

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Marija Begić

Metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa za
identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu u dodacima prehrani za
erektilnu disfunkciju

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godina

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate Programme
Drug Research and Development

Marija Begić

Liquid chromatography-mass spectrometry method for identification and
quantification of sildenafil in dietary supplements for erectile dysfunction

Diploma thesis

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Marija Begić

Metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa za
identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu u dodacima prehrani za
erektilnu disfunkciju

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godina

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Siniša Tomić

Diplomski rad obranjen je dana 17.09.2018 pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Miranda Mladnić Pejatović
2. doc. dr. sc. Karlo Wittine
3. izv. prof. dr. sc. Siniša Tomić

Rad ima 47 stranica, 17 slika, 13 tablica i 18 literaturnih navoda

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju za provjeru kakvoće lijekova (OMCL) Agencije za lijekove i medicinske proizvode.

Sažetak

Pojava krivotvorina rastući je problem na farmaceutskom tržištu. Među najkrivotvorenijima su lijekovi za erektilnu disfunkciju. Međutim, vrlo su česte i patvorine dodataka prehrani koje sadrže sintetske lijekove za erektilnu disfunkciju.

U ovom radu opisana je validacija metode tekućinske kromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu u dodacima prehrani kod kojih se sumnja na krivotvorenje sintetskim lijekovima za erektilnu disfunkciju.

Za separaciju spojeva tekućinskom kromatografijom korištena je C18 kolona. Otopina koncentrirane formijantne kiseline u ultračistoj vodi i otopina koncentrirane formijantne kiseline u metanolu korištene su kao mobilna faza. Analiza je započeta identifikacijom sildenafilu u uzorcima metodom masene spektrometrije. Za detekciju i kvantifikaciju sildenafilu korišten je UV detektor pri valnoj duljini 280 nm, kao i kvadrupolni analizator i analizator vremena leta (Q-TOF). Metoda se pokazala prikladnom za analizu dodataka prehrani.

Korištenjem navedene metode sildenafil je detektiran u dva dodatka prehrani u prosječnoj koncentraciji većoj od 90,0 mg po dozi.

Ključne riječi:

Eretilna disfunkcija, dodaci prehrani, sildenafil, farmaceutsko krivotvorenje, tekućinska kromatografija, masena spektrometrija

Summary

Pharmaceutical counterfeiting is a growing problem. One of the most counterfeited class of drugs and dietary supplements are erectile dysfunction drugs and supplements.

This paper describes the validation of the liquid chromatography-mass spectrometry method for identification and quantification of sildenafil in dietary supplements for erectile dysfunction and analysis of dietary supplements which are considered to be adulterated.

Liquid chromatography was performed on C18 stationary phase. A solution of formic acid in methanol and a solution of formic acid in ultrapure water was used as the mobile phase. Analysis began by identification of sildenafil using mass spectrometry. For detection and quantification of sildenafil, UV-detector (wavelength: 280 nm), as well as quadrupole and time of flight mass analysers were used. This method was shown to be suitable for analysis of dietary supplements.

Using this method sildenafil was identified and quantified in two dietary supplements in the concentration of 90,0 mg per dose.

Key words:

Erectile dysfunction, dietary supplements, sildenafil, pharmaceutical counterfeits, liquid chromatography, mass spectrometry

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Erektilna disfunkcija	1
1.2.	Uloga dušikovog (II) oksida u postizanju erekcije	2
1.2.1.	Djelovanje dušikovog (II) oksida.....	2
1.3.	Inhibitori fosfodiesteraze tipa 5	3
1.3.1.	Sildenafilcitrat	3
1.3.2.	Nuspojave primjene sildenafilcitrata	5
1.4.	Krivotvorenje lijekova i dodataka prehrani	5
1.4.1.	Krivotvorenje lijekova	6
1.4.2.	Krivotvorenje dodataka prehrani	6
1.4.3.	Krivotvorenje dodataka prehrani u Hrvatskoj.....	7
1.5.	Metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom za identifikaciju krivotvorina.....	9
1.5.1.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)..	10
1.5.2.	Masena spektrometrija	11
2.	CILJ RADA.....	13
3.	MATERIJALI I METODE.....	13
3.1.	Materijali	13
3.1.1.	Referentne tvari.....	13
3.1.2.	Otapala i reagensi	13
3.1.3.	Uzorci.....	14
3.1.4.	Oprema i pribor	14
3.1.5.	Programski paketi	15
3.2.	Metode.....	15
3.2.1.	Provedba mjerenja	15
3.2.2.	Priprema mobilnih otopina	16
3.2.3.	Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti	16
3.2.4.	Opis izvođenja validacijskih eksperimenata	18
3.2.5.	Opis pripreme otopina uzoraka za koje postoji sumnja na krivotvorenje	21
3.2.6.	Obrada i prikazivanje rezultata	22
4.	REZULTATI	23

4.1. Rezultati validacije metode	23
4.1.1. Provjera prikladnosti sustava i specifičnosti	23
4.1.2. Linearnost.....	25
4.1.3. Provjera ponovljivosti i preciznosti	26
4.1.4. Provjera točnosti.....	28
4.1.5. Provjera radnog područja	29
4.1.6. Provjera granica kvantifikacije i detekcije.....	29
4.1.7. Provjera stabilnosti otopina	32
4.1.8. Promjena HPLC kolone.....	34
4.2. Rezultati analize uzoraka za koje postoji sumnja na krivotvorenje	35
5. RASPRAVA	38
6. ZAKLJUČAK	41
7. LITERATURA	43
8. ŽIVOTOPIS.....	45

1. UVOD

1.1. Eretilna disfunkcija

Normalna seksualna funkcija opisuje se kao fiziološki proces koji uključuje koordinaciju psiholoških funkcija, endokrinog, žilnog i neurološkog sustava. Erekcija je ukrućenje muškog spolnog uda i nastaje tijekom seksualnog uzbuđenja. Erekcija penisa je neurovaskularni fenomen koji zahtijeva normalnu funkciju i dilataciju krvnih žila penisa i relaksaciju glatkog mišića penisa¹.

Eretilna disfunkcija definira se kao nesposobnost postizanja ili održavanja erekcije penisa dovoljne za snošaj. Riječ je o čestom poremećaju u muškaraca dobi od 40 do 70 godina². Najraniji zapisi o kliničkom poremećaju erekcije datiraju iz doba drevnog Egipta i procjenjuje se da su stari gotovo 5000 godina³.

Težina poremećaja erektile funkcije varira. Učestalost u populaciji je relativno visoka i raste s dobi muškarca. Uzroci erektile disfunkcije se dijele na organske i psihogene. Kod većine zahvaćenih muškaraca obično je riječ o kombinaciji više uzroka¹.

Najčešće bolesti i zdravstvena stanja koja (ne)posredno dovode do erektile disfunkcije su:

1. krvožilni poremećaji, poput aterosklerotičkih promjena, bolesti perifernih krvnih žila, povišeni krvni tlak i infarkt miokarda
2. dijabetes
3. deficijencija testosterona
4. neurološka oštećenja kao što su ozljede živaca nastale prilikom operacije prostate, multipla skleroza, ozljede kralježnice, neurološka oštećenja nastala kao posljedica kronične zlouporabe alkohola
5. psihogeni uzroci, poput depresije i posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP)

Ostali uzroci, primjerice trauma u području zdjelice, uzimanje nekih lijekova (npr. antihipertenzivi, antidepresivi), brojne druge bolesti i stanja mogu pridonijeti razvoju erektilne disfunkcije¹.

1.2. Uloga dušikovog (II) oksida u postizanju erekcije

Funkcionalno stanje penisa, flacidnog ili u erekciji, određeno je tonusom glatkih mišića. Simpatički kontraktilni faktori održavaju flacidnost dok parasimpatički induciraju relaksaciju glatkog mišićja i izazivaju erekciju⁴. Dušikov (II) oksid, NO je primarni medijator relaksacije glatkih mišićnih vlakana penisa⁵. NO koji sudjeluje u postizanju erekcije potiče iz dvaju glavnih izvora: direktno iz parasimpatičkih živaca ili indirektno iz endotela *corpora cavernosa* (spužvasto tijelo penisa koje zadržava većinu krvi tijekom erekcije) i krvnih žila penisa kao odgovor na kolinergičnu stimulaciju⁴.

1.2.1. Djelovanje dušikovog (II) oksida

NO se sintetizira iz aminokiseline L-arginin djelovanjem enzima dušikov (II) oksid-sintaze (eng. *nitric oxide synthase*, NOS). NO je mala molekula vremena poluživota 3 do 5 sekundi. NO brzo difundira iz endotelnih stanica i/ili neurona u kojima se sintetizira. Difuzija NO iz stanica u kojima je sintetiziran se odvija brže nego proces unutarstanične razgradnje molekule NO. To omogućava intercelularnu akumulaciju NO i njegovih učinaka⁶.

Unutar endotelnih i neuronalnih stanica penisa, NO djeluje aktivacijom enzima *gvanilatciklaze*. Unutar molekule *gvanilatciklaze* molekula hema s inkorporiranim željezom je zadužena za interakciju sa NO. Ta interakcija je zaslužna za aktivaciju enzima *gvanilatciklaze* posredstvom NO. Nakon aktivacije vezanjem molekule NO, *gvanilatciklaza* prevodi gvanozin-5'-trifosfat (GTP) u ciklički gvanozinmonofosfat (cGMP)⁵.

cGMP inducira relaksaciju glatkih mišića aktivacijom enzimske kaskade posredovane razinom unutarstaničnog kalija. cGMP ovisne protein *kinaze G* i *A* uzrokuju fosforilaciju proteina fosfolambina. Nefosforilirani fosfolambin djeluje inhibirajući stanične pumpe kalija što za posljedicu ima visoke

unutrastanične razine kalija i kontrakciju glatkih mišića. Fosforilirani fosfolambin je inaktivan, kalijeve crpke su tada aktivne, smanjuje se unutarstanična razina kalija i dolazi do relaksacije glatkih mišića penisa, odnosno erekcije⁷. Fosforilacija fosfolambina posredstvom NO-a je ključna za relaksaciju mišića i postizanje erekcije u slučaju seksualne stimulacije.

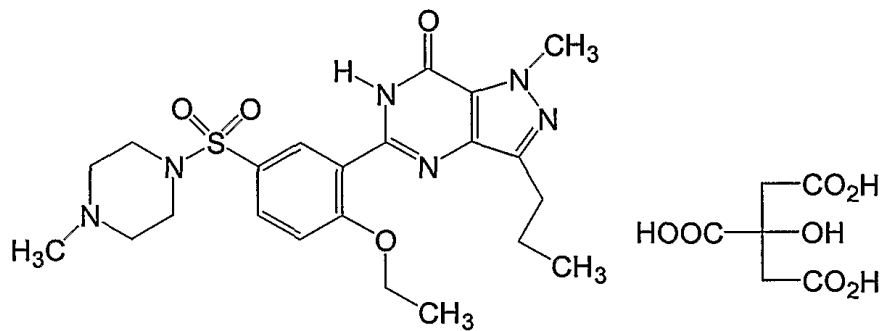
1.3. Inhibitori fosfodiesteraze tipa 5

Poremećaj prijenosa signala za relaksaciju glatkog mišića penisa putem cGMP-a može ograničiti djelovanje NO. U tom slučaju ključnu ulogu imaju enzimi iz obitelji *fosfodiesteraza*. Djelovanje izoenzima 5 iz obitelji *fosfodiesteraza* rezultira prelaskom aktivnog cGMP-a u inaktivni GMP. To za posljedicu ima konstrikciju glatkih mišića penisa i prelazak u flacidno stanje⁴.

Enzim koji je prepoznat kao ključan u regulaciji erektilne funkcije je izoenzim 5 *fosfodiesteraze* (PDE5).

1.3.1. Sildenafilcitrat

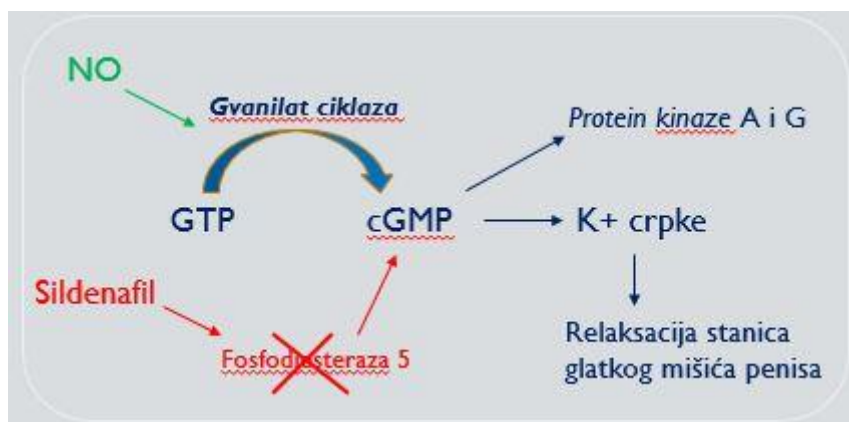
1998. godine započnje napredak u liječenju erektilne disfunkcije. Na tržište lijekova je uveden prvi oralno primjenjiv lijek za erektilnu disfunkciju s djelatnom tvari sildenafilcitrat (*Viagra*[®], Pfizer, New York, SAD). Sildenafilcitrat pripada grupi visokoafinitetnih kompetitivnih inhibitora fosfodiesteraze tipa 5 (PDE5-Is)⁸ čija svojstva su dobro okarakterizirana. Sildenafilcitrat, kao i ostali inhibitori fosfodiesteraze tipa 5 koji su uslijedili na tržištu, razvijeni su na temelju prepoznavanja i razumijevanja ključne uloge dušikovog (II) oksida u relaksaciji glatkog mišića penisa. U Republici Hrvatskoj uz sildenafil, registrirani PDE5 inhibitori su vardenafil i tadalafil.



Slika 1 Kemijska struktura sildenafilcitrata

Preuzeto sa <http://www.americanhealth.com-html.pw/mens-health>

Primjena sildenafilcitrata i njegova inhibicija fosfodiesteraze tipa 5 potiče nakupljanje NO i povećanje razine cGMP-a. To omogućava relaksaciju glatkih mišića penisa. Obzirom da sildenafilcitrata djeluje sprječavajući razgradnju postojećeg NO, za djelovanje lijeka potrebna je seksualna stimulacija koja potiče sintezu NO⁴.



Slika 2 Djelovanje sildenafil, inhibitora fosfodiesteraze tipa 5

1.3.2. Nuspojave primjene sildenafilcitrata

Prilikom primjene lijeka koji sadrži sildenafil može doći do preosjetljivosti na djelatnu ili bilo koju pomoćnu tvar.

Sukladno poznatim učincima sildenafil na nakupljanje dušikovog oksida, dokazano je da sildenafil pojačava hipotenzivno djelovanje nitrata pa je stoga kontraindicirana njegova istodobna primjena s pripravcima koji otpuštaju dušikov oksid ili nitratima u bilo kojem obliku⁹.

Pripravci za liječenje erektilne disfunkcije, uključujući sildenafil, ne smiju se primjenjivati kod muškaraca kojima nije preporučljiva seksualna aktivnost (npr. bolesnici s teškim kardiovaskularnim bolestima, kao što je nestabilna angina ili teško zatajivanje srca)⁹.

Sildenafil je kontraindiciran u bolesnika kod kojih je došlo do gubitka vida u jednom oku zbog nearerijske prednje ishemijske optičke neuropatije (eng. *non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy*, NAION), bez obzira je li to stanje povezano ili nije s prethodnom izloženošću PDE5 inhibitorima¹⁰.

Skupina bolesnika kod kojih nije ispitana sigurnost primjene PDE5 inhibitora jesu bolesnici sa teškim oštećenjem jetre, hipotenzijom, infarktom miokarda i nedavnim moždanim udarom¹⁰.

1.4. Krivotvorenje lijekova i dodataka prehrani

Uz revoluciju na području liječenja erektilne disfunkcije, sildenafilcitrata poznatiji pod nazivom *Viagra*[®] imao je i veliki društveni utjecaj. *Viagra*[®] se često svrstava u kategoriju takozvanih *lifestyle* lijekova. Riječ je o lijekovima za koje korisnik smatra da će poboljšati njegove mentalne ili fizičke performanse u situaciji kada ne postoji stvarna terapijska potreba za tim lijekom¹¹.

Naziv *Viagra*[®] u popularnoj kulturi postaje sinonim za potenciju u svakom kontekstu. Sve veća popularnost dovodi do zloupotrebe i pojave krivotvorina na tržištu lijekova.

1.4.1. Krivotvorenje lijekova

Prema Zakonu o lijekovima (2013., NN) Republike Hrvatske, članak 3, stavak 49.: "Krivotvoreni lijek je lijek koji je neistinito predstavljen s namjerom prijevare, s obzirom na:

- a) identitet, uključujući pakiranje i označivanje lijeka, naziv ili sastav lijeka u pogledu bilo kojeg sastojka lijeka uključujući pomoćne tvari i jačinu lijeka
- b) podrijetlo, uključujući proizvođača, državu proizvodnje i državu podrijetla lijeka ili nositelja odobrenja za stavljanje lijeka u promet
- c) sljedivost, uključujući zapise i dokumente koji se odnose na promet lijeka.

Definicija se ne odnosi na lijek s nenamjernim nedostacima u kakvoći i ne odnosi se na pitanja o kršenju prava intelektualnog vlasništva."

1.4.2. Krivotvorenje dodataka prehrani

Posljednjih godina svjedoci smo trenda korištenja dodataka prehrani s biljnim tvarima. Na konkurentnom tržištu dodataka prehrani pojavljuje se i sve veći broj dodataka prehrani, namijenjenih kao pomoć pri normalnoj seksualnoj funkciji muškarca za koje se navodi da su iz sirovina isključivo prirodnog podrijetla.

Prema Pravilniku o dodacima prehrani (2013., NN) Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske, Članak 3, „dodacima prehrani smatraju se

- 1) pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja
- 2) hranjivim tvarima u smislu stavka 1. ovoga članka smatraju se vitamini i minerali
- 3) druge tvari u smislu stavka 1. ovoga članka smatraju se: aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, organi i ekstrakti biljnih vrsta,

mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom.“

Na tržištu dodataka prehrani zabilježen je velik broj slučajeva pojave dodataka prehrani za seksualnu potenciju koji sadrže farmakološki aktivne tvari što prema članku 3 Pravilnika o dodacima prehrani nije dopušteno.

1.4.3. Krivotvorenje dodataka prehrani u Hrvatskoj

Na hrvatskom tržištu 2012. godine u kapsulama dodataka prehrani *Epimen*[®] i *ViaNatur*[®] pronađene su tvari koje su kemijske modifikacije sildenafil¹². Prema deklaracijama, navedeni dodaci prehrani sadrže isključivo biljne sastojke. Prema dostupnim podacima moguće je da ti biljni sastojci imaju određeni učinak na erektilnu disfunkciju. U njima pronađene kemijske modifikacije sildenafil¹² nisu navedene na deklaraciji.

Navedene kemijske modifikacije sildenafil¹² su sintetskog podrijetla. Jedini način na koji su mogle dospjeti u dodatak prehrani je ako su dodane u proizvod tijekom procesa proizvodnje.

Pronađene modifikacije sildenafil¹² djeluju na način sličan sildenafilcitratu. To znači da imaju izrazit učinak na erektilnu disfunkciju ali i niz značajnih nuspojava. Najznačajnije nuspojave sildenafil¹² su teške kardiovaskularne nuspojave, u koje se ubrajaju srčane aritmije (nepravilan rad srca), srčani i moždani udar. Navedene nuspojave direktno ugrožavaju život korisnika i mogu imati fatalan ishod. Jedna od ozbiljnih nuspojava čija učestalost nije poznata je iznenadno smanjenje ili gubitak vida.

Iako rijetka, pojava prethodno navedenih nuspojava je razlog zbog kojeg se inhibitori PDE5 smiju propisivati isključivo na recept. Liječnik prije propisivanja mora procijeniti omjer koristi i rizika primjene lijeka u pojedinog pacijenta, odrediti odgovarajuću dozu lijeka i nadzirati zdravstveno stanje pacijenta. Upravo zbog toga prisutnost tvari, poput sildenafil¹², u dodacima prehrani koji su dostupni u slobodnoj prodaji predstavlja veliku opasnost za zdravlje korisnika koji imaju faktore rizika za nastanak teških nuspojava.

Dodaci prehrani, za razliku od lijekova, ne služe liječenju već samo pomažu u održavanju zdravlja. Dodaci prehrani nisu namijenjeni liječenju bolesti i ne prolaze kroz rigorozan postupak odobravanja poput lijekova. U Republici Hrvatskoj dodaci prehrani su u nadležnosti Ministarstva zdravstva.

Kontrola kakvoće dodataka prehrani odnosi se na ispitivanje zdravstvene i sanitarne ispravnosti, ali ne i na ispitivanje farmaceutske kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti kako je to propisano za lijekove.

U svijetu postoje različiti primjeri regulacije stavljanja dodataka prehrani na tržište. U SAD-u je, primjerice, nadležno tijelo i za lijekove i dodatke prehrani Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA). Međutim, proizvođači dodataka prehrani nisu dužni svoj proizvod registrirati pri FDA, niti su dužni dobiti odobrenje od FDA prije proizvodnje ili prodaje dodataka prehrani. Proizvođači dodataka prehrani u SAD-u nemaju obvezu dokazati sigurnost i djelotvornost svojeg proizvoda prije nego što ga plasiraju na tržište, a regulatorne mjere se provode tek nakon što proizvod dođe na tržište¹³.

Za nas je važnije iskustvo Europske unije (EU) sa dodacima prehrani. U EU, čija članica je i Hrvatska, dodaci prehrani regulirani su zakonodavstvom o hrani. Direktivom 2002/46/EZ Europskog parlamenta i vijeća, usklađeni su zakoni država članica u odnosu na dodatke prehrani. Države članice moraju osigurati da dodaci prehrani na tržištu unutar EU udovoljavaju pravilima utvrđenima u ovoj Direktivi. U slučaju da proizvođač na tržište želi plasirati dodatak prehrani koji sadrži izvor hranjivih tvari ili hranjive tvari koje nisu na popisu dozvoljenih tvari u Direktivi 2002/46/EZ, mora predati zahtjev za odobrenje Europskoj komisiji. U tom slučaju Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, *European Food Safety Authority*) priprema znanstveno mišljenje na temelju kojega će Europska komisija ocijeniti zahtjev za odobrenje te pregledati i eventualno ažurirati popis dozvoljenih tvari u dodacima prehrani. U području regulacije stavljanja dodataka prehrani na tržište i regulaciji istog tržišta, EU prednjači nad SAD-om.

Može se reći kako je područje regulacije dodataka prehrani siva zona zaštite potrošača, odnosno pacijenata. Regulatorni nedostatak državne kontrole kakvoće kao redovitog nadzora dodataka prehrani ostavlja prostora njihovim proizvođačima da u dodatke prehrani stavljaju sintetske djelatne tvari koje se inače koriste u lijekovima. Proizvođači dodataka prehrani ulažu višestruko manje novčanih sredstava u razvoj i dokazivanje djelotvornosti i sigurnosti kada svoj proizvod registriraju kao dodatak prehrani. Činom dodavanja sintetskih djelatnih tvari osiguravaju djelotvornost svog dodatka prehrani, njegovu popularnost na tržištu te zaradu.

1.5. Metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom za identifikaciju krivotvorina

Povećan broj sumnji na patvorenje dodataka prehrani za seksualnu disfunkciju potaknuo je razvoj analitičke metode za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafil. Kao izbor nametnula se metoda tekućinske kromatografije spregnute sa masenim spektrometrom (HPLC-MS).

Riječ je o analitičkoj fizičko-kemijskoj tehnici koja kombinira razdvajanje komponenata tekućinskom kromatografijom sa analizom pomoću masene spektrometrije. Ovakvo sprezanje analitičkih tehnika pospješuje razdvajanje i detektiranje komponenata. Tekućinska kromatografija ima sposobnost razdvajanja komponenata smjese¹⁴. Spektrometrija masa omogućava strukturnu identifikaciju komponenata smjese sa visokom osjetljivošću i molekularnom preciznošću¹⁴.

1.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je višenamjenska tehnika za separaciju otopljenih tvari¹⁴. Neke druge separacijske tehnike, poput plinske kromatografije, nisu pogodne za razdvajanje termički nestabilnih molekula ili se ne mogu direktno spregnuti, kao što je to slučaj kod izoelektričnog fokusiranja¹⁴. Tekućinska kromatografija se uspješno može koristiti za razdvajanje širokog spektra polarnih i nepolarnih molekula kao što su to peptidi i proteini, polimeri i male molekule lijekova ili njihovih metabolita.

Tekućinski kromatograf je sustav kojim se analiziraju navedeni analiti. Analiza se obavlja razdvajanjem ciljanog analita na kromatografskoj koloni koja je punjena česticama stacionarne faze i detekcijom istog prikladnom tehnikom¹⁴.

Stacionarna faza koja je u najširoj uporabi u HPLC tehnici je stacionarna faza koju čine čestice polarnog anorganskog materijala silikagela na kojeg su vezani lanci n-oktadodecila¹⁵. Popularan naziv tih kolona je C18 kolone. Silikagel na svojoj površini posjeduje reaktivne silanolne (-Si-OH) skupine što omogućava njegovu derivatizaciju C18 lancima ugljikovodika. Riječ je o monoligandnom vezanju prilikom kojeg jedna silanolna skupina veže jedan ugljikovodični lanac¹⁵. Određeni dio silanolnih skupina ostaje nezasićen. Gustoća vezanja C18 lanac i udio slobodnih silanolnih skupina utječe na svojstva razdvajanja analita¹⁶. Modifikacija tih parametara omogućava pripravljanje stacionarnih faza željenog stupnja polarosti.

Pokretna faza (mobilna faza) u tekućinskoj kromatografiji je tekućina, uglavnom voda, organska otapala i puferi. Također može biti polarna ili nepolarna. Često se radi o smjesi dvaju otapala. U slučaju kombinacije dvaju otapala tijekom analize, sastav mobilne faze može biti konstantan, tada je riječ o izokratnoj eluciji. Suprotno tome, ako se sastav mobilne faze mijenja s vremenom, govorimo o gradijentnoj eluciji¹⁴.

Prema principu odjeljivanja HPLC metoda može biti normalno-fazna (polarna stacionarna faza i nepolarna mobilna faza) i obrnuto-fazna (nepolarna stacionarna faza i polarna mobilna faza)¹⁴.

Tekućinski kromatograf se sastoji od sustava za dobavu mobilne faze, injekcijskog sustava, kućišta za kolonu i detektora. Detaljnije, sustav za dobavu mobilne faze sastoji se od spremnika mobilne faze, odzračivača, binarne ili kvarterne pumpe, regulatora tlaka u sustavu i dinamičke ili statičke miješalice. Injekcijski sustav služi za unos uzorka. Sastoji se od injekcijskog ventila, automatskog uzorkivača (eng. *autosampler*), injekcijske igle i graduirane injekcije ili crpke, te kapilare određenog volumena. Detektor može biti UV/VIS, fluorescentni, amperometrijski¹⁴. Sprezanje sa tehnikom masene spektrometrije omogućava korištenje masenih detektora poput kvadrupolnog i analizatora vremena leta.

Odabirom odgovarajućeg pufera, protoka, organskih otapala koji će se koristiti za izvođenje tekućinske kromatografije, može se formirati tekućinska kromatografija koja će se jednostavno spregnuti sa masenim spektrometrom.

1.5.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je analitička tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju omjera njihovih molekularnih masa i naboja (m/z). Osnovni dijelovi masenog spektrometra jesu ionizator, analizator i detektor¹⁴.

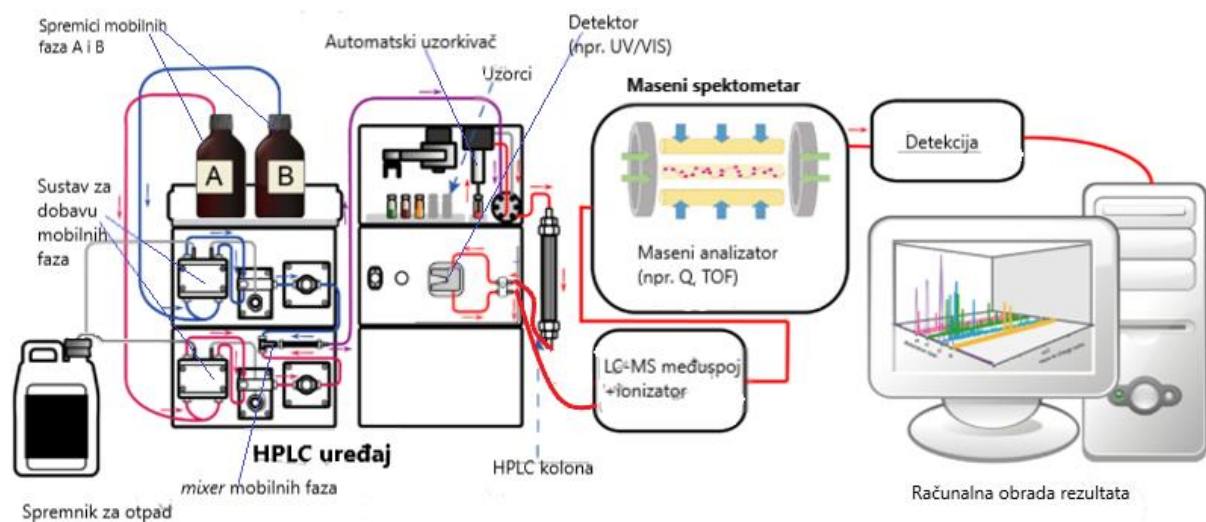
Prvi korak u analizi molekula masenim spektrometrom je ionizacija molekula u ionizatoru. Ioni nastali u ionizatoru provode se kroz analizator u kojem se razdvajaju prema odnosu mase i naboja. Razdvojeni ioni se detektiraju na detektoru gdje proizvode električni signal koji se može registrirati na računaru ili nekom drugom uređaju. Analizator i detektor, često i ionizator, su pod visokim vakuumom što osigurava stalan protok iona kroz instrument¹⁴.

Prilikom sprezanja, tekućinski kromatograf i maseni spektrometar povezani su međuspojem koji ima ulogu ionizacije molekula. Ionizacija

elektroaspršenjem (eng. *electrospray ionization*, ESI) je način ionizacije kompatibilan sa svim analizatorima. Upravo zato je najzastupljeniji način ionizacije molekula u LC-MS spregnutom sustavu¹⁷.

Kvadrupol je vrlo često korišten analizator. Sastoji se od četiri dijagonalno električki povezane elektrode. Jedan par elektroda ima pozitivan polaritet a drugi par negativni. Parovi elektroda su još spojeni radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje. Ovisno o primjenjenoj struji, ioni različitih m/z vrijednosti koji ulaze u ionizator, mogu zadržati stabilnu putanju i proći kroz analizator ili mogu dotaknuti elektrodu i postati neutralne molekule koje ne detektiramo¹⁷.

Analizator vremena leta (eng. *Time of Flight*, TOF) analizira ione na temelju različitih brzina koje ovise o masi iona. Manji ioni imaju veću brzinu dok veći ioni postižu manje brzine. Separacija iona vrši se s obzirom na brzinu iona koji dolaze na detektor u različitim vremenima¹⁷.



Slika 3 Osnovni dijelovi HPLC uređaja i masenog spektrometra

Preuzeto i adaptirano:

https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry

Za analizu dodataka prehrani kod kojih postoji sumnja na krivotvorenje korištena je obrnuto-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s gradijentnom eluacijom spregnuta sa masenim spektrometrom, te će u

nastavku biti riječ o njoj. Korištena je C18 stacionarna faza. Otopina koncentrirane formijatne kiseline u ultračistoj vodi i otopina koncentrirane formijatne kiseline u metanolu korištene su kao mobilne otopine. Za detekciju i kvantifikaciju sildenafilu korišten je UV detektor, kao i kvadrupolni analizator i analizator vremena leta (Q-TOF).

2. CILJ RADA

Obzirom na povećan broj sumnji na krivotvorenje dodataka prehrani za seksualnu potenciju bilo je potrebno razviti analitičku metodu za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu.

Cilj ovog rada je utvrditi da je metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa prikladna za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu u lijekovima i dodacima prehrani za održavanje normalne seksualne funkcije muškaraca.

Nakon utvrđivanja prikladnosti metode cilj je utvrditi koji dodaci prehrani sadrže djelatnu tvar sildenafil.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Referentne tvari

Sildenafilcitrat CRS, EDQM, kat. Br. Y0001578, serija 1; 98,8%

3.1.2. Otapala i reagensi

Metanol, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, br. serije I0938707810, exp 12.04.2019.

Formijatna kiselina, 95% p.a., Sigma-Aldrich, LOT SZBF2800V exp 21.09.2018.

Ultračista voda, HALMED

3.1.3. Uzorci

a) Uzorci za izvođenje validacijskih eksperimenata

Vitaseng tablete, Belupo, serija 25010036, exp 03/2019

Afrička šljiva, Herbiko, serija 170817, exp 02/2020

Gel (carbopol 940), ljekarne Perković, serija 217, exp 02/2018

b) Uzorci za koje postoji sumnja na krivotvorenje

EpiMen Plus kapsule, EpiMen Plus kapsule, serija L22122019 (exp 12/19)

Alpha Strong, Terra Lab (puštanje u promet), serija ASTL38 (exp 6/2022)

F.F.Fairyland (Royal Kings Honey), K.F.Fairyland

Vivanord kapsule, serija 171130

3.1.4. Oprema i pribor

HPLC Agilent 1200RR sistem i Q-TOF detektor

HPLC kolona Hypersil GOLD C18, 150x4mm, 3 µm

Vaga Mettler Toledo, model PB1502-sk

Vaga Mettler Toledo, model XP205DR

Staklene pipete prikladnog volumena

Odmjerne tikvice prikladnog volumena

Vibracijska mješalica Ika-Werke GmnH&Co KG, VM-004

Centrifuga Rotina 38R, C-005

Ledenica za reagense Labena, L-003

3.1.5. Programski paketi

Mass Hunter Workstation Software, version B.05.

3.2. Metode

3.2.1. Provedba mjerenja

Kromatografski uvjeti HPLC sustava:

Protok: 0,8 ml/min

T kolone : 30 °C

UV detekcija: 280 nm

V injektiranja: 5 µl

Gradijent:

Tablica 3. Gradijent mobilnih faza

t/ min	B (%)
0,0	40
7,0	80
8,0	80
8,1	40
12,0	40

Parametri spektrometra masa:

Mode: positive

Gas Temp: 300 °C

Drying Gas: 11 l/min

Nebulizer: 45 psig

Sheet Gas Temp: 350 °C

3.2.2. Priprema mobilnih otopina

Mobilna otopina A: 1,0 ml koncentrirane formijatne kiseline je otopljeno u 1 L ultračiste vode

Mobilna otopina B: 1,0 ml koncentrirane formijatne kiseline je otopljeno u 1 L metanola

3.2.3. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti

Uz sildenafil, u dodacima prehrani i lijekovima ispitivana je prisutnost vardenafila i tadalafila. Ovaj rad je usredotočen na identifikaciju i sadržaj sildenafil.

Priprava osnovnih standardnih otopina:

Osnovna otopina sildenafilcitrata: U odmjernu tikvicu od 50 ml odvagalo se 35,0 mg standarda sildenafilcitrata i otopilo se u metanolu. Tikvica je do oznake volumena nadopunjena metanolom. Dobivena je otopina masene koncentracije sildenafil 0,5 mg mL⁻¹.

Osnovna otopina tadalafila: U odmjernu tikvicu od 50 ml odvagalo se 25,0 mg standarda tadalafila i otopilo se u metanolu. Tikvica je do oznake volumena nadopunjena metanolom. Dobivena je otopina masene koncentracije tadalafila 0,5 mg mL⁻¹.

Osnovna otopina vardenafila: U odmjernu tikvicu od 50 ml odvagalo se 30,0 mg standarda vardenafila i otopilo se u metanolu. Tikvica je do oznake volumena nadopunjena metanolom. Dobivena je otopina masene koncentracije vardenafila 0,5 mg mL⁻¹.

Identifikacijska otopina: U odmjernu tikvicu od 10 ml otpipetirano je 1 ml osnovne otopine sildenafil, 1 ml osnovne otopine tadalafila i 1 ml osnovne otopine vardenafila. Tikvica je do oznake volumena nadopunjena metanolom. Dobivena je otopina u kojoj su svi analiti koncentracije 0,05 mg mL⁻¹ otopine.

Tablica 1. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Provjera prikladnosti sustava	<ul style="list-style-type: none"> - Rezolucija između pikova vardenafila i sildenafilila mora biti veća od 1,5 - Simetrija svih pikova mora biti manja od 2
Specifičnost	<ul style="list-style-type: none"> - Retencijska vremena vardenafila, sildenafilila i tadalafila u rezolucijskoj otopini (ID standard) moraju odgovarati retencijskim vremenima pojedinih komponenata u standardnim otopinama unutar $\pm 5\%$ od srednje vrijednosti - m/z (sildenafilil)= 475,21 g mol⁻¹ - m/z (tadalafil)= 390,14 g mol⁻¹ - m/z (vardeafil)= 489,22 g mol⁻¹
Linearnost	<ul style="list-style-type: none"> - Koeficijent korelacije između svih injektiranja standardnih otopina u rasponu 0,0003 – 0,05 mg/ml mora biti veći od 0,999
Radno područje	<ul style="list-style-type: none"> - Radno područje je 0,005 – 0,05 mg mL⁻¹ (potvrđeno kroz parametre preciznosti i točnosti)
Preciznost (standard)	
Ponovljivost	<ul style="list-style-type: none"> - Relativno standardno odstupanje (RSD) između svih faktora odziva detektora (RF), priprema i injektiranja standardnih otopina u rasponu 0,005 – 0,05 mg mL⁻¹ mora biti manje ili jednako 2,0%
Intermedijarna preciznost	<ul style="list-style-type: none"> - Relativno standardno odstupanje (RSD) između svih faktora odziva detektora (RF), priprema i injektiranja standardnih otopina u rasponu 0,005 – 0,05 mg mL⁻¹ dva analitičara mora biti manje ili jednako 2,0%
Točnost	<ul style="list-style-type: none"> - 90,0 – 110,0%
Granice kvantifikacije	<ul style="list-style-type: none"> - Omjeri signala analita i šuma bazne linije mora biti veći ili jednak 10 - RSD između površina pet injektiranja otopine analita mora biti manji od 10,0%
Granica detekcije	<ul style="list-style-type: none"> - omjer signala analita i šuma bazne linije mora biti veći ili jednak 3
Robusnost	
Stabilnost otopina	<ul style="list-style-type: none"> - Relativno standardno odstupanje između površina analita manje ili jednako 2,0%
Promjena HPLC kolone	<ul style="list-style-type: none"> - RSD između površina analita manji ili jednak 2,0% - Rezolucija između pikova vardenafila i sildenafilila mora biti veća od 1,5 - Simetrija svih pikova mora biti manja od 2

3.2.4. Opis izvođenja validacijskih eksperimenata

3.2.4.1. Provjera prikladnosti sistema, specifičnost, robusnost

Prema navedenim uputama pripravljena je identifikacijska otopina i pripravljene su standardne otopine pojedinačnih analita koncentracije iste kao u identifikacijskoj otopini ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$). Nakon provedene HPLC-QTOF analize očitana su retencijska vremena (RT) i m/z vrijednosti, te su međusobno uspoređene na sljedeći način:

- a) uspoređene su RT analita u identifikacijskoj otopini sa pojedinačnim standardnim otopinama analita u svrhu provjere prikladnosti sistema i specifičnosti
- b) uspoređene su m/z analita u identifikacijskoj otopini sa pojedinačnim standardnim otopinama analita, ponovno kako bi se provjerila prikladnost sistema i specifičnost
- c) ista identifikacijska otopina je injektirana kroz više dana i rezultati su međusobno uspoređivani kako bi se ocijenila robusnost
- d) uspoređene su RT analita u identifikacijskoj otopini sa pojedinačnim standardnim otopinama analita na drugoj koloni u svrhu provjere robusnosti metode

3.2.4.2. Priprema otopina standarda za procjenu linearnosti

Pripremljene su osnovne otopine analita i niz standardnih otopina analita u rasponu koncentracija od $0,0003 - 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ na način opisan u Tablici 2. Sve standardne otopine su pripravljene iz osnovne otopine analita razrjeđivanjem u metanolu. Svaka otopina injektirana je 2 puta.

Mjeren je odziv površina pikova pojedinog analita i stavljeni su u korelaciju sa koncentracijom standarda. Nacrtna je pravac ovisnosti dobivenih površina o koncentraciji za sve analizirane otopine. Izračunata je korelacija pravca.

Tablica 2. Priprema pojedinačnih standardnih otopina. Osnovna otopina je otopina koncentracije 0,5 mg mL⁻¹.

Koncentracija standarda (mg mL ⁻¹)	V (osnovna) / ml	V (razrjeđenja)/ ml
0,0003*	3	50
0,001*	10	50
0,005	0,5	50
0,01	1	50
0,05	5	50

* Osnovna otopina za pripravu je otopina koncentracije 0,005 mg mL⁻¹.

3.2.4.3. Priprema otopina standarda za procjenu preciznosti i ponovljivosti

Pripremljena je standardna otopina sildenafil koncentratione 0,01 mg mL⁻¹ na sljedeći način. Odvagano je 3,5 mg sildenafilcitrate u odmjernu tikvicu od 50 ml. Sildenafilcitrat je otopljen u metanolu i tikvica je nadopunjena metanolom do oznake volumena. Potom je otpipetirano 2,0 ml ove otopine u odmjernu tikvicu od 10 ml koja je nadopunjena metanolom do oznake volumena. Pripremljeno je 18 standardnih otopina sildenafil koncentratione 0,01 mg mL⁻¹ u tri neovisne pripreme tijekom dva dana: analitičar 1 je pripremio 12 priprema standarda (6 priprema prvi dan, 6 priprema drugi dan), analitičar 2 je pripremio 6 priprema drugi dan. Svaka otopina je injektirana tri puta.

Nakon provedene analize, očitane su površine analita. Iz dobivenih rezultata izračunat je faktor odziva detektora (RF) koji je omjer koncentracije i površine analita. Izračunato je relativno standardno odstupanje za sve rezultate.

Intermedijarna preciznost provjerena je usporedbom RF vrijednosti niza pripremljenih standarda koje su dva analitičara pripremala kroz cjelokupno vrijeme ispitivanja parametra.

Iz rezultata dobivenih od strane jednog analitičara tijekom jednog dana ispitana je ponovljivost.

Evaluacija rezultata provedena je na osnovi izračuna RSD vrijednosti.

3.2.4.4. Priprema uzoraka za ispitivanje točnosti

Točnost je provjerena dodavanjem standarda u matriks, kako bi konačna koncentracija sildenafilila bila $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Provjera točnosti vršena je za tri različita matriksa: kapsule, tablete i gel.

U odmjernu tikvicu volumena 100 ml kvantitativno je prenesen 1 uzorak/matriks: usitnjena tableta, prah kapsule, 1 g gela. U takav uzorak uvagano je 7,0 mg sildenafilictrata kako bi konačna koncentracija sildenafilila u uzorku bila $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Odmjerna tikvica je potom nadopunjena do $2/3$ volumena metanolom. Snažno je miješana na miješalici 30 minuta. Nakon miješanja tikvica je nadopunjena metanolom do oznake volumena. Dio otopine je centrifugiran 10 minuta na 4500 rpm. Pripremljene su 3 takve otopine za svaki uzorak. Ove otopine korištene su za pripremu otopina koncentracije $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$.

10,0 ml supernatanta otopine uzorka koncentracije $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ je otpipetirano u odmjernu tikvicu volumena 50 ml. Tikvica je do oznake volumena nadopunjena metanolom kako bi se dobila otopina koncentracije analita $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$.

5,0 ml supernatanta otopine uzorka koncentracije $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ je otpipetirano u odmjernu tikvicu volumena 50 ml. Tikvica je do oznake volumena nadopunjena metanolom kako bi se dobila otopina koncentracije analita $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$.

Uz ove otopine pripremljene su i otopine slijepih proba koje sadrže uzorak bez uvaganog sildenafilila. Svaka pripremljena otopina injektirana je tri puta.

Nakon analize očitane su površine analita u svim uzorcima. Iz razlike površina u uzorcima sa dodanim standardom i površina u uzorcima bez dodanog standarda, u odnosu na površinu dodanog standarda, izračuna se

iskorištenje metode, relativna standardna devijacija i srednja vrijednost svih iskorištenja.

3.2.4.5. Ispitivanje granica kvantifikacije i detekcije

Za ispitivanje granica kvantifikacije i detekcije korištene su otopine koncentracije 0,0003 i 0,001 mg mL⁻¹, pripremljene prema Tablici 2. Izmjeren je omjer signala analita i visine šuma bazne linije.

3.2.5. Opis pripreme otopina uzoraka za koje postoji sumnja na krivotvorenje

Otopina uzorka pripremljena je na način da je jedna doza (jedna usitnjena tableta, sadržaj kapsule ili sadržaj vrećice) kvantitativno prenesena u tikvicu volumena 100 ml. U tikvicu je dodan metanol do otprilike 2/3 volumena. Tikvica je postavljena na miješalicu kako bi se otopina snažno miješala 30 minuta. Nakon miješanja, tikvica je nadopunjena metanolom do oznake volumena. Dio tako pripremljene otopine je centrifugiran 10 minuta na 4500 rpm-a. Centrifugirana otopina je analizirana.

Analiza je započeta identifikacijom sildenafilu u uzorcima spektrometrijom masa. U slučaju pozitivne identifikacije sildenafilu u analiziranom uzorku, pristupilo se kvantitativnoj analizi uzoraka metodom tekućinske kromatografije uz UV-detekciju.

Pripremljene su otopine standarda sildenafilcitrata koncentracije sildenafilu 0,005 mg mL⁻¹, 0,01 mg mL⁻¹ i 0,05 mg mL⁻¹, sukladno Tablici 2. Pripremljena je i identifikacijska otopina. Procjena koncentracije sildenafilu u uzorcima provedena je usporedbom površina pikova dobivenih u uzorcima sa površinama pikova u identifikacijskoj otopini. U slučaju da su površine pikova analita u uzorku veće od površine pikova u identifikacijskoj otopini, uzorak je dodatno razrijeđen metanolom u pogodnom volumenu.

3.2.6. Obrada i prikazivanje rezultata

Za izvođenje kvantitativne analize integrirani su pikovi na kromatogramima standarda i uzorka. Sadržaj sildenafilu u uzorku je izražen kao mg/dozi.

Računa se na sljedeći način:

Jednadžba 1.
$$RF = \frac{m_{std} \cdot w \cdot F \cdot D_{std}}{A_{std} \cdot 50}$$

Jednadžba 2.
$$\frac{mg}{dozi} = RF \cdot Au \cdot 100 \cdot Du$$

Legenda:

RF- faktor odaziva detektora

m_{std} - odvaga standarda (mg)

w – čistoća standarda

D_{std} – dodatno razrjeđenje za pripremu otopine standarda

F – faktor korekcije (F (sildenafilu)= 0,7118)

A_{std} – površina analita u standardnoj otopini

A_u – površina analita u otopini uzorka

D_u – dodatno razrjeđenje otopine uzorka (ako je potrebno)

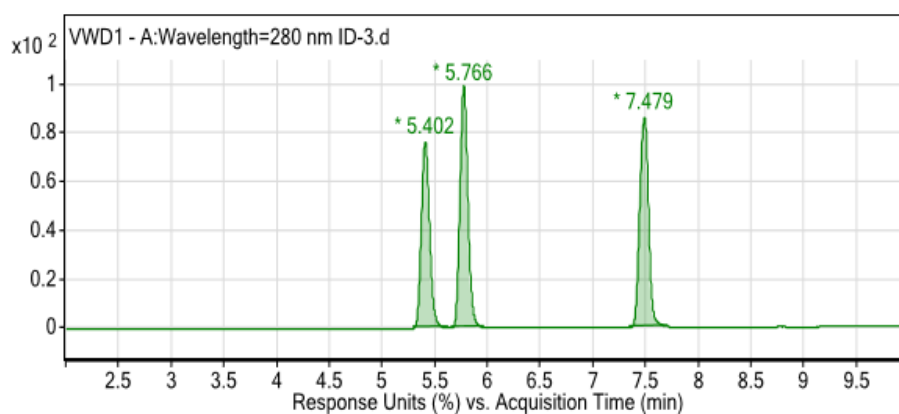
4. REZULTATI

4.1. Rezultati validacije metode

4.1.1. Provjera prikladnosti sustava i specifičnosti

Rezolucija između pikova vardenafila i sildenafilu u identifikacijskoj otopini je veća od 1,5. Simetrija svih pikova je manja od 2.

Retencijsko vrijeme sildenafilu u rezolucijskoj (ID) otopini odgovara retencijskom vremenu otopine standarda sildenafilu. m/z sildenafilu u identifikacijskoj otopini odgovara m/z vrijednosti u otopini standarda sildenafilu ($m/z = 475,21$).



Slika 4 Rezolucijska otopina; redosljed analita: vardenafil, sildenafil, tadalafil

Tablica 4. Kriteriji i rezultati za potvrdu specifičnosti / selektivnosti

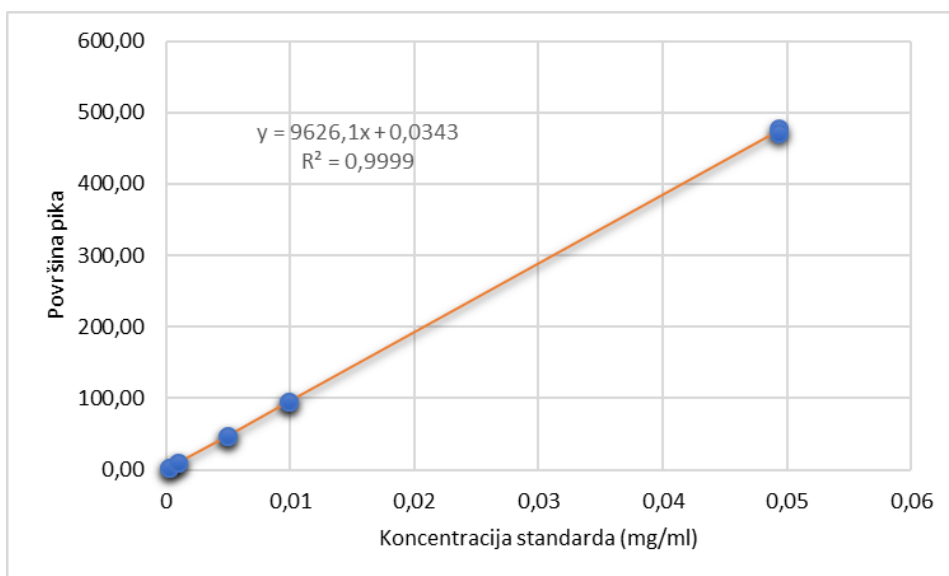
Parametar	Kriterij	Rezultat
Retencijsko vrijeme (RT)	RT vardenafila, sildenafil i tadalafil u rezolucijskoj otopini (ID standard) moraju odgovarati retencijskim vremenima pojedinih komponenata u standardnim otopinama unutar $\pm 5\%$ od srednje vrijednost	Vardenafil : 5,48 min (std) 5,45 min (ID) Sildenafil: 5,89 min (std) 5,88 min (ID) Tadalafil: 7,52 min (std) 7,52 min (ID)
m/z	m/z vardenafila: 489,22 m/z sildenafil: 475,21 m/z tadalafil: 390,14	Vardenafil : 489,22 (std) 489,22 (ID) Sildenafil: 475,21 (std) 475,21 (ID) Tadalafil: 390,14 (std) 390,14 (ID)

4.1.2. Linearnost

Koeficijent korelacije svih injektiranja otopina standarda sildenafilcitrata u koncentracijama sildenafilu od 0,0003 mg mL⁻¹ do 0,05 mg mL⁻¹ iznosi 0,9999. U Tablici 5 sumiran je prikaz odnosa koncentracije sa površinom pikova.

Tablica 5. Ovisnost površina analita o koncentraciji sildenafilu

Koncentracija [mgmL ⁻¹]	Broj injektiranja	Površine
		sildenafil
0,0003	1	2,8604
	2	2,9088
0,001	1	9,3873
	2	9,2934
0,005	1	46,6385
	2	46,7075
0,01	1	96,0601
	2	96,0173
0,05	1	477,9388
	2	470,6793
nagib (<i>slope</i>):		9626,08
odsječak (<i>intercept</i>):		0,0343
R^2 :		0,9999



Slika 5 Linearnost otopina standarda sildenafil; $R^2=0,9999$

4.1.3. Provjera ponovljivosti i preciznosti

Izračunati su faktori odziva detektora prilikom injektiranja otopina koncentracije $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ koje su pripravljene od strane dva analitičara tijekom dva dana. Izračunate su RF vrijednosti i njihovo relativno standardno odstupanje (RSD) za svakog analitičara posebno, između dva analitičara i RSD svih rezultata.

Prosječan faktor odziva detektora (RF) za oba dana iznosi 0,000102. Relativno standardno odstupanje (RSD) između svih faktora odziva detektora prilikom injektiranja iznosi 1,42%.

Tablica 6. Sildenafil - ponovljivost i intermedijarna preciznost pripreme standarda

Standard	Analitičar 1		Analitičar 2
	1. dan	2. dan	1. dan
	RF	RF	RF
1	0,000103	0,000103	0,000102
	0,000103	0,000102	0,000101
	0,000103	0,000102	0,000101
2	0,000105	0,000104	0,000101
	0,000103	0,000104	0,000101
	0,000102	0,000103	0,000101
3	0,000105	0,000101	0,000104
	0,000103	0,000101	0,000103
	0,000103	0,000102	0,000103
4	0,000103	0,000102	0,000102
	0,000103	0,000103	0,000103
	0,000102	0,000101	0,000103
5	0,000103	0,000101	0,000103
	0,000103	0,000099	0,000103
	0,000103	0,000099	0,000102
6	0,000103	0,000098	0,000103
	0,000103	0,000098	0,000103
	0,000103	0,000101	0,000103
<i>RSD:</i>	0,80 %	1,80%	0,99%
RSD između rezultata analitičara 1 unutar dva dana:			1,61%
RSD između rezultata dva analitičara unutar unutar istog dana:			1,50%
<i>RSD između svih rezultata:</i>			1,42%

4.1.4. Provjera točnosti

Kriterij točnosti 90,0-110,0% je zadovoljen za sve matrikse (tablete, kapsule, gel).

Tablica 7. Točnost metode za sildenafil u tri različita matriksa (koncentracije su izražene kao mg mL^{-1})

Konc.	uz	Iskorištenje (%)								
		kapsula			tableta			gel		
		C _{teor}	C _{dobv}	%	C _{teor}	C _{dobv}	%	C _{teor}	C _{dobv}	%
0,005	1	0,0049	0,0045	92,3	0,0049	0,0049	99,5	0,0050	0,0049	99,5
		0,0049	0,0046	93,3	0,0049	0,0049	99,7	0,0050	0,0051	101,8
		0,0049	0,0046	93,6	0,0049	0,0050	101,1	0,0050	0,0049	99,0
	2	0,0049	0,0046	93,5	0,0050	0,0049	99,3	0,0049	0,0050	100,3
		0,0049	0,0047	94,4	0,0050	0,0050	100,4	0,0049	0,0050	101,3
		0,0049	0,0047	94,3	0,0050	0,0049	99,5	0,0049	0,0050	100,5
	3	0,0049	0,0047	93,9	0,0049	0,0050	101,3	0,0049	0,0049	100,7
		0,0049	0,0048	95,3	0,0049	0,0050	101,4	0,0049	0,0049	100,7
		0,0049	0,0047	93,6	0,0049	0,0050	102,1	0,0049	0,0048	97,5
0,01	1	0,0098	0,0091	92,7	0,0098	0,0100	101,9	0,0099	0,0101	102,0
		0,0098	0,0093	94,3	0,0098	0,0098	100,1	0,0099	0,0100	101,1
		0,0098	0,0093	94,2	0,0098	0,0099	100,6	0,0099	0,0101	101,9
	2	0,0099	0,0092	92,9	0,0099	0,0099	100,3	0,0099	0,0099	99,9
		0,0099	0,0092	93,7	0,0099	0,0101	101,5	0,0099	0,0100	101,0
		0,0099	0,0091	92,0	0,0099	0,0099	99,6	0,0099	0,0100	101,3
	3	0,0099	0,0092	93,2	0,0098	0,0098	100,4	0,0098	0,0099	100,8
		0,0099	0,0094	95,0	0,0098	0,0101	102,7	0,0098	0,0098	100,3
		0,0099	0,0094	95,1	0,0098	0,0099	101,2	0,0098	0,0099	100,8
	1	0,0492	0,0460	93,4	0,0491	0,0492	100,2	0,0496	0,0503	101,2

0,05		0,0492	0,0466	94,8	0,0491	0,0498	101,4	0,0496	0,0509	102,6
		0,0492	0,0467	94,8	0,0491	0,0498	101,3	0,0496	0,0508	102,3
	2	0,0493	0,0463	93,9	0,0495	0,0496	100,1	0,0495	0,0508	102,7
		0,0493	0,0469	95,0	0,0495	0,0498	100,5	0,0495	0,0500	101,1
		0,0493	0,0467	94,6	0,0495	0,0499	100,8	0,0495	0,0491	99,2
	3	0,0494	0,0474	95,9	0,0490	0,0491	100,2	0,0491	0,0503	102,6
		0,0494	0,0476	96,4	0,0490	0,0497	101,4	0,0491	0,0498	101,6
		0,0494	0,0464	94,0	0,0490	0,0497	101,4	0,0491	0,0486	99,0
	<i>Srednja vrijednost %:</i>			<i>94,1</i>			<i>100,7</i>			<i>100,8</i>
<i>RSD %:</i>			<i>1,10</i>			<i>0,87</i>			<i>1,23</i>	

4.1.5. Provjera radnog područja

Kroz parametre preciznosti i točnosti potvrđeno je da je radno područje za sildenafil u koncentracijskom području 0,005 – 0,05 mg mL⁻¹.

4.1.6. Provjera granica kvantifikacije i detekcije

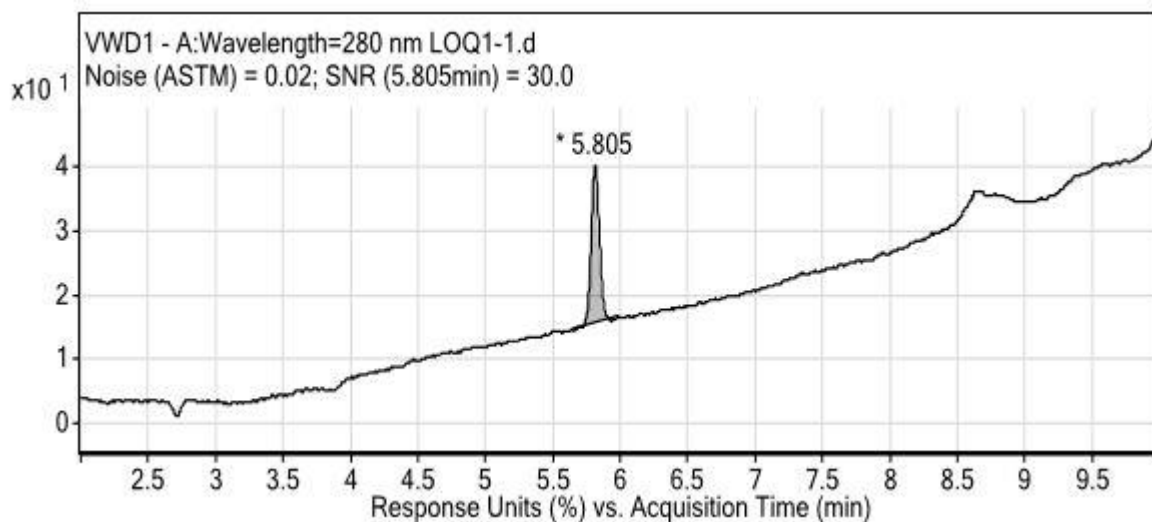
Ispitivanjem granica kvantifikacije utvrđeno je da su svi omjeri signala analita i šuma bazne linije veći od 10. Koncentracija 0,0003 mgmL⁻¹ je potvrđena kao granica kvantifikacije sildenafilu prema postavljenim kriterijima.

Tablica 8. Granice kvantifikacije za sildenafil za koncentraciju 0,0003 mgmL⁻¹

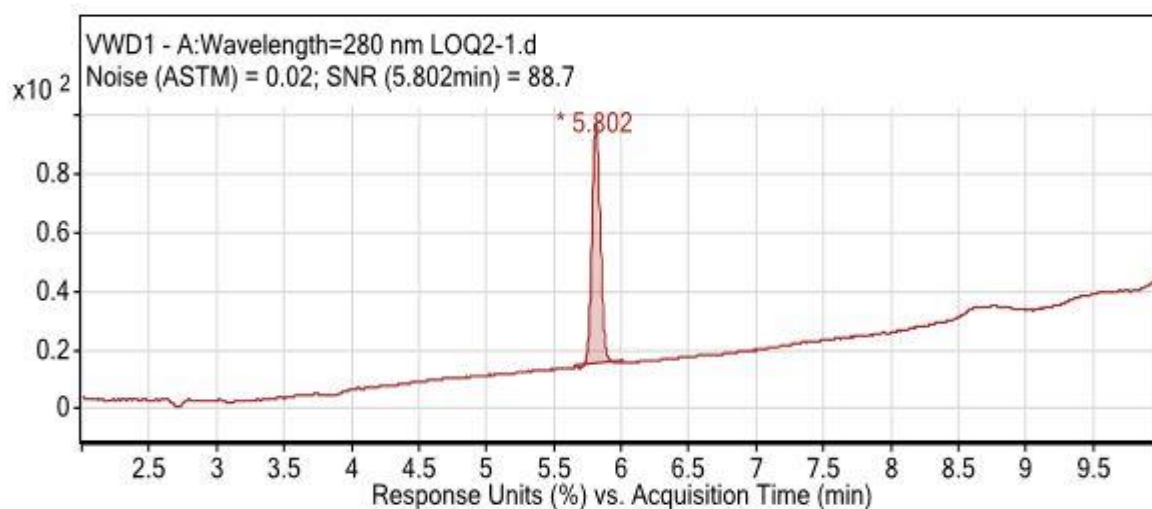
Koncentracija [mgmL ⁻¹]	Broj injektiranja	Površine
		sildenafil
0,0003	1	2,86
	2	2,88
	3	2,86
	4	2,90
	5	2,83
<i>Srednja vrijednost:</i>		2,87
<i>RSD %:</i>		0,9
<i>S / N :</i>		29

Tablica 9. Granice kvantifikacije za sildenafil za koncentraciju 0,001 mgmL⁻¹

Koncentracija [mgmL ⁻¹]	Br. injek	Površine
		sildenafil
0,001	1	9,65
	2	9,79
	3	9,85
	4	9,78
	5	9,84
<i>Srednja vrijednost:</i>		9,78
<i>RSD %:</i>		0,8
<i>S / N :</i>		100



Slika 6 Kromatogram ispitivanja granica kvantifikacije, $c(\text{sildenafil}) = 0,0003 \text{ mg ml}^{-1}$; omjer signala i šuma bazne linije = 30,0

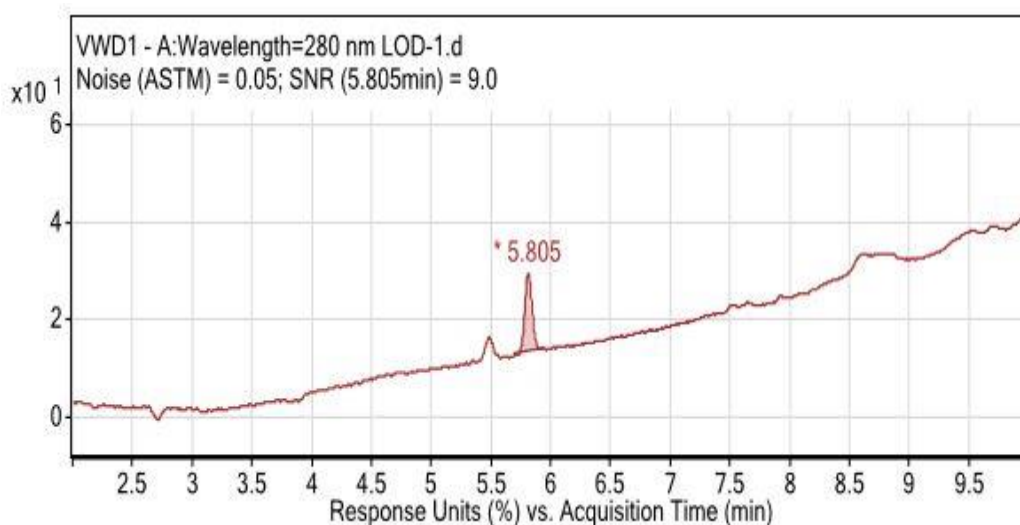


Slika 7 Kromatogram ispitivanja granica kvantifikacije, $c(\text{sildenafil}) = 0,0001 \text{ mg ml}^{-1}$; omjer signala i šuma bazne linije = 88,7

Ispitivanjem granica detekcije utvrđeno je da su svi omjeri signala analita i šuma bazne linije veći od 3. Koncentracija $0,0001 \text{ mg mL}^{-1}$ je potvrđena kao granica otkrivanja sildenafil.

Tablica 10. Rezultati provjere granica detekcije sildenafilila

Koncentracija sildenafilila (mg mL ⁻¹)	Broj injektiranja	Površina pika	Omjer signala i šuma bazne linije
0,0001	1	1,89	9
0,0001	2	1,23	8,2
0,0001	3	1,05	13,4



Slika 8 Kromatogram ispitivanja granica detekcije, c(sildenafilil)= 0,0001 mg ml⁻¹; omjer signala i šuma bazne linije = 9,0

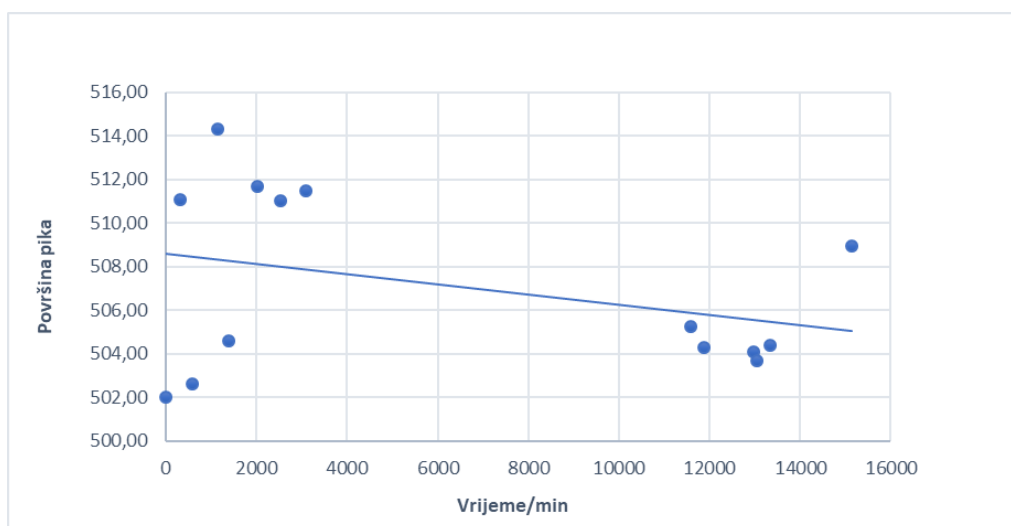
4.1.7. Provjera stabilnosti otopina

Identifikacijska otopina je injektirana tijekom 3 mjeseca. Tijekom tog perioda, čuvana je u hladnjaku na 4-8°C.

Ispitivanjem stabilnosti otopina standarda sildenafilila ustanovljeno je da je relativna standardna devijacija između površina analita 1,38 %, odnosno manja od 2,0%. Otopina standarda je stabilna u periodu od tri mjeseca.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja stabilnosti otopina standarda sildenafilila

Uzorak	Vrijeme analize		Vrijeme/min	Površina pika
ID-1	13.03.18.	12:19:20 PM	0	494,48
ID-2	13.03.18.	5:45:11 PM	326	502,45
ID-3	13.03.18.	10:09:39 PM	590	494
ID-4	14.03.18.	7:14:30 AM	1135	505,77
ID-1	14.03.18.	11:33:26 AM	1394	497,68
ID-2	14.03.18.	9:56:29 PM	2017	504,54
ID-3	15.03.18.	6:29:58 AM	2530	501,77
ID-4	15.03.18.	3:58:57 PM	3099	503,37
ID-1	21.03.18.	1:17:11 PM	11578	492,89
ID-2	21.03.18.	6:13:03 PM	11874	493,86
ID-3	22.03.18.	12:22:01 PM	12963	493,62
ID-1	22.03.18.	1:34:34 PM	13035	492,81
ID-2	22.03.18.	6:45:28 PM	13346	491,24
ID-3	24.03.18.	12:41:47 AM	15142	497,94
ID-3	10.06.18.	8:13:49 AM	125773	516,63
Prosječna vrijednost površine pika: 498,87 Standardna devijacija površine pika: 6,893508 RSD površine pika: 1,381825				



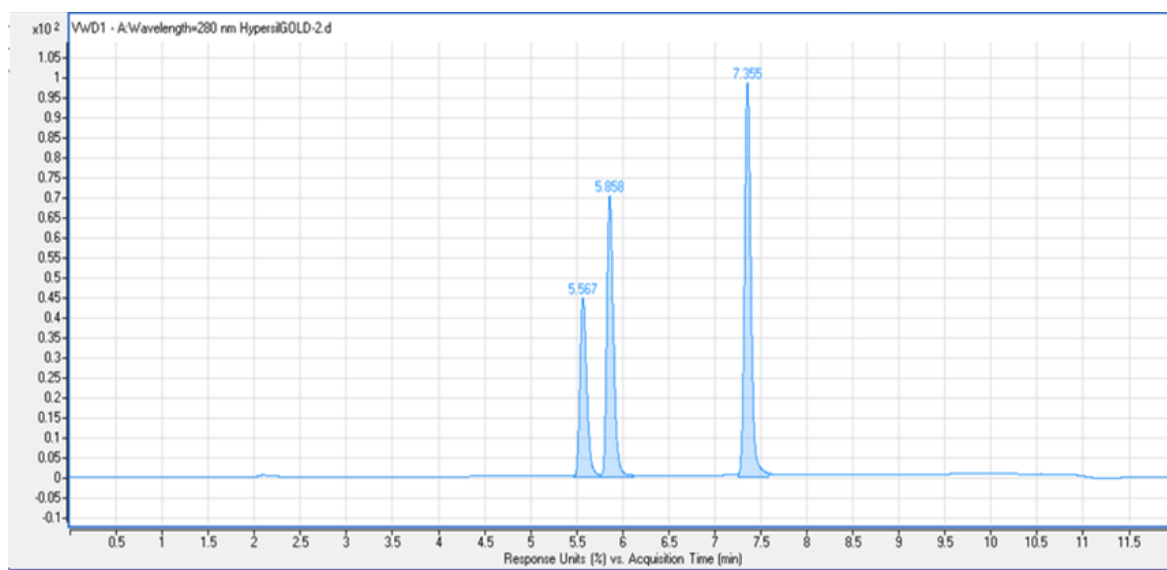
Slika 9 Grafički prikaz stabilnosti otopina standarda sildenafilila

4.1.8. Promjena HPLC kolone

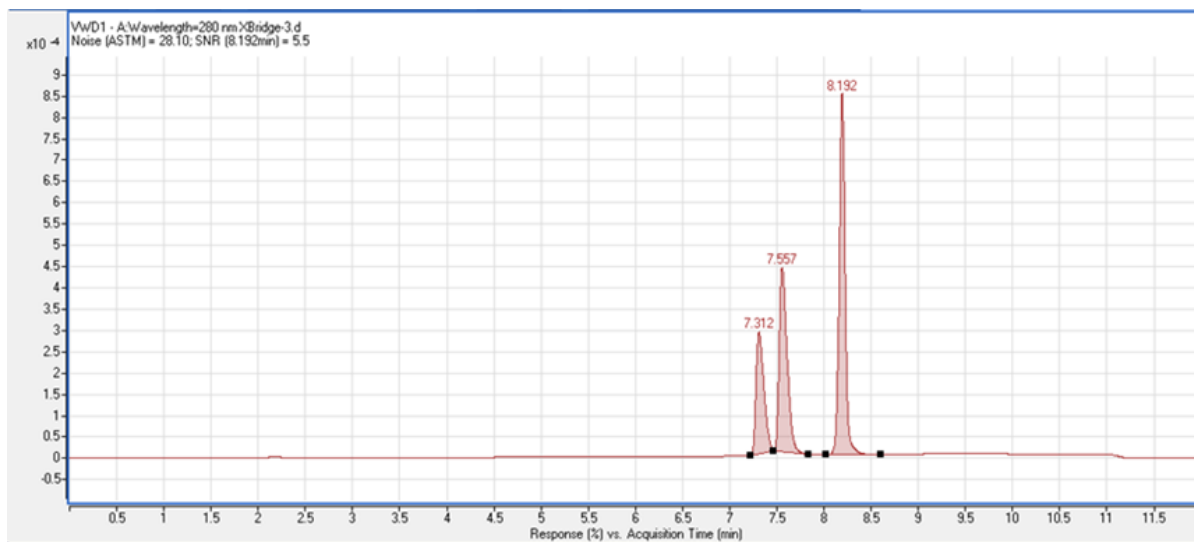
Uz kolonu Hypersil GOLD 3 μm , 150 x 4mm, provjerena je separacija na koloni XBridge C18 3,5 μm , 150 x 4,6m. Na slikama 10. i 11. su kromatogrami identifikacijske otopine dobiveni na ovim kolonama, a u tablici 12. su sumirani rezultati usporedbi ispitanih kolona.

Tablica 12. Usporedba analitičkih kolona

Parametar usporedbe	Analit	Kolona		<i>RSD površina</i>
		Hypersil GOLD	XBridge C18	
površina	vardeofil	325,35	320,78	1,0 %
	sildenafil	493,69	486,62	1,0%
	tadalafil	673,94	684,84	1,1%
rezolucija	Vardenafil / sildenafil	2,2	1,6	
Simetrija	vardeofil	1,3	1,4	
	sildenafil	1,3	1,5	
	tadalafil	1,2	1,1	



Slika 10 Kromatogram identifikacijske otopine dobiven na koloni Hypersil GOLD 3 μm , 150 x 4mm



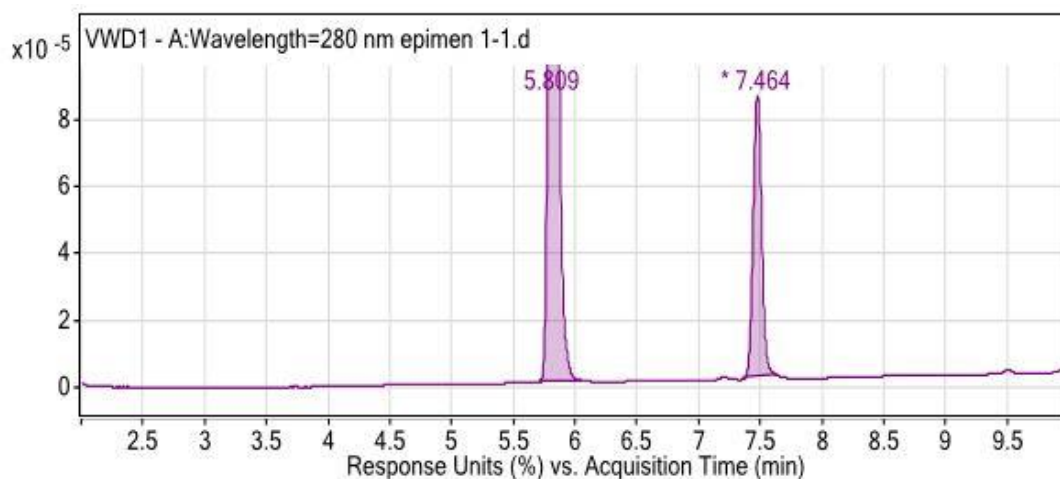
Slika 11 Kromatogram identifikacijske otopine dobiven na koloni XBridge C18 3,5 μ m, 150 x 4,6mm

4.2. Rezultati analize uzoraka za koje postoji sumnja na krivotvorenje

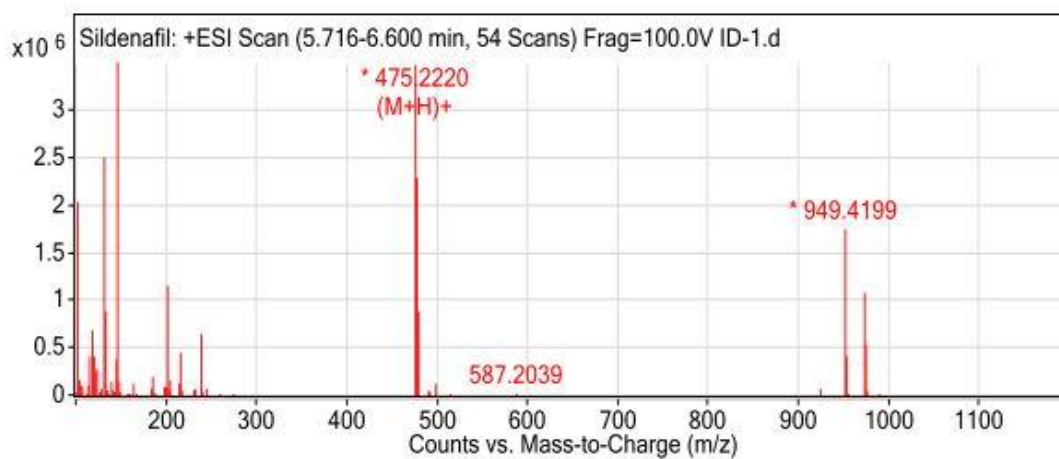
Analizirana su četiri dodatka prehrani za erektilnu disfunkciju kod kojih postoji sumnja na krivotvorenje. Od svakog dodatka uzeta su po dva uzorka (2 tablete, 2 kapsule) i analizirani su prema protokolu navedenom u točki 3.2.4. Sildenafil je masenim spektrometrom detektiran u dodacima *Epimen*[®] i *Vivanord*[®]. I u *Epimen*[®] i *Vivanord*[®] kapsulama detektiran je i tadalafil, također PDE5 inhibitor. Nakon detekcije, izvršena je kvantifikacija čiji rezultati su u Tablici 13.

Tablica 13. Rezultati ispitivanja sadržaja *Epimen* i *Vivanord* kapsula

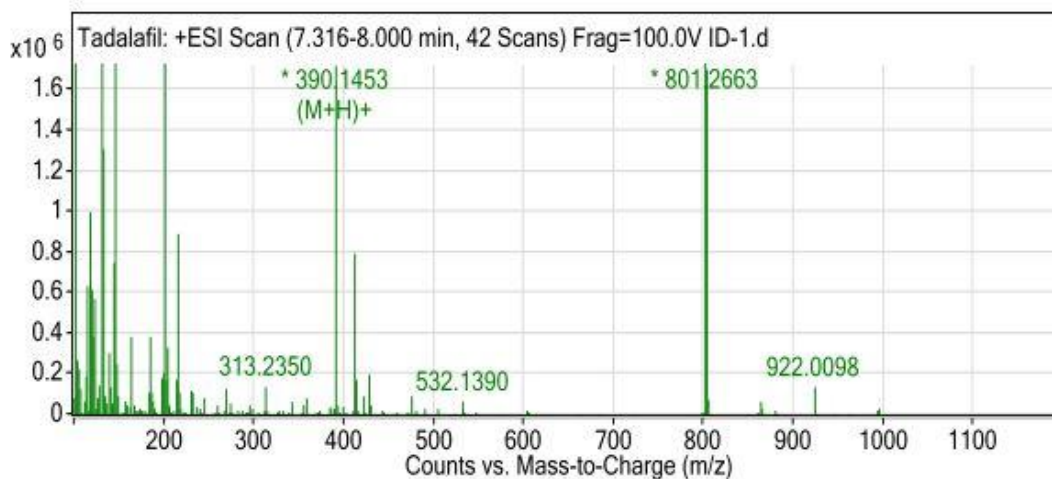
Uzorak	Retencijsko vrijeme	Površina pika	Količina sildenafil (mg/dozi)	Srednja vrijednost količine sildenafil (mg/dozi)	RSD količine sildenafil (%)
Epimen1	5,809	418,33	87,39	90,01	2,67
Epimen1	5,807	425,96	88,98		
Epimen2	5,807	433,78	90,62		
Epimen2	5,812	445,31	93,03		
Vivanord1	5,725	94,33	98,70	93,50	6,18
Vivanord1	5,746	93,94	98,29		
Vivanord2	5,734	84,24	88,14		
Vivanord2	5,754	84,92	88,85		



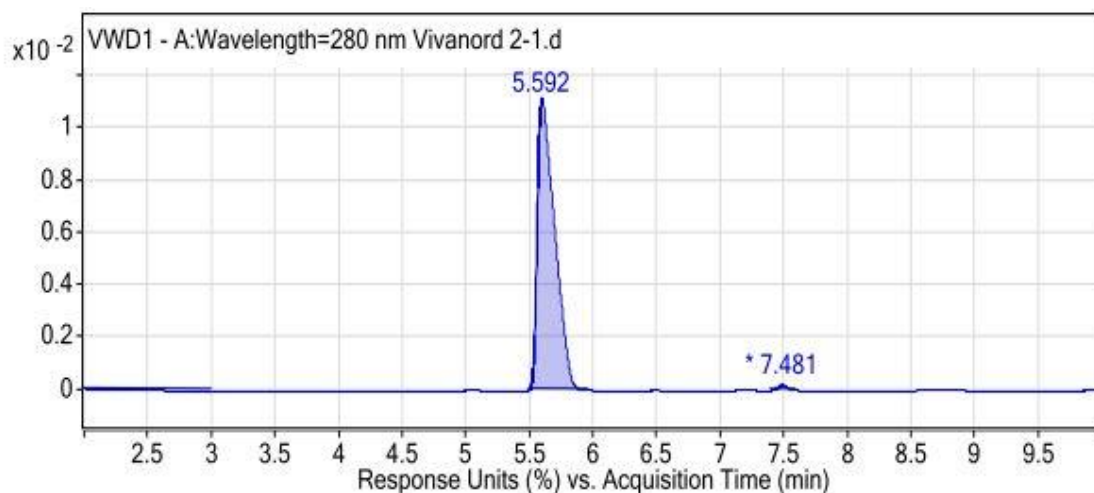
Slika 12 Kromatogram ispitivanja Epimena® (pik 1= sildenafil, pik 2= tadalafil)



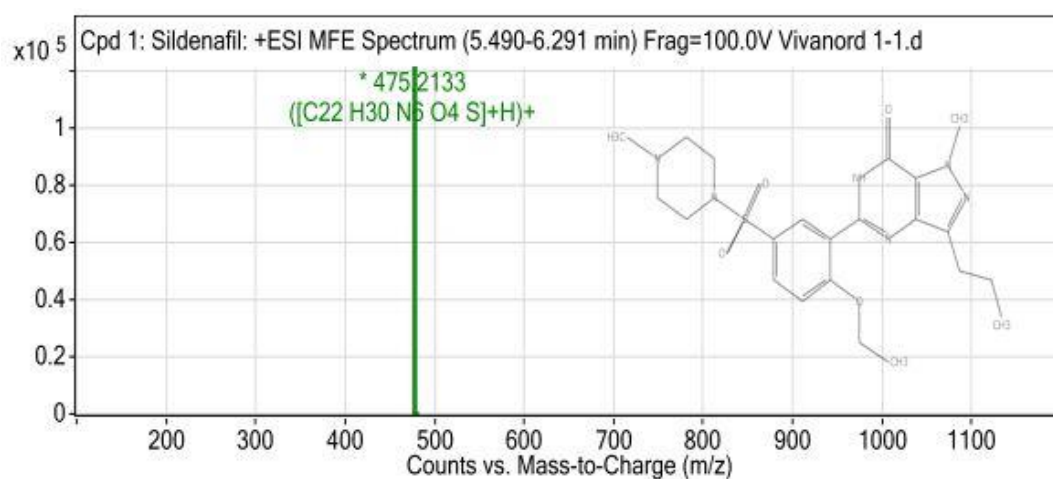
Slika 13 MS identifikacija sildenafilu u otopini Epimena®



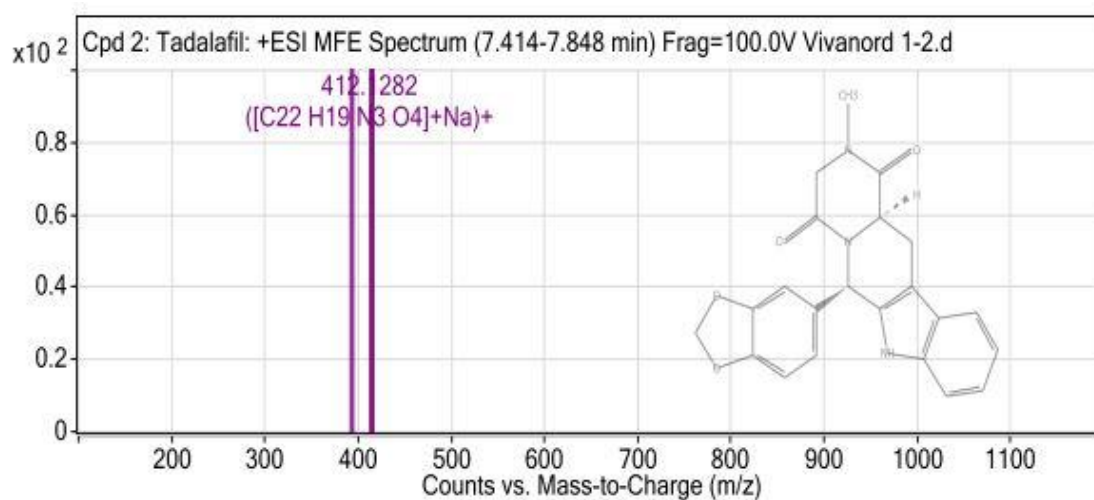
Slika 14 MS identifikacija tadalafila u otopini Epimena®



Slika 15 Kromatogram ispitivanja Vivanorda® (pik 1 = sildenafil, pik 2= tadalafil)



Slika 16 MS identifikacija sildenafilu u otopini Vivanorda®



Slika 17 MS identifikacija tadalafilu u otopini Vivanorda®

5. RASPRAVA

Iako rijetke, brojne ozbiljne nuspojave uzrokovane korištenjem sildenafilu u liječenju erektilne disfunkcije potaknule su razvoj proizvoda temeljen na prirodnim izvorima. Za dodatke prehrani navodi se kako se sastoje od sirovina isključivo biljnog porijekla. Obično je riječ o ekstraktima biljaka za koje se, u tradicionalnoj medicini, vjeruje da posjeduju određeni učinak na postizanje erekcije.

Kako učinak biljnih sirovina nije uvijek obećavajući, ponekad proizvođači dodataka prehrani posežu za dodavanjem sildenafilu ili njegovih modifikacija u svoje proizvode. Čin dodavanja sildenafilu u dodatke prehrani jamči njihovu djelotvornost ali i pojavu kontraindikacija vezanih uz korištenje sildenafilu. Povećan broj nuspojava prilikom korištenja dodataka prehrani za održavanje normalne seksualne funkcije muškarca potaknule su na razvoj tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrijom masa kao analitičke metode za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu u istima.

Prilikom sprežanja tekućinske kromatografije sa masenim spektrometrom potrebno je obratiti pozornost na odabir otapala. Tako je u ovom slučaju kao otapalo odabran metanol. Pokazalo se da dolazi do vrlo dobrog otapanja sildenafilu u metanolu. Metanol je pogodan za korištenje i u HPLC i u MS sustavu. Dobro otapanje sildenafilu u metanolu čini postupak pripreme uzoraka jednostavnim i smanjuje trajanje analitičkog postupka.

Valna duljina pri kojoj su uzorci analizirani UV detektorom je 280 nm, iako se kao valna duljina pri kojoj sildenafil postiže maksimum apsorbancije spominje 292 nm¹⁸. Razlog tome je što je u ovom analitičkom postupku uz detekciju i kvantifikaciju sildenafilu, vršena detekcija i kvantifikacija tadalafilu i vardenafila. Pokazalo se da je 280 nm valna duljina pri kojoj se postiže odgovarajuća rezolucija i simetrija pikova sildenafilu, tadalafilu i vardenafila. Rezolucija između pikova vardenafila i sildenafilu u identifikacijskoj otopini je veća od 1,5. Simetrija svih pikova je manja od

2, što udovoljava postavljenim zahtjevima. Retencijsko vrijeme sildenafilu u rezolucijskoj (ID) otopini odgovara retencijskom vremenu otopine standarda sildenafilu.

Analizom na masenom spektrometru dobivene su odgovarajuće m/z vrijednosti (m/z (sildenafil) = 475,21).

Za ispitivanje linearnosti metode mjeren je odziv površina pikova analita i stavljeni su u korelaciju sa koncentracijom standarda. Koeficijent linearnosti iznosi 0,9999 što udovoljava postavljenim zahtjevima. Rezultati analize ponovljivosti i preciznosti također odgovaraju postavljenim uvjetima, RSD < 2,0%.

Kada je u pitanju točnost, sva tri matriksa, gel, tableta, kapsula udovoljavaju zahtjevima 90,0-110,0% točnosti. Za istaknuti je kako je kompleksno analizirati uzorke čiji sastav je nepoznat. Na deklaracijama proizvoda navodi se samo da sadrže ekstrakte određenih biljaka. Sastav dodataka prehrani može utjecati na analizu i rezultate iste. Zato je dobro imati HPLC s UV detektorom i maseni spektrometar. Veća je sigurnost da su prikupljeni rezultati točni.

Potvrđeno je da je otopina standarda sildenafilcitrata stabilna kroz cijelo vrijeme vršenja analize. Prema kriterijima postavljenima Programom validacije, kolona XBridge C18 3,5 µm, 150 x 4,6m je ekvivalenta koloni Hypersil GOLD 3 µm, 150 x 4mm. Riječ je o ponovljivoj, robusnoj i preciznoj metodi.

Nakon što je ustanovljeno da je metoda prema svim parametrima prikladna za detekciju i kvantifikaciju sildenafilu u dodacima prehrani, analizirani su uzorci dodataka prehrani. Utvrđeno je da se u 2 dodatka prehrani nalazi sildenafil. Riječ je o dodacima *Vivanord*[®] i *Epimen*[®]. U oba navedena dodatka detektiran je i tadalafil. Zanimljivo je za primijetiti kako su oba dodatka u kojima je pronađen sildenafil u farmaceutskom obliku kapsula. U *Epimen*[®] kapsulama prosječna količina sildenafilu iznosi 90,01 mg uz relativnu standardnu devijaciju od 2,67%. Prosječna količina sildenafilu u

Vivanord[®] kapsulama iznosi 93,5 mg uz relativnu standardnu devijaciju od 6,18 %. Ovako velik iznos relativne standardne devijacije nije neuobičajen. Može upućivati na dvije stvari: nasumično nekontrolirano dodavanje sildenafilu dodacima prehrani i/ili utjecaj sastojaka biljnog porijekla na točnost metode.

Riječ je o zabrinjavajućem rezultatu obzirom da je preporučena dnevna doza sildenafilu 50 mg a maksimalna preporučena dnevna doza 100 mg. Nekontrolirano korištenje ovakvih dodataka prehrani može imati ozbiljne posljedice po zdravlje.

6. ZAKLJUČAK

Tehnika spregnute tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije se pokazala prikladnom i dominantnom za karakterizaciju PDE5 inhibitora u dodacima prehrani za erektilnu disfunkciju. Metoda je validirana i prema svima parametrima zadovoljava.

Potvrđeno je da je obrnuto-fazna tekućinska kromatografija na C18 koloni prikladna za izdvajanje molekule sildenafil. Sprezanje sa masenom spektrometrijom povećava točnost rezultata zato jer je masena spektrometrija osjetljiva, pa će detektirati i spojeve u tragovima. Također je dobra zbog pristupa brojnim bazama podataka koje olakšavaju identifikaciju spojeva.

Nakon identifikacije sildenafil masenom spektrometrijom, detekcija sildenafil UV detektorom pri 280nm pokazala se veoma prikladnom. Pri toj valnoj duljini dobiveni su pikovi dobre rezolucije i simetrije. Dobiveni pikovi su kasnije integrirani kako bi odredili točne količine sildenafil u pojedinim uzorcima. Parametaru točnosti udovoljavaju sva tri matriksa (tableta, kapsula, gel).

Poslije uspješno provedene validacije započeta je analiza uzoraka kod koji postoji sumnja na krivotvorenje. Od četiri analizirana uzorka kod dva je detektiran sildenafil. Riječ je o kapsulama *Epimen*[®] (serija L22122019) i *Vivanord*[®] (serija 171130). Prosječna količina sildenafil u oba uzorka iznosi preko 90,0 mg/dozi. Riječ je o opasnoj količini sildenafil obzirom da je preporučena dnevna količina sildenafil 50 mg, a maksimalna dozvoljena dnevna količina 100 mg.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je krivotvorenje dodataka prehrani za erektilnu disfunkciju prisutno i na hrvatskom tržištu. Nužno je bilo razviti prikladnu analitičku metodu za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju sildenafil u dodacima prehrani za erektilnu disfunkciju.

Naime, radi se o dodacima prehrani koji se najčešće kupuju putem online trgovine ili u ljekarnama, te se nekontrolirano koriste bez prethodnog

savjetovanja s liječnikom. Čest razlog je društvena stigma povezana sa erektilnom disfunkcijom ili želja muškaraca za poboljšanjem seksualne izvedbe.

7. LITERATURA

- 1 McMahon CG. Erectile dysfunction. *Intern Med J* 2014; **44**: 18–26.
- 2 Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 1994; **151**: 54–61.
- 3 Shah J. Erectile dysfunction through the ages. *BJU Int* 2002; **90**: 433–441.
- 4 Cartledge J, Minhas S, Eardley I. The role of nitric oxide in penile erection. 2001; : 13.
- 5 Lue TF. Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1802–1813.
- 6 Burnett AL, Ricker DD, Chamness SL, Maguire MP, Crone JK, Bredt DS *et al.* Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biol Reprod* 1995; **52**: 1–7.
- 7 Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod* 1995; **52**: 485–489.
- 8 Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Oral Sildenafil in the Treatment of Erectile Dysfunction: *Obstet Gynecol Surv* 1998; **53**: 552–554.
- 9 Jackson G, Montorsi P, Cheitlin MD. Cardiovascular safety of sildenafil citrate (Viagra®): An updated perspective. *Urology* 2006; **68**: 47–60.
- 10 UP-I-530-09-10-02-245.pdf.
<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-10-02-245.pdf>
(accessed 6 Jun2018).
- 11 Young SN. Lifestyle drugs, mood, behaviour and cognition. *J Psychiatry Neurosci* 2003; **28**: 87–89.

- 12 Pitanja_i_odgovori_Epimen_i_ViaNatur.pdf.
http://www.halmed.hr/fdsak3jnFsk1Kfa/novosti/Pitanja_i_odgovori_Epimen_i_ViaNatur.pdf (accessed 10 Jul2018).
- 13 U S Food and Drug Administration Home Page.
<https://www.fda.gov/> (accessed 10 Jul2018).
- 14 Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Cengage Learning, 2013.
- 15 Ohtsu Y, Fukui H, Kanda T, Nakamura K, Nakano M, Nakata O *et al.* Structures and chromatographic characteristics of capsule-type silica gels coated with hydrophobic polymers in reversed-phase liquid chromatography. *Chromatographia* 1987; **24**: 380–384.
- 16 Engelhardt H, Dreyer B, Schmidt H. Properties and diversity of C18 bonded phases. *Chromatographia* 1982; **16**: 11–17.
- 17 Cindri M, Markovi A, Horva A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. 2009; **45**: 15.
- 18 Singh S, Prasad B, Savaliya A, Shah R, Gohil V, Kaur A. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. *TrAC Trends Anal Chem* 2009; **28**: 13–28.

8. ŽIVOTOPIS

Marija Begić

Adresa: Križ Hrastovački 14, 44250 Petrinja, Hrvatska

Telefonski broj: +3850915079518

e-mail: marijabegic@yahoo.com

Obrazovanje

- 2016 – 2018 diplomski studij Istraživanje i razvoj lijekova, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
- 2014 -2016 preddiplomski studij Biotehnologija i istraživanje lijekova, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Akademski titula: univ. bacc. biotech. et pharm. inv

Završni rad: *Potencijalni farmakološki učinci histamina, te agonista i antagonista njegovih receptora: sadašnjost i budućnost*

Mentor rada: dr.sc. Miranda Mladinić Pejatović

- 2011 – 2014 preddiplomski studij Biotehnologija, Prehrambeno-biotehnoški Fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Aktivnosti i postignuća

- 2018 Laboratorij za analitičku biotehnologiju i proteomiku, istraživačka skupina prof. Đure Josića, volonter
- 2017 Ministarstvo znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske, stipendija
- 2017 *Institut de Biologie Structurale*, Grenoble, Francuska, stručno putovanje
- 2016 Jadran galenski laboratorij, Odjel kontrola kvalitete, stručna praksa
- Član i volonter Udruge studenata biotehnologije Rijeka

Osobne vještine

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici

engleski

njemački

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
C1	C2	C1	C1	C2
A2	B1	A2	A2	A2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Digitalna
kompetencija:

SAMOPROCJENA

Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik

Vozačka dozvola: B kategorija