thuốc tương ứng với 20 mg Sildenafil citrat bằng cân phân tích 4 số cho vào bình định mức 20 mL có 5 mL methanol và khử khí bằng siêu âm trong vòng 10 phút. Thêm methanol vào bình này để được 20 mL dung dịch mẫu. Lọc dung dịch mẫu trong bình qua giấy lọc có nếp gấp hình rẻ quạt (lấy 5 mL dịch lọc đầu) để loại bỏ tá dược. Dịch lọc thu được là dung dịch mẫu có chứa Sildenafil citrate (Viagra, Pfizer). Hút chính xác 2 mL dịch lọc vào bình định mức 20 mL và thêm MeOH đến vạch mức, thu được nồng độ 100 µg/mL (pha loãng 200 lần).

Việc tối ưu hóa pha động được thực hiện dựa trên hình dạng và thông số của peak sắc kí. Cuối cùng sau khi xem xét kết quả, pha động bao gồm methanol, acetonitril (sử dụng cho HPLC) và nước cất theo tỉ lệ 60:30:10 về thể tích để đáp ứng đầy đủ tất cả các tiêu chí về tính phù hợp của hệ thống và cũng thu được các thông số sắc kí tiêu chuẩn. Pha tĩnh được chọn là HPLC Column Spherisorb ODS1 ((250 × 4,0) mm; kích thước hạt 5 µm, số hiệu: PSS845542, Số seri: 01473618114006, sản xuất tại Ireland) (tập đoàn Waters, Hoa Kỳ). Bước sóng tối ưu để phát hiện Sildenafil citrat là 230 nm và tốc độ dòng chảy: 0,8 mL/min.

2.2.2 Thẩm định quy trình

Các tiêu chuẩn của quy trình thẩm định theo ICH với các quy định về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng [8, 9].

Tính tương thích hệ thống

Tính tương thích hệ thống đạt được bằng cách tiêm chất chuẩn đối chiếu thứ cấp của Sildenafil citrat với nồng độ 100 µg/mL ở thể tích tiêm 20 µL, thực hiện sắc kí liên tục sáu lần. Ghi nhận giá trị RSD% về thời gian lưu và diện tích peak

Tính đặc hiệu

Dung dịch thử và chuẩn được thực hiện với khối lượng mẫu tương đương để chạy sắc kí trong cùng điều kiện. 4 loại mẫu cho thực nghiệm bao gồm: dung dịch mẫu trắng (dung môi), mẫu thử (Viagra), mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn được tiêm vào hệ thống HPLC trong các điều kiện thử nghiệm, sắc kí đồ được ghi lại cho từng dung dịch và hình dạng của các peak được phân tích về thông số.

Tính tuyến tính

Tính tuyến tính được thiết lập ở khoảng nồng độ (25 - 50 - 100 - 200 - 400 và 800) µg/mL cho dung dịch chuẩn đối chiếu thứ cấp. Bắt đầu ở 0,1600 g SDN citrat trong bình định mức 20 mL và sau đó pha loãng 10 lần bằng dung môi methanol để thu được khoảng C1 = 800 µg/mL. Sau đó quá trình được tiếp tục pha loãng 2 lần để có nồng độ C2 tiếp theo. Tiến hành tương tự với các nồng độ còn lại để được 6 điểm cho chỉ tiêu tính tuyến tính.

Diện tích peak (y) của Sildenafil citrat được vẽ biểu đồ so với nồng độ (x) tương ứng, phân tích hồi quy tuyến tính được suy ra từ biểu đồ và tính toán để ghi nhận hệ số R². Thiết lập phương trình về độ rộng của diện tích và nồng độ tiêu chuẩn có dạng là :

$$y = a.x + b \quad (R^2 \geq 0,9995)$$

Độ lặp lại

Độ chụm hay được hiểu là độ lặp lại của phương pháp được xác định từ diện tích peak của sáu lần bơm từ 6 mẫu thử có cùng quy trình thực hiện, cùng điều kiện thí nghiệm với khoảng nồng độ ở 100 µg/mL. Yêu cầu RSD% thường không quá 2 % khi tiến hành trên các mẫu thử đã chọn.

Độ đúng

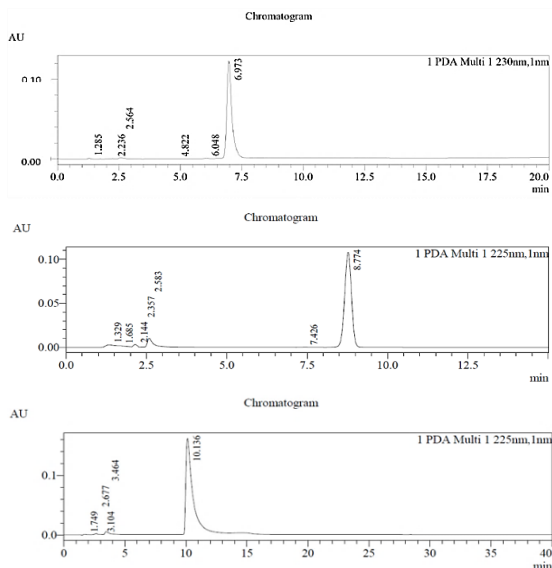
Độ đúng của phép thử viên nén Sildenafil citrat được

xác định bằng cách thêm vào ở các mức (80, 100 và 120) % của chất chuẩn tinh khiết vào lượng mẫu thử đã biết về hàm lượng. Ghi lượng tìm thấy so với lượng thêm vào để tính tỉ lệ phục hồi. Khoảng giới hạn cho phép với tỉ lệ phục hồi (98 đến 102) %

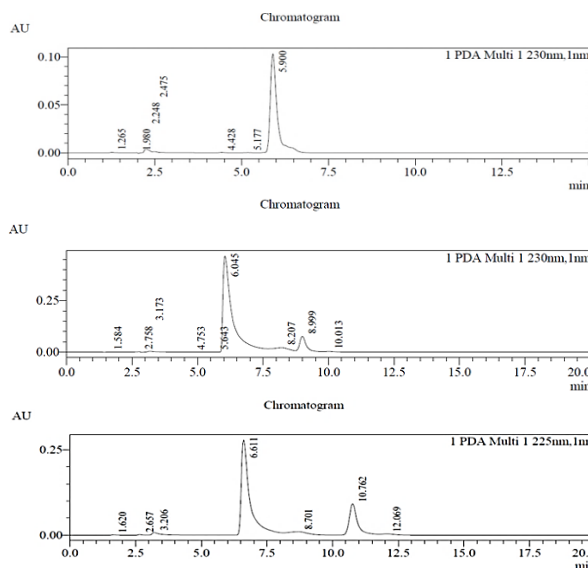
3 Kết quả và bàn luận

3.1 Khảo sát điều kiện sắc kí

Khảo sát dung môi



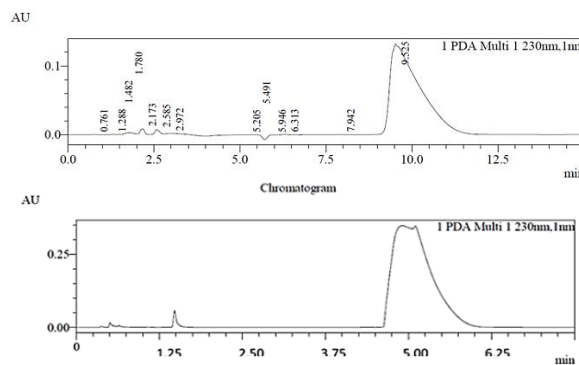
Hình 1 Hệ dung môi MeOH: nước với các tỉ lệ (90:10), (70:30) và (50:50)



Hình 2 Hệ dung môi ACN: nước với các tỉ lệ (90:10), (70:30) và (50:50)

Nhận xét: từ 6 sắc kí đồ (MeOH: H₂O; ACN: H₂O) với 3 cặp tỉ lệ 90:10, 70:30 và 50:50 về thể tích trong kết quả khảo sát dung môi, nhận thấy tỉ lệ dung môi hữu cơ càng thấp thì thời gian lưu càng lớn.

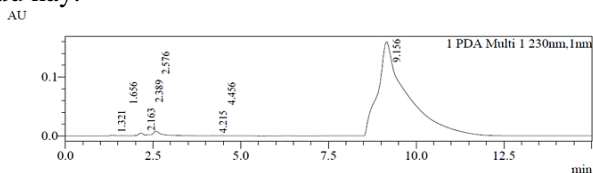
Hệ dung môi với tỉ lệ 90:10 cho peak có thời gian lưu tối ưu nhất và đáp ứng yêu cầu của các thông số phân tích so với 2 tỉ lệ còn lại. Sự khác biệt giữa MeOH và ACN là không đáng kể. Mặc dù cả MeOH và ACN sử dụng theo tỉ lệ 90:10 đều cho kết quả tốt, tách peak tốt nhưng khi sử dụng ACN: nước thì thời gian lưu lại quá nhanh. Ngoài ra, chi phí sử dụng MeOH thấp hơn nhiều so với ACN. Để tối ưu hóa, nên chọn MeOH để sử dụng với tỉ lệ lớn hơn trong pha động cho nghiên cứu này.



Hình 3 Khảo sát dung môi pha động MeOH:H₃PO₄ với các tỉ lệ (90:10), (70:30) và (50:50)

Nhận xét: khi thay nước bằng dung môi acid, cả 3 tỉ lệ khảo sát trên đều cho thấy peak không đẹp, bị kéo đuôi, xuất hiện nhiều tạp chất cũng như các thông số phân tích không đạt như ban đầu.

Qua các tài liệu tham khảo và lí do đã nêu, nghiên cứu đã thử nghiệm trên hệ thống kết hợp MeOH: ACN với nhau và để đảm bảo tỉ lệ 90 % dung môi hữu cơ trong

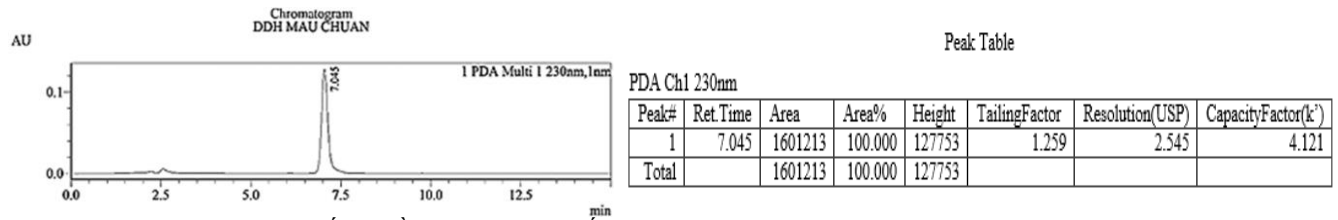


pha động, hệ thống này bao gồm 60 % là MeOH và 30 % là ACN.

Vì vậy, nghiên cứu này sử dụng hệ dung môi MeOH: ACN: H₂O với tỉ lệ 60:30:10 để phân tích định lượng

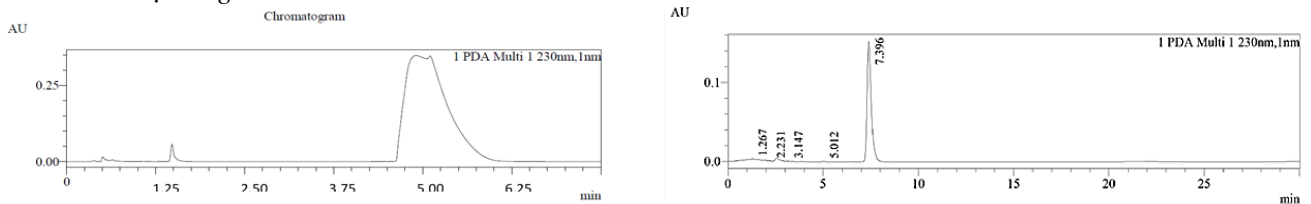
Sildenafil citrat trong viên nén Viagra bằng phương pháp HPCL.

Kết quả ghi nhận qua sắc kí đồ và thông số như sau:



Hình 4 Sắc kí đồ và bảng thông số peak với pha động MeOH: ACN: H₂O (60:30:10)

Khảo sát tốc độ dòng



Hình 5 Sắc kí đồ ở tốc độ dòng 1 mL/min (bên trái) và 0,8 mL/min (bên phải)

Nhận xét: Khi chạy sắc kí với tốc độ dòng 1,0 mL/min thì peak ra nhanh hơn nhưng không tách rời hoàn toàn (peak dễ biến dạng), khó đạt các thông số sắc kí và

đôi khi áp suất càng lúc càng tăng khi vạch tốc độ cao hơn. Do đó, thử nghiệm chọn tốc độ dòng là 0,8 mL/min để quá trình được tối ưu hơn.

Bảng 1 Điều kiện sắc kí

Thông số	Điều kiện sắc kí
Cột sắc kí	Spherisorb ODS1 C18 analytical Column with (250 × 4) mm, 5 μm particle size
Đầu dò	SHIMADZU Prominence - i HPLC PDA detector
Dung môi rửa kim	Methanol (using for HPLC)
Pha động	Methanol : Acetonitrile : Water (60:30:10 v/v)
Tốc độ dòng	0,8 mL/min
Bước sóng phát hiện	230 nm
Thời gian chạy	15 phút
Nhiệt độ	Oven Temperature (40 °C)
Thể tích tiêm mẫu	20 μL
Thời gian lưu (Rt)	(7,00 ± 0,2) phút
Hệ số kéo đuôi (Asymmetry factor) T _f	0,8 ≤ T _f ≤ 1,5; T _f < 2,0 (follow U.S.FDA)
Hệ số phân giải (USP)	R _s > 1,5; R _s > 2,0 (follow U.S.FDA)
Hệ số dung lượng (k')	1 - 5

Thiết bị: Shimadzu Prominence - i HPLC system - High Performance Liquid Chromatograph

3.2 Thẩm định quy trình phân tích

Tính tương thích hệ thống

Bảng 2 Tính tương thích hệ thống của mẫu chuẩn

Lần	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak	Độ phân giải (USP)
1	7,112	1 221 828	3,377
2	7,018	1 224 804	3,458
3	7,098	1 221 412	3,589
4	7,109	1 222 797	3,447
5	7,111	1 221 730	3,504
6	7,009	1 220 140	3,553
X _{average}	7,0762	1 222 119	3,488
SD	0,0489	1569,79	
RSD (%)	0,6908	0,1285	

4	7,068	1 128 612	2,926
5	7,084	1 133 551	3,045
6	7,093	1 105 999	3,009
X _{average}	7,0633	1 125 071	2,995
SD	0,0242	9767,497	
RSD (%)	0,3422	0,8682	

Bảng 3 Tính tương thích hệ thống của mẫu thử Viagra

Lần	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak	Độ phân giải (USP)
1	7,029	1 128 836	3,003
2	7,043	1 128 865	3,010
3	7,063	1 124 561	2,979

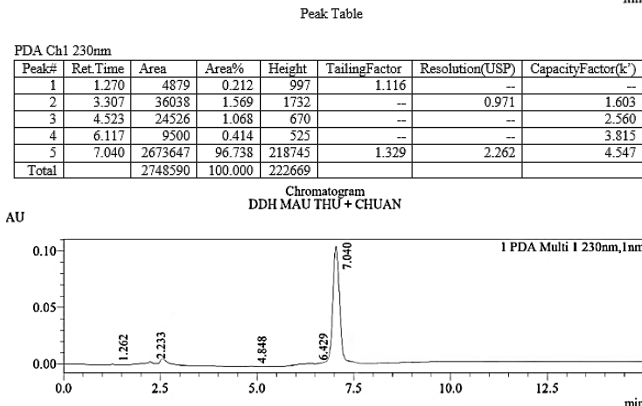
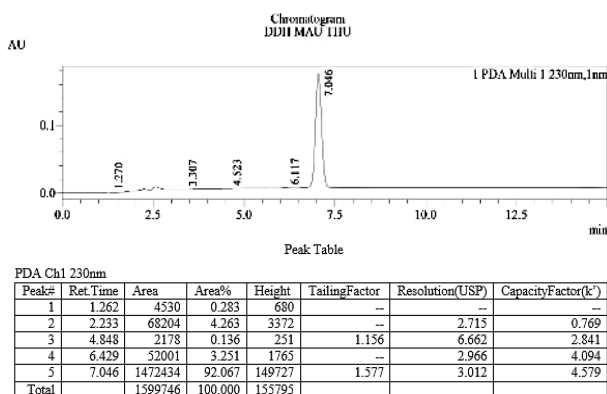
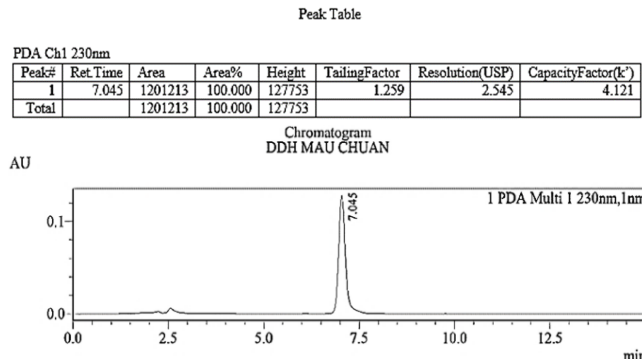
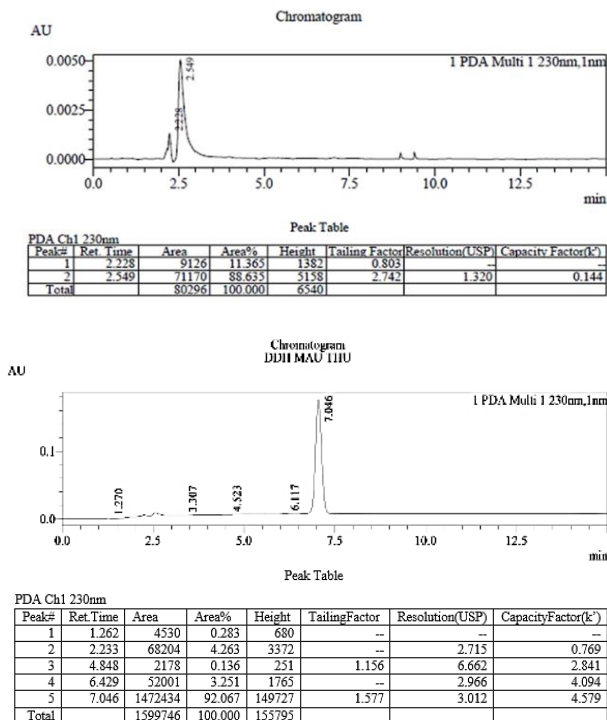
Nhận xét : Mẫu chuẩn có thời gian lưu trung bình là 7,0762 phút với RSD% là 0,69 % và diện tích trung bình là 1 222 119 với RSD% là 0,13 %

Mẫu thử có thời gian lưu trung bình là 7,0633 phút với RSD% là 0,34 % và diện tích trung bình ghi nhận là 1 125 071 với RSD% là 0,86 %

Tất cả các thông số về độ phân giải của mẫu chuẩn và thử đều cao hơn 1,5 và khá đồng đều.

=> Kết quả cho thấy khả năng tương thích của hệ thống đáp ứng các yêu cầu chung để xác nhận. Thiết bị phù hợp cho các thử nghiệm và tiêu chí tiếp theo.

Tính đặc hiệu

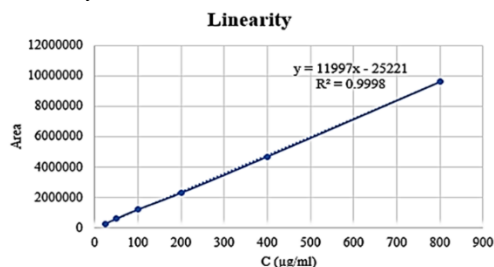


Hình 6 Sắc kí đồ và thông số sắc kí của mẫu trắng, chuẩn, thử và thử thêm chuẩn

Nhận xét: mẫu trắng không ghi nhận đỉnh ở thời gian lưu khoảng 7 phút. Các mẫu chuẩn, thử và thử thêm chuẩn có mức thời gian lưu của hoạt chất Sildenafil

citrat tương đồng nhau (7,045 phút với mẫu chuẩn, 7,046 phút với mẫu thử và 7,040 phút với mẫu thử thêm chuẩn).

Tính tuyến tính



C (µg/mL)	25	50	100	200	400	800
S	288 416	610 588	1 220 116	2 308 468	4 698 635	9 618 258

Hình 7 Tính tuyến tính và dãy nồng độ mẫu chuẩn

Nhận xét: phương trình tuyến tính: $y = 11997x - 25221$ ($R^2 = 0,9998$). Các thông số đạt yêu cầu và nằm trong phạm vi về tính tuyến tính.

Độ lặp lại

Hàm lượng cho phép: (90 đến 110) % so với hàm lượng nhãn (Phụ lục 11.1 theo Dược điển Việt Nam V) = (45 – 55) mg

Hàm lượng SDN citrat trong viên nén (Viagra 50 mg):

$$C (\%) = \frac{S_{\text{thử}}}{S_{\text{chuẩn}}} \times C_o \times \text{ĐPL} \times \frac{100}{C_{\text{nhãn}}} \times P \times \frac{M}{m}$$

:

M: khối lượng trung bình viên = 0,3128 (g);

m: khối lượng cân thực tế (m cân LT= KLTB x 20/50 = 0,1251(g))

S chuẩn = 1 222 119; $C_o = 0,1$ mg/mL

ĐPL: độ pha loãng = 200 lần

P (%): độ tinh khiết chuẩn = 0,9888

C nhãn = 50 mg

Kết quả độ lặp lại được ghi nhận theo Bảng 4.

Bảng 4 Độ lặp lại

Mẫu	Khối lượng cân thực tế	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak	Độ phân giải (USP)	Nồng độ (%)
1	0,1251	6,956	1 258 079	2,971	101,806
2	0,1249	6,951	1 260 745	2,829	102,185
3	0,1248	6,968	1 242 773	2,498	100,809
4	0,1262	6,991	1 260 515	2,352	101,114
5	0,1258	6,982	1 214 184	2,272	97,707
6	0,1252	6,974	1 270 040	2,601	102,692
Average	0,12533	6,970	1 251 056		101,0520
SD	0,00055	0,0152	20105,8034		1,7771
RSD(%)	0,4390	0,2186	1,6071		1,7587

Nhận xét: độ lặp lại có RSD% về thời gian lưu, diện tích peak đều dưới 2,0 %. Các mẫu thử đều có độ phân giải đạt yêu cầu. Nồng độ 6 mẫu thử ghi nhận giá trị trung bình là 101,05 % và giá trị RSD% về nồng độ là 1,76 %.

Độ đúng

Bảng 5 Độ đúng với 3 mức (80, 100 và 120) % lượng chất chuẩn thêm vào mẫu thử

Lượng mức chuẩn thêm vào (%)	Diện tích peak	Khối lượng chuẩn thêm vào (lí thuyết) mg	Khối lượng chuẩn thêm vào (thực tế) mg	Khối lượng chuẩn tìm thấy (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)
80	2 245 061	20 mg x 80 % = 16 mg	17	16,8010	98,8297
	2 246 610			16,8266	98,9799
	2 247 691			16,8444	99,0847
RSD (%)					0,1295
100	2 580 706	20 mg x 100 % = 20 mg	22	22,3339	101,5175
	2 577 462			22,2804	101,2745

Độ đúng của phép thử viên nén Sildenafil citrat được xác định bằng cách áp dụng phương pháp làm ba lần hỗn hợp mẫu thử và mẫu chuẩn mà lượng Sildenafil citrat chuẩn đã biết được thêm vào ở các mức độ khác nhau (80, 100 và 120) %. Kết quả cho độ đúng (tỉ lệ phục hồi) được hiển thị trong Bảng 5.

	2 573 015			22,2071	100,9413
RSD (%)					0,2858
120	2 795 113	20 mg x 120 % = 24 mg	25.5	25,8682	101,4438
	2 802 482			25,9896	101,9202
	2 807 362			26,0701	102,2356
RSD (%)					0,3913
RSD tổng cộng (%)					1,3381

Nhận xét: tỉ lệ thu hồi trên các mẫu có thêm chất chuẩn ở ba mức: (80, 100 và 120) % của chất chuẩn được thêm vào được báo cáo RSD% tương ứng là (0,1295; 0,2858 và 0,3913) %

RSD% tổng độ chính xác = 1,3381 %.

Tất cả các chỉ số trong phần độ chính xác đã chứng minh yêu cầu xác thực cơ bản (tỉ lệ phục hồi: (98 đến 102) % và RSD% ≤ 2 %).

Nhận xét chung: so với các nghiên cứu đã có, quy trình đã tìm được hệ dung môi đơn giản (methanol phối hợp với acetonitril và nước), tối ưu hóa hơn về thời gian lưu (dưới 10 phút) và thể tích dung môi (tốc độ dòng 0,8 mL/min) trong việc định lượng Sildenafil citrat [10 - 12].

4. Kết luận và đề xuất

Kết luận

Khảo sát sơ bộ đã tìm ra điều kiện sắc kí cho việc xác định hàm lượng Sildenafil citrat trong viên nén bằng kĩ thuật HPLC.

Lượng bột thuốc được cân chính xác và pha loãng với methanol tới khoảng nồng độ 100 µg/mL, độ pha loãng 200 lần để thu được mẫu thử, lọc qua màng lọc

PTFE và cho vào vial để phân tích với hệ thống HPLC. Kết quả được tính toán dựa trên diện tích peak để kết luận về hàm lượng với điều kiện sắc kí đã được đề cập tại phần kết quả nghiên cứu.

Các nghiên cứu trong nước chưa đi sâu về phương pháp định lượng hoạt chất này bằng kĩ thuật HPLC, chưa có chuyên luận này tại Dược điển Việt Nam. Đối chiếu với các nghiên cứu nước ngoài, nghiên cứu đã bổ sung thêm một hệ điều kiện chạy sắc kí là sự phối hợp methanol, acetonitril và nước để làm nguồn tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo. Sự kéo đuôi của peak sắc kí được giảm thiểu và tối ưu hơn về thời gian lưu so với các nghiên cứu ngày trước trên kĩ thuật HPLC.

Đề xuất

Nếu có thêm thời gian, nghiên cứu định hướng mở rộng thêm các hệ điều kiện khảo sát, áp dụng trên mẫu thực phẩm chức năng trên thị trường, phát triển định lượng đa thành phần.

Lời cảm ơn Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2020.01.048/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Boollell, M; Allen, MJ; Ballard, SA; Gepi-Attee, S; Muirhead, GJ; Naylor, AM; Osterloh, IH; Gingel. C (June 1996), "Sildenafil: an Orally Active Type 5 Cyclic GMP-Specific Phosphodiesterase Inhibitor for the Treatment of Penile Erectile Dysfunction", International Journal of Impotence Research, 8(2): p.47-52.
2. J.J. Berzas Nevado, J. Rodríguez Flores, G. Castañeda Peñalvo, N. Rodríguez Fariñas (2010), "Determination of sildenafil citrate and its main metabolite by sample stacking with polarity switching using micellar electrokinetic chromatography", J.Chromatograph, 953: p.279-286.
3. J.D.H. Cooper, D.C. Muirhead, J.E. Taylor, P.R. Baker (1997), "Development of an assay for the simultaneous determination of sildenafil (viagra) and its metabolite (UK-103,320) using automated sequential trace enrichment of dialysates and high-performance liquid chromatography", 701: p.87-95.
4. M.C. Tseng, J.H. Lin (2002), "Determination of sildenafil citrate adulterated in a dietary supplement capsule by LC/MS/MS", J. Food Drug Anal., 10: p.112-119.
5. C.F. Barnett, R.F. Machado (2006), "Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension", p.411-422.



6. R.F. Machado, K.A. Reddy, L. Fernandez (November 2018), “Advantages and Disadvantages of tablets in Pharmaceutical industry”, Essays.
7. P. Ravi Sankar, K. Sai Snehalatha, Shaik. Tabassum Firdose, P. Srinivasa Babu (December 2019), “Applications of HPLC in Pharmaceutical Analysis”, Article, 59(1): p.117-124.
8. European Medicines Agency (2015), “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”, ICH Topic Q2 (R1), 1994: p.17.
9. B.P. Reddy, K.A. Reddy, M.S. Reddy (2010), “Validation and stability indicating RP-HPLC method for the determination of tadalafil API in pharmaceutical formulations”, Res. Pharm. Biotechnol, 2: p.1–6.
10. M. Abdel-Hamid (2016), “Determination of sildenafil, tadalafil, and vardenafil in tablets and adulterated herbal products by ESI-MS-MS”, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol, 29: p.591–603.
11. N. Daraghmeh, M. Al-Omari, A. Badwan, A. M. Jaber (2014), “Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC”, J. Pharm. Biomed. Anal., 25: p.483–492.
12. V. Nagaraju, D. Sreenath, J.T. Rao, R.N. Rao (2003), “Separation and determination of synthetic impurities of sildenafil (Viagra) by reversed-phase high-performance liquid chromatography”, Anal. Science, 19: p.1007–1011.

Development of a procedure for the quantification of Sildenafil citrate in tablets by high performance liquid chromatography (HPLC)

Nguyen Hoang Thao My*, Le Quang Hanh Thu

Faculty of Medical Laboratory Techniques, Nguyen Tat Thanh University

*nhtmy@ntt.edu.vn

Abstract This study helps constructing the optimal quantitative method for the determination of Sildenafil citrate content in Viagra film-coated tablets (Pfizer). The analyte was completely separated and quantified with a PDA probe (230 nm detection wavelength) using a combination of 60 % Methanol and 30 % Acetonitrile and 10 % Water as the mobile phase. This quantitative method provides better recovery and lower standard deviation (%RSD) as well as high accuracy compared to previous methods. Systematic fit with RSD% for retention time and the peak area is 0.69 % and 0.13 %, respectively. The specificity is satisfactory according to the ICH standard, Linear equation: $y = 11997x - 25221$ ($R^2 = 0.9998$) and the parameters are satisfied and in the linear range. Accuracy has RSD % retention time, peak area corresponding to 0.22; 1.60 %. Recovery rate: (98 to 102) % and $RSD\% \leq 2$ % meet the general requirements of the correctness assessment. With the application of these methods, the quantity control process shall be possible, ensuring the safety of the drug.

Keywords sildenafil citrate, HPLC, quantitative, tablet, validation