

OBSAH

1.	ÚVOD	2
2.	TEORETICKÁ ČÁST	3
	2.1. Způsoby léčby erektilní dysfunkce	3
	2.2. Mechanismus působení sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu	3
	2.3. Viagra (sildenafil)	4
	2.3.1. Obecné informace o léku.....	4
	2.3.2. Farmakologické vlastnosti.....	4
	2.4. Levitra (vardenafil)	6
	2.4.1. Obecné informace o léku.....	6
	2.4.2. Farmakologické vlastnosti.....	7
	2.5. Cialis (tadalafil).....	8
	2.5.1. Obecné informace o léku.....	8
	2.5.2. Farmakologické vlastnosti.....	9
	2.6. Porovnání Viagry, Levitary a Cialisu.....	11
3.	METODY VYHLEDÁVÁNÍ POUŽITÝCH ZDROJŮ	11
4.	VÝSLEDKY REŠERŠE	13
5.	METODY STANOVENÍ LÁTEK	21
	5.1. Chromatografické metody	21
	5.1.1. RP – HPLC	21
	5.1.2. HPTLC	22
	5.2. Potenciometrická metoda	22
	5.3. Spektrofotometrické metody	23
	5.4. Voltmetrická metoda	23
	5.5. Hmotnostně spektrometrická metoda (MS)	24
	5.6. Porovnání metod stanovení sildenafilu, vardenafilu, tadalafilu	24
6.	ZÁVĚR	25
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	26
8.	POUŽITÉ ZDROJE	27
	SOUHRN.....	31

1. ÚVOD

Sildenafil, vardenafil a tadalafil jsou v této době nejvíce používaná perorální léčiva pomáhající při léčbě erektilní dysfunkce. Cílem této práce je podat přehledný souhrn analytických metod, které se používají ke stanovení výše uvedených látek. Tyto metody jsou seřazeny v přehledných tabulkách. Práce je zaměřená na metody pro stanovení sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu v tělních tekutinách, zejména v plasmě. Je zde popsáno také stanovení těchto látek v potravinových doplňcích, ve kterých je jejich přítomnost zakázána. Zmíněno je i stanovení výše uvedených látek v léčivých přípravcích. Práce vychází z nalezených článků publikovaných v odborných časopisech v uplynulých pěti letech.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Způsoby léčby erektilní dysfunkce

V dnešní době existuje mnoho způsobů léčby erektilní dysfunkce (ED). Způsob léčby je závislý na příčině ED, která může být psychogenní, hormonální, neurogenní nebo vaskulární. Mezi hlavní způsoby léčby ED patří perorální léčba pomocí tablet, injekční léčba, hormonální léčba, chirurgická léčba a psychologická léčba. Nejmodernějším způsobem léčby ED je v současnosti perorální léčba tabletami, které jsou na lékařský předpis. Tablety se polykají, nebo se nechávají rozpouštět pod jazykem. Jednotlivé druhy tablet se odlišují zejména dobou trvání účinnosti. V současnosti jsou na trhu k dispozici tři hlavní přípravky k perorální léčbě ED: Viagra (sildenafil), Levitra (vardenafil) a Cialis (tadalafil) [1].

2.2. Mechanismus působení sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu

Sildenafil, vardenafil a tadalafil (SVT) patří mezi inhibitory specifické fosfodiesterázy typu 5 (PDE 5). Za fyziologických podmínek dochází při sexuální stimulaci k uvolňování oxidu dusnatého (NO) v corpus cavernosum. NO aktivuje enzym guanylátcyklázu a dochází tak ke zvýšení hladiny cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). Zvýšená hladina cGMP vede k uvolnění hladkého svalstva v corpus cavernosum, což umožní přítok krve. PDE 5 způsobuje degradaci cGMP. PDE 5 inhibitory tedy zamezují degradaci cGMP a zvyšují tak hladinu cGMP v corpus cavernosum [2].

2.3. Viagra (sildenafil)

2.3.1. Obecné informace o léku

Složení přípravku

Jedná se o potahované tablety.

Léčivá látka: Sildenafilum (ve formě sildenafili citras (SC))

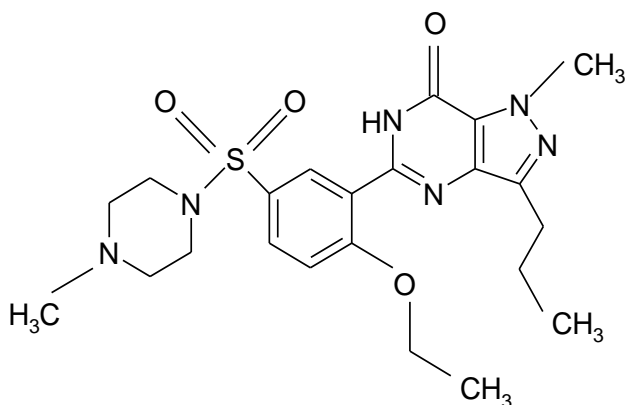
Pomocné látky:

Jádro tablety - mikrokrytalická celulosa, hydrogenfosforečnan vápenatý, sodná sůl kroskarmelosy, magnesium-stearát.

Potah tablety - hypromelosa, oxid titaničitý (E171), monohydrát laktosy, triacetin, hlinitý lak indigokarminu (E132)[2].

Molekulová hmotnost sildenafilu: 474,6 g/mol

Vzorec sildenafilu:



Obr.č.1

2.3.2. Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamické vlastnosti

Sildenafil, sloužící k léčbě ED se užívá perorálně v podobě tablet. Užívají se dávky 25 mg, 50 mg nebo 100 mg. Je účinný pouze při sexuální stimulaci, zvyšuje přítok krve do penisu. V corpus cavernosum je sildenafil selektivní inhibitor cGMP specifické PDE 5, která způsobuje degradaci cGMP a tím omezuje přítok krve. Sildenafil nepůsobí přímo relaxačně na corpus cavernosum, ale je důležitý pro zesílení relaxačního účinku

NO na tuto tkáň. Sildenafil je selektivní k PDE 5 mnohem více než k ostatním PDE. Tato selektivita je významná zejména u PDE 3, což je cAMP – specifická izoforma fosfodiesterázy, která se účastní kontroly srdeční kontraktility [2].

Doba účinnosti sildenafilu je 4-5 hodin po podání při adekvátní sexuální stimulaci [3]. Doba nástupu účinku je 25 minut.

Sildenafil přechodně mírně snižuje tlak, avšak bez klinického efektu. Jednu hodinu po podání dávky 100 mg byly u některých jedinců pozorovány přechodné změny v rozlišování barev. Po dvou hodinách již změny nebyly pozorovatelné. Tento jev se dává do souvislosti s lehkou inhibicí PDE 6, která se účastní převodu světla na sítnici. Při studii, zda sildenafil ovlivňuje motilitu či morfologii spermatu zdravých dobrovolníků, neměla dávka 100 mg žádný vliv[2].

Farmakokinetické vlastnosti

Absorpce:

Sildenafil se vstřebává rychle. Po perorálním podání dávky na lačno se dosahuje maximálních plazmatických koncentrací za 30 – 120 minut. Při stejném podání je průměrná absolutní biologická dostupnost je 41 %. Po perorálním podání sildenafilu spolu s jídlem se rychlost absorpce snižuje[2].

Distribuce:

Průměrný distribuční objem sildenafilu je 105 l v ustáleném stavu. Je přítomna distribuce do tkání. Po jednorázově podané perorální dávce 100 mg činí průměrná hodnota maximální celkové plazmatické koncentrace sildenafilu přibližně 440 ng/ml (CV 40 %). Protože sildenafil a jeho hlavní cirkulující metabolit N-desmetyl se váží na plazmatické proteiny z 96 %, má to za následek průměrnou hodnotu maximální plazmatické koncentrace volného sildenafilu 18 ng/ml (38 nM). Vazba na proteiny nezávisí na celkové koncentraci

lék [2].

Metabolismus:

Vylučování sildenafilu se uskutečňuje hlavně pomocí jaterních mikrosomálních isoenzymů CYP3A4 (hlavní cesta) a CYP2C9 (vedlejší cesta). Hlavní cirkulující metabolit je výsledkem N-demetylace sildenafilu. Plazmatické koncentrace tohoto metabolitu dosahují přibližně 40 % hodnot zjištěných u sildenafilu. Metabolit N-desmetyl se dále biotransformuje, s terminálním poločasem přibližně 4 hodi [2].

Vylučování:

Celková clearance sildenafilu z organismu je 4 l/hod s výsledným terminálním poločasem 3–5 hod. Po perorálním nebo intravenózním podání se sildenafil vylučuje ve formě metabolitů převážně stolicí (přibližně 80 % perorálně podané dávky) a v menší míře močí (přibližně 13 % perorálně podané dávky[2]).

2.4. Levitra (vardenafil)

2.4.1. Obecné informace o léku

Složení přípravku

Jedná se o potahované tablety.

Léčivá látka: vardenafilum (ve formě hydrochlorid trihydrátu)

Pomocné látky:

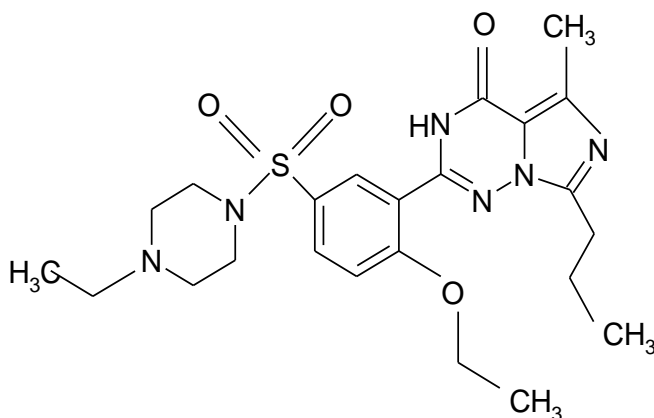
Jádro tablety – krospovidon, magnesium-stearát, mikrokrystalická celulosa, koloidní bezvodý oxid křemičitý

Potah tablety - makrogol 400, hypromelosa, oxid titaničitý (E171), žlutý oxid železitý (E172),

červený oxid železitý (E172) [4].

Molekulová hmotnost vardenafilu: 488,604 g/mol

Vzorec vardenafilu :



Obr.č.2

2.4.2. Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamické vlastnosti

Vardenafil, který se používá k léčbě ED je perorální léčivo v podobě tablet. Užívá se v dávkách 5mg, 10mg nebo 20 mg. K působení vardenafilu je nutná sexuální stimulace. Vardenafil obnovuje porušenou erektilní funkci zvýšením přítoku krve do penisu. Vardenafil je velmi účinný a selektivní inhibitor cGMP specifické fosfodiesterázy typu 5 (PDE5), významně zvyšuje účinek oxidu dusnatého v corpus cavernosum inhibicí PDE5. Poté co se uvolní NO v důsledku sexuální stimulace, vede vardenafilem vyvolaná inhibice PDE5 ke zvýšení hladin cGMP v kavernózních tělesech. Vardenafil má silnější inhibiční účinek na PDE 5 než na ostatní známé fosfodiesterázy [4]. Doba účinnosti vardenafilu je 4 - 5 hodin [3]. Doba nástupu účinku je 15 – 25 minut.

Vardenafil působí mírné snížení tlaku, bez klinických následků. Údaje získané ze všech velkých klinických studií zaměřených na účinnost uvádějí následující procento

pacientů, kteří dosáhli po užití vardenafilu úspěšné penetrace: psychogenní erektilní dysfunkce (77-87 %), smíšená erektilní dysfunkce (69-83 %), organická erektilní dysfunkce (64-75 %), starší pacienti (52-75 %), ischemická choroba srdeční (70-73 %), hyperlipidémie (62-73 %), chronické plicní onemocnění (74-78 %), deprese (59-69 %) a pacienti současně léčení antihypertenzivy (62-73 %). Účinnost a bezpečnost vardenafilu přetrvávaly v dlouhodobých studiích [4].

Farmakokinetické vlastnosti

Absorpce:

Rychlé vstřebávání vardenafilu přispívá u některých mužů k dosažení maximální plazmatické koncentrace již za 15 minut po perorálním užití. V 90 % případů je však dosaženo maximálních plazmatických koncentrací 30 až 120 minut po perorálním podání nalačno. Průměrná absolutní biologická dostupnost po perorálním podání je 15 %. Při užití vardenafilu po tučném jídle (57% tuku) dochází ke snížení rychlosti absorpce. Při podání po jídle s obsahem 30% tuku nejsou při porovnání s užitím nalačno rychlost a rozsah absorpce ovlivněny[4].

Distribuce:

Průměrný distribuční objem vardenafilu v ustáleném stavu činí 208 litrů, což svědčí o jeho distribuci do tkání. Vardenafil a jeho hlavní cirkulující metabolit (M1) se váží ve vysoké míře na plazmatické bílkoviny (přibližně 95 % vardenafilu nebo M1). Vazba vardenafilu a M1 na plazmatické bílkoviny není závislá na celkové koncentraci léčiv [4].

Metabolismus:

Vardenafil je metabolizován převážně v játrech pomocí izoformy 3A4 cytochromu P450 (CYP) a v menší míře také izoformami CYP3A5 a CYP2C. Desethylací vardenafilu vzniká u lidí hlavní cirkulující metabolit (M1), který je dále metabolizován. Plazmatický eliminační poločas tohoto metabolitu je přibližně 4 hodiny. Určitá část metabolitu M1 se objevuje ve formě glukuronidu v systémové cirkulaci. Metabolit M1 vykazuje podobný profil selektivity vůči fosfodiesteráze jako vardenafil a jeho účinnost *in vitro* z hlediska inhibice fosfodiesterázy typu 5 je přibližně 28% ve srovnání s vardenafilem. K celkovému farmakologickému účinku tedy přispívá tento metabolit přibližně 7 % [4].

Vylučování:

Celková tělesná clearance vardenafilu je 56 l/hod s výsledným terminálním poločasem přibližně 4-5 hodin. Po perorálním podání se vardenafil vylučuje ve formě metabolitů zejména stolicí (přibližně 91 - 95 % podané dávky) a v menší míře močí (přibližně 2 - 6 % podané dávky) [4].

2.5. Cialis (tadalafil)

2.5.1. Obecné informace o léku

Složení přípravku

Jedná se o potahované tablety.

Léčivá látka: tadalafilum

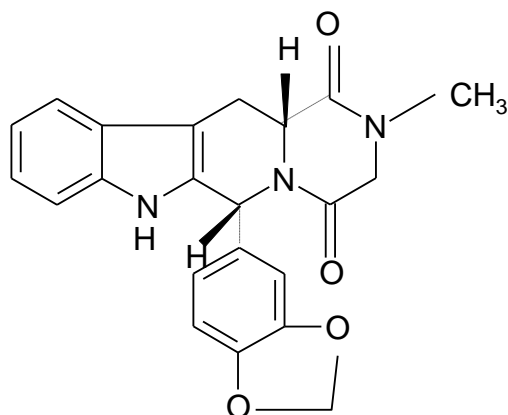
Pomocné látky:

Obsah tablety - monohydrát laktosy, sodná sůl kroskarmelosy, hyprolosa, mikrokrystalická celulóza, natrium-laury-sulfát, magnesium- stearát

Potah tablety - monohydrát laktosy, hypromelosa
triacetin, oxid titaničitý (E171), žlutý oxid železitý (E172), mastek [5]

Molekulová hmotnost tadalafilu: 389,404 g/mol

Vzorec tadalafilu:



Obr.č.3

2.5.2. Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamické vlastnosti

Tadalafil je léčivo užívané při poruchách erekce. Podává se perorálně ve formě tablet. Užívá se v dávkách 10 mg nebo 20 mg. Lék je neúčinný bez sexuální stimulace. Tadalafil je selektivní PDE 5 inhibitor. Inhibice PDE 5 tadalafillem zvyšuje hladiny cGMP v corpus cavernosum. Tento proces vede k uvolnění hladkého svalstva, přítoku krve do tkání penisu, a tím k erekci. Působení tadalafilu na PDE 5 je mnohem intenzivnější než na ostatní fosfodiesterázy. Doba účinnosti tadalafilu je až 36 hodin po podání. Minimální doba nástupu účinku je 16 minut. U tadalafilu nebyly zjištěny žádné změny tlaku či poruchy barvocitu na rozdíl od sildenafilu a vardenafilu.

V primárních studiích účinnosti bylo u pacientů léčených přípravkem Cialis (tadalafil) úspěšných 75% všech pokusů o pohlavní styk oproti 32% na placebo [5].

Farmakokinetické vlastnosti

Absorpce:

Tadalafil se po perorálním podání rychle vstřebává a průměrné maximální plazmatické koncentrace (C_{max}) je dosaženo přibližně za 2 hodiny po podání. Rychlost a rozsah absorpce tadalafilu nezávisí na příjmu potravy, je tedy možné užívat přípravek Cialis s jídlem i nalačno. Doba podání přípravku (ráno nebo večer) neměla významný účinek na rychlost a rozsah absorpce [5].

Distribuce:

Průměrný distribuční objem je přibližně 63 l, což naznačuje distribuci tadalafilu do tkání.

94% tadalafilu je při terapeutických koncentracích vázáno na plazmatické proteiny. Vazba na proteiny není ovlivněna poruchami funkce ledvin [5].

Metabolismus:

Tadalafil je metabolizován převážně isoformou 3A4cytochromu P450 (CYP). Hlavním cirkulujícím metabolitem je metylkatecholglukuronid. Tento metabolit vykazuje nejméně 13 000 krát nižší účinnost na PDE5 než tadalafil. V pozorovaných koncentracích není proto klinický účinek metabolitu předpokládán [5].

Vylučování:

Průměrná orální clearance tadalafilu u zdravých jedinců je 2,5 l/h a průměrný eliminační poločas je 17,5 hodiny. Tadalafil je vylučován především ve formě neaktivních metabolitů, převážně stolicí (přibližně 61% podané dávky) a v menší míře močí (přibližně 36% podané dávky) [5].

Farmakokinetika stanovená u populace trpící poruchami erekce je shodná s farmakokinetikou

u jedinců bez erektilní dysfunkce [5].

2.6. Porovnání Viagry, Levitary a Cialisu

Sildenafil (Viagra), vardenafil (Levita) a tadalafil (Cialis) jsou všechny specifickými inhibitory PDE 5. Sildenafil a vardenafil jsou si podobné chemickou strukturou, tadalafil se chemickou strukturou odlišuje (Obr.č.1, 2, 3 viz výše). Se sildenafilem máme více zkušeností než s vardenafilem, jelikož se v ČR užívá delší dobu. Všechny tři preparáty mají vynikající účinky a jsou dobře snášeny [3].

Jídlo před požitím léku nezpůsobuje resorpci tadalafilu, redukuje a zpožďuje resorpci sildenafilu a vardenafilu, zejména pokud obsahuje více tuku. Tadalafil se od sildenafilu a vardenafilu odlišuje také ve farmakokinetice. Vrcholy plazmatických hladin jsou u sildenafilu a vardenafilu dosaženy do jedné hodiny, u tadalafilu do dvou hodin [6]. Nástup účinku tadalafilu by měl být tedy pomalejší. U některých jedinců dochází k prvním účinkům již po 16 minutách, což je srovnatelné se sildenafilem (25 minut) a vardenafilem (15 – 25 minut). Biologický poločas ($t_{1/2}$), který podmiňuje dobu trvání účinku je u tadalafilu 17,5 hodiny. Tato doba je mnohem delší než u sildenafilu (3 – 4 hodiny) a vardenafilu (4 - 5) a činí tadalafil výjimečným. [6]. Doba účinnosti tadalafilu je až 36 hodin, zatímco u sildenafilu a vardenafilu je to 4 - 5 hodin [3]. Doby účinnosti tadalafilu a zbylých dvou PDE 5 inhibitorů se navzájem doplňují a pacient si může zvolit jemu lépe vyhovující lék.

3. METODY VYHLEDÁVÁNÍ POUŽITÝCH ZDROJŮ

Zdroje z kterých se v této práci čerpalo byly získány pomocí internetu. Zdroje pro teoretickou část jsou v českém jazyce. Do vyhledávače google (www.google.com) byly zadány postupně hesla „Viagra“, „Levita“, „Cialis“, „erektilní dysfunkce“, „sildenafil“, „vardenafil“, „tadalafil“. Z nalezených zdrojů se vybraly vhodné články pro tento účel (viz použité zdroje [1] – [6]).

Vlastní metody stanovení SVT se získaly z článků publikovaných v odborných časopisech v anglickém jazyce. Tyto články byly nalezeny prostřednictvím serverů Pub Med (www.pubmed.gov) a Web of knowledge (<http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi/portal.cgi/?DestApp=WOS&Func=Frame&Init=Yes&SID=R1e34iIEKpKfcomc55M>). Na těchto serverech byly zadány hesla „

sildenafil“ (vardenafil, tadalafil) and „determination“ nebo „assay“, „determination of SVT“ (in human plasma). Z nalezených odkazů se opět vybraly články použitelné pro tento účel. Práce je zaměřená na metody publikované v posledních pěti letech, s výjimkou zajímavého odkazu [14] z roku 2001. Jedná se o odkazy [7] – [32]. Plný text byl dostupný jen u některých článků, a tak bylo časlo čerpáno pouze ze zveřejněných abstraktů. Toto omezení se nijak výrazně neodrazilo v úplnosti této práce, jelikož většina abstraktů obsahovala všechny požadované informace o dané analytické metodě.

4. VÝSLEDKY REŠERŠE

Tab.č.1 Chromatografické metody

stanovovaná látka	Matrice	metoda	kolona-náplň/m.f./rozměry	detekce	limity stanovení	
sildenafil	Lidská plasma	RP-HPLC-MS/MS	methanol (10 mM – acetát amonný pH 7,0 (85:15)	ESI - MS	lineární rozsah koncentrací 0,125 - 40 ng/ml	[7]
sildenafil citrát	Léčivé přípravky, lidská plasma	RP-HPLC	C-18 kolona, acetonitril:voda (45:55)	UV diode array 220 nm	lineární rozsah koncentrací $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-5}$ mol/l LOQ $7,5 \times 10^{-8}$ mol/l, LOD $2,2 \times 10^{-8}$ mol/l	[8]
sildenafil citrát	Tělní tekutiny	RP-HPLC-MS	NovaPak C18 HPLC kolona, acetonitril + 10 µg/ml trimethylamin v 2 mM mravenčanu amonném o pH 3,0	MS analyzátor PerkinElmer Sciex Api 100 s jednoduchým kvadrupólem	LOD 0,2 ng/ml LOQ 0,5 ng/ml	[9]
sildenafil a jeho metabolit N - demethylsildenafil	kryší sérum	SPE-RP - HPLC	Kromasil C-18 kolona, fosfátový pufr (0,05 M) – acetonitril (54:46, pH 8)	photodiode array detektor		[10]

sildenafil a jeho metabolit N- demethyl sildenafil	Lidská plasma	RP-HPLC	C-8 (150 mm × 4,6 mm), acetonitril, methanol a fosfátový pufr (0,05 M) (18,5:34,5:47,0) pH 7,68	elektrochemická	LOQ 7,858 ng/ml pro sildenafil a LOQ 8,675 ng/ml pro N-demethyl sildenafil	[11]
sildenafil a jeho metabolit demethyl-sildenafil	Lidská plasma	RP-HPLC- MS	křemenná kolona, organicko – vodná m.f.	MS	LLOQ 1,0 ng/ml pro sildenafil a demethylsildenafil	[12]
sildenafil	Lidská plasma	RP - LC- MS	Luna fenylhexyl kolona, směs acetonitrilu a mravenčanu amonného (10 mM, pH 6,0) (60:40)	ESI - MS	LLOQ 2,0 ng/ml pro sildenafil	[13]
sildenafil	Lidská plasma	RP-HPLC	Capcell Pak MF Ph – 1 kolona (20×4 mm) 15% acetonitril v 20 mM fosfátovém roztoku pH 7, střední kolona (35×2 mm), fenyl-hexyl kolona (100×2 mm) 36% acetonitril v 10 mM fosfátovém roztoku pH 4,5		lineární rozsah koncentrací 10- 1000 ng/ml LOD 10 ng/ml	[14]
sildenafil, famotidine	Přírodní léky, potrav. doplňky	LC-MS/MS		MS	LOD 0,05 – 1,5 ng/ml	[15]

sildenafil	Rostlinné léčivé přípravky	HPTLC	deska se silikagelem, toluen – aceton – methanol (6:2:2)	denzitometricky při vlnové délce 312 nm	lineární rozsah koncentrací 100 – 600 ng na skvrnu	[16]
sildenafil	Léčivé přípravky a afrodisiakální rostlinné přípravky	HPTLC	deska se silikagelem, CHCl ₃ – methanol- diethylamin (90 :10 :1)	denzitometricky při vlnové délce 305 nm		[17]
vardenafil	Léčivé přípravky	RP-HPLC	C – 18 kolona a Chromolit Performance RP- 18e monolitová kolona, směs acetonitril (pH od 2 do 7,5) -fosfátový pufr		lineární rozsah koncentrací 10-1000 µg/ml, LOD a LOQ je 0,10 a 0,31 µg/ml pro C – 18; 0,11 a 0,32 µg/ml pro monolitickou kolonu	[18]
tadalafil	Lidská plasma	RP- HPLC- MS	Xterra MS C18 kolona, 10 mM mravenčan amonný-acetonitril (10:90, pH 3)	ESI - MS	lineární rozsah koncentrací 10 – 1000 ng/ml LLOQ 10 ng/ml	[19]
tadalafil	kryší plasma	RP-HPLC	C-18 kolona, acetonitril-voda (35:65) s 20 mM fosfátovým pufrem o pH 7	UV 290 nm	kalibrační křivka lineární od 10 do 2000 ng/ml, LOQ 10 ng/ml	[20]

tadalafil	Léčivé přípravky	RP-HPLC	monolitová kolona Chromolith Performance RP-18e (100 mm×4,6 mm i.d.), fosfátový pufr (100 mM, pH 3) – acetonitril (80:20)	UV 230 nm	lineární rozsah koncentrací od 100 do 5000 ng/ml pro tadalafil, LOD 100 ng/ml, (pro sildenafil byl LOD 50- 5000 ng/ml)	[21]
tadalafil citrate	Tablety	TLC	deska se silikagelem, n-hexan – ethylacetát – methanol (8,0:6,0:2,0)	densitometricky při vlnové délce 285 nm		[22]
sildenafil, vardenafil	Lidská plasma	LLLmikroE-HPLC			lineární rozsah koncentrací od 5 µg/l do 1,0 mg/l LOD 1 µg/l pro sildenafil a LOD 0,5 µg/l pro vardenafil	[23]
sildenafil, vardenafil, tadalafil	Přírodní potravinové doplňky	RP-HPLC – UV-ESI-MS	C-18 kolona, roztok acetonitrilu a vodný roztok (20 mmol acetátu amonného, 0,2% kyselina mravenčí)	UV 292 nm, identifikace léčiv ESI-MS	lineární rozsah koncentrací 0,8 – 80 µg/ml pro sildenafil, 2,25 – 225 µg/ml pro vardenafil, 1,1 – 110 µg/ml pro tadalafil	[24]

sildenafil, vardenafil, tadalafil, homosildenafil, hydroxyhomosil denafil, acetildenafil	potravinové doplňky	RP-HPLC- DAD	Waters Symmetry C18 kolona (25 cm ×4.6 mm, 5 μm), 38% acetonitril a 62% 0,01 M vodný roztok mravenčanu amonného	diode array (DAD), 225, 230 a 290 nm	sildenafil-LOD 1,3 ng, LOQ 4,5 ng, vardenafil- LOD 2,0 ng, LOQ 7,0 ng, tadalafil – LOD 0,9 ng, LOQ 3,2 ng, homosildenafil- LOD1,6 ng, LOQ 5,5 ng, hydroxyhomosildenafil-LOD 1,2 ng, LOQ 4,5 ng, acetildenafil-LOD 1,4 ng, LOQ 4,5 ng,	[25]
sildenafil, vardenafil, tadalafil, homosildenafil, hydroxyhomosil denafil, acetildenafil	potravinové doplňky	RP-LC-ESI- MS-MS	Luna C18 kolona (150 mm ×2 mm, 5 μm), 62% 0.01 M vodný roztok mravenčanu amonného a 38% acetonitril	MS	sildenafil-LOD 0,03 ng, LOQ 0,10 ng, vardenafil-LOD 0,02 ng, LOQ 0,07 ng tadalafil-LOD 0,21 ng, LOQ 0,70 ng, homosildenafil-LOD 0,03 ng, LOQ 0,11 ng, hydroxyhomosildenafil-LOD 0,045 ng, LOQ 0,16 ng, acetildenafil-LOD 0,02 ng, LOQ 0,07 ng	[25]

PDE-5 inhibitor DA – 8159 a jeho metabolit DA - 8164	Lidská plasma	RP-HPLC- MS	Luna fenylhexylovákolona, směs acetonitrilu a mravenčanu amonného (10 mM, pH 6) (60:40)	ESI - MS	LLOQ 2,0 ng/ml	[26]
PDE -5 inhibitor DA - 8159	Lidská plasma, moč	RP-HPLC- UV	Capcell Pak C – 18 UG 120 kolona, 30% acetonitril a 70% 20 mM fosforečnan draselný (pufr pH 4,5)	UV 292 nm	LLOQ 5 ng/ml pro plasmu a 10 ng/ml pro moč	[27]

Tab.č.2 Potenciometrická metoda

stanovovaná látka	Matrice	metoda	elektrody	limity stanovení	
sildenafil	Léčivé přípravky, lidské sérum	potenciometre	dvě potenciometrické elektrody citlivé na SC založené na elektroaktivní membráně z PVC, obsahující iontové asociály SC s wolframátosfosforečnanem (TP) a reineckátem (Re)	rychlá odezva na SC v rozmezí koncentrací $1,0 \times 10^{-2}$ – $7,9 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-6}$ M LOD 0,53 a 0,67 $\mu\text{g/ml}$ pH 3-6 pro TP a Re, v tomto pořadí	[28]

Tab.č.3 Spektrofotometrické metody

stanovovaná látka	Matrice	metoda	reakce	vlnová délka	limity stanovení	
sildenafil citrát	čistá léčiva a komerční léčiva obsahující sildenafil citrát	spektrofotometrie	sildenafil citrát + diazotovaný dapson v hydroxidu sodném	475 nm	lineární rozsah koncentrací 30 – 80 µg/ml	[29]
sildenafil citrát	čistá léčiva a komerční léčiva obsahující sildenafil citrát	spektrofotometrie	sildenafil citrát + diazotovaná p-sulfanilová kyselina v hydroxidu sodném	420 nm	lineární rozsah koncentrací 20 – 100 µg/ml	[29]
sildenafil citrát	Léčivé přípravky	RRS (resonance Rayleigh-scattering)	sildenafil + Evansova modř - vzniká komplex (sil:EM=1:1) ve vodném roztoku o pH 1,1 – 4,6	maximum při 365 nm, ostatní měření při 400, 442, 470 a 534 nm	intenzita RRS je přímo úměrná koncentraci sildenafilu od 0 do 11,5 µg/ml, LOD 30,3 ng/ml	[30]

Tab.č.4 Voltametrická metoda

stanovovaná látka	Matrice	metoda	elektroda	technika	limity stanovení	
vardenafil	tablety, lidská plasma	voltametrie	skelný uhlík	cyklická, diferenční pulsní, nebo squarewave voltametrie	lineární rozsah koncentrací od 4×10^{-7} do 2×10^{-5} mol/l	[31]

Tab.č.5 Hmotnostně spektrometrická metoda

stanovovaná látka	Matrice	metoda		limity stanovení	
sildenafil, vardenafil, tadalafil	Léčivé přípravky, rostlinné přípravky	ESI-MS-MS		LLOQ 20 ng/ml	[32]

5. METODY STANOVENÍ LÁTEK

5.1. Chromatografické metody

Přehled chromatografických metod je uveden v tabulce č. 1. Jde bezpochyby o nejvíce rozšířené metody při stanovení sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu a jejich metabolitů.

Chromatograficky se stanovují SVT v tělních tekutinách, potravinových doplncích i léčivých přípravcích.

5.1.1. RP – HPLC

Nejčastěji se stanovují SVT pomocí RP-HPLC. U této metody se nejvíce používají C-18 kolony. Jako mobilní fáze jsou užívány zejména acetonitril, methanol, fosfátový pufr, mravenčan amonný a jejich směsi s různými kombinacemi a zastoupením jednotlivých látek. K získávání SVT z matrice se většinou užívá extrakce – LLE, méně často SPE. Organickou fází při LLE bývá ether, methanol, chloroform nebo dichlormethan. Detekce je u těchto stanovení UV nebo MS (často ESI-MS).

Ergun a kol. provedli například stanovení sildenafilu citrátu v lidské plasmě a léčivých přípravcích pomocí RP-HPLC. Jedná se o jednoduchou, přesnou, rychlou a správnou metodu. Při stanovení použili kolonu C-18 a směs acetonitril-voda (45:55) jako m.f. K detekci byl použit diode array detektor při 220 nm [8].

Pomocí RP-HPLC se stanovují také SVT vedle sebe. Příkladem může být současné stanovení SVT v přírodních potravinových doplncích, jako nežádoucích látek. Zhu a kol. provedli toto stanovení metodou HPLC-UV-ESI-MS. Separace dosáhli na koloně C-18 a směsí acetonitrilu a vodného roztoku (20 mmol acetátu amonného; 0,2% kyseliny mravenčí) jako m.f. Metoda byla úspěšně aplikována pro analýzy vzorků přírodních potravinových doplňků [24].

5.1.2. HPTLC

Tenkovrstvá chromatografie se také dá využít pro stanovení léčivých látek užívaných při ED. Reddy a kol. použili tuto techniku pro stanovení sildenafilu citrátu v rostlinných léčivých přípravcích. Desky se silikagelem byly umístěny v sytící komoře svisle, ve vzdálenostech 8 cm. Jako m.f. zde byla použita směs toluen-aceton-methanol (6:2:2). Detekce byla provedena denzitometricky při 312 nm. Tato HPTLC technika je doplňková pro ostatní chromatografické metody a potenciálně může sloužit pro rutinní analýzy při kontrole kvality [16].

Abourashed a kol. užíli také HPTLC metodu pro stanovení sildenafilu citrátu, a to v lékových přípravcích a afrodisiakálních rostlinných přípravcích. Zde byla použita silikagelová deska a směs chloroform-methanol-diethylamine (90:10:1). Detekce byla opět denzitometrická při 305 nm. Sildenafil jako zakázaná příměs byl stanoven v lékových přípravcích a to v obsahu od 49,7 do 50,5 mg v tabletě a dokonce v jednom ze tří afrodisiakálních rostlinných přípravků, prohlašovaných za zcela přírodní (obsah v tabletě 85,0 mg) [17].

U třetí nalezené TLC metody Tampubolon a kol. stanovovali tadalafil citrát v tabletách. Použita byla deska se silikagelem a směs n-hexan-ethylacetát-methanol (8:6:2). Detekce byla provedena densitometricky při 285 nm. Tato metoda je levná, citlivá, přesná a správná, může být použita pro rutinní analýzy tablet ve farmaceutickém průmyslu, v laboratořích kontrolujících kvalitu [22].

5.2. Potenciometrická metoda

Potenciometrická metoda pro stanovení sildenafilu v léčivých přípravcích a lidském séru je přehledně uvedena v tabulce č.2. Hassan a kol. provedli tuto metodu s použitím dvou elektrod citlivých na sildenafil citrát. Elektrody jsou založené na elektroaktivní membráně z PVC, obsahující iontové asociály SC s wolframátpfosforečnanem (TP) a reineckátem (Re) . U této metody je rychlá odpověď SC v rozmezí koncentrací $1,0 \times 10^{-2}$ – $7,9 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-6}$ M, LOD 0,53 a 0,67 µg/ml pH 3-6 pro TP a Re v tomto pořadí. Obě elektrody ukazují dobrou citlivost pro sildenafil citrát v léku, i přes příměsi dusíkatých látek, některých anorganických kationů, mast'ových základů a rozpouštědel běžně užívaných v léčivých přípravcích [28].

5.3. Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody pro stanovení sildenafilu citrátu v léčivech jsou uvedeny v tabulce č.3. Jde o dvě jednoduché spektrofotometrické metody, které vyvinuli Rao a kol. Metody jsou výhodné při analýze velkého množství vzorků. Metoda A je založena na reakci mezi sildenafilu citrátem a diazotovaným dapsonem v hydroxidu sodném. Lineární rozsah koncentrací je zde 30 – 80 µg/ml při 475 nm s molárním absorpčním koeficientem 767,4 mol⁻¹ cm⁻¹. Při druhé metodě (B) dochází k reakci mezi sildenafilu citrátem a diazotovanou p-sulfanilovou kyselinou v hydroxidu sodném. Lineární rozsah koncentrací je zde 20 – 100 µg/ml při 420 nm s molárním absorpčním koeficientem 9461 mol⁻¹ cm⁻¹. Tyto metody byly použity pro analýzy čistých léků a komerčních přípravků obsahujících sildenafilu citrát. Běžné mast'ové základy a příměsy léků neruší stanovení. Tyto metody nabízejí určité výhody, zejména jednoduchost, rychlost a citlivost bez potřeby extrakce nebo zahřívání [29].

Metodu RRS (resonance Rayleigh-scattering) provedli Liu a kol. Jde o stanovení sildenafilu citrátu v léčivých přípravcích, založené na reakci s Evansovou modří za vzniku iontově asociovaných komplexů (sil:EM=1:1) ve vodném roztoku o pH 1,1 – 4,6. Maximum RRS je při 365 nm. Ostatní píky byly při 400, 442, 470 a 534 nm. Intenzita RRS byla přímo úměrná koncentraci sildenafilu v rozmezí od 0 do 11,5 µg/ml a LOD pro sildenafilu byl 30,3 ng/ml. Metoda má dobrou citlivost a může být použita pro stanovení sildenafilu ve vodných fázích bez použití organického extrakčního rozpouštědla [30].

5.4. Voltmetrická metoda

Voltmetrická metoda stanovení vardenafilu v tabletách a lidské plasmě je uvedena v tabulce č.4. Metodu provedli Uslu a kol. Ke stanovení použili elektrodu ze skelného uhlíku. Vardenafil poskytoval ireverzibilní anodické vlny v rozmezí pH 1,0 – 12,0 v různých elektrolytech. Lineární rozsah koncentrací byl v rozmezí 0,4 - 20 µmol/l. Navržená metoda byla úspěšně použita ke stanovení vardenafilu v tabletách a lidské plasmě. Mimoto výsledky získané touto metodou byly porovnatelné s HPLC metodami [31].

5.5. Hmotnostně spektrometrická metoda (MS)

MS stanovení sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu je uvedeno v tabulce č. 5. Stanovení těchto látek pomocí ESI-MS-MS v léčivých a rostlinných přípravcích popisuje Abdel- Hamid. Metoda umožňuje rychlé stanovení PDE-5 inhibitorů (< 3min) a velice selektivní detekci v přítomnosti příměsí tabletek nebo matrice přírodních látek. Kvantifikace sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu bylo dosaženo vícenásobným monitorováním iontů při m/z 475 > 100, 390 > 268, 489 > 169, v tomto pořadí . Koncentrace každé látky byla určena z kalibrační křivky sestavené pomocí vnitřního standardu (fenylalanin m/z 166 > 103). Na základě získaných dat byla navržena tato metoda pro rutinní analýzy léčivých a rostlinných přípravků obsahujících PDE-5 inhibitory [32].

Ve vytvořených tabulkách chybí u několika metod údaje o koloně, způsobu detekce či limitech stanovení. Chybějící údaje nebyly bohužel dostupné.

5.6. Porovnání metod stanovení sildenafilu, vardenafilu, tadalafilu

Z přehledu nalezených metod uvedených v kapitole 3. (viz výše), je zřejmé, že HPLC metody výrazně převažují nad ostatními metodami používanými při stanovení SVT. Využívá se zde hlavně RP – HPLC, zejména pro svou rychlost (časy separací okolo 3 – 8 minut), nízké limity detekce a kvantifikace (řádově ng/ml) a snadné začlenění do tzv. tandemových metod (např. RP-HPLC-MS). Tenkovrstvá chromatografie zde představuje metodu doplňkovou k HPLC metodám. Ostatní metody pro stanovení SVT se využívají méně, nicméně příčiny jsou rozmanité a nelze říci, že jde o výrazně horší metody v porovnání s RP-HPLC. Důvodem je například menší citlivost metod, ale také to, že metody jsou zatím méně prozkoumané než RP-HPLC, nebo jsou náročnější na čas i přístrojové vybavení. V budoucnu by však mohly sehrát významnou roli při stanovení SVT. Jedná se hlavně o potenciometrická a hmotnostně spektrometrická stanovení SVT. U spektrofotometrických metod je sice menší citlivost, avšak tyto metody vynikají především svou jednoduchostí a nenáročností na přístrojové vybavení.

6. ZÁVĚR

Byl vytvořen přehled analytických metod používaných pro stanovení sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu (látek používaných při ED) v tělních tekutinách, potravinových doplňcích a lécích. Ve výčtu nalezených metod za posledních pět let výrazně převažují chromatografická stanovení, a to zejména RP-HPLC. Velká část metod se zabývala stanovením výše uvedených látek v tělních tekutinách (15 metod), zejména v lidské plasmě. O něco méně bylo nalezeno metod pro stanovení SVT v lécích (12 metod) a nejméně pak v potravinových doplňcích (4 metody), kde slouží stanovení SVT k odhalení těchto látek jako nežádoucích příměsí. Kromě chromatografických metod se používají metody spektrofotometrické, potenciometrické, voltmetrické a hmotnostně spektrometrické. Jejich porovnání je uvedeno v kapitole 4.6.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CYP	cytochrom p 450
DAD	diode array detector
ED	erektilní dysfunkce
EM	Evansova modř
ESI	ionizace elektrosprayem
ES	vnější standard (external standard)
HPLC	vysoceúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysoceúčinná tenkovrstvá chromatografie
IS	vnitřní standard (internal standard)
LOD	limitdetekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
LLE	liquid- liquid extrakce
LLOQ	spodní limit kvantifikace (low limit of quantification)
m.f.	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry)
PDE	fosfodiesteráza (phosphodiesterase)
PVC	polyvinylchlorid
Re	reineckát
RRS	resonance Rayleigh-scattering
RP	obrácené fáze (reverse phase)
Rt	retenční čas
SC	sildenafil citrát
s.f.	stacionární fáze
SPE	solid phase extrakce
SVT	sildenafil, vardenafil, tadalafil
TP	wolframátofosforečnan (tungstofosfate)
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialová oblast detekce (ultraviolet)

8. POUŽITÉ ZDROJE

- [1] [cit. 2007-3-10] Dostupné z < <http://www.sexzdravi.cz/lecba.htm>>.
- [2] PŘÍLOHA I. SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU, [cit. 2007-3-10]
Dostupné z < <http://www.opetmuzem.cz/odbornici/letak.viagra.pdf>>.
- [3] ZÁMEČNÍK, L., DVOŘÁČEK, J. Tadalafil – moderní možnost v léčbě erektilní dysfunkce. *UROLOGIE PRO PRAXI* [online], 2004, 5. [cit. 2007-3-18].
Dostupné z < <http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2004/05/05.pdf>>.
- [4] PŘÍLOHA I. SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU, [cit. 2007-3-10]
Dostupné z < <http://www.opetmuzem.cz/odbornici/levitra-h-pi-cs.pdf>>.
- [5] PŘÍLOHA I. SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU, [cit. 2007-3-10]
Dostupné z < <http://www.opetmuzem.cz/odbornici/cialis-h-pi-cs.pdf>>.
- [6] KUBÍČEK, V. Medikamentózní léčba erektilní dysfunkce – dramatická změna v přístupu k léčbě. *UROLOGIE PRO PRAXI* [online], 2004, 2. [cit. 2007-3-9].
Dostupné z <<http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2004/02/07.pdf>>.
- [7] WANG, Y.W., et al. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of sildenafil in human plasma. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES*, DEC 15 2005,828 (1-2): 118-121. ISSN: 1570-0232
- [8] ERGUN, B., et al. Validation of a reversed-phase HPLC method for the analysis of sildenafil citrate in pharmaceutical preparations and in spiked human plasma. *JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES*, 2005,28 (10): 1539-1548. ISSN: 1082-6076
- [9] TRACQUI, A., LUDES, B. HPLC-MS for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in biological fluids. Application to the solivary excretion of sildenafil after oral intake. *JOURNAL OF ANALYTICAL TOXICOLOGY*, MAR 2003, 27(2): 88-94
- [10] GUERMOUCHE, M.H., BENSALAH, K. Solid phase extraction and liquid chromatographic determination of sildenafil and N-demethylsildenafil in rat serum with basic mobile phase. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*, MAR 3 2006, 40 (4): 952-957. ISSN: 0731-7085
- [11] AL-GHAZAWI, M., TUTUNJI, M., ABURUZ, S. Simultaneous determination of sildenafil and N- desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid

- chromatography metod usány electrochemical detection with application to a pharmacocinetic study. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*, JAN 17 2007, 43(2): 613-8
- [12] ERKES, A., ADDISON, T., NAIDONG, W. Simultaneous assay of sildenafil and desmethyl sildenafil in human plasma using liquid chromatography- tandem mass spektrometry on silica column with aqueous-organic mobile phase. *CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCE.*, MAR 5 2002, 768(2): 277-84
- [13] KIM, J., et al. Simultaneous determination of sildenafil and its aktive metabolita UK-103, 320 in human plasma usány liquid chromatography-tandem mass spektrometry. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*, JUN 1 2003, 32(2): 317-22
- [14] JEONG, C.K., et al. Narrowbore high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of sildenafil and its metabolite UK-103,320 in human plasma using column switching. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY*, MAR 5 2001, B 752 (1): 141-147. ISSN: 0378-4347
- [15] LIANG, Q.L., et al. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*, FEB 13 2006, 40 (2): 305-311. ISSN: 0731-7085
- [16] REDDY, T.S., REDDY, A.S., DEVI, P.S. Quantitative determination of sildenafil citrate in herbal medicinal formulations by high-performance thin-layer chromatography. *JPC-JOURNAL OF PLANAR CHROMATOGRAPHY-MODERN TLC*, NOV-DEC 2006, 19 (112): 427-431. ISSN: 0933-4173
- [17] ABOURASHED, E.A., ABDER-KADER, M.S., HABIB, A.A.M. HPTLC determination of sildenafil in pharmaceutical products and aphrodisiac herbal preparations . *JPC-JOURNAL OF PLANAR CHROMATOGRAPHY-MODERN TLC*, SEP-OCT 2005, 18 (105): 372-376. ISSN: 0933-4173
- [18] ABOUL-ENEIN, H.Y., GHANEM, A., HOENEM, H. Determination of vardenafil in pharmaceutical formulation by HPLC using conventional C-18 and monolithic silica columns. *JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES*, 2005,28 (4): 593-604. ISSN: 1082-6076
- [19] RAMAKRISHNA, N.V., et al. Qantitation of tadalafil in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spektrometry with electrospray ionization.

CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES, OCT 5 2004, 809(2): 243-9

- [20] CHENG, C.L., CHOU, CH. Determination of tadalafil in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES*, AUG 5 2005, 822 (1-2): 278-284. ISSN: 1570-0232
- [21] ABOUL-ENEIN, H.Y., ALI, I. Determination of tadalafil in pharmaceutical preparation by HPLC using monolithic silica column. *TALANTA*, JAN 15 2005, 65 (1): 276-280. ISSN: 0039-9140
- [22] TAMPUBOLON, H.B., et al. Densitometric determination of tadalafil citrate in tablets: Validation of the metod. *JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES*, 2006, 29 (18): 2753-2765. ISSN: 1082-6076
- [23] ZHANG, Z., et al. Determination of sildenafil and vardenafil in human plasma by high performance liquid chromatography coupled with liquid-liquid-liquid microextraction. *SE PU / CHINESE JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY.*, JUL 2005, 23(4): 358-61
- [24] ZHU, X.L., et al. Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spektrometry. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY*, FEB 25 2005, A 1066 (1-2): 89-95. ISSN: 0021-9673
- [25] ZOU, P., et al. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spektrometry. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY*, FEB 3 2006, A 1104 (1-2): 113-122. ISSN: 0021-9673
- [26] KIM, J., et al. Simultaneous determination of a new phosphodiesterase-5 inhibitor DA-8159 and its active metabolite in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spektrometry. *CHROMATOGRAPHIA*, APR 2003, 57 (7-8): 447-450. ISSN: 0009-5893
- [27] CHO, J.Y., et al. Sensitive liquid chromatography assay with ultraviolet detection for a new phosphodiesterase V inhibitor, DA-8159, in human plasma and urine. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE*

BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES, OCT 5 2003, 795 (2): 179-186. ISSN: 1570-0232

- [28] HASSAN, S.S.M., et al. Continuous potentiometric monitoring of viagra (sildenafil) in pharmaceutical preparations using novel membrane senzore. *JOURNAL OF APPLIED ELECTROCHEMISTRY*, FEB 2006, 36 (2): 139-146. ISSN: 0021-891X
- [29] RAO, P.V., et al. New spectrophotometric methods for sildenafil citrate. *ASIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*, OCT-DEC 2006, 18 (4): 2475-2478. ISSN: 0970-7077
- [30] LIU, S.P., et al. Resonance Rayleigh-scattering method for the determination of sildenafil citrate in a pharmaceutical formulation using Evans blue. *ANALYTICAL SCIENCES*, JUN 2006, 22 (6): 819-823. ISSN: 0910-6340
- [31] USLU, B., et al. Electrochemical behavior of vardenafil on glassy carbon electrode: Determination in tablets and human serum. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, NOV 3 2005, 552 (1-2): 127-134. ISSN: 0003-2670
- [32] ABDEL-HAMID, M.L. Determination of sildenafil, tadalafil, and vardenafil in tablets and adulterated herbal products by ESI-MS-MS. *JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES*, 2006, 29 (4): 591-603. ISSN: 1082-6076

SOUHRN

Látky používané při léčbě erektilní dysfunkce se dají stanovit různými analytickými metodami. Práce se zabývá třemi látkami, které se dnes používají nejvíce při léčbě erektilní dysfunkce. Jsou to sildenafil (Viagra), vardenafil (Levitra) a tadalafil (Cialis). V textu je popsáno stanovení těchto látek v tělních tekutinách, potravinových doplňcích a lécích. Analytické metody jsou uspořádány v přehledných tabulkách. Nejrozsáhlejší tabulka patří chromatografickým metodám, které se zde používají nejvíce, a to zejména HPLC na obrácených fázích. Práce je rozdělena na teoretickou část, tabulky a popis vybraných metod. Text zahrnuje i zhodnocení a porovnání jednotlivých metod. Tato práce může sloužit jako přehled užívaných analytických metod při stanovení sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu, pro všechny zájemce o tuto problematiku.

ABSTRACT

Substances used at treatment erectile disfunction give determine by various analytical methods. Work deal with three substances, which we use mostly at treatment of erectile disfunction today. These are sildenafil (Viagra), vardenafil (Levitra) and tadalafil (Cialis). In this text there is described determination of these substances in body fluids, food supplements and medicines. Analytic methods are organized in well - arranged tables. The most extensive table is devoted to chromatographic methods, which are used mostly here, namely especially HPLC on reverse phases. Work is divided into theoretic part, tables and description of chosen methods. The text includes also estimation and comparison of single methods. This work is able to serve as a view of analytical methods used at assesment of sildenafil, vardenafil and tadalafil, for all persons interested in these problems.

