



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Josipa Kosić-Vukšić

**ANALIZA INHIBITORA FOSFODIESTERAZE TIP A
5 U DODACIMA PREHRANI VEZANIM
SUSTAVIMA TEKUĆINSKA
KROMATOGRAFIJA–SPEKTROMETRIJA MASA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET

Josipa Kosić–Vukšić

**ANALIZA INHIBITORA FOSFODIESTERAZE TIP 5 U
DODACIMA PREHRANI VEZANIM SUSTAVIMA
TEKUĆINSKA
KROMATOGRAFIJA–SPEKTROMETRIJA MASA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Dr. sc. Adela Krivohlavek, zn. sur.
Prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, 2025



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Josipa Kosić–Vukšić

**ANALYSIS OF PHOSPHODIESTERASE TYPE 5
INHIBITORS IN DIETARY SUPPLEMENTS BY
HYPHENATED SYSTEMS LIQUID
CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Dr. Adela Krivohlavek, Research Associate
Dr. Nives Galić, Professor

Zagreb, 2025

Zahvale

Zahvaljujem mentoricama dr. sc. Adeli Krivohlavek i prof. dr.sc. Nives Galić na predloženoj temi, poticaju, strpljenju, savjetima i razumijevanju tijekom izrade ovog rada.

Hvala Marijani Pocrnić, mag. chem. na pomoći u razvoju metode, prenesenom znanju i stečenom iskustvu kao i brojnim korisnim savjetima tijekom izrade ove disertacije.

Hvala prof. dr. sc. Predragu Novaku na lijepoj suradnji, ohrabrivanju i vođenju kroz studij.

Hvala svim mojim kolegama u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, posebno Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu voda na poticaju, razumijevanju, razgovorima, druženju i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Hvala mojim roditeljima, sestri Nikolini i bratu Ivanu na bezuvjetnoj ljubavi i podršci kako tijekom svih godina školovanja, tako i u životu.

Na kraju, najveće hvala zaslužuju moji Branko, Ira i Sven koji su u mene vjerovali i bez čije strpljivosti i podrške ovaj rad ne bi bio ostvaren. Hvala na slušanju svih mojih problema i strahova i vraćanju osmijeha na lice.

Sadržaj

SAŽETAK	X
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1. Enzim fosfodiesteraze (PDE)	4
2.1.1. Inhibitori enzima fosfodiesteraze tipa 5.....	5
2.1.2. Eretilna disfunkcija.....	9
2.1.3. Mehanizam djelovanja PDE-5I u liječenju ED.....	9
2.1.4. Nuspojave	11
2.2. Dodaci prehrani.....	12
2.2.1. Patvorenje dodataka prehrani.....	14
2.2.2. PDE-5I i njihovi analozi u dodacima prehrani.....	16
2.3. Metodologija određivanja PDE-5I u dodacima prehrani.....	18
2.3.1. Postupci pripreme uzoraka	18
2.3.2. Analitičke tehnike za određivanje PDE-5I	19
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. Materijali	27
3.1.1. Certificirani referentni materijali i kemikalije.....	27
3.1.2. Otopine.....	28
3.1.3. Instrumenti i pribor.....	28
3.1.4. Programi za upravljanje instrumentima i obradu podataka.....	31
3.2. Uzorci biljnih dodataka prehrani	31
3.3. Metode	38
3.3.1. Priprema uzoraka	38
3.3.2. Analiza PDE-5I vezanim sustavom tekućinska kromatografija–spektrometrija masa (UHPLC–QTOF)	38
3.3.3. Analiza PDE-5I vezanim sustavom tekućinska kromatografija–spektrometrija masa (HPLC–TOF).....	41
3.4. Validacija analitičkih metoda	43
3.5. Mjerna nesigurnost analitičkih metoda	46
3.6. Statistička obrada podataka	49
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	50
4.1. Optimizacija postupka ekstrakcije	50

4.2. Razvoj UHPLC–QTOF metode za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani	52
4.2.1. Optimizacija kromatografskih uvjeta	52
4.2.2. Optimizacija masenospektrometrijskih uvjeta na uređaju UHPLC–QTOF	58
4.2.3. Validacija UHPLC–QTOF metode i procjena mjerne nesigurnosti.....	87
4.3. Razvoj HPLC–TOF metode za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani.....	99
4.3.1. Optimizacija instrumentalnih uvjeta.....	99
4.3.2. Validacija HPLC–TOF metode i procjena mjerne nesigurnosti	112
4.4. Analiza uzoraka	125
4.5. Usporedba rezultata analize PDE–5I metodom UHPLC–QTOF i HPLC–TOF.....	132
§ 5. ZAKLJUČAK.....	135
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ	137
§ 7. LITERATURNI IZVORI	140
§ 8. DODATAK.....	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS.....	XVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ANALIZA INHIBITORA FOSFODIESTERAZE TIPA 5 U DODACIMA PREHRANI VEZANIM SUSTAVIMA TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA–SPEKTROMETRIJA MASA

Josipa Kosić–Vukšić

Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, Mirogojska cesta 16, 10 000 Zagreb

U ovom radu razvijene su dvije metode određivanja četiri inhibitora fosfodiesteraze tipa 5 i njihovih analoga u dodacima prehrani, koristeći vezane sustave tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena leta. Priprema uzoraka dodataka prehrani uključivala je ekstrakciju čvrsto–tekuće organskim otapalom te razrjeđivanje ekstrakta. Analiti su razdvojeni tekućinskom kromatografijom obrnutih faza, a detekcija i kvantifikacija provedeni su praćenjem odabranih prekursor iona i dva potvrdna fragmentna iona. Prikadnost metoda potvrđena je kroz validaciju, pri čemu su ispitane značajke zadovoljile unaprijed definirane kriterije prihvatljivosti. Procijenjena je proširena mjerna nesigurnost, nakon čega su metode primjenjene u analizi 49 realnih uzoraka dodataka prehrani s hrvatskog tržišta. Rezultati su pokazali da većina uzoraka sadrži ilegalne inhibitore fosfodiesteraze tipa 5 i njihove analoge, pri čemu su u nekim uzorcima zabilježene koncentracije u rasponu terapijskih doza. Ovi rezultati ukazuju na značajan problem patvorenja dodataka prehrani te naglašavaju potrebu za pojačanim nadzorom i strožim regulatornim kontrolnim mjerama.

(169 stranica, 66 slika, 34 tablica, 174 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: analozi/analizator masa koji mjeri vrijeme leta/inhitori fosfodiesteraze tipa 5/dodaci prehrani/med/tekućinska kromatografija–spektrometrija masa/validacija/

Mentori: dr. sc. Adela Krivohlavek, zn. sur., prof. dr. sc. Nives Galić

Rad prihvaćen: 03. rujna 2025.

Ocjenitelji:

1. dr. sc. Mario Cindrić, zn. savj.
2. izv. prof. dr. sc. Jasna Jablan
3. prof. dr. sc. Predrag Novak



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

ANALYSIS OF PHOSPHODIESTERASE TYPE 5 INHIBITORS IN DIETARY SUPPLEMENTS BY HYPHENATED SYSTEMS LIQUID CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

Josipa Kosić–Vukšić

Teaching Institute of Public Health dr. Andrija Štampar, Mirogojska cesta 16, 10 000 Zagreb

In this study, two methods were developed for the determination of four phosphodiesterase type 5 inhibitors and their analogs in dietary supplements, using hyphenated systems liquid chromatography–mass spectrometry with a time-of-flight analyzer. Sample preparation involved solid–liquid extraction with organic solvents, followed by extract dilution. The analytes were separated by reversed–phase liquid chromatography, and detection and quantification were performed by monitoring selected precursor ions and two confirming fragment ions. The method's suitability was confirmed through validation, with evaluated parameters meeting predefined acceptance criteria. Expanded measurement uncertainty was estimated, and the methods were applied to analyze 49 dietary supplement samples from the Croatian market. The results showed that most samples contained illegal phosphodiesterase type 5 inhibitors and their analogs, with some samples showing concentrations within the therapeutic dose range. These findings highlight a significant issue of dietary supplement adulteration, emphasizing the need for enhanced monitoring and stricter regulatory control measures.

(169 pages, 66 figures, 34 tables, 174 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: analogs/time of flight analyzer/phosphodiesterase type 5 inhibitors/dietary supplements/honey/liquid chromatography–mass spectrometry/validation/

Supervisors: Dr. Adela Krivohlavek, Research Associate; Dr. Nives Galić, Professor

Thesis accepted: September 3, 2025

Reviewers: Dr. Mario Cindrić, Senior Scientist
Dr. Jasna Jablan, Associate Professor
Dr. Predrag Novak, Professor

§ 1. UVOD

Erekttilna disfunkcija (ED) je stanje u kojem muškarac ne može postići ili održati erekciju dovoljnu za zadovoljavajući spolni odnos¹. Za njeno liječenje koriste se inhibitori fosfodiesteraze tipa 5 (PDE-5I). Do danas u svijetu postoji nekoliko komercijalno dostupnih PDE-5I. Inhibitori prve generacije uključuju sildenafil citrat (*Viagra*), tadalafil (*Cialis*) i vardenafil hidroklorid (*Levitra*). Novija verzija PDE-5I, odobrena 2012. godine, je avanafil (*Stendra* u SAD i *Spedra* u EU). Ostali inhibitori druge generacije su udenafil (*Zydena*), mirodenafil hidroklorid (*Mvix*) i lodenafil karbonat (*Helleva*)². Od lijekova iz ove skupine, u Republici Hrvatskoj za liječenje ED registrirani su lijekovi koji kao farmakološki aktivne tvari sadrže sildenafil, vardenafil, tadalafil i avanafil. PDE-5I, iako učinkoviti u liječenju ED, njihova primjena bez liječničkog nadzora može biti štetna za zdravlje zbog mogućih interakcija i nuspojava³. Najčešće nuspojave uključuju glavobolju, omaglicu, smetnje vida, začepljenost nosa, crvenilo praćeno osjećajem vrućine te žgaravicu. Među rjeđim, ali ozbiljnijim nuspojavama ističu se kardiovaskularni problemi (poremećaji srčanog ritma, srčani i moždani udar), koji mogu biti opasni po život, kao i naglo, najčešće trajno, oštećenje vida⁴.

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća upotreba biljnih lijekova i dodataka prehrani porasla je u cijelom svijetu. Dodaci prehrani svrstavaju se u kategoriju prehrambenih proizvoda te su regulirani propisima koji se odnose na hranu, prema EU Direktivi 2002/46/EC⁵. Definirani su kao koncentrirani izvori hranjivih tvari (vitamini i minerali) ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom. Prema svojim deklaracijama, trebali bi sadržavati isključivo biljne sastojke. Potrošači ih kupuju kako bi nadopunili prehranu te ih percipiraju kao prirodniju i sigurniju alternativu tradicionalnoj medicini⁶. Na tržište se stavljaju u dozirnim oblicima (kapsule, tablete, prahovi, tekućine) poput lijekova, ali ova vrsta proizvoda nije namijenjena liječenju ili prevenciji određenih bolesti. Za razliku od lijekova, biljni dodaci prehrani nisu strogo regulirani u mnogim zemljama, što olakšava njihovu distribuciju⁷.

Globalna popularnost „prirodnih“ proizvoda dovela je do čestog patvorenja dodavanjem nekontroliranih količina ilegalnih tvari, uključujući PDE-5I, koje su nadležna tijela Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) te Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrile kao lijekove za liječenje ED—a. Također, u njima se mogu pronaći neodobreni sintetski analozi PDE-5I, koji su sintetizirani uz

minimalne strukturne modifikacije odobrenih PDE–5I^{2,7,8}. Broj različitih analoga PDE–5I kontinuirano raste, s trenutno oko 90 poznatih spojeva⁹. Ova praksa predstavlja ozbiljan zdravstveni rizik za potrošače, osobito za osobe koje uzimaju druge lijekove ili imaju još neke zdravstvene probleme⁷.

Analiza PDE–5I i njihovih analoga u dodacima prehrani predstavlja izazov za analitičare, jer zahtijeva primjenu naprednih analitičkih tehnika/metoda i strategija za detekciju, identifikaciju i potvrđivanje nedopuštenih ilegalnih tvari u dodacima prehrani¹⁰. Za određivanje PDE–5I i analoga dosad su korištene različite tehnike, no prevladava upotreba vezanih sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*, LC–MS)^{6,11–15}. Koristi se spektrometrija masa niske (engl. *Low Resolution*, LR) i visoke rezolucije (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS), pri čemu se HRMS pokazala superiornom i u ciljanoj i neciljanoj analizi zbog mogućnosti identifikacije analita fragmentacijom te izvrsnom točnošću mase i izotopnim profilima^{9,16–18}. Dodatni izazovi kod identifikacije i kvantifikacije PDE–5I i njihovih analoga su nedostatak referentnih standarda za mnoge spojeve te vrlo velika strukturna raznolikost novih analoga. Posljednjih godina provedena su brojna istraživanja o prisutnosti PDE–5I u dodacima prehrani i pojedinim prehrambenim proizvodima. U većini studija pronađeni su PDE–5I pri čemu su glavni ilegalni spojevi bili sildenafil i tadalafil. Posebno zabrinjava činjenica da su u nekim uzorcima PDE–5I prisutni u supraterepeutskim koncentracijama koje višestruko premašuju maksimalnu dnevnu dozu.

S obzirom na identificirane rizike povezane s nedopuštеноm prisutnošću PDE–5I i njihovih analoga u dodacima prehrani, ciljevi ovog doktorskog rada su:

- razvoj analitičkih metoda za kvantitativnu analizu ciljanih PDE–5I i kvalitativnu analizu njihovih sintetskih analoga u dodacima prehrani primjenom vezanih sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa uključujući tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti povezan s analizatorom koji mjeri vrijeme leta (engl. *High Performance Liquid Chromatography–Time of Flight*, HPLC–TOF) i tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan s kvadrupol–TOF analizatorom masa (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography Quadrupole–Time of Flight*, UHPLC–QTOF)
- validacija i procjena mjerne nesigurnosti razvijenih metoda

- analiza uzoraka dodataka prehrani namijenjenih za pomoć kod erektilne disfunkcije nabavljenih na hrvatskom tržištu (Zagreb)
- usporedba primijenjenih metoda za rutinsko određivanje PDE-5I u dodacima prehrani

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Enzim fosfodiesteraze (PDE)

Fosfodiesteraze su enzimi koji kontroliraju unutarstanične razine cikličkih nukleotida, a prvi su ih otkrili Sutherland i suradnici. Općenito, PDE su skupina enzima odgovornih za kidanje fosfodiesterske veze sekundarnih glasnika 3',5' – cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) ili 3',5' – cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) pri čemu nastaju neaktivni 5' – adenozin monofosfat (AMP) ili 5' – gvanozin monofosfat (GMP). PDE su podijeljene u 11 obitelji (PDE1 – PDE11) koje se nalaze u različitim stanicama i tkivima te se međusobno razlikuju prema strukturnim karakteristikama, specifičnosti supstrata, kinetičkim svojstvima i osjetljivosti na endogene regulatore i inhibitore (Tablica 1). Neke PDE su visokospecifične za hidrolizu cAMP (PDE4, PDE7 i PDE8), neke su visokospecifične za cGMP (PDE5, PDE6 i PDE9), dok neke pokazuju mješovitu specifičnost (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 i PDE11)^{19–21}.

Tablica 1. Raspodjela PDE enzima u tkivima čovjeka^{19,21}.

PDE obitelj	Broj gena	Supstrat	Distribucija u tkivima
PDE1	3	cGMP>cAMP	Mozak, srce, pluća, bubreg, jetra, vaskularni i viscelarni glatki mišići, skeletni mišići, testis, imunološki sustav, krvne žile, trombociti, limfociti
PDE2	1	cAMP i cGMP	Kora nadbubrežne žlijezde, mozak, kavernožno tijelo, srce, bubreg, jetra, viscelarni glatki mišić, skeletni mišić
PDE3	2	cAMP i cGMP	Kavernožno tijelo, srce, trombociti, vaskularni i viscelarni glatki mišići, jetra, bubreg, masno tkivo
PDE4	4	cAMP	Bubrezi, pluća, mastociti, mozak, srce, skeletni mišići, kavernožno tijelo, srce, trombociti,

PDE obitelj	Broj gena	Supstrat	Distribucija u tkivima
			vaskularni i viscelarni glatki mišići, skeletni mišići, štitnjača, testis, neuralno tkivo
PDE5	1	cGMP	Kavernozno tijelo, trombociti, skeletni mišići, krvožilni, vaskularni i viscelarni glatki mišić
PDE6	3	cGMP	Mrežnica
PDE7	2	cAMP	Skeletni mišići, srce, limfociti, gušterača,
PDE8	2	cAMP	Testis, jajnici, tanko i debelo crijevo
PDE9	1	cGMP	Slezena, tanko crijevo, mozak
PDE10	1	cAMP i cGMP	Testis, štitnjača, strijatum
PDE11	1	cAMP i cGMP	Kavernozno tijelo, hipofiza, jetra, bubrezi, prostate, skeletni mišići, testisi

PDE5 je najviše prisutna u glatkim mišićima kavernoznih tijela penisa, dok se u manjim količinama nalazi u trombocitima, vaskularnim i visceralnim glatkim mišićima te skeletnim mišićima. PDE5 je strukturiran kao dimer, sastavljen od regulacijskog i reakcijskog dijela. Regulacijski dio, smješten na amino-terminalnom kraju monomera, uključuje fosforilacijsko mjesto, dva alosterička cGMP-vezna mjesta i dio za dimerizaciju (mjesto vezanja drugog monomera). Reakcijski dio, smješten na karboksi-terminalnom kraju monomera, sadrži katalitičku domenu s dva Zn^{2+} vezna mjesta i cGMP-vezno mjesto. Za razgradnju supstrata PDE5 (cGMP), molekula supstrata najprije mora zauzeti alosteričku domenu regulacijskog dijela, dok protein kinaza G (PKG) mora fosforilirati enzim, što uzrokuje promjenu konformacije reakcijskog dijela enzima i izlaganje katalitičke domene prema cGMP-veznom mjestu, gdje supstrat zatim prolazi kroz degradaciju^{22,23}. PDE5 enzim regulira funkciju putem dostupnosti, odnosno koncentracije supstrata unutar stanice. Klasični inhibitori PDE i kompetitivni, selektivni analozi cikličkog nukleotida cGMP-a djeluju samo na reakcijski dio PDE5, a ne na regulacijski dio enzima.

2.1.1. Inhibitori enzima fosfodiesteraze tipa 5

PDE-5I skupina su lijekova koji se koriste za liječenje muškaraca s erektilnom disfunkcijom (impotencijom). Do danas u svijetu postoji nekoliko komercijalno dostupnih PDE-5I. Prva tri

odobrena PDE-5I su sildenafil citrat (Viagra[®], Pfizer, SAD), tadalafil (Cialis[®], Eli Lilly, SAD) i vardenafil hidroklorid (Levitra[®], Bayer, Njemačka).

Sildenafil citrat, trgovačkog imena Viagra[®], proizvođača Pfizera, prvi je odobreni PDE-5I za liječenje ED. Primarno je Viagra bila namijenjena za liječenje angine pectoris, no zbog prijavljenih nuspojava, uključujući erekciju penisa te nekoliko objavljenih studija o njezinom mogućem mehanizmu djelovanja, Pfizer je ubrzo preusmjerio istraživački fokus s angine pectoris na ED. Krajem 1993. godine, provedene su prve kliničke studije s primjenom sildenafil na pacijentima s ED²⁴. Sildenafil se pokazao vrlo učinkovitim, s prikladnim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima, što je dovelo do provedbe dodatnih studija i razvojnih programa na većem broju sudionika i različitim skupinama bolesnika s ED²⁵. Sildenafil je odobren od strane FDA i EMA 1998. godine²⁴. Preporučene doze su 25, 50 i 100 mg, a učinkovitost lijeka traje do 12 sati, s početkom otprilike 30 minuta nakon uzimanja²⁶.

Vardenafil, trgovačkog imena Levitra[®], proizvođača Bayer, drugi je odobreni PDE-5I za liječenje ED. Vardenafil je približno 10 puta potentniji od sildenafil u inhibiciji PDE5, zbog čega se preporučuje u nižim dozama od 5, 10 i 20 mg. Njegovo djelovanje započinje 15 do 30 minuta nakon primjena, a učinkovitost traje do 12 sati²⁶⁻²⁸.

Tadalafil, trgovačkog imena Cialis[®], proizvođača Eli Lilly, dostupan je na tržištu od 2003. godine. Poznat je i pod nazivom “vikend pomoć” jer ima produljeni učinak do 36 sati nakon uzimanja što je znatno dulje u usporedbi sa sildenafilom i vardenafilom. Preporučene doze su 5, 10 i 20 mg^{26,29,30}.

Avanafil, trgovačkog naziva Stendra[®], proizvođača Vivus Inc., PDE-5I je druge generacije, odobren od FDA 2012. godine, a od EMA-e 2013. godine. Dostupan je u obliku tableta u dozama od 50, 100 i 200 mg. Maksimalnu koncentraciju u plazmi (T_{max}) postiže 30 – 45 minuta nakon uzimanja, a djelovanje započinje već 15 min od uzimanja. Međutim, u usporedbi sa ostalim PDE-5I, avanafil ima najkraću učinkovitost, koja traje oko 6 sati^{26,30}. Tablica 2. prikazuje farmakokinetička i farmakodinamička svojstva sildenafil, vardenafila, tadalafila i avanafila.

Kasnije su odobreni i udenafil (Zydena[®], Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd) u Južnoj Koreji i Malaziji, mirodenafil hidroklorid (Mvix[®], SK Chemicals Life Science) u Južnoj Koreji, i lodenafil karbonat (Helleva[®], Cristalia Produtos Quimicos e Farmaceuticos) u Brazilu². Iz ove skupine lijekova u Republici Hrvatskoj za liječenje ED registrirani su lijekovi koji kao farmakološki aktivne tvari sadrže sildenafil, vardenafil, tadalafil i avanafil.

Tablica 2. Farmakokinetička i farmakodinamička svojstva sildenafil, vardenafil, tadalafil i avanafil^{26,29}.

Parametar	Sildenafil (Viagra®)	Vardenafil (Levitra®)	Tadalafil (Cialis®)	Avanafil (Stendra®)
Terapeutske doze (mg)	25, 50, 100	5, 10, 20	5, 10, 20	50, 100, 200
Početak djelovanja (min)	30–60	15–30	15–45	15
T _{max} (min)	60	60	120	30–45
Učinkovitost (h)	12	12	35	6
Metabolizam	CYP3A4	CYP3A4	CYP3A4	CYP3A4
Eliminacija	80 % feces	91–95 % feces	61 % feces	62% feces
	13 % urin	2–6 % urin	36 % urin	21 % urin
IC ₅₀ (nM)	1,6	0,1	4,0	5,2
Ostale PDE inhibicije	PDE1, PDE6 (mrežnica)	PDE1, PDE6	PDE11 (mišići)	PDE6 (mrežnica)

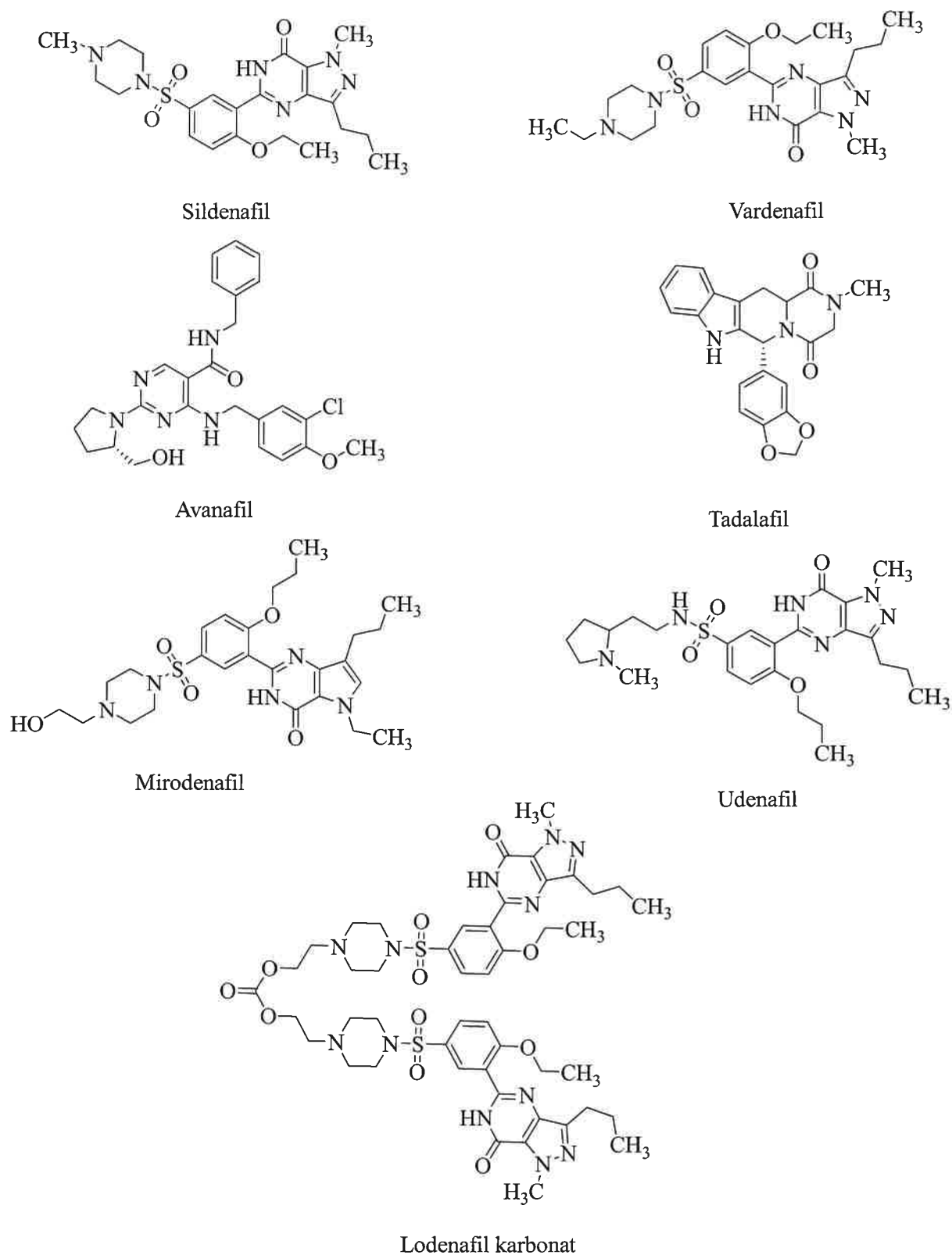
T_{max} – vrijeme potrebno da lijek dosegne maksimalnu koncentraciju; CYP3A4 – citokrom P3A4; IC₅₀ – koncentracija spoja inhibitora pri kojoj se postiže 50 % maksimalne inhibitorne aktivnosti

Osnovna fizikalno – kemijska svojstva odobrenih PDE–5I navedena su u Tablici 3, dok njihove strukture prikazuje Slika 1.

Tablica 3. Fizikalno–kemijska svojstva odobrenih PDE–5I^{31,32}.

<i>Analit</i>	<i>Formula</i>	<i>Mol. masa</i> <i>g mol⁻¹</i>	<i>logK_{ow}</i>	<i>pK_{a,1}</i>	<i>pK_{a,2}</i>	<i>Topljivost u</i> <i>vodi (mg mL⁻¹)</i>
Sildenafil	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	474,6	2,75	11,14	5,99	3,5
Vardenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	488,6	2,79	11,75	6,21	0,11
Avanafil	C ₂₃ H ₂₆ ClN ₇ O ₃	483,9	2,4	12,35	5,55	gotovo netopljiv
Tadalafil	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	389,4	1,42	15,17	–4,2	gotovo netopljiv
Udenafil	C ₂₅ H ₃₆ N ₆ O ₄ S	516,7	–	10,25	8,44	0,079
Mirodenafil	C ₂₆ H ₃₇ N ₅ O ₅ S	531,7	–	7,69	5,83	0,181
Lodenafil karbonat	C ₄₇ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁ S ₂	1035,2	–	7,6	5,47	0,092

logK_{ow} – koeficijent raspodjele oktanol–voda; *pK_a* – konstanta disocijacije kiseline



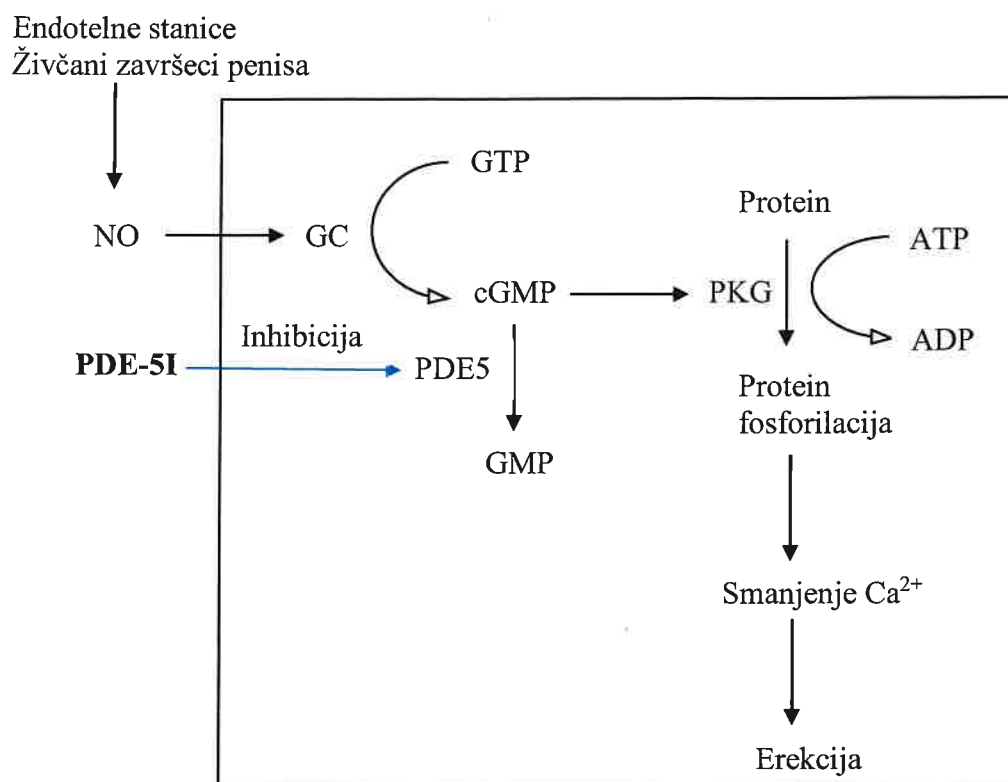
Slika 1. Kemijske strukture PDE-5I navedenih u Tablici 3. Strukture su izrađene pomoću programa ChemDraw.

2.1.2. Eretilna disfunkcija

Eretilna disfunkcija definira se kao nemogućnost postizanja i održavanja erekcije dostatne za zadovoljavajući spolni odnos¹. Epidemiološke studije su pokazale porast incidencije i prevalencije ED-a. Prema procjenama, danas u Europskoj Uniji od ED-a boluje oko 40 milijuna muškaraca, a predviđa se da će se do 2025. godine taj broj udvostručiti. Prevalencija ED među muškarcima u dobi od 40 do 49 godina iznosi 2 % – 9 %, a povećava se na 20 % – 40 % u skupini od 60 do 69 godina. Kod muškaraca starijih od 70 godina, prevalencija premašuje 50 %^{33–35}. Za postizanje erekcije potrebno je nekoliko preduvjeta: odgovarajuće psihičko zdravlje, normalne hormonalne funkcije, neoštećen mozak i živčani sustav te dotok odgovarajuće količine krvi u penis. Uzroci ED se dijele na organske i psihogene. Organski uzroci su: koronarne bolesti (arteroskleroza, krvožilni poremećaji, hipertenzija, hiperkolesteromija, infarkt miokarda), dijabetes, prostatektomija i uzimanje lijekova (antihipertenzivi, antidepresivi, antipsihotici, antihistaminici), neurološke bolesti, endokrinopatije, traume i dr. Psihogeni uzroci ED-a su tjeskoba, stres, depresija, problematično obiteljsko okruženje, strah od neuspjeha. Osim navedenih, brojne druge bolesti i stanja mogu pridonijeti razvoju ED^{36,37}. Ovaj problem može biti prolazan ili trajan, a isto tako može imati značajan utjecaj na kvalitetu života muškaraca, ali se danas sve više prepoznaje kao medicinski problem koji može biti uspješno liječen.

2.1.3. Mehanizam djelovanja PDE-5I u liječenju ED

Potpuno razumijevanje mehanizma erekcije penisa ključno je za objašnjenje načina na koji PDE-5I postižu svoje pozitivne učinke. Funkcionalno stanje penisa, bilo da je u opuštenom (flacidnom) stanju ili erekciji, određeno je tonusom glatkih mišića. Simpatički čimbenici održavaju opušteno stanje, dok parasimpatički čimbenici potiču opuštanje glatkih mišića, što rezultira erekcijom. Dušikov(II) oksid (NO), ključni je medijator opuštanja glatkih mišićnih vlakana penisa. NO potreban za postizanje erekcije može potjecati iz dva glavna izvora: izravno iz parasimpatičkih živaca ili neizravno iz endotelnih stanica poznatih kao kavernozno tijelo (lat. *corpus cavernosum*) i krvnih žila penisa, kao odgovor na kolinergičnu stimulaciju. Općenito, glatki mišići koji oblažu penis, moraju biti u opuštenom stanju kako bi došlo do erekcije^{38,39}. Slika 2. prikazuje mehanizam djelovanja PDE-5I u liječenju ED.

Slika 2. Mehanizam djelovanja PDE-5I u liječenju ED¹⁹.

NO se sintetizira iz aminokiseline L-arginin djelovanjem enzima dušikov(II) oksid-sintaze (engl. *Nitric Oxide Synthase*, NOS). Tijekom seksualne stimulacije, endotelne stanice i živčani završeci penisa oslobađaju NO direktno u penis⁴⁰. NO zatim difundira u citoplazmu glatkih mišićnih stanica i veže se za intracelularnu topivu guanilat ciklazu (GC), inducirajući njezinu konformacijsku promjenu. Kao rezultat toga, guanozin trifosfat (GTP) pretvara se u cGMP putem katalitičkog puta¹⁹. Povećanje intracelularne razine cGMP-a aktivira cGMP ovisnu proteinsku kinazu (PKG), koja zauzvrat smanjuje intracelularnu razinu kalcija (Ca^{2+}) putem fosforilacije specifičnih membranskih proteina stanica glatkog mišića (fosfolambina)⁴¹. Smanjenje koncentracije Ca^{2+} kao i fosforilacija fosfolambina posredstvom NO-a, ključni su za relaksaciju mišića i postizanje erekcije tijekom seksualne stimulacije^{19,41}.

Nakon prestanka seksualne stimulacije, razina NO koja se oslobađa iz parasimpatičkih živaca opada, što rezultira smanjenjem razine cGMP-a u glatkim mišićima zbog smanjene sinteze putem GC, dok se istovremeno povećava njegova razgradnja putem PDE5. Posljedično, mišići se kontrahiraju, a penis postaje sve mekši zbog smanjenog dotoka krvi u kavernozna tijela²².

Enzim PDE5, razgrađuje cGMP u neaktivni GMP, što dovodi do smanjenja erekcije. Ova razgradnja odvija se na katalitičkom mjestu u prisutnosti vezanog cinka¹⁹. PDE-5I smanjuju aktivnost PDE5 natječući se s cikličkim GMP-om, čime posljedično smanjuju njegovu razgradnju i povećavaju učinke NO-a. Ovaj proces održava povišenu razinu cGMP-a i produžuje erekciju²⁹.

2.1.4. Nuspojave

PDE-5I su vrlo učinkoviti u liječenju ED, ali ako se koriste bez liječničkog nadzora mogu biti štetni za zdravlje zbog različitih nuspojava i interakcija³. Naime, niti jedan od inhibitora nije selektivan samo za PDE5 receptor, već dolazi do unakrsne reaktivnosti s drugim izoenzimima PDE, što rezultira različitim nuspojavama. Najčešće nuspojave specifične za ovu klasu lijekova uključuju glavobolju, crvenilo lica (najizraženije kod sildenafil), začepljenje nosa ili rinitis, dispepsiju, bolove u leđima i mialgiju. Mialgija je povezana s visokom koncentracijom enzima PDE11 u skeletnim mišićima, koji pokazuje značajnu križnu reaktivnost s tadalafilom. Osim toga, mogu se javiti poremećaji percepcije boja (plava izmaglica) što je posljedica visoke koncentracije enzima PDE6 u mrežnici, zbog čega su retinalne stanice osjetljive na PDE-5I. Ovaj učinak je posebno izražen kod sildenafil, koji ima visok afinitet za inhibiciju PDE6 u PDE5. Ostale moguće nuspojave uključuju hipotenziju i vrtoglavicu⁴²⁻⁴⁴.

Rjeđe, ali ozbiljnije nuspojave uključuju priapizam (dugotrajna i bolna erekcija), gubitak sluha, iznenadni gubitak vida, kao i potencijalno povećan rizik od melanoma i raka prostate⁴².

Istodobna primjena svih PDE-5I sa nitratima, poput nitroglicerina, izosorbid mononitrat i gliceril trinitrata, kontraindicirana je, jer kod bolesnika s težim kardiovaskularnim poremećajima može pojačati vazodilatorni i hipotenzivni učinak⁴³. Svi PDE-5I primarno se metaboliziraju putem izoenzima 3A4 citokroma P450 (engl. *Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4*, CYP3A4). Zbog toga ih treba primjenjivati s oprezom u kombinaciji s inhibitorima CYP3A4 (ketokonazol, itrakonazol, eritromicin, klaritromicin, ritonavir, sok grejpa) koji mogu povećati njihove koncentracije u plazmi. Također, preporučuje se izbjegavanje istodobne primjene s induktorima CYP3A4 (rifampicin, karbamazepin, fenitoin) koji mogu smanjiti koncentraciju PDE-5I u plazmi i time oslabiti njihovo djelovanje⁴³.

2.2. Dodaci prehrani

Dodaci prehrani (engl. *Food Supplements*) definiraju se kao pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom, a koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja. Hranjivim tvarima u dodacima prehrani smatraju se vitamini i minerali, dok se u druge tvari ubrajaju aminokiseline, masne kiseline, vlakna, organi i ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom. Na tržište se stavljaju u dozirnim oblicima poput kapsula, pastila, tableta, kao i u obliku vrećica sa prahom, ampula s tekućinom, bočica s kapaljkom te drugih sličnih oblika tekućine i praha namijenjenih za konzumaciju u odmjerenim količinama^{5,45}. Za proizvodnju biljnih pripravaka koriste se svježi ili osušeni dijelovi biljaka, bilo cijeli ili u segmentima (korijen, list, plod, cvijet), kao i čiste tvari biljnog podrijetla te proizvodi dobiveni iz navedenih biljnih vrsta. Popis odobrenih ljekovitih biljnih vrsta reguliran je Pravilnikom o hrani za posebne prehrambene potrebe Republike Hrvatske^{5,46}.

Ljudi su od davnina koristili biljne lijekove za prevenciju bolesti i očuvanje zdravlja, kao i za ublažavanje i liječenje različitih zdravstvenih tegoba. Posljednjih godina, biljni sastojci sve su više uključeni u lijekove, dodatke prehrani, nutraceutike, homeopatske pripravke, hranu i kozmetiku¹⁰. Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća upotreba biljnih lijekova i dodataka prehrani uvelike je porasla u cijelom svijetu. Povećana potrošnja ovih proizvoda među različitim skupinama potrošača povezana je s nizom čimbenika, uključujući:

- a) rastuće nepovjerenje prema konvencionalnoj medicini i farmaceutskim proizvodima te sve veći interes za alternativne terapije,
- b) uvjerenje kako su biljni proizvodi “prirodni”, “zdravi” i sigurniji,
- c) sve izraženiji trend samoliječenja, kojim pojedinci nastoje preuzeti veću kontrolu nad vlastitim zdravljem i donošenjem odluka koje na njega utječu^{10,47}.

Dodaci prehrani široko se koriste u različite svrhe, uključujući uravnoteženje prehrane, regulaciju tjelesne mase, poboljšanje sportske izvedbe, održavanje zdravlja, prevenciju kroničnih bolesti, poboljšanje izgleda, poboljšanje seksualne potencije i druge ciljeve^{47,48}. Međutim, rastuća popularnost i konzumacija velikih količina dodataka prehrani izazivaju zabrinutost zbog njihove sigurnosti i mogućih zdravstvenih rizika. Problemi mogu nastati

uslijed nepravilne primjene proizvoda, dodataka prehrani, interakcije s propisanim lijekovima, loše kvalitete, upitne čistoće, jačine i/ili sastava⁴⁷.

U Sjedinjenim Američkim Državama, nadležno tijelo za regulaciju dodataka prehrani i lijekova je FDA. Za razliku od lijekova, FDA ne provodi prethodna ispitivanja učinkovitosti i sigurnosti za svaki dodatak prehrani prije nego što se stavi na tržište. Proizvođači su dužni osigurati dokaze da njihovi proizvodi nisu štetni te da su proizvedeni u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP), no unatoč tome, dodaci prehrani mogu se lako plasirati na tržište i prije provjere⁴⁹. Ova mogućnost jednostavnog ulaska na tržište izaziva zabrinutost u pogledu kvalitete i sigurnosti proizvoda. Kontrola se najčešće provodi putem prijava potrošača ili kao dio redovitih inspekcijskih pregleda na tržištu. Nedostatak odgovornosti proizvođača i nedovoljan nadzor nadležnih institucija, doveli su do učestalijih upozoravajućih izvještaja na stranicama FDA-a i u javnim medijima o prisutnosti zabranjenih aktivnih sastojaka u biljnim proizvodima, što može predstavljati ozbiljnu prijetnju ljudskom zdravlju⁵⁰.

U Europskoj uniji, kojoj pripada i Hrvatska, dodaci prehrani regulirani su zakonodavstvom o hrani, temeljenim na Direktivi 2002/46/EZ⁵ Europskog parlamenta i Vijeća. Ova direktiva usklađuje zakone država članica u vezi s dodacima prehrani te propisuje zahtjeve koje proizvodi moraju ispunjavati kako bi bili dostupni na tržištu EU. Države članice obvezne su osigurati da dodaci prehrani ispunjavaju odredbe Direktive, što uključuje regulaciju sastojaka koji se mogu koristiti, određivanje dopuštenih doza, pravila označavanja te sigurnosne zahtjeve. Ako proizvođač želi plasirati dodatak prehrani na tržište EU, a određeni izvor hranjivih tvari ili hranjiva tvar nije navedena u Direktivi 2002/46/EZ⁵, mora podnijeti zahtjev za odobrenje Europskoj komisiji. U tom postupku, proizvođač treba prikupiti i dostaviti relevantne informacije o sastojku, uključujući podatke o sigurnosti, učinkovitosti i primjenjivosti u dodacima prehrani. Nakon podnošenja zahtjeva, Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) provodi znanstvenu procjenu sigurnosti i učinkovitosti tvari. Na temelju rezultata procjene, Europska komisija donosi odluku o odobrenju ili odbijanju tvari za uporabu u dodacima prehrani.

Kao članica EU-a, Hrvatska, primjenjuje nacionalnu regulativu iz područja hrane, uključujući Pravilnik o dodacima prehrani⁴⁵ koji je podzakonski akt Zakona o hrani⁵¹. Ova regulativa usklađena je s odredbama EU Direktive 2002/46/EC⁵, a nadležnost za provedbu i nadzor na nacionalnoj razini imaju državne institucije. Time se osigurava da dodaci prehrani

dostupni na Hrvatskom tržištu zadovoljavaju iste standarde sigurnosti i kvalitete kao i oni u ostatku EU. Dodaci prehrani nalaze se u nadležnosti Ministarstva zdravstva. Budući da nisu namijenjeni liječenju bolesti, ne prolaze rigorozan postupak odobravanja poput lijekova. Njihov sastav, označavanje i stavljanje na tržište regulirani su Zakonom o prehranbenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima⁵², Pravilnikom o dodacima prehrani⁴⁵, Pravilnikom o uvjetima za uvrštavanje u program monitoringa i provedbu programa monitoringa dodataka prehrani⁵³. U EU i Republici Hrvatskoj, zabranjeno je stavljanje u promet proizvoda s tvrdnjama koje bi mogle dovesti potrošače u zabludu.

Kontrola kakvoće dodataka prehrani odnosi se na ispitivanje zdravstvene i sanitarne ispravnosti, ali ne i na ispitivanje farmaceutske kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti, kao što je to propisano za lijekove. Kontrola zdravstvene ispravnosti dodataka prehrani uključuje testiranje na prisutnost određenih dopuštenih ili zabranjenih kontaminanata poput teških metala i pesticida, kao i testiranje na aditive, vitamine, alergene, te na prisutnost ilegalnih farmakoloških sastojaka⁵⁴.

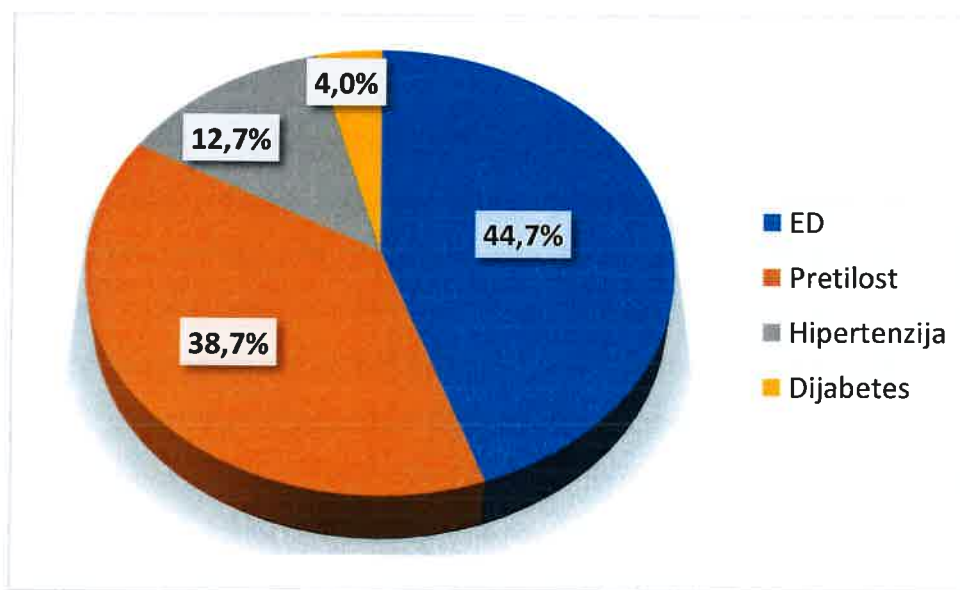
Unatoč širokom rasponu propisa, problemi sa sigurnošću hrane mogu se pojaviti u različitim državama članicama, što je dovelo do uspostave Sustava brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje u EU (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF). RASFF omogućava nadzor vlasti kroz brz i učinkovit mehanizam razmjene informacija i obavijesti koje izdaju države članice EU. Tim podacima, države članice mogu poduzeti odgovarajuće mjere, upozoriti potrošače i povući određene proizvode s tržišta⁴⁸.

2.2.1. Patvorenje dodataka prehrani

Povećana dostupnost i nekontrolirana uporaba dodataka prehrani i biljnih pripravaka, popraćena je i povećanom učestalošću patvorenja ovih proizvoda raznim kontaminantima i ilegalnim tvarima. Konzumacija takvih patvorenih, kontaminiranih ili pogrešno označenih proizvoda predstavlja značajan zdravstveni rizik⁶. Ovi rizici uključuju izloženost kemijskim kontaminantima (npr. biljnim toksinima⁵⁵, pesticidima⁵⁶, mikotoksinima⁵⁷ ili teškim metalima⁵⁸), alergijskim reakcijama te interakcijama prirodnih komponenti s nedeklariranim lijekovima^{3,59,60}. Drugi ozbiljni rizici mogu proizaći iz namjernog dodavanja ilegalnih sintetskih tvari (npr. odobrenih receptnih lijekova i njihovih strukturnih analoga, lijekova koji nisu podvrgnuti kliničkim ispitivanjima ili lijekova koji su povučeni iz upotrebe zbog ozbiljnih

nuspojava) s ciljem postizanja trenutnog farmakološkog djelovanja ili pojačavanja navodnog biološkog učinka⁶¹. Ove ilegalno dodane tvari, koje se dodaju dodacima prehrani ili biljnim sirovinama u proizvodnji, ponekad značajno premašuju terapijsku dozu pojedinog lijeka⁶. Nažalost, slabi sustavi kontrole kvalitete, neadekvatne zakonske mjere i nekontrolirani kanali distribucije (npr. internet) pridonose ponudi nekvalitetnih proizvoda koji svojim štetnim djelovanjem predstavljaju ozbiljan problem za sigurnost hrane i zdravlje ljudi, jer potrošači nisu svjesni rizika povezanih s konzumacijom takvih proizvoda¹⁰.

Ovisno o namjeni dodatka prehrani, ilegalno se dodaju farmakološki aktivne tvari, poput PDE-5I^{12,62,63}, lijekova za mršavljenje^{12,64,65}, nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*, NSAID)^{12,66,67}, lijekova za hipertenziju⁶⁸, antidijabetičkih lijekova^{12,69} ili anaboličko-androgenih steroida⁷⁰. Dodatni problem predstavlja upotrebu analoga ovih tvari za koje nisu dostupne farmakološke studije, kao i korištenje lijekova sumnjive kvalitete¹⁰. Prema istraživanjima provedenim u razdoblju od 2009. do 2019., najveći postotak patvorenja zabilježen je upravo kod dodataka prehrani namijenjenih za pomoć u liječenju problema s ED-om (44,7%), nakon čega slijede dodaci za regulaciju tjelesne mase odnosno mršavljenje (38,7%), dodaci prehrani za snižavanje visokog krvnog tlaka (12,7%) i dodaci prehrani za dijabetičare (4,0%), kako je prikazano na Slici 3³⁵.



Slika 3. Izvještaj o patvorenju dodataka prehrani u periodu od 2009. – 2019. godine³⁵.

U dodacima prehrani za koje se tvrdi da reguliraju šećer u krvi ili liječe dijabetes, prijavljeni su različiti lijekovi za snižavanje šećera u krvi. Najčešće otkriveni antidijabetici u dodacima prehrani su: glibenklamid (derivat sulfoniluree), rosiglitazon (derivat tiazolidiona) i metformin (derivat bigvanida)^{12,69}. Istraživanja su pokazala da su krivotvoreni dodaci prehrani koji navode učinkovitost u snižavanju ili održavanju optimalnog krvnog tlaka prvenstveno sadržavali amlodipin, indapamid, valsartan, klonidin i hidroklorotiazid⁶⁸. NSAID lijekovi uglavnom su pronađeni u dodacima prehrani namijenjenim liječenju reumatoidnog artritisa, ekcema ili kroničnih bolova u leđima. Analizom su detektirani sljedeći lijekovi: fenilbutazon, aminopirin, indometacin, hidrokortizon, deksametazon, ibuprofen, diklofenak, salicilna kiselina i naproksen^{12,66,67}. Dodaci prehrani koji se reklamiraju kao sredstva za aktivaciju metabolizma i sagorijevanje masti često su patvoreni sa stimulansima te su zabilježene velike količine nedeklariranih sastojaka poput kofeina, efedrina i njegovih analoga (pseudoefedrin, metilefedrin), metilendioksimetamfetamin ili β -metilfenetilamin^{6,71}. Ozbiljan problem predstavlja i patvorenje proizvoda za izgradnju mišića anaboličkim androgenim steroidima i njihovim analogima. Korištenje dodataka prehrani obogaćenih stimulansima i anaboličkim steroidima povezano je s visokim rizikom otkrivanja slučajeva dopinga budući da su sportaši glavna skupina potrošača⁷².

2.2.2. PDE-5I i njihovi analozi u dodacima prehrani

PDE-5I poput sildenafil, tadalafil i vardenafil, zajedno s njihovim neodobrenim analogima, čine veliku i značajnu skupinu farmaceutski aktivnih tvari koje se dodaju proizvodima radi poboljšanja ED^{2,7}. Neodobreni analozi ovih lijekova nastaju minimalnim strukturnim modifikacijama odobrenih PDE-5I, poput preuređenja jednog ili više atoma ili dodavanje/eliminacija funkcionalnih grupa. Njihova uporaba raste jer proizvođači na taj način nastoje izbjeći otkrivanje patvorenja tijekom rutinskih kontrolnih ispitivanja⁷³. Razlog porasta uporabe prirodnih proizvoda za ED je široka dostupnost, diskretnost, anonimnost te prihvatljiva cijena⁷³. Procjenjuje se da je u Europi kupljeno oko šest milijuna ilegalnih proizvoda koji sadrže PDE-5I izvan službenog zdravstvenog sustava⁷. Do danas je u znanstvenoj literaturi zabilježeno oko 90 neodobrenih analoga PDE-5I i taj broj neprestano raste⁹. Neodobreni PDE-5I analozi mogu imati sličnu, ali i potpuno različitu farmakološku učinkovitost u odnosu na odobrene PDE-5I. Posebno zabrinjava činjenica da ovi strukturni analozi nisu klinički

ispitani u pogledu djelotvornosti, sigurnosti, toksičnosti i mehanizma djelovanja. Promjene u njihovoj molekularnoj strukturi mogu značajno utjecati na apsorpsiju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje, što povećava rizik od nepoznatih nuspojava⁷⁴. Na primjer, analog sildenafil, propoksifenil–tiohidroksihomosildenafil, pokazuje 10 puta veću inhibiciju enzima PDE5 u odnosu na sildenafil, što znači da može izazvati ozbiljnije nuspojave pri istoj dozi⁶². Analizi sildenafil najčešće su detektirani u dodacima prehrani u usporedbi s ostalim PDE–5I analogima. Razlog tome je niska cijena i lako dostupne sirovine potrebne za njihovu sintezu, kao i činjenica da je sinteza sildenafil iz Pfizerovog patenta omogućila razvoj stotina aktivnih analoga. Što se tiče, analoga tadalafil, broj koraka u sintezi je relativno mali, no ključni sastojak, piperonal, zajedno s njegovim analogima, strogo je kontroliran od strane Međunarodnog odbora za kontrolu narkotika (engl. *International Narcotics Control Board*, INCB)^{7,75}. Piperonal se također koristi u proizvodnji 3,4–metilendioksimetamfetamina (MDMA, popularni naziv ecstasy) i uvršten je na crvenu listu prekursora i kemikalija koje se često koriste u ilegalnoj proizvodnji droga i psihotropnih tvari⁷⁶. Zbog toga su analozi tadalafil rjeđe detektirani, unatoč jednostavnijoj sintezi i znatno duljem trajanju djelovanja (36 h) u usporedbi sa sildenafilom (4 h). Vardenafil ima najbrži početak djelovanja, ali i najkraće trajanje učinka u usporedbi sa sildenafilom i tadalafilom što može biti razlog zašto su njegovi analozi najmanje zastupljeni na tržištu patvorenih proizvoda^{2,7}. Do danas, nisu zabilježeni slučajevi patvorenja s avanafilom ili njegovim analogima.

Podaci iz RASFF-a pokazuju da je krivotvorenje dodataka prehrani s PDE–5I i njihovim analogima, kako ranije poznatim tako i novootkrivenim, stalno prisutno te bilježi rastući trend. Predviđa se da će globalna prevalencija ED–a doseći 322 milijuna muškaraca do 2025³⁴. Istovremeno, procjenjuje se da će legalno globalno tržište PDE–5I u farmaceutskoj industriji porasti za 3,78 milijardi USD uz složenu godišnju stopu rasta (engl. *Compound Annual Growth Rate*, CAGR) od 6,85 % između 2023. i 2028. godine⁷⁷. Zanimljivo je da u Hrvatskoj, zemlji s približno 3,8 milijuna stanovnika, prema bazi lijekova Hrvatske agencije za lijekove, postoji čak 48 odobrenih lijekova ATC koda (engl. *Anatomical Therapeutic Chemical*, ATC, Classification System) G04BE (lijekovi namijenjeni liječenju ED) koji se izdaju isključivo na recept⁷⁸. S druge strane, globalno tržište dodataka prehrani za seksualno zdravlje očekuje značajan rast, s procijenjenih 2,548 milijardi USD u 2022. na 4,201 milijardu USD do 2028., uz CAGR od 8,69 %⁷⁹. Posljednjih godina prodaja lijekova i dodataka prehrani putem interneta ubrzano raste diljem svijeta, što dodatno doprinosi širenju i legalnog i ilegalnog tržišta

proizvoda za liječenje ED–a. Kao što su pokazale prethodne studije, krivotvoreni dodaci prehrani koji sadrže PDE–5I inhibitore, njihove analoge ili njihove različite kombinacije predstavljaju značajan farmakološki i toksikološki rizik za javno zdravlje^{3,10,80}.

2.3. Metodologija određivanja PDE–5I u dodacima prehrani

2.3.1. Postupci pripreme uzoraka

Odabir optimalnih parametara za pripremu uzoraka ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući složenost i prirodu matrice uzorka, dozirni oblik, osjetljivost analitičke metode te ukupno trajanje analitičkog postupka. U većini studija temeljenih na LC–MS i CE–MS, priprema uzoraka temelji se na minimalističkom pristupu, bez primjene složenih tehnika pročišćavanja. Najčešće se koristi princip “razrijedi i mjeri” (engl. *Dilute and Shoot*). Za krute uzorke dodataka prehrani poput tableta, sadržaja kapsula i prahova, ovaj pristup često uključuje jednostavnu ekstrakciju organskim otapalima poput metanola^{81,82} ili acetonitrila¹⁴ kao i njihovih smjesa s vodom^{17,83–85} nakon čega se dobiveni ekstrakt razrjeđuje odgovarajućim otapalom. Uzorci u tekućem obliku obično se samo razrjeđuju odgovarajućim otapalom. Ovaj jednostavan i brz postupak uključuje homogenizaciju uzorka, zatim slijedi miješanje putem trešenja, sonikacije ili vrtloženja, nakon čega slijedi centrifugiranje, filtriranje i razrjeđivanje dobivenog ekstrakta. Iako ovakva priprema uzoraka ne zahtijeva dodatne složene korake pročišćavanja, može doći do istovremene ekstrakcije neželjenih spojeva koji mogu ometati analizu PDE–5I. Vrijeme potrebno za pripremu uzoraka ovom metodom uglavnom ovisi o trajanju ekstrakcije i centrifugiranja te se kreće između 10 i 35 minuta⁶. U slučajevima kada se koristi tehnika vezanog sustava plinska kromatografija–spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, GC–MS), često je potrebna derivatizacija niskohlapljivih analita, što produljuje vrijeme pripreme uzoraka na 20 do 30 minuta, ovisno o analitu i korištenom derivatizacijskom sredstvu^{6,86,87}.

Osim u sadržaju kapsula, ilegalne tvari mogu biti prisutne i u samim ljuskama kapsula. Na primjer, u ljuskama kapsula biljnih pripravaka za dijabetes otkriveni su tragovi rosiglitazona, dok taj spoj nije bio detektiran u samom sadržaju kapsule⁸⁸. Slično, Lanzarotta i suradnici identificirali su prisutnost tadalafila u ljuskama kapsula proizvoda namijenjenih

liječenju erektilne disfunkcije⁸⁹. Ova praksa omogućuje prikrivanje ilegalnih sastojaka, otežavajući njihovo otkrivanje standardnim analitičkim postupcima.

Do danas je samo mali broj studija koristio alternativne tehnike ekstrakcije, poput ekstrakcije na čvrstoj fazi⁹⁰ (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE), tekućinsko-tekućinske ekstrakcije^{91,92} (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) te QuEChERS postupka (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). QuEChERS postupak temelji se na ekstrakciji uzorka mješavinom acetonitrila i vode, nakon čega se organska i vodena faza razdvajaju dodavanjem soli. U ovom postupku većina polarnih komponenti ostaje u vodenoj fazi, dok se ciljani analiti prenose u acetonitril⁹³. Ovaj je postupak prvotno razvijen za analizu ostataka pesticida u biljnim matricama, a kasnije je primijenjen za detekciju drugih kontaminanata, poput mikotoksina u hrani, hrani za životinje i biljnim dodacima prehrani⁵⁷. Postupak QuEChERS, pokazao se korisnim za simultanu izolaciju i pročišćavanje više farmaceutskih spojeva i biljnih toksina iz biljnih dodaka prehrani prije LC-MS analize, pri čemu je vrijeme pripreme uzorka iznosilo otprilike 65 min⁸. Vrijeme pripreme produljeno je zbog potrebe za prethodnim namakanjem suhih uzoraka u vodi (30 minuta) kako bi se poboljšalo iskorištenje ekstrakcije biljnih toksina. U nekim su studijama dodani dodatni koraci čišćenja radi uklanjanja koekstrahiranih komponenti matrice, uključujući disperzivno pročišćavanje (engl. *Dispersive Solid Phase Extraction*, dSPE) pomoću oktadecilsilil (C18) sorbenata ili primarnih sekundarnih amina (PSA)^{8,94,95}. dSPE je brz postupak pročišćavanja koji uključuje dodavanje sorbenta u alikvot ekstrakta uzorka, nakon čega slijedi kratko miješanje (1–2 minute) i centrifugiranje. U usporedbi s dSPE metodom, SPE čišćenje pomoću patrona zahtijeva više vremena (ne manje od 30 minuta po uzorku), ali omogućuje temeljitije pročišćavanje ekstrakata.

2.3.2. Analitičke tehnike za određivanje PDE-5I

Analitičke tehnike za određivanje PDE-5I i njihovih analoga u različitim vrstama uzoraka moraju biti visoko selektivne. Osim pripreme uzorka, ključni korak za uspješnu analizu često je i pravilan odabir instrumentalne tehnike. Za detekciju PDE-5I i njihovih analoga u biljnim pripravcima predložene su različite neinstrumentalne i instrumentalne tehnike. Međutim, većina objavljenih istraživanja fokusirala se isključivo na biljne pripravke u dozirnim oblicima poput kapsula i tableta, dok su prehrambeni proizvodi rijetko bili obuhvaćeni. Tek je nekoliko studija specifično istraživalo prisutnost ovih spojeva u prehrambenim proizvodima^{9,94}.

Od neinstrumentalnih tehnika za analizu PDE-5I koristi se tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC). Prednosti TLC-a uključuju jednostavnost primjene i niske troškove, dok su glavni nedostaci niska osjetljivost i slabija ponovljivost rezultata. Cai i suradnici⁹⁶ koristili su TLC za određivanje osam PDE-5I, pri čemu je mobilna faza bila smjesa kloroforma, etil-acetata, metanola i vode, uz UV detekciju. Budući da PDE-5I spojevi sadrže dušik, njihova se prisutnost na TLC pločama može vizualizirati prskanjem Dragendorffovim reagensom ili drugim nespecifičnim reagensima, poput sumporne kiseline. Osim za analitičke svrhe, preparativna TLC koristi se i za izolaciju nepoznatih PDE-5I⁹⁷. Preparativna TLC razlikuje se od analitičke TLC po većim dimenzijama ploča i debljem sloju sorbenta, što omogućuje nanošenje i odvajanje veće količine uzorka. Nakon razvijanja ploče, odvojeni spojevi fizički uklonjaju (struganjem) sa sloja sorbenta i ekstrahiraju za daljnju analizu ili identifikaciju. Ova metoda je korisna kada je cilj izolirati nepoznate ili potencijalno ilegalne analoge PDE-5I, ali nije prikladna za identifikaciju i probir (engl. *Screening*) spojeva ako nisu dostupni referentni standardi.

Imunotestovi se također koriste za određivanje PDE-5I i njihovih analoga. Guo i suradnici⁹⁸ prvi su razvili imunotest koristeći grupno-specifično monoklonsko antitijelo temeljeno na strukturi kromofora vardenafila. Od tada su razvijene i druge metode imunotesta za različite PDE-5I uključujući sildenafil i njegove analoge⁹⁹ te tadalafil i njegove analoge¹⁰⁰. Imunotestovi su cjenovno isplativa metoda za preliminarni probir PDE-5I i njihovih analoga u usporedbi s drugim analitičkim tehnikama koje obično zahtijevaju skupu i sofisticiranu opremu. Međutim, rezultati mogu biti nejasni, ovisno o vrsti PDE-5I, što često zahtijeva dodatnu potvrdnu analizu.

Metode vibracijske spektroskopije, poput infracrvene (engl. *Infrared Spectroscopy*, IR), infracrvene u bliskom infracrvenom području (engl. *Near Infrared Spectroscopy*, NIR) i Ramanove spektroskopije, vrlo su poželjne zbog svoje jednostavnosti, brzine analize i minimalne količine potrebnog uzorka. Osim toga, zahtijevaju minimalnu ili nikakvu pripremu uzorka. Vibracijska spektroskopija temelji se na vibracijama i rotacijama organskih molekula na specifičnim frekvencijama koje odgovaraju različitim razinama vibracijske energije. U IR spektroskopiji, promjene u tim razinama uzrokovane su apsorpcijom IR zračenja, dok se u Ramanovoj spektroskopiji temelje na raspršenju svjetla. Budući da su IR i Ramanova spektroskopija komplementarne tehnike, često se koriste zajedno za identifikaciju različitih funkcionalnih skupina u nepoznatim spojevima. Ove su metode dosad uspješno primjenjene za

otkrivanje krivotvorenih tableta Viagre i Cialis^{101–103}. Za identifikaciju novih analoga PDE–5I često se koristi IR uz Fourierovu transformaciju (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) u kombinaciji s prigušenom totalnom refleksijom (engl. *Attenuated Total Reflectance*, ATR) ili metodom pastila kalijeva bromida. Primjer njihove primjene je identifikacija propoksifenil tioaildenafila pomoću interne biblioteke FTIR–ATR¹⁰⁴.

Nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) jedna je od ključnih tehnika za identifikaciju i određivanje struktura PDE–5I, uključujući njihove poznate i nepoznate analoge. U usporedbi s analitičkim tehnikama poput LC–MS i GC–MS, NMR ima prednost zbog jednostavnije pripreme uzoraka – dovoljno je otopiti krute uzorke ili razrijediti tekuće u odgovarajućem deuteriranim otapalu. Također, NMR omogućuje visoku obnovljivost podataka, iako mu je glavni nedostatak niža osjetljivost te potreba za većom količinom uzorka^{105–107}. Tehnološki napredak u području spektrometrije (instrumenti s frekvencijama >400 MHz) značajno je poboljšao osjetljivost NMR instrumenata. Razvoj elektronike, supravodljivih magneta i krio–tehnologije, u kombinaciji s novim tehnikama za suzbijanje signala otapala, dodatno je unaprijedio analitičke mogućnosti NMR spektroskopije. Uz to, NMR je nedestruktivna metoda, što omogućuje daljnju analizu uzoraka nakon spektroskopskog ispitivanja. Najčešće korištene NMR tehnike za određivanje struktura uključuju ¹H NMR, ¹³C NMR, jednodimenzionalne metode (DEPT, NOE), dvodimenzionalne homonuklearne (COSY, NOESY) i heteronuklearne tehnike (HMQC, HMBC). Primjena ovih metoda omogućila je otkrivanje novih analoga PDE–5I, poput homosildenafilila, koji je prvi put identificiran 2003. godine od strane Shina i suradnika¹⁰⁸. Dodatno, Gillard i suradnici¹⁰⁶ su demonstrirali učinkovitost ¹H NMR tehnike za brzo preliminarno testiranje PDE–5I spojeva i njihovih analoga u biljnim pripravcima. U sklopu istraživanja analizirano je 150 biljnih dodataka prehrani deklariranih za poboljšanje muške seksualne funkcije, pri čemu je 92 uzorka bilo pozitivno na prisutnost PDE–5I spojeva i njihovih analoga. Nadalje, 33 uzorka sadržavala su više od jednog PDE–5I spojeva i njihovih analoga. Nadalje, 33 uzorka sadržavala su više od jednog PDE–5I, dok je u 12 uzoraka detektirana kombinacija sildenafilila, vardenafila i tadalafila u koncentracijama koje premašuju maksimalne preporučene dnevne doze. Identifikacija i kvantifikacija spojeva provedene su korištenjem ¹H NMR spektroskopije, uz dodatnu potvrdu kemijskih struktura primjenom izravne infuzijske spektrometrije masa.

Za uspješno određivanje PDE–5I i njihovih analoga u dodacima prehrani primjenom GC–MS tehnike ključno je zadovoljiti dva osnovna kriterija: hlapljivost i termičku stabilnost analita³⁵. Unatoč nižim troškovima u usporedbi s LC–MS tehnikom, u literaturi je dostupno

vrlo malo podataka o određivanju PDE-5I pomoću GC-MS tehnike^{109,110}. Razlog tome vjerojatno leži u termičkoj nestabilnosti PDE-5I i njihovih analoga te u izazovima vezanim uz njihovu derivatizaciju pomoću standardnih sililirajućih reagensa². Man i suradnici¹⁰⁹ razvili su GC-MS metodu za određivanje sildenafil, vardenafil i tadalafil u biljnim dodacima prehrani koristeći kratku (10 m) kapilarnu kolonu. Metodom je postignuto dobro kromatografsko razdvajanje komponenti uz kratko vrijeme analize i bez prethodne derivatizacije i hidrolize. S druge strane, Mokhtar i suradnici¹¹⁰ razvili su GC-MS/MS metodu kojom su kvantificirali sildenafil i pet njegovih analoga koristeći tzv. praćenje višestrukih tranzicijskih reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM), čime je dodatno povećana selektivnost i pouzdanost analize. U svom istraživanju koristili su dvije različite tehnike ionizacije: ionizaciju elektronima (engl. *Electron Ionization*, EI) i kemijsku ionizaciju (engl. *Chemical Ionization*, CI). Dosad se GC-MS analiza nakon derivatizacije i/ili hidrolize primjenjivala samo u slučajevima kada LC-MS nije u mogućnosti odrediti strukturu analoga ili njihovih fragmenata. Na primjer, kiselu hidrolizu praćena GC-MS analizom korištena je za identifikaciju struktura spojeva poput piperidinafila¹¹¹, noracetildenafile¹¹², aildenafil¹¹³.

Jedna od najčešće korištenih tehnika za preliminarnu analizu PDE-5I je HPLC s UV detektorom, posebno detektorom s nizom fotodioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD). Korištenjem referentnih standarda izrađuje se baza UV spektara poznatih PDE-5I i njihovih analoga, a identifikacija se provodi usporedbom UV spektara i retencijskog vremena s referentnim standardima^{114,115}. Zbog značajnog smanjenja vremena analize i poboljšane učinkovitosti, posljednjih godina sve veću primjenu nalazi UHPLC. UHPLC koristi kolone unutarnjeg promjera 1,7 mm s veličinom čestica od 1,8 µm, čime se znatno poboljšava razlučivanje, učinkovitost i brzina analize. Sacre i suradnici¹¹⁶ razvili su UHPLC-UV metodu kojom su odredili tri odobrena PDE-5I i pet analoga u manje od 4,5 min. Međutim, glavni nedostatak metoda temeljenih na HPLC-UV/DAD je ograničena mogućnost identifikacije novih, nepoznatih analoga¹¹⁷.

Sprega tekućinske kromatografije i spektrometrije masa je najučestalija tehnika koja se koristi za analizu PDE-5I i analoga u biljnim preparatima i dodacima prehrani (Tablica 4). Razlog tome je visoka osjetljivost i specifičnost, uz mogućnost dobivanja podataka o strukturama fragmenata molekule^{118,119}. Za analizu PDE-5I upotrebljavaju se HPLC i UHPLC kolone s C18 nepokretnim fazama, dok se kao pokretne faze najčešće koriste acetonitril i metanol uz dodatke mravlje/octene kiseline i amonijevog formijata/acetata. Prednost UHPLC

tehnike je kraće trajanje analize i manja potrošnja otapala. Nakon kromatografskog razdvajanja PDE-5I slijedi njihova detekcija metodama spektrometrije masa. Ovisno o informacijama koje se žele dobiti kao i željenoj selektivnosti, koriste se analizatori masa niske i visoke rezolucije¹¹⁸. Među često korištenim analizatorima masa su jednostuki kvadrupol (engl. *Single Quadrupole*, Q)¹²⁰, trostruki kvadrupol (engl. *Triple Quadrupole*, QqQ)^{115,119,121–123}, stupica iona (engl. *Ion Trap*, IT)¹²⁴ te TOF¹²⁵. Također su u primjeni hibridni sustavi, poput trostrukog kvadrupola s linearnom stupicom iona (engl. *Linear Ion Trap*, QqQ-LIT)^{122,126}, QTOF-a^{127–129} i kvadrupola s orbitalnom stupicom iona (engl. *Quadrupole Orbitrap*, Q-Orbitrap)^{130–132}. Hibridni sustavi HRMS kao što su QTOF i QOrbitrap omogućuju pouzdaniju identifikaciju i potvrdu analita zahvaljujući mogućnosti fragmentacije odabranih iona te većoj točnosti mjerenja mase i snage razlučivanja. Osim toga, HRMS omogućuje identifikaciju nepoznatih spojeva na temelju točne mase, uz istovremeno dobivanje spektralnih informacije u MS i tandem MS načinu rada¹³³. Primjena ove tehnike posebno se pokazala korisnom u probirnim analizama te za identifikaciju nepoznatih PDE-5I analoga. Na temelju prethodnih saznanja^{121,134–136}, PDE-5I i njihovi analozi dijele specifične ione nastale fragmentacijom. Na primjer, sildenafil analozi sa sulfonamidnom grupom proizvode fragmentne ione m/z 377,1273, 311,1503 i 283,1190, dok oni s acetilnim grupama daju m/z 341,1603, 311,1503 i 297,1346. Sildenafil analozi s karbonilnom skupinom generiraju ion m/z 311,1133, dok oni s propoksi i sulfonil grupama daju ione m/z 325,1659 i 283,1190. Tiosildenafil analozi generiraju karakteristične ione m/z 327,1274 i 299,0961, dok propoksitio analozi generiraju ione m/z 341,1431 i 299,0961. Nadalje, fragmentni ioni m/z 135,0441, 151,0866 i 155,0254 specifični su za tadalafil, vardenafil i avanafil. Identifikacija ovih specifičnih iona može ukazivati na prisutnost novih PDE-5I analoga^{136,137}.

Od ionizacijskih tehnika, uglavnom se koristi ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) u pozitivnom načinu snimanja, pri čemu nastaju $[M+H]^+$ ioni. Međutim, ESI tehnika je osjetljiva na utjecaj matrice, što može dovesti do smanjenja ili povećanja signala analita u usporedbi s čistim standardnim otopinama. Kako bi se kompenzirali ovi efekti, najčešće se koristi razrjeđivanje matrice ili dodatak izotopno obilježenih unutarnjih standarda¹³².

U Tablici 4. prikazane su analitičke metode za određivanje PDE-5I i analoga dostupnih u literaturi. Tablica sadrži podatke o pripremi uzoraka, korištenim analitičkim tehnikama, sastavu pokretne i nepokretne faze, trajanju analize, protoku, rasponu određivanja te granicama

detekcije i kvantifikacije. Prikazani su podaci za različite matrice, uključujući tablete, kapsule i praškaste uzorke. Iz Tablice 4. je vidljivo da postoje razlike među objavljenim metodama u pogledu kvalitete i pouzdanosti, ali i da je sprega tekućinske kromatografije i spektrometrije masa najprikladnija tehnika za specifičnu analizu PDE-5I u dodacima prehrani.

Tablica 4. Analitičke metode za određivanje PDE-5I u dodacima prehrani.

Instrumentna tehnika ^{ref}	Matrica	Priprema uzorka	Kolone i pokretne faze	Trajanje analize (min)	Protok (ml min ⁻¹)	Radno područje (ng mL ⁻¹)	GD (ng mL ⁻¹)	GK (ng mL ⁻¹)
HPLC-MS ⁹⁶	Tablete, kapsule	Ekstrakcija s MeOH	C18 (5 µm, 250×4,6 mm)/ acetonitril i voda s 0,1 % mravlje kiseline	45	1,0	10–20		40–90
LC-MS/MS ¹³⁸	Kapsule, tablete	Ekstrakcija s MeOH, soniranje	C18 (2,2 µm, 100×2 mm)/ acetonitril i voda s 12 mmol L ⁻¹ amonijevim formijatom i 0,01 % octene kiseline	18	0,4	40–80000	0,8–160	16–800
LC-MS/MS ¹²²	Pilule, kapsule, prahovi	Ekstrakcija s MeOH/voda (70:30, v/v), soniranje, centrifuga, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (3 µm, 100×2 mm)/ acetonitril i voda s 2 mmol L ⁻¹ amonijevim formijatom	15	0,3	0,05–50	0,004–0,455	0,012–1,5
UPLC-TOF-MS; GC-MS ¹²⁵	Tablete, kapsule, prahovi, gel kapsule	Ekstrakcija s MeOH, soniranje, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (1,7 µm, 150×2,1 mm)/ acetonitril s 0,1 % mravlje kiseline i voda s 5 mmol L ⁻¹ amonijevim formijatom (pH 3,0)	15	0,4	100–1000	1–3	4–9
UHPLC-Q-Orbitrap MS ¹³²	Kapsule, tablete, gelovi, tekućine	Ekstrakcija s 2% mravljom kiselinom u acetonitrilu, soniranje, QuEChERS, dSPE	C18 (1,8 µm, 100×2,1 mm)/ metanol i voda, oboje s 0,1 % mravljom kiselinom i 5 mmol L ⁻¹ amonijevim formijatom	15	0,4–0,7	0,1–1000	1	5–100
UHPLC-HRMS-M S (Q-TOF) ¹³⁹	Prah, gel kapsule, tablete, kapsule	Ekstrakcija s acetonitril/voda (50:50, v/v) i 0,1–1 % FA, soniranje, centrifuga, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (5 µm, 150×2,1 mm)/ acetonitril i voda s 0,1 % mravlje kiseline	30	0,3	0,4–200	0,18–0,75	6,67
UHPLC-QTOF-HR MS ¹⁴⁰	Kapsule, tablete, tekućine, pilule	Ekstrakcija s acetonitril/voda (80:20, v/v), soniranje, centrifuga, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (1,8 µm, 100×3,0 mm)/ voda s 5 mmol L ⁻¹ amonijevim acetatom (pH 3,4) i acetonitril	18	0,4	1 ili 5–200	0,04–2	1–5
UHPLC-MS/MS ¹²¹	Kapsule, tablete	Ekstrakcija s acetonitril/voda (50:50, v/v), soniranje, mješanje, centrifuga, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (2,6 µm, 100×2,1 mm)/ acetonitril i voda s 5 mmol L ⁻¹ amonijevim formijatom i 0,2 % mravlja kiseline	15	0,3	1–500	–	0,5–5

Tablica 4. – Nastavak

Instrumentna tehnika ^{ref}	Matrica	Priprema uzorka	Kolone i pokretne faze	Trajanje analize (min)	Protok (ml min ⁻¹)	Radno područje (ng mL ⁻¹)	GD (ng mL ⁻¹)	GK (ng mL ⁻¹)
UHPLC–Q–Orbitrap–MS ¹³⁶	Prah, kapsule, tablete, tekućine	Ekstrakcija s 70% MeOH, soniranje, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (2,7 µm, 100×2,1 mm)/ acetonitril i voda s 1 mmol L ⁻¹ amonijevim acetatom	20	0,4	10–1000	0,09–8,55	0,24–17,10
UHPLC–QTOF ¹²⁸	Granule, gel kapsule, tablete, kapsule, tekućine	Ekstrakcija s MeOH, soniranje, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (1,8 µm, 100×2,1 mm)/ voda s 0,1 % mravljom kiselinom i acetonitril	26	0,3	100–30700	5–500	20–1240
LC–IT–TOF MS ¹⁴¹		Ekstrakcija s MeOH, soniranje, centrifuga, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (3 µm, 150×2,1 mm)/ acetonitril i voda s 0,2 % octene kiseline	70	0,2	130–4000	–	–
LC–QTOF–MS ¹²⁹	Tekućine, gelovi, med, slatkiši, žvake	QuEChERS	C18 (2,0 µm, 100×4,6 mm)/ acetonitril s 0,1 % mravljom kiselinom i voda s 10 mmol L ⁻¹ amonijevim formijatom	45	0,4	80–1200	10–70	80
LC–HRMS ¹⁴²	Tablete, kapsule	Ekstrakcija s acetonitril/voda (50:50, v/v), soniranje, centrifuga, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (1,7 µm, 100×2,1 mm)/ acetonitril/metanol (1:1, v/v) i voda, oboje s 10 mmol L ⁻¹ amonijevim formijatom i 0,1 % mravlja kiselina	29	0,3	10–1000	10	30
HPLC–DAD; HPLC–QTOF/MS; NMR ¹⁴³	Pilule, kapsule, prahovi	Ekstrakcija s MeOH/voda (70:30, v/v), soniranje, centrifuga, filtriranje i razrjeđivanje	C18 (3,5 µm, 150×2,1 mm)/ acetonitril i voda s 0,1 % mravlje kiseline	45 25	1 0,3	80–81000 –	30–500 –	80–1600 –

GD – granica detekcije; GK – granica kvantifikacije

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio doktorske disertacije izrađen je u Službi za zdravstvenu ekologiju, Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, te u Zavodu za analitičku kemiju Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu.

3.1. Materijali

3.1.1. Certificirani referentni materijali i kemikalije

Za određivanje PDE–5I u ovom istraživanju korišteni su certificirani referentni materijali čiji popis je prikazan u Tablici 5.

Tablica 5. Popis certificiranih referentnih materijala za određivanje PDE–5I.

Analit	Kratica	Čistoća (%)	Proizvođač
Avanafil	AVA	98	Toronto Research Chemicals, Ontario, Kanada
Sildenafil	SIL	> 99,9	Cerilliant, Round Rock, TX, SAD
Tadalafil	TAD	> 99,9	Cerilliant, Round Rock, TX, SAD
Vardenafil	VAR	97,3	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
Sildenafil – d8	IS	98	Toronto Research Chemicals, Ontario, Kanada

Uz referentne materijale u ovom radu korištene su i sljedeće kemikalije:

- Metanol, čistoća za LC–MS, Supelco–Merck, Darmstadt, Njemačka
- Acetonitril, čistoća za LC–MS, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska
- Ultračista voda, vodljivosti $0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$
- Mravlja kiselina, čistoća za LC–MS, LiChropur
- Amonijev formijat, čistoća $\geq 99,9 \%$, LiChropur
- Purine i HP–0921, Agilent Technologies, Santa Clara, CA,
- ESI Tuning mix, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka

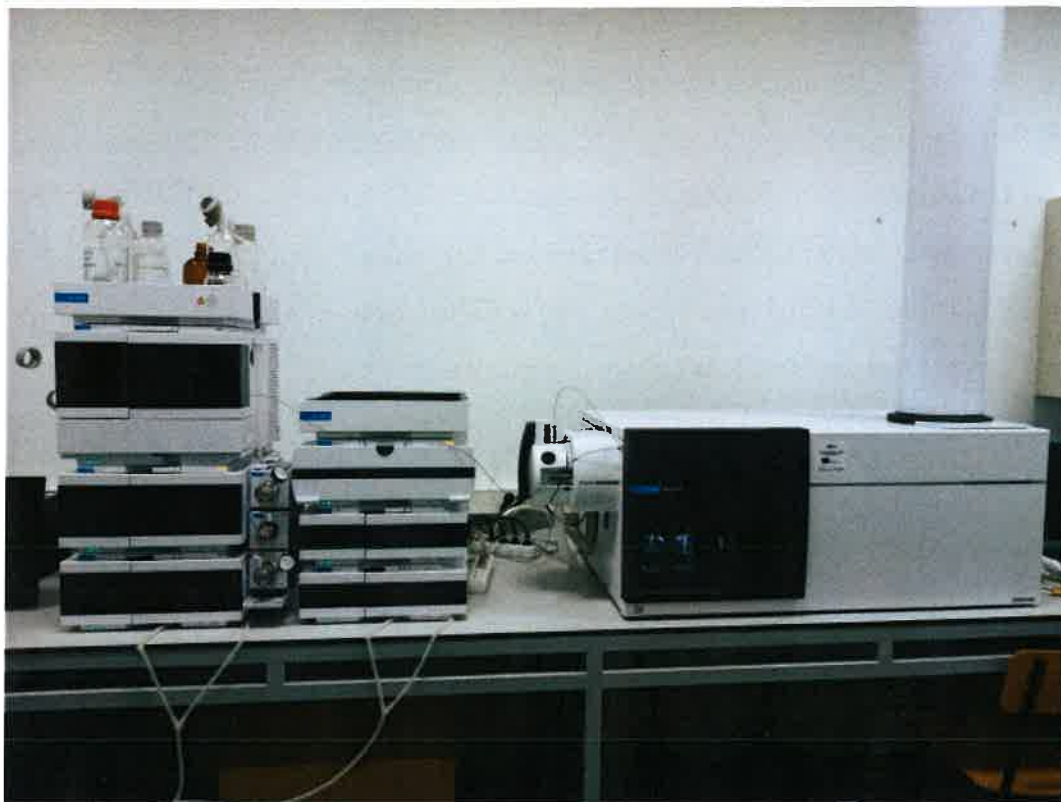
3.1.2. Otopine

Za pripremu izvornih standardnih otopina korišteni su certificirani referentni materijali PDE-5I poznate čistoće različitih proizvođača (Tablica 5). Pojedinačne izvorne standardne otopine sildenafil, vardenafil, avanafil i izotopno obilježenog internog standarda sildenafil – d8 (IS) pripremljene su u metanolu, dok je tadalafil pripremljen u acetonitrilu, u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹. Sve otopine čuvane su u mraku na -20 °C. Iz izvornih standardnih otopina pripremljene su pojedinačne radne otopine standarda masene koncentracije 10 µg mL⁻¹, dok su otopine s masenim koncentracijama pojedinih analita od 1 µg mL⁻¹ dobivene njihovim daljnjim razrjeđivanjem. Tako pripremljene standardne otopine pohranjene su u bočicama od tamnog stakla u zamrzivaču na -20 °C. Neposredno prije analize, iz pojedinačnih radnih otopina pripremljene su svježe smjese radnih otopina za pripremu kalibracijskih krivulja u smjesi vode i acetonitrila (1:1, v/v). Smjese su sadržavale ciljane PDE-5I u koncentracijama od 50 ng mL⁻¹ do 1500 ng mL⁻¹ te uvijek istu količinu od 100 ng mL⁻¹ IS, za potrebe HPLC-TOF analize. Za UHPLC-QTOF analize, pripremljeni radni standardi za kalibraciju sadržavali su od (2–60) ng mL⁻¹ avanfila, (10–300) ng mL⁻¹ sildenafil i vardenafil, (20–600) ng mL⁻¹ tadalafil te uvijek istu količinu od 100 ng mL⁻¹ IS.

3.1.3. Instrumenti i pribor

- UHPLC-QTOF: vezani sustav tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti Agilent 1290 Infinity II UPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) sastavljen od kvaterne pumpe, automatskog uzorkivača, termostatiranog odjeljka za kolonu vezanog s hibridnim analizatorom masa visokog razlučivanja temeljenim na mjerenju vremena leta (Q-TOF 6550 iFunnel (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) (Slika 4) s *Dual AJS ESI* sustavom za ionizaciju elektroraspršenjem.
- HPLC-TOF: vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti Flexar FX-10 (Perkin Elmer, Shelton, CT, SAD) sastavljen od binarne pumpe, automatskog uzorkivača, termostatiranog odjeljka za kolonu te analizatora mase temeljenog na mjerenju vremena leta TOF s *Ultraspray 2 Dual ESI probe* (Axion 2 TOF, Perkin Elmer, Shelton, CT, SAD), prikazanom na Slici 5.
- Analitička vaga BP-221 S, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- Ultrazvučna kupelj Branson 1210, Branson Ultrasonic, Danbury, SAD

- Laboratorijska mješalica, Vortex V-1 plus, Biosan, Latvija
- Centrifuga Rottina 38, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka
- Uređaj za proizvodnju ultračiste vode, NIRO-VV-UV-UF, Nirosta d.o.o., Osijek, Hrvatska
- pH metar S470 Mettler Toledo, Giessen, Njemačka
- PTFE filtri veličine pora 0,2 μm , Pall acrodisc, New York, SAD
- Mikroštrcaljke, Brand, Wertheim, Njemačka
- Staklene vialice za autouzorkivače 2,0 mL graduirane sa pripadajućim PTFE čepovima i silikonskim septama (Chrom4, Njemačka)
- Hladnjak s ledenicom (4 °C i -20 °C), Arctiko, Danska
- Laboratorijske pipete: (0,5–10) μL ; (5–50) μL ; (20–200) μL ; (100–1000) μL (Transferpette, Brand GmbH, Wertheim, Njemačka)
- Stakleno laboratorijsko posuđe, Schott, Isolab, Njemačka
- Polipropilenske epruvete za uzorke, kapaciteta 15 mL i 50 mL, Isolab Laborgeräte GmbH, Njemačka
- Kolone za tekućinsku kromatografiju:
 1. Inertsil ODS-4 HP C18, 150 mm $\times$ 2,1 mm; 3 μm (GL Sciences, Kina)
 2. Kinetex XB-C18, 150 mm $\times$ 2,1 mm; 2,6 μm (Phenomenex, California, SAD)
 3. Zorbax SB C18, 150 mm $\times$ 2,1 mm; 3,5 μm (Agilent, SAD)



Slika 4. UHPLC–QTOF u Zavodu za analitičku kemiju, PMF, Zagreb.



Slika 5. HPLC–TOF u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, Zagreb.

3.1.4. Programi za upravljanje instrumentima i obradu podataka

- Program MassHunter B.10.0.10305.0 (Agilent Technologies, SAD).
- TOF MS driver, version 6.2 (Perkin Elmer, SAD)
- Chromera Software i Axion EC ID (Perkin Elmer, SAD)
- ChemDraw 23.1.1.
- Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft, SAD).

3.2. Uzorci biljnih dodataka prehrani

Uzorci biljnih dodataka prehrani ispitani u ovom radu prikupljeni su s hrvatskog tržišta. Uzorkovanje je provedeno od strane Sanitarne inspekcije grada Zagreba i privatnih distributera te dostavljeni u Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar. Detaljan opis uzoraka prikazan je u Tablici 6. Kupljeni uzorci prikazani su u Tablici 7.

Tablica 6. Opis i porijeklo uzoraka biljnih dodataka prehrani.

Oznaka	Dozirni oblik	Dodatak prehrani – sastav	Proizvođač
1	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
2	Med	Kraljevski med Ekstrakt korijena ginsega (<i>Panax ginseng</i>)	Kina
3	Kapsula	FORMEN kapule Ekstrakt korijena ginsega (<i>Panax ginseng</i>), ekstarkt biljke Maca (<i>Lepidium meyenii</i>), ekstrakt koprive (<i>Urtica dioica</i>), ekstrakt ploda slatke naranče (<i>Citrus sinensis</i>)	Francuska
4	Med	Kraljevski med Ekstrakt korijena ginsega (<i>Panax ginseng</i>)	Kina
5	Tableta	Potencijal forte Korijen ginsenga (<i>Panax ginseng</i>), sjeme guarane (<i>Paulinia Cupana</i>), čubar (<i>Saturea hortenzis</i>), list zelenog čaja (<i>Camellia sinensis</i>), ekstrakt gospine trave	Srbija

Oznaka	Dozirni oblik	Dodatak prehrani – sastav	Proizvođač
6	Kapsula	(<i>Hypericum perforatum</i>), list ružmarina (<i>Rosmarini folium</i>) EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
7	Kapsula	RAGING BULL PLUS Korijen slatkolisnog kozlinca (<i>Ostragalus glycyphyllosae radix</i>), list obične koprive (<i>Urticae dioicae folium</i>), sjeme make (<i>Lepidium meyenii</i>), korijen ginsenga (<i>Panax ginseng</i>), korijen anđelike (<i>Angelica archangelica</i>), plod običnog komorača (<i>Foeniculum vulgare</i>), ekstrakt korijena ruže (<i>Rhodiola rosea</i>), plod guarane (<i>Paulinia Cupana</i>)	Velika Britanija
8	Kapsula	ALFAKTIV Ekstrakt biljke Damjana (<i>Turnera diffusa var. aphrodisiaca</i>)	Srbija
9	Tableta	ALPHA STRONG 100% Ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>) 55 mg, ekstrakt ploda babljeg zuba (<i>Tribulus terrestris</i>) 25 mg, ekstrakt korijena planinske ruže (<i>Rhodiola rosea</i>) 20 mg, ekstrakt ploda širokolisnog vlasca (<i>Allium tuberosum</i>) 20 mg.	Indonezija
10	Kapsula	RAGING BULL PLUS Korijen slatkolisnog kozlinca (<i>Ostragalus glycyphyllosae radix</i>), list obične koprive (<i>Urticae dioicae folium</i>), sjeme make (<i>Lepidium meyenii</i>), korijen ginsenga (<i>Panax ginseng</i>), korijen anđelike (<i>Angelica archangelica</i>), plod običnog komorača (<i>Foeniculum vulgare</i>), ekstrakt korijena ruže (<i>Rhodiola rosea</i>), plod guarane (<i>Paulinia Cupana</i>)	Velika Britanija
11	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
12	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki	Kina

Oznaka	Dozirni oblik	Dodatak prehrani – sastav	Proizvođač
13	Kapsula	slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>) EPIMEN plus	Kina
14	Kapsula	Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>) HERBIKO AFRIČKA ŠLJIVA	Srbija
15	Med	ekstrakt kore afričke šljive (<i>Prunus Africana – Pygeum affricanum</i>) KRALJEVSKI MED	Kina
16	Kapsula	Ekstrakt korijena ginsega (<i>Panax ginseng</i>) EPIMEN plus	Kina
17	Kapsula	Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>) EPIMEN plus	Kina
18	Kapsula	Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>) EPIMEN plus	Kina
19	Kapsula	Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>) Formula XXL	Kina
20	Kapsula	Ekstrakt korijena ginsega (<i>Panax ginseng</i>), Ekstrakt gomolja make (<i>Lepidium meyenii</i>), Ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>) EPIMEN plus	Kina
21	Kapsula	Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>) THE GOLD PILL	Velika Britanija
		Sjeme kole (<i>Colae acuminatae</i>), sjeme make (<i>Lepidium meyenii</i>), korijen ginsenga (<i>panax Ginseng</i>), korijen anđelike (<i>Angelica archangelica</i>), plod običnog	

Oznaka	Dozirni oblik	Dodatak prehrani – sastav	Proizvođač
22	Kapsula	komorača (<i>Foeniculum vulgare</i>), ekstrakt korijena ruže (<i>Rhodiola rosea</i>), plod guarane (<i>Paulinia cupana</i>) EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
23	Kapsula	RAGING BULL PLUS Korijen slatkolisnog kozlinca (<i>Qstragalus glycyphyllosae radix</i>), list obične koprive (<i>Urticae dioicae folium</i>), sjeme make (<i>Lepidium meyenii</i>), korijen ginsenga (<i>Panax ginseng</i>), korijen andelike (<i>Angelica archangelica</i>), plod običnog komorača (<i>Foeniculum vulgare</i>), ekstrakt korijena ruže (<i>Rhodiola rosea</i>), plod guarane (<i>Paulinia Cupana</i>)	Velika Britanija
24	Tableta	ALPHA STRONG 100% Ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>) 55 mg, ekstrakt ploda babljeg zuba (<i>Tribulus terrestris</i>) 25 mg, ekstrakt korijena planinske ruže (<i>Rhodiola rosea</i>) 20 mg, ekstrakt ploda širokolisnog vlasca (<i>Allium tuberosum</i>) 20 mg.	Indonezija
25	Tableta	ALPHA STRONG 100% Ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>) 55 mg, ekstrakt ploda babljeg zuba (<i>Tribulus terrestris</i>) 25 mg, ekstrakt korijena planinske ruže (<i>Rhodiola rosea</i>) 20 mg, ekstrakt ploda širokolisnog vlasca (<i>Allium tuberosum</i>) 20 mg.	Indonezija
26	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
27	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetrovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
28	Kapsula	RAGING BULL PLUS Korijen slatkolisnog kozlinca (<i>Qstragalus glycyphyllosae radix</i>), list obične koprive (<i>Urticae</i>	Velika Britanija

Oznaka	Dozirni oblik	Dodatak prehrani – sastav	Proizvođač
		<i>dioicae folium</i>), sjeme make (<i>Lepidium meyenii</i>), korijen ginsenga (<i>Panax ginseng</i>), korijen anđelike (<i>Angelica archangelica</i>), plod običnog komorača (<i>Foeniculum vulgare</i>), ekstrakt korijena ruže (<i>Rhodiola rosea</i>), plod guarane (<i>Paulinia Cupana</i>)	
29	Kapsula	Raging Bull Korijen slatkolisnog kozlinca (<i>Qstragalus glycyphyllosae radix</i>), list obične koprive (<i>Urticae dioicae folium</i>), sjeme make (<i>Lepidium meyenii</i>), korijen ginsenga (<i>Panax ginseng</i>), korijen anđelike (<i>Angelica archangelica</i>), plod običnog komorača (<i>Foeniculum vulgare</i>), ekstrakt korijena ruže (<i>Rhodiola rosea</i>), plod guarane (<i>Paulinia Cupana</i>)	Velika Britanija
30	Kapsula	The Gold Pill Sjeme kole (<i>Colae acuminatae</i>), sjeme make (<i>Lepidium meyenii</i>), korijen ginsenga (<i>panax Ginseng</i>), korijen anđelike (<i>Angelica archangelica</i>), plod običnog komorača (<i>Foeniculum vulgare</i>), ekstrakt korijena ruže (<i>Rhodiola rosea</i>), plod guarane (<i>Paulinia cupana</i>)	Velika Britanija
31	Kapsula	Formula XXL Ekstrakt korijena ginsega (<i>Panax ginseng</i>), Ekstrakt gomolja make (<i>Lepidium meyenii</i>), Ekstrakt kore kineskog cimetovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
32	Kapsula	Formula XXL Ekstrakt korijena ginsega (<i>Panax ginseng</i>), Ekstrakt gomolja make (<i>Lepidium meyenii</i>), Ekstrakt kore kineskog cimetovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
33	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
34	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
35	Prah	Alpha strong premium Ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>) 55 mg, ekstrakt ploda babljeg zuba (<i>Tribulus terrestris</i>) 25 mg,	Indonezija

Oznaka	Dozirni oblik	Dodatak prehrani – sastav	Proizvođač
36	Kapsula	ekstrakt korijena planinske ruže (<i>Rhodiola rosea</i>) 20 mg, ekstrakt ploda širokolisnog vlasca (<i>Allium tuberosum</i>) 20 mg. EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetočca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
37	Kapsula	Alpha strong premium Ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>) 55 mg, ekstrakt ploda babljeg zuba (<i>Tribulus terrestris</i>) 25 mg, ekstrakt korijena planinske ruže (<i>Rhodiola rosea</i>) 20 mg, ekstrakt ploda širokolisnog vlasca (<i>Allium tuberosum</i>) 20 mg.	Indonezija
38	Kapsula	Alpha strong premium Ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>) 55 mg, ekstrakt ploda babljeg zuba (<i>Tribulus terrestris</i>) 25 mg, ekstrakt korijena planinske ruže (<i>Rhodiola rosea</i>) 20 mg, ekstrakt ploda širokolisnog vlasca (<i>Allium tuberosum</i>) 20 mg.	Indonezija
39	Prah	Alpha strong premium Ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>) 55 mg, ekstrakt ploda babljeg zuba (<i>Tribulus terrestris</i>) 25 mg, ekstrakt korijena planinske ruže (<i>Rhodiola rosea</i>) 20 mg, ekstrakt ploda širokolisnog vlasca (<i>Allium tuberosum</i>) 20 mg.	Indonezija
40	Kapsula	Prorecta Ekstrakt biljke babin zub, ekstrakt korijena ginsenga, ekstrakt sjemenki grejpa (<i>Citrus paradisi Macf</i>), ekstrakt guarane (<i>Paulinia Cupana</i>), ekstrakt rodiole	Češka
41	Kapsula	Prorecta long Ekstrakt make (<i>Lepidium Meyenii</i>), ekstrakt sjemenki grejpa (<i>Citrus paradisi Macf</i>)	Češka
42	Tekućina	Prorecta shot Ekstrakt biljke babin zub, ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>), ekstrakt sjemenki grejpa (<i>Citrus paradisi Macf</i>), ekstrakt guarane (<i>Paulinia Cupana</i>), ekstrakt rodiole (<i>Rhodiola rosea</i>)	Češka
43	Prah	Alpha strong premium	Indonezija

Oznaka	Dozirni oblik	Dodatak prehrani – sastav	Proizvođač
		Ekstrakt korijena ginsenga (<i>Panax ginseng</i>) 55 mg, ekstrakt ploda babljeg zuba (<i>Tribulus terrestris</i>) 25 mg, ekstrakt korijena planinske ruže (<i>Rhodiola rosea</i>) 20 mg, ekstrakt ploda širokolisnog vlasca (<i>Allium tuberosum</i>) 20 mg.	
44	Tableta	PANER suhi ekstrakt korijena sibirskog ginsenga (<i>Eleutherococcus senticosus</i>), suhi ekstrakt listova biljke babin zub (<i>Tribulus terrestris</i>)	Poljska
45	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
46	Kapsula	EPIMEN plus Ekstrakt sjemenki japanske sofore (<i>Sophora japonica</i>), ekstrakt ploda nara (<i>Punica granatum</i>), ekstrakt sjemeki slatkog badema (<i>Pronus amygdalus var. dulcis</i>), ekstrakt kore kineskog cimetovca (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Kina
47	Med	PROZEK Biskupska kapica (<i>Epimedium</i>), đumbir, korijen galangala (<i>Alpinia galanga</i>), ekstrakt kore kineskog cimetovca (<i>Cinnamomum cassia</i>), Ekstrakt gomolja make (<i>Lepidium meyenii</i>)	Kina
48	Tableta	TRIBESTAN Suhi ekstrakt biljke babin zub (<i>Tribulus terrestris</i>)	Bugarska
49	Med	Korean Red Ginseng Extract Korejski crveni ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	Južna Koreja

Tablica 7. Farmaceutski dozirni oblici.

Dozirni oblik	Naziv proizvoda	Aktivna tvar	Proizvođač
Tableta	LEVITRA® 20 mg	Vardenafil	Bayer AG, Leverkusen, Njemačka
Tableta	CIALIS® 20 mg	Tadalafil	Eli Lilly SA, Beograd, Srbija
Oralni gel	KAMAGRA 100 mg	Sildenafil	Ajanta Pharma Limited, Mumbai, India

3.3. Metode

3.3.1. Priprema uzoraka

Priprema čvrstih uzoraka dodataka prehrani, uključujući prahove, tablete i kapsule, provedena je primjenom ekstrakcije kruto-tekuće. Kao otapalo za ekstrakciju korišten je acetonitril. Prije ekstrakcije, nekoliko dozirnih oblika je usitnjeno u fini prah pomoću tarionika te homogenizirano miješanjem. Nakon usitnjavanja i homogenizacije, otprilike jedan dozirni oblik (0,2 g do 0,4 g tableta, kapsula i praha) odvagano je u polipropilensku kivetu od 15 mL, nakon čega je dodano (5–10) mL acetonitrila. Uzorak je zatim izmiješan 1 minutu na vortex mješalici, 30 min u ultrazvučnoj kupelji, a potom 10 minuta centrifugiran na 4600 okretaja u minuti. Dobiveni supernatanti su filtrirani pomoću PTFE membranskog filtera (veličine čestica 0,2 μm), a filtrat je razrijeđen prije analize 10 do 10 000 puta. Za potrebe analize, 100 μL radnog standarda sildenafil – d8, korištenog kao interni standard (IS), masene koncentracije 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dodano je alikvotu otopine.

Tekući uzorci u volumenu ekvivalentnom jednoj dozi, razrijeđeni su i analizirani.

Uzorak meda homogeniziran je intenzivnim miješanjem, nakon čega je 1 g uzorka odvagano u polipropilensku kivetu od 50 mL i ekstrahirano s 25 mL smjese acetonitrila i vode (1:1, v/v). Uzorak je izmiješan 1 minutu na vortex mješalici, 30 min u ultrazvučnoj kupelji, a zatim 10 minuta centrifugiran na 4600 okretaja u minuti pri sobnoj temperaturi. Nakon razdvajanja faza, gornji sloj je filtriran kroz PTFE filter (veličine čestica 0,2 μm), a dobiveni filtrat dodatno razrijeđen prije analize 10 do 10 000 puta. U alikvotni dio otopine dodano je 100 μL IS, masene koncentracije 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.2. Analiza PDE-5I vezanim sustavom tekućinska kromatografija–spektrometrija masa (UHPLC–QTOF)

Za analizu PDE-5I u dodacima prehrani korišten je vezani sustav UHPLC–QTOF, prethodno opisan u poglavlju 3.1.3. Analiti su razdvojeni primjenom tekućinske kromatografije obrnutih faza pri čemu je za razdvajanje ciljanih spojeva odabrana analitička kolona Inertsil ODS-4 HP (150 mm $\times$ 2,1 mm; 3 μm). Tijekom analize, temperatura kolone održavana je na 40 °C, dok je temperatura odjeljka za injektiranje bila 10 °C. Primijenjeno je gradijentno eluiranje pri protoku pokretne faze od 0,2 mL min⁻¹. Pokretna faza A sastojala se od 5 mmol L⁻¹

amonijeva formijata uz dodatak mravlje kiseline volumnog udjela 0,1 % u vodi, dok je pokretna faza B bila 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu. Sastav pokretne faze prikazan je u Tablici 8. Volumen injektiranja bio je 1 μ L.

Tablica 8. Sastav pokretne faze za razdvajanje PDE–5I na koloni Inertsil ODS–4.

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	80	20
2	60	40
6	45	55
10	35	65
11	5	95
13	5	95
13,1	80	20
15	80	20

Za detekciju PDE–5I i njihovih analoga korištena je ionizacija elektoraspršenjem u pozitivnom načinu snimanja, pri čemu je kao prekursor ion odabran protonirani molekulski ion, $[M+H]^+$. Optimizirani uvjeti rada na spektrometru masa visokog razlučivanja prikazani su u Tablici 9. Dušik je korišten kao plin za sušenje, raspršivanje i kolizijski plin.

Tablica 9. Radni uvjeti na spektrometru masa Q–TOF (Agilent Technologies, SAD).

Parametar:	Vrijednost:
Napon fragmentora:	350 V
Napon mlaznice (engl. <i>Nozzle</i>):	1000 V
Tlak raspršivača:	25 psi
Napon kapilare:	3500 V
Temperatura plina:	350 °C
Protok plina:	10 L min ⁻¹
Temperatura plina za sušenje:	200 °C
Protok plina za sušenje:	17 L min ⁻¹
Referentne mase	121,05087; 922,00979

Ciljano/probirna analiza odabranih PDE-5I i njihovih analoga provedena je primjenom "Target/Suspect screening" pristupa i algoritma "Find by formula", koji omogućava simultanu potvrdu ciljanih spojeva i probir sumnjivih spojeva (PDE-5I analozi). Baza podataka kreirana je korištenjem softvera Personal Compound Database and Library Manager (PCDL, Agilent, SAD) unosom naziva spojeva i molekularnih formula 97 poznatih PDE-5I i njihovih analoga (Tablica D1 u poglavlju 8. Dodatak), prethodno opisanih u literaturi. Osim poznatih m/z vrijednosti, baza podataka sadrži i podatke o vremenu zadržavanja te MS/MS spektre ciljanih analita (sildenafil, tadalafil, vardenafil i avanafil) pri različitim kolizijskim energijama (CE). Probirna analiza primjenom složenog algoritma predlaže moguće spojeve koji najbolje odgovaraju definiranim parametrima: maksimalna razlika od 5 ppm između eksperimentalnih i teoretskih vrijednosti m/z te postignuti rezultat >80 (engl. *Score*) koji je kombinacija tri parametra: podudarnost mase, izotopne zastupljenosti i razmaka između izotopnih signala. Za potvrdu prisutnosti PDE-5I, uspoređuju se MS/MS spektri uzorka sa spektrima referentnih standarda ciljanih analita pri čemu je potrebna prisutnost minimalno dva produkt iona (≤ 20 ppm). Također, potrebno je da se vrijeme zadržavanja spojeva u kromatogramu uzorka poklapa s vremenom zadržavanja standardne otopine ($\pm 0,25$ min). Postizanje minimalno četiri identifikacijska boda za zabranjene supstance (jedan prekursor ion = 1 bod, svaki fragmentni ion = 1,5 boda), zadovoljava kriterije Odluke 2002/657/EC¹⁴⁴.

Kvantifikacija se provodi samo za pozitivne uzorke ciljanih PDE-5I koristeći vanjsku kalibracijsku krivulju uz pristup unutarnjeg standarda. Za kvantitativno određivanje odabran je produkt ion najvećeg intenziteta (kvantifikator), dok je drugi produkt ion izabran za potvrdu identiteta (kvalifikator).

Koncentracije u ekstraktu uzorka izražavaju se u jedinici ng mL^{-1} i određuju se putem kalibracijskih krivulja. Konačna izmjerena vrijednost korigira se na temelju pripreme uzorka, a maseni udio PDE-5I u uzorku izražava se u mg kg^{-1} ili u mg po dozirnom obliku, prema sljedećim formulama:

$$\omega(\text{PDE-5I}, \text{mg kg}^{-1}) = \gamma_{\text{uz}} \cdot \frac{V_{\text{ot}}}{m_{\text{uz}}} \cdot DF \quad (1)$$

$$\omega(\text{PDE-5I}, \text{mg u dozirnom obliku}) = \gamma_{\text{uz}} \cdot \frac{V_{\text{ot}}}{m_{\text{uz}}} \cdot DF \cdot m_{\text{doza}} \quad (2)$$

γ_{uz} – masena koncentracija ciljanog PDE–5I očitana iz kalibracijskog pravca (ng mL^{-1})

V_{ot} – volumen ekstrakcijskog otapala (mL)

m_{uz} – masa uzorka korištena za pripremu/analizu (g)

DF – faktor razrjeđenja (engl. *dilution factor*)

m_{doza} – ukupna količina dozirnog oblika (kg)

Uzorci koji su probirnom analizom identificirani kao pozitivni, ali za koje nisu dostupni referentni standardi, podvrgnuti su dodatnoj analizi. Na identificiranim ionima provedeni su eksperimenti tandemne spektrometrije masa (MS/MS) upotrebom kolizijom aktivirane disocijacije (engl. *Collision Induced Dissociation*, CID) u pozitivnom načinu rada. Primijenjeni su različiti kolizijski potencijali (10, 20, 30, 40, 50 V) kako bi se dobio što veći broj fragmentnih iona. Potvrda analita temelji se na usporedbi dobivenih prekursor i fragmentnih iona s podacima dostupnim u literaturi i/ili online bazama podataka (MassBank, mzCloud). Za potvrdu prisutnosti moraju biti ispunjeni sljedeći kriteriji: točna masa prekursor iona (≤ 5 ppm) te prisutnost najmanje dva karakteristična fragmentna iona (≤ 20 ppm). Nakon identifikacije, spektri molekularnih i fragmentnih iona koji potvrđuju određeni analit, pohranjuju se u bazu podataka i koriste za daljnje analize.

U slučaju detekcije spojeva koji nisu obuhvaćeni popisom sumnjivih spojeva (Tablica D1 u poglavlju 8. Dodatak), postoji potreba za neciljnom analizom kako bi se identificirali novi neprijavljeni analozi. Ioni čiji signali su imali najveći intenzitet u kromatogramu ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC) podvrgnuti su daljnjoj MS/MS analizi. U takvim slučajevima identifikacija se temelji na usporedbi fragmentnih iona nepoznatih analoga s fragmentnim ionima poznatih PDE–5I, budući da ti spojevi i njihovi analozi često imaju zajedničke karakteristične ione koji nastaju tijekom fragmentacije.

Svi spektralni podaci obrađeni su korištenjem računalnog programa MassHunter. Za osiguranje točnosti i ponovljivosti određivanja vrijednosti m/z , sve analize provedene su uz kontinuirani unos referentne tvari Purine i HP–0921.

3.3.3. Analiza PDE–5I vezanim sustavom tekućinska kromatografija–spektrometrija masa (HPLC–TOF)

Za analizu PDE–5I i njihovih analoga korišten je HPLC–TOF (opisan u poglavlju 3.1.3.). Kromatografski uvjeti bili su gotovo identični onima primjenjenima u UHPLC–QTOF analizi (poglavlje 3.3.1), osim volumena injektiranja koji je iznosio 5 μL . Analize su provedene uz

ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada pri čemu je kao plin nosilac korišten dušik. Detaljni radni parametri prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Radni parametri HPLC–TOF (Perkin Elmer, USA).

Parametar:	Vrijednost:
LC	Flexar FX–10, Perkin Elmer, USA
Kolona:	Inertsil ODS–4 HP
Mobilna faza:	A: 5 mmol L ⁻¹ amonijev formijat i 0,1 % mravlja kiselina u vodi; B: 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
Temperatura kolone:	40 °C
Protok:	0,2 ml min ⁻¹
Volumen injektiranja:	5 µL
MS	Axion 2TOF, Perkin Elmer, USA
Ionizacija:	ESI+
Napon letne cijevi (<i>Flight tube</i>):	10 kV
Napon na izlazu kapilare:	100 V
Temperatura plina:	350 °C
Protok plina:	12 L min ⁻¹
Tlak raspršivača	70 psi (obje probe)
Način snimanja:	2 spektra/sekundi
Napon na izlazu iz kapilare	Tadalafil – 150 V
(fragmentacija u izvoru):	Avanafil, Sildenafil, Vardenafil – 200 V

Za detekciju i kvantifikaciju ciljanih i sumnjivih PDE–5I odabran je prekursor ion, protonirani molekulski ion, $[M+H]^+$. LC–MS spektri masa prikupljeni su u MS “full scan” modu, koristeći kromatograme iona odabranih m/z vrijednosti (engl. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) s rasponom masa $\pm 0,025 m/z$ za analite prethodno definirane u metodi (Tablica D1, poglavlje 8. Dodatak). Analiza je provedena u rasponu od 100 m/z do 1000 m/z pri brzini snimanja od 2 spektra/sekundi. Detekcija ciljanih analita temelji se na određivanju točne mase prekursor iona (≤ 5 ppm) $[M+H]^+$ i usporedbi vremena zadržavanja u kromatogramu uzorka s vremenom zadržavanja PDE–5I u kromatogramu standardne otopine smjese ciljanih

analita pripremljene u otapalu (odstupanje $\pm 0,25$ min). Za sumnjive analite za koje nemamo referentne standarde, kriterij vremena zadržavanja nije primijenjen. Za potvrdu ciljanih i sumnjivih analita, provodi se ponovna analiza uz fragmentaciju u izvoru. Ciljani analiti potvrđeni su ako su prisutna minimalno dva karakteristična fragmentna iona identična onima iz referentnih standarda s odstupanjem ≤ 20 ppm. Sumnjivi analiti (bez referentnih standarda) potvrđuju se usporedbom prekursor iona i fragmentnih iona s literaturnim podacima. Kvalitativni softver Axion EC ID korišten je za probir vlastite baze podataka (Tablica D1, poglavlje 8. Dodatak) ili povezivanje s bazom podataka PubChem, temeljeno na sljedećim kriterijima: točnost mase prekursor iona (≤ 5 ppm) i maksimalno odstupanje eksperimentalnog od teoretskog izotopnog profila (<10 %, engl. *Iso-cum Sigma*). Na temelju postignutog rezultata (engl. *Score*), softver predlaže najvjerojatnije spojeve koji odgovaraju postavljenim kriterijima. Prihvatljiv rezultat za pouzdanu identifikaciju treba biti $\geq 0,7$. Tijekom analize, točnost mase je dodatno poboljšana kontinuiranim unosom referentne tvari ("*Lock-spray*"), koji omogućava internu kalibraciju instrumenta.

Za kvantitativnu analizu ciljanih PDE-5I, korišten je prekursor ion uz primijenu vanjske kalibracijske krivulje uz korištenje IS. Koncentracije u ekstraktu uzorka izražavaju se u jedinici ng mL^{-1} i određuju se putem kalibracijskih krivulja. Konačna izmjerena vrijednost korigira se na temelju pripreme uzorka, a maseni udio PDE-5I u uzorku izražava se u mg kg^{-1} ili u mg po dozimnom obliku, prema formulama (1) i (2).

3.4. Validacija analitičkih metoda

Validacija opisanih metoda za određivanje PDE-5I u dodacima prehrani obuhvatila je određivanje selektivnosti, linearnosti, točnosti i preciznosti metode, utjecaja matrice, granice detekcije i kvantifikacije te stabilnosti analita u pripremljenim ekstraktima. Validacijski eksperimenti provedeni su u skladu s Odlukom Komisije 2002/657/EC¹⁴⁴ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata te smjernicama Međunarodne konferencije za usklađivanje tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku uporabu (engl. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), dio Q2(R1) Validacija analitičkih metoda: Metodologija¹⁴⁵.

Selektivnost metode ispitana je analizom i usporedbom slijepih uzoraka matrice (slijepi uzorci nisu sadržavali PDE-5I), referentnih standarda i uzoraka matrice obogaćenih dodanim

referentnim standardima i IS kako bi se provjerila prisutnost mogućih interferirajućih spojeva koji koeluiraju na istom vremenu zadržavanja kao i ciljani analiti. Osim kromatografskog razdvajanja, selektivnost svakog ciljanog analita određena je na temelju visokorezolucijske mase $[M+H]^+$ i prisutnosti fragmentnih iona koji odgovaraju svakom ciljnom analitu.

Linearnost metode određena je injektiranjem standardnih otopina u odgovarajućem koncentracijskom području za pojedini ciljani analit uz dodatak IS. Primjenom sustava UHPLC–QTOF–MS, masene koncentracije sildenafil i vardenafil redom su bile 10 ng mL^{-1} , 20 ng mL^{-1} , 50 ng mL^{-1} , 100 ng mL^{-1} , 200 ng mL^{-1} i 300 ng mL^{-1} , tadalafil 20 ng mL^{-1} , 40 ng mL^{-1} , 100 ng mL^{-1} , 200 ng mL^{-1} , 400 ng mL^{-1} i 600 ng mL^{-1} te avanafil 2 ng mL^{-1} , 4 ng mL^{-1} , 10 ng mL^{-1} , 20 ng mL^{-1} , 40 ng mL^{-1} i 60 ng mL^{-1} . IS korišten je pri konstantnoj masenoj koncentraciji od 100 ng mL^{-1} u svim standardnim otopinama i uzorcima.

Primjenom sustava LC–TOF, lineranost metode je određena injektiranjem osam standardnih otopina u masenom koncentracijskom rasponu analita od 50 ng mL^{-1} do 1500 ng mL^{-1} uz dodatak IS od 100 ng mL^{-1} . Masene koncentracije analita u standardnim otopinama su redom bile 50 ng mL^{-1} , 100 ng mL^{-1} , 200 ng mL^{-1} , 300 ng mL^{-1} , 500 ng mL^{-1} , 700 ng mL^{-1} , 1000 ng mL^{-1} i 1500 ng mL^{-1} .

Svaka radna otopina standarda je injektirana tri puta te je iz dobivenih podataka prikazana ovisnost omjera srednje vrijednosti izmjerenih površina analita i IS te pripadajuće koncentracije radne otopine standarda. Određena je jednadžba kalibracijskog pravca za pojedini spoj te izražen koeficijent determinacije R^2 za koji je postavljen kriterij, $R^2 \geq 0,98$.

Granica kvantifikacije (GK) postavljena je kao najniža koncentracija kalibracijske krivulje koja se može odrediti uz odgovarajuću točnost i preciznost. Granica detekcije (GD) izračunata je na temelju standardne devijacije reziduala (engl. *Residual Standard Error*) i nagiba kalibracijske krivulje dobivene analizom standardnih otopina u koncentracijskom području granice detekcije, prema sljedećoj jednadžbi:

$$GD = 3,3 \cdot \frac{s}{a} \quad (3)$$

gdje je s standardna devijacija reziduala, a a nagib kalibracijskog pravca.

Točnost metode ispitana je izračunavanjem analitičkog povrata nakon dodavanja standarda slijepim uzorcima različitih vrsta matrica (tablete, kapsule i med) na četiri koncentracijska nivoa (GK, $1,5 \times \text{GK}$, $15 \times \text{GK}$ i $25 \times \text{GK}$). Svaka koncentracija je injektirana šest puta u istom

danu i u razmaku od sedam dana. Analitički povrat (engl. *Recovery*, R), izračunava se kao omjer aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti prema jednadžbi:

$$R(\%) = \frac{\gamma_s}{\gamma_t} \cdot 100 \quad (4)$$

gdje je γ_s izmjerena masena koncentracija PDE-5I dodanih u slijepu matricu uzorka, a γ_t teoretska masena koncentracija PDE-5I dodanih u slijepu matricu uzorka

Prihvatljiv raspon točnosti postavljen je unutar 85 % – 115 % za sve ispitane koncentracijske nivoe, osim za GK gdje je prihvatljiv širi raspon točnosti od 80 % – 120 %.

U cilju potvrđivanja primjenjivosti metode za rutinska ispitivanja, dodatno su analizirani dostupni lijekovi za pomoć kod erektilne disfunkcije koji sadrže sildenafil (Kamagra), vardenafil (Levitra) i tadalafil (Cialis) kao farmakološki aktivne tvari s deklariranim sadržajem.

Preciznost metode ispitana je pomoću ispitivanja ponovljivosti mjerenja pri čemu su korišteni isti eksperimenti kao kod ispitivanja točnosti. Ispitivanje je provedeno na šest mjerenja za četiri koncentracijska nivoa. Ponovljivost mjerenja ispitana je isti dan i u razmaku od sedam dana (međupreciznost). Izračunate su srednje vrijednosti masenih koncentracija po svakom obogaćenom koncentracijskom nivou, standardne devijacije (engl. *Standard Deviation*, SD) i relativne standardne devijacije (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD). Metoda je prikladna ukoliko zadovoljava kriterije da je $RSD \leq 15\%$ za sve ispitane koncentracijske nivoe, osim za GK gdje je prihvatljiva vrijednost $RSD-a \leq 20$.

Utjecaj matrice (engl. *Matrix Effect*, ME), ispitan je na temelju usporedbe nagiba kalibracijskih pravaca dobivenih analizom standardne otopine smjese analita pripremljene u čistom otapalu i standardnih otopina pripremljenih u matrici uzorka obogaćenoj na četiri koncentracijska nivoa (GK, 1,5×GK, 15×GK i 25×GK) uz korištenje IS. U slijepe uzorke ispitivane matrice ekstrahirane prema postupku pripreme uzoraka opisanom u poglavlju 3.3.1. dodana je standardna otopina analita u ekstrakt neposredno prije analize. Standardna otopina u istoj koncentraciji pripremljena je i u čistom otapalu te su zajedno analizirane. ME, odnosno supresija ili povećanje intenziteta odziva signala, u postotku, računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$ME (\%) = \left(\frac{\text{nagib kalibracijskog pravca u matrici}}{\text{nagib kalibracijskog pravca u otapalu}} - 1 \right) \cdot 100 \quad (5)$$

ME je kategoriziran u nekoliko skupina: beznačajan $< \pm 10 \%$, prihvatljiv $\pm 10 \%$ do $\pm 20 \%$, umjeren $> \pm 20$ do $< \pm 50 \%$ i jaki $> \pm 50 \%$ s tim da pozitivna vrijednost predstavlja povećanje intenziteta odziva signala, a negativna vrijednost supresiju odziva signala uzrokovano matricom uzorka⁹⁵.

Stabilnost je ispitana u pripremljenim ekstraktima slijepih matrica (tableta, kapsula, med) obogaćenima analitima na četiri razine koncentracije: GK, 1,5×GK, 15×GK i 25×GK. Ekstrakti su analizirani odmah nakon pripreme (0. dan) te ponovno nakon 7 dana skladištenja u hladnjaku pri 4 °C u dobro zatvorenim bočicama za injektiranje, zaštićenima od svjetlosti. Stabilnost je izražena kao postotak zadržane masene koncentracije analita i izračunata prema izrazu (6). Prihvatljiv raspon stabilnosti je postavljen unutar 85 % – 115 % za sve koncentracijske nivoe, osim za granicu kvantifikacije gdje je prihvatljiv širi raspon stabilnost unutar 80 % – 120 %.

$$\text{Stabilnost (\%)} = \frac{\gamma_{\text{konačna (7 dan)}}}{\gamma_{\text{početna (0 dan)}}} \cdot 100 \quad (6)$$

gdje je $\gamma_{\text{konačno (7 dan)}}$ izmjerena masena koncentracija PDE–5I dodanih u ekstraktu nakon 7 dana skladištenja, a $\gamma_{\text{početna (0 dan)}}$ početna masena koncentracija PDE–5I u ekstraktu izmjerena odmah nakon pripreme.

3.5. Mjerna nesigurnost analitičkih metoda

Mjerna nesigurnost je parametar pridružen rezultatu mjerenja, koji označava rasipanje vrijednosti oko mjerne veličine. Mjerna nesigurnost određivanja PDE–5I u dodacima prehrani procijenjena je na temelju podataka dobivenih validacijom metode i iz podataka preuzetih iz umjernica i certifikata proizvođača standardnih referentnih tvari i opreme. Izračuni nesigurnosti provedeni su prema Vodiču za procjenu mjerne nesigurnosti – GUM metoda (engl. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*).

Metoda određivanja PDE–5I u ovom istraživanju temelji se na razrijedi i mjeri principu gdje se homogenizirani uzorak ekstrahira otapalom, a dobiveni ekstrakt filtrira i razrijedi. Identifikacija i kvantifikacija u razređenom ekstraktu se provodi vezanim sustavima HPLC–TOF i

UHPLC–QTOF. Navedenim metodama određuje se masena koncentracija pojedinog PDE–5I u ekstraktu uzorka pomoću sljedećih izraza:

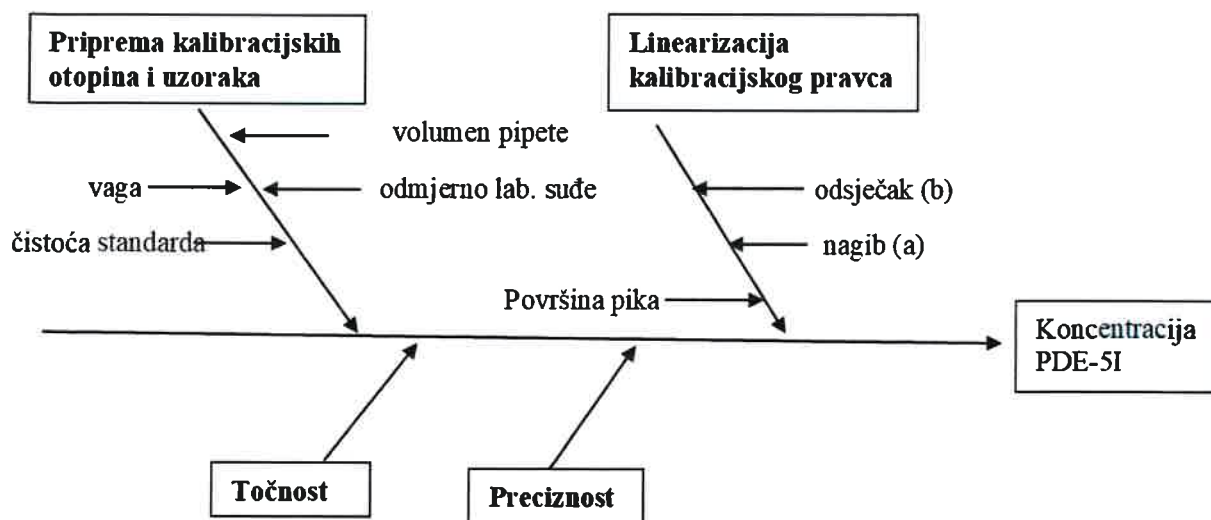
$$y = ac + b \quad (7)$$

$$c = \frac{y - b}{a} \quad (8)$$

gdje je y odziv detektora, a nagib kalibracijskog pravca, b odsječak na y osi.

Izmjerena vrijednost koncentracije se korigira s obzirom na pripremu uzorka prema formuli (1). Izvori mjerne nesigurnosti (A i B vrste) su identificirani te grafički prikazani Ishikavinim dijagramom uzroka i posljedica (Slika 6). Nesigurnosti A vrste odnose se na podatke koji su dobiveni statističkom obradom rezultata proizašlih iz validacijskih eksperimenata kao što su: kalibracijski pravac, preciznost te točnost. Izvori nesigurnosti B vrste odnose se na podatke preuzete iz certifikata i umjernica kao što su: čistoća referentnih materijala, nesigurnost umjernog suđa, nesigurnost vage te nesigurnost volumena pipeta i odmjernog posuđa. Standardne nesigurnosti izračunate su prema formuli (9), gdje je a podatak o vrijednosti mjerne nesigurnosti koji daje proizvođač na pripadajućem certifikatu/umjernici.

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (9)$$



Slika 6. Ishikava dijagram za metodu određivanja PDE–5I.

Nesigurnost kalibracijskog pravca, računa se pomoću sljedećih formula (10–12):

$$u(\bar{c}_0) = \frac{s}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}} \quad (10)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_j - (ac_j + b))^2}{n-2}} \quad (11)$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2 \quad (12)$$

gdje je s rezidualno standardno odstupanje, a nagib kalibracijskog pravca, p broj točaka u kalibracijskom pravcu, c_0 očitana koncentracija, n broj mjerenja iz kojeg je određena c_0 , A_j površina kalibranta, c_j koncentracija kalibranta, b odsječak kalibracijskog pravca.

Za izračun nesigurnosti preciznosti korišteni su podaci ponovljivosti mjerenja (intermedijarna preciznost) kroz 7 dana na četiri koncentracijska nivoa gdje je svaki nivo izmjeren 6 puta. Izračunata je združena (engl. *Pooled*) standardna devijacija, s_p , uzimajući u obzir standardne devijacije svakog dana s_i i broja ponavljanja n , prema formuli (13):

$$s_p = \sqrt{\frac{\sum (n-1) \cdot s_i^2}{\sum (n-1)}} \quad (13)$$

Za izračun nesigurnosti točnosti, korištena je standardna devijacija analitičkih povrata prema formuli (14):

$$u_i = \frac{s_i}{\sqrt{n}} \quad (14)$$

Nakon kvantifikacije svih sastavnica mjerne nesigurnosti odabrane su one koje doprinose značajnoj ukupnoj mjernoj nesigurnosti. Sastavljena mjerna nesigurnost računa se prema formuli:

$$u_c = c \cdot \sqrt{(u_1)^2 + (u_2)^2 + (u_3)^2 + \dots + (u_n)^2} \quad (15)$$

gdje je c koncentracija mjerne veličine pri kojoj se iskazuje mjerna nesigurnost.

Proširena mjerna nesigurnost računa se množenjem sastavljene mjerne nesigurnosti s obuhvatnim faktorom $k=2$ (vjerojatnost 95 %).

$$U = k \cdot u_c = 2 \cdot u_c \quad (16)$$

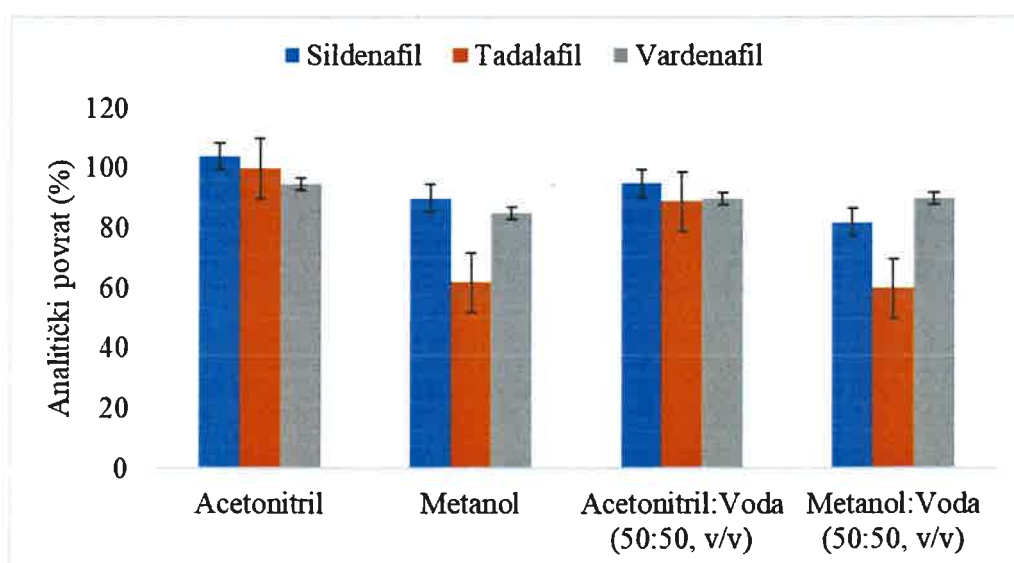
3.6. Statistička obrada podataka

Sve vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (n nezavisnih mjerenja). Statistička obrada podataka provedena je korištenjem računalnog programa Microsoft Excel 2019, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Za usporedbu razlika između dviju skupine podataka o sadržaju PDE-5I (sildenafil i tadalafil), dobivenih različitim instrumentima, primijenjen je dvostrani Studentov t -test na razini značajnosti $P = 0,05$.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija postupka ekstrakcije

Kako bi se smanjio broj koraka i skratilo vrijeme pripreme, za ekstrakciju PDE-5I iz dodataka prehrani (kapsule, prahovi, tablete) primijenjena je jednostavna metoda ekstrakcije kruto-tekuće. Posebna pažnja tijekom optimizacije posvećena je odabiru najprikladnijeg otapala s ciljem postizanja maksimalne učinkovitost ekstrakcije i što većeg postotka analitičkog povrata ciljanih spojeva. U tu svrhu ispitana su sljedeća otapala: acetonitril, metanol, smjesa metanola i vode (50:50, v/v) i smjesa acetonitrila i vode (50:50, v/v). Odabir otapala temeljen je na polarnim svojstvima PDE-5I te na podacima objavljenima u literaturi^{120,121,132,146,147}. Prethodna istraživanja pokazala su da se acetonitril i njegove smjese s vodom najčešće koriste kao ekstrakcijska otapala, što se može pripisati slaboj topljivosti tadalafile u metanolu¹²⁰. Eksperimenti su provedeni na komercijalnim farmaceutskim formulacijama koje sadrže sildenafil, vardenafil i tadalafile (poglavlje 3.2, Tablica 7.) kao farmakološki aktivne tvari. Analitički povrat (%) odabranih PDE-5I izračunat je na temelju deklarirane količine aktivnih tvari, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 7.



Slika 7. Usporedba srednjih vrijednosti analitičkih povrata dobivenih ekstrakcijom PDE-5I iz različitih komercijalnih farmaceutskih formulacija.

Prema dobivenim rezultatima, za sve ispitivane analite najbolji analitički povrati postignuti su korištenjem acetonitrila kao ekstrakcijskog otapala, dok smjesa acetonitrila i vode (50:50, v/v) daje usporedive rezultate. Metanol i njegova smjesa s vodom (50:50, v/v) kao ekstrakcijska otapala daju znatno niže analitičke povrate za tadalafil, dok su za sildenafil i vardenafil ti povrati i dalje zadovoljavajući. Ovi rezultati potvrđuju literaturne navode o slabijoj topljivosti tadalafila u metanolu.

Zbog visokog udjela šećera te prisustva proteina, organskih kiselina, pigmenata i nečistoća, med predstavlja složenu matricu koja može otežati detekciju, osobito pri niskim koncentracijama. Za razvoj i optimizaciju postupka pripreme meda korištena je slijepa matrica meda. Uzorak meda potrebno je dobro izmješati staklenim štapićem, pazeći pritom da se izbjegne stvaranje mjehurića zraka. Uzorci meda se prije ekstrakcije obično otapaju u vodi, pa se za ekstrakciju PDE-5I iz uzoraka meda razmatrala smjesa vode i organskog otapala. Primijenjena je jednostavna ekstrakcija smjesom organskog otapala i vode pri čemu su ispitana dva organska otapala: acetonitril i metanol. Med u količini od 1,0 g otopljen je u 12,5 mL vode, obogaćen je s smjesom ciljanih PDE-5I i IS, nakon čega je smjesi dodano 12,5 mL organskog otapala. Konačna koncentracija ciljanih PDE-5I iznosila je 50 ng mL⁻¹, a IS 100 ng mL⁻¹. Nakon miješanja na vortex mješalici uzorak je postavljen u ultrazvučnu kupelj (30 min), a potom centrifugiran (10 min, 4600 o min⁻¹, sobna temperatura). Gornji sloj je filtriran kroz PTFE filter (veličine čestica 0,2 µm). Učinkovitost ekstrakcije procijenjena je na temelju analitičkog povrata (%), a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Analitički povrat ekstrakcije PDE-5I iz meda primjenom smjese vode i organskih otapala (voda:organsko otapalo = 50:50, v/v), $V = 25$ mL, $n = 3$.

Otapalo	Analitički povrat, %			
	Sildenafil	Vardenafil	Avanafil	Tadalafi
Acetonitril	96,0	101,5	103,9	89,8
Metanol	91,2	87,0	96,6	73,8

Na temelju dobivenih rezultata, acetonitril se pokazao kao optimalno otapalo za ekstrakciju PDE-5I iz uzoraka meda, pružajući najbolje rezultate u smislu analitičkog povrata ekstrakcije i intenziteta odgovora. Iako je smjesa metanola i vode također pokazala zadovoljavajuće rezultate, njezina učinkovitost bila je nešto niža, posebno za tadalafil (73,8 %).

Ova metoda pripreme odabrana je kao standardna tehnika ekstrakcije meda i ostalih krutih uzoraka (kapsule, tablete, prahovi) te je naknadno validirana u svim ispitivanim matricama, duž cijelog područja metode, uz prihvatljiv i zanemariv utjecaj matrice (ME, %).

4.2. Razvoj UHPLC–QTOF metode za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani

4.2.1. Optimizacija kromatografskih uvjeta

Optimizacija kromatografskih uvjeta za razdvajanje PDE–5I u dodacima prehrani zahtijeva podešavanje različitih parametara kako bi se postiglo učinkovito razdvajanje i detekcija ciljanih spojeva. Iako potpuno kromatografsko razdvajanje analita nije nužno kod primjene tandemne MS detekcije, koja predstavlja standard u većini LC metoda za analizu PDE–5I, bolje razdvajanje ipak doprinosi povećanju osjetljivosti metode, preciznosti kvantifikacije i reproducibilnosti rezultata. Osim toga, osobito je važna kod analize složenih matrica, gdje kromatografsko razdvajanje može značajno smanjiti nepovoljne utjecaje matrice u analizatoru masa. Ciljani PDE–5I i njihovi strukturni analozi, većinom su bazični spojevi, što je posljedica prisutnosti specifičnih funkcionalnih skupina poput sekundarnih i tercijarnih amina (npr. piperazinska skupina u sildenafilu). Njihova fizikalno–kemijska svojstva, navedena su u Tablici 3, poglavlje 2.2.1.

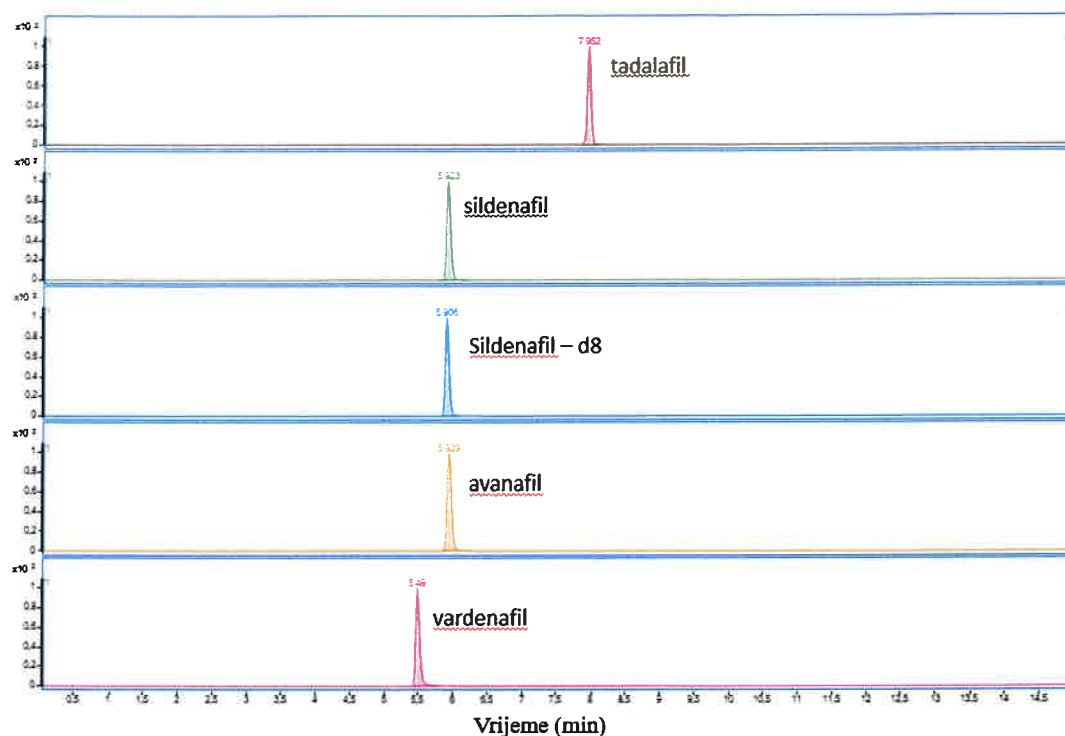
Za analizu PDE–5I sustavom HPLC–TOF i UHPLC–QTOF primijenjena je kromatografija obrnutih faza, pri čemu su u preliminarnim istraživanjima testirane tri različite kromatografske kolone: Inertsil ODS–4 HP C18, Kinetex XB–C18 i Zorbax SB–C18 (Tablica 12). Kolona Inertsil ODS–4 sadrži visokokvalitetni silikagel sa specifičnim C18 vezanjem. Poznata je po izuzetno inertnom silikagelu, što smanjuje neželjene interakcije s polarnim i bazičnim spojevima, što rezultira boljim oblicima kromatografskih pikova i reproducibilnošću. Kinetex XB kolona koristi čestice jezgra–ljuska (engl. *Core–Shell*) na bazi silicija s di–izobutilnim C18 modifikatorima, što poboljšava učinkovitost, oštrinu kromatografskih pikova i selektivnost za bazične i kisele spojeve, čineći je prikladnom za širok raspon analitičkih primjena u HPLC/UHPLC sustavima. Zorbax SB koristi visokostabilan silikagel sa di–izobutilnim C18 vezanjem, dizajniran za rad u kiselim uvjetima. Kolone Inertsil ODS–4 i Kinetex XB pripadaju deaktiviranim (engl. *End–Capped*) kolonama što znači da su podvrgnute dodatnoj obradi kako

bi se deaktivirale rezidualne silanolne skupine prisutne na površini silikagela. Prisutnost tih skupina može dovesti do širenja kromatografskih pikova, posebno kod spojeva s bazičnim funkcionalnim skupinama. Kolone su odabrane prema njihovoj selektivnosti za PDE-5I, uključujući sposobnost zadržavanja spojeva s polarnim i nepolarnim svojstvima. Kako bi se minimizirao utjecaj dimenzija kolone i veličine čestica punila na rezultate odvajanja, odabrane su kolone s najbližijim dimenzijama i veličinama čestica među dostupnim opcijama. Karakteristike korištenih kolona su navedene u Tablici 12. U gotovo svim objavljenim metodama za odvajanje PDE-5I korištene su različite C18 kolone s punilom temeljenim na silikagelu modificiranim sa oktadecilnim skupinama^{122,124,126,135,147,148}. Iznimka je studija Ren i suradnici, koji su se odlučili za C8 kolonu¹³⁸. Dimenzije kolona korištenih u literaturi variraju u duljini od 50 mm do 250 mm, unutarnjem promjeru od 2,0 mm do 4,6 mm, te veličini čestica punila od 1,8 μm do 5 μm .

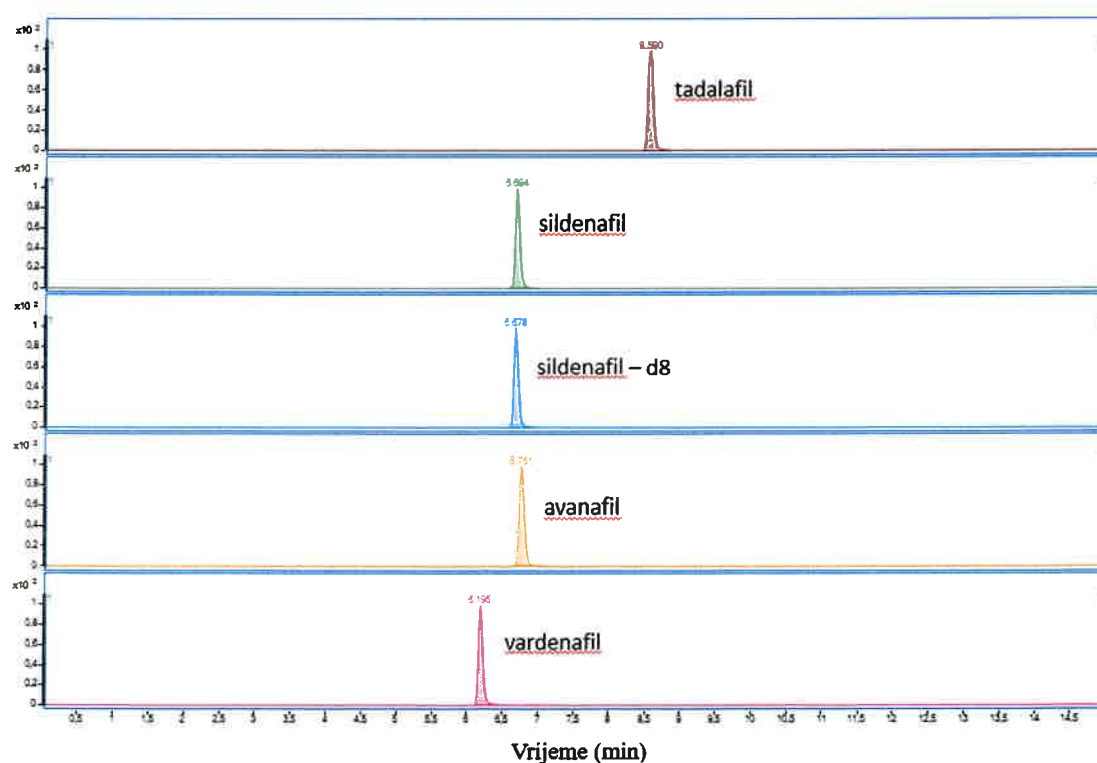
Rezultati analiza pokazali su da među testiranim kolonama nije bilo značajnih razlika u razdvajanju ciljanih spojeva. Vremena zadržavanja bila su relativno slična, no kolona Inertsil ODS-4 HP pokazala se najučinkovitijom u razdvajanje ciljanih PDE-5I spojeva. S druge strane, Kinetex XB-C18 i Zorbax SB-C18 kolone, nisu postigle jednaku razinu razlučivanja, unatoč svojim specifičnim prednostima. Kolona Zorbax SB je pri istim uvjetima pokazala nešto bolju selektivnost od Kinetex XB, budući su na njoj sildenafil i avanafil djelomično razdvojeni. Nasuprot tome, na koloni Kinetex XB, kromatografski pikovi sildenafil i avanafil koeluiraju. Usporedba kromatograma iona odabranih m/z vrijednosti ciljanih PDE-5I na sve tri kolone prikazana je na Slikama 8. – 10. S obzirom na to da je kolona Inertsil ODS-4 pokazala najbolji učinak razdvajanja, odabrana je za daljnju optimizaciju sastava pokretne faze prema Tablici 13.

Tablica 12. Karakteristike HPLC kolona.

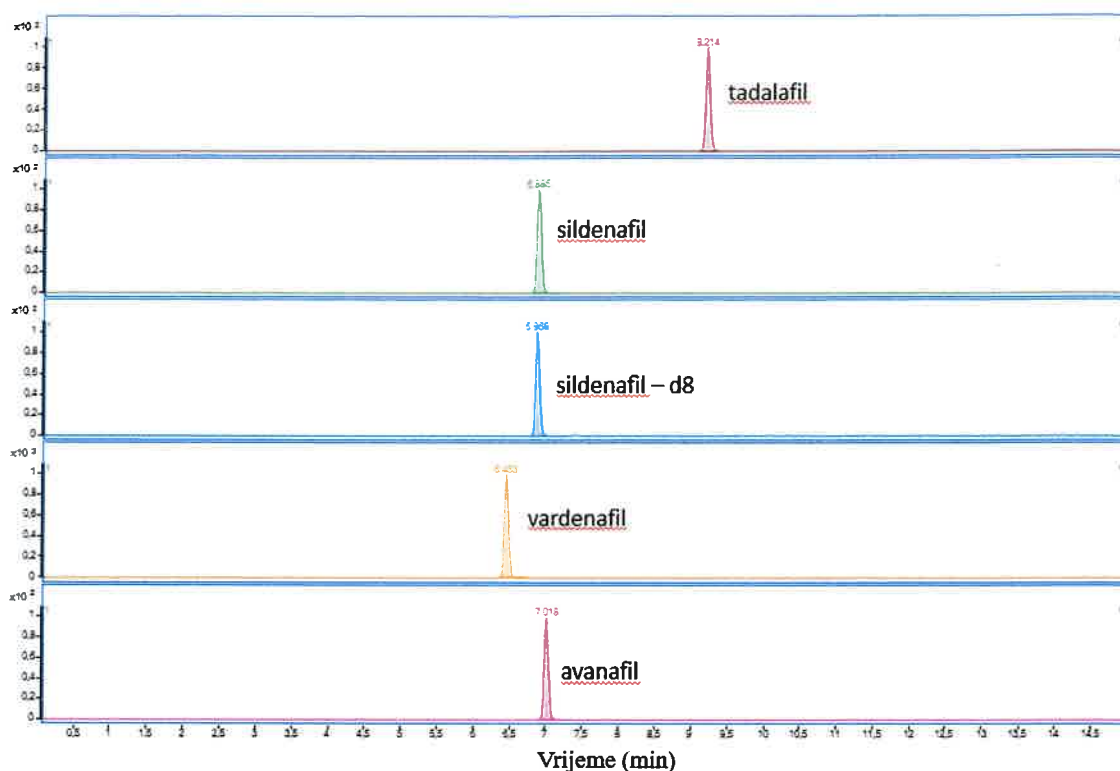
Naziv kolone	Vrsta nepokretne faze	Dimenzije (mm)	Veličina čestica (μm)	Površina čestica ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Veličina pora ($\text{\AA}$)	Udio ugljika (%)	“End-Capped”
Inertsil ODS-4	C18	150 ´ 2,1	3,0	450	100	11	DA
Kinetex XB	C18	150 ´ 2,1	2,6	200	100	10	DA
Zorbax SB	C18	150 ´ 2,1	3,5	–	80	1	NE



Slika 8. Analiza standardne smjese PDE–5I na koloni Kinetex XB: kromatogrami iona odabranih m/z vrijednosti. Masena koncentracija pojedinačnih analita: 50 ng mL⁻¹.



Slika 9. Analiza standardne smjese PDE–5I na koloni Zorbax SB: kromatogrami iona odabranih m/z vrijednosti. Masena koncentracija pojedinačnih analita: 50 ng mL⁻¹.



Slika 10. Analiza standardne smjese PDE-5I na koloni Inertsil: kromatogrami iona odabranih m/z vrijednosti. Masena koncentracija pojedinačnih analita: 50 ng mL^{-1} .

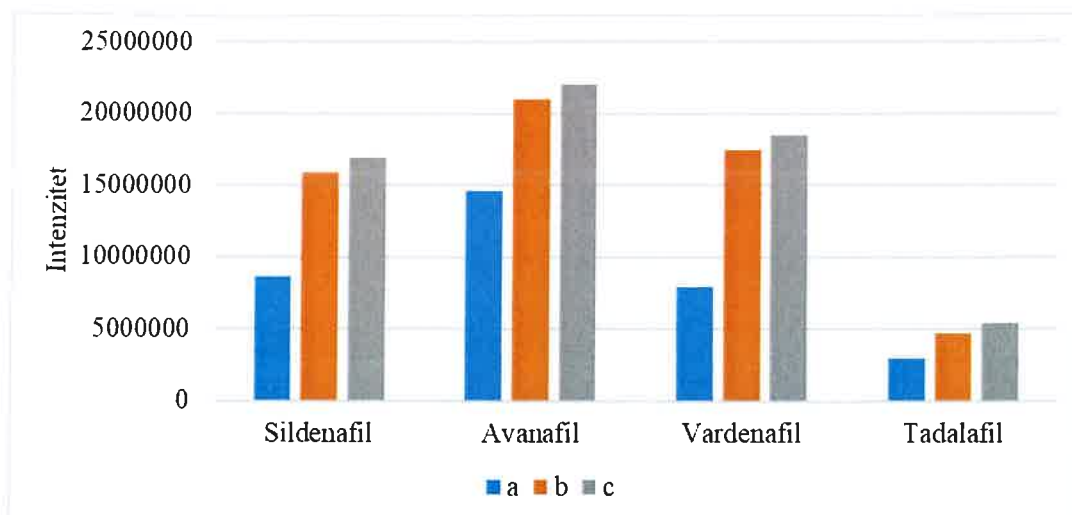
Prilikom optimizacije kromatografskog procesa ključno je pronaći optimalan sastav pokretne faze kako bi se postigao pravilan oblik kromatografskih pikova i zadovoljavajuća osjetljivost ciljanih spojeva. Ionska jakost pokretne faze ima značajan utjecaj na odgovor spektrometra mase. Prethodna istraživanja pokazala su da se za razdvajanje ciljanih spojeva najčešće koristi gradijentno ispiranje pri čemu su acetonitril i metanol najčešće korišteni kao organska pokretna faza^{120,126,147–149}. Međutim, metanol se nije pokazao pogodnim za razdvajanje sildenafil i vardenafil zbog njihove slične strukture i polarnosti. Osim toga, metanol generira veći tlak i pozadinski šum pa zato nije razmatran kao potencijalna organska faza tijekom optimizacije^{146,148}. PDE-5I spojevi u svojim strukturama sadrže bazične amino skupine, što ih čini izrazito osjetljivim na pH pokretne faze, budući da mogu biti prisutni u neutralnoj i ioniziranoj formi¹²¹. Općenito, pH i sastav pokretne faze značajno utječu na zadržavanje takvih spojeva, ali i na oblik kromatografskog pika¹⁵⁰. Zbog bazičnog karaktera PDE-5I spojeva, u pokretnu fazu su dodavane ili mravlja ili octena kiselina kao i amonijev formijat ili acetat, unatoč tome što njihova prisutnost može pojačati supresijske učinke kod ESI

ionizacije¹²¹. Kisele pokretne faze povoljne su za kromatografsko razdvajanje spojeva s bazičnim funkcionalnim skupinama, jer smanjuju disocijaciju potencijalno zaostalih rezidualnih skupina u slabe anionske vrste, koje mogu snažno vezati bazične spojeve. Osim toga, kiseli aditivi (npr. mravlja kiselina) potpomažu protoniranje bazičnih spojeva čime se povećava signal. Uz kisele aditive, u pokretnu fazu se dodavaju modifikatori poput amonijeva acetata i amonijeva formijata, koji stabiliziraju pH i ionsku jakost, a mogu utjecati na polarnost analita te poboljšati efikasnosti ionizacije. Provedena su testiranja različitih vrsta pokretnih faza. Za vodenu pokretnu fazu testirana je prisutnost 0,1 % mravlje kiseline i amonijeva formijata u različitim koncentracijama (2 mmol L^{-1} i 5 mmol L^{-1}) dok je u svim eksperimentima kao organska pokretna faza korišten acetonitril uz dodatak 0,1 % mravlje kiseline (Tablica 13).

Tablica 13. Testirane kombinacije pokretnih faza.

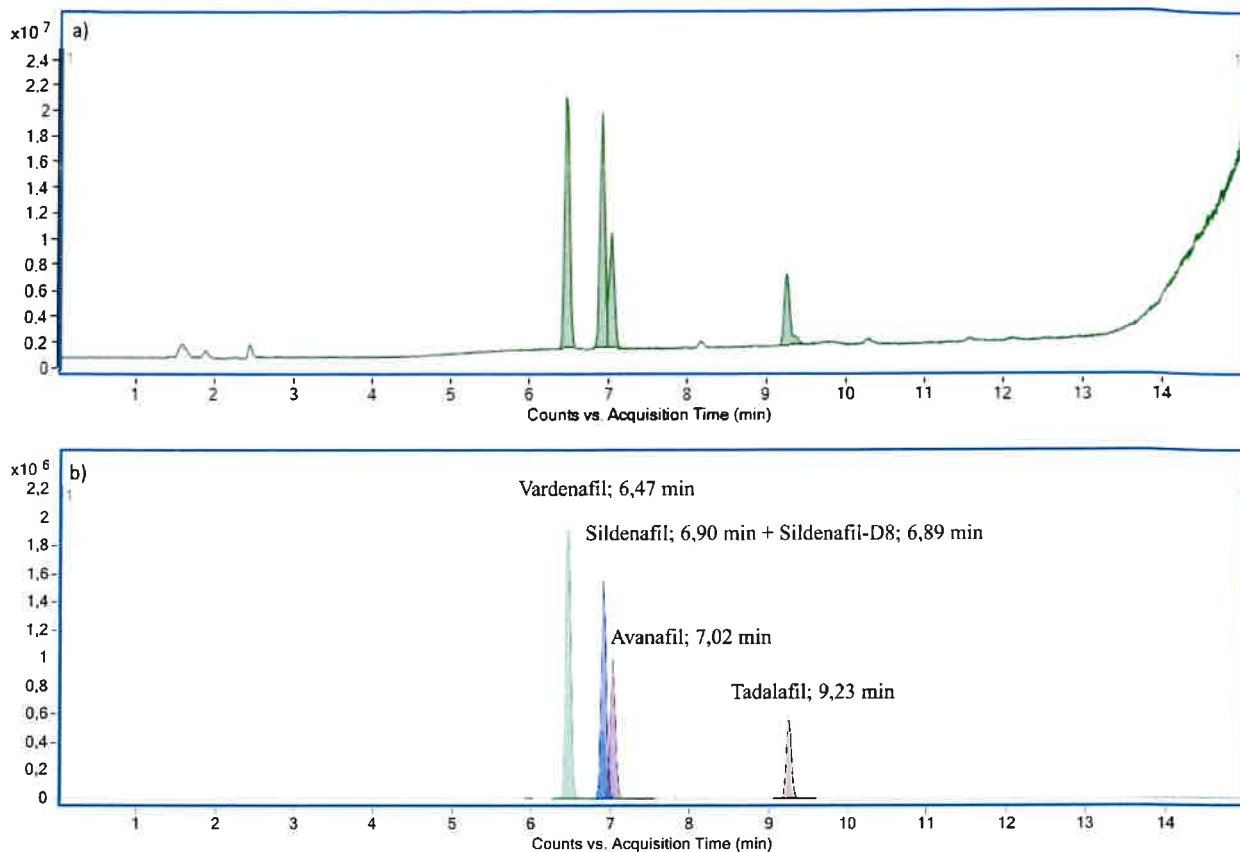
	Pokretna faza A	Pokretna faza B
a	0,1 % mravlja kiselina u vodi	0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
b	2 mmol L^{-1} amonijev formijat i 0,1 % mravlja kiselina u vodi	0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
c	5 mmol L^{-1} amonijev formijat i 0,1 % mravlja kiselina u vodi	0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu

Rezultati utjecaja sastava pokretne faze prikazani su na Slici 11., gdje je jasno vidljiva razlika u intenzitetu odziva za sve ciljane analite, ovisno o korištenoj pokretnoj fazi. Povećani udio amonijeva formijata u vodenoj fazi imao je pozitivan utjecaj na učinkovitost ionizacije ciljanih spojeva, što je rezultiralo povećanjem signala. Na temelju najboljeg odziva, za konačnu pokretnu fazu A odabrana je voda s dodatkom 5 mmol L^{-1} amonijeva formijata i 0,1 % mravlje kiseline, dok je kao pokretna faza B korišten acetonitril s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline.



Slika 11. Utjecaj sastava pokretne faze. Testirane kombinacije pokretnih faza (a, b, c) navedene u Tablici 13.

Optimizirani su i ostali kromatografski parametri, uključujući protok pokretne faze, temperaturu kolone i volumen injektiranja. Protok je ispitan u rasponu od $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ do $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Povećanjem protoka pokretne faze smanjivalo se vrijeme zadržavanja ciljanih analita na koloni, ali je istovremeno rasla potrošnja otapala. Kao optimalni protok za analizu PDE-5I izabran je $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Temperatura kolone testirana je u rasponu od $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Povećanje temperature rezultiralo je višim i ponovljivijim odzivom te smanjenjem tlaka u koloni, dok značajne promjene u vremenu zadržavanja nisu zabilježene. Na temelju rezultata, za optimalnu temperaturu odabrano je $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Volumen injektiranja ispitan je u rasponu od $1 \text{ }\mu\text{L}$ do $5 \text{ }\mu\text{L}$ kako bi se postigla zadovoljavajuće niska granica kvantifikacije, uz minimalno unošenje nečistoća. Kao optimalni volumen odabran je $1 \text{ }\mu\text{L}$ jer se time smanjuje količina matrice koja se unosi u sustav i posljedično utjecaj matrice uzorka. Kromatogram standarda pri optimalnim uvjetima prikazan je na Slici 12.



Slika 12. a) Kromatogram ukupne ionske struje (TIC) smjese ciljanih PDE-5I i IS (300 ng mL^{-1} sildenafil i vardenafila, 400 ng mL^{-1} tadalafila, 60 ng mL^{-1} avanafila i 100 ng mL^{-1} IS); b) kromatogrami iona odabranih vrijednosti m/z (EIC) ciljanih PDE-5I i IS.

4.2.2. Optimizacija masenospektrometrijskih uvjeta na uređaju UHPLC-QTOF

Za određivanje polarnih organskih spojeva, uključujući PDE-5I, uobičajeno se koristi ionizacija elektroraspršenjem. Izbor polariteta ionizacije ovisi o svojstvima analita, no u svim dosadašnjim istraživanjima za ciljne PDE-5I primjenjivana je pozitivna ionizacija. Kako bi se postigla maksimalna osjetljivost i selektivnost instrumenta, provedena je optimizacija parametara ionskog izvora za četiri ciljana PDE-5I injektiranjem standardnih otopina izravno u protok mobilne faze (engl. *Flow-Injection Analysis*, FIA), bez upotrebe kromatografske kolone. Koristila se ionizacija elektroraspršenjem u pozitivnom modu, uz primjenu individualnih standardnih otopina koncentracije 500 ng mL^{-1} i protoka $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Testirani su sljedeći parametri ionskog izvora: potencijal fragmentora ($100 \text{ V} - 400 \text{ V}$), napon kapilare ($3000 \text{ V} - 3500 \text{ V}$), temperatura plina omotača ($225 \text{ }^{\circ}\text{C} - 350 \text{ }^{\circ}\text{C}$), protok plina omotača ($10 \text{ L min}^{-1} - 12 \text{ L min}^{-1}$), tlak raspršivača ($25 \text{ psi} - 40 \text{ psi}$), napon mlaznice ($0 \text{ V} - 2000 \text{ V}$), protok

plina za sušenje (15 L min^{-1} – 20 L min^{-1}), temperatura plina za sušenje ($200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $225 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Za sve ciljane analite bilo je ključno postići što veći i stabilniji intenzitet odziva. Protonirani ion ($[\text{M}+\text{H}]^{+}$) pokazao se kao najintenzivniji ion te je odabran kao prekursor ion. Utjecaj ispitivanih operativnih parametara na intenzitet MS signala prikazan je u Tablici 14., gdje je maksimalni intenzitet signala definiran kao 100%, a svi ostali izraženi su relativno prema toj vrijednosti. Testirani rasponi i preporučene vrijednosti preuzeti su iz uputa proizvođača instrumenta. Za većinu parametara uključujući tlak raspršivača, potencijal kapilare, potencijal mlaznice, protok i temperatura plina za sušenje preporučene vrijednosti su odabrane kao optimalne, jer značajno poboljšanje intenziteta signala nije uočeno pri promjenama tih parametara. Niži protok plina omotača i viša temperatura rezultirali su višim intenzitetom signala. Nadalje, za sve ciljane PDE–5I bolji intenzitet signala postignut je pri višem potencijalu fragmentora i srednjem potencijalu mlaznice.

Tablica 14. Utjecaj različitih parametara izvora na MS intenzitet signala. Optimalne vrijednosti su podebljane.

Parametar	Testirana vrijednost	% Sildenafil	% Tadalafil	% Vardenafil	% Avanafil
Potencijal fragmentora, V	100	59	85	69	49
	200	83	86	80	68
	300	94	100	97	89
	350	100	98	97	94
	380	96	86	100	82
	400	92	27	99	100
Temperatura plina omotača, $^{\circ}\text{C}$	225	91	67	74	71
	250*	93	75	77	87
	300	93	80	92	87
	350	100	100	100	100
Protok plina omotača, L min^{-1}	10	100	92	98	100
	11*	97	100	98	94
	12	97	97	100	86
Tlak raspršivača, psi	25*	100	100	98	100
	30	88	90	100	91

Parametar	Testirana vrijednost	% Sildenafil	% Tadalafil	% Vardenafil	% Avanafil
	35	79	80	82	64
	40	71	72	80	68
Potencijal kapilare, V	3000	77	88	93	53
	3500*	100	100	100	100
Potencijal mlaznice, V	0	39	70	62	15
	500	83	100	92	56
	1000	95	90	100	89
	1500	100	79	98	100
	2000	91	69	87	99
Temperatura plina za sušenje, °C	200*	100	100	100	100
	225	94	96	94	91
Protok plina za sušenje, L min ⁻¹	15	99	93	96	96
	17*	100	100	100	100
	20	97	96	97	92

*zadane vrijednosti preporučene u uputama proizvođača instrumenta

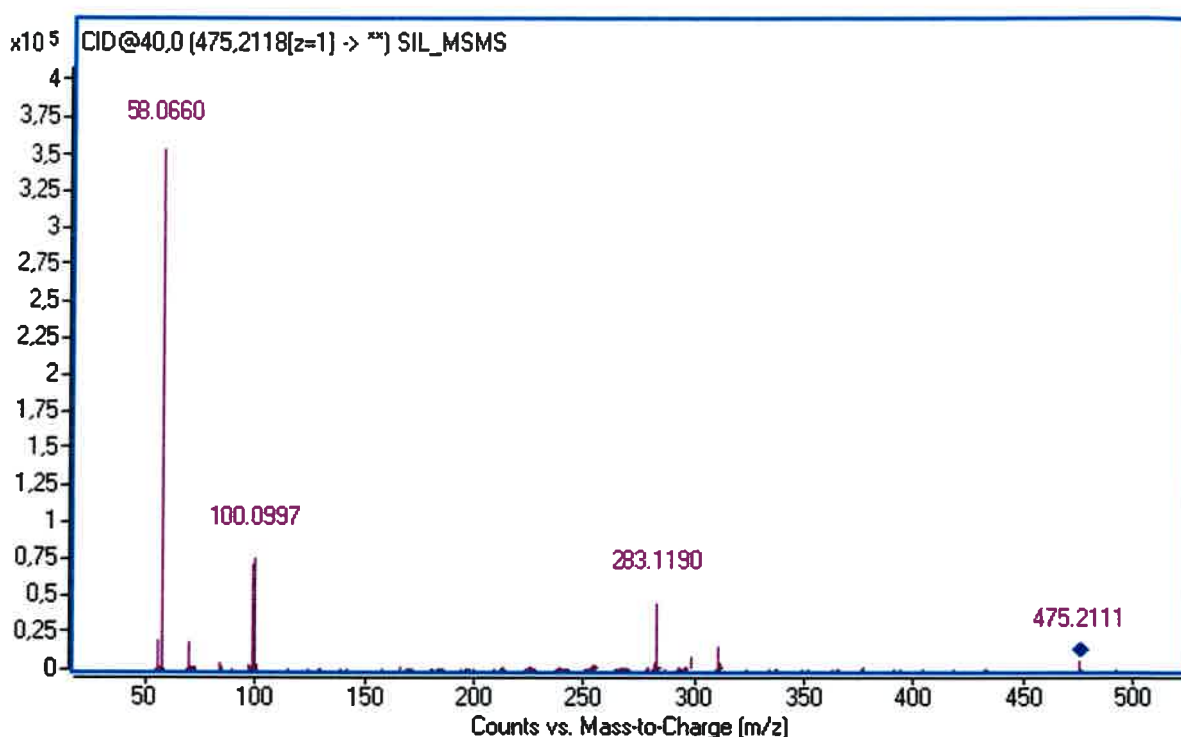
Nakon optimizacije parametara ionskog izvora, za sve ciljane PDE–5I slijedilo je određivanje optimalnih parametara spektrometrije masa. Snimljeni su spektri masa pozitivnih iona u rasponu m/z 100 – 1000. Kao što je već navedeno u eksperimentalnom dijelu, za sve ciljane analite kao prekursor ion odabran je protonirani molekulski ion, $[M+H]^+$. Tandemna spektrometrija masa provodila se nad odabranim prekursor ionima, pri različitim kolizijskim potencijalima u rasponu od 10 V do 50 V, uz povećanje od 5 V. Za svaki primijenjeni potencijal praćen je intenzitet fragmentnih iona, a na temelju intenziteta signala u MS/MS spektrima odabrani su optimalni kolizijski potencijali za svaku ciljanu tvar koji su navedeni u Tablici 15. Osim toga, odabrana su dva najzastupljenija i najstabilnija produkt iona, pri čemu je najintenzivniji izabran kao kvantifikacijski, a drugi manjeg odziva kao potvrdni (kvalifikacijski) ion. Kao kolizijski plin korišten je dušik, a MS/MS spektri ciljanih PDE–5I pohranjeni su u bazu podataka. Tako kreirana baza s molekularnim i fragmentnim ionima, koji potvrđuju svaki od odabranih PDE–5I, koristi se u daljnjim analizama. MS/MS spektri prikazani su na Slikama 15, 17, 19, 21 i 23, dok su predloženi fragmentacijski putevi prikazani na Slikama 16, 18, 20, 22 i 24. Fragmentacijski putevi i strukture fragmentnih iona predloženi

su na temelju dobivenih iona iz MS/MS spektara pri optimalnim CE vrijednostima. Tablica 15. prikazuje četiri ciljana PDE-5I, njihova vremena zadržavanja, kolizijske potencijale te molekularne i fragmentne ione kao i pogreške određivanja masa. Pogreške mase vrlo su male (<5,2 ppm) i ukazuju na dobru preciznost i pouzdanost rezultata. Pretpostavljene sheme fragmentacija temeljene na dobivenim MS/MS spektrima, izrađene su korištenjem programa ChemDraw.

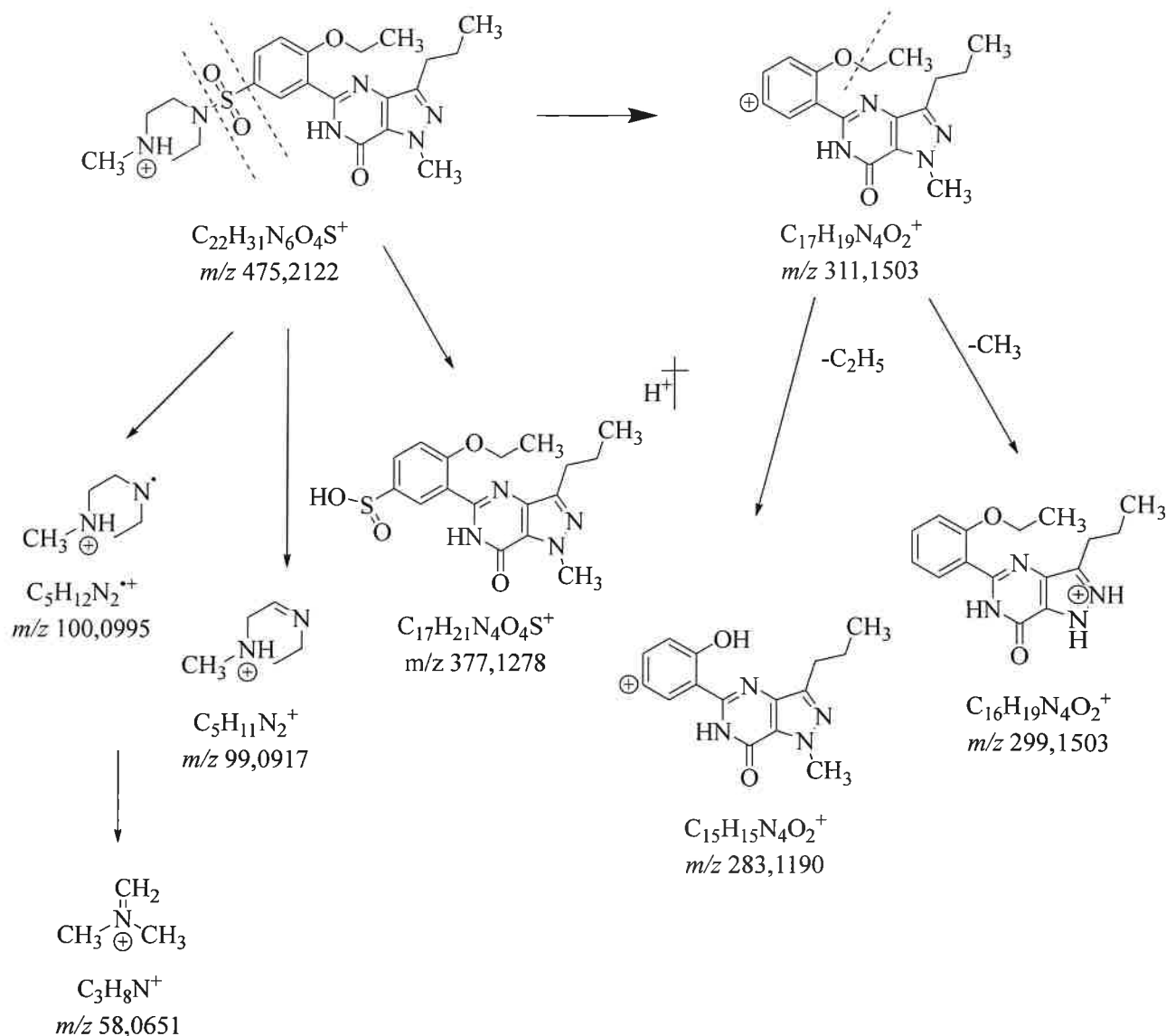
Tablica 15. Vremena zadržavanja ciljanih PDE–5I, m/z prekursor i produkt iona te optimizirani kolizijski potencijali MS/MS analize.

Analit	Vrijeme zadržavanja (min)	CE (V)	Prekursor ion $[M+H]^+$		Pogreška mase (ppm)	Produkt ion 1 (kvantifikator) (m/z)	Pogreška mase (ppm)	Produkt ion 2 (kvalifikator) (m/z)	Pogreška mase (ppm)
			Teoretska vrijednost (m/z)	Eksperimentalna vrijednost (m/z)					
Vardenafil	6,47	50	489,2279	489,2266	-2,7	151,0870	2,7	312,1582	0,3
Sildenafil	6,90	40	475,2122	475,2111	-2,3	58,0660	5,2	100,0997	2,0
Avanafil	7,04	35	484,1857	484,1855	-0,6	375,1230	3,2	155,0265	4,5
Tadalafil	9,23	10	390,1448	390,1458	2,6	268,1092	4,1	135,0444	2,2
Sildenafil–d8	6,89	40	483,2624	483,2620	-0,8	62,0905	4,8	108,1496	-0,9

Ionizacijom sildenafilu u pozitivnom načinu snimanja nastaje protonirani molekulski ion $[M+H]^+$ sa signalom pri m/z 475,2111. Primjenom kolizijskog potencijala uočeni su signali fragmentnih iona pri m/z 283,1190, koji je rezultat cijepanja sulfonil–metilpiperazinskog prstena i odgovara jednostruko nabijenom fragmentnom ionu $[C_{15}H_{15}N_4O_2]^+$. Nadalje, fragmentacijom nastalog metilpiperazina (m/z 100,0997) nastaje fragmentni ion m/z 58,0660, koji odgovara fragmentnom ionu $[C_3H_8N]^+$. Gotovo jednake rezultate dobili su i drugi autori^{132,135,136,151,152}. Na temelju fragmentnih iona prikazanih na Slici 13. predloženi su mogući mehanizmi fragmentacije sildenafilu, a prikazani su na Slici 14.



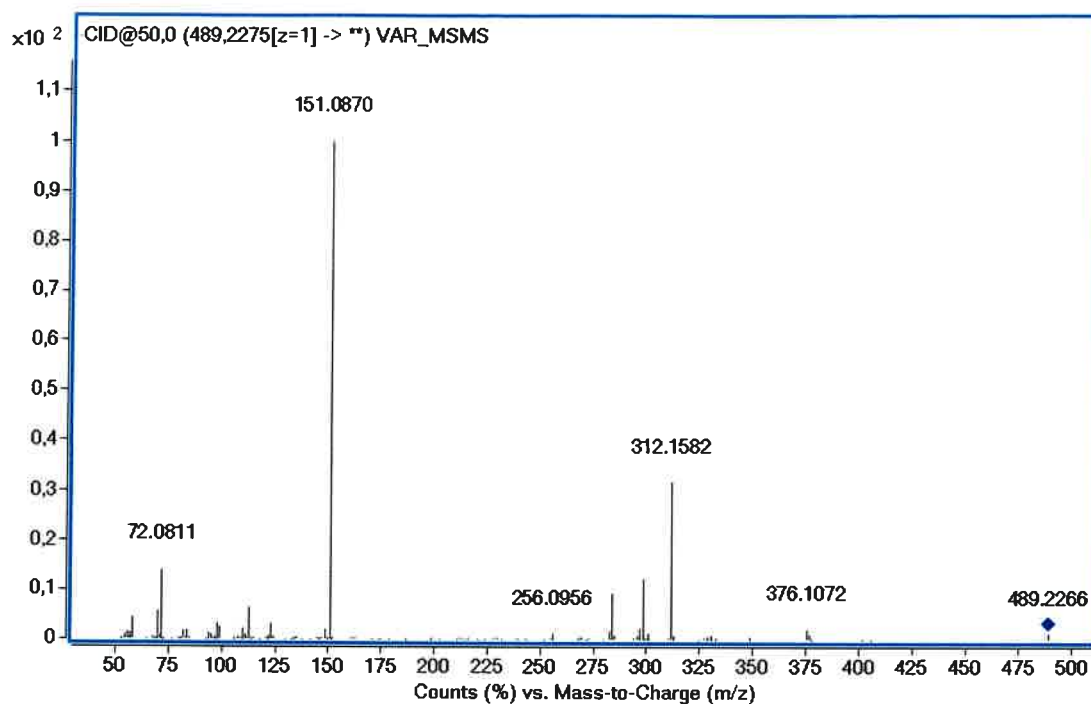
Slika 13. MS/MS spektar sildenafilu dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 40V. Ionizacijska tehnika ESI+.



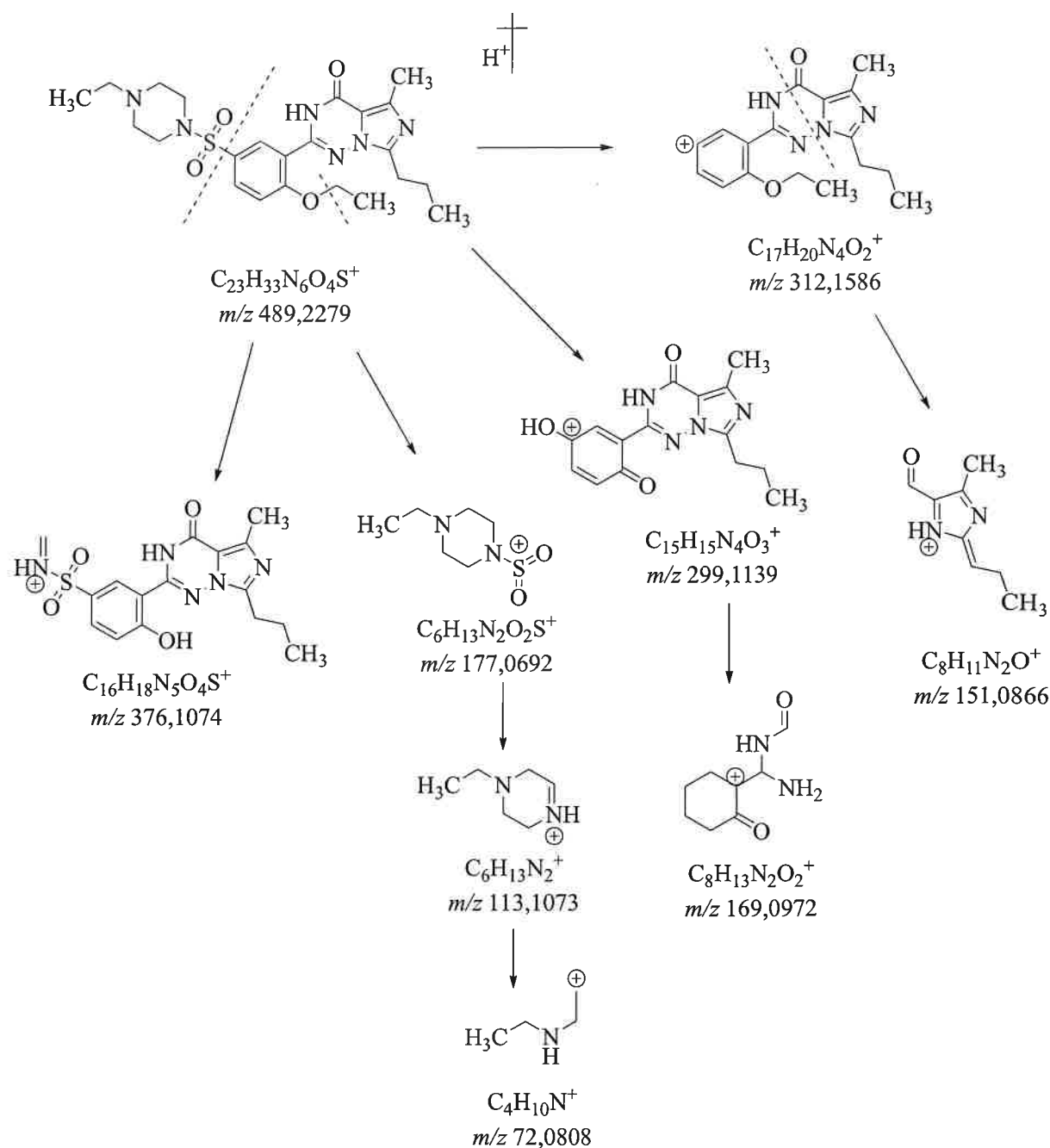
Slika 14. Predloženi fragmentacijski put $[M+H]^+$ sildenafila (m/z 475,2122) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

Najintenzivniji fragmentni ioni vardenafila dobiveni snimanjem MS/MS spektra bili su oni s omjerom m/z 312,1582 i 151,0870 (Slika 15). Osim ovih intenzivnih signala, u spektru masa vidljivi su i manje intenzivni signali poput 376,1072 i 72,0811. Fragmentni ioni m/z 376,1074 i 113,1073, nastaju odvajanjem etilpiperazina, dok ion m/z 312,1581 nastaje odvajanjem etilpiperazina i sulfonilne skupine. Cijepanjem N–N veze i amidne veze tetraazobiciklinonskog prstena nastaje fragmentni ion m/z 151,0866. Predloženi fragmentacijski put prikazan je na Slici 16. Isti fragmentacijski put dobili su i drugi autori^{135,151–154}. Međutim, u nekim metodama¹³² zapaženi su i drugi fragmenti, poput iona m/z 344,1479 ($C_{17}H_{20}N_4O_4$), 299,1139 ($C_{15}H_{15}N_4O_3$)

te 169,0972 ($C_8H_{13}N_2O_2$). Ovi fragmentni ioni također su dobiveni u našem istraživanju primjenom HPLC–TOF tehnike (poglavlje 4.3.1).



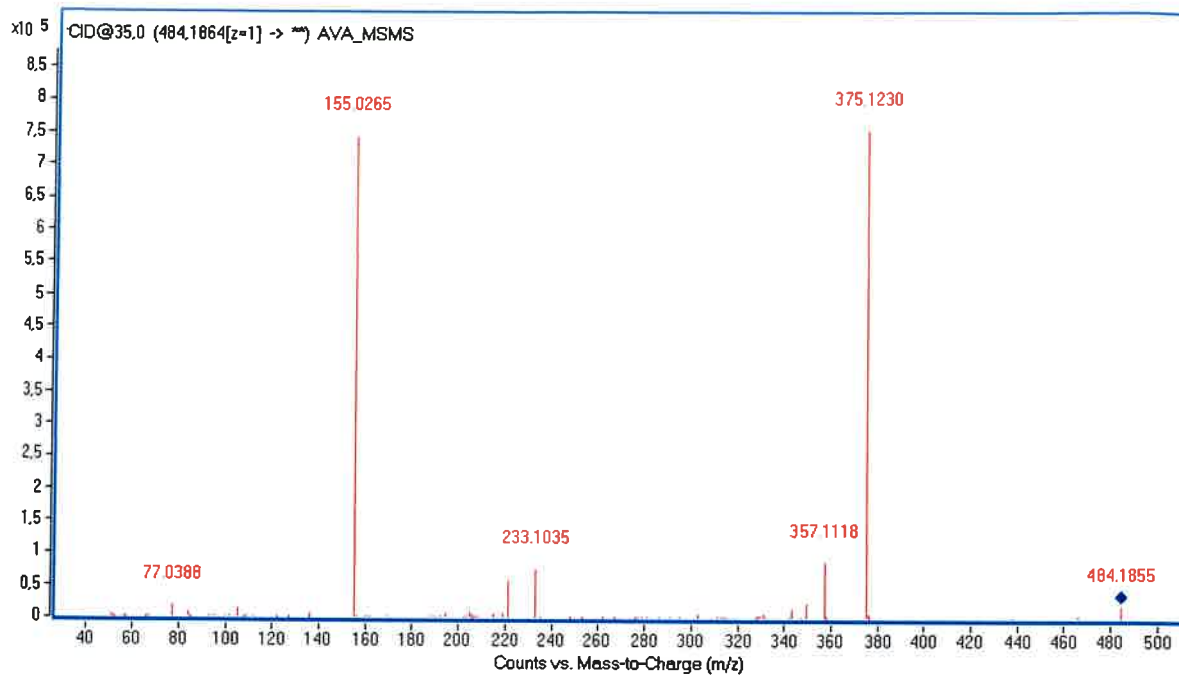
Slika 15. MS/MS spektar vardenafila dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 50 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



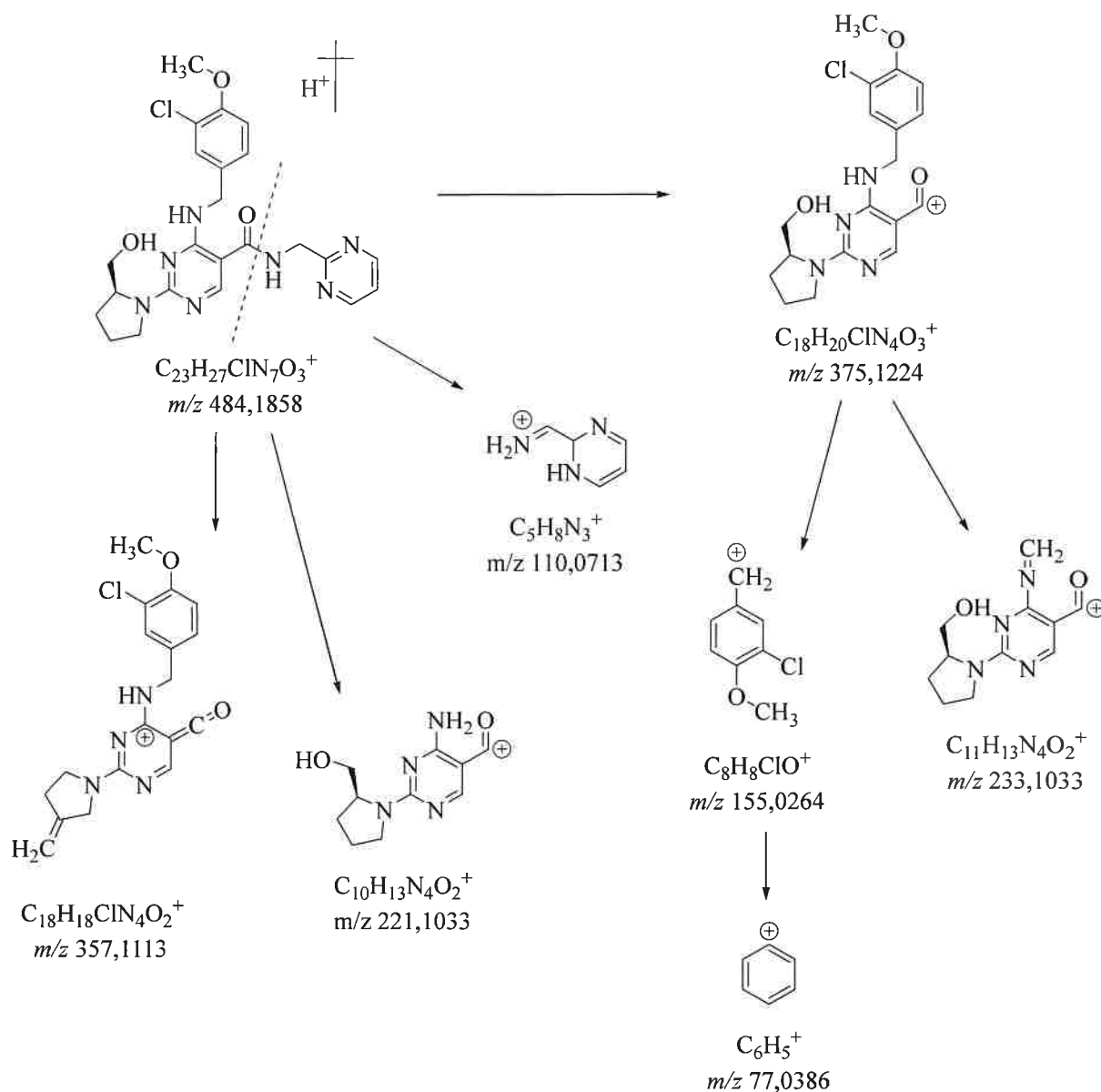
Slika 16. Fragmentacijski put $[M+H]^+$ vardenafila (m/z 489,2279) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

Najintenzivniji fragmentni ioni avanafila, dobiveni MS/MS analizom su ioni s omjerom m/z 375,1230 ($C_{18}H_{20}ClN_4O_3^+$) i 155,0265 ($C_8H_8ClO^+$), a prikazani su na Slici 17. Osim ovih intenzivnih signala, u spektru masa vidljivi su i manje intenzivni signali poput fragmentnih iona m/z 357,1118, 233,1035 te 77,0388. Prema literaturnim podacima, osim navedenih, moguć je

nastanak i drugih fragmentnih iona, uključujući m/z 342,14, 329,14 i 175,11¹⁵⁵. Na temelju MS/MS spektra, pretpostavljen je fragmentacijski put, prikazano na Slici 18.

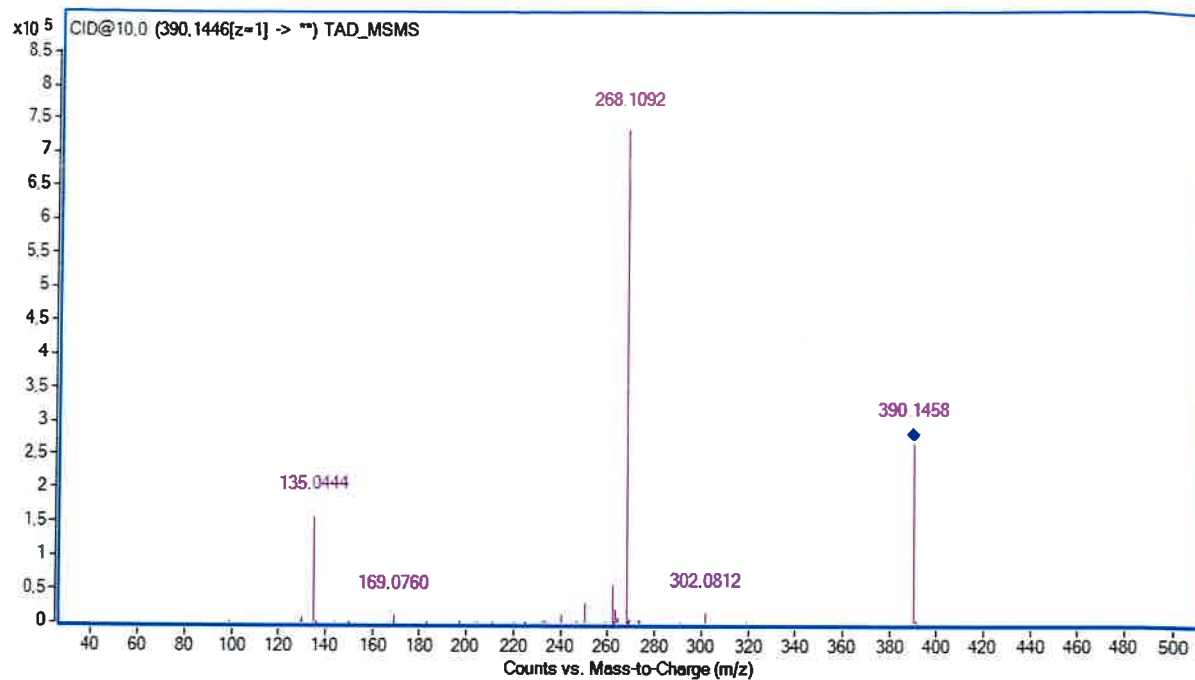


Slika 17. MS/MS spektar avanafila dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 35 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

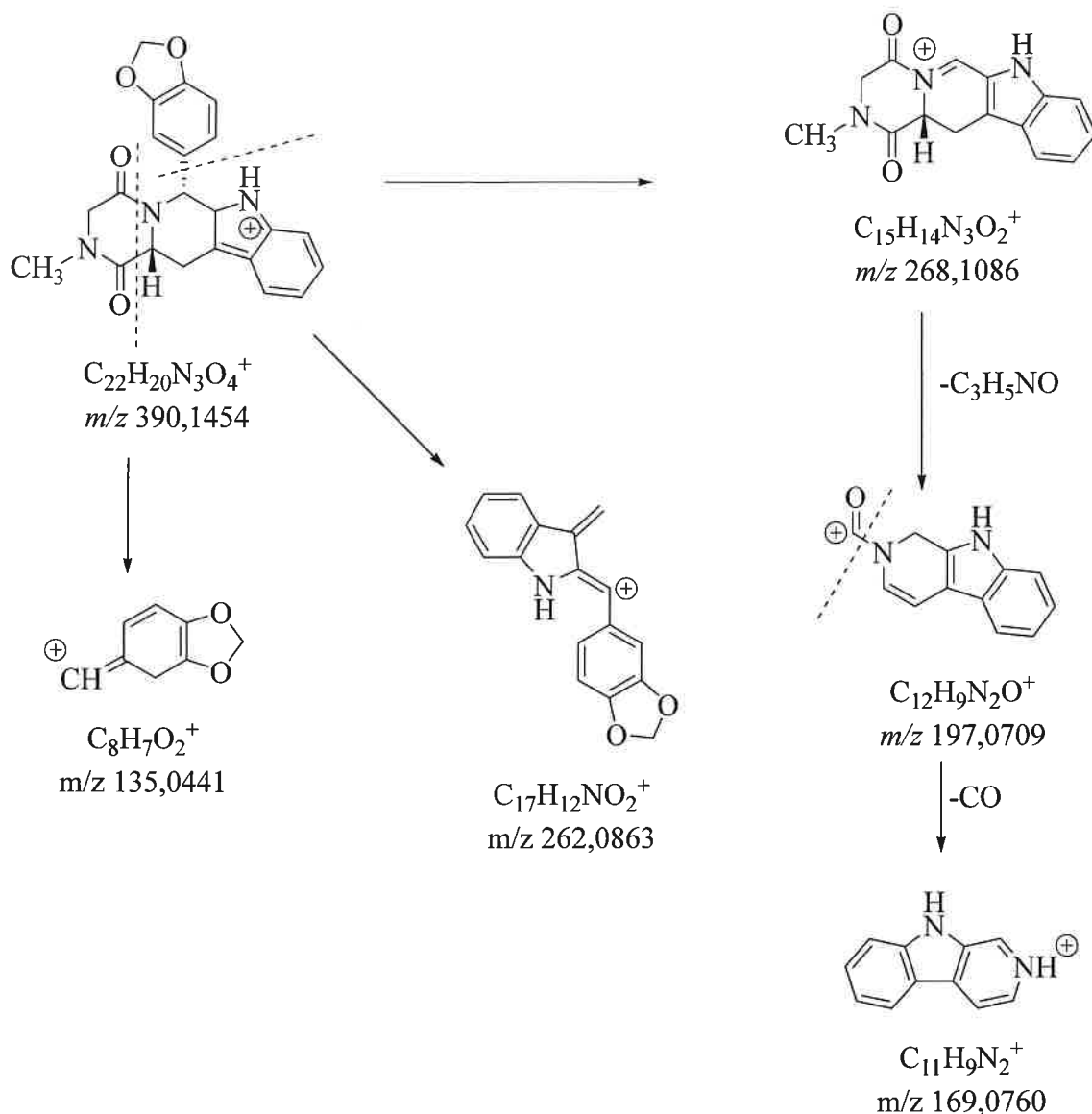


Slika 18. Fragmentacijski put $[M+H]^+$ avanafila (m/z 484,1858) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

Najintenzivniji fragmentni ioni tadafila bili su oni s omjerom m/z 268,1092 ($C_{15}H_{14}N_3O_2^+$), 169,0760 ($C_{11}H_9N_2^+$) i 135,0444 ($C_8H_7O_2^+$) (Slika 19.). Naša istraživanja potvrdila su navode iz literature^{132,152,153,156} pri čemu je najdominatniji fragmentni ioni omjera m/z 268,1086 ($C_{15}H_{14}N_3O_2^+$), koji nastaje gubitkom benzodioksolnog dijela (m/z 135,0446 ($C_8H_7O_2^+$)). Daljnjom fragmentacijom, gubitkom piperazina, nastaje ion omjera m/z 169,0766 ($C_{11}H_9N_2^+$). Fragmentacijski put tadafila prikazan je na Slici 20.

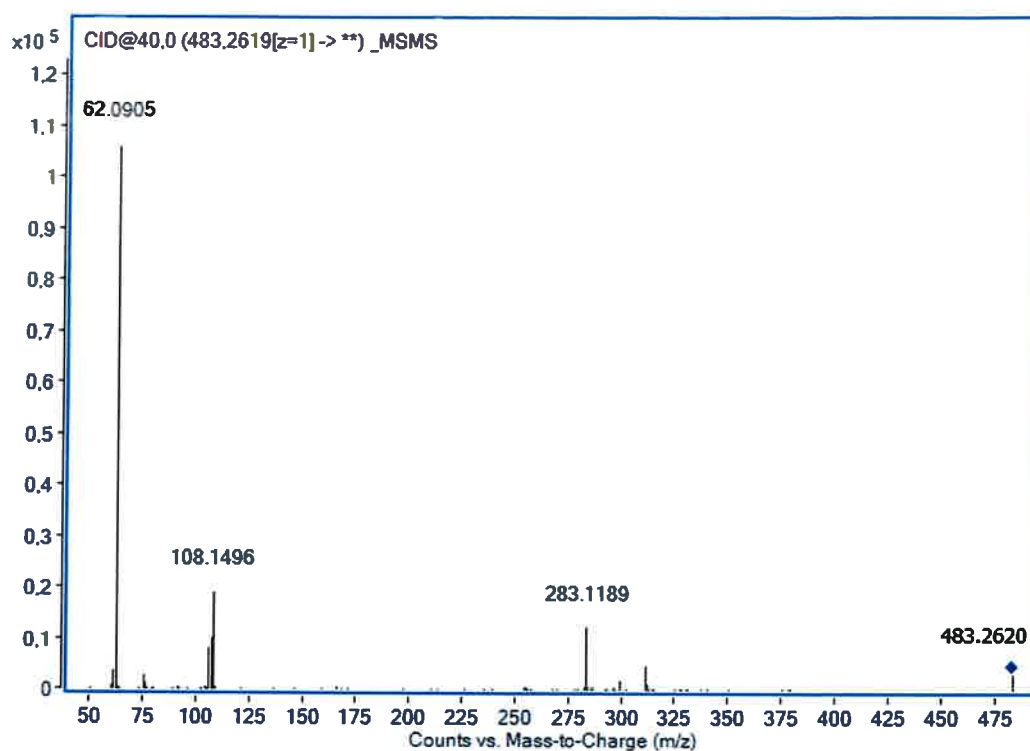


Slika 19. MS/MS spektar tadalafila dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 10 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

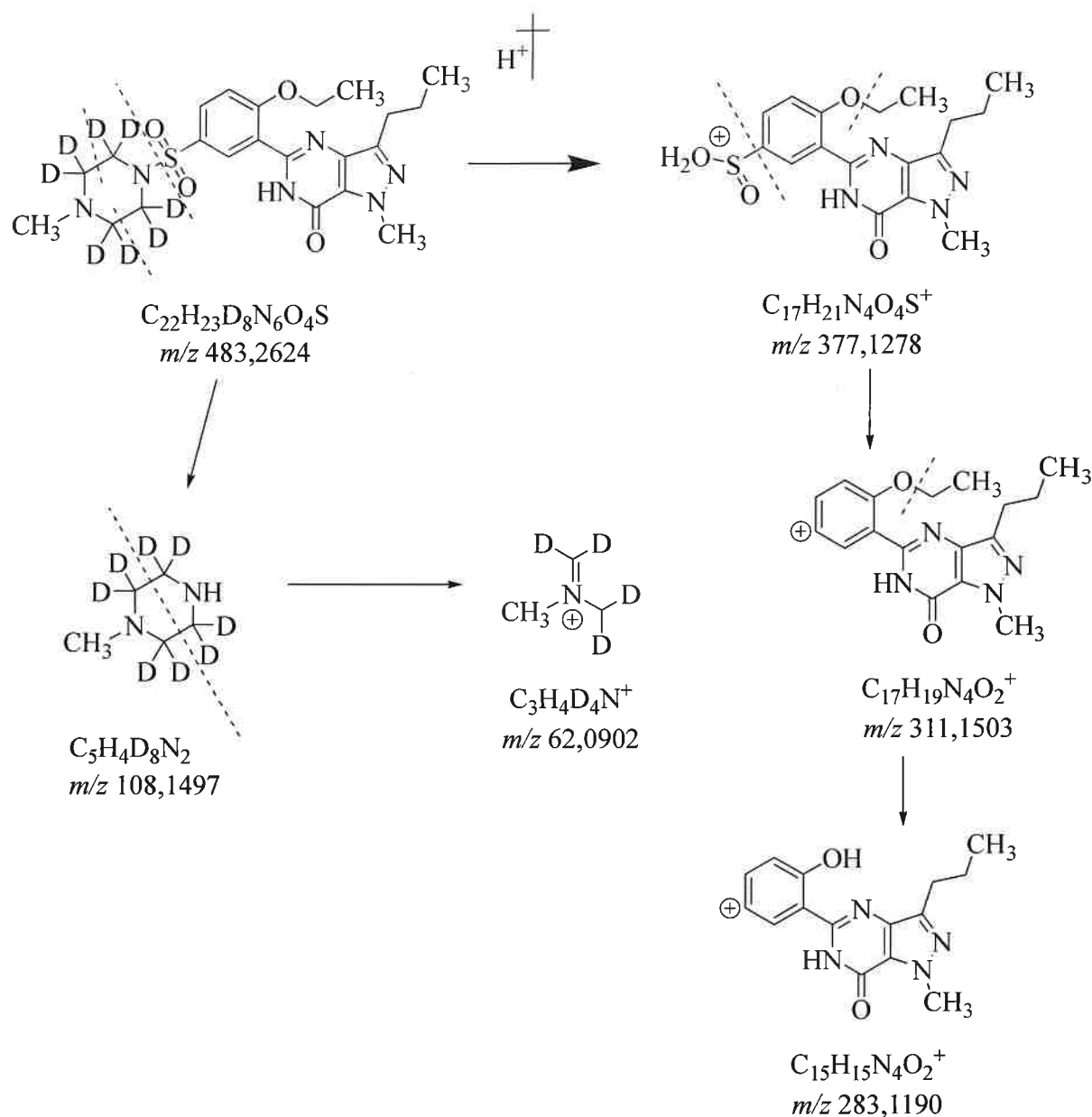


Slika 20. Fragmentacijski put $[M+H]^+$ tadalafila (m/z 390,1454) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

IS, deuterirani sildenafil, pokazuje sličan put fragmentacije kao i sildenafil. Ionizacijom u pozitivnom načinu snimanja nastaje protonirani molekulski ion $[M+H]^+$ pri m/z 483,2620. Primjenom kolizijskog potencijala uočeni su signali fragmentnih iona pri m/z 283,1189 koji je rezultat cijepanja sulfonil–metilpiperazinskog prstena i odgovara jednostruko nabijenom fragmentnom ionu $[C_{15}H_{15}N_4O_2]^+$. Nadalje, fragmentacijom nastaju ioni m/z 108,1496 i m/z 62,0905. Opisani spektar masa prikazan je na Slici 21. Er i suradnici u svom su istraživanju dobili jednak put fragmentacije za deuterirani sildenafil¹⁵⁷. Na temelju dobivenih fragmentnih iona u MS/MS spektru predloženi su putevi fragmentacije, a prikazani su na Slici 22.



Slika 21. MS/MS spektar sildenafil – d8 dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 22. Fragmentacijski put $[\text{M}+\text{H}]^+$ sildenafila – d8 (m/z 483,2624) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

Probirna analiza bez referentnih standarda (kvalitativna analiza)

Kada referentni standardi nisu dostupni, nakon snimanja kromatograma ukupne struje nastalih iona, pretraga sumnjivih analita provodi se u nekoliko koraka:

(1) Probir baze podataka prema listi spojeva (Tablica D1, dodatak 8) primjenom softvera koji filtrira spojeve na temelju kriterija definiranih u poglavlju 3.3.2. Za svaki detektirani spoj

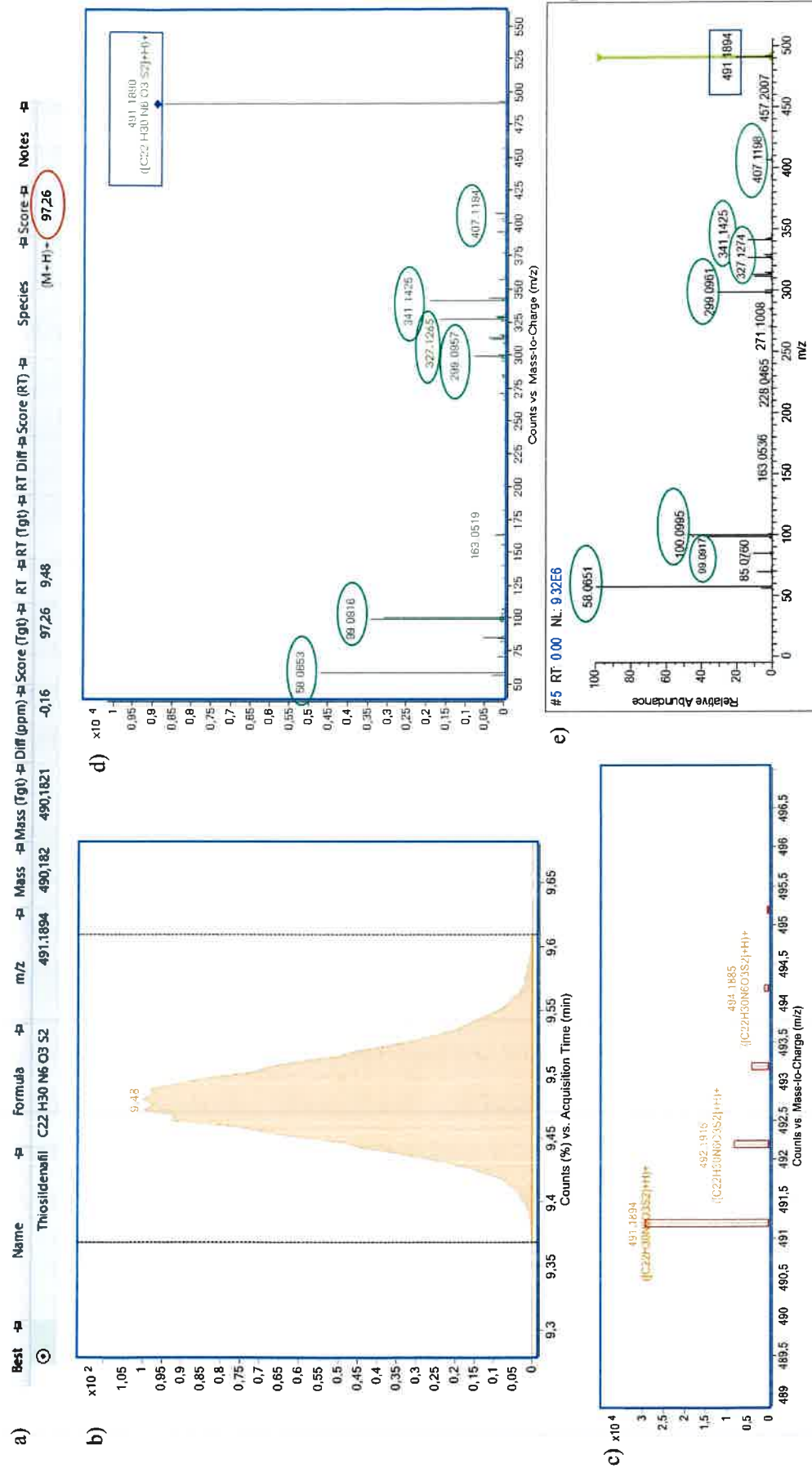
izračunava se rezultat podudarnosti mase na temelju točne mase, izotopne zastupljenosti i razmaka između izotopnih signala.

(2) Nad odabranim sumnjivim spojevima provodi se MS/MS analiza u pozitivnom načinu rada primjenom različitih kolizijskih potencijala kako bi se dobila široka paleta fragmenata (3) Usporedba spektara masa – MS/MS spektri uspoređuju se s dostupnim podacima iz znanstvene literature i/ili online bazama podataka (MassBank, mzCloud). Cilj je pronaći podudarnosti između prekursor iona i nastalih fragmentnih iona s poznatim podacima za slične spojeve. Kriteriji za potvrdu su točnost određivanja mase m/z prekursor iona ≤ 5 ppm i prisutnost najmanje dva karakteristična fragmentna iona s odstupanjem od ≤ 20 ppm.

Primjer identifikacije tiosildenafilila u realnom uzorku primjenom UHPLC–QTOF–MS analize prikazan je na Slici 23. Na temelju zadanih parametara softver je predložio spoj tiosildenafilil s rezultatom podudaranja od 97,26 i pogreškom određivanja mase prekursor iona od $-0,16$ ppm (Slika 23.a). Slika 23.b prikazuje uvećani prikaz pika tiosildenafilila i odgovarajuće vrijeme zadržavanja. Prikaz izotopne raspodjele (Slika 23.c) pokazuje da su signali u spektru unutar zadanih granica, dok se MS/MS spektar (Slika 23.d) podudara s MS/MS spektrom (Slika 23.e) dostupnim u online bazi podataka mzCloud – MS/MS spektar snimljen tehnikom višeenergetske kolizijske disocijacije (engl. *Higher–Energy Collisional Dissociation*, HCD) pri normaliziranoj energiji sudara (engl. *Normalized Collision Energy*, NCE) od 40 %.

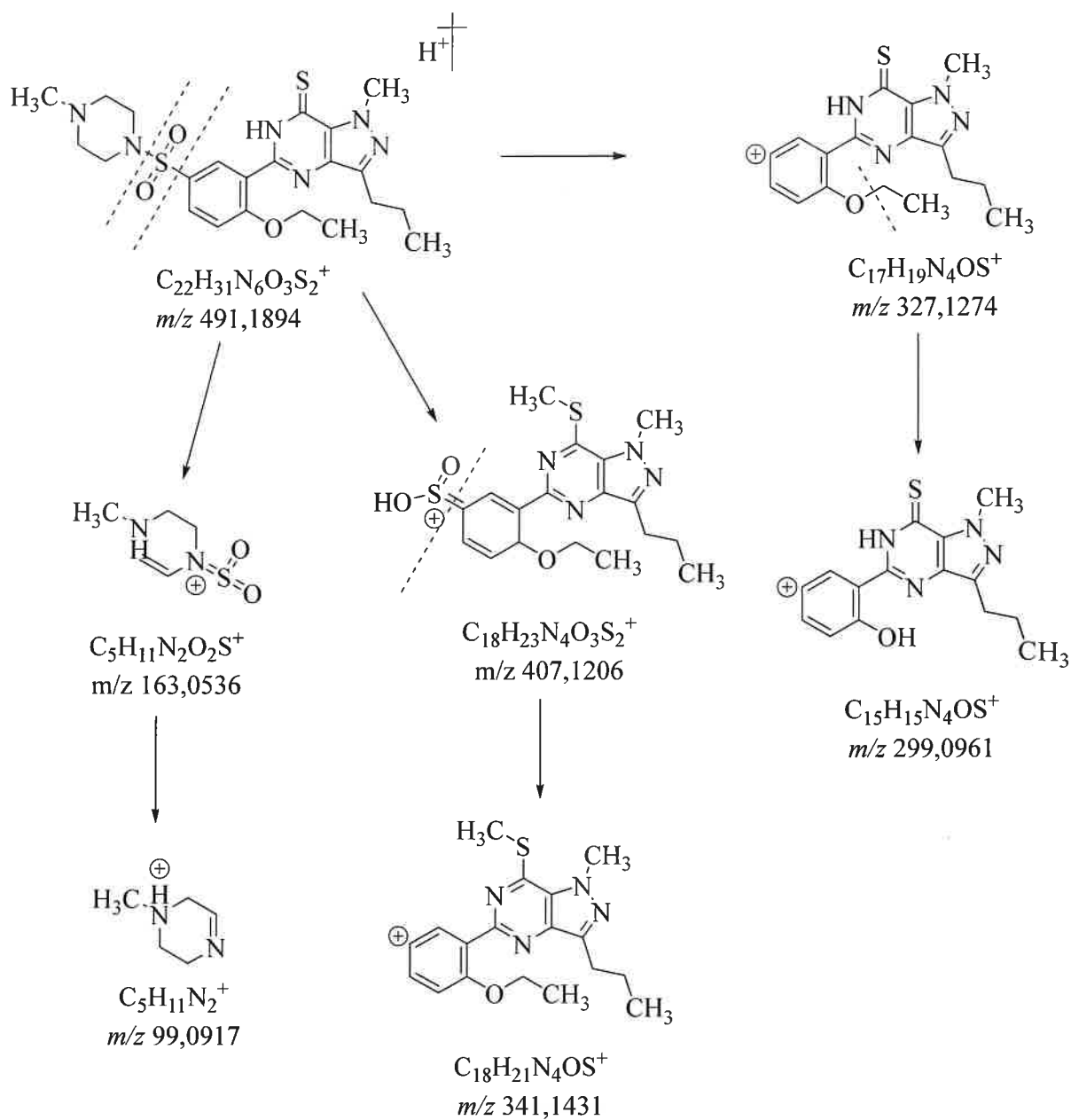
Ilegalni spojevi identificirani UHPLC–QTOF metodom navedeni su u Tablici D2 (poglavlje 8. Dodatak). U Tablici su prikazana vremena zadržavanja, molekulske formule prekursor i fragmentnih iona, eksperimentalne i teoretske vrijednosti m/z te pogreške mase. Za sve detektirane ilegalne spojeve pogreška mase je mala (< 5 ppm) što potvrđuje preciznu i pouzdanu identifikaciju.

Identificirano je osam različitih spojeva, od toga jedan analog sildenafilila (propoksifenil aildenafilil), četiri analoga tiosildenafilila (tiosildenafilil, depiperazino–tiosildenafilil, hidroksitiohomosildenafilil i dimetil–tiosildenafilil), dva analoga tadalafilila (2–hidroksipropilnortadalafilil i kloropretadalafilil) i johimbin.

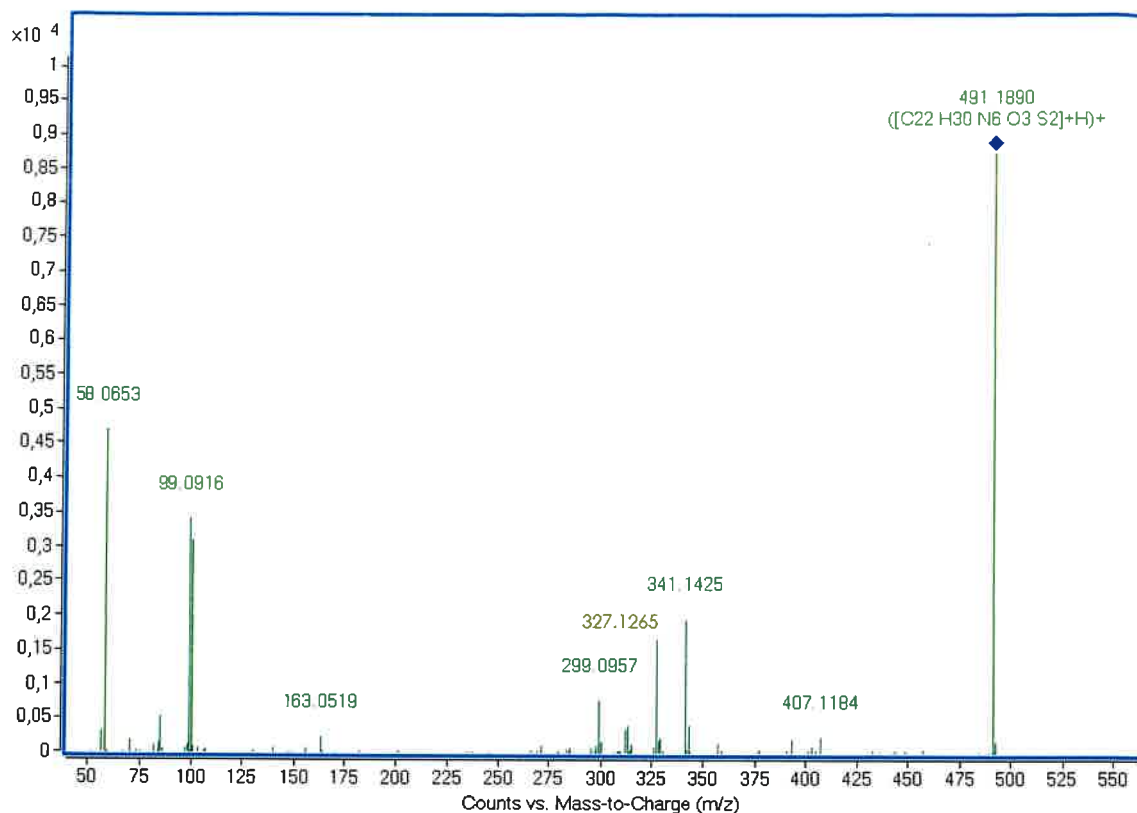


Slika 23. Primjer identifikacija thiosildenafilu u uzorku 1: a) rezultat podudarnosti mase (score 97,26), b) vrijeme zadržavanja, c) izotopni profil, d) MS/MS spektar pri 30V, e) MS/MS spektar thiosildenafilu preuzet s <https://www.mzcloud.org>.

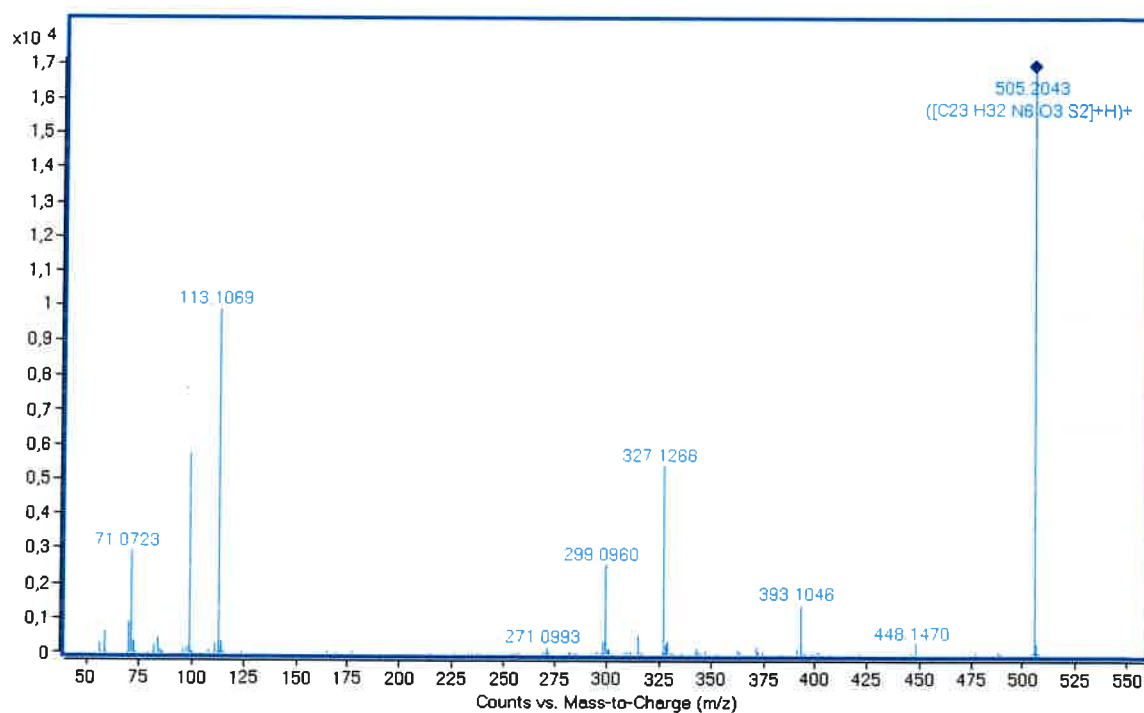
Tiosildenafil i njegovi analozi (depiperazino–tiosildenafil, hidroksitiohomosildenafil i dimetil–tiosildenafil) pokazuju sličan fragmentacijski put, prikazan na primjeru tiosildenafil (Slika 24.). Ovi spojevi generiraju specifične zajedničke fragmentne ione m/z 327,1274 i 299,0961 tijekom analize i služe kao ključni indikatori u potvrđivanju strukturne srodnosti^{136,151,158}. Ostali fragmentni ioni (Tablica D2, poglavlje 8. Dodatak) omogućavaju diferencijaciju među analozima te pomažu u njihovoj jednoznačnoj identifikaciji. MS/MS spektri tiosildenafil i analoga prikazani su na Slikama 25.–28. Tiosildenafil je karakteriziran molekularnim ionom m/z 491,1890 i fragmentnim ionima poput m/z 407,1184, 341,1425 te 99,0916 i 58,0653 što je potvrđeno i u drugim istraživanjima^{159,160}. U spektru masa dimetil–tiosildenafil (sulfoildenafil) vidljivi su ioni m/z 448,1470, 393,1046, 327,1268, 299,0960 te 113,1069. Iste rezultate za dimetil–tiosildenafil dobili su i drugi autori^{143,151}. Fragmentacijom protonirane molekule hidroksitiohomosildenafil ($C_{23}H_{33}N_6O_4S_2^+$, m/z 521,1999) osim spomenutih specifičnih fragmenata detektirani su još fragmentni ioni m/z 503,1894, 477,1749, 129,1020 te 99,0914. Rezultati fragmentacije hidroksitiohomosildenafil usporedivi su s rezultatima drugih autora^{161,162}. Najintenzivniji fragmentni ioni depiperazino–tiosildenafil bio je ion m/z 381,0682, koji nastaje gubitkom etilne ($-C_2H_4$) skupine. Ostali detektirani ioni uključuju m/z 351,0291, 299,0957 i 272,0722. Vaysse i suradnici u svom su istraživanju dobili jednake fragmentne ione karakteristične za depiperazino–tiosildenafil¹⁶³.



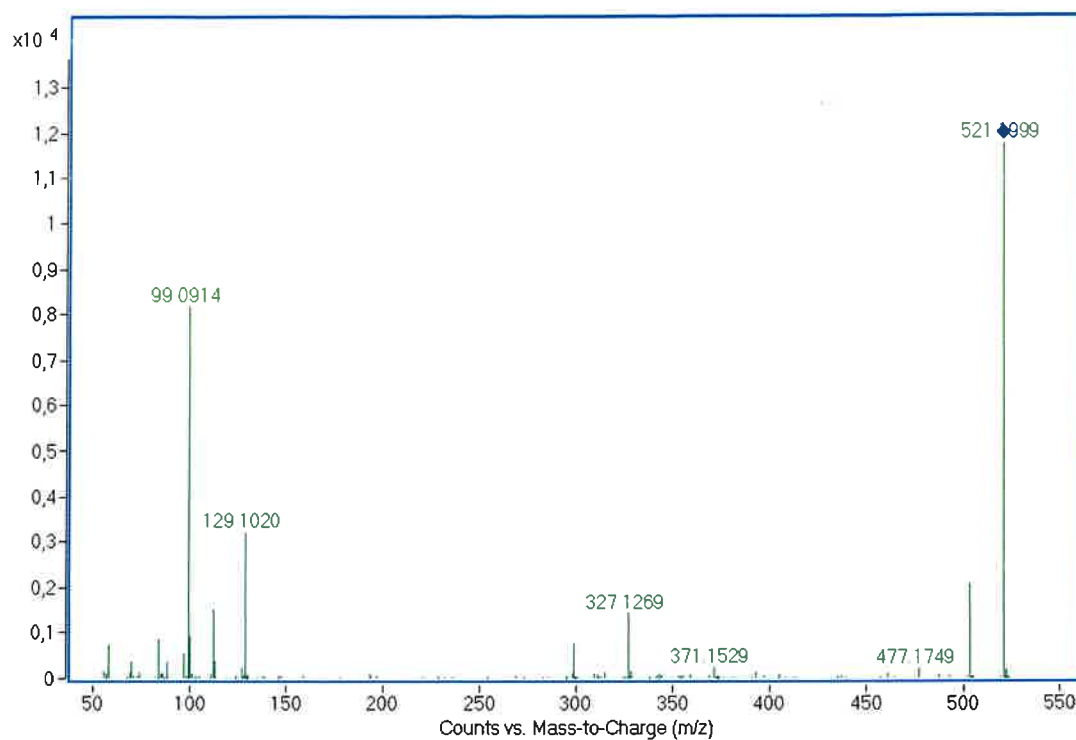
Slika 24. Fragmentacijski put $[\text{M}+\text{H}]^+$ tiosildenafil (m/z) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.



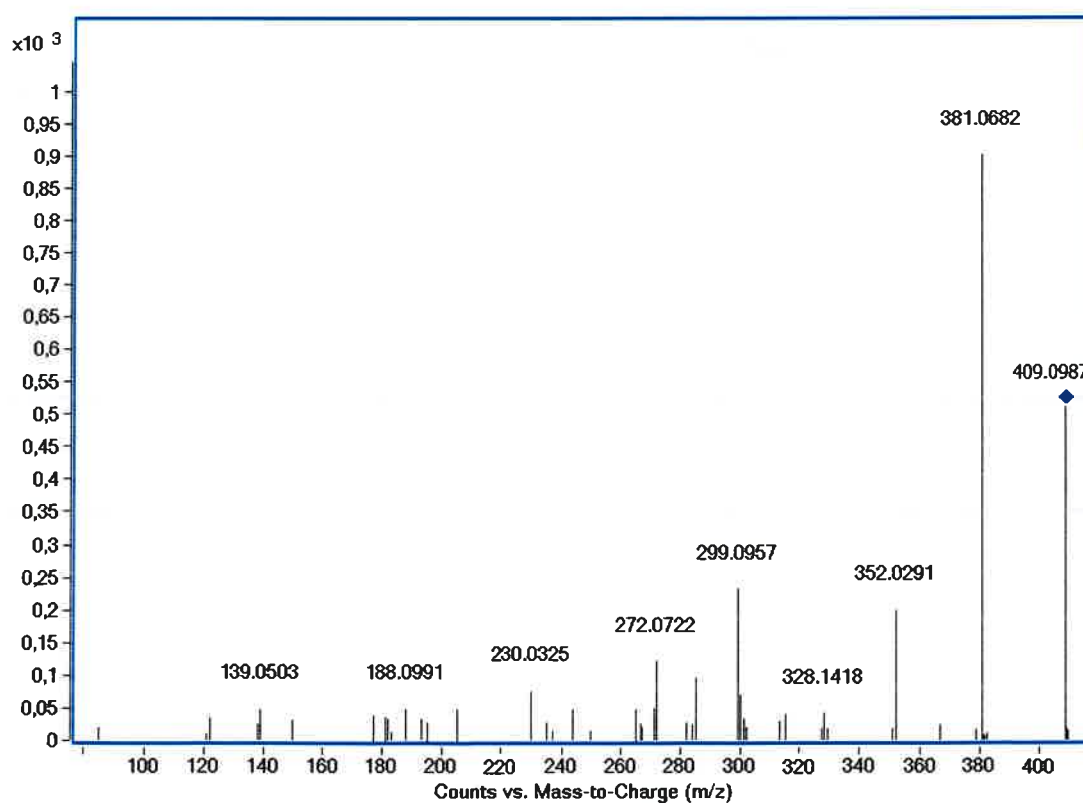
Slika 25. MS/MS spektar tiosildenafila dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 30 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 26. MS/MS spektar dimetiltiosildenafila (sulfoildenafil) dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 30 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

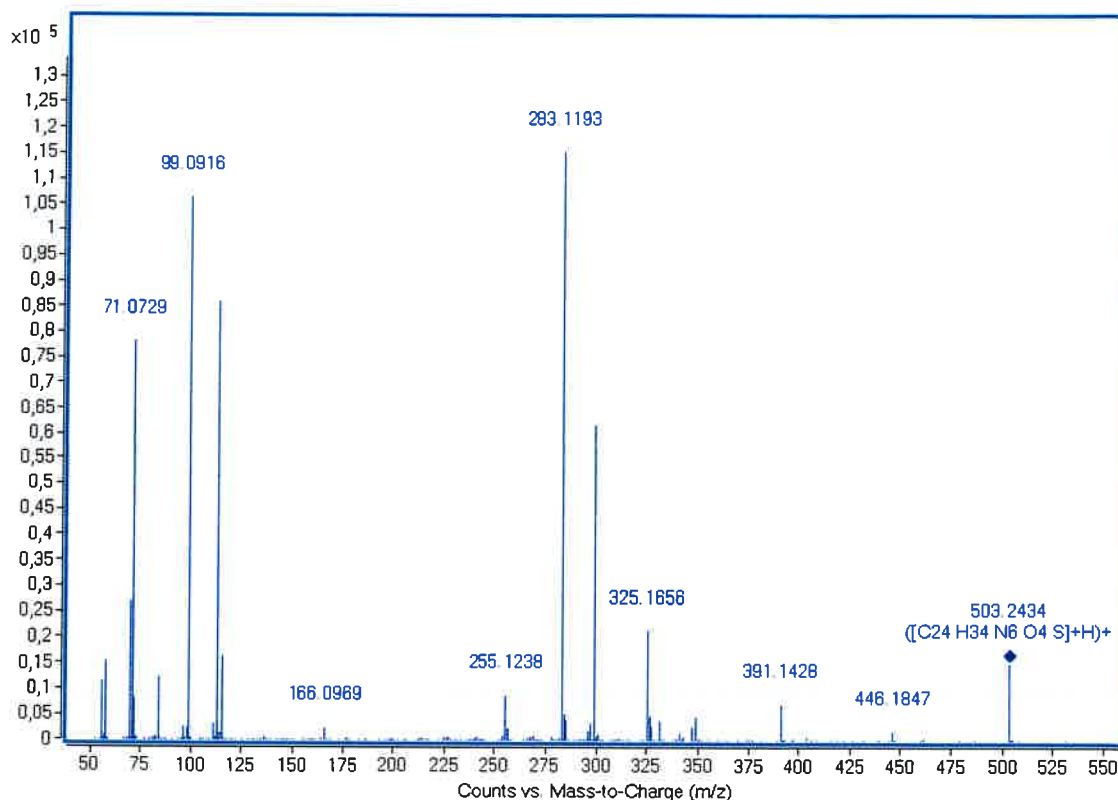


Slika 27. MS/MS spektar hidroksitiohomosildenafilu dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 30 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

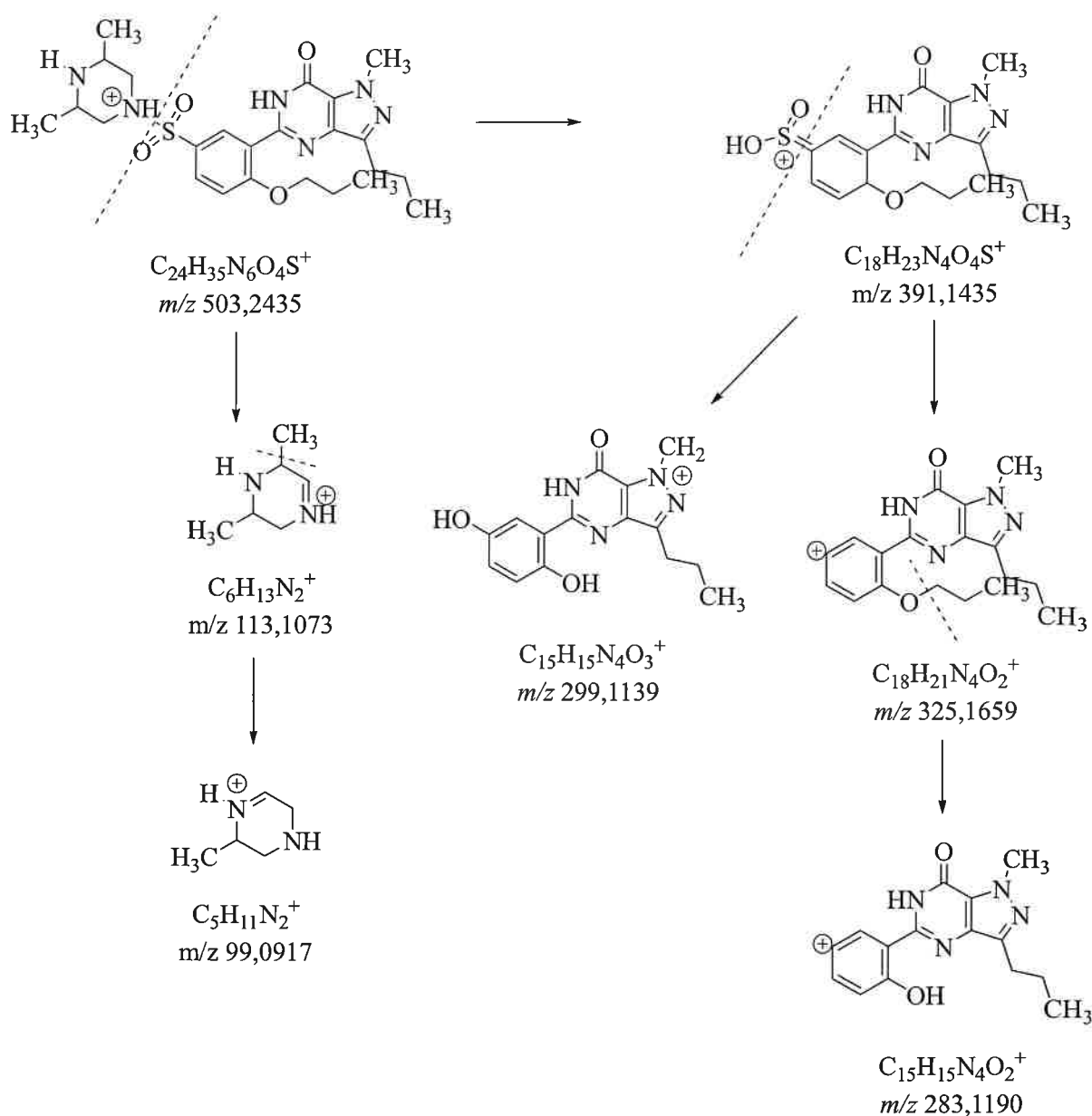


Slika 28. MS/MS spektar depiperazino–tiosildenafilu dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 30 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

Propoksifenil aildenafil je analog sildenafil koji ionizacijom u pozitivnom načinu snimanja generira protonirani molekulski ion $[M+H]^+$, m/z 503,2434. MS/MS analizom dobiveni su produkt ioni m/z 391,1428, 325,1656, i 283,1193 (Slika 29.) Fragmentacijski put ovih iona prikazan je na Slici 30. Cijepanjem sulfonamidne veze dolazi do gubitka 2,6-dimetilpiperazinske jedinice što rezultira nastankom pirolipirimidin-fenil-SO₂H₂⁺ fragmentnog iona m/z 391,1428. Naime, svi analozi sildenafil koji sadrže propoksi i sulfonil skupine daju karakteristične ione m/z 325,1659 i 283,1190. Osim spomenutih iona, u spektru masa vidljivi su još i fragmentni ioni m/z 113,1072 i 99,0916. Kee i suradnici u svom su istraživanju dobili jednake fragmentne ione karakteristične za propoksifenil aildenafil¹⁰⁴.



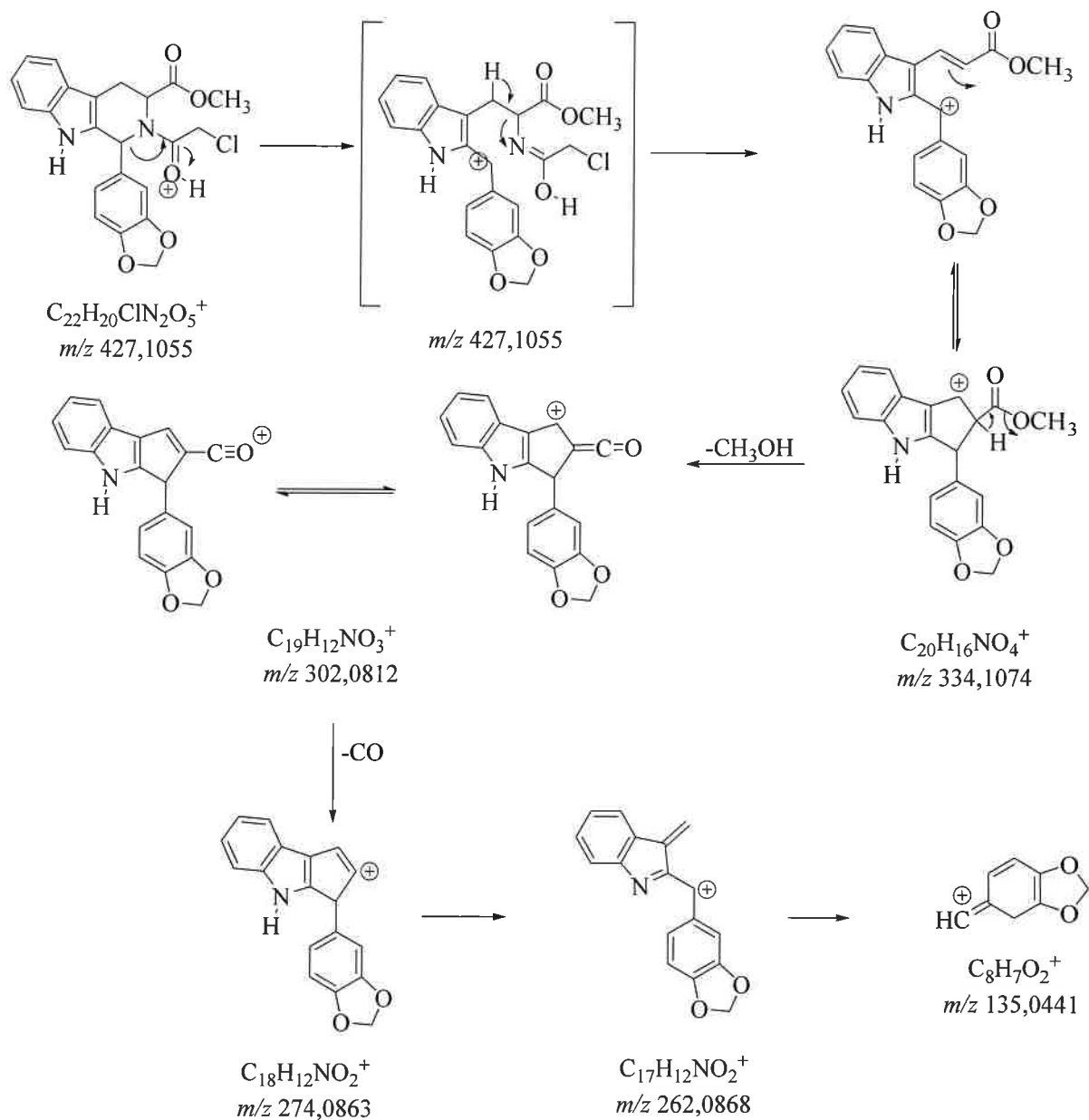
Slika 29. MS/MS spektar propoksifenil aildenafil dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 40 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



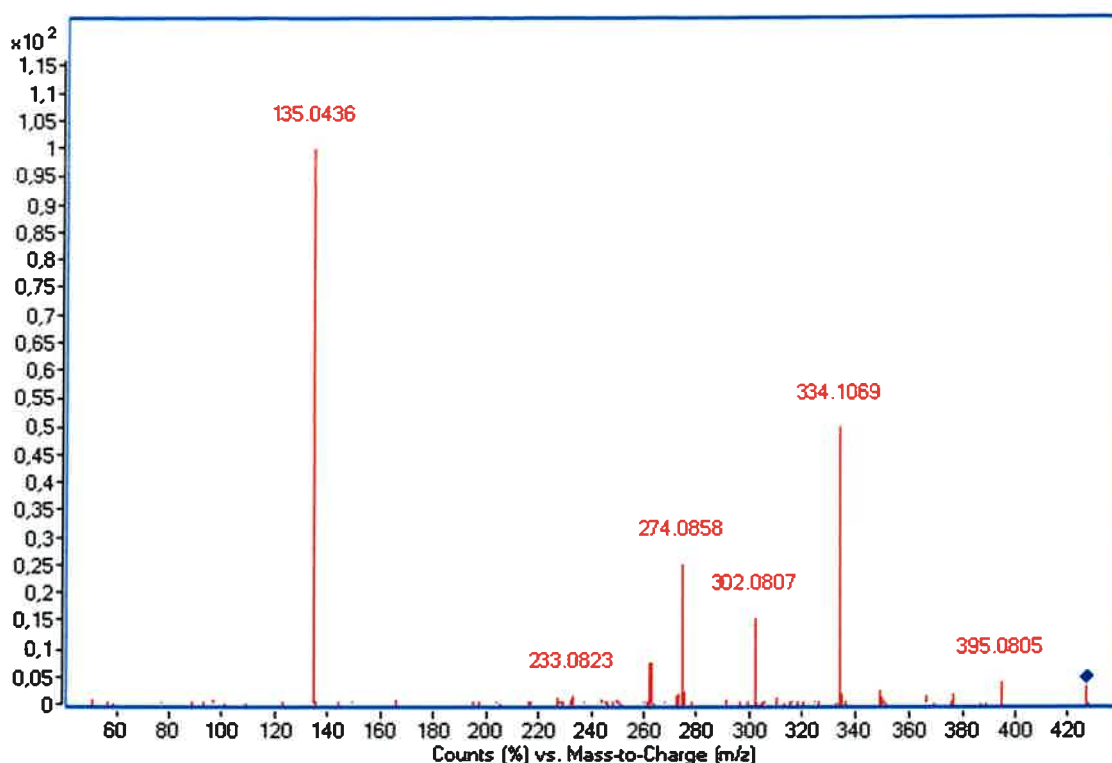
Slika 30. Fragmentacijski put $[M+H]^+$ propoksifenil aildenafil (m/z 503,2435) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

Od dva identificirana analoga tadalafila (2-hidroksipropilnortadalafil i kloropretadalafil), kloropretadalafil pokazuje najmanju strukturnu sličnost s tadalafilom jer mu nedostaje piperazin-2,5-dion prsten. Protoniranjem kisika amidne skupine nastaje molekulski ion $[M+H]^+$ m/z 427,1059. Daljnjom fragmentacijom nastaje ion omjera m/z 334,1069. Eliminacijom metanola nastaje drugi identifikacijski ion m/z 302,0807, dok se naknadnim gubitkom ugljikova monoksida formira treći identifikacijski ion m/z 274,0858 (Slika 31). Iste rezultate dobili su i drugi autori^{143,151,156}. Oba spoja generiraju zajednički fragmentni ion

karakterističan za analoge tadalafila, m/z 135,0441. MS/MS spektar kloropretadalafila prikazan je na Slici 32.

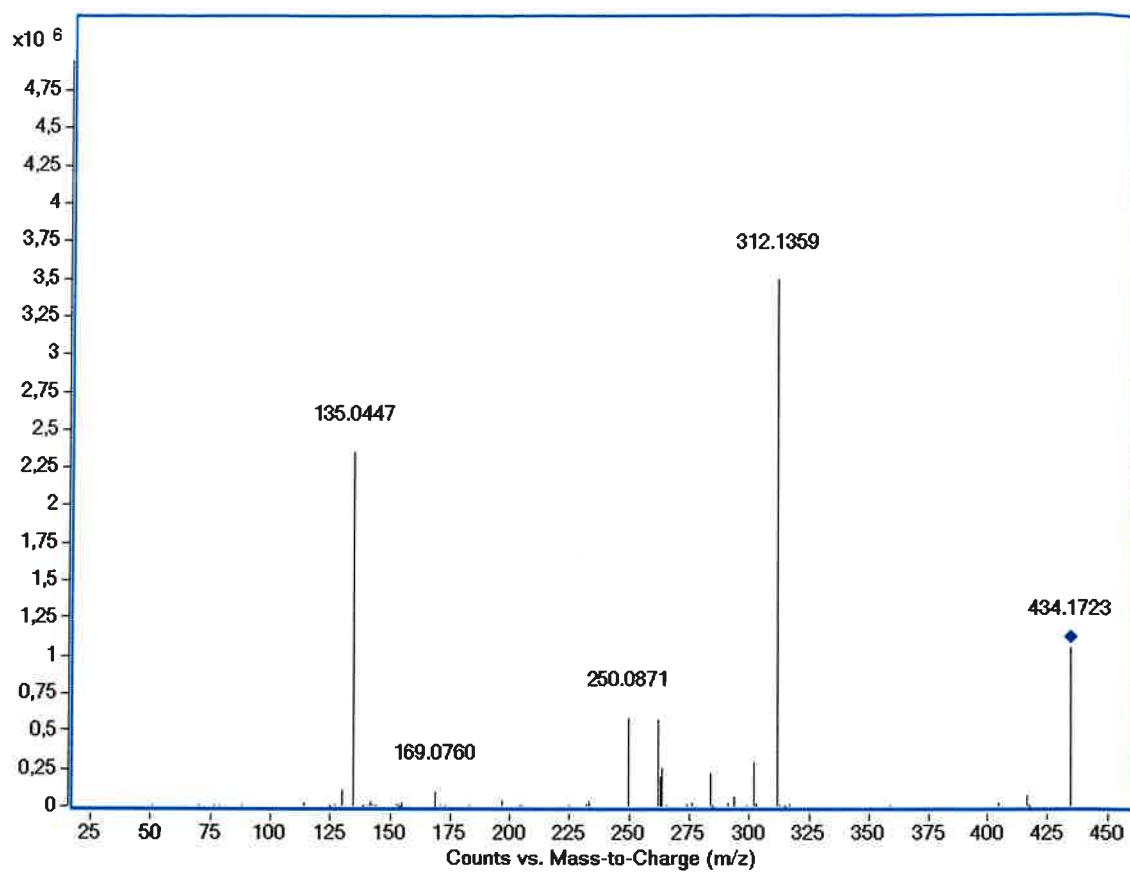


Slika 31. Fragmentacijski put $[M+H]^+$ kloropretadalafila (m/z 427,1055) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

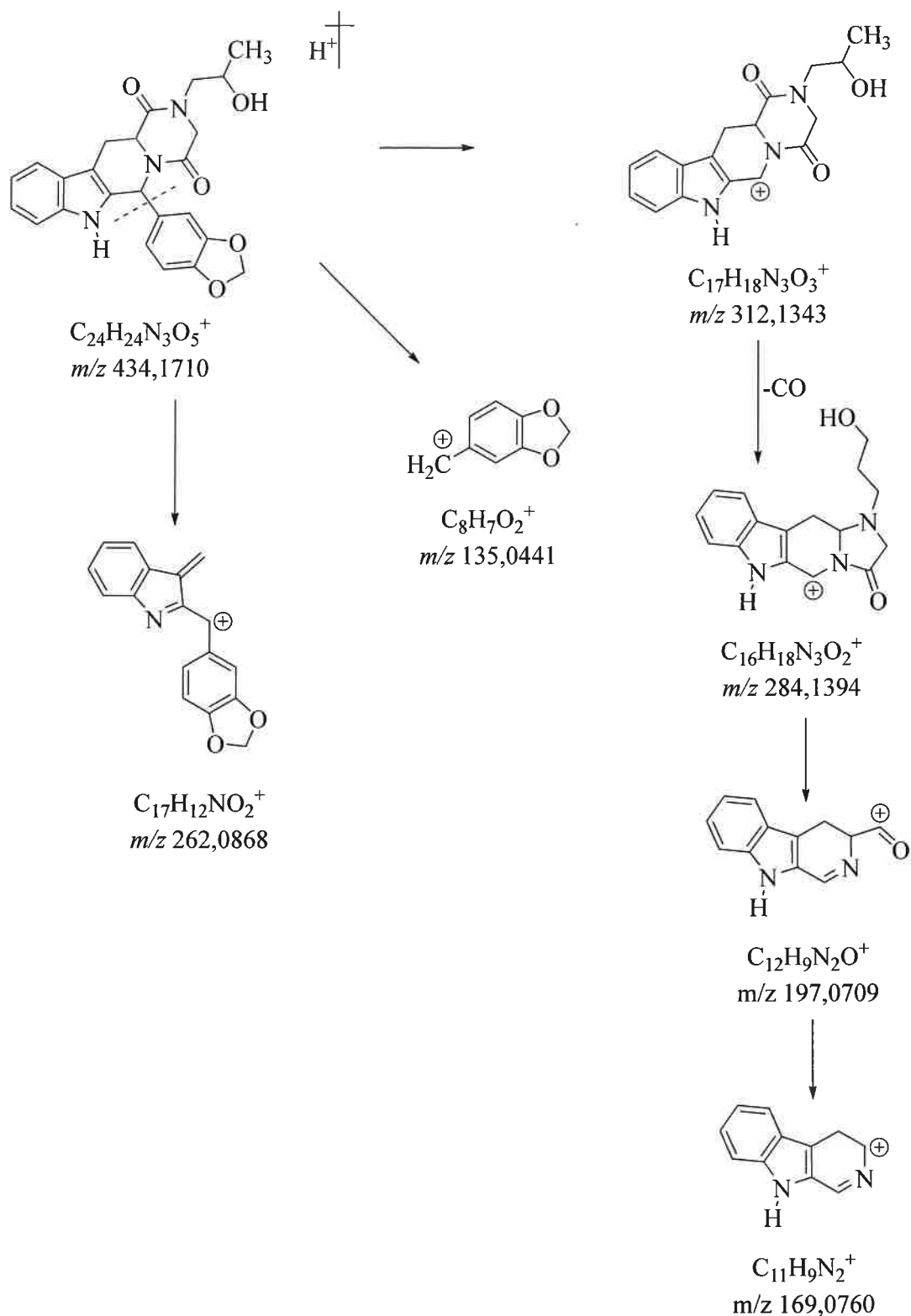


Slika 32. MS/MS spektar kloropretadalafila dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 20 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

2–hidroksipropilnortadalafil je karakteriziran protoniranim molekularnim ionom m/z 434,1723 te fragmentnim ionima m/z 312,1359 i 135,0447 koji nastaju gubitkom benzodioksolnog dijela (Slika 33). Detektiraju se i drugi fragmenti, poput iona omjera m/z 262,0870 ($C_{17}H_{12}NO_2^+$) i 197,0705 ($C_{12}H_9N_2O^+$). Slika 34. pokazuje fragmentacijski put 2–hidroksipropilnortadalafila koji su potvrdili i drugi autori^{142,164}.

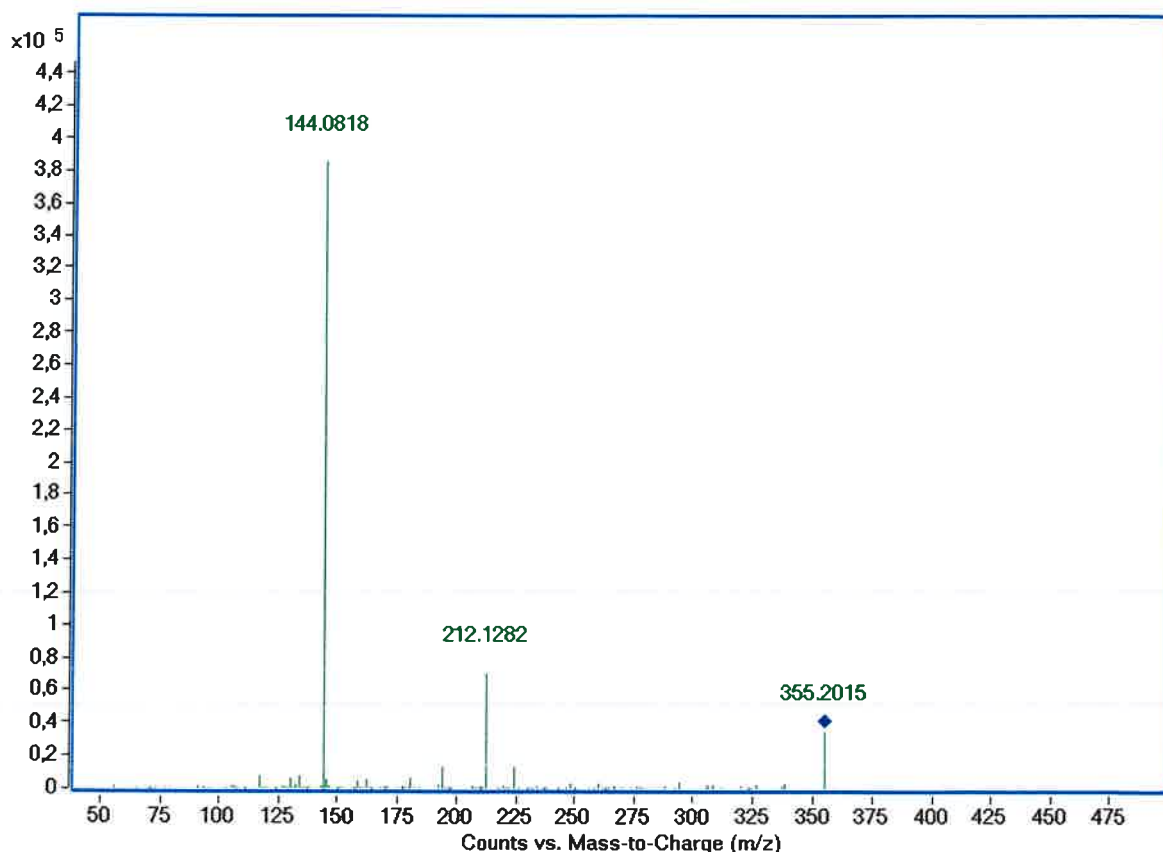


Slika 33. MS/MS spektar 2–hidroksipropilnortadalafila dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 20 V. Ionizacijska tehnika ESI+.

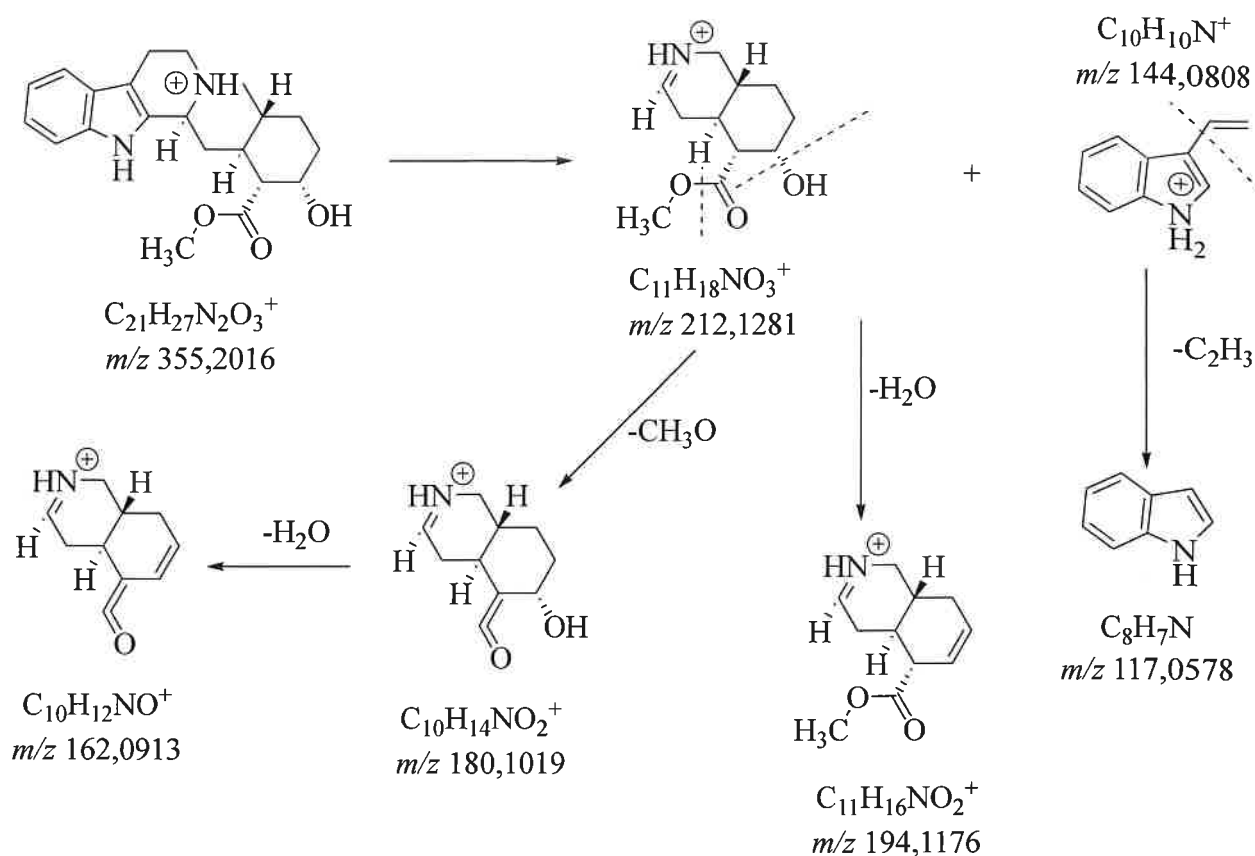


Slika 34. Fragmentacijski put $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2-hidroksipropilnortadalafila (m/z 434,1710) primenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

Spoj koji je, među ostalima, identificiran u analiziranim dodacima prehrani, a ne spada u skupinu PDE-5I ili njihovih analoga, je johimbin. Johimbin je prirodni alkaloid dobiven iz kore stabla *Pausinystalia johimbe* i tradicionalno se koristi kao afrodizijak u narodnoj medicini. Djeluje kao selektivni antagonist $\alpha 2$ -adrenergičkih receptora, što doprinosi njegovom učinku na libido i erektilnu funkciju. Preporučena doza za johimbin u farmaceutskim pripravcima iznosi od 5 mg do 20 mg dnevno. Johimbin je identificiran prema njegovom putu fragmentacije s prekursor ionom m/z 355,2029 i fragmentnim ionima m/z 212,1292 ($C_{11}H_{18}NO_3^+$) i 144,0827 ($C_{10}H_{10}N^+$) (Slika 35). Naša istraživanja potvrdila su navode iz literature¹⁶⁵. Daljnjom fragmentacijom, gubitkom vode, nastaje ion omjera m/z 194,1176 ($C_{11}H_{16}NO_2^+$), dok gubitkom metoksi grupe nastaje ion m/z 180,1019 ($C_{10}H_{14}NO_2^+$) iz kojeg naknadnim gubitkom vode nastaje ion m/z 162,0917 ($C_{10}H_{12}NO^+$) (Slika 36).



Slika 35. MS/MS spektar johimbina dobiven UHPLC–QTOF pri kolizijskom potencijalu od 30 V. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 36. Fragmentacijski put $[M+H]^+$ johimbina (m/z 355,2016) primjenom ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada.

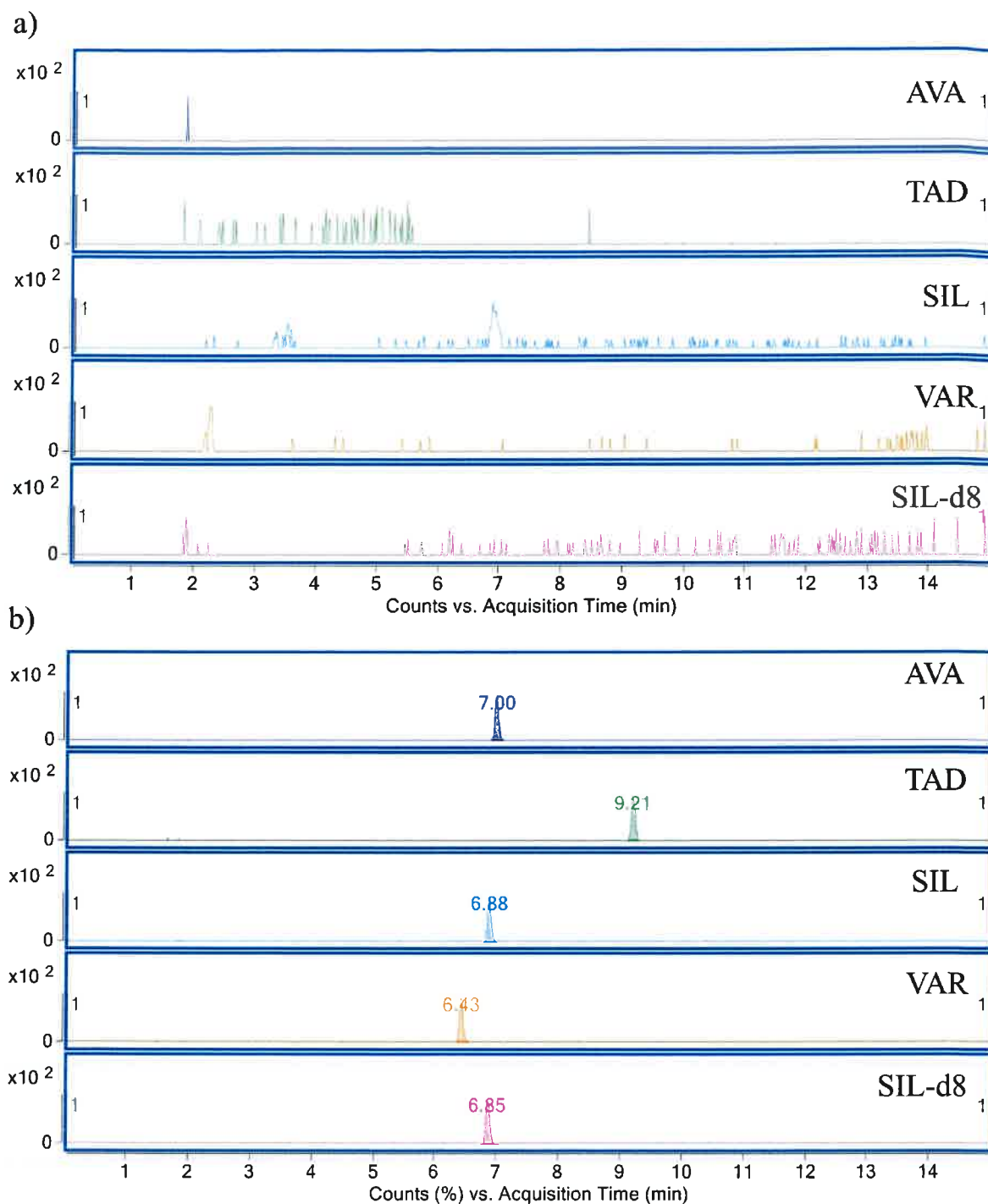
U sklopu istraživanja nisu identificirani novi nepoznati analozi.

Dobiveni rezultati potvrđuju da je UHPLC–QTOF–MS prigodan za komercijalnu uporabu zbog kombinacije visoke osjetljivosti, visoke razlučivosti i visoke točnosti mase i za prekursor i za fragmente ione te se može učinkovito koristiti za otkrivanje ilegalnih spojeva u dodacima prehrani, bez potrebe za izravnom usporedbom s referentnim standardima.

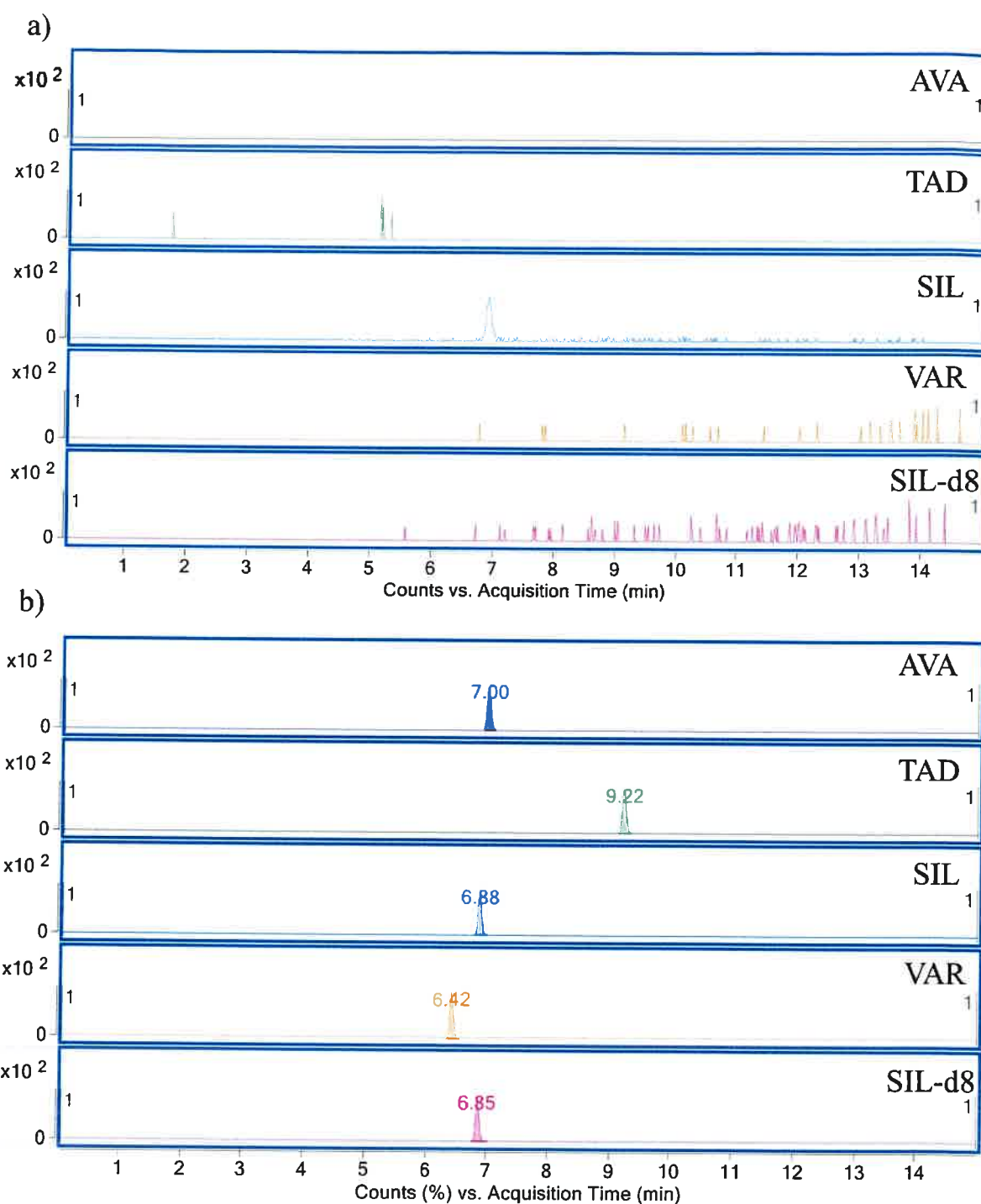
4.2.3. Validacija UHPLC–QTOF metode i procjena mjerne nesigurnosti

Validacija UHPLC–QTOF metode za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani obuhvatila je sljedeće parametre: selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu detekcije, granicu kvantifikacije, utjecaj matrice i stabilnost. Pokusi validacije provedeni su u skladu s postupkom detaljno opisanim u poglavlju 3.4., a rezultati su prikazani u Tablicama 16. – 20. Za potrebe validacije korištene su slijepe matrice uzoraka (kapsula, tableta i med), u koje su dodani ciljani analiti u odgovarajućim masenim koncentracijama.

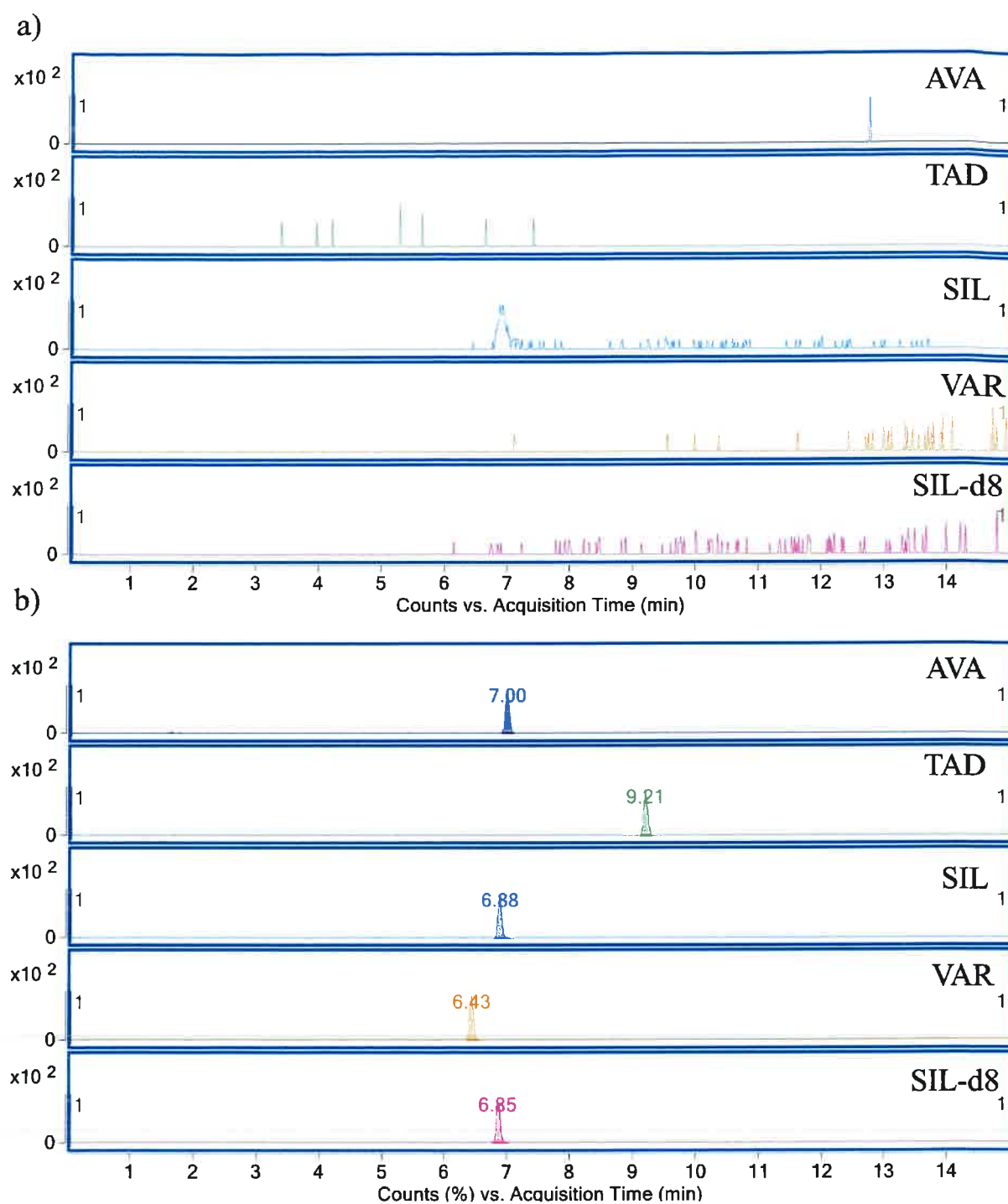
Selektivnost metode potvrđena je usporedbom kromatograma slijepih matrica kapsula (Slika 37.), tableta (Slika 38.) i meda (Slika 39.) s kromatogramima obogaćenih uzoraka odgovarajućih matrica. Budući da u očekivanom vremenu zadržavanja analiziranih PDE–5I nije bilo kromatografskih signala ili su oni bili prisutni samo kao manji, beznačajni signali intenziteta odziva na razini šuma, potvrđena je selektivnost razvijene metode. Dodatno, selektivnost UHPLC–QTOF metode poboljšana je kombinacijom visokog razlučivanja i točnosti mase (često unutar $\pm 1\text{--}5$ ppm) QTOF analizatora. Navedeno omogućava razdvajanje iona vrlo sličnih masa, čime se izbjegavaju interferencije spojeva sa sličnim molekulskim masama prisutnih u matrici. Osim toga, QTOF generira fragmentne ione jedinstvene za ciljani spoj što dodatno povećava sigurnost identifikacije.



Slika 37. Kromatogrami iona odabranih m/z vrijednosti PDE-5I u a) ekstraktu čistog uzorka kapsule i b) obogaćenom ekstraktu kapsule na razini GK. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 5.



Slika 38. Kromatogrami iona odabranih m/z vrijednosti PDE-5I u a) ekstraktu čistog uzorka tablete i b) obogaćenom ekstraktu tablete na razini GK. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 5.



Slika 39. Kromatogrami iona odabranih m/z vrijednosti PDE-5I u a) ekstraktu čistog uzorka meda i b) obogaćenom ekstraktu meda na razini GK. Popis kratica imena analita nalazi se u Tablici 5.

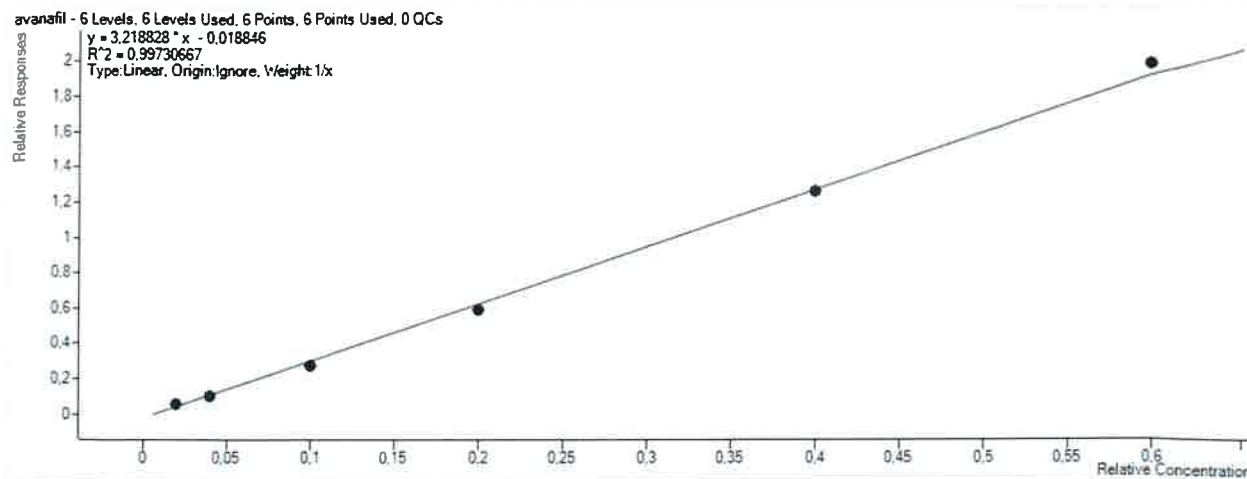
Linearnost metode za ciljane analite ispitana je u rasponu koncentracija od 10 ng mL⁻¹ do 300 ng mL⁻¹ za sildenafil i vardenafil, od 20 ng mL⁻¹ do 600 ng mL⁻¹ za tadalafil te od 2 ng mL⁻¹ do 60 ng mL⁻¹ za avanafil. Svaka otopina sadržavala je jednaku masenu koncentraciju IS od 100 ng mL⁻¹ i injektirana je uzastopno tri puta. Kalibracijske krivulje za sve analite dobivene su linearnom regresijom, pri čemu su na y-os prikazani omjeri površina pikova pojedinog PDE-5I i IS, a na x-osi omjeri inicijalne masene koncentracije injektiranog PDE-5I i IS. Krivulje su prikazane na Slikama 40. – 43. Za svaki analit određen je koeficijent determinacije (R^2), a rezultati su prikazani u Tablici 16. U ispitivanom rasponu koncentracija koeficijenti determinacije za sve ciljane analite bili su $\geq 0,98$ čime je zadovoljen kriterij prihvatljivosti linearnosti i potvrđena linearnost metode.

Granice kvantifikacije ciljano su postavljene kao najniža točka kalibracijskog pravca pri kojima su zadovoljeni kriteriji ponovljivosti (RSD < 20 %) i točnosti (80–120 %). Granica detekcije određena je regresijskom analizom temeljenoj na standardnoj devijaciji reziduala i nagiba kalibracijske krivulje dobivene analizom uzoraka koji sadrže analit u rasponu granice detekcije.

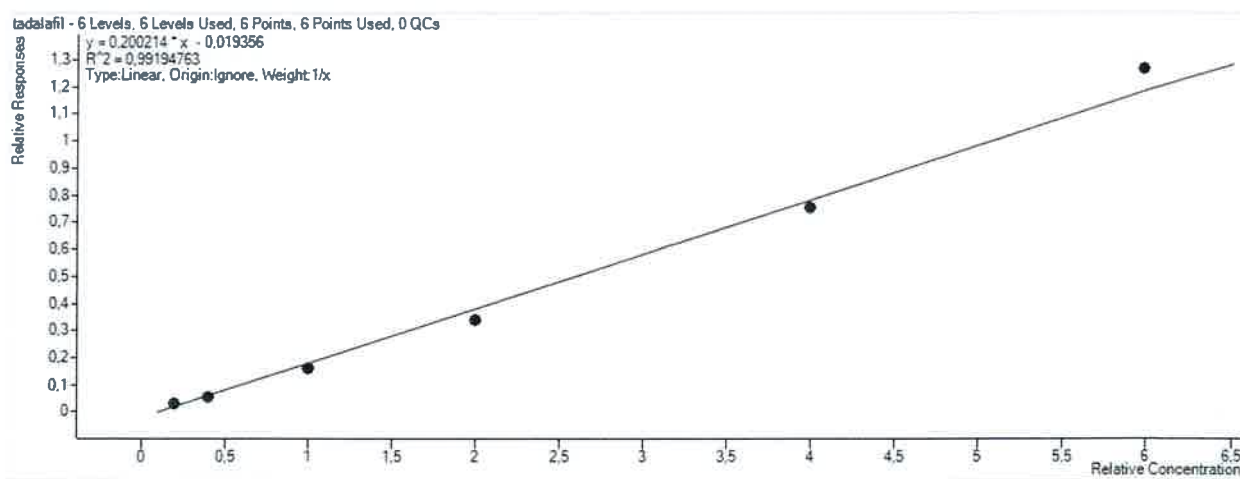
Tablica 16. Linearnost UHPLC–QTOF metode za određivanje PDE-5I u dodacima prehrani.

Analit	Raspon linearnosti (ng mL ⁻¹)	Jednadžba	R^2	GD (ng mL ⁻¹)	GK (ng mL ⁻¹)
Avanafil	2 – 60	$y=3,2188x-0,0188$	0,997	0,2	2
Tadalafil	20 – 600	$y=0,2002x-0,0194$	0,992	2,2	20
Sildenafil	10 – 300	$y=0,9259x+0,002$	0,999	1,2	10
Vardenafil	10 – 300	$y=1,1154x+0,0228$	0,998	0,8	10

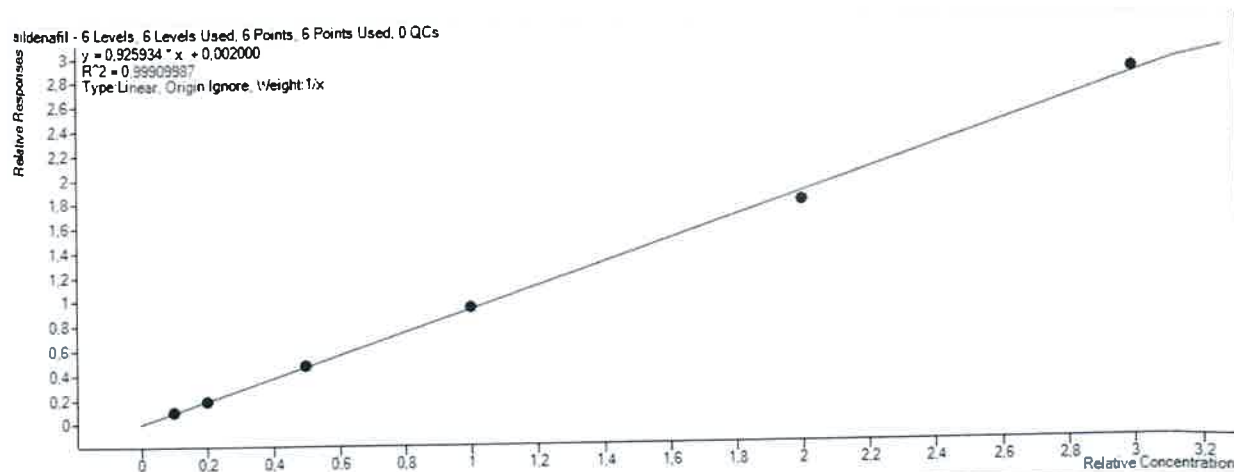
R^2 – koeficijent determinacije; GD – granica detekcije; GK – granica kvantifikacije



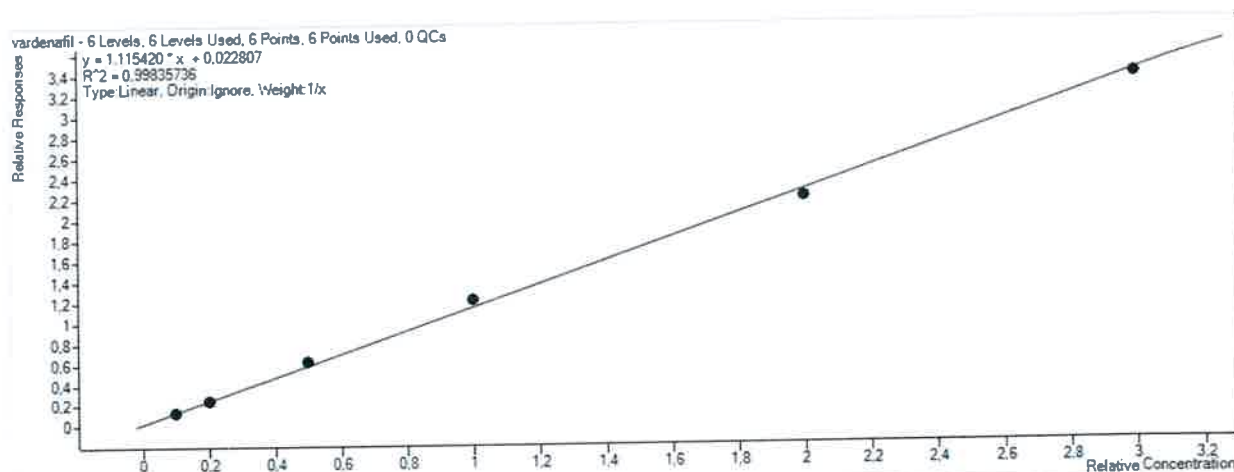
Slika 40. Kalibracijska krivulja avanafila – linearnost u koncentracijskom rasponu od 2 ng mL⁻¹ – 60 ng mL⁻¹.



Slika 41. Kalibracijska krivulja tadalafila – linearnost u koncentracijskom rasponu 20 ng mL⁻¹ – 600 ng mL⁻¹.



Slika 42. Kalibracijska krivulja sildenafila – linearnost u koncentracijskom rasponu 10 ng mL⁻¹ – 300 ng mL⁻¹.



Slika 43. Kalibracijska krivulja vardenafila – linearnost u koncentracijskom rasponu 10 ng mL⁻¹ – 300 ng mL⁻¹.

Utjecaj matrice uzorka procijenjen je na četiri razine koncentracije usporedbom nagiba kalibracijskih krivulja dobivenih iz standardnih otopina smjese analita pripremljenih u čistom otapalu i standardnih otopina pripremljenih u matrici uzorka, pritom je korišten IS, kako je opisano u poglavlju 3.4. Budući da se svaki realan uzorak razrijeđuje najmanje 10 puta, matrica uzorka također je razrijeđena u istom omjeru. Utjecaj matrice izračunat je prema izrazu (4) i izražen u postocima. Na taj način procijenjen je utjecaj matrice uzorka unutar cjelokupnog linearnog područja analitičke metode, a rezultati su izraženi kao supresija (smanjenje) i/ili pojačanje odziva signala. Rezultati utjecaja različitih matrica prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17. Rezultati određivanja utjecaja matrice za analizu PDE-5I.

Analit	Utjecaj matrice (%)		
	Kapsule	Tablete	Med
Avanafil	-0,47	-0,99	-3,07
Tadalafil	-0,42	0,01	-2,65
Sildenafil	-0,32	-1,52	-1,56
Vardenafil	4,95	-1,05	-1,33

Pozitivne vrijednosti ukazuju na povećanje, a negativne na suzbijanje signala analita u prisutnosti matrice. Za sve analite, smanjenje ili povećanje signala bilo je ispod 5 % što ukazuje na vrlo nizak utjecaj matrice, kategoriziran kao beznačajan. Zbog minimalnog utjecaja matrice, za kvantifikaciju su korišteni standardi pripremljeni u otapalu.

Eksperimenti određivanja točnosti i preciznosti, uključujući ispitivanja unutar istog dana i kroz sedam dana, provedeni su korištenjem obogaćenih slijepih matrica (kapsule, tablete i med) na četiri razine koncentracije i u šest replika uz primjenu IS. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 18. – 19. Preciznost metode izražena je RSD–om dok je točnost prikazana kao analitički povrat (%). Za sve ciljane analite, točnosti su se kretale između 88,5 % i 115,9 % za eksperimente provedene isti dan te između 86,9 % i 111,2 % za eksperimente provedene kroz sedam dana. Razvijena metoda pokazala se preciznom, pri čemu je RSD ponovljivosti mjerenja unutar istog dana bio između 0,4 % i 4,5 %, dok je višednevni RSD iznosio između 0,9 % i 5,2 %. RSD vrijednosti dobivene za vrlo niske koncentracije (GK) bile su uglavnom više u usporedbi s onima izmjerenima pri višim koncentracijama, što je vjerojatno posljedica većih fluktuacija u odzivu pri vrlo niskim koncentracijama. Osim na obogaćenim slijepim matricama, točnost i preciznost dodatno je ispitana i na komercijalnim uzorcima lijekova namijenjenih za liječenje erektilne disfunkcije. Dobiveni rezultati prikazani su Tablici 20. Rezultati ukazuju na vrlo dobru točnost i preciznost UHPLC–QTOF metode u ponovljivim uvjetima.

Tablica 18. Točnost UHPLC–QTOF metode određivanja PDE–5I u različitim matricama (eksperimenti provedeni isti dan i kroz 7 dana).

Analit	Obogaćeno (ng mL ⁻¹)	Točnost ± SD (%)					
		Isti dan (<i>n</i> = 6)			Tijekom 7 dana (<i>n</i> = 6)		
		Kapsule	Tablete	Med	Kapsule	Tablete	Med
Avanafil	2	101,1±3,0	113,0±3,5	111,4±3,0	93,2±7,1	105,3 ±6,6	105,7±5,1
	3	93,1±3,4	100,9±3,7	100,2±2,0	88,6±4,1	96,4±4,3	94,0±5,2
	30	111,9±2,5	110,4±2,7	101,6±2,0	110,4±2,3	107,4±3,1	101,4±1,8
	50	103,7±0,7	104,4±1,2	101,2±1,3	104,0±1,9	104,4±1,9	102,0±2,1
Tadalafil	20	103,8±4,4	114,2±4,4	111,6±4,6	101,7±3,7	111,2±5,0	110,5±4,0
	30	92,3±2,8	97,8±3,0	95,1±3,3	91,3±2,8	97,1±2,4	94,1±3,1
	300	98,6±2,7	96,9±3,0	88,5±0,8	99,8±1,9	96,6±1,8	90,0±1,8
	500	97,6±0,7	97,7±1,2	95,1±1,3	100,5±2,6	100,9 ±2,8	97,6±2,4
Sildenafil	10	100,5±4,4	115,7±5,2	115,9±2,1	93,6±7,3	107,4±7,2	106,8±7,1
	15	96,7±2,1	108,0±3,9	102,6±2,2	91,7±4,6	101,4±5,9	95,7±5,6
	150	110,4±3,0	109,7±2,8	100,2±0,9	110,2±2,6	107,1±3,0	100,7±2,0
	250	101,8±0,9	102,3±1,2	97,5±1,8	101,7±1,8	101,7±2,8	99,2±3,1
Vardenafil	10	91,4±2,6	107,2±2,8	105,1±2,1	86,9±5,9	104,2±4,4	101,5±4,9
	15	94,6±0,9	104,1±3,7	99,5±2,9	91,5±4,3	101,9±3,8	97,1±3,6
	150	108,0±2,4	106,4±2,7	98,4±0,8	110,2±2,5	108,3±2,5	101,8±2,9
	250	97,8±0,4	98,0±1,5	95,5±1,0	101,8±3,2	102,3±3,4	99,5±3,2

Tablica 19. Preciznost UHPLC–QTOF metode određivanja PDE–5I u različitim matricama (eksperimenti provedni isti dan i kroz 7 dana).

Analit	Obogaćeno (ng mL ⁻¹)	Preciznost (RSD, %)					
		Isti dan (<i>n</i> = 6)			Tijekom 7 dana (<i>n</i> = 6)		
		Kapsule	Tablete	Med	Kapsule	Tablete	Med
Avanafil	2	3,0	3,1	2,7	2,8	3,0	2,7
	3	3,6	3,6	2,0	2,8	2,4	2,2
	30	2,2	2,4	2,0	1,6	1,9	1,8
	50	0,6	1,2	1,3	1,4	1,6	1,9
Tadalafil	20	4,2	3,9	4,1	2,7	3,6	3,1
	30	3,1	3,0	3,5	3,0	2,0	2,7
	300	2,7	3,1	0,9	1,8	1,9	1,7
	500	0,7	1,3	1,4	1,2	1,6	1,7
Sildenafil	10	4,4	4,5	1,8	5,2	3,8	2,6
	15	2,1	3,6	2,1	2,8	3,3	2,3
	150	2,7	2,5	0,9	2,3	1,9	0,9
	250	0,9	1,2	1,8	1,5	1,9	2,1
Vardenafil	10	2,8	2,6	2,0	3,3	2,7	2,4
	15	1,0	3,6	2,9	2,1	2,7	2,4
	150	2,3	2,5	0,9	1,8	2,1	1,4
	250	0,4	1,5	1,0	1,2	1,4	1,3

Tablica 20. Točnost i preciznost komercijalnih uzoraka lijekova za liječenje erektilne disfunkcije (*n* = 6).

Naziv lijeka (aktivna tvar)	Deklarirana vrijednost	Izmjerena vrijednost ± SD	Analitički	
	(mg)	(mg)	povrat ± SD (%)	RSD (%)
Cialis (Tadalafil)	20	20 ± 1	100 ± 3,6	3,6
Levitra (Vardenafil)	20	19 ± 1	94,6 ± 1,8	1,9
Kamagra (Sildenafil)	100	106 ± 2	106 ± 2	1,9

Stabilnost analita ispitana je u tri matrice (tableta, kapsula i med) na način da su uzorci obogaćeni poznatim koncentracijama odabranih PDE-5I na četiri razine koncentracije (GK, 1,5×GK, 15×GK i 25×GK). Nakon pripreme, uzorci su pohranjeni u hladnjaku pri 4 °C tijekom 7 dana, nakon čega su analizirani kao i uzorci neposredno nakon pripreme (0. dan). Vremenski interval od 7 dana odabran je u skladu s očekivanim trajanjem obrade uzorka u svakodnevnoj analitičkoj praksi. Stabilnost je izražena kao postotak, odnosno omjer konačno izmjerene koncentracije nakon 7 dana skladištenja u odnosu na početnu koncentraciju određenu na dan pripreme (0. dan). Rezultati su prikazani u Tablici 21.

Tablica 21. Stabilnost PDE-5I u različitim matricama obogaćenim na četiri razine koncentracije tijekom skladištenja na 4 °C tijekom 7 dana.

Analit	Obogaćeno (ng mL ⁻¹)	Stabilnost (%) nakon 7 dana		
		Tableta	Kapsula	Med
Avanafil	2	87,8	84,4	91
	3	91,3	91,8	88,6
	30	96,9	99,2	100,3
	50	101,2	101,9	102,5
Tadalafil	20	93,3	94,4	96,2
	30	97,2	97,5	96
	300	100	102,2	102
	500	105,4	105,5	104,4
Sildenafil	10	89,9	93,5	88,5
	15	97,2	94,4	91,7
	150	95	98,5	98,7
	250	96,7	98,6	99,9
Vardenafil	10	92,7	87,3	91
	15	94,4	91	93,8
	150	102,5	103,1	104,5
	250	106,7	106,4	106,2

Svi ispitani analiti pokazali su zadovoljavajuću stabilnost nakon 7 dana skladištenja pri 4 °C u sve tri ispitivane matrice. Kod najnižih razina obogaćenja (GK), u nekim slučajevima zabilježena je blaga degradacija (npr. avanafil u kapsuli, 84,4%), no to ostaje unutar granice prihvatljivosti od ± 20 % predviđene za koncentracije na GK. Na višim razinama obogaćenja, stabilnost svih analita bila je unutar ± 15 %.

Slijedom provedene validacije može se potvrditi da je primijenjena UHPLC–QTOF analitička metoda prikladna za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani u okviru rutinske analize.

Procjena mjerne nesigurnosti UHPLC–QTOF metode

Analizom pojedinih faza mjernog procesa prepoznati su sljedeći izvori mjerne nesigurnosti: nesigurnosti tipa A odnose se na podatke dobivene statističkom analizom rezultata validacijskih ispitivanja, uključujući nesigurnost kalibracijskog pravca, nesigurnost preciznosti te nesigurnost točnosti dok izvori nesigurnosti tipa B preuzeti su iz umjernica i certifikata, kao što su čistoća analitičkih standarda, nesigurnost vage, nesigurnost volumena pipeta i odmjernog posuđa. Identificirani izvori nesigurnosti kvantificirani su prema formulama (9) – (14), dok su izračunate relativne standardne nesigurnosti za pojedine spojeve i matrice prikazane u Tablicama D3–D6 (poglavlje 8. Dodatak). U istim tablicama navedene su ukupna mjerna nesigurnost (u), izračunata prema formuli (15) iz svih relevantnih sastavnica, i proširena mjerna nesigurnost (U), izračunata formulom (16). Postignute vrijednosti proširenih mjernih nesigurnosti za svaki analit i korištenu matricu navedene su u Tablici 22.

Analizom je utvrđeno da sastavnice nesigurnosti A vrste, dobivene validacijom metode, doprinose u najznačajnijoj mjeri ukupnoj mjernoj nesigurnosti, pri čemu je najveći utjecaj imala nesigurnost kalibracijskog pravca. Proširene mjerne nesigurnosti za PDE–5I analizirane u svim ispitivanim matricama kretale su se između 12 % i 26 %. U regulativi ne postoje propisane vrijednosti proširene mjerne nesigurnosti za ocjenu prihvatljivosti dobivenih rezultata. U literaturi su dostupni samo podaci o proširenoj mjernoj nesigurnosti sildenafilu u među, koja iznosi 22 %, pri korištenju tehnike LC–ESI–MS–MS¹²³. U skladu s tim, procijenjene mjerne nesigurnosti za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani razvijenom metodom smatraju se prihvatljivima. Najviše vrijednosti proširene mjerne nesigurnosti, u gotovo svim ispitivanim matricama, dobivene su za analit tadalafil.

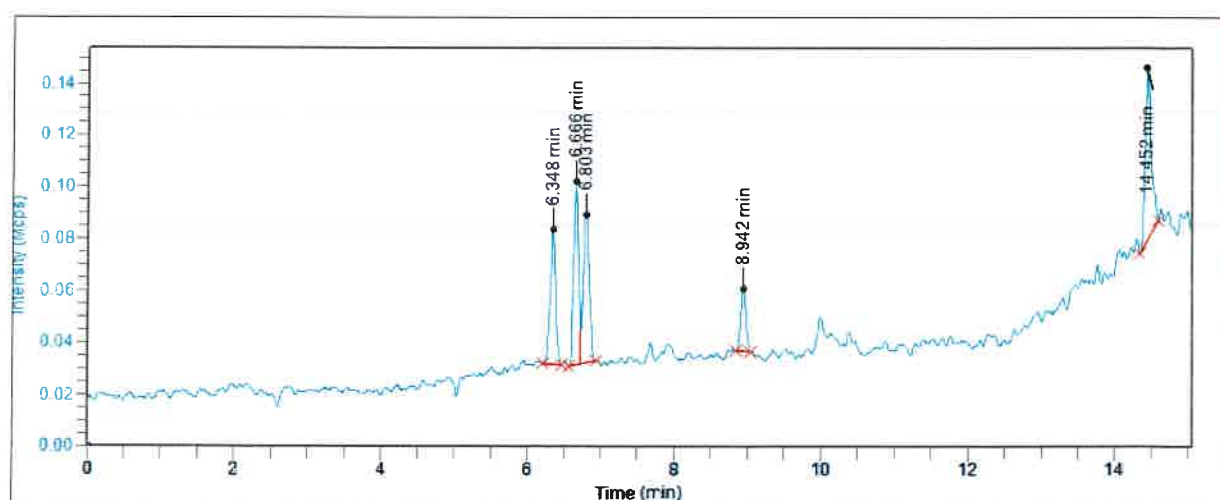
Tablica 22. Proširena mjerna nesigurnost za ciljane PDE-5I po vrstama matrica (UHPLC–QTOF metoda).

Analit	Proširena mjerna nesigurnost, U (k = 2), %		
	Kapsule	Tablete	Med
Avanafil	14	14	14
Tadalafil	26	26	26
Sildenafil	14	14	13
Vardenafil	12	12	12

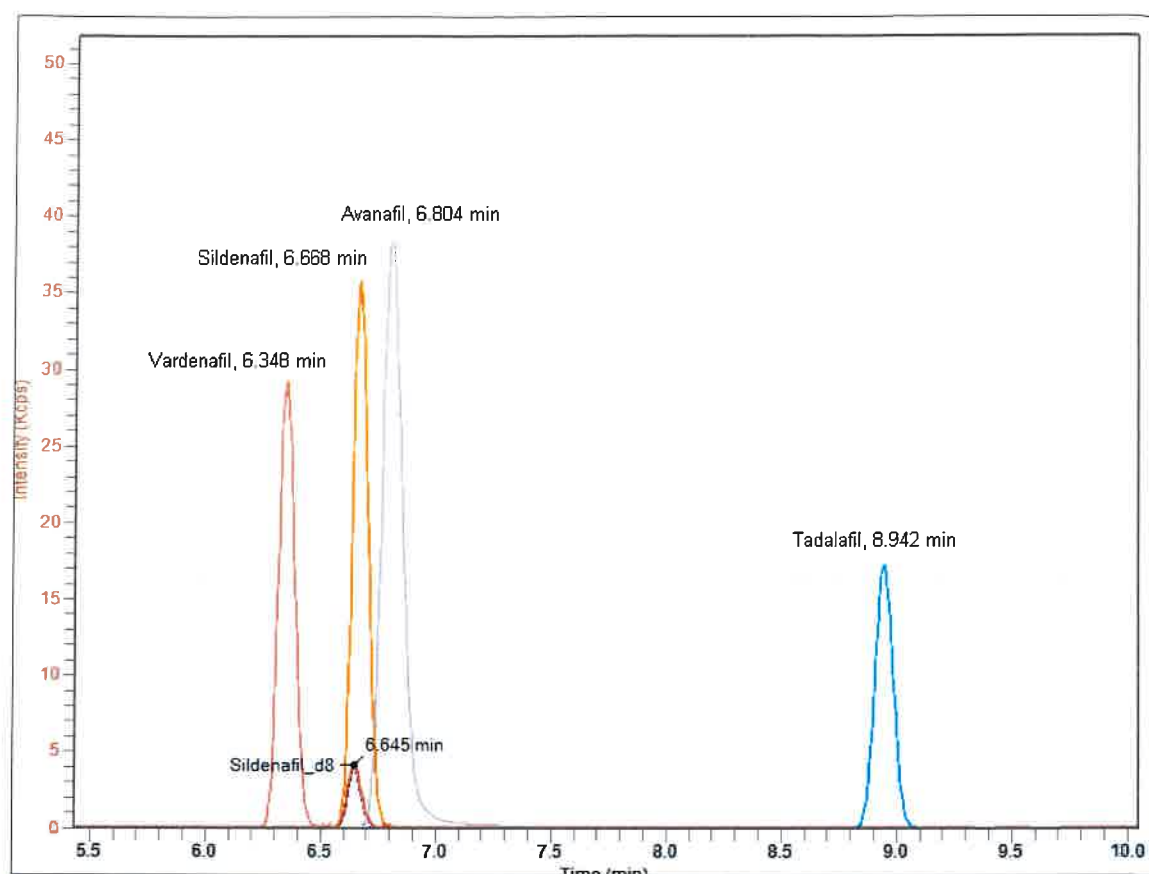
4.3. Razvoj HPLC–TOF metode za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani

4.3.1. Optimizacija instrumentalnih uvjeta

Optimizacija kromatografskih uvjeta opisana je u poglavlju 4.1.1. Na Slici 44. prikazano je kromatografsko razdvajanje ciljanih PDE–5I korištenjem C18 kolone (Inertsil ODS–4) na uređaju HPLC–TOF. HPLC–TOF metoda zahtijeva veći volumen injektiranja u usporedbi s UHPLC–QTOF–om kako bi se osigurao dovoljan odziv detektora. Radi dodatnog povećanja osjetljivosti, volumen injektiranja povećan je s 1 μ L na 5 μ L.



Slika 44. Kromatogramu ukupne ionske struje (TIC) – 700 ng mL⁻¹ PDE–5I i 100 ng mL⁻¹ IS.



Slika 45. Kromatogram iona odabranih vrijednosti m/z (700 ng mL^{-1} PDE-5I i 100 ng mL^{-1} IS).

Optimizacija MS parametara ionskog izvora provedena je protočno-injekcijskom analizom za četiri ciljana PDE-5I (sildenafil, vardenafil, tadalafil, avanafil) u pozitivnom ESI modu, koristeći individualne standarde koncentracije 500 ng mL^{-1} . Testirani parametri uključivali su napon na izlazu iz kapilare ($80 - 150 \text{ V}$), protok plina za sušenje ($8 \text{ L min}^{-1} - 12 \text{ L min}^{-1}$), temperatura plina ($150 \text{ }^{\circ}\text{C} - 350 \text{ }^{\circ}\text{C}$) i tlak raspršivača ($20 \text{ psi} - 80 \text{ psi}$) s ciljem postizanja maksimalnog intenziteta signala. Napon na izlazu iz kapilare (engl. *Capillary Exit*) pokazao se ključnim za osjetljivost i fragmentaciju, pri čemu povećanje iznad 150 V uzrokuje fragmentaciju u izvoru, stvarajući karakteristične fragmente. Ostali ispitani parametri nisu značajno utjecali na intenzitet signala. Protonirani molekulski ion ($[M+H]^+$) pokazao se kao najintenzivniji ion i odabran je kao prekursor ion. Potom je slijedilo određivanje optimalnih vrijednosti fragmentacije u izvoru. Optimalni napon za fragmentaciju u izvoru određen je injektiranjem svakog pojedinačnog PDE-5I pri vrijednostima od $100 \text{ V} - 300 \text{ V}$ (povećanje po 50 V). Za većinu analita, napon od 200 V se pokazao optimalnim jer osigurava ravnotežu

između prisutnosti $[M+H]^+$ i vidljivosti fragmentnih iona, dok tadalafil fragmentira već pri 150 V, a napon ≥ 250 V uzrokuje opsežnu fragmentaciju, uključujući referentne mase.

Ciljana analiza PDE-5I

Prilikom ciljane MS analize, osim ukupne struje nastalih iona, praćeni su kromatogrami ioni odabranih vrijednosti m/z za ciljane PDE-5I: sildenafil (m/z 475,2122), vardenafil (m/z 489,2279), tadalafil (m/z 390,1448), avanafil (m/z 484,1858) i sildenafil-d8 (m/z 483,2624). Pogreške mase prekursor iona bile su <5 ppm (Tablica 23). TOF-MS u ESI+ modu pruža točnu masu $[M+H]^+$ i izotopne obrasce, ali ograničene strukturne informacije. Fragmentacijom u izvoru nadoknađuje nedostatak MS/MS selektivnosti, generirajući fragmentne ione uz prekursor ion. Ključni fragmentni ioni uključuju: sildenafil (m/z 311,1493; 283,1187; 99,0933; 58,0643), tadalafil (m/z 268,1058; 262,0851; 135,0442), avanafil (m/z 375,1209; 155,0250) i vardenafil (m/z 377,1273; 344,1467; 299,1125; 169,0995). Dobiveni spektri masa prikazani su na Slikama 46. – 49., a eksperimentalne i teoretske vrijednosti m/z prekursor i fragmentnih iona dobivenih fragmentacijom u izvoru te pogreške mase prikazane su u Tablici 24. Fragmentacijski putevi sildenafil, tadalafil i avanafil podudaraju se s onima dobivenim primjenom UHPLC-QTOF tehnike (poglavlje 4.1.2), dok vardenafil pokazuje različite fragmente. Razlike u fragmentaciji vardenafila kod TOF i QTOF analizatora masa proizlaze iz različitih tehnika fragmentacije, zbog preciznije selekcije iona u QTOF-u putem kvadrupola te bolje kontrole energije sudara, što omogućuje ciljano fragmentiranje specifičnih kemijskih veza. Fragmentni ioni vardenafila dobiveni primjenom TOF uređaja, usporedivi su s rezultatima prethodnih istraživanja drugih autora^{142,166}.

Tablica 23. Točne mase prekursor iona (napon na izlazu iz kapilare – 100 V).

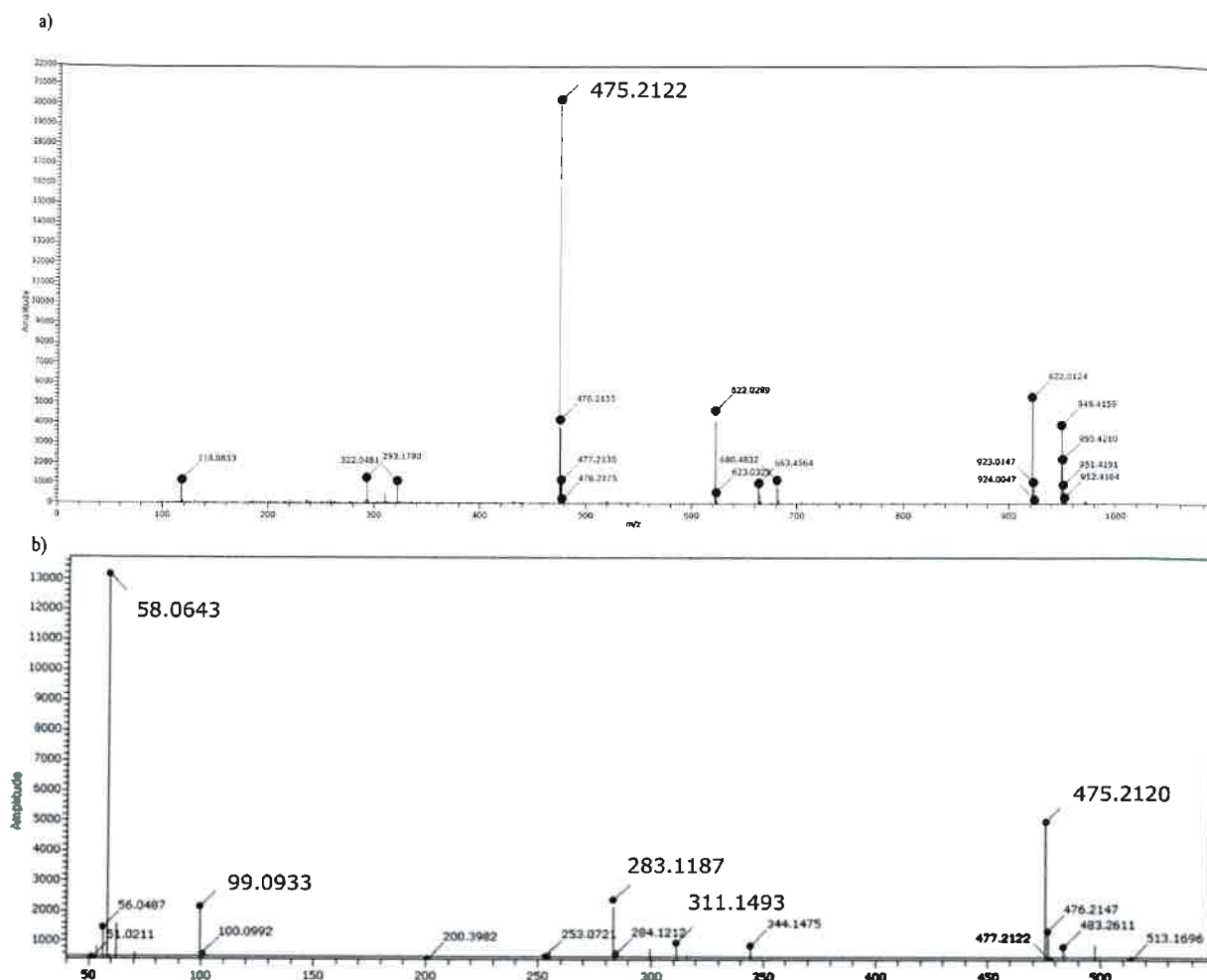
Ciljani analit	Molekulska formula	Vrijeme zadržavanja (min)	Prekursor ion $[M+H]^+$		Pogreška mase (ppm)
			Teoretski m/z	Eksperimentalno m/z	
Vardenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_4S$	6,35	489,2279	489,2277	-0,4
Sildenafil	$C_{22}H_{30}N_6O_4S$	6,67	475,2122	475,2122	0,0
Avanafil	$C_{23}H_{26}ClN_7O_3$	6,80	484,1858	484,1869	2,3
Tadalafil	$C_{22}H_{19}N_3O_4$	8,94	390,1448	390,1451	0,8
Sildenafil-d8	$C_{22}H_{22}D_8N_6O_4S$	6,65	483,2624	483,2616	-1,7

HPLC–TOF tehnika, uz mogućnost korištenja fragmentacije u izvoru, predstavlja koristan alat za identifikaciju analita, osobito kod spojeva s istom empirijskom formulom i točnom masom. Međutim, korištenje fragmentacije u izvoru ima određena ograničenja, uključujući niže intenzitete fragmentnih iona kod analita prisutnih u vrlo niskim koncentracijama te veći broj neželjenih fragmenata budući da fragmentacijom nastaje velik broj iona, osobito onih s nižim vrijednostima m/z ¹⁶⁷. Dodatno, kod LC–TOF tehnike, uočene su veće pogreške mase pri manjim omjerima m/z . Razlog tome je niža razlučivost instrumenta u tom rasponu ($< 200 m/z$), što dovodi do većih odstupanja u određivanju m/z manjih fragmenata.

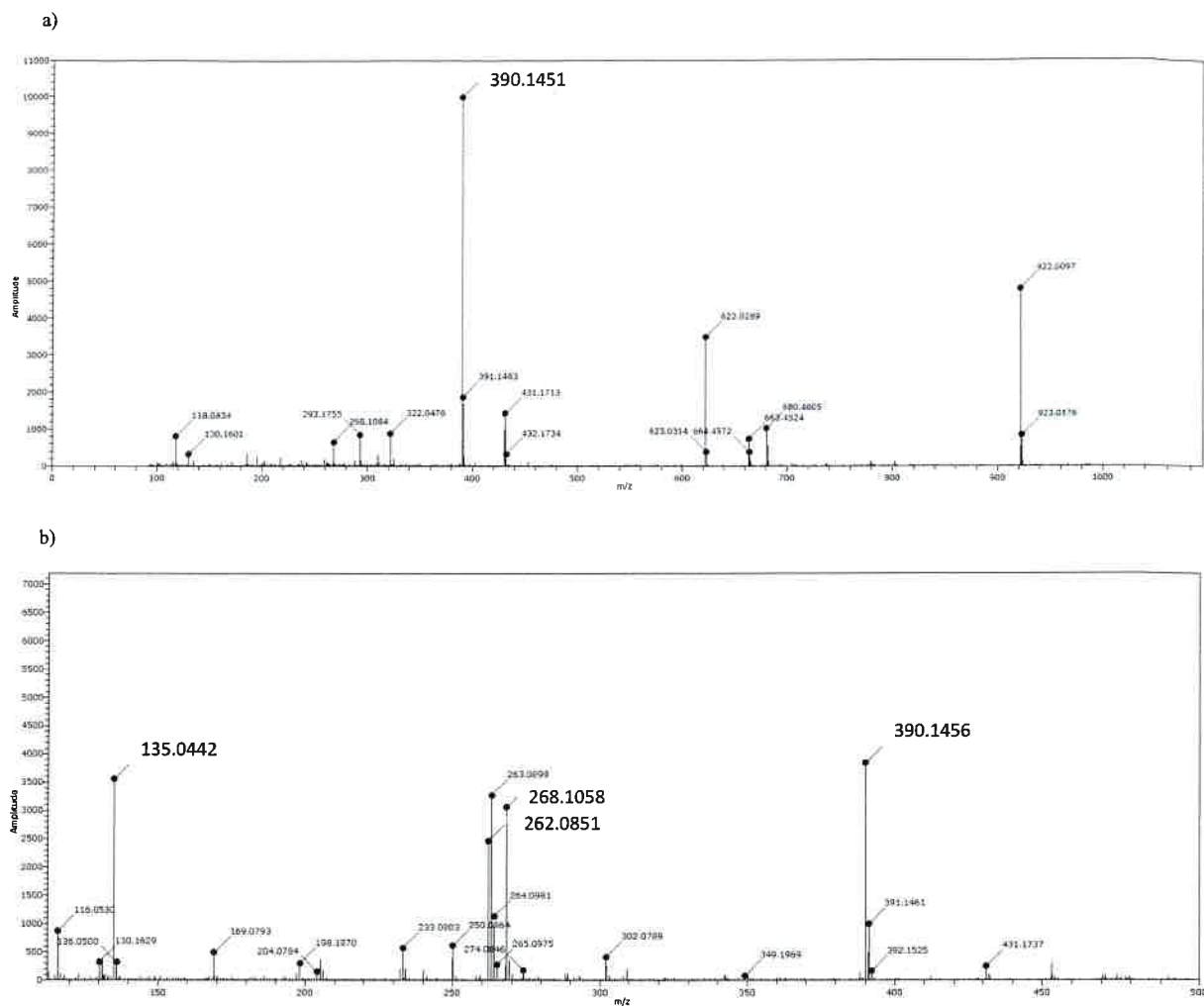
Prag točnosti (5 ppm za prekursor ion te 20 ppm za fragmentne ione) uz kriterij o vremenu zadržavanja zadovoljava kriterije Odluke 2002/657/EC¹⁴⁴ osiguravajući četiri identifikacijske točke (1 bod za prekursor iona, 3 boda za dva fragmentna iona) za potvrdu i identifikaciju ciljanog analita.

Tablica 24. Teoretske i eksperimentalne vrijednosti m/z prekursor i fragmentnih iona ciljanih PDE–5I dobivenih fragmentacijom u izvoru HPLC–TOF tehnikom.

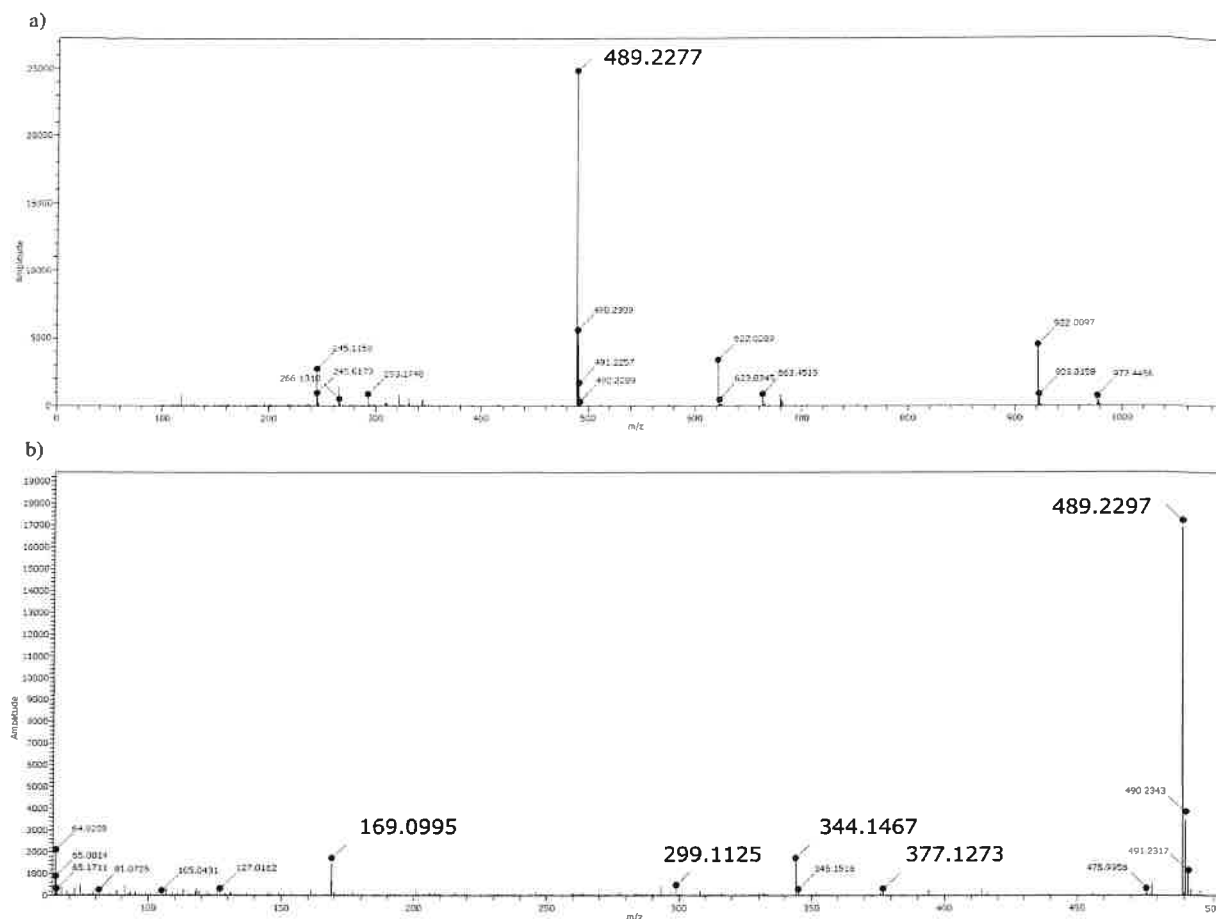
Ciljani analit	Napon za fragmentaciju (V)	Kemijska formula	Teoretska vrijednost m/z	Eksperimentalna vrijednost m/z	Pogreška mase (ppm)
Sildenafil	200	$C_{22}H_{31}N_6O_4S^+$	475,2122	475,2120	–0,4
		$C_{17}H_{19}N_4O_2^+$	311,1503	311,1493	–3,2
		$C_{15}H_{15}N_4O_2^+$	283,1190	283,1187	–1,1
		$C_{15}H_{15}N_4O_2^+$	100,0995	100,0992	–3,0
		$C_5H_{11}N_2^+$	99,0917	99,0933	16,1
		$C_3H_8N^+$	58,0651	58,0643	–13,8
Vardenafil	200	$C_{23}H_{33}N_6O_4S^+$	489,2279	489,2297	3,4
		$C_{17}H_{21}N_4O_4S^+$	377,1278	377,1273	–2,3
		$C_{17}H_{20}N_4O_4^+$	344,1479	344,1467	–3,5
		$C_{15}H_{15}N_4O_3^+$	299,1139	299,1125	–4,7
		$C_8H_{13}N_2O_2^+$	169,0972	169,0995	13,6
Avanafil	200	$C_{23}H_{27}ClN_7O_3$	484,1858	484,1862	0,8
		$C_{18}H_{20}ClN_4O_3^+$	375,1218	375,1209	–2,4
		$C_{10}H_{13}N_4O_2^+$	221,1033	221,1024	–4,1
		$C_8H_8ClO^+$	155,0258	155,0250	–5,2
Tadalafil	150	$C_{22}H_{20}N_3O_4^+$	390,1448	390,1456	2,1
		$C_{15}H_{14}N_3O_2^+$	268,1081	268,1058	–8,6
		$C_{17}H_{12}NO_2^+$	262,0863	262,0851	–4,6
		$C_8H_7O_2^+$	135,0441	135,0442	0,7



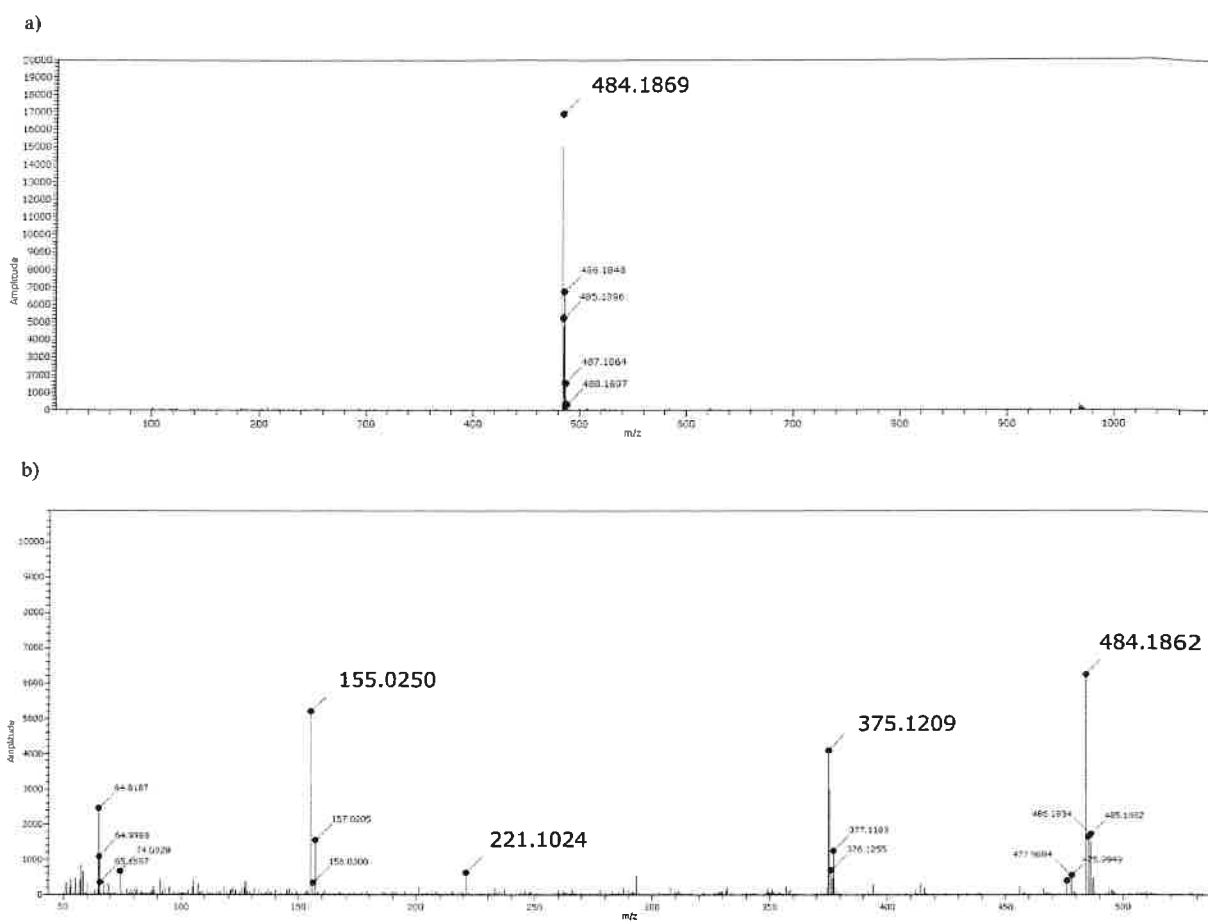
Slika 46. ESI-MS spektar sildenafil, a) bez fragmentacije (100 V), b) fragmentacija u izvoru (200 V).



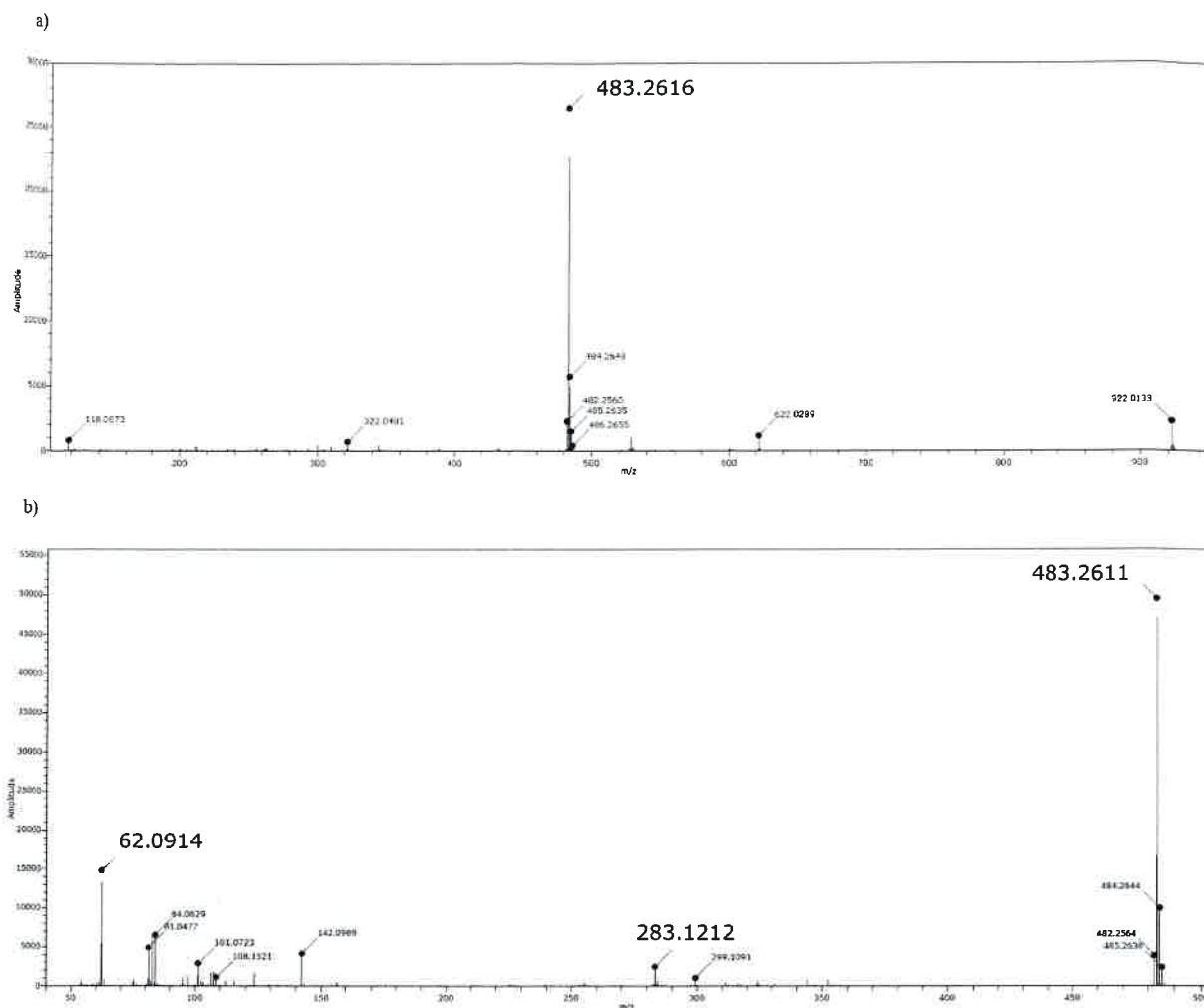
Slika 47. Spektar masa tadalafila, a) bez fragmentacije (100 V), b) fragmentacija u izvoru (150 V).



Slika 48. ESI–MS spektar vardenafila, a) bez fragmentacije (100 V), b) fragmentacija u izvoru (200 V).



Slika 49. ESI-MS spektar avanfila, a) bez fragmentacije (100 V), b) fragmentacija u izvoru (200 V).



Slika 50. ESI–MS spektar sildenafil–d8, a) bez fragmentacije (100 V), b) fragmentacija u izvoru (200 V).

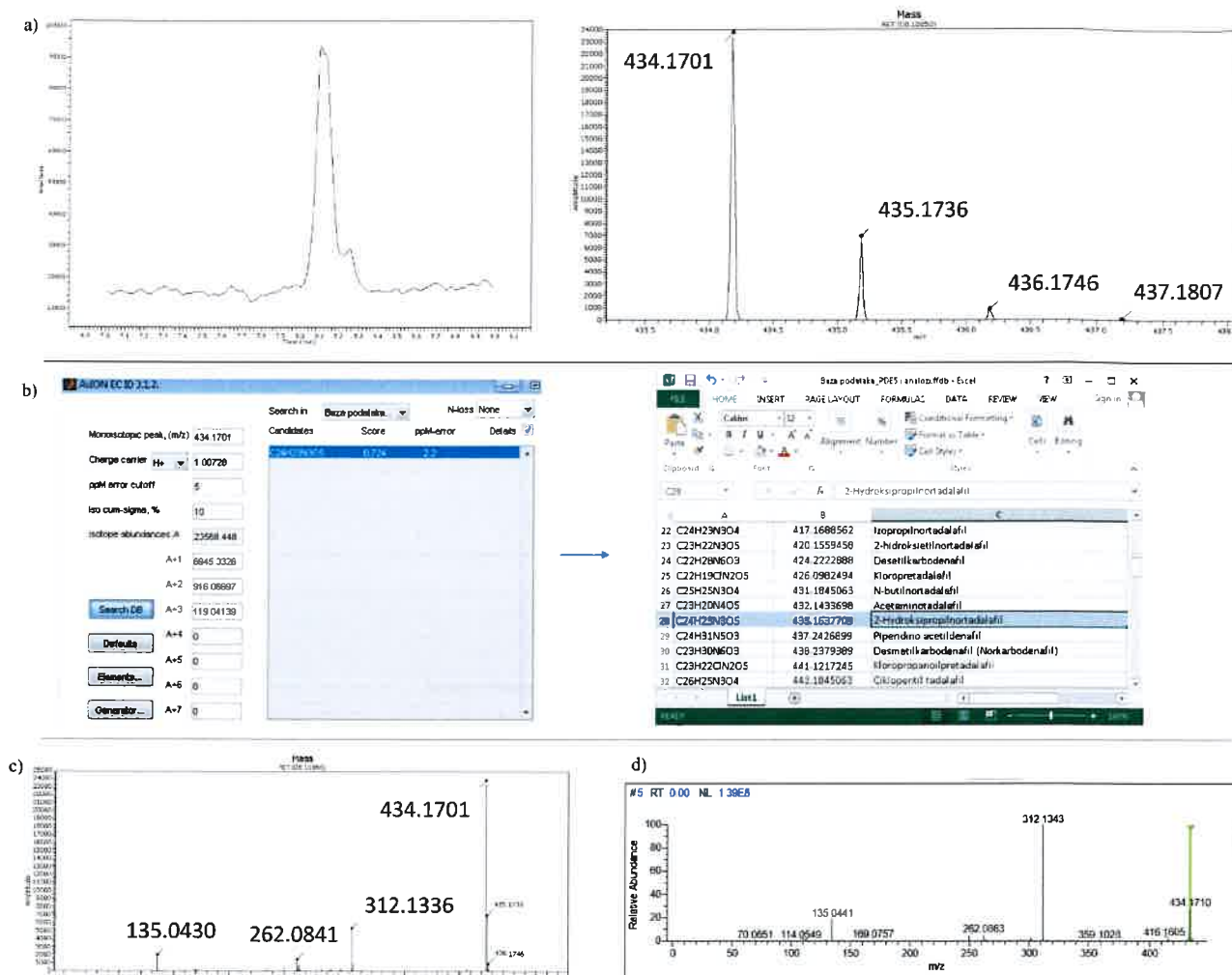
Identifikacija sumnjivih analita bez referentnih standarda (kvalitativna analiza)

Kada referentni standardi nisu dostupni, identifikacija sumnjivih analita provodi se korištenjem računalnog programa Axion EC ID pri čemu se detektirani spojevi pretražuju i uspoređuju s vlastitom bazom podataka točnih masa (Tablica D1, poglavlje 8. Dodatak) ili softver predlaže moguće spojeve na temelju dobivenih vrijednosti m/z i izotopnog profila. Za potvrda sumnjivih analita potrebno je ponovno injektiranje ekstrakta uzorka, pri čemu je korištena fragmentacija u izvoru kako bi se dobilo što više fragmentnih iona.

Potvrda identifikacije temelji se na sljedećim kriterijima:

- prisutnost iona prekursora (baza podataka, Tablica D1, poglavlje 8. Dodatak)
- točnost određivanje mase prekursor iona ≤ 5 ppm (rezultat $> 0,7$)

- prisutnost najmanje dva karakteristična fragmentna iona koji odgovaraju literaturnim podacima ili online dostupnim bazama podataka (MassBank, mzCloud) s odstupanjem ≤ 20 ppm.

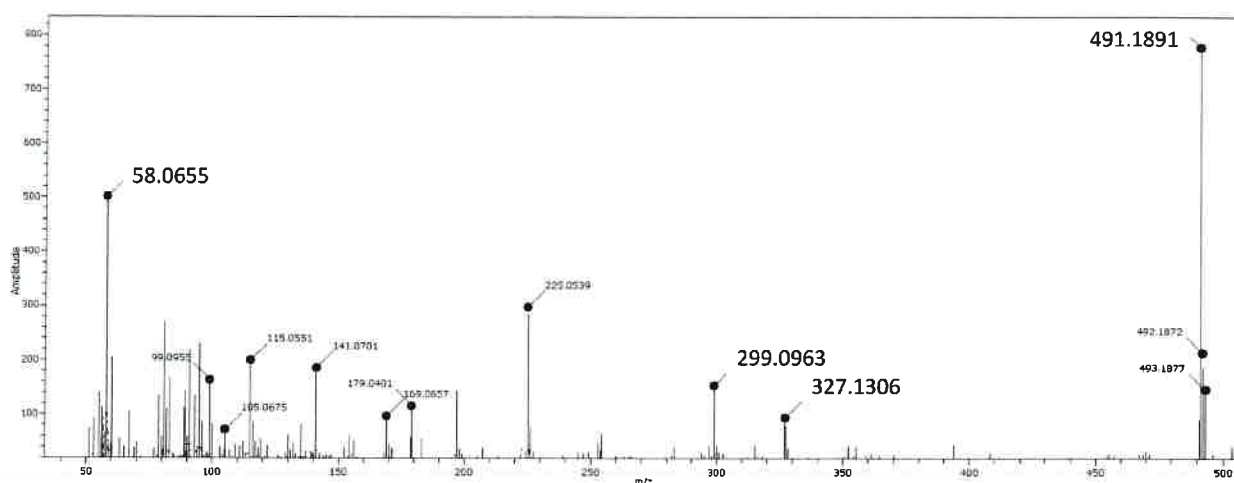


Slika 51. Detekcija/identifikacija analoga tadalafila 2–hidroksipropilnortadalafila u uzorku 35, a) EIC m/z 434,1701, izotopni profil; b) AxION EC ID – rezultat > 0,7; c) fragmentacija u izvoru (150 V); d) spektar 2–hidroksipropilnortadalafila za usporedbu (preuzeto s <https://beta.mzcloud.org/dataviewer/library>).

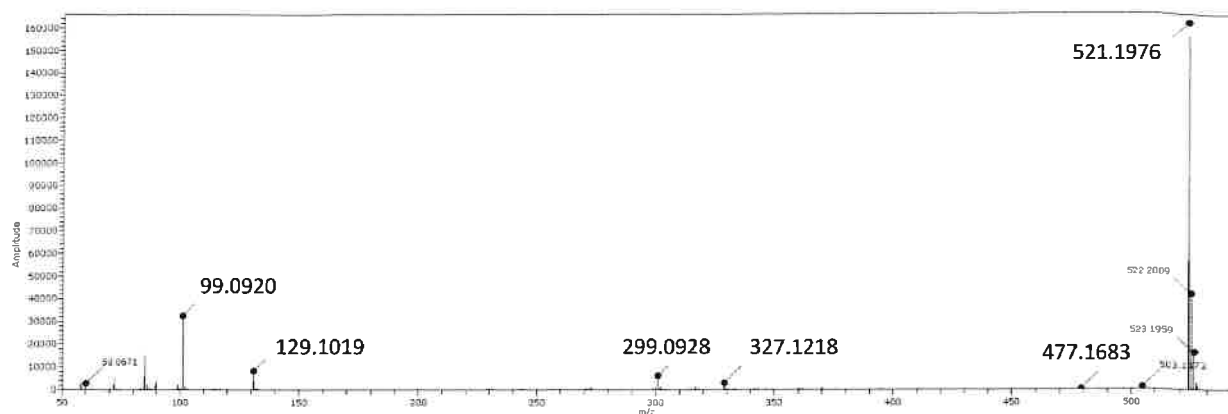
Primjer identifikacije analoga tadalafila (2–hidroksipropilnortadalafila) u realnom uzorku primjenom HPLC–TOF–MS tehnike prikazan je na Slici 51. Na temelju zadanih parametara, softver je predložio spoj 2–hidroksipropilnortadalafila s rezultatom podudaranja 0,724 i

pogreškom određivanja mase prekursor iona od 2,2 ppm. Fragmentacijom u izvoru pri naponu od 150 V dobiveni su fragmentni ioni koji se podudaraju s MS/MS spektrom (Slika 51.d) dostupnim u online bazi podataka mzCloud – MS/MS spektar snimljen koristeći HCD način fragmentacije pri NCE 20 %.

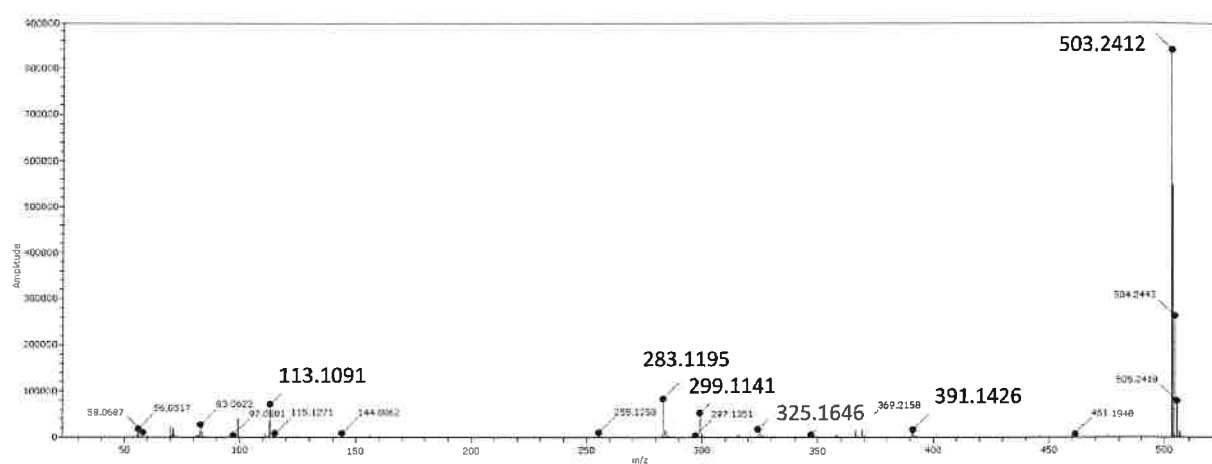
Na prethodno opisan način, identificirano je šest PDE-5I analoga, od toga jedan analog sildenafil (propoksifenil aildenafil), dva analoga tiosildenafil (tiosildenafil, hidroksitiohomosildenafil), dva analoga tadalafil (2-hidroksipropilnortadalafil i kloropretadalafil) i johimbin. Tablica D7. (poglavlje 8. Dodatak) prikazuje PDE-5I analoge identificirane bez referentnih standarda primjenom HPLC–TOF tehnike. U Tablici su prikazana vremena zadržavanja, molekulske formule prekursor i fragmentnih iona, eksperimentalne i teoretske vrijednosti m/z iona i pogreška mase. MS spektri prikazani su na Slikama 52.–57. Putevi fragmentacije odgovaraju onima dobivenim UHPLC–QTOF tehnikom, prethodno prikazanim na Slikama 24., 30., 31., 34. i 36.



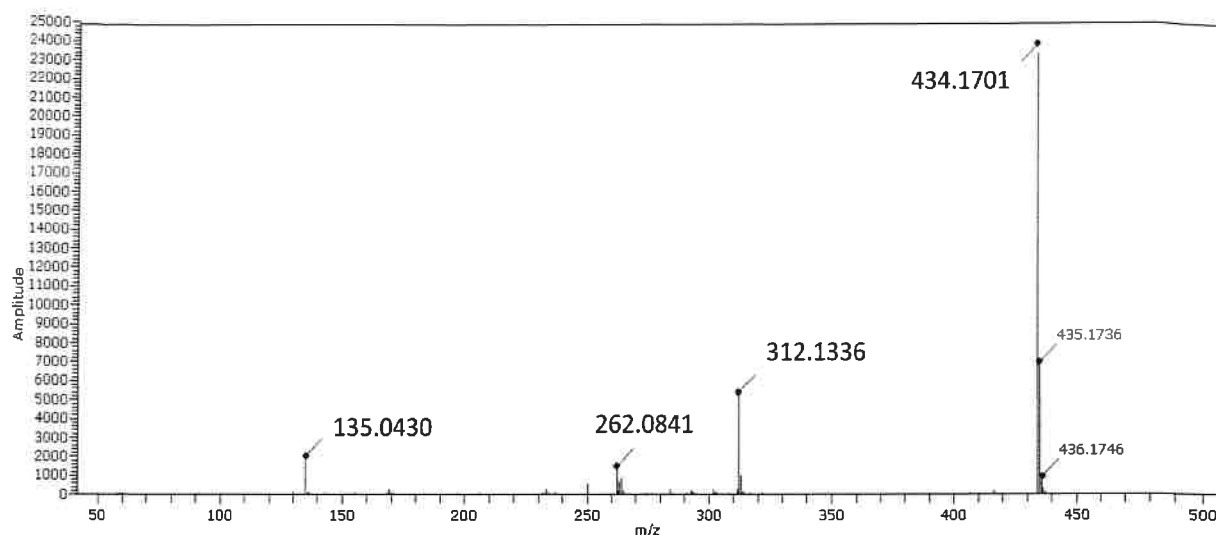
Slika 52. MS spektar tiosildenafil dobiven fragmentacijom u izvoru pri 200 V primjenom HPLC–TOF. Ionizacijska tehnika ESI+.



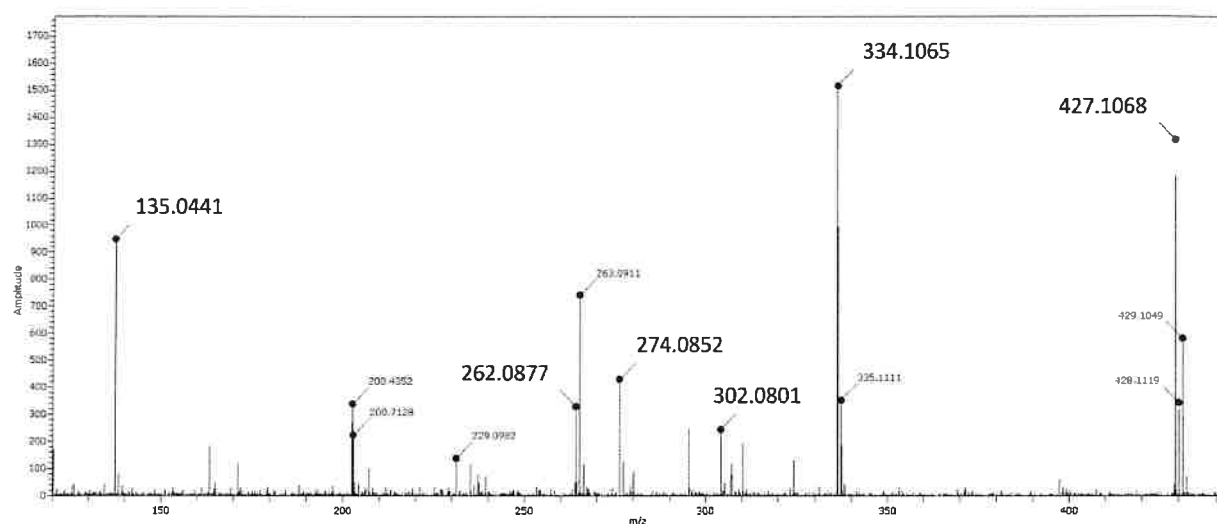
Slika 53. MS spektar hidroksitiohomosildenafila dobivenog fragmentacijom u izvoru pri potencijalu od 200 V primjenom LC-TOF. Ionizacijska tehnika ESI+.



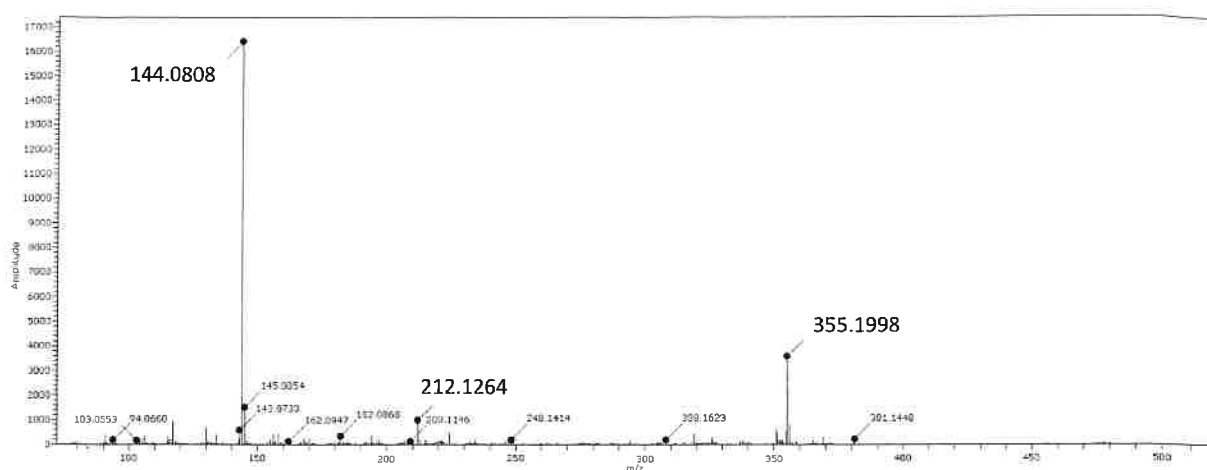
Slika 54. MS spektar propoksifenil aildenafilila dobivenog fragmentacijom u izvoru pri potencijalu od 200 V primjenom LC-TOF. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 55. MS spektar 2–hidroksipropilnortadalafila dobivenog fragmentacijom u izvoru pri potencijalu od 150 V primjenom LC–TOF. Ionizacijska tehnika ESI+.



Slika 56. MS spektar kloropretadalafila dobivenog fragmentacijom u izvoru pri potencijalu od 150 V primjenom LC–TOF. Ionizacijska tehnika ESI+.

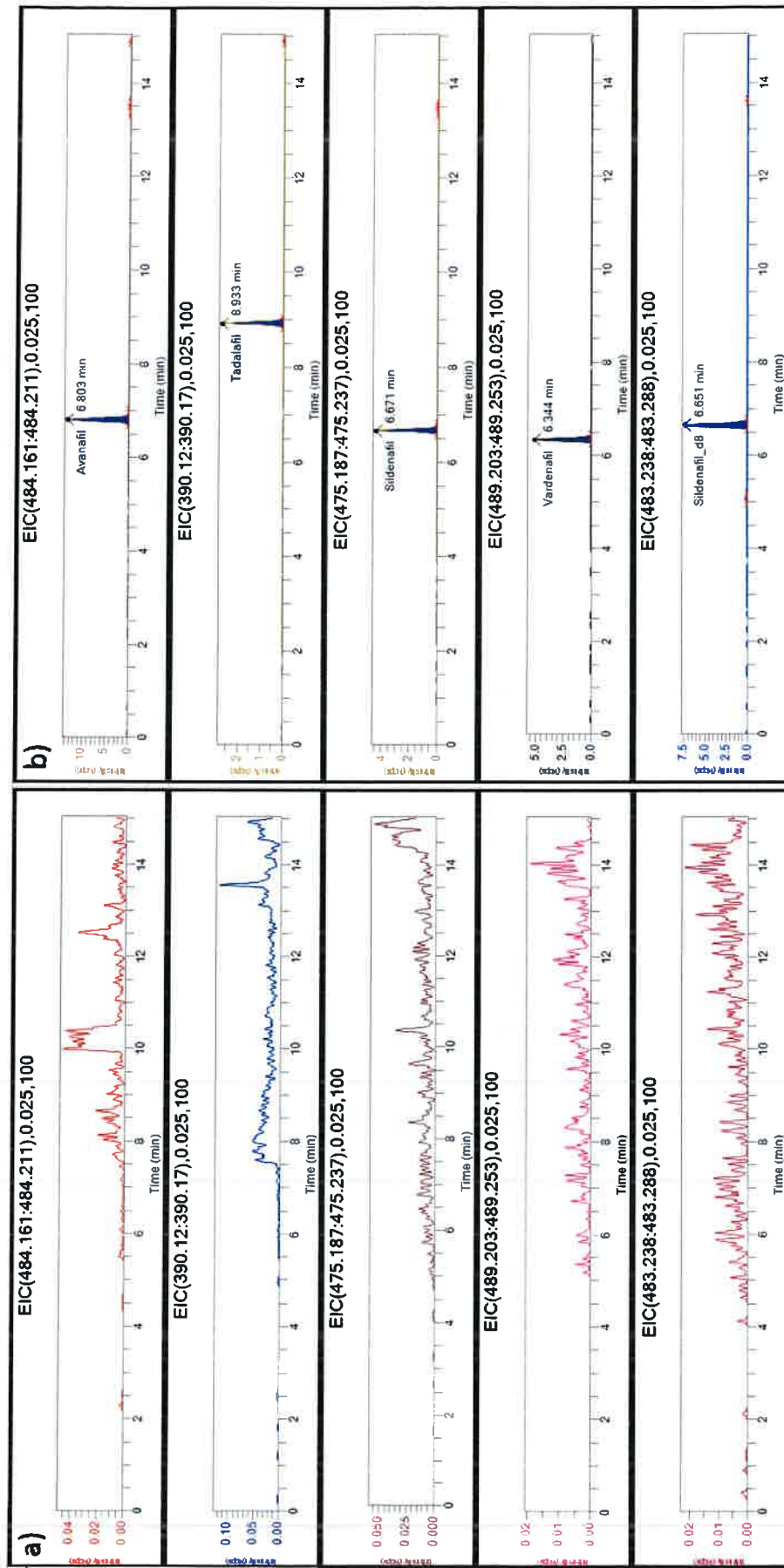


Slika 57. MS spektar johimbina dobiven fragmentacijom u izvoru pri potencijalu od 200 V primjenom LC–TOF. Ionizacijska tehnika ESI+.

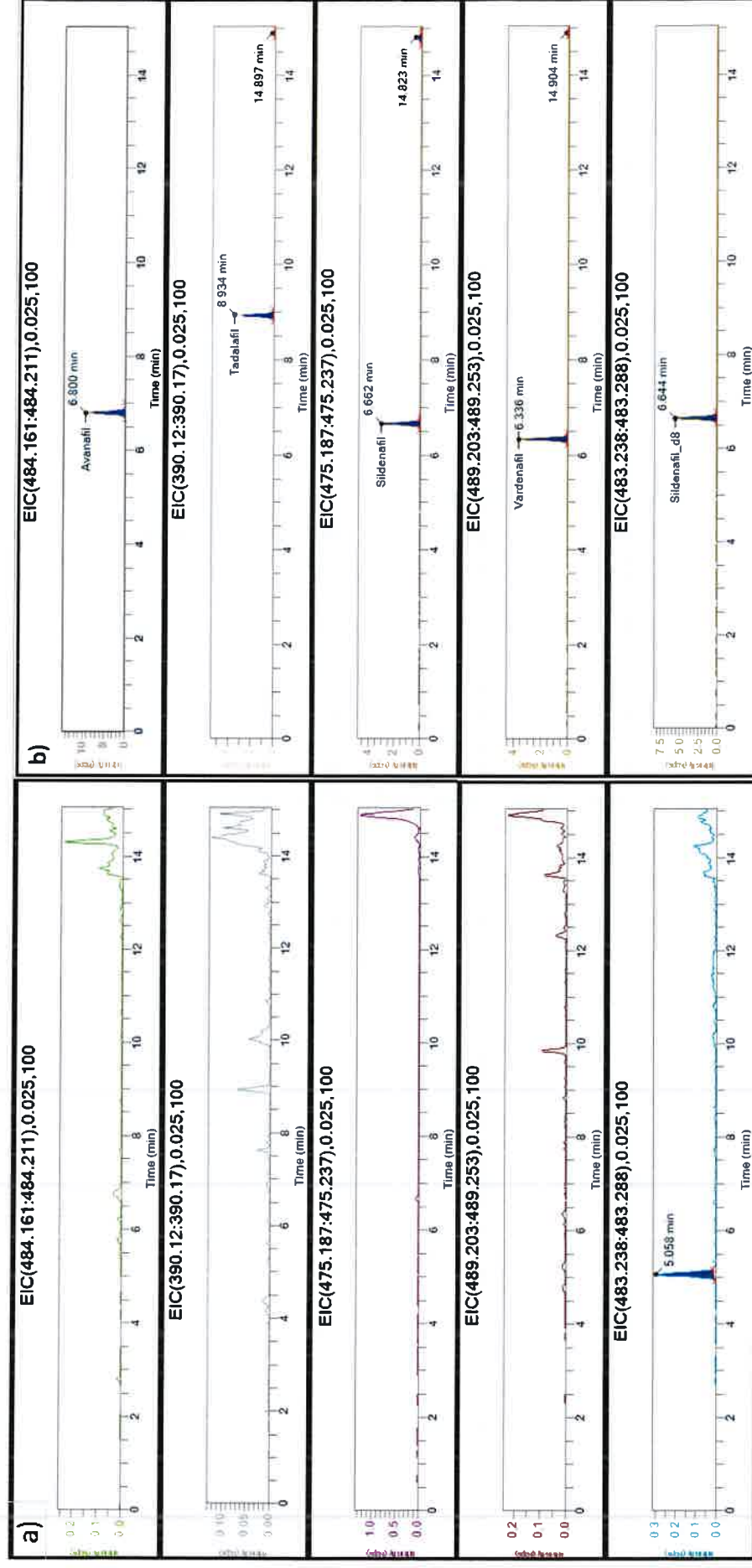
4.3.2. Validacija HPLC–TOF metode i procjena mjerne nesigurnosti

Validacija HPLC–TOF metode za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani obuhvatila je sljedeće parametre: selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu detekcije, granicu kvantifikacije, utjecaj matrice te stabilnost analita u ekstraktu. Pokusi validacije provedeni su u skladu s postupkom detaljno opisanom u poglavlju 3.4., a rezultati su prikazani u Tablicama 25. – 30. Za potrebe validacije korištene su slijepe matrice uzoraka (kapsula, tableta i med), koje su obogaćene ciljanim analitima u odgovarajućim masenim koncentracijama.

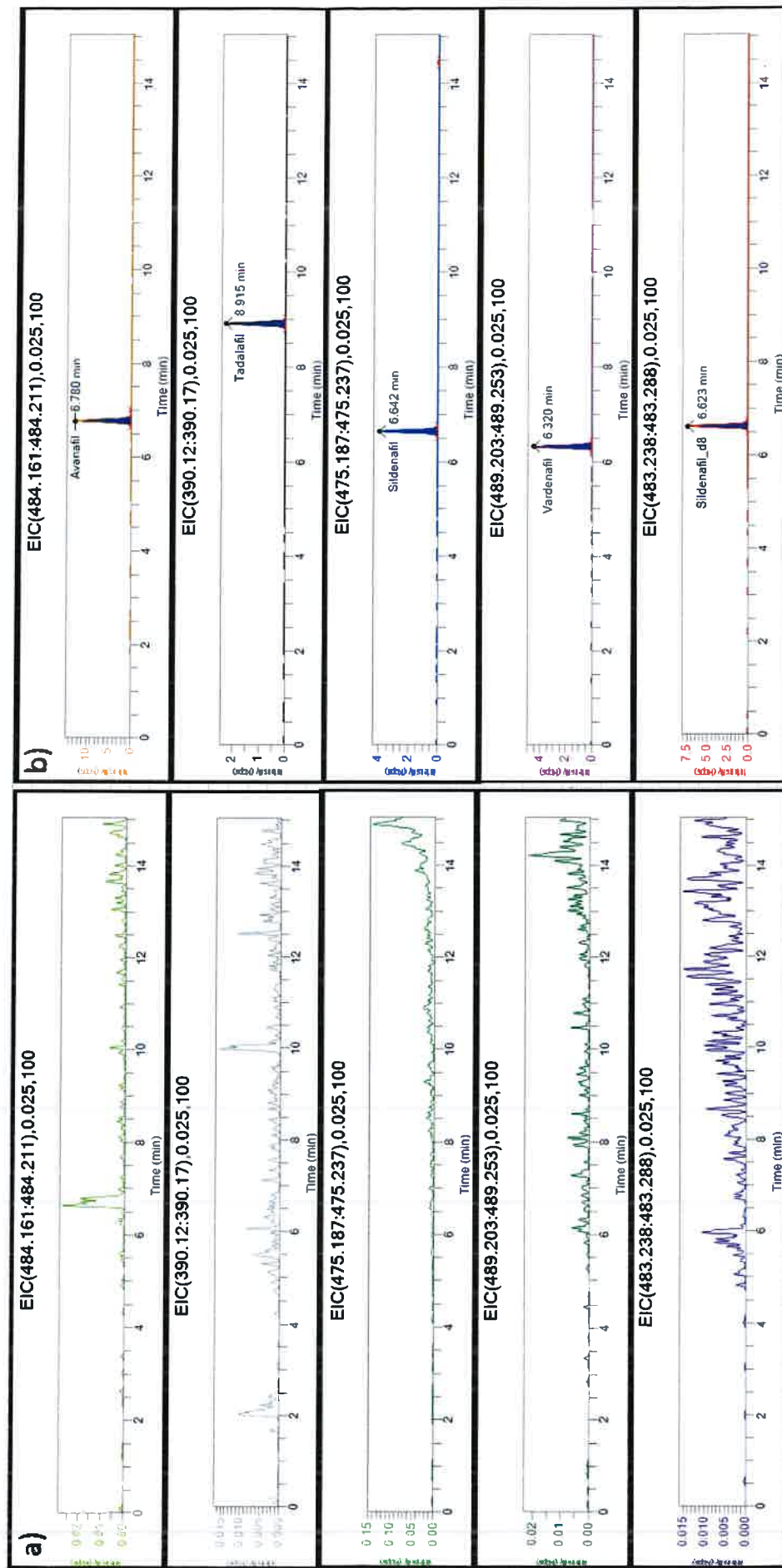
Selektivnost metode potvrđena je usporedbom kromatograma slijepih matrica kapsula (Slika 58.), tableta (Slika 59.) i meda (Slika 60.) s kromatogramima obogaćenih uzoraka odgovarajućih matrica. Odsutnost kromatografskog signala u očekivanom vremenu zadržavanja analiziranih PDE–5I na kromatografskoj koloni potvrđuje selektivnost razvijene metode. Dodatno, analite je moguće razlučiti prema njihovoj specifičnoj masi i fragmentaciji, zahvaljujući kombinaciji visokog razlučivanja i točnosti mjerenja mase TOF analizatora masa.



Slika 58. Kromatogrami iona odabranih vrijednosti m/z za 4 ciljana PDE-5I u a) ekstraktu čistog uzorka kapsule i b) obogaćenog ekstrakta kapsule pri koncentraciji 50 ng mL^{-1} .

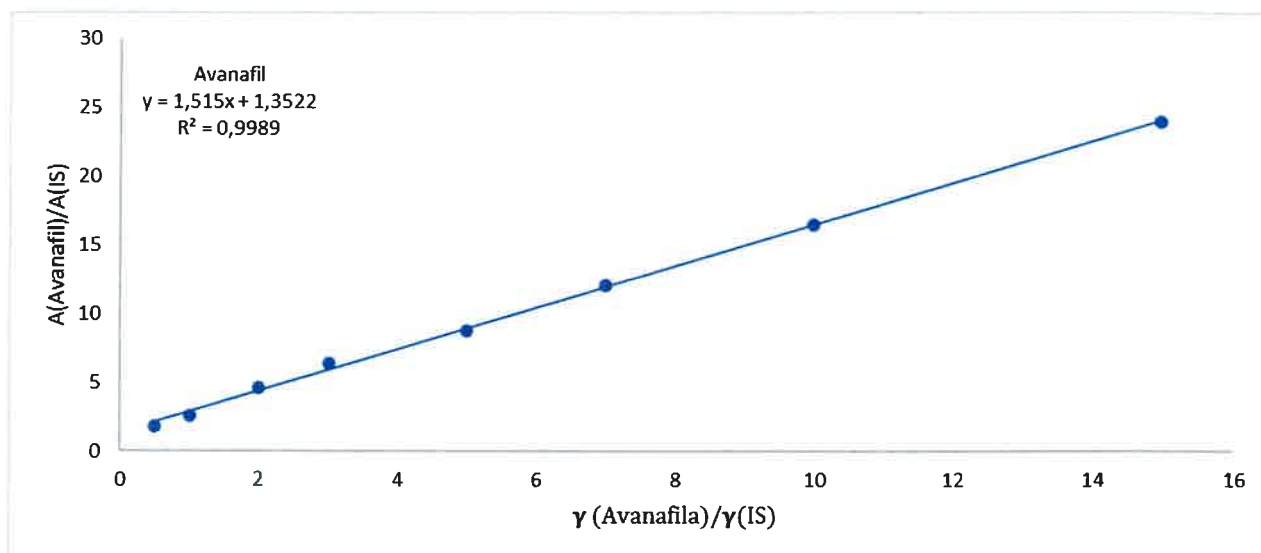


Slika 59. Kromatogrami iona odabranih vrijednosti m/z za 4 ciljana PDE-5I u a) ekstraktu čistog uzorka tablete i b) obogaćenog ekstrakta tablete pri koncentraciji 50 ng mL⁻¹.

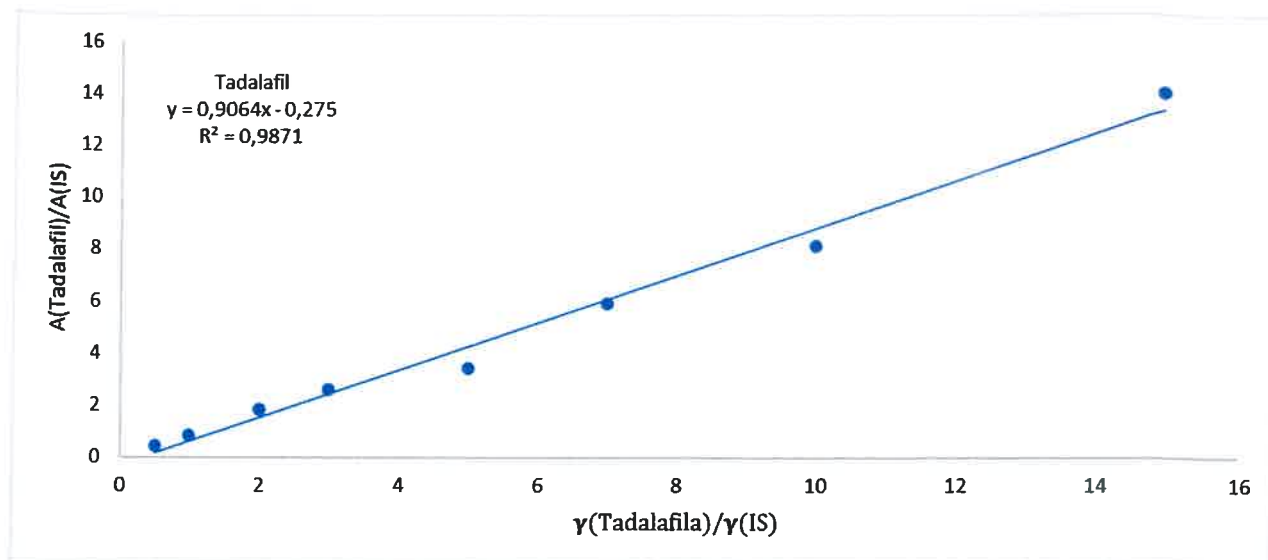


Slika 60. Kromatogrami iona odabranih vrijednosti m/z za 4 ciljane PDE-5I u a) ekstraktu čistog uzorka meda i b) obogaćenog ekstrakta meda pri koncentraciji 50 ng mL⁻¹.

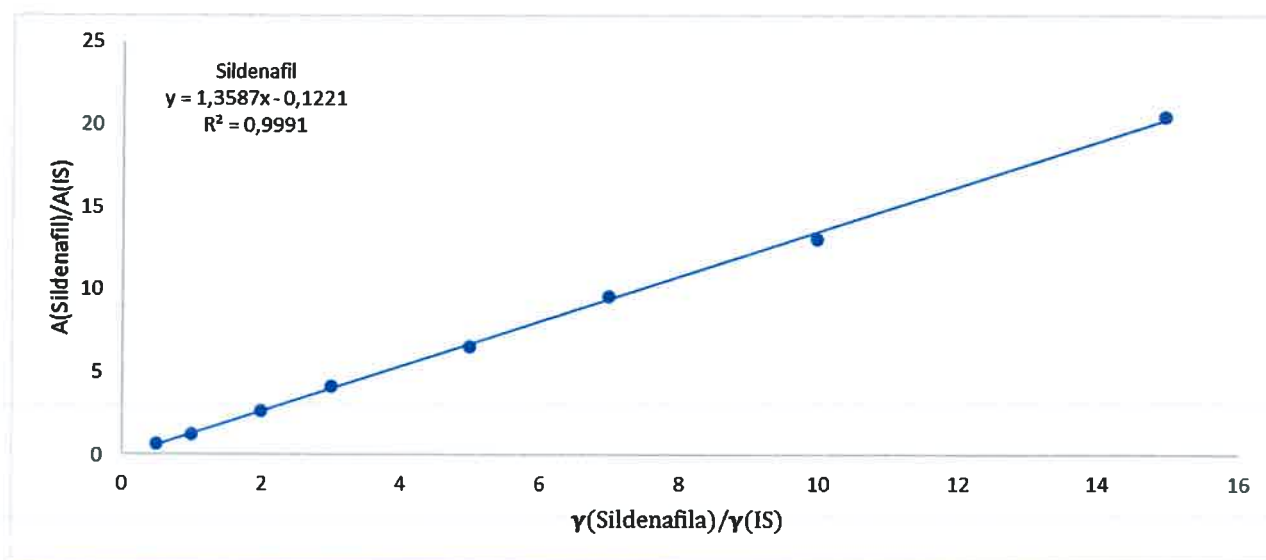
Linearnost metode za ciljane PDE-5I ispitana je injektiranjem osam radnih standarda masenih koncentracija u rasponu od 50 ng mL^{-1} do 1500 ng mL^{-1} . Svaka otopina sadržavala je jednaku masenu koncentraciju IS-a od 100 ng mL^{-1} i injektirana je uzastopno tri puta. Kalibracijske krivulje za sve analite dobivene su linearnom regresijom, pri čemu je omjer površina pikova pojedinog PDE-5I i IS prikazan na y-osi, a omjer inicijalne masene koncentracije PDE-5I i IS na x-osi. Krivulje su prikazane grafički na Slikama 61. – 64. Za svaki analit određen je koeficijent determinacije (R^2), a rezultati su prikazani u Tablici 25. Za sve ciljane analite u ispitivanom rasponu koncentracija koeficijenti determinacije (R^2) bili su $\geq 0,98$, čime je zadovoljen kriterij prihvatljivosti linearnosti i potvrđena linearnost metode.



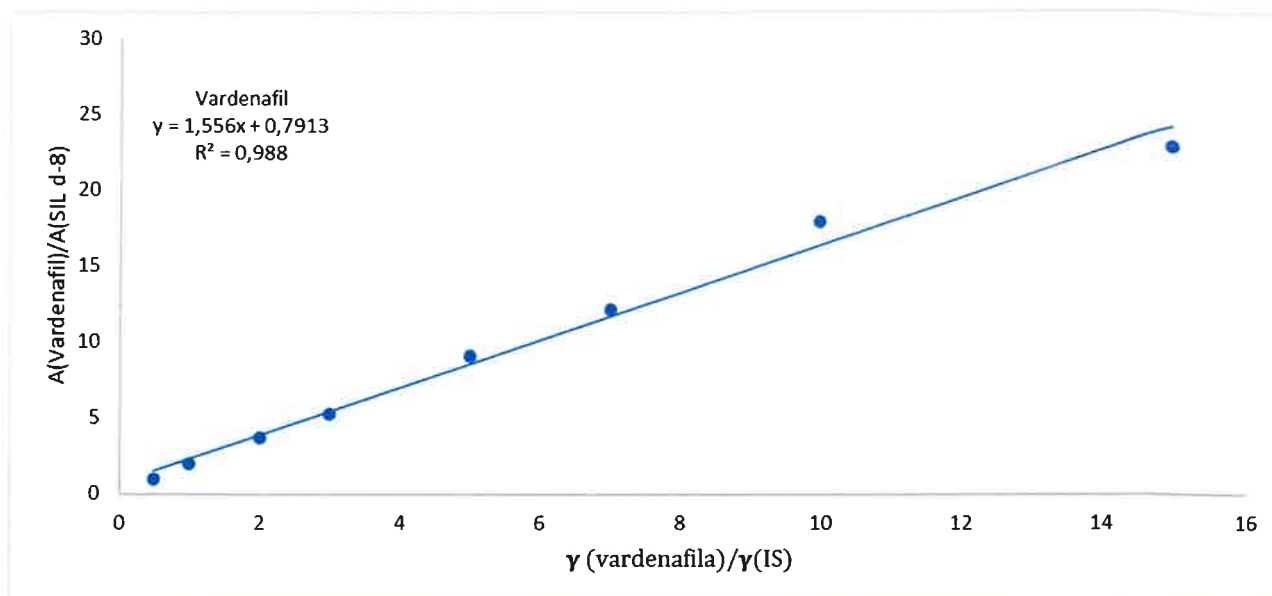
Slika 61. Kalibracijska krivulja avanafila – linearnost u koncentracijskom rasponu od 50 ng mL^{-1} – 1500 ng mL^{-1} .



Slika 62. Kalibracijska krivulja tadalafila – linearnost u koncentracijskom rasponu od (50 – 1500) ng mL^{-1} .



Slika 63. Kalibracijska krivulja sildenafil – linearnost u koncentracijskom rasponu od (50 – 1500) ng mL^{-1} .



Slika 64. Kalibracijska krivulja vardenafila – linearnost u koncentracijskom rasponu od (50 – 1500) ng mL⁻¹.

Granice kvantifikacije ciljano su postavljene kao najniža točka kalibracijske krivulje pri kojima su zadovoljeni kriteriji ponovljivosti (RSD < 20 %) i točnosti (80 % – 120 %). Uz navedene uvjete, granica kvantifikacije za sve ciljane PDE-5I iznosila je 50 ng mL⁻¹. Granice detekcije kretale su se od 4 ng mL⁻¹ do 9 ng mL⁻¹, određene regresijskom analizom na temelju standardne devijacije residuala i nagiba krivulje u području niskih koncentracija (Tablica 25.). GD i GK vrijednosti dobivene ovom metodom više su u usporedbi s UHPLC–QTOF metodom zbog niže osjetljivosti HPLC–TOF uređaja. Razvijena metoda namijenjena je rutinskoj kontroli dodataka prehrani, a količine PDE-5I se ne očekuju na razini tragova, pa stoga postizanje ekstremno niskih granica određivanja nije potrebno.

Tablica 25. Linearnost HPLC–TOF metode za određivanje ciljanih PDE–5I u dodacima prehrani.

Analit	Raspon linearnosti (ng mL ⁻¹)	Jednadžba	R ²	GD (ng mL ⁻¹)	GK (ng mL ⁻¹)
Avanafil	50 – 1500	y=1,515x+1,3522	0,998	9	50
Tadalafil	50 – 1500	y=0,9064x–0,275	0,987	5	50
Sildenafil	50 – 1500	y=1,358x–0,1221	0,999	4	50
Vardenafil	50 – 1500	y=1,556x+0,7913	0,988	5	50

R² – koeficijent determinacije; GD – granica detekcije; GK – granica kvantifikacije

Eksperimenti određivanja točnosti i preciznosti, uključujući ispitivanja unutar istog dana i tijekom sedam dana, provedeni su korištenjem obogaćenih slijepih matrica (kapsule, tablete i med) na četiri razine koncentracije i u šest replika. Svim uzorcima dodan je IS u koncentraciji od 100 ng mL⁻¹. Preciznost metode izražena je RSD–om, dok je točnost prikazana kao analitički povrat uz standardno odstupanje ($\pm$ SD). Rezultati su prikazani u Tablicama 26. – 27. Točnost metode bila je vrlo dobra za sve ispitane matrice i koncentracijske razine. Za kapsule, točnost se kretala od 89,7 % do 110,1 % (unutar istog dana) i između 94,0% i 105,9% (tijekom sedam dana). Za tablete, točnost je bila u rasponu od 86,0 % do 107,0 % (unutar istog dana) te od 87,1 % i 106,9 % (tijekom sedam dana). U matrici meda, točnost je bila između 90,2 % do 115,5 % (unutar istog dana) te između 91,5 % i 106,5 % (tijekom sedam dana). Preciznost metode bila je zadovoljavajuća. RSD ponovljivosti mjerenja unutar istog dana bio je između 1,2 % i 10,8 % za kapsule, 0,4 % do 8,7 % za tablete i 0,3 % do 11,8 % za med. Višednevni RSD iznosio je od 1,7 % do 10,4 % za kapsule, 2,0 % do 11,0 % za tablete i 2,1 % do 13,5 % za med. Osim na obogaćenim slijepim matricama, točnost i preciznost dodatno je ispitana i na komercijalnim uzorcima lijekova za pomoć kod erektilne disfunkcije. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 28. Rezultati ukazuju na vrlo dobru točnost i preciznost HPLC–TOF metode u ponovljivim uvjetima.

Tablica 26. Točnost HPLC–TOF metode određivanja 4 ciljane PDE–5I u različitim matricama i na četiri koncentracijska nivoa.

Analit	Obogaćeno (ng mL ⁻¹)	Točnost ± SD (%)					
		Isti dan (<i>n</i> = 6)			Tijekom 7 dana (<i>n</i> = 6)		
		Kapsule	Tablete	Med	Kapsule	Tablete	Med
Avanafil	50	107,5±1,9	99,0±6,7	110,3±9,9	100,6±8,0	100,3±10,1	102,8±12,2
	75	109,5±5,2	98,7±8,4	111,0±5,2	105,9±5,9	106,9±4,9	102,7±10,2
	750	110,1±5,3	103,1±5,8	109,8±5,7	104,8±6,8	101,4±4,6	104,7±7,0
	1250	104,1±11,2	93,2±5,6	102,5±4,8	104,7±8,0	97,1±7,9	100,3±4,1
Tadalafil	50	95,5±2,0	86,0±4,0	93,3±11,0	97,7±8,8	87,1±3,2	93,8±10,5
	75	102,2±6,8	93,5±6,4	107,1±4,9	105,2±7,9	94,1±7,8	102,8±7,9
	750	91,0±3,4	99,2±4,0	95,4±3,9	96,1±8,7	100,4±4,6	95,2±6,2
	1250	94,1±3,5	98,2±6,6	92,6±5,3	95,2±3,9	100,4±4,9	92,9±7,8
Sildenafil	50	100,3±1,3	97,4±1,9	94,0±2,7	101,4±5,1	98,5±6,2	96,4±4,0
	75	100,9±3,8	100,7±5,3	99,3±0,3	101,8±7,0	101,5±5,4	96,4±6,4
	750	97,6±3,6	93,4±2,4	94,4±2,5	94,0±5,7	90,2±3,9	91,5±4,8
	1250	93,1±2,1	93,0±2,6	90,2±4,5	94,7±3,2	95,3±3,2	94,5±8,4
Vardenafil	50	99,0±8,0	102,3±3,4	115,5±2,5	103,0±8,8	101,2±5,2	103,0±8,7
	75	94,2±4,5	107,0±0,4	108,9±1,6	96,3±4,7	102,9±4,8	106,5±3,3
	750	89,7±3,1	89,8±2,6	95,5±8,3	94,3±6,8	90,9±3,0	101,7±8,1
	1250	91,0±1,1	92,6±8,0	97,4±8,5	93,9±3,5	96,1±8,6	98,9±5,7

Tablica 27. Preciznost HPLC–TOF metode određivanja 4 ciljana PDE–5I u različitim matricama i na četiri koncentracijska nivoa.

Analit	Obogaćeno (ng mL ⁻¹)	Preciznost (RSD, %)					
		Isti dan (<i>n</i> = 6)			Tijekom 7 dana (<i>n</i> = 6)		
		Kapsule	Tablete	Med	Kapsule	Tablete	Med
Avanafil	50	1,8	6,7	9,0	3,0	11,0	9,8
	75	4,7	8,5	4,7	4,7	4,7	5,2
	750	4,8	5,6	5,2	3,7	4,6	4,6
	1250	10,8	6,0	4,6	8,6	7,7	3,6
Tadalafil	50	2,1	4,6	11,8	10,4	3,5	13,5
	75	6,7	6,8	4,5	7,6	9,2	7,1
	750	3,7	4,1	4,1	7,4	4,9	7,2
	1250	3,7	6,4	5,7	4,4	4,9	9,4
Sildenafil	50	1,3	2,0	2,8	4,9	6,9	2,7
	75	3,8	5,3	0,3	7,6	5,9	6,3
	750	3,7	2,6	2,7	5,1	2,0	4,5
	1250	2,3	2,8	6,0	3,2	2,3	9,5
Vardenafil	50	8,1	6,7	3,5	8,3	4,9	8,9
	75	4,8	0,4	1,5	4,7	3,8	2,1
	750	3,5	3,8	8,7	6,1	3,3	9,5
	1250	1,2	8,7	8,7	1,7	8,9	6,2

Tablica 28. Točnost i preciznost komercijalnih uzoraka lijekova za liječenje ED ($n = 6$).

Naziv lijeka (aktivna tvar)	Deklarirana vrijednost (mg)	Izmjerena vrijednost $\pm$ SD (mg)	Analitički povrat $\pm$ SD (%)	RSD (%)
Cialis (Tadalafil)	20	22 ± 1	$111,7 \pm 6,1$	6,1
Levitra (Vardenafil)	20	20 ± 1	$101,8 \pm 3,3$	3,3
Kamagra (Sildenafil)	100	97 ± 3	$96,5 \pm 2,8$	2,9

Utjecaj matrice uzorka procijenjen je pomoću postekstrakcijski obogaćenih slijepih matrica na četiri razine koncentracije. Procjena se temelji na usporedbi nagiba kalibracijskih krivulja dobivenih iz standardnih otopina smjese analita pripremljenih u čistom otapalu i standardnih otopina pripremljenih u matrici uzorka. U analizi je korišten IS, kako je opisano u poglavlju 3.4. Matrica uzorka razrijeđena je deset puta, s obzirom da se svaki realni uzorak razređuje minimalno deset puta. Utjecaj matrice uzorka izračunat je prema izrazu (4) i izražen u postotcima. Rezultati utjecaja različitih matrica za ciljane analite prikazani su u Tablici 29.

Tablica 29. Rezultati utjecaja matrice za analizu PDE-5I dobivene HPLC-TOF metodom.

Analit	Utjecaj matrice (%)		
	Kapsule	Tablete	Med
Avanafil	1,3	4,6	0,7
Tadalafil	-8,9	-8,4	-9,1
Sildenafil	-2,3	2,5	-1,9
Vardenafil	-8,3	-8,3	6,3

Iz rezultata je vidljivo da je utjecaj matrice za sve analite i matrice bio manji od 10 %, što ukazuje na neznatan utjecaj matrice te potvrđuje da uporaba IS i razrijeđivanje matrice učinkovito smanjuje njezin učinak na kvantitativno određivanje ciljanih PDE-5I. Na temelju dobivenih rezultata odlučeno je da se za kvantifikaciju koriste radni standardi pipremljeni u otapalu (acetonitril:voda = 50:50, v/v).

Stabilnost analita ispitana je za tri matrice (tableta, kapsula i med) na način da su uzorci obogaćeni poznatim koncentracijama odabranih PDE-5I na četiri razine koncentracije (GK,

1,5×GK, 15×GK i 25×GK). Nakon pripreme, uzorci su pohranjeni u hladnjaku pri 4 °C tijekom 7 dana, nakon čega su analizirani kao i uzorci neposredno nakon pripreme (0. dan). Vremenski interval od 7 dana odabran je u skladu s očekivanim trajanjem skladištenja uzoraka između pripreme i analize u rutinskoj praksi. Stabilnost je izražena kao postotak, odnosno omjer konačno izmjerene koncentracije nakon 7 dana skladištenja u odnosu na početnu koncentraciju određenu na dan pripreme (0. dan). Rezultati su prikazani u Tablici 30.

Tablica 30. Stabilnost PDE-5I u različitim matricama obogaćenim na četiri razine koncentracije tijekom skladištenja na 4 °C tijekom 7 dana.

Analit	Obogaćeno (ng mL ⁻¹)	Stabilnost (%) nakon 7 dana		
		Tableta	Kapsula	Med
Avanafil	50	102,6	87,1	86,4
	75	99,8	93,5	85,1
	750	96,6	90,5	90,9
	1250	106,9	101,2	95,5
Tadalafil	50	103,1	104,6	101,3
	75	101,4	105,8	92,1
	750	102,4	111,2	99,6
	1250	104,4	102,2	100,6
Sildenafil	50	102,4	103,9	106,4
	75	101,5	101,8	99,6
	750	93,1	92,7	93,9
	1250	104,8	103,3	91,9
Vardenafil	50	97,2	108,0	104,8
	75	95,2	104,5	95,6
	750	102,5	105,1	101,8
	1250	107,6	106,4	103,2

Svi ispitani analiti pokazali su zadovoljavajuću stabilnost nakon 7 dana skladištenja pri 4 °C u sve tri ispitivane matrice. Na svim razinama obogaćenja, stabilnost svih analita bila je unutar ±15%. Slijedom provedene validacije može se potvrditi da je primijenjena HPLC–TOF

analitička metoda prikladna za određivanje PDE–5I u dodacima prehrani u okviru rutinske analize.

Procjena mjerne nesigurnosti HPLC–TOF metode

Analizom pojedinih faza mjernog procesa prepoznati su sljedeći izvori mjerne nesigurnosti: nesigurnosti tipa A odnose se na podatke dobivene statističkom analizom rezultata validacijskih ispitivanja, uključujući nesigurnost kalibracijskog pravca, nesigurnost preciznosti te nesigurnost točnosti dok izvori nesigurnosti tipa B preuzeti su iz umjernica i certifikata, kao što su čistoća analitičkih standarda, nesigurnost vage, nesigurnost volumena pipeta i odmjernog posuđa. Identificirani izvori nesigurnosti kvantificirani su prema formulama (9)–(14), dok su izračunate relativne standardne nesigurnosti za pojedine spojeve i matrice prikazane u Tablicama D8–D11 (poglavlje 8. Dodatak). U istim tablicama navedene su ukupna mjerna nesigurnost (u), izračunata prema formuli (15) iz svih relevantnih sastavnica, i proširena mjerna nesigurnost (U), izračunata formulom (16). Postignute vrijednosti proširenih mjernih nesigurnosti za svaki analit i matricu navedene su u Tablici 31.

Analizom je utvrđeno da sastavnice nesigurnosti A vrste, dobivene validacijom metode, doprinose u najznačajnijoj mjeri ukupnoj mjernoj nesigurnosti, pri čemu je najveći utjecaj imala nesigurnost kalibracijskog pravca. Proširene mjerne nesigurnosti za PDE–5I analizirane u svim matricama iznosile su između 17 % i 44 %. Najviše vrijednosti proširene mjerne nesigurnosti, u svim ispitivanim matricama, dobivene su za tadalafil.

Tablica 31. Proširena mjerna nesigurnost U (%) za ciljane PDE–5I po vrstama matrica (HPLC–TOF metoda).

Analit	U ($k = 2$), %		
	Kapsula	Tablete	Med
Avanafil	32	34	32
Tadalafil	41	41	44
Sildenafil	18	17	18
Vardenafil	29	30	31

4.4. Analiza uzoraka

Razvijene i validirane metode HPLC–TOF i UHPLC–QTOF, opisane u ovom radu, primijenjene su za analizu 49 realnih uzoraka dodataka prehrani prikupljenih na hrvatskom tržištu (grad Zagreb). Uzorci su dostavljeni Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar od strane sanitarne inspekcije i privatnih distributera (Tablica 6.). Najčešće zemlje podrijetla uzoraka bile su Kina, Indonezija i Velika Britanija. Rezultati analize prikazani su u Tablici 32., pri čemu su navedeni samo pozitivni rezultati dobiveni UHPLC–QTOF i HPLC–TOF metodom.

Tablica 32. Identifikacija ciljanih PDE–5I i detekcija sumnjivih analoga PDE–5I u patvorenim dodacima prehrani.

Uzorak	UHPLC–QTOF		HPLC–TOF	
	Ciljani PDE–5I (mg po dozi ±PMN)	Sumnjivi analog PDE–5I	Ciljani PDE–5I (mg po dozi ±PMN)	Sumnjivi analog PDE–5I
1.	Sildenafil (0,007±0,001)	Tiosildenafil Hidroksitiohomosildenafil	Sildenafil (0,009±0,002)	Tiosildenafil Hidroksitiohomosildenafil
2.	Tadalafil (49,4±12,8)		Tadalafil (44,5±18,7)	
3.	<GK	Hidroksitiohomosildenafil	<GK	–
4.	Tadalafil (63,5±16,5)		Tadalafil (62,5±26,3)	
7.	Sildenafil (7,1±0,1)		Sildenafil (6,6±1,1)	
8.	Sildenafil (0,04±0,01)		Sildenafil (0,06±0,01)	
9.	Tadalafil (14,1±3,7)	Kloropretadalafil	Tadalafil (12,3±5,0)	Kloropretadalafil
10.	Sildenafil (0,009±0,001)		Sildenafil (0,009±0,002)	

	UHPLC–QTOF		HPLC–TOF	
	Ciljani Uzorak PDE–5I (mg po dozi ±PMN)	Sumnjivi analog PDE–5I	Ciljani PDE–5I (mg po dozi ±PMN)	Sumnjivi analog PDE–5I
14.	Tadalafil (0,12±0,03)		Tadalafil (0,13±0,05)	
15.	Tadalafil (0,02±0,01)		Tadalafil (0,02±0,01)	
18.	<GK	Depiperazino–tiosildenafil Hidroksitiohomosildenafil	<GK	– Hidroksitiohomosildenafil
19.	Sildenafil (0,001±0,0001)	Hidroksitiohomosildenafil	Sildenafil (0,001)	Hidroksitiohomosildenafil
23.	Sildenafil (0,001±0,0001)		Sildenafil (0,001±0,0002)	
24.	Tadalafil (11,6±3,0)	Kloropretadalafil	Tadalafil (9,5±4,0)	Kloropretadalafil
25.	Tadalafil (13,1±3,4)	Kloropretadalafil	Tadalafil (10,8±4,5)	Kloropretadalafil
28.	Sildenafil (0,004±0,0006)		Sildenafil (0,004±0,0007)	
	Tadalafil (0,004±0,0001)		Tadalafil (0,004±0,002)	
29.	Sildenafil (4,3±0,6)	Tiosildenafil Hidroksitiohomosildenafil	Sildenafil (3,5±0,6)	– –
	Tadalafil (9,3±2,4)	Sulfoaildenafil Propoksifenil aildenafil	Tadalafil (8,2±3,4)	– Propoksifenil aildenafil
30.	Sildenafil (3,1±0,4)		Sildenafil (2,6±0,4)	
	Tadalafil (9,3±2,4)		Tadalafil (10,4±4,4)	

UHPLC-QTOF			HPLC-TOF		
Uzorak	Ciljani	Sumnjivi analog PDE-5I	Ciljani	Sumnjivi analog PDE-5I	
	PDE-5I (mg po dozi ±PMN)		PDE-5I (mg po dozi ±PMN)		
31.	Sildenafil (0,001±0,0001)		Sildenafil (0,002±0,0003)		
32.	Sildenafil (0,001±0,0001)		Sildenafil (0,001±0,0002)		
33.	Sildenafil (0,002±0,0003)		Sildenafil (0,002±0,0003)		
34.	Sildenafil (3,5±0,5) Tadalafil (14,4±3,7)		Sildenafil (4,1±0,7) Tadalafil (15,4±6,5)		
35.	<GK	2-Hidroksipropilnortadalafil	<GK	2-Hidroksipropilnortadala	
37.	Sildenafil (3,8±0,5) Tadalafil (26,7±6,9)		Sildenafil (3,2±0,5) Tadalafil (25,3±4,3)		
38.	Sildenafil (11,0±1,5)		Sildenafil (10,6±1,8)		
39.	<GK	Johimbin	<GK	Johimbin	
41.	Sildenafil (0,001±0,0001) Tadalafil (0,003±0,0008)		Sildenafil (0,002±0,0003) Tadalafil (0,003±0,001)		
43.	Sildenafil (1,7±0,2) Tadalafil (0,06±0,02)		Sildenafil (1,7±0,3) Tadalafil (0,06±0,03)		

	UHPLC–QTOF		HPLC–TOF	
	Ciljani Uzorak PDE–5I (mg po dozi ±PMN)	Sumnjivi analog PDE–5I	Ciljani PDE–5I (mg po dozi ±PMN)	Sumnjivi analog PDE–5I
45.	Sildenafil (1,8±0,3)		Sildenafil (2,2±0,4)	
46.	Sildenafil (4,5±0,6)		Sildenafil (4,9±0,8)	
47.	Sildenafil (23,9±3,3)		Sildenafil (24,3±4,1)	
49.	Sildenafil (0,01±0,001)		Sildenafil (0,02±0,003)	

GK – granica kvantifikacije

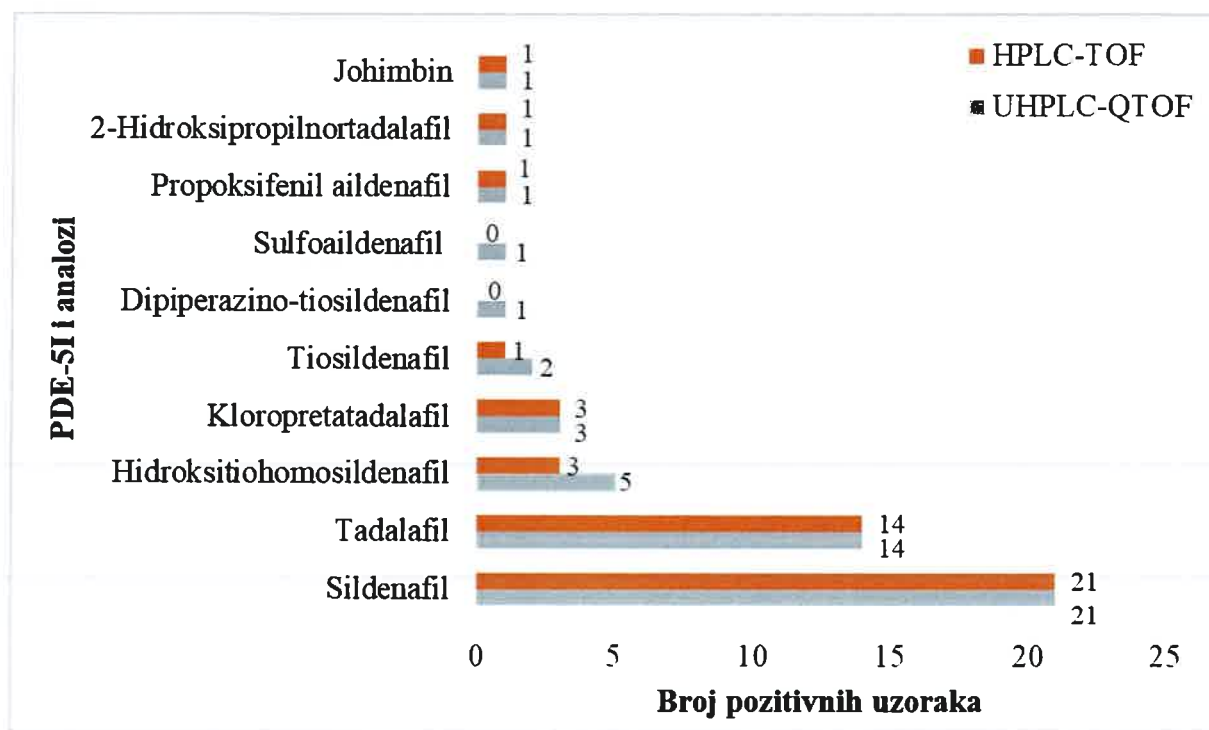
Prisutnost ilegalnih PDE–5I potvrđena je u 65 % testiranih uzoraka primjenom UHPLC–QTOF metode (Tablica 33). Nadalje, sildenafil i tadalafil identificirani su kao glavni ilegalni spojevi, dok vardenafil i avanafil nisu pronađeni ni u jednom uzorku. Sildenafil je potvrđen u 21 uzorku (43%), od čega 12 puta samostalno i 9 puta u kombinaciji s drugim PDE–5I, u koncentracijama od 0,001 mg do 23,9 mg po dozi. Tadalafil je potvrđen u 14 uzoraka (29 %), od čega je u 4 uzorka identificiran kao jedini ilegalni spoj, dok je u 10 uzoraka pronađen u kombinaciji s drugim PDE–5I. Koncentracije tadalafila kretale su se od 0,003 mg do 63,5 mg po dozi pri čemu je u 9 uzoraka utvrđena količina veća od 5 mg, što premašuje terapijsku dozu, a u 3 uzorka koncentracija je prelazila 20 mg, što značajno nadmašuje maksimalno preporučenu dozu. Osim sildenafil i tadalafila, identificirano je dodatnih 7 analoga PDE–5I u 10 uzoraka: hidroksitiohomosildenafil (5 uzoraka), kloropretadalafil (3 uzorka), tiosildenafil (2 uzorka), a depiperazino–tiosildenafil (1 uzorak), propoksifenil aildenafil (1 uzorak), sulfoildenafil (1 uzorak), 2–hidroksipropilnortadalafil (1 uzorak). Također, u jednom uzorku identificiran je alkaloid johimbin. Ovi dodatni ilegalni spojevi bili su prisutni samostalno ili u kombinaciji s do četiri ilegalna spoja u jednom uzorku (Slika 67). Iako analozi PDE–5I nisu kvantificirani zbog nedostatka referentnih standarda, određeni analozi kao što su hidroksitiohomosildenafil (uzorak 18), 2–hidroksipropilnortadalafil (uzorak 35) i alkaloid johimbin (uzorak 39)

detektirani su u višim koncentracijama bez prisutnosti PDE-5I. S druge strane, većina ostalih analoga pronađena je u vrlo niskim koncentracijama, što bi moglo biti posljedica razgradnje ili transformacije nekih od PDE-5I^{117,122} prisutnih u većim količinama.

Prisutnost ilegalnih PDE-5I potvrđena je u 63 % testiranih uzoraka primjenom HPLC-TOF metode (Tablica 33). Rezultati dobiveni ovom metodom u velikoj mjeri su u skladu s rezultatima UHPLC-QTOF metode, uz određena odstupanja u detekciji pojedinih analoga (uzorci 3, 18 i 29). Konkretno, u tim uzorcima nisu detektirani sljedeći analozi: tiosildenafil (uzorak 29), hidroksitiohomosildenafil (uzorci 3 i 29), depiperazino-tiosildenafil (uzorak 18) i sulfosildenafil (uzorak 29). Ovo odstupanje može se pripisati nižoj osjetljivosti HPLC-TOF metode u usporedbi s UHPLC-QTOF metodom. Nadalje, sildenafil i tadalafil identificirani su kao glavni ilegalni spojevi, dok vardenafil i avanafil nisu pronađeni ni u jednom uzorku. Sildenafil je potvrđen u 21 uzorku (43 %), u koncentracijama od 0,001 mg do 24,3 mg po dozi. Tadalafil je potvrđen u 14 uzoraka (29 %), u koncentraciji od 0,003 mg do 62,5 mg po dozi. Osim sildenafil i tadalafil, identificirano je dodatnih 5 analoga PDE-5I u 8 uzoraka: tiosildenafil (uzorak 1), hidroksitiohomosildenafil (uzorak 1, 18 i 19), kloropretadalafil (uzorak 9, 24, 25), propoksifenil sildenafil (uzorak 29), 2-hidroksipropilnortadalafil (uzorak 35). Također, u jednom uzorku identificiran je alkaloid johimbin (uzorak 39). Na Slici 65. prikazani su PDE-5I i analozi detektirani u pozitivnim uzorcima dobivenim UHPLC-QTOF i HPLC-TOF metodom. Rezultati pokazuju da je sildenafil najčešće detektiran ilegalan spoj u uzorcima, a potom slijedi tadalafil. Isto tako, analozi sildenafil su češće prisutni u usporedbi s ostalim analozima PDE-5I. Ovi trendovi mogu se pripisati lako dostupnim i jeftinim sirovinama za sintezu analoga sildenafil¹⁶⁸.

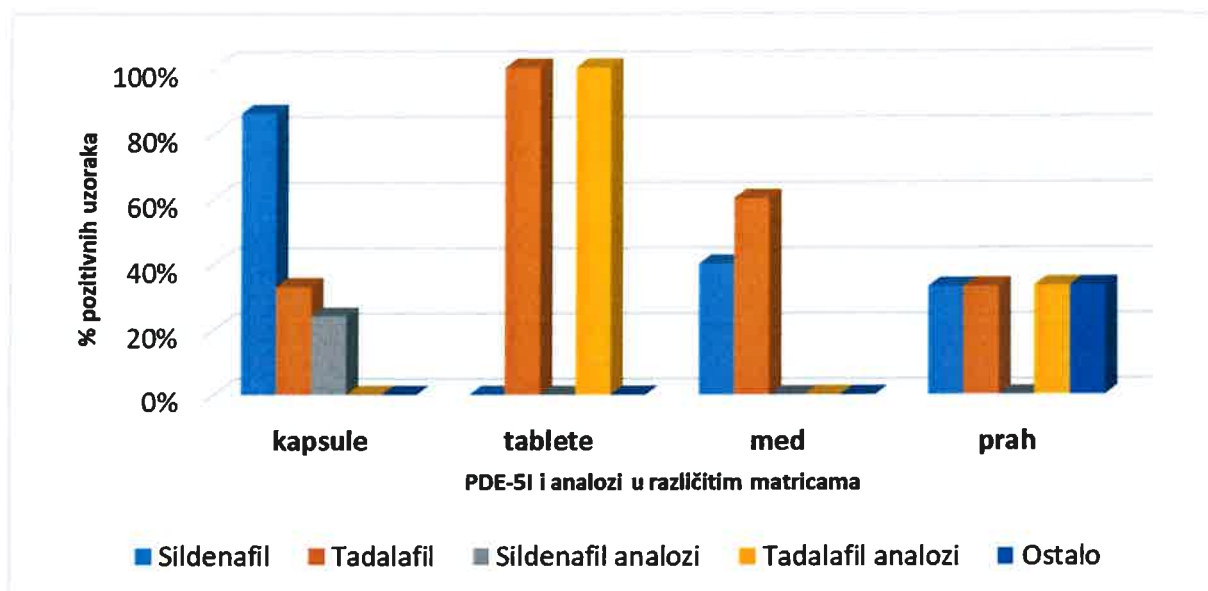
Tablica 33. Rezultati ispitivanja PDE-5I i analoga u dodacima prehrani namjenjenih za poboljšanje ED.

Uređaj:	UHPLC-QTOF			HPLC-TOF	
Dozirni oblik	Broj analiziranih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	% pozitivnih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	% pozitivnih uzoraka
Kapsule	33	20	61	19	58
Tablete	7	4	57	4	57
Med	5	5	100	5	100
Prahovi	3	3	100	3	100
Tekućine	1	0	0	0	0
UKUPNO	49	32	65	31	63



Slika 65. PDE-5I i analozi detektirani u pozitivnim uzrocima UHPLC-QTOF i HPLC-TOF metodom.

U 49 analizirana uzorka, kapsule, tablete i med su najčešće ispitivane matrice u sklopu ovog istraživanja dok su prahovi i tekućine bile prisutne u manjem broju. Distribucija PDE-5I i analoga u pozitivnim uzorcima i različitim matricama prikazana je na Slici 66.



Slika 66. Distribucija PDE-5I i analoga u pozitivnim uzorcima i različitim matricama.

Rezultati patvorenja dodataka prehrani PDE-5I i njihovim analogima iz ovog istraživanja uspoređeni su s onima iz objavljene literature te se uglavnom dobro slažu s rezultatima sličnih istraživanja u drugim zemljama^{81,83,85,106,169–172}. Studija nizozemskih istraživača¹⁷¹ pokazala je da je 32 % uzoraka sadržavalo PDE-5I, poput sildenafil (62,6 mg po dozi) te osam različitih analoga (hidroksihomosildenafil, tiosildenafil, aildenafil, tioaildenafil, acetildenafil, noracetildenafil, aminotadalafil i piperidino–vardeafil) u koncentracijama od 0,2 mg do 87 mg po dozi. S druge strane, u Francuskoj¹⁰⁶ su PDE-5I pronađeni u 61 % od 150 testiranih uzoraka (27 % PDE-5I poput sildenafil, tadalafil i vardenafil, dok su 34 % činili njihovi analozi), pri čemu su koncentracije PDE-5I u 25 % uzoraka bile više od maksimalnih preporučenih doza. U Maleziji su rezultati pokazali da je 36 % uzoraka bilo patvoreno sildenafilom, tadalafilom i s četrnaest njihovih analoga¹⁷². Studija čeških znanstvenika⁸³ otkrila je da je 16 % uzoraka sadržavalo registrirane i neregistrirane PDE-5I, pri čemu su glavni ilegalni spojevi bili sildenafil i tadalafil, a izmjerene koncentracije kretale su se do 64,4 mg po dozi za zbroj sildenafil i njegovih analoga te do 106 mg po dozi za zbroj tadalafil i njegovih analoga. Nedavna studija iz Vijetnama⁸⁵ pokazala je da je 22 % dodataka prehrani namijenjenih za poboljšanje seksualne učinkovitosti bilo patvoreno sildenafilom i tadalafilom kao glavnim

aktivnim spojevima. Osim toga, otkriveno je i 12 različitih analoga sildenafil (71 %), tadalafil (21 %) i vardenafil (7 %). Lee i suradnici¹⁷⁰ utvrdili su da je 47,5 % dodataka prehrani ($0,01 \text{ mg g}^{-1}$ do 370 mg g^{-1}) i 27,5 % prehrambenih proizvoda ($0,007 \text{ mg g}^{-1}$ do $239,0 \text{ mg g}^{-1}$) ilegalno patvoreno PDE-5I i njihovim analogima.

4.5. Usporedba rezultata analize PDE-5I metodom UHPLC-QTOF i HPLC-TOF

U svrhu procjene usporedivosti dvaju korištenih instrumenata, provedena je statistička analiza kvantitativnih rezultata sadržaja sildenafil i tadalafil pomoću dvostranog Studentovog *t*-testa za zavisne uzorke (engl. *Paired Two-Sample t-Test for Means*) na razini značajnosti $P = 0,05$. Izračunate *t*-vrijednosti za sildenafil (0,6458) i tadalafil (2,0107) bile su niže od kritičnih *t*-vrijednosti (2,1009 za sildenafil i 2,1448 za tadalafil), što dokazuje da ne postoji statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina rezultata dobivenih na HPLC-TOF i UHPLC-QTOF instrumentima.

Kvantitativni podaci za ciljane PDE-5I bile su unutar granica metode ($\pm \text{PMN}$), bez značajnih odstupanja između korištenih instrumenata. Kvalitativna analiza potvrdila je da su obje metode uspješno identificirale prisutnost istih sumnjivih analoga u većini ispitanih uzoraka. Međutim, UHPLC-QTOF se pokazao osjetljivijim, osobito u detekciji PDE-5I analoga prisutnih u vrlo niskim koncentracijama gdje primjenom HPLC-TOF pojedini analozi nisu bili dektirani.

Vezani sustavi tekućinske kromatografije i spektrometrije mase visokog razlučivanja, predstavljaju metode izbora u analizi ciljanih i sumnjivih spojeva zbog svojih brojnih prednosti poput osjetljivosti, selektivnosti i točnosti mjerenja mase. Hibridni QTOF sustav nadmašuje klasični TOF zahvaljujući kvadrupolnom filteru i mogućnosti provođenja MS/MS fragmentacije unaprijed odabranih iona, kao i većoj točnosti mjerenja mase i snage razlučivanja. Iako TOF može povećati selektivnost praćenjem kromatograma iona odabranih vrijednosti *m/z* prekursor i fragmentnih iona, njegova učinkovitost ograničena je nedostatkom filtracije iona i činjenice da do fragmentacije dolazi u izvoru, što rezultira neselektivnom fragmentacijom svih iona, višim pozadinskim šumom i potencijalnim interferencijama uzrokovanim komponentama matrice. Preciznost određivanja mase, ključna za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju nepoznatih spojeva, kod TOF-a je iznosila $< 5 \text{ ppm}$ za prekursor ione dok je za fragmentne ione varirala i do 20 ppm . Suprotno tome, QTOF omogućava veću preciznost, često

unutar ± 5 ppm i za prekursor i za fragmentne ione, zahvaljujući MS/MS mogućnostima. Ova razina preciznosti omogućuje razlučivanje izobarnih spojeva te osigurava veću pouzdanost u identifikaciju nepoznatih analita. Nadalje, QTOF postiže veći omjer signal–šum i niže granice kvantifikacije, čineći ga prikladnijim za detekciju tragova ciljanih i sumnjivih analita u složenim matricama.

Performanse UHPLC–QTOF i HPLC–TOF metoda razvijenih u ovom istraživanju uspoređene su s literaturnim podacima (Tablica 34.), s naglaskom na trajanje analize, protok, granice detekcije i kvantifikacije, točnost i preciznost. Obje metode traju 15 minuta, što je prihvatljivo za rutinske analize, uz protok od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, niži od većine metoda iz literature, čime se smanjuje potrošnja otapala i povećava ekološka i ekonomska učinkovitost. Kada se uspoređuju GD i GK, UHPLC–QTOF postiže rezultate unutar raspona literature, dok HPLC–TOF pokazuje nižu osjetljivost. Unatoč tome, obje metode su primjenjive za rutinsku kontrolu dodataka prehrani s očekivanim višim koncentracijama PDE–5I (terapijske doze). Međutim, HPLC–TOF može biti ograničen u detekciji tragova ili analita prisutnih u vrlo niskim koncentracijama. Što se tiče točnosti, obje metode pokazuju usporedive rezultate s literaturom, dok je preciznost UHPLC–QTOF među boljima, za razliku od HPLC–TOF, koji pokazuje veću varijabilnost u rezultatima.

Konačno, HPLC–TOF, unatoč slabijoj selektivnosti, osjetljivosti i ponovljivosti, smatra se brzom, ekonomičnom i prikladnom metodom za kvantifikaciju ciljanih PDE–5I i probir analoga PDE–5I u dodacima prehrani. S druge strane, UHPLC–QTOF pruža veću analitičku fleksibilnost i pouzdanost zahvaljujući MS/MS sposobnosti, visokoj selektivnosti i osjetljivosti, omogućujući detekciju niskih koncentracija ilegalnih spojeva u složenim matricama te dublju kvalitativnu analizu i identifikaciju bez referentnih standarda no uz veću cijenu i tehničku složenost.

Tablica 34. Usporedba razvijenih metoda sa sličnim metodama opisanim u literaturi.

Metoda ^{ref}	Trajanje analize (min)	Protok (mL min ⁻¹)	GD (ng mL ⁻¹)	GK (ng mL ⁻¹)	Analitički povrat (%)	RSD (%)
UHPLC-QTOF – metoda iz ovog rada	15	0,2	0,2–2,2	2–20	88,5–115,9	0,4–5,2
HPLC-TOF – metoda iz ovog rada	15	0,2	4–9	50	86,0–115,5	0,4–13,5
UHPLC-QTOF ⁹¹	15	–	0,07–14,63	–	86,2–116,6	0,27–12,6
HPLC-QTOF ¹⁷³	8	0,55	0,016–0,09	0,05–0,32	91,7–105,4	<7,72
UHPLC-Q-TOF ¹³⁹	30	0,3	0,18–0,75	6,67	80,9–108,1	<11,0
UHPLC-QTOF ¹⁴⁰	18	0,4	0,04–2	1–5	82,3–113,8	0,4–13,6
UHPLC-QTOF ⁸³	15	0,3	–	1–30	77–101,0	2,1–5,2
UHPLC-QTOF ¹⁷⁴	45	0,4	10–70	80	77,4–122,0	<16,7
LC-QTOF ¹⁷⁰	25	0,3	30–500	80–1600	80,4–119,5	0,1–13,9
UHPLC-QTOF ⁸²	26	0,3	5–500	20–1200	86,6–113,7	0,9–11,4

GD – granica detekcije; GK – granica kvantifikacije

§ 5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu razvijene su dvije metode za detekciju i kvantitativnu analizu četiri ciljane PDE-5I (sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil) te kvalitativnu analizu njihovih strukturnih analoga u dodacima prehrani namijenjenim kao pomoć kod ED, primjenom vezanih sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (UHPLC-QTOF i HPLC-TOF).
- Optimalno razdvajanje postignuto je korištenjem Inertsil ODS-4 kolone (150 mm × 2,1 mm, 3 µm) uz gradijentno eluiranje s protokom od 0,2 mL min⁻¹. Pokretna faza sastojala se od otopine A (5 mmol L⁻¹ amonijev formijat i 0,1 % mravlja kiseline u vodi (v/v)) i otopine B (0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu (v/v)).
- Identifikacija ciljanih PDE-5I primjenom UHPLC-QTOF temelji se na MS visokog razlučivanja s kromatografskim razdvajanjem i usporedbi s referentnim standardima, praćenjem prekursor iona i dva potvrdna fragmentna iona, uz optimizirane parametre izvora i kolizijske ćelije za postizanje maksimalne osjetljivosti.
- HPLC-TOF metoda također koristi MS visokog razlučivanja s kromatografskim razdvajanjem gdje se identifikacija temelji na praćenju odabranih prekursor iona uz potvrdu fragmentacijom u izvoru, s optimiziranim naponom na izlazu iz kapilare za postizanje zadovoljavajuće osjetljivosti.
- Za kvalitativnu analizu analoga bez dostupnih referentnih standarda, u obje metode, provedena je usporedba fragmentacijskih spektara s literaturnim podacima i online bazama spektara.
- Obje metode su validirane te je dokazana njihova prikladnost za rutinsku analizu PDE-5I u dodacima prehrani.
- Procijenjena je proširena mjerna nesigurnost za ciljane analite pri čemu je tadalafil pokazao najvišu, a sildenafil najnižu proširenu mjernu nesigurnost.
- Analizom realnih uzoraka s tržišta utvđena je značajna prisutnost PDE-5I i analoga u dodacima prehrani, osobito sildenafil i tadalafil, često u koncentracijama višim od terapijskih doza, slično globalnim trendovima, što ukazuje na ozbiljan problem krivotvorenja i potencijalne zdravstvene rizike za potrošače.

- Usporedba razvijenih metoda pokazuje da su obje razvijene metode konkurentne, s prednošću UHPLC–QTOF–a zbog MS/MS mogućnosti, veće osjetljivosti i pouzdanosti, posebno za detekciju niskih koncentracija analita i složenije analize. HPLC–TOF, iako manje osjetljiv i precizan, zadovoljava zahtjeve rutinske analize PDE–5I i njihovih analoga u dodacima prehrani.
- Rezultati ovog istraživanja naglašavaju važnost i potrebu kontinuiranog nadzora tržišta i strožeg provođenja regulatornih mjera kako bi se smanjio zdravstveni rizik za potrošače.
- Rezultati pružaju znanstvenu osnovu za unapređenje kontrole kvalitete dodataka prehrani, procjenu zdravstvenih rizika i edukaciju potrošača, doprinoseći zaštiti javnog zdravstva u Hrvatskoj. Ovi rezultati otvaraju mogućnosti za daljnja istraživanja patvorenja prehrambenih proizvoda.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

ATR – prigušena totalna refleksija (engl. *Attenuated Total Reflectance*)

cAMP/cGMP – 3',5' – ciklički adenzin/gvanzin monofosfat

CE-MS – kapilarna elektroforeza – spektrometrija masa (engl. *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*)

CI – kemijska ionizacija (engl. *Chemical Ionization*).

CID – kolizijom aktivirana disocijacija (engl. *Collision Induced Dissociation*)

DAD – detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*)

dSPE – disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Dispersive Solid Phase Extraction*)

ED – erektilna disfunkcija (engl. *Erectile Dysfunction*)

EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*)

EI – ionizacija elektronima (engl. *Electron Ionization*)

EIC – kromatogram iona odabranih vrijednosti m/z (engl. *Extracted Ion Chromatogram*)

EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

ESI – ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*)

FIA – protočno injekcijska analiza (engl. *Flow Injection Analysis*)

FDA – Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FTIR – Infracrvena spektroskopija uz Fourierovu transformaciju (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GC-MS – vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

GMP – dobra proizvođačka praksa (engl. *Good Manufacturing Practice*)

GUM – Uputa za iskazivanje mjerne nesigurnosti (engl. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*)

HCD – višeenergetska kolizijska disocijacija (engl. *Higher-Energy Collisional Dissociation*)

HRMS – spektrometar masa visoke rezolucije (engl. *High Resolution Mass Spectrometer*)

IR – infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared Spectroscopy*)

ICH – Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku uporabu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

IT – stupica iona (engl. *Ion Trap*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

LC-MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (engl. *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*)

LLE – tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (engl. *Liquid–Liquid Extraction*)

LRMS – spektrometar masa niske rezolucije (engl. *Low Resolution Mass Spectrometer*)

ME – utjecaj matrice (engl. *Matrix Effect*)

m/z – omjer mase i naboja iona (engl. *Mass-to-Charge Ratio*)

MS – spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*)

MS/MS – tandemna spektrometrija masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry*),

MRM – praćenje višestrukih reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring*)

NCE – normalizirana energija sudara (engl. *Normalized Collision Energy*)

NIR – infracrvena spektroskopija u bliskom infracrvenom području (engl. *Near Infrared Spectroscopy*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*)

NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *Non–Steroidal Anti–Inflammatory Drugs*)

Orbitrap – orbitalna stupica iona (engl. *Orbital Ion Trap*)

PCDL – engl. *Personal Compound Database and Library*

PDE – enzim fosfodiesteraza (engl. *Phosphodiesterase Enzyme*)

PDE-5I – inhibitori fosfodiesteraze tipa 5 (engl. *Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors*)

PKG – protein kinaza G (engl. *Protein Kinase G*)

ppm – engl. *Parts Per Million*

Q – kvadrupol (engl. *Quadrupole*)

QQQ – trostruki kvadrupol (engl. *Triple Quadrupole*)

Q-TOF – hibrid kvadrupola i analizatora koji mjeri vrijeme leta (engl. *Hybrid Quadrupole–Time of Flight*)

QuEChERS – brza, jednostavna, jeftina, efektivna, robusna i sigurna metoda ekstrakcije (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

RASFF – sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*)

RP – kromatografija obrnutih faza (engl. *Reversed Phase*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)

SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*)

TIC – kromatogram ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Chromatogram*)

TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*)

TOF – analizator masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of Flight*)

(U)HPLC – tekućinska kromatografija (ultra) visoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. NIH Consensus Conference. Impotence, *JAMA* **270** (1993) 83–90.
2. D. N. Patel, L. Li, C. L. Kee, X. Ge, M. Y. Low, H. L. Koh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2014) 176–190.
3. I. Žuntar, A. Krivohlavek, J. Kosić-Vukšić, D. Granato, D. Bursać Kovačević, P. Putnik, *Curr. Opin. Food Sci.* **24** (2018) 9–15.
4. <https://patients.uroweb.org/hr/erektilna-disfunkcija/lijecenja-ed-a/inhibitori-fosfodiesteraze-tipa-5-pde-5i/> (preuzeto 29. veljače 2024. god.)
5. European Parliament, *Off. J. Eur. Communities*. **L183** (2002) 51–57.
6. L. Vaclavik, A.J. Krynitsky, J.I. Rader, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 6767–6790.
7. B. J. Venhuis, D. de Kaste, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 196–208.
8. L. Vaclavik, A.J. Krynitsky, J.I. Rader, *Anal. Chim. Acta.* **810** (2014) 45–60.
9. A. Y. Mohd Yusop, L. Xiao, S. Fu, *Talanta* **204** (2019) 36–43.
10. T. Rocha, J.S. Amaral, M. B. P. P. Oliveira, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15** (2016) 43–62.
11. S. R. Gratz, C. L. Flurer, K. A. Wolnik. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36** (2004) 525–533.
12. M. J. Bogusz, H. Hassan, E. Al-Enazi, Z. Ibrahim, M. Al-Tufail, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 554–564.
13. F. Song, A. El-Demerdash, S. J. S. H. Lee, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70** (2012) 40–46.
14. P. Zou, S. Sze-Yin Oh, P. Hou, M-Y. Low, H-L. Koh, *J. Chromatogr. A* **1104** (2006) 113–122.
15. Q. Liang, J. Qu, G. Luo, Y. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 305–311.
16. S. Singh, B. Prasad, A.A. Savaliya, R. P. Shah, V. M. Gohil, A. Kaur, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **28** (2009) 13–28.
17. C. Bortolini, A. Pivato, S. Bogialli, P. Pastore, *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015) 6207–6216.
18. J. H. Lee, H. N. Park, S. Park, Y. M. Lee, H. Kang, *Sci. Justice* **59** (2019) 433–441.
19. J. Corbin, *Int. J. Impot. Res.* **16** (2004) S4–S7.
20. S. H. Soderling, S. J. Bayuga, J. A. Beavo, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 15553–15558.

21. R. Shafiee-Nick, A. R. Afshari, S. H. Mousavi, A. Rafighdoust, V. R. Askari, H. Mollazadeh, *Biomed. Pharmacother.* **94** (2017) 541–556.
22. B. Šincek, *Medicus* **13** (2004) 125–129.
23. S. H. Francis, T. M. Lincoln, J. D. Corbin, *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 620–626.
24. H. A. Ghofrani, I. H. Osterloh, F. Grimminger, *Nat. Rev. Drug Discov.* **5** (2006) 689–702.
25. F. Montorsi, T. E. Mcdermott, R. Morgan, A. Olsson, A. Schultz, H. J. Kirkeby, *Urology* **53** (1999) 1011–1018.
26. G. Katz, R. B. Tan, D. Rittenberg, W. J. Hellstrom, *Ther. Clin. Risk Manag.* **10** (2014) 701–711.
27. I. Saenz De Tejada, J. Angulo, P. Cuevas, A. Fernández, I. Moncada, A. Allona, *Int. J. Impot. Res.* **13** (2001) 282–290.
28. J. D. Corbin, A. Beasley, M. A. Blount, S. H. Francis, *Neurochem. Int.* **45** (2004) 859–863.
29. S. Huang, J. Lie, *Pharmacol. Ther.* **38** (2013) 407–419.
30. J. L. Zurawin, C. A. Stewart, J. E. Anaissie, F. A. Yafi, W. J. G. Hellstrom, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **9** (2016) 1163–1170.
31. <https://go.drugbank.com> (preuzeto 11. rujna 2024. god.)
32. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (preuzeto 11. rujna 2024. god.)
33. H. A. Feldman, I. Goldstein, D. G. Hatzichristou, R. J. Krane, J. B. McKinlay, *J. Urol.* **151** (1994) 54–61.
34. I. A. Aytaç, J. B. Mckinlay, R. J. Krane, *BJU Int.* **84** (1999) 50–56.
35. L. Muschietti, F. Redko, J. Ulloa, *Drug Test. Anal.* **12** (2020) 861–886.
36. G. Štimac, *Medicus* **21** (2012) 87–93.
37. C. G. McMahon, *Intern. Med. J.* **44** (2014) 18–26.
38. H. E. Campbell, *J. Manag. Care Pharm.* **11** (2005) 151–171.
39. J. Cartledge, S. Minhas, I. Eardley, *Expert Opin. Pharmacother.* **2** (2001) 95–107.
40. D. P. Rotella, *Nat. Rev. Drug Discov.* **1** (2002) 674–682.
41. J. D. Corbin, S. H. Francis, D. J. Webb, *Urology.* **60** (2002) 4–11.
42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549843> (preuzeto 16. siječnja 2024. god.)
43. E. Ventimiglia, P. Capogrosso, F. Montorsi, A. Salonia, *Expert Opin. Drug Saf.* **15** (2016) 141–152.

44. N. Mehrotra, M. Gupta, A. Kovar, B. Meibohm, *Int. J. Impot. Res.* **19** (2007) 253–264.
45. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_10_126_2740.html (preuzeto 5. veljače 2024. god.)
46. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_04_41_1062.html (preuzeto 26. veljače 2024. god.)
47. B. Egan, C. Hodgkins, R. Shepherd, L. Timotijevic, M. Raats, *Food Funct.* **2** (2011) 747–752.
48. A. Petroczi, G. Taylor, D. P. Naughton, *Food Chem. Toxicol.* **49** (2011) 393–402.
49. <https://www.fda.gov/food/dietary-supplements> (preuzeto 20. veljače 2024. god.)
50. <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/compliance-actions-and-activities/warning-letters> (preuzeto 20. veljače 2024. god.)
51. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2023_02_18_302.html (preuzeto 20. veljače 2024. god.)
52. <https://www.zakon.hr/z/576/zakon-o-prehrambenim-i-zdravstvenim-tvrđnjama-te-hrani-obogacenoj-nutrijentima> (preuzeto 20. veljače 2024. god.)
53. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_83_1804.html (preuzeto 20. veljače 2024. god.)
54. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj/eng> (preuzeto 20. veljače 2024. god.)
55. D. H. Phua, A. Zosel, K. Heard, *Int. J. Emerg. Med.* **2** (2009) 69–76.
56. G. Martínez-Domínguez, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, *Talanta*. **118** (2014) 277–291.
57. L. Vaclavik, M. Vaclavikova, T. H. Begley, A. J. Krynitsky, J. I. Rader, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 4822–4830.
58. E. S. J. Harris, S. Cao, B. A. Littlefield, J. A. Craycroft, R. Scholten, T. Kaptchuk, *Sci. Total Environ.* **409** (2011) 4297–4305.
59. S. Bent, R. Ko, *Am. J. Med.* **116** (2004) 478–485.
60. K. Baxter (ur.), *Pharmaceutical Press*, 8. izd., London, 2008, str. 1025.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2464810/> (preuzeto 20. veljače 2024. god.)
61. Cole MR, Fetrow CW. Adulteration of dietary supplements. *Am J Health-Syst Pharm* 2003; **60**: 1576–80.

62. S. Balayssac, V. Gilard, C. Zedde, R. Martino, M. Malet-Martino, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **63** (2012) 135–150.
63. H–M. Lee, B. J. Lee, *Food Addit. Contam. Part A*. **28** (2011) 396–407.
64. H. Wang, Y. Wu, Y. Zhao, W. Sun, L. Ding, B. Guo, *Food Addit. Contam. Part A*. **29** (2012) 1194–1201.
65. P. Zou, S. S. Y. Oh, K. H. Kiang, M. Y. Low, B. C. Bloodworth, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21** (2007) 614–618.
66. W. F. Huang, K. C. Wen, M. L. Hsiao, *J. Clin. Pharmacol.* **37** (1997) 344–350.
67. E. Ernst, *J. Intern. Med.* **252** (2002) 107–113.
68. Y. L. Lu, N. L. Zhou, S. Y. Liao, N. Su, D. X. He, Q. Q. Tian, *Food Addit. Contam. Part A*. **27** (2010) 893–902.
69. Z. Zhou, J. Zhang, W. Zhang, Y. Bai, H. Liu, *Analyst* **136** (2011) 2613–2618.
70. X. Wu, B. Zhu, L. Lu, W. Huang, D. Pang, *Food Chem.* **133** (2012) 482–488.
71. K. Deventer, W. Van Thuyne, P. Mikulčíková, P. Van Eenoo, F. T. Delbeke, *Food Chem.* **103** (2007) 1508–1513.
72. H. Geyer, M. K. Parr, K. Koehler, U. Mareck, W. Schänzer, M. Thevis, *J. Mass Spectrom.* **43** (2008) 892–902.
73. G. Jackson, S. Arver, I. Banks, V. J. Stecher, *Int. J. Clin. Pract.* **64** (2010) 497–504.
74. K. Skalicka-Woźniak, M. I. Georgiev, I. E. Orhan, *Food Chem. Toxicol.* **108** (2017) 355–364.
75. M. A. Gouda, *Synth. Commun.* **47** (2017) 2269–2304.
76. https://www.incb.org/documents/PRECURSORS/TECHNICAL_REPORTS/2024/E/PRE_Report_E.pdf (preuzeto 6. siječnja 2024. god.)
77. <https://www.technavio.com/report/phosphodiesterase-pde-inhibitors-market-industry-analysis> (preuzeto 6. siječnja 2024. god.)
78. <https://www.halmed.hr/en/Lijekovi/Baza-lijekova/#rezultati,%20pristup%205.1.2024>. (preuzeto 6. siječnja 2024. god.)
79. <https://www.researchandmarkets.com/reports/5820213> (preuzeto 10. siječnja 2024. god.)
80. J. H. Hong, Y. S. Kwon, I. Y. Kim, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **13** (2017) 183–192.

81. F. Damiano, C. Silva, A. Gregori, F. Vacondio, M. Mor, M. Menozzi, *Sci. Justice* **54** (2014) 228–237.
82. S. Shi, Y. Wu, M. Zhou, Q. Cheng, *J. Chromatogr. B* **1144** (2020) 122077.
83. M. Jiru, M. Stranska-Zachariasova, Z. Dzuman, K. Hurkova, M. Tomaniova, R. Stepan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **164** (2019) 713–724.
84. E. S. Lee, J. H. Lee, K. M. Han, J. W. Kim, I. S. Hwang, S. Cho, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **83** (2013) 171–178.
85. T. O. Nguyen, C-S. Tran, T. T. H. Do, T. M. H. Nguyen, Q-D. Bui, C. T. Bui, *J. Anal. Methods Chem.* **3** (2021) 1–11.
86. M. K. Parr, H. Geyer, U. Reinhart, W. Schänzer, *Food Addit. Contam.* **21** (2004) 632–640.
87. W. Van Thuyne, F. T. Delbeke, *J. Chromatogr. Sci.* **43** (2005) 2–6.
88. W. Pang, H. Yang, Z. Wu, M. Huang, J. Hu, *Chromatographia* **70** (2009) 1353–1359.
89. A. Lanzarotta, J. B. Crowe, M. Witkowski, B. M. Gamble, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **67–68** (2012) 22–27.
90. S. R. Gratz, B. M. Gamble, R. A. Flurer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20** (2006) 2317–2327.
91. E. H. Kim, H. S. Seo, N. Y. Ki, N. H. Park, W. Lee, J. A. Do, *J. Chromatogr. A* **1491** (2017) 43–56.
92. S. R. Park, J. G. Lee, S. H. Roh, G. Kim, C. H. Kwon, H. R. Park, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **5** (2012) 29–32.
93. B. Ding, Z. Wang, J. Xie, G. Zeng, W. Chen, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **11** (2018) 214–222.
94. A. Y. Mohd Yusop, L. Xiao, S. Fu, *Drug Test. Anal.* **13** (2021) 965–976.
95. N. Zamariola, P. T. Netto, C. A. Franchi, J. L. V. De Camargo, M. R. R. De Marchi, *J. Anal. Toxicol.* **41** (2017) 399–406.
96. Y. Cai, T. G. Cai, Y. Shi, X. L. Cheng, L. Y. Ma, S. C. Ma, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **33** (2010) 1287–1306.
97. T. Hasegawa, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, Y. Haishima, N. Kawahara, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **49** (2008) 311–315.
98. J. B. Guo, Y. Xu, Z. B. Huang, Q. H. He, S. W. Liu, *Anal. Chim. Acta* **658** (2010) 197–203.

99. J. Guo, W. Liu, X. Lan, H. Chen, Z. Xiao, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess* **33** (2016) 1095–1104.
100. F. He, T. Zou, J. Yang, H. Wang, L. Deng, Y. Tian, *Food Agric. Immunol.* **30** (2019) 349–368.
101. M. de Veij, A. Deneckere, P. Vandenabeele, D. de Kaste, L. Moens, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46** (2008) 303–309.
102. E. Deconinck, P. Y. Sacré, P. Courselle, J. O. De Beer, *Talanta* **100** (2012) 123–133.
103. E. Deconinck, P. Y. Sacré, D. Coomans, J. De Beer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **57** (2012) 68–75.
104. C. L. Kee, X. Ge, H. L. Koh, M. Y. Low, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70** (2012) 265–272.
105. S. Trefi, C. Routaboul, S. Hamieh, V. Gilard, M. Malet-Martino, R. Martino, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47** (2008) 103–113.
106. V. Gilard, S. Balayssac, A. Tinaugus, N. Martins, R. Martino, M. Malet-Martino, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **102** (2015) 476–493.
107. S. Balayssac, S. Trefi, V. Gilard, M. Malet-Martino, R. Martino, M. A. Delsuc, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (2009) 602–612.
108. M. H. Shin, M. K. Hong, W. S. Kim, Y. L. Lee, Y. C. Jeoung, *Food Addit. Contam.* **20** (2003) 793–796.
109. C. N. Man, N. M. Nor, R. Lajis, G. L. Harn, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 8426–8430.
110. S. U. Mokhtar, S. T. Chin, C. L. Kee, M. Y. Low, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **121** (2016) 188–196.
111. J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, *J. Chromatogr. A* **1125** (2006) 67–75.
112. J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44** (2007) 887–893.
113. J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, D. A. d’Avignon, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43** (2007) 1615–1621.
114. S-Y. Liu, S-O. Woo, H-L. Koh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24** (2001) 983–992.
115. P. Zou P, S. S.-Y. Oh, P. Hou, M-Y. Low, H-L. Koh, *J. Chromatogr. A* **1104** (2006) 113–122.
116. P. Y. Sacré, E. Deconinck, P. Chiap, J. Crommen, F. Mansion, E. Rozet, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 6439–6447.
117. B. J. Venhuis, D. de Kaste, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 196–208.
118. L. Vaclavik, A. J. Krynitsky, J. I. Rader, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 6767–6790.

119. Q. Liang, J. Qu, G. Luo, Y. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 305–311.
120. S. R. Gratz, C. L. Flurer, K. A. Wolnik, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36** (2004) 525–533.
121. M. Jiru, M. Stranska-Zachariasova, Z. Dzuman, K. Hurkova, M. Tomaniova, R. Stepan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **164** (2019) 713–724.
122. E. S. Lee, J. H. Lee, K. M. Han, J. W. Kim, I. S. Hwang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **83** (2013) 171–178.
123. M. J. Bogusz, H. Hassan, E. Al-Enazi, Z. Ibrahim, M. Al-Tufail, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 554–564.
124. S. R. Park, J. G. Lee, S. H. Roh, G. Kim, C. H. Kwon, H. R. Park, *Food Addit. Contam. Part B* **5** (2012) 29–32.
125. F. Damiano, C. Silva, A. Gregori, F. Vacondio, M. Mor, M. Menozzi, *Sci. Justice* **54** (2014) 228–237.
126. H. M. Lee, B. J. Lee, *Food Addit. Contam. Part A* **28** (2011) 396–407.
127. Y. C. Huang, H. C. Lee, Y. L. Lin, Y. T. Lin, C. F. Tsai, H. F. Cheng, *Food Addit. Contam. Part A* **33** (2016) 1637–1642.
128. S. Shi, Y. Wu, M. Zhou, Q. Cheng, *J. Chromatogr. B* **1144** (2020) 122077.
129. A. Y. Mohd Yusop, L. Xiao, S. Fu, *Drug Test. Anal.* **13** (2021) 965–976.
130. F. Shi, C. Guo, L. Gong, J. Li, P. Dong, J. Zhang, *J. Chromatogr. A* **1344** (2014) 91–98.
131. C. L. Kee, X. Ge, M. Y. Low, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **32** (2015) 1737–1748.
132. L. Vaclavik, A. J. Krynitsky, J. I. Rader, *Anal. Chim. Acta* **810** (2014) 45–60.
133. F. Xian, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, *Anal. Chem.* **84** (2012) 708–719.
134. E. H. Kim, H. S. Seo, N. Y. Ki, N. H. Park, W. Lee, J. A. Do, *J. Chromatogr. A* **1491** (2017) 43–56.
135. E. Öztürk Er, B. Özbek, S. Bakırdere, *J. Sep. Sci.* **42** (2019) 475–483.
136. J. H. Lee, H. N. Park, S. Park, Y. M. Lee, H. Kang, *Sci. Justice* **59** (2019) 433–441.
137. A. Y. Mohd Yusop, L. Xiao, S. Fu, *Talanta* **204** (2019) 36–43.
138. Y. Ren, C. Wu, J. Zhang, *J. Sep. Sci.* **35** (2012) 2847–2857.
139. C. Bortolini, A. Pivato, S. Bogialli, P. Pastore, *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015) 6207–6216.140.
140. X. B. Wang, J. Zheng, J. J. Li, H. Y. Yu, Q. Y. Li, L. H. Xu, *J. Food Drug. Anal.* **26** (2018) 1138–1153.

141. U. Kim, H. D. Cho, M. H. Kang, J. H. Suh, *Molecules* **25** (2020) 2734.
142. T. O. Nguyen, C. S. Tran, T. T. H. Do, T. M. H. Nguyen, Q. D. Bui, C. T. Bui, *J. Anal. Methods Chem.* **2021** (2021).
143. J. H. Lee, O. R. Park, Y. J. Yang, J. H. Han, E. J. Jung, N. S. Kim, *J. Chromatogr. Sci.* **60** (2022) 953–962.
144. European Commission, *Off. J. Eur. Communities* **L221** (2002) 8–36.
145. ICH, Validation of analytical procedures Q2(R2), u: International Conference of harmonization, Geneva, Švicarska, 2024.
146. A. Zailina, A. Aminah, Y. M. Ambar, *Sains Malays.* **42** (2013) 135–142.
147. F. Song, A. El-Demerdash, S. J. S. H. Lee, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70** (2012) 40–46.
148. X. Zhu, S. Xiao, B. Chen, F. Zhang, S. Yao, Z. Wan, *J. Chromatogr. A* **1066** (2005) 89–95.
149. S. H. Kim, H. Jun Kim, J. Son, B. Wook Jeon, E. Sook Jeong, E. Ju Cha, *Mass Spectrom. Lett.* **3** (2012) 50–53.
150. J. Wang, D. Yang, Z. Wang, B. Chen, S. Yao, *Food Chem.* **113** (2009) 227–232.
151. J.-A. Do, E. Noh, S.-B. Yoon, H.-J. Park, S. Cho, S.-K. Park, *Anal. Sci. Technol.* **28** (2015) 278–287.
152. S. Ahn, J. Y. Hong, M. K. Hong, Y. P. Jang, M. S. Oh, J. H. Jung, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23** (2009) 3158–3166.
153. S. R. Gratz, B. M. Gamble, R. A. Flurer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20** (2006) 2317–2327.
154. J. Xia, W. Wu, F. Jiang, S. Zhu, *Heliyon* **9** (2023) e19456.
155. P. Mital, K. Charny, V. Vivek, *Arab. J. Chem.* **13** (2020) 6493–6509.
156. J. M. Lee, J. Hong, H. B. Oh, B. Moon, *Bull. Korean Chem. Soc.* **39** (2018) 190–196.
157. E. O. Er, E. Akkaya, B. Özbek, S. Bakırdere, *Microchem. J.* **152** (2020) 104302.
158. J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44** (2007) 887–893.
159. T. Moriyasu, K. Minowa, M. Sakamoto, K. Kishimoto, H. Kadoi, J. Nakajima, *J. AOAC Int.* **94** (2011) 1770–1777.
160. J. C. Reepmeyer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23** (2009) 927–936.
161. K.-C. Lai, Y.-C. Liu, Y.-L. Lin, L.-Y. Tsai, J.-H. Lin, *J. Food and Drug Anal.* **18** (2010) 269–278.
162. S. Jin, Y. Wang, X. Ning, T. Liu, R. Liang, X. Pei, *Molecules* **29** (2024) 3601.

163. J. Vaysse, V. Gilard, S. Balayssac, C. Zedde, R. Martino, M. Malet-Martino, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **59** (2012) 58–66.
164. S. Jin, Y. Wang, X. Ning, T. Liu, R. Liang, X. Pei, *Molecules* **29** (2024) 3601.
165. Q. Chen, P. Li, B. Li, F. Yuan, X. Li, J. Zhu, *Acta Chromatogr.* **23** (2011) 629–639.
166. L. Vaclavik, J. R. Schmitz, J. F. Halbardier, K. Mastovska, *J. AOAC Int.* **99** (2016) 55–72.
167. J. V. Sancho, O. J. Pozo, M. Ibáñez, F. Hernández, *Anal. Bioanal. Chem.* **386** (2006) 987–997.
168. D. N. Patel, L. Li, C. L. Kee, X. Ge, M. Y. Low, H. L. Koh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2014) 176–190.
169. C–L. Kee, X. Ge, M–Y. Low, V. Gilard, M. Malet-Martino, *Food Addit. Contam. Part A* **40** (2023) 1495–1530.
170. J. H. Lee, O. R. Park, Y. J. Yang, J. H. Han, E. J. Jung, N. S. Kim, *J. Chromatogr. Sci.* **60** (2022) 953–962.
171. N. M. Reeuwijk, B. J. Venhuis, D. de Kaste, L. A P. Hoogenboom, I. M. C. M. Rietjens, M. J. Martena, *Food Addit. Contam. Part A* **30** (2013) 2027–2034.
172. N. B. Bujang, C. F. Chee, C. H. Heh, N. A. Rahman, M. J. C. Buckle, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **34** (2017) 1101–1109.
173. E. Öztürk Er, B. Özbek, S. Bakırdere, *J. Sep. Sci.* **42** (2019) 475–483.
174. A. Yusri, M. Yusop, L. Xiao, S. Fu, *Forensic Sci. Int.* **322** (2021) 110748.

§ 8. DODATAK

Tablica D1. Popis PDE–5I i njihovih analoga uključenih u bazu podataka (PCDL).

Redni broj	Molekulska formula	Ime spoja	Točna masa (m/z)
1.	C17H20N4O2	Desulfovardenafil	312,1586
2.	C19H22N4O3	Gendenafil	354,1692
3.	C21H26N2O3	Johimbin	354,1943
4.	C18H20N4O4	Acetilna kiselina	356,1485
5.	C18H20N4O4	Norneovardenafil	356,1485
6.	C17H19N5O4	Nitrodenafil	357,1437
7.	C19H24N4O4	Dihidroksidenafil	372,1798
8.	C21H17N3O4	Nortadalafil (Demetiltadalafil)	375,1219
9.	C19H21ClN4O3	Klorodenafil	388,1302
10.	C22H19N3O4	Tadalafil	389,1376
11.	C19H23N3O6	Benzamidenafil (Ksantoantrafil)	389,1587
12.	C21H18N4O4	Aminotadalafil	390,1328
13.	C19H23ClN4O3	Hidroksikloridenafil	390,1459
14.	C21H26N4O2S	Tioksobutildenafil	398,1776
15.	C21H28N4O4	Hidroksietoksidenafil	400,2111
16.	C23H21N3O4	Homotadalafil (N–Etil tadalafil)	403,1532
17.	C18H23N5O4S	Aminosildenafil	405,1471
18.	C19H20Cl2N4O2	Z–diklorodenafil	406,0963
19.	C19H20Cl2N4O2	E–diklorodenafil	406,0963
20.	C18H22N4O5S	Desmetilpiperazinil propoksisildenafil	406,1311
21.	C17H20N4O4S2	Depiperazino–tiosildenafil	408,0926
22.	C24H23N3O4	Izopropilnortadalafil	417,1689
23.	C23H22N3O5	2–Hidroksietilnortadalafil	420,1559
24.	C22H28N6O3	Desetilkarbodenafil	424,2223
25.	C22H19ClN2O5	Kloropretadalafil	426,0982

Redni broj	Molekulska formula	Ime spoja	Točna masa (m/z)
26.	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₄	<i>N</i> -butilnortadalafil	431,1845
27.	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O ₅	Acetaminotadalafil	432,1434
28.	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₅	2-Hidroksipropilnortadalafil	433,1638
29.	C ₂₄ H ₃₁ N ₅ O ₃	Piperidino acetildenafil	437,2427
30.	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₃	Desmetilkarbodenafil (Norkarbodenafil)	438,2379
31.	C ₂₃ H ₂₂ CIN ₂ O ₅	Kloropropanoilpretadalafil	441,1217
32.	C ₂₆ H ₂₅ N ₃ O ₄	Ciklopentil tadalafil	443,1845
33.	C ₂₆ H ₂₅ N ₃ O ₄	Trans-ciklopentil tadalafil	443,1845
34.	C ₂₄ H ₂₈ N ₆ OS	Tioquinapiperifil	448,2045
35.	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃	Karbodenafil (Fondenafil)	452,2536
36.	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃	Noracetildenafil (Desmetillhongdenafil)	452,2536
37.	C ₂₂ H ₂₈ N ₆ OS ₂	Ditiodesetilkarbodenafil	456,1766
38.	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	Norneosildenafil (Piperidino sildenafil)	459,1940
39.	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	Pseudovardenafil (Piperidinovardenafil)	459,1940
40.	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	<i>N</i> -Desetilvaridenafil	460,1893
41.	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	<i>N</i> -Desmetilsildenafil	460,1893
42.	C ₂₁ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	Deskarbonsildenafil	462,2049
43.	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₅	Dietilaminopretadalafil	463,2107
44.	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	Acetildenafil (Hongdenafil)	466,2692
45.	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	Acetilvaridenafil	466,2692
46.	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	Dimetilacetildenafil	466,2692
47.	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	Propoksifenil-noracetildenafil	466,2692
48.	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₂ S	Dimetiltiokarbodenafil	468,2307
49.	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₄	Hidroksikarbodenafil	468,2485
50.	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ OS ₂	Ditio-desmetilkarbodenafil	470,1923
51.	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	Sildenafil	474,2049
52.	C ₂₅ H ₃₂ N ₆ O ₄	Oksohongdenafil	480,2485
53.	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₄	Hidroksiacetildenafil (Hidroksihongdenafil)	482,2642
54.	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₄	Izopiperazinonafil	482,2642
55.	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₄	Piperazinonafil (Dihidroacetildenafil)	482,2642

Redni broj	Molekulska formula	Ime spoja	Točna masa (m/z)
56.	C23H26N7O3Cl	Avanafil	483,1786
57.	C24H32N6OS2	Dimetilditiodenafil	484,2079
58.	C29H33N3O4	<i>N</i> -Oktil-nortadalafil	487,2471
59.	C23H32N6O4S	Propoksifenil sildenafil	488,2206
60.	C23H32N6O4S	Homosildenafil	488,2206
61.	C23H32N6O4S	Aildenafil (Metizosildenafil)	488,2206
62.	C23H32N6O4S	Vardenafil	488,2206
63.	C23H32N6O4S	Dimetilsildenafil	488,2206
64.	C22H30N6O3S2	Tiosildenafil	490,1821
65.	C28H33N3O5	Dipropilaminopretadalafil	491,2420
66.	C25H30N6O5	Dioksoacetildenafil (Dioksohongdenafil)	494,2278
67.	C27H22N4O6	Produkt interakcije aminotadalafila i 5-hidroksimetilfurfurala	498,1539
68.	C25H34N6OS2	Ditiopropilkarbodenafil	498,2236
69.	C25H35N6OS2	3,5-dimetilpiperazinil ditiodesmetilkarbodenafil	498,2236
70.	C24H34N6O4S	Propoksifenil aildenafil	502,2362
71.	C30H24N4O4	<i>N</i> -fenilpropenil tadalafil	504,1798
72.	C23H32N6O3S2	Sulfoaildenafil (Tioaildenafil, dimetiltiosildenafil)	504,1977
73.	C23H32N6O3S2	Tiodimetilsildenafil	504,1977
74.	C23H32N6O3S2	Tiohomosildenafil (Sulfohomosildenafil, homosildenafil tione)	504,1977
75.	C23H32N6O3S2	Propoksifenil tiosildenafil	504,1977
76.	C23H32N6O5S	Hidroksihomosildenafil	504,2155
77.	C23H32N6O5S	Hidroksivardenafil	504,2155
78.	C25H36N6O4S	Udenafil	516,2519
79.	C25H36N6O4S	Propoksifenil izobutil aildenafil	516,2519
80.	C24H34N6O3S2	Propoksifenil tioaildenafil	518,2134
81.	C24H34N6O3S2	Propoksifenil-tiohomosildenafil	518,2134
82.	C24H34N6O3S2	Propoksifenil-tiodimetilsildenafil	518,2134
83.	C24H34N6O5S	Propoksifenil-hidroksihomosildenafil	518,2311

Redni broj	Molekulska formula	Ime spoja	Točna masa (m/z)
84.	C23H33N7O5S	Gisadenafil	519,2264
85.	C23H32N6O4S2	Hidroksitiohomosildenafil	520,1926
86.	C23H32N6O4S2	Hidroksitiovaridenafil	520,1926
87.	C26H36N6O4S	Ciklopentinafil	528,2519
88.	C26H37N5O5S	Mirodenafil	531,2515
89.	C24H34N6O4S2	Propoksifenil–tiohidroksihomosildenafil	534,2083
90.	C28H34N6O4S	Benzilsildenafil	550,2362
91.	C32H38N6O3	Cinamildenafil	554,3005
92.	C27H35N9O5S2	Mutaprodenafil	629,2203
93.	C27H35N9O5S2	Nitrozoprodenafil	629,2203
94.	C43H35N5O9	Bisprenortadalafil	765,2435
95.	C46H43N5O10	<i>Trans</i> –bisprehomotadalafil	825,3010
96.	C49H47N5O10	<i>Trans</i> –bispreciklopentil tadalafil	865,3323
97.	C47H62N12O11S2	Lodenafil karbonat	1034,4102

Tablica D2. Identifikacija sumnjivih PDE-5I analoga bez referentnih standarda UHPLC-QTOF metodom.

PDE-5I analozi	Vrijeme zadržavanja (min)	Kemijska formula	Teoretski m/z	Ekspperimentalni m/z	Pogreška mase (ppm)
Johimbin	5,85	$C_{21}H_{27}N_2O_3^+$	355,2016	355,2015	-0,3
		$C_{11}H_{18}NO_3^+$	212,1281	212,1282	0,5
		$C_{11}H_{16}NO_2^+$	194,1176	194,1173	-1,5
		$C_{10}H_{12}NO^+$	162,0913	162,0913	0,0
		$C_{10}H_{10}N^+$	144,0808	144,0818	6,9
Depiperazino-tiosildenafil	7,77	$C_{17}H_{21}N_4O_4S_2^+$	409,0999	409,0987	-2,9
		$C_{15}H_{17}N_4O_4S_2^+$	381,0686	381,0682	-1,0
		$C_{13}H_{12}N_4O_4S_2^{++}$	352,0294	352,0291	-0,9
		$C_{15}H_{15}N_4OS^+$	299,0961	299,0957	-1,3
		$C_{13}H_{12}N_4OS^{++}$	272,0726	272,0722	-1,5
Propoksifenil aildenafil	7,91	$C_{24}H_{35}N_6O_4S^+$	503,2435	503,2434	-0,2
		$C_{18}H_{23}N_4O_4S^+$	391,1435	391,1428	-1,8
		$C_{18}H_{21}N_4O_2^+$	325,1659	325,1656	-0,9
		$C_{15}H_{15}N_4O_3^+$	299,1139	299,1137	-0,7
		$C_{15}H_{15}N_4O_2^+$	283,1190	283,1193	1,1
		$C_6H_{13}N_2^+$	113,1073	113,1072	-0,9
		$C_5H_{11}N_2^+$	99,0917	99,0916	-1,0

PDE-5I analozi	Vrijeme zadržavanja (min)	Kemijska formula	Teoretski <i>m/z</i>	Ekperimentalni <i>m/z</i>	Pogreška mase (ppm)
2-Hidroksipropilnortadalafil	8,37	C ₂₄ H ₂₄ N ₃ O ₅ ⁺	434,1710	434,1723	2,9
		C ₁₇ H ₁₈ N ₃ O ₃ ⁺	312,1343	312,1359	5,1
		C ₁₇ H ₁₂ NO ₂ ⁺	262,0868	262,0870	0,8
		C ₁₂ H ₉ N ₂ O ⁺	197,0709	197,0705	-2,0
		C ₁₁ H ₉ N ₂ ⁺	169,0760	169,0760	0,0
		C ₈ H ₇ O ₂ ⁺	135,0441	135,0447	4,4
Hidroksitiohomosildenafilfil	9,20	C ₂₃ H ₃₃ N ₆ O ₄ S ₂ ⁺	521,1999	521,1999	-0,6
		C ₂₃ H ₃₁ N ₆ O ₃ S ₂ ⁺	503,1894	503,1894	0,0
		C ₂₁ H ₂₉ N ₆ O ₄ S ₂ ⁺	477,1737	477,1749	2,5
		C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₃ S ₂ ⁺	393,1050	393,1041	-2,3
		C ₁₇ H ₁₉ N ₄ OS ⁺	327,1274	327,1269	-1,5
		C ₁₅ H ₁₅ N ₄ OS ⁺	299,0961	299,0963	0,7
		C ₆ H ₁₃ N ₂ O ⁺	129,1022	129,1020	-1,6
		C ₂₂ H ₃₁ N ₆ O ₃ S ₂ ⁺	491,1894	491,1890	-0,7
		C ₁₈ H ₂₃ N ₄ O ₃ S ₂ ⁺	407,1206	407,1184	-5,4
		C ₁₈ H ₂₁ N ₄ OS ⁺	341,1431	341,1425	-1,8
		C ₁₇ H ₁₉ N ₄ OS ⁺	327,1274	327,1265	-2,8
		C ₁₅ H ₁₅ N ₄ OS ⁺	299,0961	299,0957	-1,3
		C ₅ H ₁₁ N ₂ ⁺	99,0917	99,0916	1,0
		C ₃ H ₈ N ⁺	58,0651	58,0653	3,4
Tiosildenafilfil	9,52				

PDE-5I analozi	Vrijeme zadržavanja (min)	Kemijska formula	Teoretski <i>m/z</i>	Eksperimentalni <i>m/z</i>	Pogreška mase (ppm)
Sulfoaildenafil	9,94	C ₂₃ H ₃₃ N ₆ O ₃ S ₂ ⁺	505,2050	505,2043	-1,4
(dimetil-tiosildenafil)		C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₃ S ₂ ⁺	448,1472	448,1470	-0,4
		C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₃ S ₂ ⁺	393,1050	393,1046	-1,0
		C ₁₇ H ₁₉ N ₄ OS ⁺	327,1274	327,1268	-1,8
		C ₁₅ H ₁₅ N ₄ OS ⁺	299,0961	299,0960	-0,3
		C ₆ H ₁₃ N ₂ ⁺	113,1073	113,1069	-3,5
Kloropretadalafil	13,04	C ₂₂ H ₂₀ ClN ₂ O ₅ ⁺	427,1055	427,1049	-1,4
		C ₂₀ H ₁₆ NO ₄ ⁺	334,1074	334,1069	-1,5
		C ₁₉ H ₁₂ NO ₃ ⁺	302,0812	302,0807	-3,3
		C ₁₈ H ₁₂ NO ₂ ⁺	274,0863	274,0858	-1,8
		C ₁₇ H ₁₂ NO ₂ ⁺	262,0868	262,0861	-2,7
		C ₈ H ₇ O ₂ ⁺	135,0441	135,0436	-3,2

Tablica D3. Sastavnice mjerne nesigurnosti za avanafil (UHPLC–QTOF).

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost		
		Kapsula	Tableta	Med
1.	Čistoća standarda	0,0118	0,0118	0,0118
2.	Volumen klipne pipete 1	0,0033	0,0033	0,0033
3.	Volumen klipne pipete 2	0,0024	0,0024	0,0024
4.	Volumen klipne pipete 3	0,0004	0,0004	0,0004
5.	Volumen odmjerne tikvice	0,0016	0,0016	0,0016
6.	Volumen menzure	0,0020	0,0020	0,0020
7.	Odvaga uzorka	0,0004	0,0004	0,0004
8.	Kalibracijski pravac	0,0665	0,0665	0,0665
9.	Međupreciznost	0,0216	0,0223	0,0215
10.	Točnost	0,0097	0,0106	0,0081
	Sastavljena mjerna nesigurnost, $u_c(x)$	0,07	0,07	0,07
	Proširena mjerna nesigurnost, $U(x)$	0,14	0,14	0,14
	Proširena mjerna nesigurnost (%)	14	14	14

Tablica D4. Sastavnice mjerne nesigurnosti za tadalafil (UHPLC–QTOF).

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost		
		Kapsula	Tableta	Med
1.	Čistoća standarda	0,0035	0,0035	0,0035
2.	Volumen klipne pipete 1	0,0033	0,0033	0,0033
3.	Volumen klipne pipete 2	0,0024	0,0024	0,0024
4.	Volumen klipne pipete 3	0,0004	0,0004	0,0004
5.	Volumen odmjerne tikvice	0,0016	0,0016	0,0016
6.	Volumen menzure	0,0020	0,0020	0,0020
7.	Odvaga uzorka	0,0004	0,0004	0,0004
8.	Kalibracijski pravac	0,1274	0,1274	0,1274
9.	Međupreciznost	0,0216	0,0227	0,0229
10.	Točnost	0,0109	0,0115	0,0101
	Sastavljena mjerna nesigurnost, $u_c(x)$	0,13	0,13	0,13
	Proširena mjerna nesigurnost, $U(x)$	0,26	0,26	0,26
	Proširena mjerna nesigurnost (%)	26	26	26

Tablica D5. Sastavnice mjerne nesigurnosti za vardenafil (UHPLC–QTOF).

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost		
		Kapsula	Tableta	Med
1.	Čistoća standarda	0,0018	0,0018	0,0018
2.	Volumen klipne pipete 1	0,0033	0,0033	0,0033
3.	Volumen klipne pipete 2	0,0024	0,0024	0,0024
4.	Volumen klipne pipete 3	0,0004	0,0004	0,0004
5.	Volumen odmjerne tikvice	0,0016	0,0016	0,0016
6.	Volumen menzure	0,0020	0,0020	0,0020
7.	Odvaga uzorka	0,0004	0,0004	0,0004
8.	Kalibracijski pravac	0,0558	0,0558	0,0558
9.	Međupreciznost	0,0211	0,0224	0,0186
10.	Točnost	0,0066	0,0104	0,0074
	Sastavljena mjerna nesigurnost, $u_c(x)$	0,06	0,06	0,06
	Proširena mjerna nesigurnost, $U(x)$	0,12	0,12	0,12
	Proširena mjerna nesigurnost (%)	12	12	12

Tablica D6. Sastavnice mjerne nesigurnosti za sildenafil (UHPLC–QTOF).

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost		
		Kapsula	Tableta	Med
1.	Čistoća standarda	0,0035	0,0035	0,0035
2.	Volumen klipne pipete 1	0,0033	0,0033	0,0033
3.	Volumen klipne pipete 2	0,0024	0,0024	0,0024
4.	Volumen klipne pipete 3	0,0004	0,0004	0,0004
5.	Volumen odmjerne tikvice	0,0016	0,0016	0,0016
6.	Volumen menzure	0,0020	0,0020	0,0020
7.	Odvaga uzorka	0,0004	0,0004	0,0004
8.	Kalibracijski pravac	0,0640	0,0640	0,0640
9.	Međupreciznost	0,0293	0,0238	0,0197
10.	Točnost	0,0104	0,0121	0,0068
	Sastavljena mjerna nesigurnost, $u_c(x)$	0,07	0,07	0,07
	Proširena mjerna nesigurnost, $U(x)$	0,14	0,14	0,13
	Proširena mjerna nesigurnost (%)	14	14	13

Tablica D7. Identifikacija sumnjivih PDE-5I analoga bez referentnih standarda HPLC-TOF metodom.

PDE-5I analozi	Vrijeme zadržavanja (min)	Kemijska formula	Teoretski m/z	Ekperimentalni m/z	Pogreška mase (ppm)
Johimbina	5,6	$C_{21}H_{27}N_2O_3^+$ $C_{11}H_{18}NO_3^+$ $C_{10}H_{10}N^+$	355,2016 212,1281 144,0808	355,1998 212,1264 144,0808	-5,1 -8,0 0,0
Propoksifenil aildenafil	7,8	$C_{24}H_{35}N_6O_4S^+$ $C_{18}H_{23}N_4O_4S^+$ $C_{18}H_{21}N_4O_2^+$ $C_{15}H_{15}N_4O_3^+$ $C_{15}H_{15}N_4O_2^+$ $C_6H_{13}N_2^+$	503,2435 391,1435 325,1659 299,1139 283,1190 113,1073	503,2412 391,1426 325,1646 299,1141 283,1195 113,1091	-4,6 -2,3 -4,0 0,7 1,8 15,9
2-Hidroksipropilnortadalafil	8,1	$C_{24}H_{24}N_3O_5^+$ $C_{17}H_{18}N_3O_3^+$ $C_{17}H_{12}NO_2^+$ $C_8H_7O_2^+$	434,1710 312,1343 262,0868 135,0441	434,1701 312,1336 262,0841 135,0430	-1,8 -2,9 -9,2 -7,4
Hidroksitiohomosildenafil	9,1	$C_{23}H_{33}N_6O_4S_2^+$ $C_{23}H_{31}N_6O_3S_2^+$ $C_{21}H_{29}N_6O_3S_2^+$	521,1999 503,1894 477,1737	521,1976 503,1873 477,1683	-4,4 -4,2 -11,3

PDE-5I analozi	Vrijeme zadržavanja (min)	Kemijska formula	Teoretski m/z	Eksperimentalni m/z	Pogreška mase (ppm)
Tiosildenafil	9,4	$C_{17}H_{19}N_4OS^+$	327,1274	327,1218	-17,1
		$C_{15}H_{15}N_4OS^+$	299,0961	299,0928	-11,0
		$C_6H_{14}N_2O^+$	129,1026	129,1019	-5,4
		$C_5H_{11}N_2^+$	99,0917	99,0920	3,0
		$C_{22}H_{31}N_6O_3S_2^+$	491,1894	491,1891	-0,6
Kloropretadlafil	12,9	$C_{17}H_{19}N_4OS^+$	327,1274	327,1306	9,8
		$C_{15}H_{15}N_4OS^+$	299,0961	299,0963	0,7
		$C_3H_8N^+$	58,0651	58,0655	6,9
		$C_{22}H_{20}ClN_2O_5^+$	427,1055	427,1068	3,0
		$C_{20}H_{16}NO_4^+$	334,1074	334,1065	-2,7
		$C_{19}H_{12}NO_3^+$	302,0812	302,0801	-3,6
		$C_{18}H_{12}NO_2^+$	274,0863	274,0852	-4,0
		$C_{17}H_{12}NO_2^+$	262,0868	262,0877	3,4
		$C_8H_7O_2^+$	135,0441	135,0441	0,0

Tablica D8. Sastavnice mjerne nesigurnosti za avanafil (HPLC–TOF).

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost		
		Kapsula	Tableta	Med
1.	Čistoća standarda	0,0118	0,0118	0,0118
2.	Volumen klipne pipete 1	0,0033	0,0033	0,0033
3.	Volumen klipne pipete 2	0,0024	0,0024	0,0024
4.	Volumen klipne pipete 3	0,0004	0,0004	0,0004
5.	Volumen odmjerne tikvice	0,0016	0,0016	0,0016
6.	Volumen menzure	0,0020	0,0020	0,0020
7.	Odvaga uzorka	0,0004	0,0004	0,0004
8.	Kalibracijski pravac	0,1393	0,1393	0,1393
9.	Međupreciznost	0,0500	0,0699	0,0579
10.	Točnost	0,0552	0,0673	0,0588
	Sastavljena mjerna nesigurnost, $u_c(x)$	0,1584	0,1702	0,1624
	Proširena mjerna nesigurnost, $U(x)$	0,3169	0,3404	0,3248
	Proširena mjerna nesigurnost (%)	32	34	32

Tablica D9. Sastavnice mjerne nesigurnosti za tadalafil (HPLC–TOF).

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost		
		Kapsula	Tableta	Med
1.	Čistoća standarda	0,0035	0,0035	0,0035
2.	Volumen klipne pipete 1	0,0033	0,0033	0,0033
3.	Volumen klipne pipete 2	0,0024	0,0024	0,0024
4.	Volumen klipne pipete 3	0,0004	0,0004	0,0004
5.	Volumen odmjerne tikvice	0,0016	0,0016	0,0016
6.	Volumen menzure	0,0020	0,0020	0,0020
7.	Odvaga uzorka	0,0004	0,0004	0,0004
8.	Kalibracijski pravac	0,1891	0,1891	0,1891
9.	Međupreciznost	0,0745	0,0561	0,0930
10.	Točnost	0,0405	0,0556	0,0654
	Sastavljena mjerna nesigurnost, $u_c(x)$	0,2073	0,2050	0,2207
	Proširena mjerna nesigurnost, $U(x)$	0,4146	0,4099	0,4414
	Proširena mjerna nesigurnost (%)	41	41	44

Tablica D10. Sastavnice mjerne nesigurnosti za vardenafil (HPLC–TOF).

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost		
		Kapsula	Tableta	Med
1.	Čistoća standarda	0,0018	0,0018	0,0018
2.	Volumen klipne pipete 1	0,0033	0,0033	0,0033
3.	Volumen klipne pipete 2	0,0024	0,0024	0,0024
4.	Volumen klipne pipete 3	0,0004	0,0004	0,0004
5.	Volumen odmjerne tikvice	0,0016	0,0016	0,0016
6.	Volumen menzure	0,0020	0,0020	0,0020
7.	Odvaga uzorka	0,0004	0,0004	0,0004
8.	Kalibracijski pravac	0,1290	0,1290	0,1290
9.	Međupreciznost	0,0519	0,0524	0,0668
10.	Točnost	0,0474	0,0598	0,0526
	Sastavljena mjerna nesigurnost, $u_c(x)$	0,1470	0,1516	0,1546
	Proširena mjerna nesigurnost, $U(x)$	0,2940	0,3032	0,3092
	Proširena mjerna nesigurnost (%)	29	30	31

Tablica D11. Sastavnice mjerne nesigurnosti za sildenafil (HPLC–TOF)

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost		
		Kapsula	Tableta	Med
1.	Čistoća standarda	0,0035	0,0035	0,0035
2.	Volumen klipne pipete 1	0,0033	0,0033	0,0033
3.	Volumen klipne pipete 2	0,0024	0,0024	0,0024
4.	Volumen klipne pipete 3	0,0004	0,0004	0,0004
5.	Volumen odmjerne tikvice	0,0016	0,0016	0,0016
6.	Volumen menzure	0,0020	0,0020	0,0020
7.	Odvaga uzorka	0,0004	0,0004	0,0004
8.	Kalibracijski pravac	0,0659	0,0659	0,0659
9.	Međupreciznost	0,0522	0,0417	0,0576
10.	Točnost	0,0275	0,0314	0,0270
	Sastavljena mjerna nesigurnost, $u_c(x)$	0,0886	0,0842	0,0917
	Proširena mjerna nesigurnost, $U(x)$	0,1772	0,1684	0,1834
	Proširena mjerna nesigurnost (%)	18	17	18

§ 9. ŽIVOTOPIS

Josipa Kosić–Vukšić (djevojačko Udiković) rođena je 19. ožujka 1981. godine u Ogulinu. Osnovnu školu i opću gimnaziju pohađala je u Ogulinu. Godine 1999. upisala je studij kemije na Prirodoslovno–matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2005. godine s temom "*Sinteza simetričnih biarila i azo spojeva iz arildiazonijevih soli katalizirana bakrovim(I) kompleksima*" pod mentorstvom prof. dr. sc. Srđanke Tomić–Pisarović i dr. sc. Ivice Cepaneca. Radni odnos započinje 2005. u tvrtki Dioki d.d. gdje obavlja poslove specijalista razvoja polimera i primjene, a potom i Voditelja razvoja polimera. U Dioki d.d. stječe iskustva i znanja o polimernim materijalima, ispitivanju polimernih materijala kao i otpadnih voda iz polimerne industrije. Osim toga radi u akreditiranom laboratoriju prema HRN EN/ISO 17025 te sudjeluje u održavanju sustava upravljanja kvalitetom i zaštite okoliša. Od 2012. godine u stalnom je radnom odnosu u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Službi za zdravstvenu ekologiju. Doktorski studij Analitičke kemije upisala je 2014. godine. U znanstvenom i stručnom radu bavi se razvojem, validacijom i primjenom kromatografskih metoda te vezanim sustavom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC–TOF). Do sada je objavila 6 znanstvenih radova. Sudjelovala je na brojnim znanstvenim i stručnim skupovima s ukupno 18 priopćenja.

Poveznica na CRORIS profil: <https://www.croris.hr/osobe/profil/38657>

Izvorni znanstveni radovi

1. J. Kosić–Vukšić; A. Krivohlavek, I. Žuntar, M. Pocrnić, N. Galić, Undeclared phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE5Is) in food supplements on the Croatian market analyzed by liquid chromatography time–of–flight mass spectrometry (LC–QTOF–MS), *Microchem. J.* **203** (2024), 110917.
2. A. Puljko, M. Milaković, S. Križanović, J. Kosić–Vukšić, I. Babić, I. Petrić, A. Maravić, M. Jelić, N. Udiković–Kolić, Prevalence of enteric opportunistic pathogens and extended–spectrum cephalosporin– and carbapenem–resistant coliforms and genes

in wastewater from municipal wastewater treatment plants in Croatia, *J. Hazard. Mater.* **427** (2022), 128155.

3. M. Milaković, G. Vestergaard, J. J. González–Plaza, I. Petrić, J. Kosić–Vukšić, I. Senta, S. Kublik, M. Schlöter, N. Udiković–Kolić, Effects of industrial effluents containing moderate levels of antibiotic mixtures on the abundance of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in exposed creek sediments, *Sci. Total Environ.* **706** (2020), 136001.
4. I. Žuntar, A. Krivohlavek, J. Kosić–Vukšić, D. Granato, D. Bursać Kovačević, P. Putnik, Pharmacological and toxicological health risk of food (herbal) supplements adulterated with erectile dysfunction medications, *Curr. Opin. Food Sci.* **24** (2018), 9–15.
5. A. Bielen, A. Šimatović, J. Kosić–Vukšić, I. Senta, M. Ahel, S. Babić, T. Jurina, J. J. González Plaza, M. Milaković, N. Udiković–Kolić, Negative environmental impacts of antibiotic–contaminated effluents from pharmaceutical industries, *Water Res.* **126** (2017), 79–87.
6. I. Cepanec, M. Litvić, J. Udiković, I. Pogorelić, M. Lovrić, Copper(I)–catalysed homo–coupling of aryl diazonium salts : synthesis of symmetrical biaryls, *Tetrahedron*, **63** (2007), 25; 5614–5621.

Priopćenja na znanstvenim i stručnim skupovima

1. M. Pocrnić, J. Kosić–Vukšić, A. Krivohlavek, N. Galić, Development and validation of liquid chromatography time–of–flight mass spectrometry method for analysis of phosphodiesterase type 5 inhibitors in food supplements, Kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane, Poreč, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **75** (2024) 78.
2. J. Kosić–Vukšić, A. Krivohlavek, M. Pocrnić, N. Galić, I. Žuntar, Analysis of phosphodiesterase type 5 inhibitors in food supplements using liquid chromatography–quadrupole time–of–flight–mass spectrometry, Kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane, Poreč, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **75** (2024) 75.
3. J. Kosić–Vukšić, S. Milovac, I. Mandić Andačić, M. Bago, A. Krivohlavek, Anonymous testing of samples for the presence of drugs or psychotropic substances, Summer Conference of Croatian Chemical Society Rijeka – Pula, Rijeka, 2024, Knjiga sažetaka str. 49.

4. N. Udiković Kolić, J. Kosić–Vukšić, A. Puljko, S. Dekić Rozman, Carbapenem resistance in Croatian municipal wastewater, 58th Croatian & 18th International Symposium on Agriculture, Dubrovnik, 2023, Knjiga sažetaka str. 43.
5. A. Baković Kovačević, J. Kosić–Vukšić, S. Tolić, A. Krivohlavek, Determination of Chlorite, Chlorate and Bromate by Ion Chromatography, Water for all, Osijek, 2022, Knjiga sažetaka str. 103–104.
6. A. Krivohlavek, J. Bošnjir, M. Ivešić, J. Kosić Vukšić, S. Šikić, What is hidden in food supplements? 13th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH, Osijek, 2021, Knjiga sažetaka str. 72.
7. J. Kosić–Vukšić, A. Krivohlavek, P. Novak, Phosphodiesterase type 5 inhibitors in dietary supplemets using LC–TOF method, 5. Simpozij studenata doktorskih studija PMF–a, Zagreb, 2021, Knjiga sažetaka str. 342.
8. J. Kosić–Vukšić, V. Šušnjara, S. Tolić, A. Krivohlavek, Irrigation water quality in urban gardens of Zagreb, 3rd International Congress on Food Safety and Quality “Food, Health and Climate Changes”, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **71** (1) (2020) 49–52.
9. A. Krivohlavek, J. Kosić Vukšić, M. Ivešić, I. Žuntar, S. Šikić, Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase–5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC–ESI–MS/MS and by LC-TOF on market in period 2012–2019., University of Chemistry and Technology, Prag, 2019, str. 281.
10. J. Bošnjir, D. Lasić, L. Barušić, I. Prskalo, J. Kosić–Vukšić, Dodaci prehrani i mogućnosti njihova patvorenja, Zagreb, 2019, Glasnik Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu str. 29.
11. J. Kosić–Vukšić, M. Bevardi, A. Krivohlavek, Determination of corticosteroids using liquid chromatography/time–of–flight mass spectrometry, Kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **68** (2017) 58.
12. J. Bošnjir, M. Bevardi, D. Lasić, J. Kosić–Vukšić, L. Barušić, Otkrivanje sastojaka patvorenosti hrane i predmeta opće uporabe, Povezivanje obrazovanja i najbolje prakse, Zdravstveno veleučilište, Zagreb, 2017. str. 100.
13. A. Bielen, A. Šimatović, J. Kosić–Vukšić, I. Senta, S. Babić, J. J. Gonzalez Plaza, T. Jurina, N. Udiković Kolić, Negative environmental impacts of effluents from pharmaceutical industry, 2. Simpozij o biologiji slatkih voda, Zagreb, 2017, Zbornik radova str. 5.

14. M. Bevardi, J. Kosić–Vukšić, M. Petrović, A. Krivohlavek, Fast screening method for determination of melamine in high protein food, Kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **68** (1) (2017) 57.
15. J. Kosić–Vukšić, Determination and validation of free cyanide in water by ion chromatography, 16th International Chromatography School, Zagreb, 2016, Knjiga sažetaka str. 12–13.
16. J. Perić Ivanagić, J. Kosić–Vukšić, S. Tolić, Ionska kromatografija u analizi voda, II. međunarodni i VI. hrvatski znanstveno–stručni skup Voda za sve, Osijek, 2016, Zbornik radova str. 105–106.
17. M. Jukić, L. Ćurković, J. Šabarić, J. Kosić Vukšić, Z. Šokčević, Speciation of heavy metals in fly ash using the bcr sequential extraction procedure, 4th International Symposium on Environmental Management – Towards Circular Economy, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2016, Zbornik radova str. 50.
18. J. Kosić–Vukšić, S. Tolić, A. Devčić–Jeras, Osiguranje kvalitete rezultata ispitivanja provođenjem međulaboratorijskih usporedbi, XIX. Znanstveno-stručni skup „Voda i javna vodoopskrba”, Trakošćan, 2015, Zbornik radova str. 168–169.

