



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

**Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Ústav analýzy potravin a výživy**

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Metodika hmotnostně-spektrometrického screeningu nedeklarovaných
syntetických inhibitorů fosfodiesterázy typu 5 (PDE-5) a jejich analogů
v herbálních doplňcích stravy**

Monika Jírů, Zbyněk Džuman, Milena Stránská, Jana Hajšlová

Praha, 2016

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky v rámci řešení projektu NAZV č. QJ1530272 a dále byla tato práce realizována v rámci “Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost” (CZ.2.16/3.1.00/21537) za podpory “Národního programu udržitelnosti I” - NPU I (LO1601 - č.: MSMT-43760/2015).

Metodu zpracovali:

Ing. Monika Jírů¹, Ing. Zbyněk Džuman¹, doc. Ing. Milena Stránská, PhD¹, prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.¹

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Ústav analýzy potravin a výživy, FPBT
Technická 3, 166 28 Praha – 6 Dejvice

Oponenti:

Ing. Radim Štěpán, PhD. – Státní zemědělská a potravinářská inspekce, ředitel inspektorátu SZPI v Praze

Ing. Alexandra Malachová, PhD. - Center for Analytical Chemistry, Konrad-Lorenz-Straße 20
3430 Tulln an der Donau

© Monika Jírů, Zbyněk Džuman, Milena Stránská, Jana Hajšlová, 2016

ISBN 978-80-7080-981-5

Obsah

1	Cíl metodiky.....	4
2	Teoretický úvod	5
3	Vlastní popis metodiky	6
3.1	Použitelnost metody.....	6
3.2	Princip metody	6
3.3	Bezpečnost práce	6
3.4	Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál.....	6
3.5	Přístroje a zařízení.....	8
3.6	Pracovní postup.....	8
3.6.1	Příprava zásobních roztoků standardů	8
3.6.2	Příprava kalibračních roztoků standardů	10
3.6.3	Příprava vzorků k analýze.....	10
3.7	Separace a detekce	11
3.7.1	Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie	11
3.7.2	Identifikace a kvantitativní vyhodnocení analytů	12
3.8	Pracovní charakteristiky metody.....	16
3.8.1	Správnost metody	16
3.8.2	Rozsah metody a linearita.....	17
3.8.3	Mez stanovitelnosti (LCL = lowest calibration level)	17
3.8.4	Opakovatelnost metody	17
4	Srovnání novosti postupů.....	20
5	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	21
6	Ekonomické aspekty	22
7	Seznam související použité literatury	25

1 Cíl metodiky

Jedním z dílčích cílů projektu QJ1530272 podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout, optimalizovat a validovat novou analytickou metodu využívající techniky ultra-účinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (U-HPLC–HRMS/MS) pro průkaz falšování herbálních doplňků stravy na podporu erekce syntetickými inhibitory fosfodiesterázy typu 5 (PDE-5) a jejich analogy (n = 59).

Vyvinutá metodika umožní rychlou kvantifikaci PDE-5 inhibitorů, ale díky využití vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie také komplexní screening (fingerprinting) zkoumaných matric herbálních doplňků stravy, kdy je umožněno i retrospektivní prohledávání hmotnostních spekter a dodatečná identifikace zájmových látek. Metodika je využitelná pro účely průkazu falšování herbálních doplňků stravy na podporu erekce.

2 Teoretický úvod

Doplňky stravy jsou v posledních letech komoditou, která na světovém trhu zaujímá stále větší část a jejíž popularita má vzrůstající charakter. Mnoho lidí dává přednost přírodní alternativní medicíně před syntetickými léčivy. Navzdory jejich velké spotřebě, nejsou doplňky stravy adekvátně kontrolovány a tím se vytváří prostor pro falšování¹. Přispívá k tomu také fakt, že se doplňky stravy začaly prodávat a distribuovat přes internet, kde je výrobci nabízí často levněji, s neznámým původem a složením². Mezi nejčastěji falšované doplňky stravy patří bylinné doplňky stravy pro léčbu erektilní dysfunkce, kdy jsou do nich nelegálně přidávány syntetické inhibitory enzymu PDE-5.

Léčiva působící proti erektilní dysfunkci obsahují jako aktivní látku inhibitory PDE-5, jako jsou sildenafil, tadalafil, vardenafil. Inhibicí PDE-5 tyto látky zabrání hydrolýze cGMP a prodlouží proto dobu erekce³. Sildenafil byl, jako účinná látka preparátu Viagra[®], dlouho jediným dostupným inhibitorem PDE-5 použitelným k léčbě erektilní dysfunkce, dokud nebyly objeveny tadalafil (účinná látka přípravku Cialis[®]) a vardenafil hydrochlorid (Levitra[®]). Nicméně při používání těchto léků dochází k nežádoucím interakcím s jinými léčivy, např. s antihypertenzivy, antidepresivy, sedativy, anxiolytiky a zejména s nitráty a donory NO. Proto ne všichni muži mohou užívat léky s PDE-5 inhibitory a pro tyto lidi jsou další alternativou v boji s nemocí herbální doplňky stravy na podporu erekce, kterých se na trhu nachází celá řada^{3,4}.

Za účelem zvýšení léčivého účinku jsou herbální doplňky stravy pro podporu erekce označené jako stoprocentně přírodní velice často falšovány přidavkem PDE-5 inhibitorů a jejich analogů. Velké nebezpečí pro zdraví spotřebitelů představují především nové analogy PDE-5 inhibitorů, protože pro jejich identifikaci a detekci nejsou běžně zavedené vhodné metody a nejsou přesně známy mechanismy jejich účinku na organismus⁴. Vzhledem k tomu, že dochází k neustálému vývoji nových analogů inhibitorů PDE-5 je třeba nepřetržitě pracovat na vývoji nových a dokonalejších analytických technik a tyto doplňky stravy by měly být rutinně kontrolovány.

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Použitelnost metody

Metoda je určena pro analytické stanovení 59 syntetických inhibitorů fosfodiesterázy typu 5 (PDE-5) a jejich analogů, konkrétně 33 analogů sildenafilu, 13 analogů tadalafilu, 7 analogů vardenafilu a 6 látek rostlinného původu. Je použitelná pro stanovení těchto analytů především v herbálních doplňcích stravy.

3.2 Princip metody

PDE-5 inhibitory jsou ze vzorku herbálního doplňku stravy extrahovány směsí acetonitril/voda (1:1, v/v) a následně podle potřeby naředěny. Identifikace a kvantifikace jednotlivých cílových analytů se provádí pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie ve spojení vysokorozlišovací tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (U-HPLC–HRMS/MS). Jednotlivé analyty jsou kvantifikovány pomocí metody externí kalibrace (kalibrační křivka).

3.3 Bezpečnost práce

Během manipulace se standardy inhibitorů PDE-5 je třeba dodržovat základní pravidla bezpečnosti práce v laboratoři. V případě kontaktu s pokožkou či očima mohou roztoky PDE-5 inhibitorů způsobit podráždění. Proto je nezbytné pracovat v laboratorních rukavicích během přípravy zásobních standardních roztoků a celé další přípravy vzorků.

3.4 Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál

- Acetonitril, HPLC gradient, Sigma-Aldrich (USA)
- Deionizovaná voda (přečištěná z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q, Millipore, Německo)
- Kyselina mravenčí p.a., Fluka Sigma-Aldrich (USA)
- Mravenčan amonný 99%, Sigma-Aldrich (USA)
- Technické plyny: dusík 5.0, dusík 4.0, Linde Technoplyn (ČR)
- Standardy jednotlivých inhibitorů PDE-5 (**Tabulka 1**)
- Mikrofiltry, 0,2 µm, Ciro (USA)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení, Simax (ČR)
- Plastové (PTFE) odměrné baňky (5, 10 ml)

- Skleněné vialky (2 ml), víčka, septa, Labicom (ČR)
- Plastové (PTFE) kyvety (15 ml), Merci (ČR)

Tabulka I: Přehled standardů jednotlivých inhibitorů PDE-5.

	Č.	Analyt	CAS	Výrobce	Kód produktu	Množství standardu
ANALOGY SILDENAFILU	1	Acetildenafil (Hondgdenafil)	831217-01-7	TRC	A161600	1 mg
	2	Benzylsildenafil	N/A	Cachesyn	CSTS0631	5 mg
	3	Carbodenafil	N/A	Cachesyn	CSTS0618	5 mg
	4	Chlorodenafil	1058653-74-9	TRC	C365535	250 mg
	5	Desmethyl Thiosildenafil	479073-86-4	TRC	D294350	2.5 mg
	6	Dimethylsildenafil (Thioildenafil)	N/A	TLC Pharmachem	S-0612	5 mg
	7	Dimethylacetildenafil	N/A	TLC Pharmachem	S-0638	5 mg
	8	Dinitrodenafil	N/A	TRC	D479775	100 mg
	9	Gendenafil	147676-66-2	TRC	G349960	5 mg
	10	Gisadenafil besylate	334827-98-4	Sigma	PZ0172	5 mg
	11	Hydroxy Chlorodenafil	1391054-00-4	TRC	H825115	250 mg
	12	Hydroxy Acetildenafil	147676-56-0	TRC	H739940	5 mg
	13	Hydroxyhomo Sildenafil (Lodenafil)	139755-85-4	TRC	H942840	2 mg
	14	Hydroxythiohomosildenafil	N/A	Cachesyn	CSTS0611	5 mg
	15	Imidazosagatriazinone	139756-21-1	TRC	E892725	500 mg
	16	Isosildenafil	253178-46-0	TRC	I900800	5 mg
	17	Lodenafil carbonate	398507-55-6	TRC	L469300	100 mg
	18	Methisosildenafil (Aildenafil)	496835-35-9	TRC	M225935	5 mg
	19	N-Desmethyl Sildenafil	139755-82-1	TRC	D292200	5 mg
	20	Nitrodenafil	147676-99-1	TRC	N493770	500 mg
	21	Nor Acetildenafil	949091-38-7	TRC	N660500	1 mg
	22	Norneo Sildenafil	371959-09-0	TRC	N824300	2 mg
	23	Piperiacetildenafil	N/A	Cachesyn	CSTS0616	5 mg
	24	Propoxyphenyl Homohydroxysildenafil	139755-87-6	TRC	P831600	10 mg
	25	Propoxyphenylsildenafil	N/A	Cachesyn	CSTS0648	5 mg
	26	Propoxyphenyl Thiosildenafil	479073-87-5	TRC	P831635	5 mg
	27	Propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil	479073-90-0	TRC	P831630	5 mg
	28	Pyrazole N-Demethyl Sildenafil	139755-95-6	TRC	P842800	1 mg
	29	Sildenafil	139755-83-2	TRC	S435000	25 mg
	30	Sildenafil-N-Oxide	1094598-75-0	TRC	S435035	10 mg
	31	Thioildenafil (Thiomethisosildenafil)	856190-47-1	TRC	T344365	2 mg
	32	Thiohomo Sildenafil	479073-80-8	TRC	T344470	2 mg
	33	Thiosildenafil	479073-79-5	TRC	T371500	5 mg
ANALOGY TADALAFILU	34	2-hydroxypropyl Nortadalafil	1353020-85-5	TRC	H952705	100 mg
	35	Acetaminotadalafil	1446144-71-3	TRC	A161250	2.5 mg
	36	Amino Tadalafil	385769-84-6	TRC	A629550	2 mg
	37	Chloropretadalafil	171489-59-1	TRC	M330125	50 mg
	38	Desmethylene Tadalafil	171489-03-5	TRC	D291990	5 mg
	39	N-butyltadalafil	171596-31-9	TLC Pharmachem	T-106	5 mg
	40	N-Desmethyl Tadalafil (Nortadalafil)	171596-36-4	TRC	D293800	2 mg
	41	N-ethyltadalafil	1609405-34-6	TLC Pharmachem	T-1013	5 mg
	42	N-Octyl Nortadalafil	1173706-35-8	TRC	O241350	5 mg
	43	Tadalafil	171596-29-5	TRC	T004500	10 mg

	Č.	Analyt	CAS	Výrobce	Kód produktu	Množství standardu
ANALOGY VARDENAFILU	44	Vardenafil	224789-15-5	TRC	V098001	5 mg
	45	Vardenafil-N-oxide	N/A	TLC Pharmachem	V-0522	5 mg
	46	Vardenafil oxopiperazine	448184-58-5	TLC Pharmachem	V-0518	5 mg
	47	Acetylvardenafil	N/A	TLC Pharmachem	V-058	5 mg
	48	Benzamidenafil (Rac xanthoanthrafil)	1020251-53-9	TRC	X500000	2 mg
	49	Hydroxythiovaridenafil	912576-30-8	TRC	H963400	1 mg
	50	Hydroxy Vardenafil	224785-98-2	TRC	H995300	2.5 mg
	51	N-Desethyl Vardenafil	448184-46-1	TRC	D289950	2 mg
	52	Norneo Vardenafil	358390-39-3	TRC	N824500	100 mg
	53	Pseudo Vardenafil	224788-34-5	TRC	P839615	5 mg
LÁTKY ROSTLINNÉHO PŮVODU	54	Avanafil	330784-47-9	TRC	A794670	10 mg
	55	Icariin	489-32-7	Sigma	I1286	100 mg
	56	Mirodenafil	862189-95-5	Cachesyn	CSTM321	5 mg
	57	Udenafil	268203-93-6	TRC	U250500	5 mg
	58	Yohimbine	65-19-0	Sigma Aldrich	Y3125	1 000 mg
	59	Zaprinast	37762-06-4	Sigma Aldrich	Z0878	25 mg

3.5 Přístroje a zařízení

- Elektronické předvážky, model HF-1200G, A&D Instruments LTD (Japonsko)
- Analytické váhy, model GR-202, A&D Instruments LTD (Japonsko)
- Centrifuga Rotina 35R, Hettich (Německo)
- Centrifuga Eppendorf 5430, Eppendorf (Německo)
- Přístroj pro přípravu deionizované vody Milli-Q, Millipore (Německo)
- Třepačka Vortex Phoenix RS-V, IKA Labortechnik (Německo)
- Automatické pipety 0,5 - 5 ml a 10 ml, TreffLab (Švýcarsko)
- Automatické mikropipety 100 - 1000 µl a 20 - 200 µl, Biohit (Finsko)
- LC-MS instrumentace
 - Ultra-účinný kapalinový chromatograf UltiMate[®] 3000 RSLC, Thermo Scientific (USA)
 - Analytická kolona Kinetex[®] C18 (100 x 2,1 mm; 2,6 µm), Phenomenex (USA)
 - Hmotnostní spektrometr Q-Exactive Plus[™], Thermo Scientific (USA)

3.6 Pracovní postup

3.6.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Standardy jednotlivých inhibitorů PDE-5 jsou od výrobců dodávány jako pevné látky, které jsou před použitím rozpuštěny v acetonitrilu a uchovávány v mrazničce při teplotě - 18 °C. Základní roztoky standardů a jejich koncentrace jsou uvedeny v **Tabulce II**. Z uvedených základních roztoků standardů je připraven zásobní standard o koncentraci 2000 ng/ml.

Tabulka II: Přehled zásobních standardů analytů a jejich ředění pro přípravu směsného pracovního standardu.

	Č.	Analyt	Koncentrace zásobního standardu [µg/ml]	Směsný pracovní standard [2 000 ng/ml]
				Přídavek zásobního roztoku standardu [µl]
ANALOGY SILDENAFILU	1	Acetildenafil (Hondgdenafil)	100	200
	2	Benzylsildenafil	500	40
	3	Carbodenafil	500	40
	4	Chlorodenafil	2000	10
	5	Desmethyl Thiosildenafil	250	80
	6	Dimethylsildenafil (Thioildenafil)	500	40
	7	Dimethylacetildenafil	500	40
	8	Dinitrodenafil	2000	10
	9	Gendenafil	500	40
	10	Gisadenafil besylate	500	40
	11	Hydroxy Chlorodenafil	2000	10
	12	Hydroxy Acetildenafil	500	40
	13	Hydroxyhomo Sildenafil (Lodenafil)	200	100
	14	Hydroxythiohomosildenafil	500	40
	15	Imidazosagatriazinone	2000	10
	16	Isosildenafil	500	40
	17	Lodenafil carbonate	2000	10
	18	Methisosildenafil (Aildenafil)	500	40
	19	N-Desmethyl Sildenafil	500	40
	20	Nitrodenafil	2000	10
	21	Nor Acetildenafil	100	200
	22	Norneo Sildenafil	200	100
	23	Piperiacetildenafil	500	40
	24	Propoxyphenyl Homohydroxysildenafil	1000	20
	25	Propoxyphenylsildenafil	500	40
	26	Propoxyphenyl Thiosildenafil	500	40
	27	Propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil	500	40
	28	Pyrazole N-Desmethyl Sildenafil	100	200
	29	Sildenafil	2500	8
	30	Sildenafil-N-Oxide	1000	20
	31	Thioildenafil (Thiomethisosildenafil)	200	100
	32	Thiohomo Sildenafil	200	100
	33	Thiosildenafil	500	40
ANALOGY TADALAFILU	34	2-hydroxypropyl Nortadalafil	2000	10
	35	Acetaminotadalafil	250	80
	36	Amino Tadalafil	200	100
	37	Chloropretadalafil	5000	4
	38	Desmethylene Tadalafil	500	40
	39	N-butyltadalafil	500	40
	40	N-Desmethyl Tadalafil (Nortadalafil)	200	100
	41	N-ethyltadalafil	500	40
	42	N-Octyl Nortadalafil	500	40
	43	Tadalafil	1000	20

	Č.	Analyt	Koncentrace zásobního standardu [µg/ml]	Směsný pracovní standard [2 000 ng/ml]
				Přídavek zásobního roztoku standardu [µl]
ANALOGY VARDENAFILU	44	Vardenafil	500	40
	45	Vardenafil-N-oxide	500	40
	46	Vardenafil oxopiperazine	500	40
	47	Acetylvardenafil	500	40
	48	Benzamidenafil (Rac xanthoanthrafil)	200	100
	49	Hydroxythiovardenafil	100	200
	50	Hydroxy Vardenafil	250	80
	51	N-Desethyl Vardenafil	200	100
	52	Norneo Vardenafil	2000	10
	53	Pseudo Vardenafil	500	40
LÁTKY ROSTLINNÉHO PŮVODU	54	Avanafil	1000	20
	55	Icariin	2000	10
	56	Mirodenafil	500	40
	57	Udenafil	500	40
	58	Yohimbine	2000	10
	59	Zaprinast	2500	8

3.6.2 Příprava kalibračních roztoků standardů

Jednotlivé kalibrační standardy (body kalibrační křivky) o koncentracích 1 až 500 ng/ml jsou připraveny odebráním vypočítaných objemů ze směsného pracovního standardu obsahujícího všech 59 inhibitorů PDE-5 do vialek, odfoukáním acetonitrilu jemným proudem dusíku a rozpuštěním v 1 ml směsi acetonitril/voda (1:1, v/v).

3.6.3 Příprava vzorků k analýze

Na analytických vahách se nejprve zváží celé tablety vcelku a v případě vzorků ve formě tobolek se také zvlášť zváží obsah i obal tobolky. Vzorky ve formě tablet se následně zhomogenizují pomocí třecí misky s tloučkem. 100 mg vzorku se naváží do 15 ml centrifugační kyvety a extrahuje se do 5 ml směsi acetonitril/voda (1:1, v/v) intenzivním třepáním po dobu 2 minut. Po protřepání se kyvety odstředí na centrifuze při 10 000 RPM po dobu 5 min a extrakt se přečistí pomocí mikro-filtrace (2 min, 5 000RPM) a přečištěný extrakt je odebrán do vialky k analýze. Vzhledem k vysokým koncentracím sledovaných analytů ve vzorcích se vzorky před analýzou naředí (10x, 100x, 1000x). Z důvodu neznámé počáteční koncentrace jsou analyzovány všechny nezředěné i zředěné vzorky. Pro výpočet koncentrace bude použit vzorek, který plochami analytů nejlépe odpovídá lineárnímu rozsahu kalibrační křivky.

3.7 Separace a detekce

3.7.1 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Pro kvantitativní stanovení cílových analytů je využito instrumentace sestávající z ultra-účinného kapalinového chromatografu s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem v kombinaci analyzátorů kvadrupól a vysokorozlišovací analyzátor typu orbitrap (U-HPLC–HRMS/MS). Hmotnostně spektrometrická detekce je prováděna s ionizací elektrosprejem v pozitivním modu (ESI+). Charakteristiky kapalinové chromatografie, použitý gradient mobilní fáze a podmínky hmotnostní spektrometrie jsou shrnuty v **Tabulkách III-V**.

Tabulka III: Parametry kapalinové chromatografie (U-HPLC)

Systém	UltiMate [®] 3000 RSLC (Thermo Scientific, USA)
Kolona	Kinetex [®] C18 (100 x 2,1 mm; 2,6 µm), Phenomenex (USA)
Teplota kolony	40 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Objem nástriku	2 µl
Mobilní fáze	A: 5 mM mravenčan amonný + 0,2% HCOOH B: acetonitril
Délka metody	12 min
Gradient mobilní fáze	viz. Tab. IV

Tabulka IV: Gradient mobilní fáze pro U-HPLC-(ESI+)-HRMS/MS

t [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
1	90	10
8	0	100
10	0	100
10,1	90	10
12	90	10

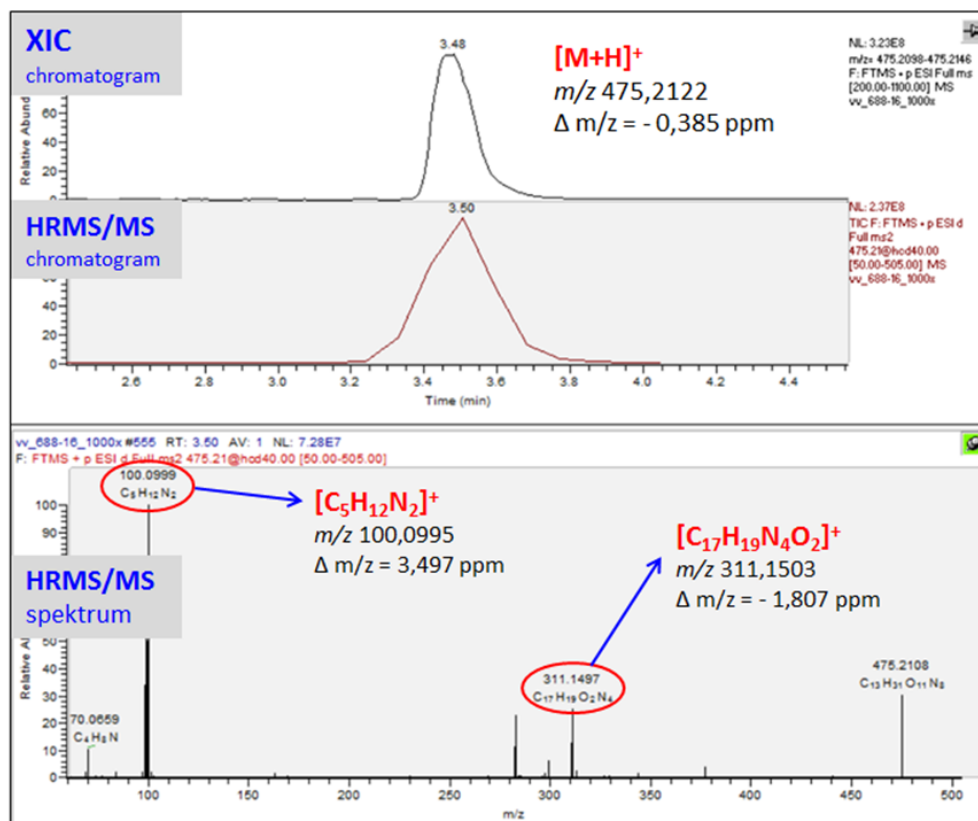
Tab. V: Hmotnostně-spektrometrické podmínky analýz

Hmotnostní spektrometr	Q-Exactive Plus [™] (Thermo Scientific, USA)
Podmínky ionizace (ESI)	
Ionizace	ESI +
Nosný/pomocný plyn (N ₂)	35/7 arb. j.
Teplota kapiláry	250°C
Vypařovací teplota	250°C
Napětí na elektrospreji	3,5 kV

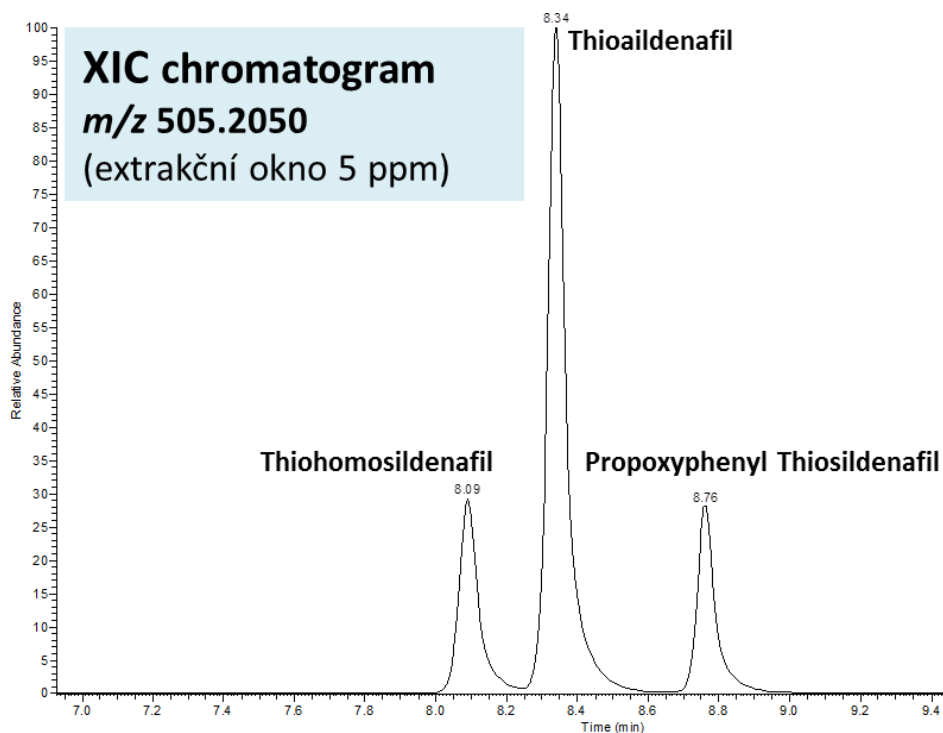
S-lens hodnota	55
Podmínky akvizičního módu <i>fullMS</i>	
Rozlišení	70 000
Akviziční rychlost	3 Hz
Hmotnostní rozsah	300 - 800 <i>m/z</i>
Automatická regulace citlivosti (AGC target)	3e ⁶
Maximální doba nástřiku (max IT)	100 ms
Podmínky akvizičního módu <i>ddMS2 (data dependent MS2)</i>	
Rozlišení	17 500
Akviziční rychlost	12 Hz
Hmotnostní rozsah	<i>m/z</i> 50 - <i>m/z</i> fragmentovaného analytu (+25)
Šířka izolačního okna	1 <i>m/z</i>
Automatická regulace citlivosti (AGC target)	1e ⁵
Maximální doba nástřiku (max IT)	50 ms
Normalizovaná kolizní energie (NCE)	28, 35, 42%
Dynamické vyloučení analytu	3 s

3.7.2 Identifikace a kvantitativní vyhodnocení analytů

Stanovované analyty jsou identifikovány na základě sledování přesných hmot (*m/z*), porovnáním retenčních časů s příslušnými standardy, porovnáním hmotnostních spekter po fragmentaci cílových analytů a izotopového zastoupení jednotlivých analytů ve vzorcích a standardech s využitím vyhodnocovacího softwaru SW TraceFinder 2.2 (Thermo Scientific). Pro identifikované analyty je následně vytvořena procesovací metoda v softwaru Xcalibur® 3.0 (Thermo Scientific) a pozitivní analyty jsou kvantifikovány. Ke kvantifikaci vzorků je použita kalibrace pomocí rozpouštědlových standardů, která byla zvolena vzhledem k předpokládané vysoké koncentraci analytů ve vzorcích. Analyty se ve vzorcích kvantifikují až po mnohonásobném zředění původního extraktu, což eliminuje ovlivnění kvantifikace možnými matričními efekty. Na **Obrázku 1** je uveden příklad identifikace sildenafilu ve vzorku na **Obrázku 2** příklad úspěšné separace analytů o stejné *m/z*. Přehled iontů stanovovaných analytů je uveden v **Tabulce VI** a přehled identifikovaných fragmentů v **Tabulce VII**.



Obrázek 1: Příklad identifikace sildenafilu ve vzorku

Obrázek 2: Příklad chromatografické separace inhibitorů PDE-5 o stejné m/z ve směsném standardu na hladině 100 ng/ml.

Tabulka VI: Sledované ionty inhibitorů PDE-5

	Č.	Analyt	Sumární vzorec	RT [min]	Molární hmotnost	[M+H] ⁺
ANALOGY SILDENAFILU	1	Acetildenafilil (Hondgdenafil)	C25H34N6O3	2.75	466.2687	467.2765
	2	Benzylsildenafilil	C28H34N6O4S	7.12	550.2357	551.2435
	3	Carbodenafil	C24H32N6O3	2.14	452.2530	453.2609
	4	Chlorodenafil	C19H21ClN4O3	9.78	388.1297	389.1375
	5	Desmethyl Thiosildenafilil	C21H28N6O3S2	7.61	476.1659	477.1737
	6	Dimethylsildenafilil (Thioaildenafil)	C23H32N6O4S	4.25	488.2200	489.2279
	7	Dimethylacetildenafilil	C25H34N6O3	3.01	466.2687	467.2765
	8	Dinitrodenafil	C17H18N6O6	10.05	402.1282	403.1361
	9	Gendenafil	C19H22N4O3	8.69	354.1686	355.1765
	10	Gisadenafil besylate	C23H33N7O5S	2.55	519.2258	520.2337
	11	Hydroxy Chlorodenafil	C19H23ClN4O3	8.54	390.1453	391.1531
	12	Hydroxy Acetildenafilil	C25H34N6O4	2.34	482.2636	483.2714
	13	Hydroxyhomo Sildenafilil (Lodenafil)	C23H32N6O5S	3.49	504.2149	505.2228
	14	Hydroxythiohomosildenafilil	C23H32N6O4S2	7.57	520.1921	521.1999
	15	Imidazosagatriazinone	C17H20N4O2	10.28	312.1581	313.1659
	16	Isosildenafilil	C22H30N6O4S	2.30	474.2044	475.2122
	17	Lodenafil carbonate	C47H62N12O11S2	9.88	1034.4097	1035.4175
	18	Methisosildenafilil (Aildenafilil)	C23H32N6O4S	4.25	488.2200	489.2279
	19	N-Desmethyl Sildenafilil	C21H28N6O4S	3.52	460.1887	461.1966
	20	Nitrodenafil	C17H19N5O4	10.01	357.1432	358.1510
	21	Nor Acetildenafilil	C24H32N6O3	2.50	452.2530	453.2609
	22	Norneo Sildenafilil	C22H29N5O4S	10.72	459.1935	460.2013
	23	Piperiacetildenafilil	C24H31N5O3	3.32	437.2421	438.2500
	24	Propoxyphenyl	C24H34N6O5S	4.68	518.2306	519.2384
	25	Propoxyphenylsildenafilil	C23H32N6O4S	4.83	488.2200	489.2279
	26	Propoxyphenyl Thiosildenafilil	C23H32N6O3S2	8.76	504.1972	505.2050
	27	Propoxyphenyl-	C24H34N6O4S2	8.57	534.2077	535.2156
	28	Pyrazole N-Demethyl Sildenafilil	C21H28N6O4S	5.25	460.1887	461.1966
	29	Sildenafilil	C22H30N6O4S	3.62	474.2055	475.2122
	30	Sildenafilil-N-Oxide	C22H30N6O5S	3.95	490.1993	491.2071
	31	Thioaildenafil (Thiomethisosildenafilil)	C23H32N6O3S2	8.34	504.1972	505.2050
	32	Thiohomo Sildenafilil	C23H32N6O3S2	8.09	504.1972	505.2050
	33	Thiosildenafilil	C22H30N6O3S2	7.77	490.1815	491.1894
ANALOGY TADALAFILU	34	2-hydroxypropyl Nortadalafil	C24H23N3O5	5.99	433.1632	434.1710
	35	Acetaminotadalafil	C23H20N4O5	4.99	432.1428	433.1506
	36	Amino Tadalafil	C21H18N4O4	4.82	390.1323	391.1401
	37	Chloropretadalafil	C22H19ClN2O5	9.96	426.0977	427.1055
	38	Desmethylen Tadalafil	C21H19N3O4	3.17	377.1370	378.1448
	39	N-butyltadalafil	C25H25N3O4	9.76	431.1840	432.1918
	40	N-Desmethyl Tadalafil (Nortadalafil)	C21H17N3O4	5.11	375.1214	376.1292
	41	N-ethyltadalafil	C23H21N3O4	7.57	403.1527	404.1605
	42	N-Octyl Nortadalafil	C29H33N3O4	11.50	487.2466	488.2544
	43	Tadalafil	C22H19N3O4	6.34	389.1370	390.1448

	Č.	Analyt	Sumární vzorec	RT [min]	Molární hmotnost	[M+H] ⁺
ANALOGY VARDENAFILU	44	Vardenafil	C23H32N6O4S	2.63	488.2211	489.2279
	45	Vardenafil-N-oxide	C23H32N6O5S	2.81	504.2149	505.2228
	46	Vardenafil oxopiperazine	C21H26N6O5S	3.90	474.1680	475.1758
	47	Acetylvardenafil	C25H34N6O3	1.74	466.2687	467.2765
	48	Benzamidenafil (Rac xanthoanthrafil)	C19H23N3O6	6.59	389.1581	390.1660
	49	Hydroxythiovardenafil	C23H32N6O4S2	5.57	520.1921	521.1999
	50	Hydroxy Vardenafil	C23H32N6O5S	2.39	504.2149	505.2228
	51	N-Desethyl Vardenafil	C21H28N6O4S	2.39	460.1887	461.1966
	52	Norneo Vardenafil	C18H20N4O4	3.88	356.1479	357.1557
	53	Pseudo Vardenafil	C22H29N5O4S	9.65	459.1935	460.2013
LÁTKY ROSTLINNÉHO PŮVODU	54	Avanafil	C23H26ClN7O3	3.51	483.1780	484.1858
	55	Icariin	C33H40O15	3.65	676.2362	677.2440
	56	Mirodenafil	C26H37N5O5S	6.99	531.2510	532.2588
	57	Udenafil	C25H36N6O4S	4.84	516.2513	517.2592
	58	Yohimbine	C21H26N2O3	1.51	354.1938	355.2016
	59	Zaprinast	C13H13N5O2	4.02	271.1064	272.1142

Tabulka VII: Přehled identifikovaných fragmentů inhibitorů PDE-5

	Č.	Analyt	Optimální NCE _{rel}	Fragment 1		Fragment 2		Fragment 3		Fragment 4		Fragment 5	
				Sum. v.z.	m/z	Sum. v.z.	m/z	Sum. v.z.	m/z	Sum. v.z.	m/z	Sum. v.z.	m/z
ANALOGY SILDENAFILU	1	Acetildenafilil (Hondgdenafil)	45	C6H11N2	111.0917	C7H15N2	127.1230	C5H10N	84.0808	C16H17N4O2	297.1346	C6H12N2	112.0995
	2	Benzylsildenafilil	30	C7H7	91.0542	C17H21N4O4S	377.1278	C21H27N6O4S	459.1809	C27H34N5O3S	508.2377	C9H12N	134.0964
	3	Carb sildenafilil	50	C16H15N4O3	311.1139	C8H5O4	165.0182	C8H12N3O	166.0975	C15H15N4O2	283.1190	C14H15N4O	255.1240
	4	Chlor sildenafilil	40	C17H18N4O3Cl	361.1062	C15H17N4O2	285.1346	C16H15N4O3	311.1139	C17H21N4O2	313.1659	C16H17N4O2	297.1346
	5	Desmethyl Thiosildenafilil	45	C15H15N4O5	299.0961	C4H9N2	85.0760	C17H19N4O5	327.1274	C15H14N4O5	298.0883	C17H19N4O5	327.1274
	6	Dimethylsildenafilil (Thio sildenafilil)	45	C5H11N2	99.0917	C4H9N	71.0730	C6H13N2	113.1073	C15H15N4O2	283.1190	C17H19N4O2	311.1503
	7	Dimethylacetildenafilil	45	C7H15N2	127.1230	C6H11N2	111.0917	C16H17N4O2	297.1346	C18H21N4O2	325.1659	C22H28N5O3	410.2187
	8	Dinitro sildenafilil	25	C15H15N6O6	375.1048	C15H14N6O5	358.1020	-	-	-	-	-	-
	9	G sildenafilil	50	C15H17N4O2	285.1346	C17H19N4O3	327.1452	C15H14N4O3	298.1060	C16H15N4O3	311.1139	C17H21N4O2	313.1659
	10	Gis sildenafilil besylate	40	C6H11N2	111.0917	C4H10N	72.0808	C15H18N5O3	316.1404	C17H22N5O3	344.1717	C17H22N5O4	360.1666
	11	Hydroxy Chlor sildenafilil	55	C16H17N4O3	313.1295	C15H17N4O2	285.1346	C17H20N4O3Cl	363.1218	C17H19N4O3	327.1452	C13H12N4O2	256.0955
	12	Hydroxy Acetildenafilil	45	C6H11N2O	127.0866	C7H15N2O	143.1179	C5H9N2	97.0760	C16H17N4O2	297.1346	C17H19N4O2	311.1503
	13	Hydroxyhom sildenafilil (Lod sildenafilil)	35	C5H11N2	99.0917	C23H31N6O4S	487.2122	C6H12N2	112.0995	C6H13N2O	129.1022	C17H19N4O2	311.1503
	14	Hydroxythiohom sildenafilil	40	C9H11N2	99.0917	C15H15N4O5	299.0961	C6H13N2O	129.1022	C17H19N4O5	327.1274	C23H31N6O3S2	503.1894
	15	Imidazosagatriazinone	50	C15H17N4O2	285.1346	C13H12N4O2	256.0955	C14H13N4O2	269.1033	C8H12N3O	166.0975	C11H10N3O2	216.0768
	16	Is sildenafilil	40	C3H8N	58.0651	C5H11N2	99.0917	C15H15N4O2	283.1190	C17H19N4O2	311.1503	C15H15N4O3	299.1139
	17	Lod sildenafilil carbonate	20	C23H31N6O4S	487.2122	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	Methisosildenafilil (Al sildenafilil)	45	C5H11N2	99.0917	C4H9N	71.0730	C6H13N2	113.1073	C15H15N4O2	283.1190	C17H19N4O2	311.1503
	19	N-Desmethyl Sildenafilil	45	C15H15N4O2	283.1190	C4H9N2	85.0760	C17H19N4O2	311.1503	C15H15N4O3	299.1139	C17H20N4O4	344.1479
	20	Nitro sildenafilil	40	C15H16N5O4	330.1197	C15H16N4O4	316.1166	C17H20N4O4	344.1479	C15H15N5O3	313.1169	C13H12N4O2	256.0955
	21	Nor Acetildenafilil	50	C4H8N	70.0651	C5H9N2	97.0760	C6H13N2	113.1073	C16H17N4O2	297.1346	C17H17N4O3	325.1295
	22	Norneo Sildenafilil	55	C15H15N4O2	283.1190	C15H15N4O3	299.1139	C15H16N4O4	316.1166	C5H10N	84.0808	C17H20N4O4	344.1479
	23	Piperiacetildenafilil	50	C6H12N	98.0964	C16H17N4O2	297.1346	C18H21N4O3	341.1608	C17H17N4O3	325.1295	C16H17N4O3	313.1295
	24	Propoxyphenyl Homohydroxysildenafilil	40	C5H11N2	99.0917	C15H15N4O2	283.1190	C15H15N4O3	299.1139	C6H12N2	112.0995	C24H33N6O4S	501.2279
	25	Propoxyphenylsildenafilil	45	C3H8N	58.0651	C15H15N4O2	283.1190	C5H12N2	100.0995	C5H11N2	99.0917	C15H15N4O3	299.1139
	26	Propoxyphenyl Thiosildenafilil	45	C3H8N	58.0651	C15H15N4O5	299.0961	C5H11N2	99.0917	C16H17N4O5	313.1118	C5H12N2	100.0995
	27	Propoxyphenyl-thiohydroxyhom sildenafilil	45	C5H11N2	99.0917	C15H15N4O5	299.0961	C15H15N4O2S	315.0910	C6H13N2O	129.1022	C4H8N2	84.0682
	28	Pyrazole N-Desmethyl Sildenafilil	40	C16H17N4O2	297.1346	C16H17N4O3	313.1295	C5H13N2	101.1073	C5H11N2	99.0917	C15H17N4O	269.1397
	29	Sildenafilil	40	C3H8N	58.0651	C5H12N2	100.0995	C5H11N2	99.0917	C15H15N4O2	283.1190	C17H19N4O2	311.1503
	30	Sildenafilil-N-Oxide	40	C5H11N2	99.0917	C18H22N5O4S	404.1387	C17H19N4O2	311.1503	C17H20N4O4	344.1479	C17H21N4O4S	377.1278
	31	Thio sildenafilil (Thiomethisosildenafilil)	45	C5H11N2	99.0917	C15H15N4O5	299.0961	C6H13N2	113.1073	C4H9N	71.0730	C17H19N4O5	327.1274
	32	Thiohom sildenafilil	45	C4H10N	72.0808	C3H8N	58.0651	C6H13N2	113.1073	C15H15N4O5	299.0961	C5H11N2	99.0917
	33	Thiosildenafilil	45	C3H8N	58.0651	C15H15N4O5	299.0961	C5H12N2	100.0995	C5H11N2	99.0917	C18H21N4O5	341.1431
ANALOGY TADALAFILU	34	2-hydroxypropyl Nortadalfafil	20	C17H18N3O3	312.1343	C8H7O2	135.0441	-	-	-	-	-	-
	35	Acetaminotadalfafil	25	C8H7O2	135.0441	C17H12NO2	262.0863	C16H15N4O3	311.1139	C17H13NO2	263.0941	C14H13N4O2	269.1033
	36	Amino Tadalafil	25	C14H13N4O2	269.1033	C8H7O2	135.0441	C17H13NO2	263.0941	C8H5O3	149.0233	C17H12NO2	262.0863
	37	Chloropretadalfafil	25	C8H7O2	135.0441	C20H16N4O4	334.1074	C14H15N2OCl	262.0867	C19H12N3O3	302.0812	C20H17N2O4	349.1183
	38	Desmethylene Tadalafil	25	C14H14N3O2	256.1081	C15H14N3O2	268.1081	C16H12NO2	250.0863	C7H7O2	123.0441	C15H12NO2	238.0863
	39	N-butyltadalafil	25	C18H20N3O2	310.1550	C8H7O2	135.0441	C16H12NO2	250.0863	C17H12NO2	262.0863	C17H20N3O	282.1601
	40	N-Desmethyl Tadalafil (Nortadalfafil)	25	C14H12N3O2	254.0924	C8H7O2	135.0441	-	-	-	-	-	-
	41	N-ethyltadalafil	25	C16H16N3O2	282.1237	C8H7O2	135.0441	-	-	-	-	-	-
	42	N-Octyl Nortadalfafil	30	C22H28N3O2	366.2176	C8H7O2	135.0441	C21H28N3O	338.2227	C19H12NO3	302.0812	C17H14NO2	264.1019
	43	Tadalafil	20	C15H14O2N3	268.1081	C8H7O2	135.0441	C17H12O2N	262.0863	-	-	-	-
ANALOGY VARDENAFILU	44	Vardenafil	45	C8H13N2O2	169.0972	C17H20N4O4	344.1479	C4H10N	72.0808	C15H15N4O3	299.1139	C16H18N5O4S	376.1074
	45	Vardenafil-N-oxide	45	C17H20N4O4	344.1479	C21H29N6O5S	477.1915	C8H13N2O2	169.0972	C6H13N2	113.1073	C17H21N4O4S	377.1278
	46	Vardenafil oxopiperazine	55	C8H13N2O2	169.0972	C17H20N4O4	344.1479	C15H16N4O4	316.1166	C15H15N4O3	299.1139	C15H15N4O2	283.1190
	47	Acetylvardenafil	45	C8H13N2O2	169.0972	C18H21N4O3	341.1608	C6H11N2	111.0917	C7H15N2	127.1230	C5H10N	84.0808
	48	Benzamidenafil (Rac xanthoanthrafil)	70	C9H11O2	151.0754	C7H7O	107.0491	C7H8O	108.0570	C8H7O2	135.0441	C7H7	91.0542
	49	Hydroxythiovardenafil	55	C8H11N2S	167.0637	C17H20N4O5	334.1108	C5H11N2	99.0917	C15H15N4O2S	315.0910	C15H16N4O3S	332.0938
	50	Hydroxy Vardenafil	45	C8H13N2O2	169.0972	C17H20N4O4	344.1479	C5H11N2	99.0917	C15H15N4O3	299.1139	C16H18N5O4S	376.1074
	51	N-Desethyl Vardenafil	45	C8H13N2O2	169.0972	C17H20N4O4	344.1479	C15H15N4O3	299.1139	C15H16N4O4	316.1166	C4H9N2	85.0760
	52	Norneo Vardenafil	45	C8H13N2O2	169.0972	C16H17N4O4	329.1244	C16H16N4O4	328.1166	C14H12N4O4	300.0853	C15H17N4O2	285.1346
	53	Pseudo Vardenafil	55	C8H13N2O2	169.0972	C17H20N4O4	344.1479	C15H15N4O3	299.1139	C15H16N4O4	316.1166	C13H12N4O2	256.0955
LÁTKY ROSTLINNÉHO PŮVODU	54	Avanafil	30	C18H20ClN4O3	375.1218	C8H8ClO	155.0258	C10H13N4O2	221.1033	C18H17N6O2	349.1408	C11H13N4O2	233.1033
	55	Icariin	30	C18H20ClN4O3	375.1218	C8H8ClO	155.0258	C10H13N4O2	221.1033	C18H17N6O2	349.1408	C11H13N4O2	233.1033
	56	Mirodenafil	45	C5H11N2	99.0917	C17H18N3O2	296.1394	C17H18N3O3	312.1343	C6H13N2O	129.1022	C16H18N3O	268.1444
	57	Udenafil	55	C15H15N4O2	283.1190	C5H10N	84.0808	C15H15N4O3	299.1139	C7H14N	112.1121	C14H15N4O	255.1240
	58	Yohimbine	45	C10H10N	144.0808	C11H18N3O	122.1281	C12H18N3O	224.1281	C11H16NO2	194.1176	C10H12NO	162.0913
	59	Zaprinast	45	C10H8N3O2	202.0611	C7H6NO	120.0444	C10H8N5O2	230.0673	C9H5N2O	157.0396	C9H7N2O	159.0553

3.8 Pracovní charakteristiky metody

3.8.1 Správnost metody

V současné době není komerčně dostupný certifikovaný referenční materiál obsahující celé spektrum sledovaných analytů. Správnost metody je tedy pravidelně ověřována analýzou vhodně zvoleného materiálu prostého PDE-5 inhibitorů („blank“) s přidavkem směsného standardu („spike“). Po přidavku roztoku se vzorek promíchá a nechá minimálně 30 min stát

při laboratorní teplotě. Následně se extrahuje příslušným výše uvedeným extrakčním postupem. Výťažnosti jednotlivých analytů v doplňcích stravy jsou uvedeny v **Tabulce VIII**.

3.8.2 Rozsah metody a linearita

Vzhledem k tomu, že se sledované analyty mohou vyskytovat v reálných vzorcích v širokém rozsahu hladin, je nutné volit pro kalibraci rozsah koncentrací standardů v dostatečně širokém rozmezí, odpovídajícím reálným nálezům. Jestliže jsou nálezy hladin analytů vyšší než odpovídající kalibrační rozsah, je nutné vzorky před samotnou U-HPLC-HRMS/MS analýzou naředit v příslušném poměru.

V používaném kalibračním rozsahu 500 – 1 ng/ml je odezva detektoru za podmínek metody pro většinu analytů lineární. Linearita kalibrace se kontroluje vynesáním odezev jednotlivých analytů do grafu vůči koncentraci a pomocí regresního koeficientu (R^2), který je uveden v **Tabulce VIII**.

3.8.3 Mez stanovitelnosti (LCL = lowest calibration level)

Mez stanovitelnosti je nejmenší množství stanovované látky (analytu) ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s předem definovanou přesností. Většinou se stanovuje jako trojnásobek meze detekce. Pro uvažované aplikace je mez stanovitelnosti zpravidla brána jako nejnižší hladina kalibrační křivky (použitého standardu o nejnižší koncentraci). LCL všech analyzovaných aminokyselin jsou uvedeny v **Tabulce VIII**.

3.8.4 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody lze charakterizovat relativní směrodatnou odchylkou (RSDr, CVr), která se získá z šesti opakovaných analýz vzorku. Pro koncentrace nižší než 5 µg/kg nesmí být RSDr > 20 %; pro koncentrace v rozmezí 5 – 100 µg/kg musí být hodnota RSDr < 15 %; při koncentracích nad 150 µg/kg musí být hodnota RSDr < 11 %. Uvedené hodnoty jsou stanoveny interními předpisy Metrologické a zkušební laboratoře 1316.2. Hodnoty RSDr (%), které byly získány při validaci metodiky, jsou uvedeny v **Tabulce VIII**.

Tabulka VIII: Pracovní charakteristiky metody U-HPLC-HRMS/MS pro stanovení inhibitorů PDE-5 v doplňcích stravy.

	Č.	Analyt	LOQ [µg/g]	regresní koeficient R ²	výtěžnost [%]	RSDr [%]
ANALOGY SILDENAFILU	1	Acetildenafil (Hondgdenafil)	0,05	1,000	90	0,7
	2	Benzylsildenafil	0,05	0,9998	88	1,0
	3	Carbodenafil	0,05	0,9999	90	0,8
	4	Chlorodenafil	0,25	0,9992	90	0,9
	5	Desmethylthiosildenafil	0,05	0,9982	87	1,5
	6	Dimethylsildenafil (Thioaildenafil)	0,05	0,9999	84	1,3
	7	Dimethylacetildenafil	0,05	0,9999	94	0,8
	8	Dinitrodenafil	0,05	0,9998	89	0,7
	9	Gendenafil	0,05	0,9996	92	1,2
	10	Gisadenafil	0,05	0,9994	83	1,9
	11	Hydroxychlorodenafil	0,05	0,9992	88	1,1
	12	Hydroxyacetildenafil	0,05	0,9993	79	1,8
	13	Hydroxyhomosildenafil (Lodenafil)	0,05	0,9997	88	1,1
	14	Hydroxythiohomosildenafil	0,05	0,9995	71	1,8
	15	Imidazosagatriazinone	0,05	0,9999	78	2,0
	16	Isosildenafil	0,05	0,9996	93	0,8
	17	Lodenafil carbonate	0,50	1,000	83	1,6
	18	Methisosildenafil (Aildenafil)	0,05	0,9996	89	1,9
	19	N-desmethylsildenafil	0,05	0,9992	92	1,0
	20	Nitrodenafil	0,05	1,000	81	0,9
	21	Noracetildenafil	0,05	0,9989	88	0,8
	22	Norneosildenafil	0,05	0,9999	90	0,9
	23	Piperiacetildenafil	0,05	0,9987	90	0,7
	24	Propoxyphenylhomohydroxysildenafil	0,05	0,9995	86	1,2
	25	Propoxyphenylsildenafil	0,05	0,9981	91	0,7
	26	Propoxyphenylthiosildenafil	0,05	0,9989	90	1,3
	27	Propoxyphenylthiohydroxyhomosildenafil	0,05	0,9996	85	0,7
	28	Pyrazole N-demethylsildenafil	0,05	0,9998	79	1,5
	29	Sildenafil	0,05	0,9994	86	1,3
	30	Sildenafil-N-oxide	0,05	0,9997	87	1,5
	31	Thioaildenafil (Thiomethisosildenafil)	0,05	0,9998	75	1,9
	32	Thiohomosildenafil	0,05	0,9995	69	1,7
	33	Thiosildenafil	0,05	0,9997	72	1,4

	Č.	Analyt	LOQ [µg/g]	regresní koeficient R ²	výtěžnost [%]	RSDr [%]
ANALOGY TADALAFILU	34	2-hydroxypropylnortadalafil	0,05	0,9992	89	0,5
	35	Acetaminotadalafil	0,25	0,9998	90	0,7
	36	Aminotadalafil	0,10	0,9994	88	0,9
	37	Chloropretadalafil	0,10	0,9999	89	1,1
	38	Desmethylenetadalafil	0,25	0,9997	89	0,6
	39	N-butyltadalafil	0,05	0,9997	90	1,1
	40	N-desmethylnortadalafil (Nortadalafil)	0,25	0,9996	87	1,3
	41	N-ethyltadalafil	0,25	0,9994	88	0,7
	42	N-octylnortadalafil	0,05	0,9997	90	0,5
	43	Tadalafil	0,25	0,9996	90	0,4
ANALOGY VARDENAFILU	44	Vardenafil	0,05	0,9998	83	2,2
	45	Vardenafil-N-oxide	0,05	0,9999	87	1,8
	46	Vardenafil oxopiperazine	0,05	0,9995	89	1,5
	47	Acetylvardenafil	0,05	0,9994	84	1,2
	48	Benzamidenafil (Rac xanthoanthrafil)	0,05	0,9998	84	1,6
	49	Hydroxythiovaridenafil	0,05	0,9994	89	1,0
	50	Hydroxyvardenafil	0,05	0,9989	83	1,5
	51	N-desethylvardenafil	0,05	1,0000	85	1,3
	52	Norneovardenafil	0,05	0,9991	84	1,3
LÁTKY ROSTLINNÉHO PŮVODU	53	Pseudovardenafil	0,05	0,9994	85	1,6
	54	Avanafil	0,05	0,9993	85	0,7
	55	Icariin	0,05	0,9998	91	0,6
	56	Mirodenafil	0,05	0,9999	85	0,8
	57	Udenafil	0,05	0,9995	89	1,2
	58	Yohimbine	0,05	0,9995	84	0,9
	59	Zaprinast	0,05	0,9999	89	1,4

4 Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika umožňuje provést rychlou a citlivou analýzu vhodnou ke stanovení inhibitorů PDE-5 (59 analytů). Analýza využívá moderní instrumentace složené z ultra-účinného kapalinového chromatografu s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem (U-HPLC–HRMS/MS).

V běžné praxi se ke stanovení základních PDE-5 inhibitorů využívá kapalinová chromatografie ve spojení s detektorem diodového pole (LC-DAD), jelikož sildenafil, tadalafil a vardenafil mají odlišná UV spektra. Problém nastává v případě jejich analogů, které mají UV spektra velmi podobná s PDE5 inhibitory, od kterých jsou odvozené a lze je odlišit pouze pomocí chromatografické separace. V tomto případě je vhodnější využít k detekci hmotnostní spektrometrii.

Popsaná metodika umožňuje stanovení 59 inhibitorů PDE-5, které jsou detekovány při ultra vysokém rozlišení hmot (až 100 000 FWHM na hmotě 200 m/z) a s velmi vysokou přesností měřené hmoty m/z (< 2 ppm). Pro každý analyt byla navíc experimentálně zjištěna hodnota kolizní energie a specifické fragmenty byly identifikovány (**Tabulka VII**). Větší počet identifikovaných fragmentů stanovovaných analytů je vysoce žádoucí zejména pro screeningové účely, kdy je možno s využitím jejich detailního přehledu spolehlivě identifikovat přítomnost daného inhibitoru PDE-5 a dodatečně tento přehled případně rozšířit. Součástí metodiky je i spektrální knihovna MS/MS spekter ve vysokém rozlišení, která je přenositelná mezi instrumenty podobného typu, a která může být též využitelná pro spolehlivé prokázání přítomnosti analytu ve vzorku. Navíc kontinuální sběr plných hmotnostních spekter ve vysokém rozlišení umožňuje zpětné prohledávání dat a dodatečnou identifikaci původně necílených nebo nově objevených PDE-5 analogů.

5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Uvedená metoda umožňuje detekci 59 inhibitorů PDE-5 je vhodná ke kontrole přítomnosti těchto látek v herbálních doplncích stravy určených pro léčbu erektilní dysfunkce. Metodika byla primárně vyvinuta pro účely projektu **QJ1530272 – Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba – spotřebitel (2015-2018, MZE/QJ)**. Aplikace metody v rámci tohoto projektu významně přispěje ke zmapování falšovaných herbálních doplňků stravy pro podporu erekce, které jsou dostupné na českém trhu. Metodiku je možné využívat jak ve státních, tak v soukromých laboratořích a výzkumných centrech.

Smluvním uživatelem metodiky je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) a certifikovanou metodiku bude využívat při stanovení inhibitorů PDE-5 v doplncích stravy.

6 Ekonomické aspekty

Při bilanci ekonomických aspektů bylo předpokládáno, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s analýzou na systémech LC-MS a vlastní tak kapalinový chromatograf s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem. Ultra-účinný kapalinový chromatograf (UHPLC) umožní laboratoři úsporu jak času, tak i použitých chemikálií a rozpouštědel. To je výhodné jak z ekonomického (cena za 1 litr acetonitrilu se pohybuje kolem 4 000 Kč), tak i z ekologického hlediska snížením množství odpadů. Dále je k samotnému provedení analýzy potřebné běžné vybavení laboratoře, viz kapitola 3.4 a 3.5, další investice do vybavení nejsou zapotřebí.

Implementace metody zahrnuje zjištění analytických standardů PDE5 inhibitorů a dále pak zjištění aktuálních pracovních charakteristik, zejména zjištění limitů kvantifikace, linearity, ale také verifikaci metody pomocí přídatku směšného standardu na předem známou hladinu a zjištění výtěžnosti, případně i opakovatelnosti metody (např. $n=6$). Seznam standardů včetně jejich pořizovací ceny je uveden v **Tabulce IX**. Za předpokladu, že by bylo provedeno 20 verifikačních a kontrolních analýz, přičemž provozní náklady na jednu analýzu by byly 3 105 Kč, celkové náklady na implementaci by se rovnaly 62,1 tis. Kč. Pokud laboratoř UHPLC-HRMS/MS zařízení nevlastní pohybují se celkové náklady na zavedení výše uvedené metody ve výši 10,9 mil Kč.

Nejzásadnějším pozitivním ekonomickým přínosem navrhované metodiky je samotná možnost paralelního stanovení 59 inhibitorů PDE-5 v rámci jedné analýzy, jež nám umožňuje spojení ultra-účinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (U-HPLC-HRMS/MS). Navíc díky vysokorozlišovacímu hmotnostnímu spektrometru typu Orbitrap získáváme plnou spektrální informaci a můžeme tak realizovat zpětné hledání nových sloučenin v již naměřených chromatogramech a hmotnostních spektrech bez nutnosti přeměření, což také znamená významné snížení nákladů při analýze vzorků, kdy cena analýzy jednoho vzorku byla vykalkulována na 3 105 Kč.

Tabulka IX: Cena jednotlivých standardů PDE-5 inhibitorů

	Č.	Analyt	Výrobce	Kód produktu	Množství standardu	Cena (Kč)
ANALOGY SILDENAFILU	1	Acetildenafil (Hondgdenafil)	TRC	A161600	1 mg	1 375
	2	Benzylsildenafil	Cachesyn	CSTS0631	5 mg	1 500
	3	Carbodenafil	Cachesyn	CSTS0618	5 mg	3 850
	4	Chlorodenafil	TRC	C365535	250 mg	1 250
	5	Desmethyl Thiosildenafil	TRC	D294350	2.5 mg	3 500
	6	Dimethylsildenafil (Thioildenafil)	TLC Pharmachem	S-0612	5 mg	3 750
	7	Dimethylacetildenafil	TLC Pharmachem	S-0638	5 mg	3 550
	8	Dinitrodenafil	TRC	D479775	100 mg	3 750
	9	Gendenafil	TRC	G349960	5 mg	3 500
	10	Gisadenafil besylate	Sigma	PZ0172	5 mg	3 010
	11	Hydroxy Chlorodenafil	TRC	H825115	250 mg	3 750
	12	Hydroxy Acetildenafil	TRC	H739940	5 mg	2 750
	13	Hydroxyhomo Sildenafil (Lodenafil)	TRC	H942840	2 mg	2 375
	14	Hydroxythiohomosildenafil	Cachesyn	CSTS0611	5 mg	3 750
	15	Imidazosagatriazinone	TRC	E892725	500 mg	1 250
	16	Isosildenafil	TRC	I900800	5 mg	2 750
	17	Lodenafil carbonate	TRC	L469300	100 mg	3 750
	18	Methisosildenafil (Aildenafil)	TRC	M225935	5 mg	2 250
	19	N-Desmethyl Sildenafil	TRC	D292200	5 mg	3 500
	20	Nitrodenafil	TRC	N493770	500 mg	4 375
	21	Nor Acetildenafil	TRC	N660500	1 mg	3 500
	22	Norneo Sildenafil	TRC	N824300	2 mg	2 375
	23	Piperiacetildenafil	Cachesyn	CSTS0616	5 mg	3 250
	24	Propoxyphenyl Homohydroxysildenafil	TRC	P831600	10 mg	3 750
	25	Propoxyphenylsildenafil	Cachesyn	CSTS0648	5 mg	2 150
	26	Propoxyphenyl Thiosildenafil	TRC	P831635	5 mg	3 750
	27	Propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil	TRC	P831630	5 mg	3 750
	28	Pyrazole N-Demethyl Sildenafil	TRC	P842800	1 mg	4 375
	29	Sildenafil	TRC	S435000	25 mg	1 500
	30	Sildenafil-N-Oxide	TRC	S435035	10 mg	1 625
	31	Thioildenafil (Thiomethisosildenafil)	TRC	T344365	2 mg	2 500
	32	Thiohomo Sildenafil	TRC	T344470	2 mg	2 750
	33	Thiosildenafil	TRC	T371500	5 mg	2 750
ANALOGY TADALAFILU	34	2-hydroxypropyl Nortadalafil	TRC	H952705	100 mg	3 125
	35	Acetaminotadalafil	TRC	A161250	2.5 mg	4 375
	36	Amino Tadalafil	TRC	A629550	2 mg	1 500
	37	Chloropretadalafil	TRC	M330125	50 mg	1 250
	38	Desmethylene Tadalafil	TRC	D291990	5 mg	4 375
	39	N-butyltadalafil	TLC Pharmachem	T-106	5 mg	1 865
	40	N-Desmethyl Tadalafil (Nortadalafil)	TRC	D293800	2 mg	2 750
	41	N-ethyltadalafil	TLC Pharmachem	T-1013	5 mg	4 500
	42	N-Octyl Nortadalafil	TRC	O241350	5 mg	1 875
	43	Tadalafil	TRC	T004500	10 mg	1 250

	Č.	Analyt	Výrobce	Kód produktu	Množství standardu	
ANALOGY VARDENAFILU	44	Vardenafil	TRC	V098001	5 mg	2 125
	45	Vardenafil-N-oxide	TLC Pharmachem	V-0522	5 mg	4 100
	46	Vardenafil oxopiperazine	TLC Pharmachem	V-0518	5 mg	2 225
	47	Acetylvardenafil	TLC Pharmachem	V-058	5 mg	3 750
	48	Benzamidenafil (Rac xanthoanthrafil)	TRC	X500000	2 mg	2 375
	49	Hydroxythioardenafil	TRC	H963400	1 mg	3 125
	50	Hydroxy Vardenafil	TRC	H995300	2.5 mg	3 750
	51	N-Desethyl Vardenafil	TRC	D289950	2 mg	2 625
	52	Norneo Vardenafil	TRC	N824500	100 mg	4 375
	53	Pseudo Vardenafil	TRC	P839615	5 mg	3 750
LÁTKY ROSTLINNÉHO PŮVODU	54	Avanafil	TRC	A794670	10 mg	1 250
	55	Icariin	Sigma	I1286	100 mg	3 105
	56	Mirodenafil	Cachesyn	CSTM321	5 mg	3 650
	57	Udenafil	TRC	U250500	5 mg	2 750
	58	Yohimbine	Sigma Aldrich	Y3125	1 000 mg	1 938
	59	Zaprinast	Sigma Aldrich	Z0878	25 mg	2 227

7 Seznam související použité literatury

- (1) Vaclavik, L.; Krynitsky, A. J.; Rader, J. I. Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 6767–6790.
- (2) Malet-Martino, M.; Martino, R.; Bonnet, P. Chapter 17 – Nutritional Supplements. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, 1.ed.; Picó, Y., Ed.; ACADEMIC PRESS **2012**; s. 539–573.
- (3) Valentová, K.; Entnerová, P.; Urbaníková, J.; Šimánek, V. Chemie mužské sexuality. *Chemické Listy* **2004**, *98*, 1119–1129.
- (4) Zou, P.; Oh, S. S. Y.; Hou, P.; Low, M.-Y.; Koh, H. L. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplements and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1104*, 113–122.

Monika Jírů (25 %), Zbyněk Džuman (25 %), Milena Stránská (25 %), Jana Hajšlová (25 %)

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika hmotnostně-spektrometrického screeningu nedeklarovaných syntetických inhibitorů fosfodiesterázy typu 5 (PDE-5) a jejich analogů v herbálních doplňcích stravy

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Rok vydání: 2016

Počet stran: 26