

Vsebina

POVZETEK.....	2
Seznam okrajšav.....	3
1. UVOD	4
1.1. Sildenafilijev citrat	4
1.2. Ponarejena zdravila.....	11
1.3. Internetna prodaja ponarejenih zdravil	15
1.4. Analizne metode za določanje sildenafilijevega citrata	21
1.5. Validacija analiznih metod	22
2. NAMEN DELA	24
3. MATERIALI IN METODE	25
3.1. Reagenti in topila.....	25
3.2. Aparature	25
3.3. Metode	25
4. EKSPERIMENTALNO DELO	27
4.1. Naročanje in nakup vzorcev	27
4.2. Razpadnost tablet.....	34
4.3. Test na težke kovine	34
4.4. Identifikacija sildenafilila	35
4.5. Identifikacija citrata.....	36
4.6. Vsebnost in enakomernost vsebnosti sildenafilila	36
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	40
5.1. Primerjava vzorcev	40
5.2. Test razpadnosti tablet.....	48
5.3. Test na težke kovine	49
5.4. Identifikacija sildenafilila v vzorcih	50
5.5. Identifikacija citrata.....	52
5.6. HPLC kvantitativna analiza vzorcev z UV detekcijo	52
5.7. Organske nečistote.....	63
SKLEP	67
Literatura	68

POVZETEK

Sildenafilijev citrat je prvi inhibitor fosfodiesteraze-5, ki je bil konec 90. let registriran za zdravljenje erektilne disfunkcije. Viagra® je v nekaj letih, odkar je prišla na tržišče, postala ena najbolj prepoznavnih blagovnih znamk na svetu. Zaradi njene popularnosti in relativno visoke cene se je razcvetel tudi ilegalni trg s ponarejenimi pripravki, ki vsebujejo sildenafilijev citrat.

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije so ponarejena zdravila v svetu čedalje bolj pereč problem, zlasti v državah brez učinkovitega nadzora. V primeru zdravil, ki se prodajajo preko svetovnega spleta, jih je več kot 50 % ponarejenih, zato je ta problematika čedalje bolj aktualna tudi v razvitih državah. Ta zdravila pogosto ne dosegajo uveljavljenih standardov kakovosti, zato so nemalokrat neučinkovita in celo nevarna.

V okviru diplome smo preko svetovnega spleta kupili različne pripravke, ki naj bi vsebovali 100 mg sildenafilila: kopijo Viagre®, »generično Viagro«, »Viagro, namenjeno ženskam (!)«, ter žvečljive tablete. Dostop, naročanje in nakup vzorcev je bil enostaven in hiter. Ponudba različnih zdravil je bila ogromna, zdravila so bila poceni, recept za nakup ni bil potreben. Spletne strani niso ponujale svetovanj, informacije o zdravilih so bile pomankljive, netočne in zavajajoče. Zdravila, so bila dostavljena preko pošte iz Indije in Velike Britanije in so se nahajala v neprimerni in pomankljivo označeni ovojnini.

Pregled in primerjava vzorcev tablet z originalnimi tabletami sta pokazala, da so vsi vzorci ponarejeni. Ovrednotili smo nekatere parametre kakovosti vzorcev v skladu s specifikacijami evropske in ameriške farmakopeje ter smernicami Mednarodne konference za harmonizacijo.

Vzorci so ustrezali testu razpadnosti za tablete. V vseh vzorcih smo potrdili prisotnost sildenafilijevega citrata s kombinacijo HPLC in UV metode ter identifikacijsko reakcijo za citrsko kislino. S HPLC analizo smo ugotovili, da je vsebnost učinkovine v vseh vzorcih primerljiva z vsebnostjo v originalnih tabletah ter da je bila enakomernost vsebnosti ustrezna, kar kaže, da so bili vsaj deloma izdelani v skladu z dobro proizvodno prakso.

Rezultati določanja organskih nečistot so pokazali, da vsaj dva vzorca vsebujeta nečistote, ki so lahko potencialno škodljive zdravju in predstavljajo tveganje za zdravje uporabnikov.

V diplomski nalogi smo ocenili, da je kakovost kupljenih vzorcev neustrezna, nakup teh zdravil pa tvegan za uporabnika.

Seznam okrajšav

AUC	površina pod krivuljo (Area Under Curve)
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
EU	Evropska unija
EUR	evro
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)
ICH	Mednarodna konferenca za harmonizacijo (International Conference on Harmonisation)
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
LOD	meja zaznavnosti (Limit of Detection)
LOQ	meja kvantifikacije (Limit of Quantification)
N	število teoretskih podov
OTC	zdravila brez recepta (Over the Counter)
PDE	fosfodiesteraza
Ph.Eur. 5	5.izdaja evropske farmakopeje (Pharmacopoea Europea)
SPAM	nezaželjena množična internetna elektronska pošta ali e-slama
t_R	retencijski čas
USP 30	30. izdaja ameriške farmakopeje (United States Pharmacopea)
UV	ultra vijolično
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organisation)

1. UVOD

1.1. SILDENAFILIJEV CITRAT

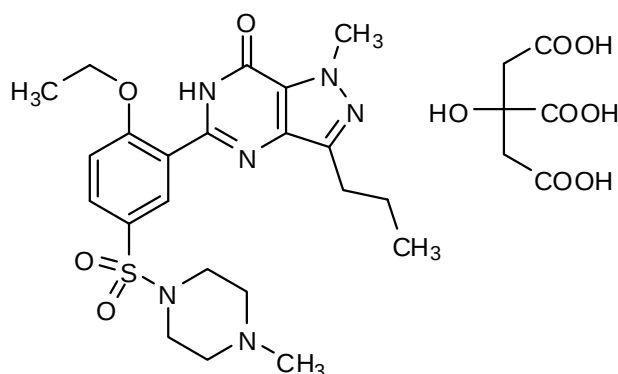
▪ Zgodovina Viagre®

Družba Pfizer je v zgodnjih 90. letih testirala inhibitor encima fosfodiesteraze-5 (PDE-5) kot potencialno zdravilo za zdravljenje angine pectoris. Po končani študiji so raziskovalci zahtevali od preiskovancev, naj neuporabljene testne tablete vrnejo. Na njihovo začudenje pa je mnogo od njih zavrnilo to zahtevo. Po tem dogodku smo bili priča hitremu vzponu in popularnosti Viagre®, ki jo je FDA odobrila marca 1998 ter še isto leto izdala dovoljenje za prodajo. Sildenafililjev citrat je bil do avgusta 2003 edini odobreni PDE-5 inhibitor za zdravljenje erektilne disfunkcije (1,2). Pfizer-jev patent za sildenafililjev citrat poteče 2011-2013 (3).

Viagra® je v zadnjem desetletju eno od najbolj prodajanih zdravil. Podjetje Pfizer je v letu 2001 prodalo okoli 715 milijonov tablet Viagre®, kar ocenjujejo na 1,5 milijarde ameriških dolarjev (4).

▪ Zdravilna učinkovina, sildenafililjev citrat

Sildenafililjev citrat je po IUPAC nomenklaturi 1-[[3-(6,7-dihidro-1-metil-7-okso-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il) 4-etoksi fenil] sulfonil]-4-metilpiperazin citrat s pripadajočo kemijsko formulo (5):



SLIKA 1: Strukturna formula sildenafililjevega citrata.

Sildenafililjev citrat je bel oz. sivo-bel kristalinični prašek s topnostjo v vodi 3.5 mg/mL in molekulsko maso 666.7. (3)

▪ **Organoleptične lastnosti Viagre®**

Viagra je modra, filmsko obložena tableta s karakteristično obliko zaobljenega diamanta, z na eni strani vtisnjenim oblikovanim napisom Pfizer ter na drugi strani "VGR xx", kjer je namesto znak xx označena doza sildenafila v miligramih (25, 50 ali 100 mg). Razen aktivne učinkovine vsebuje tableta še sledeče spojine: mikrokristalno celulozo, kalcijev hidrogenfosfat, kroskamelozo, magnezijev stearat, hipromelozo, titanov dioksid, laktozo, triacetin, in karminsko modro barvilo (5).



SLIKA 2: Tablete Viagre® (1)

▪ **Doziranje, izdajanje in cena**

Viagra® je na voljo v treh različnih jakostih, 25, 50, in 100 mg. Tableta nima razdelilne zareze in se je ne da natančno preploviti niti z rezalcem tablet (3). Najvišja priporočena dnevna doza je 100 mg. Tableto je priporočeno zaužiti od 30 minut do 4h pred spolnim odnosom (5). Tablete se dobi le na recept. Cena za eno tableto, ne glede na dozo, se giblje od 8 do 12 \$.

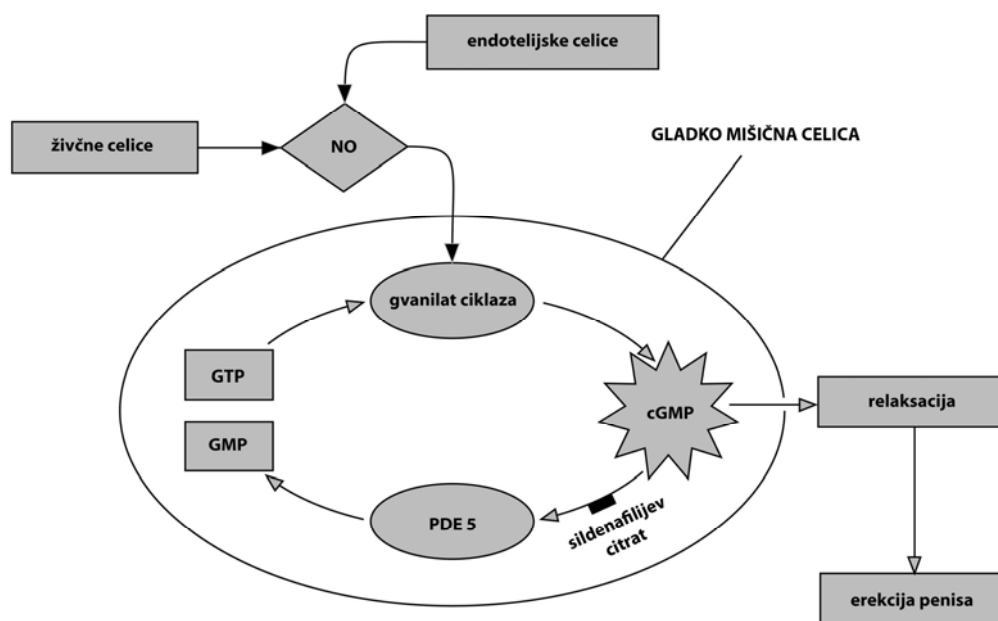


SLIKA 3: Tablete Viagre® s primarno in sekundarno ovojnino.

Viagro® prodajajo v lekarnah le ob predložitvi recepta, ki ga predpiše osebni zdravnik (3). Kupec mora torej na osebni pregled k svojemu zdravniku, ki ga seznani z delovanjem, stranskimi učinki in kontraindikacijami.

Februarja 2007 so v Manchestru (Velika Britanija) uvedli poskusno prodajo Viagre® brez recepta. Tablete so lahko kupili moški med 30 in 65 letom po posvetu s farmacevtom in predloženim testom krvnega pritiska (6).

▪ **Mehanizem delovanja**



SLIKA 4: Mehanizem delovanja sildenafilijevega citrata.

Mehanizem erekcije se začne s procesom, ko erotični stimulans preko parasimpatičnega živčnega sistema povzroči sprostitvev NO v *corpus cavernosum* penisa. NO se veže na receptorsko mesto encima gvanilat ciklaze, kar privede do zvišane količine cGMP (ciklični gvanozin monofosfat). Rezultat je relaksacija gladkih mišic v steni žil (vazodilatacija) v *corpusu cavernosumu*, povečan pretok krvi in erekcija (3,5).

Za uplahnitev erekcije poskrbi mehanizem, ki vključuje v *corpusu cavernosumu* prisoten encim fosfodiesterazo tipa 5 (PDE-5). Ta je odgovoren za razgrajevanje cGMP, za vazokonstrikcijo, zmanjšanje pretoka krvi in uplahnitev erekcije.

Sildenafil deluje kot učinkovina, ki selektivno inhibira PDE-5 (slika 4). Po svoji zgradbi je podoben cGMP. Kompetitivna inhibicija PDE-5 povzroči povečano količino cGMP v

corpusu cavernosumu in s tem boljšo erekcijo. Sildenafil kot učinkovina ne sodeluje v začetni fazi mehanizma erekcije, torej ne more nadomestiti erotičnega stimulansa, ki je odgovoren in potreben za proizvodnjo cGMP. (3,5) Sildenafil ne deluje kot afrodiziak, ne poveča spolne vzburjenosti oz. ne vpliva na erotični stimulus (7).

Encim PDE-5 se razen v *corpusu cavernosumu* nahaja tudi v trombocitih, vaskularnih in visceralnih gladkih mišicah, ter skeletnem mišičju. Inhibicija encima ima za posledico povišano aktivnost NO (preko cGMP), ki preprečuje agregacijo trombocitov in vitro, nastanek trombusov in vivo, ter povzroča periferno arterijsko in vensko dilatacijo (5).

In vitro študije so pokazale precejšno selektivnost sildenafilu za encim PDE-5 v primerjavi z drugimi tipi fosfodiesteraz. PDE-6 se nahaja v očesni retini in je udeležena v proces fototransdukcije. Čeprav ima do PDE-6 sildenafil kar 10x manjšo afiniteto kot do PDE-5, pa domnevajo, da je lahko sildenafiljev citrat odgovoren za anomalije, ki se pojavljajo pri zaznavanju barvnega spektra. PDE-3 je pomemben encim v procesu kontrole srčne kontraktilnosti. Do PDE-3 izkazuje sildenafil 4000x manjšo afiniteto kot do PDE-5 (5).

Glavni učinki sildenafilu so izboljšanje in podaljšanje časa erekcije, ter znižanje krvnega pritiska.

Sildenafil je odobren tudi za zdravljenje pljučne arterijske hipertenzije. Zdravilo se imenuje Revatio®. Tablete so na voljo v jakosti 20 mg (8).

▪ Farmakokinetika

Sildenafiljev citrat se po oralni administraciji hitro absorbira. Njegova absolutna biološka uporabnost je 40%. Maksimalno koncentracijo v krvi doseže po 30 do 120 minut po zaužitju (srednja vrednost je 60 minut). Zdravilo začne delovati približno 1h po zaužitju. Učinek se poveča s povečanjem doze. Absorbcija se zmanjša in zakasni ob hkratnem vnosu mastne hrane. Sildenafil in njegov glavni N-demetiliran metabolit se v 96% vežeta na plazemske proteine. Ta vezava je neodvisna od celotne koncentracije učinkovine. Prevladuje hepatični metabolizem s citokromom P450 3A4. Nekaj se ga odstrani s CYP2C9 jetrnimi mikrosomalnimi izoencimi. Inhibitorji citokroma tako povišajo koncentracijo sildenafilu v krvi. V jetrih nastaja aktivni N-demetiliran metabolit, ki se kasneje še razgradi. In vitro izkazuje ta metabolit 50% jakosti sildenafilu. Njegova krvna koncentracja je približno 40%, tako da lahko rečemo, da je odgovoren za 20% učinka. Razpolovna doba sildenafilu in njegovega glavnega metabolita je 4h. Učinek začne

pojemati 2h po zaužitju. Okoli 80% oralne doze sildenafilijevega citrata se izloči s fecesom, okoli 13% z urinom (5).

▪ **Kontraindikacije**

Pri sočasnem jemanju nitratov (nitroglicerina), natrijevega nitroprusida in amil nitratov se okrepi hipotenzija. Pri okvarah jeter (npr. ciroza), okvarah delovanja ledvic (z očistkom < 30 ml/min) in sočasnem jemanju inhibitorjev P450 3A4 (eritromicin) je lahko plazemska koncentracija sildenafilila od 3 do 8x višja kot pri zdravih ljudeh.

Pri sočasnem jemanju nekaterih proteaznih inhibitorjev (ritonavir; zdravljenje okužbe z virusom HIV) se lahko plazemska koncentracija sildenafilijevega citrata poveča do 11x.

Previdnost je potrebna še:

- pri dednih degenerativnih motnjah retine (vključno z dednimi motnjami retinalne fosfodiesteraze)
- pri jemanju alfa blokatorjev je treba zdravlila vzeti vsaj 4h narazen, da bi se izognili hipotenziji. Doza sildenafilijevega citrata naj ne bi bila višja od 25 mg.
- pri moških, ki jim je spolni odnos odsvetovan, zaradi rizičnih kardiovaskularnih razlogov
- ob nedavni kapi ali srčnem napadu
- pri stanju hipotenzije < 90/50 in hipertenzije >170/110
- pri pacientih s srčnim popuščanjem ali arterijsko koronarno boleznijo z nestabilno angino (5).

▪ **Stranski učinki**

Pojavijo se lahko kihanje, glavobol, zardelost, prebavne motnje, podaljšan čas erekcije, palpitacije in fotofobija. V redkih primerih lahko pride do infekcij urinarnega trakta, diareje in vrtoglavice. Uporabniki poročajo o zameglitvi perifernega vida. Maja 2005 je FDA odkrila povezavo med jemanjem sildenafilila in nearterijsko ishemično optično nevropatijo (NAION), ki je lahko vzrok za poslabšanje ali popolno izgubo vida. Resnejši možni stranski učinki, ki se lahko pojavijo so: povišan intraokularni pritisk, vizualne motnje (pri višjih dozah), hipotenzija, ventrikularna aritmija, infarkt miokarda, nenadna smrt, kap. Priapizem, boleča erekcija, ki še po 4h ne izgine, zahteva takojšnjo zdravniško pomoč, da ne bi prišlo do trajne poškodbe tkiva in izgube sposobnosti erekcije (5, 7).

▪ **Postmarketinška poročanja o zastrupitvah s sildenafilijevim citratom**

► *Kontraindikacije*

Ameriška agencija »Poison Control Centers' Toxic Exposure Surveillance System« (TESS) poroča, da je bil v 21% primerov zastrupitve s sildenafilijevim citratom vzrok v nasprotujočih si učinkih ob zaužitju večih zdravil hkrati. Najbolj pogoste posledice so bile kardiovaskularnega, nevrološkega in dermatološkega tipa (9).

► *Predoziranja, zastrupitve*

Pri zastrupitvi otrok s sildenafilijevim citratom so ugotovili, da je prišlo v 2% do fatalnih posledic, v 2% do hujših in v 11% do srednje nevarnih učinkov (9). V nekem primeru je 42-letna ženska ob poizkusu samomora zaužila 20 tablet s 100 mg vsebnostjo sildenafilila. 2 uri po tem dogodku je bila pripeljana na urgenco, kjer so izvedli izpiranje želodca in ji dali aktivno oglje. Simptomi, ki so sledili, so zajemali šibkost, palpitacije, glavobol, omotico, napolnjen trebuh, ter zardelost. Srčni utrip je dosegel 110 udarcev na minuto, opazili so rdečico in drhtavico. Bolnica ni želela odgovoriti na vprašanja o neugodju v genitalijah. Opaziti je bilo spremembe na sliki EKG. Po 12 urah so simptomi izginili in bolnico so odpustili iz bolnišnice (9).

► *Stranski učinki*

Do maja 2005 je FDA prejela 38 poročanj o ishemični optični nevropatiji po zaužitju sildenafilijevega citrata. V večini primerov je šlo za tip NAION, v ostalih primerih pa za ponavljajočo se oz. trajno poškodbo (10). FDA je odobrila vključitev informacij o možnosti izgube vida (NAION) za Viagra®, Cialis® in Levitra® naknadno, t.j. po prvih postmarketinških poročanjih. FDA-jeva poročila o smrtnih primerih od marca do julija 1998 so obsegala poročilo o 123 smrtnih primerih od 3,6 milijonov izdanih receptov za Viagra®. V 21 primerih je šlo za neznan vzrok smrti, 2 sta umrla zaradi kapi in 46 zaradi kardiovaskularnih zapletov (infarkt miokarda, zastoj srca, koronarna arterijska bolezen, hipotenzija z zastojem srca,...) V prijavljenih primerih s podatki o starosti je bila povprečna starost umrlih 64 let. Od 69 umrlih je bilo 66 moških. Doze smrtnih primerov so bile večinoma 50 ali 100mg. Od vseh smrtnih primerov le 5 umrlih ni bilo podvrženih rizičnim faktorjem. V 12 primerih so umrli jemali nitroglicerina ali nitrata. Ostalih 74 % je imelo ali visok pritisk, hiperholesterolemijo, diabetes mellitus, prekomerno telesno težo, probleme s srcem, ali pa so kadili. (11)

▪ **Viagra kot »lifestyle« zdravilo in rekreacijska droga**

Viagra® se je na trgu uveljavila tudi kot »lifestyle« zdravilo. Veliko moških si jo želi poskusiti, čeprav nimajo težav z erekcijo. Čeprav ni dokazov, da bi lahko sildenafil deloval kot afrodiziak, mnogo ljudi še vedno verjame, da lahko le ta izboljša njihovo spolno aktivnost, učinek erekcije in seksualno izkušnjo. Med njimi so tudi ženske (9).

Posebno problematiko predstavlja aktualna uporaba sildenafilijevega citrata kot rekreacijske droge, ki jo mladi mešajo s klubskimi drogami, med katerimi so tudi različni nitriti in nitrati. Kombinacija le teh s sildenafilom je še posebej nevarna, zaradi nevarnih sinergizma stranskih učinkov (glej poglavje kontraindikacije) (12).

Sildenafilijev citrat se na črnem trgu pojavlja pod različnimi imeni: »Vitamin V«, »Thrill pill«, ter v kombinacijah z različnimi drogami »Hammerheading«, »X's«, »O's« in »Sextasy« (v kombinaciji z metilendioksimetamfetaminom znanim kot MDMA oz. Ecstasy), »Tina« (v kombinaciji z metamfetaminom). Poleg naštetih mešanic se sildenafilijev citrat uporablja tudi v kombinaciji z gamahidroksibutanojsko kislino (GHB), ketaminom in amil nitratom (znan kot »poppers«). Mešanice lahko vsebujejo tudi več različnih drog skupaj. »Trail mix« vsebuje uprašen MDMA, ketamin, stimulant, sildenafilijev citrat in druge substance (9,13).

V Kanadi je bila mešanica Viagre® in Ecstasy-ja popularna že 1 leto po odobritvi prodaje sildenafilijevega citrata. Cena tablete s sildenafilijevim citratom dosega na črnem trgu od 25 \$ do 30\$. Uporaba sildenafilijevega citrata je razširjena v 10 % vseh nočnih klubov v Veliki Britaniji. Povprečna starost uživalcev je 26 let, odjemalci so tako moški kot ženske. Do mešanja sildenafilijevega citrata z naštetimi drogami je prišlo zaradi stranskih učinkov teh drog, ki povzročajo zmanjšanje libida in v nekaterih primerih tudi začasno erektilno disfunkcijo. Uporaba sildenafilijevega citrata je pogosta tudi pri odvisnikih od opiatov ter pri uživalcih alkohola, ki si želijo boljšo spolno aktivnost (9,13). Pri uporabi mešanice MDMA in sildenafilijevega citrata poročajo o glavobolih in podaljšani erekciji (9,13).

Uporaba sildenafilijevega citrata kot rekreacijske droge je povezana z visokim deležem seksualne aktivnosti brez zaščite ter z visokim tveganjem za prenos spolnih bolezni, med njimi tudi okužbo z virusom HIV. Ena tretjina uživalcev »rekreativnih drog« s sildenafilijevim citratom pripada HIV seropozitivni populaciji (9).

Uporabo sildenafilijevega citrata so opazili tudi med srednješolsko populacijo, kjer velja le ta za afrodiziak in »party drug« (9).

1.2. PONAREJENA ZDRAVILA

▪ Definicija

Po definiciji WHO je ponarejeno zdravilo tisto, ki je namerno in zavajajoče označeno glede istovetnosti in/ali izvora. Ponarejanje se lahko nanaša na lastniška ali generična zdravila. Ponaredki zdravil, ki so bili odkriti na trgu, so razvrščeni v različne skupine (14):

- Kopije originalnega produkta, 1%;
- Produkti z ustrezno količino aktivne učinkovine, a ponarejeno embalažo, 15.6%;
- Produkti z visoko vsebnostjo nečistot in kontaminantov, 8.5%.
- Produkti z neustrezno količino aktivne učinkovine, 20.2%;
- Produkti brez aktivne učinkovine, 32.1%;
- Produkti z neustreznimi sestavinami, 21.4%;

▪ Razširjenost ponarejenih zdravil

Definicije, kaj je »ponarejeno zdravilo« se med državami razlikujejo, kar pomeni, da je neenotno tudi ocenjevanje obsega in količine ponarejanja (15).

FDA navaja, da je ponarejanje zdravil težko odkriti, raziskovati in količinsko opredeliti.

Po navedbah WHO dosega trgovina s ponarejenimi zdravili v industrijskih državah z učinkovitim regulatornim in tržnim sistemom. (ZDA, večina EU, Avstralija, Kanada, Japonska, Nova Zelandija) manj kot 1% skupne prodaje zdravil.

V Afriki, Aziji in Latinski Ameriki se procent giblje med 10% in 30% ter v bivših državah Sovjetske zveze okoli 20 %. Delež v nekaterih državah kot so Argentina, Kolumbija in Mehika naj bi se dvignil celo na 40%. V Afriki dosega procent ponarejenih primerkov pri nekaterih skupinah zdravil, kot so na primer antimalariki, tudi do 50%. Med zdravili, ki se prodajajo preko internetnih strani brez podatka o fizičnem naslovu, je ponarejenih več kot 50% zdravil (15).

Pojavljanje in prodaja ponarejenih zdravil še zdaleč ni samo problem nerazvitih dežel in dežel v razvoju. FDA poroča, da se je v Ameriki od leta 1990 do 2003 štirikrat povečalo število ponarejenih zdravil. Po poročilih »Centre for Medicines in the Public Interest«, naj bi prodaja ponarejenih zdravil v Ameriki v letu 2010 dosegla 75 milijard \$, kar je 90 % porast glede na leto 1995 (15).

▪ **Mesto izdelave, izvor ponarejenih zdravil**

Ponarejena zdravila so lahko uvožena, nezakonito prepeljana ali lokalno proizvedena. Proizvajajo se tako v velikih družbah z najmodernejšo opremo, kot tudi v majhnih, slabo opremljenih laboratorijih, ki vključuje izdelavo v domačih skladiščih in kletah brez ustreznih higienskih standardov. Z možnostjo nakupa sodobne farmacevtske tehnološke opreme za izdelavo in pakiranje zdravil kot so tabletirke in oprema za tiskanje, je posnemanje pravih zdravil za ponarejevalce olajšano, odkrivanje ponaredkov pa oteženo (16).

V poročilih WHO iz leta 2002 je izvor proizvodnje ponarenih zdravil predvsem JV Azija, z vodilnimi državami Kitajsko, Indijo in Tajsko. V zadnjih letih so se ponarejanju pridružile Afrika, celotna Azija in Južna Amerika. Na Kitajskem so leta 2001 zaprli okrog 1.300 tovarn za proizvodnjo zdravil (15).

PRIMER: Kitajec Xi Yongli je bil obsojen na 8 let zapora, ker je s sodelavci najel staro farmacevtsko tovarno, jo registriral kot tovarno za izdelavo prehrabnih izdelkov, nakupil večje količine sildenafilijevega citrata in izdelal celih 60 ton tablet brez dovoljenja (17).

▪ **Vzroki za uspeh ponarejenih zdravil**

Glavni vzroki za uspeh ponarejenih zdravil na trgu so ogromni zaslužki (ocena globalnega trga leta 2005 je bila okoli 35 milijard \$) ter majhno tveganje, da bodo ponarejevalci odkriti in kaznovani. Visoke cene zdravil so spotakljiva tema politike držav. Pomemben dejavnik v nekaterih državah je pomanjkanje in slaba oskrba z osnovnimi zdravili (16). Ponarejanju zdravil so bolj izpostavljene nerazvite države in države v razvoju, kjer gre tudi za pomanjkljiv regulatorni sistem. Velikokrat je vzrok slabo izvajanje zakona o zdravilih, pomanjkanje nadzora nad izvozom zdravil, internetno poslovanje in nenadzorovana neposredna poštna dostava na dom (16). Nedavna ocena količine pošilk z zdravili iz tujine preko mednarodne pošte v Miamiu na Floridi se giblje okrog 7 milijonov paketov letno. Proizvajalci in distributerji so povezani v mreže z mnogimi posredniki, zato je težje odkriti izvor goljufije. Večkrat se zgodi, da eden od posrednikov zdravila prepakira v novo embalažo in s tem olajša izvoz oz. uvoz zdravil (18).

Na trgu ponarejenih zdravil obstajajo znaki generalizirane korupcije, organiziranega kriminala, vključno s podkupovanjem in izsiljevanjem politikov, uradnikov, farmacevtov in ostalih (16).

▪ **Ponaredki Viagre® in pripravkov s sildenafilijevim citratom**

Viagra® spada med najprivlačnejša zdravila za ponarejanje. Ima veliko potencialnih kupcev, različnega profila. Zaradi visoke cene in razlik v cenah identičnih produktov obstaja velika možnost, da bo kupec iskal zdravilo izven uradnega sistema oskrbe, predvsem v primerih, ko si ga ta težko privošči.

Različni viri poročajo, da so raziskovalci po obsežnih analizah ugotovili, da je kar polovica vseh »Viager«, ki se prodajajo preko interneta, ponarejenih (19). Na internetnih straneh je možno izbirati med cenovno različnimi ponarejenimi »Viagrami«. Januarja 2004 je bilo preko internetne strani Paypill.com v Veliki Britaniji prodanih na tisoče tablet s sildenafilijevim citratom (19). Na ilegalnih slovenskih spletnih straneh je možno kupiti ponarejeno »Viagro«, ki jo pošiljajo preko dostavnih služb. Naslovi slovenskih spletnih trgovin so: <http://www.moja-viagra.com>, <http://www.modraviagra.com>, <http://viagra-online.gajba.net>, <http://modrataletka.com> (dosegljive jan. 2008).

Ponaredke s sildenafilijevim citratom, ki se pojavljajo na svetovnem spletu, lahko razvrstimo v šest glavnih skupin:

1. Ponarejena »Viagra«

Prodajalci ponujajo Viagro, ki naj bi bila originalna Pfizerjeva Viagra®. Prvi znaki, da gre za ponarejen izdelek, so predvsem nižja cena, ter poudarjene oznake kot na primer »avtentična« Viagra, »100 %« Viagra,... (7)

2. »Generična Viagra«

Sildenafilijev citrat je patentno zaščiten. Generična zdravila s sildenafilijevim citratom v razvitih državah niso odobrena in ne obstajajo; torej jih lahko označimo kot ilegalni ponaredek. Poleg spornega imena proizvajalci pogosto navajajo, da je bilo generično zdravilo narejeno po WHO standardih, čeprav WHO ni organizacija, ki bi lahko zagotavljala kakovost zdravila. Cena »generične Viagre« je lahko od Viagre® nižja tudi za 70% (7).

3. »Viagra s hitrim raztapljanjem«

Pojavlja se v obliki »soft gela«, žvečljivih tablet ali kot pastila za lizanje. Viagra s hitrejšim raztapljanjem oz. hitrejšim delovanjem nikoli ni bila registrirana ali odobrena s strani katerekoli regulatorne organizacije (7).

4. Zeliščna in rastlinska zdravila za zagotavljanje ali izboljšanje erekcije in seksa:

Do sedaj ni bilo še nobeno zeliščno zdravilo dokazano učinkovito v te namene. V teh pripravkih so z analizo že večkrat odkrili dodatke sildenafilijevega citrata in njegovih terapevtskih ekvivalentov tadalafil (Cialis®) in verdenafila (Levitra®), čeprav nikjer ni bilo označeno, da pripravek te učinkovine vsebuje (7).

5. »Viagra za ženske« (v različnih oblikah)

Ti pripravki vsebujejo ponavadi sildenafilijev citrat. Ženskam naj bi zagotavljali boljšo spolnost. Prodajalci zavajajo stranke predvsem s provokativnimi stavki, kot npr.: »zakaj bi morale biti diskriminirane v spolnosti«, ter »zdaj, tudi za ženske«, ipd. Tablete so pogosto v roza barvi. Seveda klinične študije niso bile nikoli izvedene in zdravila nikoli odobrena.

6. Drugo (prehranska dopolnila)

FDA je analizirala ameriško prehransko dopolnilo z imenom Actra-Rx in odkrila, da vsebuje 55 mg sildenafil v vsaki tableti. Zdravilo se je na ameriškem trgu pojavljalo tudi pod imeni Yilishen in Niagara Actra-Rx (20).

1.3. INTERNETNA PRODAJA PONAREJENIH ZDRAVIL

▪ Internetni sistem prodaje zdravil

► *Internetno informiranje*

V ZDA 50% pacientov preveri zdravstvene podatke preko interneta. Za iskanje podatkov o zdravju je lani v ZDA uporabilo internet kar 22 milijonov ljudi (21).

Do informacij o zdravju in zdravilih je možno priti preko kateregakoli internetnega brskalnika. Te informacije imajo večkrat nedoločljiv vir in so nezanesljive.

FDA preko svojih spletnih strani svari pred nekompetentnimi informacijami o zdravilih. Za kakovostno informiranje priporoča uporabo spletnih strani s končnico .gov (vladne strani, npr. www.fda.gov), .edu (univerzitetne medicinske in farmacevtske strani), .org (neprofitne organizacije, ki osveščajo ljudi o zdravju) ter uradne strani medicinskih in farmacevtskih organizacij in časnikov. Na straneh, ki informirajo, morajo biti jasno navedeni avtorji in originalni viri podatkov ter datum izdane informacije oziroma datum zadnje posodobitve strani. Dejavnik zanesljivosti je uredniški odbor s profesionalnimi in strokovnimi referencami. Na straneh, kjer zbirajo podatke, mora biti vedno naveden namen zbiranja (16, 18). Strani s končnico .com so ponavadi komercialne in prodajajo zdravila. Informacije, ki so posredno ali neposredno namenjene trženju zdravila, imajo funkcijo oglaševanja in se temu tudi prilagajajo (22).

► *Informacije o »Viagri«*

Informacije o »Viagri« so zaradi njene popularnosti še posebej zlorabljene. Nahajajo se tudi na straneh z erotično in pornografsko vsebino. Če odtipkamo v internetni brskalnik www.google.com besedico »Viagra«, dobimo 91.400.000 zadetkov. Na googlovih straneh znotraj Slovenije jih dobimo 71.800. Za naslednje, po popularnosti primerljivo zdravilo »Prozac«, dobimo na svetovnem spletu 23.600.000 zadetkov in na spletu znotraj Slovenije 21.100 zadetkov (vsi podatki so navedeni za 9.januar 2008).

► *Nedovoljeno oglaševanje zdravil na internetu*

Problematika oglaševanja in prodaje na trgu kot je internet je obširna, saj internet ni teritorialno omejen, posamezne države pa nimajo enake zakonodaje. Viri na spletnih straneh so nedefinirani, prodaja je težko sledljiva. Internetna oglasna stran lahko čez noč

izgine, z njo pa tudi vsi podatki in dokazi o njenem obstoju. Prodajalci stalno spreminjajo svoje naslove strežnikov ali »URL«-je, ter najemajo »SPAM«-erše, zato jih je težko onemogočiti (23). V večini primerov je težko identificirati ime, lokacijo in državo, kjer ima podjetje licenco. Identificirati je težko tudi zdravnike, farmacevte in internetne operatorje, ki so vključeni v to prakso (24). Kadar pride do identifikacije vpletenih v neustrezno internetno prodajo zdravil, je izven države proti njim finančno zahtevno in težko ukrepati. Vsaka država naj bi bila odgovorna za regulacijo spletnih virov, ki delujejo na njenem ozemlju, obenem pa naj bi priznala tudi ureditve drugih držav, katerih zakonodajo ocenjuje za primerljivo svoji (16, 18). Regulacija in nadzor medmrežne prodaje in oglaševanja zdravil je v fazi urejanja tako znotraj posameznih držav, kot tudi na meddržavnem nivoju (25).

Zdravila, katerih oglaševanje je dovoljeno, so v Sloveniji podvržena »Zakonu o zdravilih«, ter »Pravilniku o oglaševanju zdravil in medicinskih pripomočkov« (26). Oglaševanje zdravil na recept za laično javnost je v Sloveniji in EU prepovedano. V ZDA in Novi Zelandiji je oglaševanje zdravil, ki se prodajajo le na recept, dovoljeno, kar zajema tudi oglaševanje preko spleta (27).

Oglasi za ponarejena internetna zdravila so ilegalni in ne ustrezajo zakonu in kodeksu o oglaševanju zdravil. Praviloma so zavajajoči in vsebujejo neresnične trditve (9). Strani kopirajo koncept in vizualno podobo strani priznanih farmacevtskih družb in zagotavljajo odobritev svojih zdravil s strani zaupanja vrednih organizacij, kot so FDA ali WHO. Ponavadi ponujajo več vrst zdravil in več oblik istega zdravila, za nakup katerih ni potrebna predložitev recepta. Nekatere strani ponujajo svetovanje z e-zdravnikom oz. svetovalcem, ki niso nujno strokovno usposobljeni za takšno delovanje.

Cene oglaševanih ponarejenih zdravil so nižje od cen zdravil, ki so na voljo v lekarni. Poleg tega oglaševalci ponujajo količinske popuste, ter popuste na članstvo internetne strani (23). Nizke cene z visokimi popusti so lahko tudi zavajajoče, saj jim pošiljatelj prišteje še visoke marže za svetovanje, ter stroške pošiljanja (23).

Ponudniki največkrat sami poskrbijo zato, da pride oglas za zdravilo do potencialnega kupca. Preko elektronske »SPAM« pošte s katero preplavijo medmrežje oglašujejo predvsem »lifestyle« zdravila, med katerimi je na prvem mestu Viagra® (9). Nedavno se je na Nizozemskem s SPAM-om pojavil ponarejeni oglas za Viagra, ki ga je prejelo 55% moških, od tega jih je 46% verjelo da gre za oglas Pfizerja. SPAM-erji se med drugim spretno izogibajo varovalom tako, da namesto ključnih besed Viagra uporabljajo različice

»Vlagra«, vrivajo besede »VIA..cheap..GRA, besede lomijo »V I A G R A« in podobno (28).

Navadno ima ena spletna stran široko ponudbo različnih zdravil za zdravljenje erekcijske disfunkcije, vključno z alternativnimi in neregistriranimi oblikami. Ilegalni oglaševalci izkoriščajo dejstvo, da je prodaja Viagre® preko interneta v Kanadi dovoljena, ter da je v ZDA dovoljen uvoz kanadskih zdravil na recept, tako da promovirajo izdelke pod lažnim kanadskim simbolom (28).

V slovenskem spletnem oglasu na naslovu <http://viagra-online.gajba.net> namenjenem prodaji »Viagre« razen E-mail naslova ne najdemo podatkov ne o fizičnem naslovu prodajalca, ne o avtorjih in strokovnih sodelavcih in ne o kakršnikoli povezavi z drugimi strokovnimi spletnimi stranmi. Ena od zavajajočih informacije oglasa je: »če tableto počasi raztapljamo pod jezikom, lahko prične delovati že v 15 minutah« (29).

Do spletne strani za nakup »Viagre« lahko potencialni kupec pride sam, tako da odtipka v iskalnik ključne besede kot na primer: »buy viagra«, »order viagra«, »buy cheap viagra online«, »how to get viagra without perscription« in podobno...

► *Inetrnetna prodaja zdravil*

Na splošno je prodaja zdravil preko interneta posredna. Internetna stran informira kupca o ponudbi, možnim načinom nakupa, ter možnosti komunikacije s ponudnikom. Na nekaterih spletnih straneh omogočajo on-line svetovanje. Zdravila plača kupec s svojo kreditno kartico in jih prejme s pošiljko na domači naslov. Ocena za nakup zdravil (legalnih in ilegalnih) preko interneta je za leto 2004 znašala 15 milijard \$ (24).

Prednosti internetne prodaje so dostopnost 24h na dan, zasebnost in anonimnost in lažja dostopnost za težje mobilne, invalide in starejše ljudi.

Prodaja zdravil brez recepta in zdravil na recept je v Sloveniji regulirana z »Zakonom o zdravilih«, ter z »Zakonom o opravljanju lekarniške dejavnosti«. Zdravila na recept se lahko v Sloveniji izdajajo le v lekarnah (26, 30). Prodaja zdravil na recept preko spleta je v Sloveniji in EU nezakonita. »Zakon o prometu z zdravili« dovoljuje prodajo OTC zdravil in svetovanje medmrežnim lekarnam, ki imajo dovoljenje za opravljanje tovrstne lekarniške dejavnosti (26). V Sloveniji deluje ena internetna lekarna, ki ima dovoljenje za prodajo zdravil brez recepta.

V ZDA obstaja veliko legalnih lekarn, kjer lahko posamezniki naročijo in kupijo zdravila, ki se dobijo brez recepta, medtem ko lahko v Kanadi preko spleta naročijo pacienti tudi

zdravila na recept, če le-tega pošljejo po faksu ali elektronski pošti. Zaradi znižanja stroškov zdravil na recept, je ameriški senat odobril veletrgovcem in farmacevtom uvoz zdravil iz Kanade po nižji ceni (32). Državljeni ZDA lahko legalno uvozijo zdravila za osebno rabo, do zaloge 3 mesecev, če so le ta odobrena iz strani FDA (31).

V letu 1999 so študije pokazale, da legalne spletne lekarne, ki ponujajo zdravila na recept s priloženim receptom, prodajo predvsem sildenafiljev citrat (od 33 prodanih izdelkov, jih je 22 vsebovalo sildenafiljev citrat) (9).

Nelegalno internetno prodajalno z zdravstvenimi pripomočki lahko odpre praktično vsak, saj je prodaja sama silno preprosta. Ponuja dobavo kateregakoli zdravila, komurkoli in kadarkoli. Ilegalnim prodajalcem ni treba upoštevati ne zakonov o izdelavi, ne zakonov o označevanju in transportiranju zdravil. Za vzpostavitev delovanja spletne strani je raziskovalna skupina »Beau Dietl & Associates« potrebovala le 50 \$ in 5 ur dela. Prodajalce na veliko je na svetovnem spletu z lahkoto najti. Prodajalna iz Indije je npr. pripravljena dostaviti večjo zalogo »Viagre®« že na podlagi E-mail naročila (24).

► *Dostava internetnih zdravil*

On-line lekarne in prodajalne zagotavljajo diskretno dostavo v roke naročnika. Kupec prejme zdravila s pošto pošiljko ali kurirsko pošiljko oz. t.i. hitro pošto, ki se izmenjuje preko komercialnih kurirskih servisov (DHL, UPS, TNT, Fedex, idr.). Zdravila, ki jih kupec prejme, niso nujno poslana iz države, v kateri je registriran internetni oglas.

Pošiljke gredo večkrat mimo carinskega postopka, označujejo jih z lažnimi oznakami kot npr. pripravki za nego lasišča, vitaminski dodatki, sojino zrnje, ročna dela, rezervni deli za svinčnike, idr. Poštne pošiljke, ki so označene kot zdravilo, gredo z lahkoto skozi carinske postopke, saj ni dokaza o ilegalni trgovini ali ilegalno predpisanih receptih.

Carinsko kontrolo poštnih pošiljk v Republiki Sloveniji izvaja Carinska Pošta, carinsko kontrolo kurirskih pošiljk pa Izpostava Letališča Brnik. Carinski organi v Sloveniji nadzirajo samo uvoz in izvoz iz tretjih držav, ne nadzirajo pa prometa pošiljk znotraj držav članic EU. V praksi obstaja tudi t.i. institut FPE (First Point of Entry), ko se za pošiljke, namenjene v Slovenijo, uvozni postopek začne in konča v eni od drugih držav članic.

Trenutno znano število poštnih pošiljk z zdravili v Sloveniji je 1– 2 pošiljki dnevno. Za zdravila, ki se pošiljajo s poštnimi pošiljkami znotraj držav Evropske Skupnosti za prejemnike v Republiki Sloveniji ni podatkov, saj teh pošiljk ni potrebno kontrolirati.

V Zakonu o zdravilih in medicinskih pripomočkih in v carinskih predpisih ni predpisa za uvoz poštnih in ostalih pošilk z zdravili za lastne potrebe fizičnih oseb. Prav tako ni nikjer predpisano, na osnovi katerega dokumenta in katera zdravila se fizičnim osebam lahko izroči. Za primer uvoza večjih količin zdravil, ki presegajo osebno uporabo, je potrebna vložitev pisne carinske deklaracije skupaj z zakonsko zahtevanimi dovoljenji, čeprav ni predpisa kakšna količina določenega izdelka sploh še pomeni zdravilo za osebno uporabo. Carinski postopek je predpisan in jasen le za ponaredke zdravil, kjer gre za predmet kršitve pravic intelektualne lastnine. Presoja, ali gre za ponaredek, je prepuščena carinskemu organu (33).

▪ **Nakup internetnih zdravil in nevarnost za kupca**

Ilegalni internetni oglasi za »Viagro« in pripravke s sildenafilijevim citratom pridobivajo kupce z nizkimi cenami, z dostopnostjo brez posvetovanja z zdravnikom in brez recepta, z zagotavljanjem intimnosti, ... Potencialni kupci »Viagre« so tako moški z erektilno disfunkcijo, kot tudi moški, ki nimajo težav, a si »Viagro« vseeno želijo poizkusiti. Ilegalni oglaševalci »Viagre« jih zavajajo s podatkom, da sildenafilijev citrat vzpodbuja potenco (28). Prodajalci ne diskriminirajo žensk, za katere zdravilo ni registrirano in za katere učinek ni bil dokazan. Večinoma se ne ozirajo niti na mladoletnost kupcev (24). Ameriški televizijski reporter poroča o tem, da je preko interneta uspešno kupil »Viagro« za svojo mačko (9). Posebno ogrožena ciljna skupina so pacienti, ki se ne zavedajo nevarnosti svojega obstoječega bolezenskega stanja in interakcij med zdravili, saj niso deležni ustreznega svetovanja. Pri erektilni disfunkciji tiči nevarnost tudi za dejstvom, da se za le to večkrat skriva druga bolezen, ki jo je dolžen raziskati zdravnik. 52-letni Robert McCutcheon iz ZDA, z bolečinami v prsnem košu in srčnimi težavami v družini, je brez posveta z zdravnikom ali farmacevtom kupil »Viagro®« on-line. Po zaužitju tablete je imel spolni odnos in umrl zaradi srčnega infarkta (24).

Na ilegalnih spletnih straneh, ki ponujajo svetovanje, svetovalci ponavadi niso strokovno usposobljeni in za to nimajo dovoljenja. Svetovanje on-line je v večini primerov nestrokovno in površno. Legalne lekarne najemajo večinoma zdravnike v pokoju, ki jim odvzem licence nič več ne pomeni. E-zdravnik z ustreznim dovoljenjem za internetno svetovanje odgovarja v povprečju na 300 prijav dnevno, kar pomeni, da si v 8 urnem delavniku brez odmora za eno svetovanje vzame 90 sekund časa (24). V ZDA je bilo leta

1999 kaznovanih 10 različnih legalnih internetnih lekarn, zaradi izdajanja receptov in zdravil s sildenafilijevim citratom pacientom, kjer so bile kontraindikacije očitne. Med njimi je bila ena izmed spletnih lekarn pripravljena dobaviti pripravek 69 let stari močnejši ženski s konorarno arterijsko boleznijo in visokim pritiskom, ki še nikoli ni doživela orgazma.

On-line obrazci so vprašalniki, ki se nahajajo na ilegalnih internetnih straneh. Ti imajo večkrat že označene podatke o spolu, letih in zdravstvenem stanju kupca. Kupec mora navedene odgovore potrditi le s klikom na miško. V večini primerov je za izpolnitev obrazca in naročila potrebno manj kot 10 minut (34). Z e-obrazci prodajalci preložijo odgovornost na kupca, ki je s tem sam odgovoren za posledice, če se v e-vprašalniku o svojem zdravstvenem stanju zlaže (24). V nekem primeru, je 9 letni deček izpolnil vprašalnik, kjer je navedel starost »4'8"« in težo »70 funtov« in po pošti vseeno prejel Prozac® (24).

Včasih je edini pogoj za nakup zdravil le veljavna kreditna kartica. Z zaupanjem svojih podatkov tvega kupec dodatno še krajo identitete in številke kreditne kartice.

Pri nakupu zdravil preko interneta je nemogoče vedeti, kaj se bo v pošiljki nahajalo in od kod bo poslana. Kupec tvega, da v prispelem zdravilu ne bo zdravilne učinkovine, da bo ta v neustrezni količini, ali pa da bodo v pripravku nevarne primesi. Poročila agencije »US Customs and Border Protection« navajajo primere internetnih zdravil, okuženih z nevarnimi bakterijami, in zdravil, ki so vsebovala cement (24).

Na internetu se ne pojavljajo le ponarejena zdravila, ampak tudi taka, ki so napačno označena ali pa jim je potekel rok uporabe (21). Zdravila, ki prispejo do kupca, se nahajajo tako v stekleničkah in škatlicah, opremljenih z oznako proizvajalca, kot tudi v neoznačenih plastičnih vrečkah in ovojnica (24). Z neustreznim transportom in embalažo se pripravki poškodujejo.

Možnost, da kljub plačilu pošiljka sploh ne bo dostavljena, je velika (24). Razlog je lahko tudi zasežba na carini.

1.4. ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE SILDENAFILIJEVEGA CITRATA

Za analizo sildenafilijevega citrata v tabletah nismo našli nobene uradno potrjene metode. Farmakopejsko specificirana metoda za določevanje sildenafilijevega citrata še ne obstaja. ICH smernice priporočajo za identifikacijo učinkovin v pripravkih kombinacijo kromatografske metode s tehniko, ki temelji na drugih principih (35). Identifikacijo citrata je mogoče izvesti po splošnem farmakopejskem predpisu za identifikacijo citrata. Za določanje vsebnosti in enakomernosti vsebnosti sildenafilijevega citrata v pripravkih obstaja v literaturi nekaj različnih validiranih analiz z različnimi cilji. Večina jih sloni na HPLC analizi. Spodaj sta opisani dve izmed validiranih in objavljenih analiznih metod za kvalitativno določanje sildenafilijevega citrata:

- *»Določanje sildenafilijevega citrata in sorodnih substanc s HPLC v komercialnih produktih in v tabletah« (36)*

HPLC metoda je bila validirana za določanje sildenafilijevega citrata in sorodnih snovi, ki se pojavljajo kot nečistote v zdravilnih pripravkih. V kromatografskem sistemu so uporabili C18 (10 μ m) kolono. Za mobilno fazo so uporabili zmes vodne raztopine 0,02M amonijevega acetata (pH 7) in acetonitrila v razmerju 1:1 (v/v). Pretok je bil 1 ml/min, ter valovna dolžina UV detekcije 240 nm.

- *»Določanje sildenafilijevega citrata v čisti obliki in farmacevtskih oblikah z reverzno fazno tekočinsko kromatografijo in preučevanje stabilnosti« (37)*

HPLC metoda je bila validirana za določanje sildenafilijevega citrata v učinkovini in v tabletah. V kromatografskem sistemu so uporabili C18 (5 μ m) kolono. Za mobilno fazo so uporabili zmes vode in acetonitrila v razmerju 48:52 (v/v). Pretok je bil 1 ml/min, ter valovna dolžina UV detekcije 245 nm. Pri metodi so kot interni standard uporabili piroksikam.

1.5. Validacija analiznih metod

HPLC je kromatografska metoda, s katero določamo čas zadrževanja določene spojine na koloni. Retencijski čas je značilen za posamezno spojino v danih kromatografskih pogojih (služi nam lahko za identifikacijo), medtem ko je površina pod krivuljo sorazmerna koncentraciji spojine (služi nam za kvantitativno določitev). Za HPLC metodo je nujna izvedba optimizacije, pri kateri določimo optimalne pogoje za analizo določene spojine. Optimalne pogoje dosežemo s predhodnimi testi, kjer v sistemu s fiksnimi parametri spreminjamo le en parameter naenkrat in opazujemo odziv. Metodo potrjujemo z validacijo. Validacija analizne metode potrjuje njeno primernost in zanesljivost za predvideno uporabo. V sklopu ICH smernic so kot kriteriji validacije navedeni selektivnost, linearnost, natančnost, točnost ter meja zaznavnosti in meja določitve ter robustnost (38).

► **Selektivnost** metode pomeni zmožnost, da lahko metoda nedvoumno loči posamezen analit v prisotnosti drugih komponent, kot so nečistote, razpadni produkti in spojine iz nosilca farmacevtske oblike. Selektivnost metode je nujna za točno in natančno določitev vsebnosti učinkovin v farmacevtski obliki.

► **Določitev območja in vrednotenje linearnosti**

Območje analitične metode je interval med spodnjo in zgornjo koncentracijo oz. količino analita, znotraj katerega analitični postopek izkazuje primerno natančnost, točnost in linearnost.

Linearnost metode znotraj danega območja pomeni, da so rezultati analize, torej površine pod kromatografskim vrhom, direktno proporcionalni koncentraciji oz. količini analita. Iz grafa izračunamo enačbo umeritvene krivulje, $y = a \cdot x + b$, kjer je a naklon premice in b odmik na y osi. Linearnost se vrednoti z grafičnim prikazom koncentracije ali vsebnosti analita, ter korelacijskim koeficientom. Bolj kot se vrednost korelacijskega koeficienta približuje 1, večja je stopnja linearnosti metode.

► **Natančnost (ponovljivost)** izraža stopnjo raztrosa serije izmerjenih vrednosti vzorca okoli povprečne vrednosti. Predstavlja slučajno napako. Rezultat običajno podajamo kot relativni standardni odklon v odstotkih (RSD%).

► **Točnost** analizne metode je merilo, kako se rezultati pridobljeni z analizno metodo, skladajo z dejanskimi vrednostmi. Za oceno točnosti potrebujemo referenčni standard z

znano koncentracijo učinkovine. V kolikor dokažemo, da je metoda specifična, linearna in natančna na delovnem območju, lahko sklepamo, da je metoda tudi točna (38).

► **Meja zaznavnosti (LOD) in meja kvantifikacije (LOQ)**

Meja zaznavnosti je minimalna količina substance, ki še povzroči tak signal, da ga lahko nedvoumno oz. z določeno verjetnostjo ločimo od šuma. Pri HPLC metodah je meja zaznavnosti koncentracija analita, ki daje vsaj 3x večji signal kot je povprečen šum detektorja na bazni liniji kromatograma (39, slika 5). Mejo detekcije lahko ocenimo vizualno iz kromatogramov analiz vzorcev pri mejni koncentraciji analita. Meja kvantifikacije (LOQ) je najmanjša koncentracija analita, ki jo še lahko kvantitativno določimo z ustrežno točnostjo in natančnostjo. Mejo kvantifikacije pri HPLC metodah predstavlja koncentracija analita, ki zagotavlja višino vrhov vsaj 10 x višjo od šuma bazne linije. Mejo kvantifikacije lahko ocenimo vizualno iz kromatogramov analiz vzorcev pri pričakovani meji kvantifikacije.

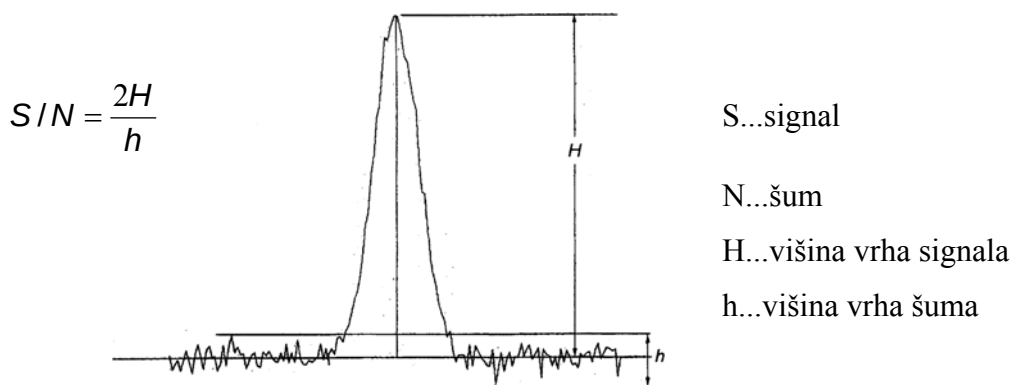


Figure 2.2.46.4.

SLIKA 5: Razmerje med signalom in šumom s pripadajočo formulo.

2. NAMEN DELA

Problematika ponarejanja zdravil v svetu, pa tudi pri nas, je čedalje bolj pereča: zlasti z razmahom uporabe medmrežja so postali mehanizmi distribucije globalni, oglaševanja preko elektronske pošte pa čedalje agresivnejša. Takšna zdravila, za katere ni potrjena varnost, učinkovitost in kakovost, niti niso podvržena ustrezni kontroli, so pogosto lahko zdravju škodljiva, hkrati tudi kršijo vsa pravila zaščite intelektualne lastnine.

V okviru diplome bomo preučili strategije oglaševanja, postopke naročanja in načine distribucije zdravil, ki naj bi vsebovala sildenafilijev citrat (Viagra®). »Viagro« smo izbrali zaradi njene popularnosti v družbi, množične ponudbe na internetnih prodajnih straneh ter zaradi prodornega vsiljevanja pripravkov s sildenafilijevim citratom preko elektronske pošte.

Preko internetnih strani, ki se oglašujejo preko elektronske pošte, bomo naročili različne vzorce pripravkov, ki naj bi vsebovali po 100 mg sildenafilila. Nakup vzorcev bomo omejili na ilegalno internetno prodajno mrežo, saj želimo preučiti način delovanja spletnih trgovcev oz. prodajalcev, ter ovrednotiti tveganje takšnega nakupa. Kot izhodišče za preučevanje ilegalne internetne prodaje zdravil na recept nam bosta služila Zakon o zdravilih in Pravilnik o oglaševanju zdravil in medicinskih pripomočkov.

Vzorci, ki jih bomo prejeli, bomo primerjali z edinim odobrenim zdravilom za zdravljenje erektilne disfunkcije, ki vsebuje sildenafilijev citrat, t.j. Viagro®. 100 mg tablete Viagre® nam bodo v nalogi služile tudi kot standard za kvantitativne analize.

Vzorcem bomo določili nekatere parametre kakovosti zdravil:

- razpadnost tablet,
- morebitno prisotnost težkih kovin,
- identifikacijo sildenafilijevega citrata,
- vsebnost učinkovine in enakomernost vsebnosti,
- prisotnost nečistot.

Uporabili bomo farmakopejske metode (Ph. Eur. 5 in USP 30), kadar so te navoljo. Za identifikacijo in določanje vsebnosti sildenafilila bomo optimizirali HPLC metodo ter jo validirali v skladu z ICH smernicami. Z isto metodo bomo preverili tudi prisotnost organskih nečistoč v vzorcih.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Reagenti in topila

- bidestilirana voda (FFA)
- H_2SO_4
- HNO_3
- H_2O_2 ; 30%,
- NH_3
- Tioacetamid
- Glicerol
- $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
- Acetonitril, HPLC kakovosti
- Amonijev acetat

Uporabili smo reagente in topila proizvajalcev Acros, Merck in Aldrich.

3.2. Aparature

- Aparatura za merjenje razpadnosti tablet (Erweka)
- pH meter (Meter Toledo MP 220)
- digitalna analitska tehtnica (Mettler Toledo AG245)
- UV spektrometer (Variom Cary 50)
- HPLC sistem Agilent 1100 Series z detektorjem z multiplimi valovnimi dolžinami (Multiple Wavelength Detector) in programsko opremo Agilent Chem Station 10

3.3. Metode

- **Razpadnost tablet**

Po Ph.Eur.5 morajo tablete ustrezati preizkusu razpadnosti (39). S testom razpadnosti dokažemo, da se tablete v tekočem mediju, pri določenih testnih pogojih in predpisani aparaturi, popolnoma dezintegrirajo. Filmsko obložene tablete se morajo popolnoma dezintegrirati v času 30 minut. Dezintegracija tablete je popolna, kadar se na testnem aparatu ne pojavijo zaostanki oz. kadar se ne pojavi očitna in čvrsta skorja na površini diska.

▪ **Test na težke kovine**

Test na težke kovine bomo izvajali po Ph.Eur. 5, po predpisu št. 2.4.8., po metodi F (39). Pripravili bomo raztopino vzorca, standardno referenčno raztopino svinčevega nitrata, kontrolno raztopino, ter raztopino slepe probe, ter primerjali barvo končnih raztopin. Test je neuspešen, če referenčna raztopina ne razvije rjave barve v primerjavi z barvo raztopine slepe probe ali če barva kontrolne raztopine ni primerljiva z barvo referenčne raztopine.

▪ **Identifikacija sildenafilu v vzorcih**

Identifikacijo učinkovine v zdravilnih pripravkih največkrat temelji na kromatografski ali spektroskopski metodi, s katero določamo vsebnost učinkovine v pripravku ali druge parametre (npr, hitrost raztapljanja). HPLC kromatografska metoda ni specifična, zato ICH smernice priporočajo kombinacijo kromatografske metode (ujemanje retencijskega časa učinkovine z retencijskim časom standarda učinkovine) s tehniko, ki temelji na drugih principih (35). Za identifikacijo sildenafilu bomo uporabili kriterij ujemanja retencijskega časa glavnega vrha z retencijskim časom standarda in ujemanje UV spektrov raztopin vzorcev z UV spektrom raztopine standarda.

▪ **Identifikacija citrata v vzorcih**

Identifikacijo citrata bomo izvajali po predpisu po USP 30 (40). Test je pozitiven, če se analitična raztopina ob segrevanju iz rumene spremeni v temno rdečo do vijolično barvo.

▪ **Vsebnost sildenafilu in enakomernost vsebnosti**

Vsebnost sildenafilijevega citrata v vzorcih bomo določevali s HPLC kvantitativno analizo z UV detekcijo. Predpisana vsebnost zdravilne učinkovine v tabletah je med 95 in 105% deklarirane količine. 100 mg tablete Viagra® morajo torej vsebovati od 95-105 mg sildenafilu v obliki sildenafilijevega citrata.

Enakomernost vsebnosti bomo določali s HPLC kvantitativno analizo. Za vsak vzorec bomo vzeli po 10 tablet in jim merili odziv. Za vsak izmerjen odziv bomo izračunali procent odstopanja od povprečne vrednosti. Test enakomernost vsebnosti po Ph.Eur.5 (poglavje 2.9.6.) predpisuje, da mora biti vsebnost zdravilne učinkovine vsake posamezne tablete med 85 in 115% povprečne vrednosti 10 tablet.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

Za eksperimentalno analizo smo želeli pridobiti referenčni standard sildenafilijev citrat, kar pa nam zaradi omejenih finančnih zmožnosti ter zapletenega in dolgotrajnega postopka za sponzorsko pridobitev od proizvajalca Pfizer-ja, ni uspelo. Kot eksterni standard smo uporabili tablete Viagra®, 100 mg.

4.1. Naročanje in nakup vzorcev

Pri naročanju in nakupu vzorcev smo izhajali iz nezaželjene elektronske pošte (SPAM-a), ki je oglaševala zdravila s sildenafilijevim citratom. Po pregledu oglasov, smo izbrali štiri različne internetne strani, kjer ponujajo različne izdelke. Omejili smo se na pripravke v obliki tablet, z označeno vsebnostjo 100 mg. Nakup smo morali omejiti na strani, kjer je bilo zagotovljeno mednarodno pošiljanje, saj so nekateri prodajalci omogočali pošiljanje le v ZDA. Oglase smo preučili iz stališča pravilnika o oglaševanju zdravil. Izbrane vzorce smo naročili preko internetnega obrazca za nakup. Plačilo smo opravili s kreditno kartico. Primerjavo vzorcev z Viagra® smo opravili po tem, ko so prispele vse pošiljke.

▪ **Viagra®**

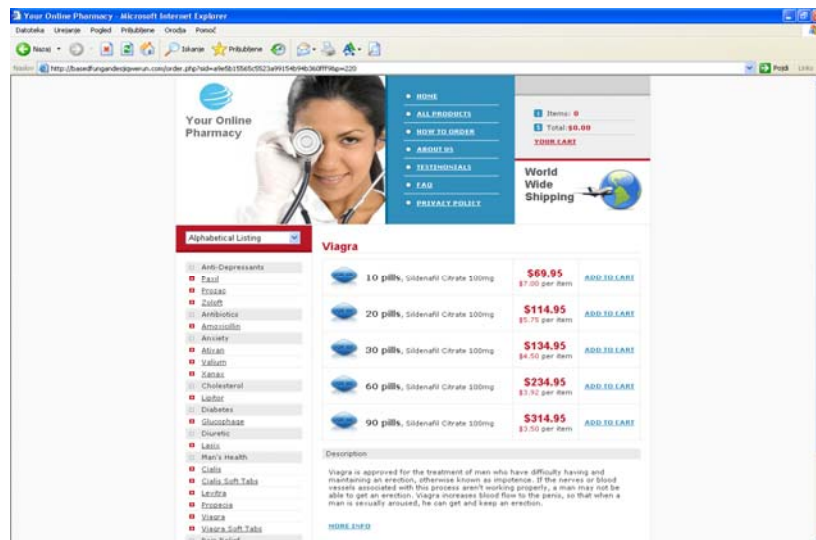
Tablete Viagre®, 100 mg, smo kupili v lekarni.

▪ **»Originalna Viagra«**

Elektronska SPAM pošta »Certified On-line Pharmacy nas je opozorila na internetno stran »Your On-line Pharmacy« na naslov <http://basedfungandesjiqwerun.com>«, preko katere smo izvedli nakup »Originalne Viagre« (slika 6). Cena 30-ih tablet je bila 143.95\$ (4.49\$ na tableto + 9\$ stroški pošiljanja).

► *Opis elektronskega SPAM oglasa*

Oglas je bil enostaven in kratek. Z zavajajočimi navedbami, da deluje spletna prodajalna s certifikatom, je ponujal različna zdravila za zdravljenje različnih bolezni in stanj po najugodnejših cenah (»best price«).



SLIKA 6: Ponudba različnih paketov tablet »originalne Viagre« (100 mg) na spletni strani »Your On-line Pharmacy«

► Opis internetne prodajne strani

Internetna stran je bila septembra 2007 dosegljiva na novem naslovu: <http://aztxobzipyijon.com/welcome.php?sid=9f4f1f5abe4eb5fd0911252ec9ec50ce&p=220>. Stran je po obliki spominjala na strani legalnih spletnih lekarn z zavajajočo sliko zdravnice na vsaki strani. Na straneh ni bilo naslova prodajalca oz. sedeža prodajalne. Za nakup ni bilo potrebno poslati recepta. Svetovanja z zdravnikom ali farmacevtom niso ponujali. Za nakup zdravila ni bilo treba izpolniti »on-line« obrazca o zdravstvenem stanju kupca. Na strani z informacijami o pripravku so priporočali, naj se zdravilo vzame od 1,5 do 4h pred spolnim odnosom, čeprav po 4h učinek Viagre® že preneha. Med znane stranske učinke Viagre® so prišteli še nezavest in zatekanje nog ter gležnjev. Kot potrditev o učinkovitosti izdelka navajajo osebna pričanja pacientov. Cene zdravil padajo s količino ponujenih tablet. Za pošiljko 10 tablet (100 mg) je cena 7\$ na tableto in za pošiljko 90 tablet (100 mg) 3.50\$ na tableto.

▪ »Generična Viagra«

Vzorec 30 tablet smo kupili preko internetne strani »ED choice« z naslovom <http://egopt.qrwvtwhwse23q8jd8qjd8q8.mowburned.com/?wkvglu> (slika 7). Z VISA kreditno kartico smo plačali 109.95 \$, kar pomeni 3,33 \$ na tableto in 10,05 \$ za stroške dostave.

ED CHOICE
YOUR BEST CHOICE FOR ED DRUGS

Shopping cart
\$99.95
View cart

BEST PRICE
\$1.78
ON THE NET

TODAY IN STOCK

- **Viagra - classic**
- Cialis - pro
- Levitra - exotic
- Viagra SOFT - ultra
- Cialis SOFT - absolute
- Generic Mix

GENERIC VIAGRA (SILDENAFIL)

Package	Per Pill	Price	BUY!
50mg x 10 pills	\$ 6.00	\$ 59.95	BUY!
50mg x 30 pills	\$ 3.00	\$ 89.95	BUY!
50mg x 60 pills	\$ 2.00	\$ 119.95	BUY!

VIAGRA
Sildenafil 50mg

Package	Per Pill	Price	BUY!
100mg x 10 pills	\$ 7.00	\$ 69.95	BUY!
100mg x 30 pills	\$ 3.33	\$ 99.95	BUY!
100mg x 60 pills	\$ 2.17	\$ 129.95	BUY!
100mg x 90 pills	\$ 1.78	\$ 159.95	BUY!

VIAGRA
Sildenafil 100mg

THANK YOU FOR VISITING OUR STORE!

We hope that you will find it to be a good source of qualitative generic medications.

All the medicines one can see in our product list are manufactured by the most respectable plants of India.

Please, see our [FAQ section](#) to get more details of the goods and services we render.

Viagra works by increasing blood flow to the penis. It is not a hormone or an

SLIKA 7: Internetna stran »ED choice« s ponudbo »Viagra – classics« oz. »generic Viagra (sildenafil)«.

► Opis internetne prodajne strani

Ista internetna stran je bila oktobra 2007 dosegljiva na novem spletnem naslovu <http://cashtabz.biz/product.php?item=Viagra>. Stran je spominjala na strani, ki oglašujejo zdravo življenje. Na straneh ni bilo naslova prodajalca oz. sedeža prodajalne. Za nakup ni bilo potrebno poslati recepta. Svetovanja z zdravnikom ali farmacevtom niso ponujali. Za nakup zdravila ni bilo treba izpolniti »on-line« obrazca o zdravstvenem stanju kupca. Za informacije o pripravku so namenili rubriko »FAQ« (»frequently asked questions« ali »pogosta vprašanja«). Na tej strani opozarjajo na možnost povišanja pritiska ali zastoj srca ter nevarnost hkratnega jemanja z amil nitrati, vendar le za moške starejše od 65 let. Na strani zasledimo med drugim navedbe kot npr: »Vsi naši pripravki so odobreni s strani

indijske FDA za izvoz«, »Dr. Myron Murdoch, klinični inštruktor urologije iz medicinske šole George Washington pravi, da ne moremo reči, da »Viagra« ne more pozdraviti ženske disfunkcije. Viagra lahko pomaga, toda ni za vse ženske...« ter »Soft tablete se raztopijo pod jezikom, kar vam dovoljuje, da lahko pred spolnim odnosom pijete alkohol in uživate mastno hrano, medtem ko je z jemanjem običajnih tablet pitje alkohola strogo odsvetovano.« Cene zdravil padajo s količino ponujenih tablet in se gibljejo od 7\$ na tableto za pošiljko 10 tablet do 1.78\$ za tableto pri pošiljki 90 tablet (za odmerke 100 mg). Če kupec ni zadovoljen z nakupom, obljublja prodajalec vračilo denarja.

▪ »Lovegra Tablets«

Nakup 20 tablet smo izvedli preko internetne strani »Pills2go.com«, na naslovu <http://pills2go.com>, z VISA kreditno kartico (slika 8). Plačali smo 72.34 EUR, kar je 2,98 EUR na tableto in 12.68 EUR za stroške dostave, s tem, da se je cena tablet med izvajanjem postopka plačila zvišala iz 40 EUR na 59.66 EUR.



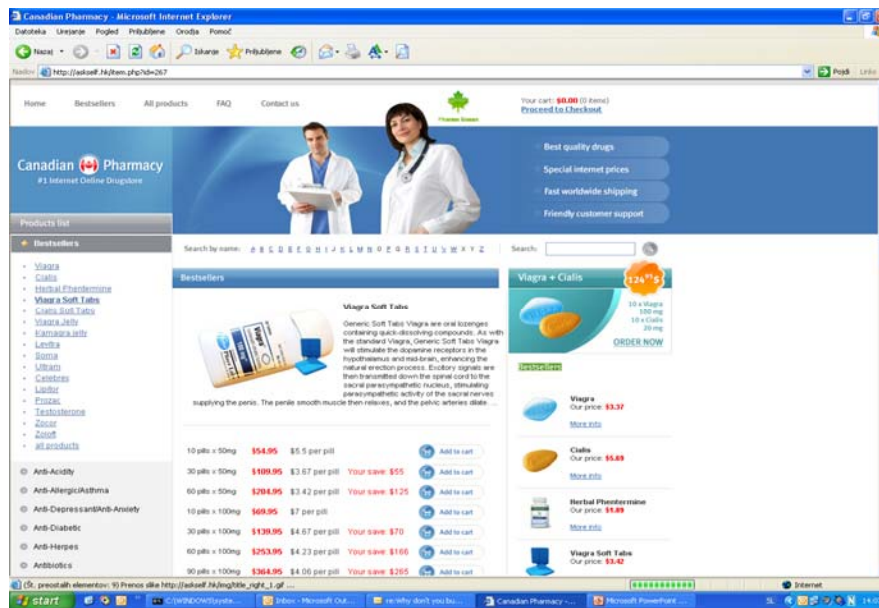
SLIKA 8: Internetna stran »Pills2go« s ponudbo »Lovegra«.

► **Opis internetne prodajne strani**

Stran ponuja tablete »Lovegra«, ki vsebujejo sildenafilijev citrat in so namenjene ženskam. (!!!) Internetna stran je oktobra 2007 še vedno dosegljiva na istem spletnem naslovu: <http://pills2go.com>. Stran je podobna stranem legalnih spletnih lekarn. Na straneh ni naslova prodajalca oz. sedeža prodajalne. Na strani ponujajo nakup originalne modre tablete z imenom »Kamagra«, oralni gel »Kamagra Oral Jelly«, ter »Soft tabs« s hitrim sproščanjem (delovati naj bi začele že po 15 minutah). Poleg pripravkov s sildenafilijevim citratom ponujajo še pripravke s tadalafilom, pripravke za hujšanje in seksualne pripomočke. Za nakup ni bilo potrebno poslati recepta. Svetovanja z zdravnikom ali farmacevtom niso ponujali. Za nakup zdravila ni bilo treba izpolniti »on-line« obrazca o zdravstvenem stanju kupca. Na strani ni nikjer navedeno, da sildenafilijev citrat kot učinkovina ni bil odobren za zdravljenje žensk. Trdijo, da je vedno več specialistov, ki predpisujejo sildenafilijev citrat ženskam, saj pride ob jemanju zdravila do povečanega pretoka krvi in občutljivosti v področju vagine ter da učinkovina izboljša naravno lubrikacijo in poveča stopnjo uspeha med spolnim odnosom. Zdravilo naj bi pomagalo odpravljati simptome ženske seksualne disfunkcije, ne glede na to ali je vzrok fiziološke ali pa psihološke narave. Na strani z informacijami o pripravku ni navedenih stranskih učinkov. Opozarjajo le na hkratno jemanje zdravil, ki bazirajo na nitratih, zdravil, ki vsebujejo inhibitorje mikrosomalnih encimov, ter zdravil za visok pritisk. Cene zdravil padajo s količino ponujenih tablet in se gibljejo od 2,3 \$ na tableto za pošiljko 4 tablet do 1, 1 \$ za tableto pri pošiljki 200 tablet (za odmerke 100 mg). Če kupec ni zadovoljen z nakupom, obljublja prodajalec vračilo denarja, a le v primeru, ko je bila uporabljena le 1 tableta.

▪ **»Viagra Soft tablete«**

Preko elektronskega oglasa z naslovom »Special Pharmacy Discount«, smo na naslovu <http://askself.hk> dobili povezavo z internetno stranjo »Canadian Pharmacy« (slika 9). Preko te smo z VISA kreditno kartico izvedli nakup 30 tablet »Viagra Soft Tabs«, za 149.95 \$ (4.66 \$ na tableto + 10 \$ stroški dostave). Ob pošiljanju smo zastonj prejeli še 4 običajne tablete »Viagre«.



SLIKA 9: Spletna stran »Canadian Pharmacy« s ponudbo »Viagra Soft Tabs«.

► Opis internetne prodajne strani

Ista internetna stran je bila oktobra 2007 dosegljiva na novem spletnem naslovu: <http://www.canadianpharmacyltd.com/?aid=1503>. Podobna je stranem legalih online lekarn. Na strani izkoriščajo dejstvo, da je v Kanadi preko »online« lekarn prodaja Viagre® dovoljena. Ob imenu spletne prodajalne, »Canadian Pharmacy«, se nahaja javorjev list, državni simbol Kanade. Na eni od podstrani so prikazani simboli organizacij, ki naj bi njihovo »online« lekarno odobrile (slika 10). Pod certifikati so:



SLIKA 10: Lažni simboli ilegalne internetne strani Canadian Pharmacy

VeriSign je organizacija, ki kupcu zagotavlja zaupanje v internetno stran, vendar se njen logo razlikuje od prikazanega. ADA spominja na FDA, logo CIDARx je enak logu organizacije CIPA, medtem ko organizacija Pharma Checker.com sploh ne obstaja. Na straneh ni bilo naslova prodajalca oz. sedeža prodajalne. Za nakup je bilo potrebno izpolniti online obrazec o zdravstvenem stanju kupca (slika 11).

Medical Questionary

Please, enter this information in order to help us exclude any delays in your order processing:

- Gender: ☐ Male ☐ Female
- Date of Birth: 1 January (year)
- Weight: lbs ☐ kgs
- Height: 4'9"
- Could you confirm what orders have you received from our pharmacy?
- Please list any current medical conditions:
- Please list any prescription, herbal or over the counter medications you are currently taking:
- Please list any prescription, herbal or over the counter medications you plan to take while on this program:
- Please list all allergies (including medications):
- Please list all surgeries:
- Is there anything else in your medical history you deem relevant:

Additional questions on the right side of the form:

- Please list any prescription, herbal or over the counter medications you are currently taking:
- Please list any prescription, herbal or over the counter medications you plan to take while on this program:
- Please list all allergies (including medications):
- Please list all surgeries:
- Is there anything else in your medical history you deem relevant:
- Do you have any of the following conditions: Leukemia, Multiple Myeloma, Sickle Cell Disease, Peptic Ulcers, or Retin's pigmentosa? ☐ No ☐ Yes
- Do you take any form of nitroglycerine? ☐ No ☐ Yes
- Have you previously been treated for sexual dysfunction? ☐ No ☐ Yes

SUBMIT ORDER

Processing may take a moment or two. Please click only once and be patient.

SLIKI 11: E-obrazec o zdravstvenem stanju kupca.

Na strani svetujejo, naj kupec zaužije zdravilo 10-20 minut pred spolnim odnosom 1x na dan (v primeru hkratnega jemanja ritonavira pa le 1x na 2 dni). Po navedbah na strani naj bi tako kot »Viagra«, tudi »Soft« tablete stimulirale dopaminske receptorje v hipotalamusu in srednjih možganih, kar naj bi izboljšalo naravno erekcijo (!!!). Svetujejo, naj kupec v primeru, ko pozabi vzeti odmerek »Viagre«, le to vzame takoj, ko se spomni, razen če je že skoraj čas za naslednji odmerek. Na strani z informacijami o stranskih učinkih najdemo razen klinično potrjenih še zatekanje nog in gležnjev, zapiranje sape in angino. Opozarjajo na nevarnost povišanja pritiska, zastoj srca, podaljšanja časa erekcije ter nevarnost hkratnega jemanja z amil nitrati. Cene zdravil padajo s količino tablet in se gibljejo od 5,5 \$ na tableto za pošiljko 10 tablet do 4,05 \$ za tableto pri pošiljki 90 tablet (za odmerke 100 mg).

4.2. Razpadnost tablet

Test razpadnosti tablet smo izvajali po Ph.Eur. 5, po predpisu št. 2.9.1. (39). V cevke predpisane aparature smo posamično vstavili tablete in jih prekrili z diski. Kot medij smo uporabili vodo. Izvajali smo test A, pri katerem je bila stalna temperatura med 35 in 39° C. Naprava s cevkami, v katerih so bile tablete se je dvigovala in spuščala z 32 dvigi na minuto, tako da so bile tablete z diski ves čas potopljene v vodi.

Predpisan poskus smo izvajali z Viagra®, ter z vsakim vzorcem posebej in opazovali razpadanje tablet ter izmerili čas popolne dezintegracije.

4.3. Test na težke kovine

Test na težke kovine smo izvajali po predpisu 2.4.8. v Ph.Eur. 5 metodi F, z vzorcem »generične Viagra« (39).

Pripravili smo raztopino vzorca, standardno referenčno raztopino svinca, kontrolno raztopino, ter raztopino slepe probe. Vse raztopine so bile pripravljene po enakem postopku. Barvo končnih raztopin smo iz ptičje perspektive primerjali v 50 ml epruветah na beli podlagi.

➤ Priprava raztopine vzorca (1)

Stehtali smo 2 tableti »generične Viagre« in ju uprašili v terilnici. V 100 ml Kjeldahlovo bučko smo odmerili 250 mg uprašenega vzorca in jo vpeli pod kotom 45°. V bučko smo postopoma dodajali zmes 8 ml H₂SO₄ in 10 ml HNO₃ in postopoma segrevali, dokler v reakcijski zmesi niso prenehali nastajati mehurčki. Po dodatku celotne količine zmesi kislin in segrevanju je raztopina potemnela. Ohladili smo jo, dodali še 2 ml HNO₃ in segreli. Ko ni več prišlo do potemnitve, smo segrevali do nastanka belih, gostih plinov. Bučko smo ohladili in previdno dodali 5 ml vode ter ponovno segrevali ob vrenju, dokler se volumen tekočine ni zmanjšal na 2-3 ml. Bučko smo ohladili in dodali 5 ml vode. Pojavila se je rumena barva, zato smo počasi dodali 1 ml 30% H₂O₂, zavreli in ponovno zmanjšali volumen na 2-3 ml. Analit smo ohladili, razredčili z vodo ter mu postopoma dodali koncentrirano raztopino amonijaka do pH 3,5. Raztopino smo prenesli v epruveto za primerjavo vzorcev in jo razredčili z vodo na 40 ml. Dodali smo 2 ml pufrske raztopine s

pH 3,5 (raztopina $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ in HCl) in 1,2 ml sveže pripravljenega tiocetamidnega reagenta. Takoj smo premešali, razredčili z vodo na 50 ml in spet premešali.

Priprava tioacetamidnega reagenta: 400 mg tioacetamida smo raztopili v 10 ml vode. 0,2 ml raztopine smo dodali v zmes 15 ml 1 M NaOH, 5 ml vode in 20 ml glicerola ter segrevali 20 sekund.

➤ *Priprava standardne referenčne raztopine svinca (2)*

400 mg $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ smo raztopili v 250 ml vode (0.1 % raztopina Pb) in redčili 1ml/500 ml, da smo dobili 2 ppm raztopino. V Kjeldahlovo bučko smo odmerili 1,25 ml pripravljene raztopine in referenčno raztopino pripravili po istem postopku kot raztopino vzorca. Mejna koncentracija svinca je ustrezala 10 ppm Pb.

➤ *Priprava kontrolne raztopine (3)*

Raztopino smo pripravili istočasno in po istem postopku kot raztopino vzorca, tako da smo vzorcu dodali še 1,25 ml 2 ppm raztopine svinčevega nitrata.

➤ *Priprava raztopine slepe probe (4)*

Raztopino smo pripravili istočasno in po istem postopku kot raztopino vzorca, brez vzorca in brez raztopine svinčevega nitrata.

4.4. Identifikacija sildenafil

Identifikacijo sildenafil v vzorcih smo izvedli s primerjavo retencijskih časov (t_R) vrha učinkovine pri HPLC analizi z UV detekcijo (poglavje 4.6.). Kromatograme vzorcev smo primerjali s kromatogrami standarda ter posneli kromatograme zmesi vzorcev in standarda. Dokaze identifikacije smo podprli s primerjavo UV spektrov raztopin vzorcev in standarda, ki smo jih posneli v območju med 200 – 400 nm.

➤ *Priprava raztopin s koncentracijo 60 $\mu\text{g/ml}$ (5) za določanje t_R na HPLC koloni*

1 tableti Viagre® (100 mg) smo v 100 ml bučki dodali zmes acetonitrila in vode (50:50, v/v), mešali 20 minut in dopolnili do oznake. Iz začetne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml smo odvzeli 3 ml in jih redčili z isto zmesjo acetonitrila in vode (50:50, v/v) na 50 ml. Po istem postopku smo pripravili tudi raztopine vzorcev.

➤ *Priprava raztopin s koncentracijo 12 µg/ml (6) za UV spektrometrijo*

Raztopinam s koncentracijo 60 µg/ml (5) smo odvzeli 2 ml in jih redčili s topilom na 10 ml (končna koncentracija 12 µg/ml). Pred snemanjem spektrov smo vzorce filtrirali skozi 4,5 µm filter.

4.5. Identifikacija citrata

Identifikacijo citrata smo izvajali po predpisu za identifikacijo citrata po USP 30 (poglavje 191). Po 1 tableto Viagra® in vsakega od vzorcev smo uprašili v terilnici in jim dodali 2 ml destilirane vode. Nato smo dodali 15 ml piridina in 5 ml acetanhidrida. Po pojavu obarvanja smo vzorce segreli in opazovali spremembe.

4.6. Vsebnost in enakomernost vsebnosti sildenafil

Za določanje vsebnosti in enakomernosti vsebnosti smo uporabili HPLC analizno metodo z UV detekcijo. Metodo smo najprej optimizirali in validirali. Za optimizacijo analizne HPLC metode smo posneli kromatograme raztopine 7. Glede na retencijski čas in obliko vrha smo spreminjali mobilno fazo in kolono. Za optimizacijo analizne metode smo preizkusili dve različni mobilni fazi: s pufrom in brez (8). Mobilni fazi s pufrom (9) smo spreminjali volumsko razmerje komponent. Optimalno valovno dolžino smo izbirali med dolžinami 220, 245, 254 in 290, ki smo jih izbrali glede na predhodno objavljene metode (poglavje 1.4.).

➤ *Priprava raztopine standarda s koncentracijo 100 µg/ml za optimizacijo analizne metode (7)*

1 tableti Viagra® (100mg) smo v 100 ml bučki dodali zmes acetonitrila in vode (50:50, v/v), mešali 20 minut in dopolnili do oznake (36). 5 ml začetne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml smo odpipetirali v 50 ml bučko in jo z zmesjo acetonitrila in vode dopolnili do oznake.

➤ *Mobilna faza brez pufra (8)*

Acetonitril in vodo smo pripravili v dve ločeni steklenici. HPLC sistem je zajemal zmes z volumskim razmerjem 50:50.

➤ *Priprava mobilne faze s pufrom (9)*

Zatehtali smo 7.708 g amonijevega acetata, ga raztopili v bidestilirani vodi in dopolnili do 500 ml (0,2 M). pH raztopine smo z dodajanjem očetne kisline ali amonijaka umerili na pH 7,0 in filtrirali skozi 0,45 µm filter s pomočjo vodne črpalke. Za optimizacijo HPLC metode smo posneli kromatograme z različnimi volumskimi razmerji med pufrom in acetonitrilom. Delež organske faze smo variirali med 45 in 60 odstotki. Vse metode so bile izokratske.

▪ **Validacija analizne metode**

▶ Za preverjanje *selektivnosti* smo primerjali raztopine slepih vzorcev (zmes acetonitrila in vode; 50:50, v/v) (**10**) in raztopine standarda (**7**). Primerjali smo tudi kromatograme, posnete z različno sestavo mobilne faze, in kromatograme, posnete z različno valovno dolžino detekcije.

▶ Za preverjanje *linearnosti in območja* metode smo analizirali serijo 10 različnih koncentracij raztopine standarda sildenafilila (**11**) v območju od 100 do 0,01 µg/ml. Vsako koncentracijo smo injicirali trikrat. Iz povprečnih odzivov (AUC) smo izdelali regresijsko premico po metodi najmanjše razlike kvadratov ter izračunali kvadrat koeficienta korelacije (r^2). Kot spodnjo mejo sprejemljivosti za umeritveno krivuljo smo določili, naj bo kvadrat koeficienta korelacije $r^2 \geq 0,99$.

➤ *Priprava serije standardnih raztopin sildenafilila (11) za vrednotenje linearnosti in določitve območja analizne metode*

1 tableti Viagre® (100mg) smo v 100 ml bučki dodali zmes acetonitrila in vode (50:50, v/v), mešali 20 minut in dopolnili do oznake. Iz začetne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml smo pripravili serijo 10 raztopin z različnimi koncentracijami v območju od 100 do 0,1 µg/ml. Raztopine smo redčili zmeraj z isto zmesjo acetonitrila in vode (50:50, v/v). V tabeli I je prikazan postopek redčenja raztopin.

TABELA I: Postopek redčenja

št. analita	koncentracija sildenafil (µg/ml)	V predhodnje razt. za redčenje (ml)	končni V redčenja (ml)
1	100		100
2	50	25	50
3	20	10	25
4	10	10	20
5	5	10	20
6	2	10	25
7	1	10	20
8	0,5	10	20
9	0,2	10	25
10	0,1	10	20

► Za preverjanje *natančnosti* (ponovljivost) smo desetkrat zaporedoma injicirali raztopino standarda s koncentracijo 60 µg/ml (**12**) in primerjali skladanja odzivov. Rezultat smo podali kot relativno standardno deviacijo (RSD), ki smo jo izračunali iz enačb 1 in 2.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad RSD \% = \frac{100}{\bar{x}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

ENACBA 1

ENACBA 2

—

x : srednja vrednost odzivov

x_i : odziv (AUC)

n: število meritev

➤ Priprava standardnih raztopin sildenafil za analizo natančnosti (**12**)

1 tableti Viagre® (100mg) smo v 100 ml bučki dodali zmes acetonitrila in vode (50:50, v/v), mešali 20 minut in dopolnili do oznake. Iz začetne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml, smo odvzeli 3 ml in jih redčili z isto zmesjo acetonitrila in vode (50:50, v/v) na 50 ml.

► *Mejo zaznavnosti (LOD) in mejo kvantifikacije (LOQ)* smo določili iz razmerij med signalom in šumom v kromatogramih standardov nizkih koncentracij. Za mejo zaznavnosti je to razmerje znašalo vsaj 3, za mejo kvantifikacije pa 10.

▪ **Kvantitativna analiza vzorcev**

Koncentracije posameznih raztopin vzorcev smo določali s primerjavo odzivov vzorcev z odzivom standarda z znano (podobno) koncentracijo po enačbi 5:

$$C_{vz} = C_{st} \frac{AUC_{vz}}{AUC_{st}}$$

EN AČBA 5

C_{vz}koncentracija vzorca, AUC_{vz} ...površina pod krivuljo za vzorec

C_{st} koncentracija standarda, AUC_{st} ... površina pod krivuljo za standard

Za analizo enakomernosti vsebnosti smo za vsak vzorec izračunali tudi procent odstopanja od povprečne vrednosti odzivov vzorcev enakih tablet.

➤ *Priprava raztopin vzorcev za kvantitativno analizo vzorcev (13).*

Raztopine vzorcev smo pripravljali po istem postopku kot raztopino standarda (5). Za vsak vzorec tablet smo vzeli po 10 tablet in pripravili 10 vzorcev enakih koncentracij (~ 60 µg/ml) ter jim izmerili odziv.

4.7. Prisotnost organskih nečistot / sorodnih snovi

V HPLC kromatogramih posameznih vzorcev smo preverili, ali so poleg vrha, ki pripada sildenafilu, prisotni tudi drugi vrhi, ki pa niso prisotni v kromatogramu samega topila (slepega vzorca). Vkolikor so bili ti prisotni, smo njihovo površino pod krivuljo primerjali s površino pod krivuljo sildenafilu. Za preverjanje prisotnosti nečistot smo uporabili bolj koncentrirane vzorce, in sicer s koncentracijo sildenafilu približno 1000 µg/ml.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Primerjava vzorcev

- standard: tablete **Viagra®**, 100 mg, Pfizer
- vzorec 1: tablete »**Originalna Viagra**«, 100 mg; na sliki modra tableta z zarezo v obliki diamanta
- vzorec 2: tablete »**generična Viagra**«, 100 mg; na sliki modra tableta v obliki nizkega valja
- vzorec 3: tablete »**Lovegra Tablets**«, 100 mg, (*»Viagra za ženske«*) na sliki roza tableta v obliki diamanta
- vzorec 4: tablete »**Viagra Soft Tabs**«, 100 mg; na sliki bela tableta v obliki diamanta



SLIKA 12: Primerjava vzorcev s tableto Viagre®, ki je nameščena v sredini.

▪ »Originalna Viagra«



SLIKA 13: Posamezne tablete (levo), tablete v primarni obojnini (desno), pisemska pošiljka vzorca z navodilom za uporabnika.

- **Opis pošiljke:** Pošiljka je prispela s pošto na dani naslov v 30 dneh od naročila. Tablete so se nahajale v navadni pisemski pošiljki. Pošiljka je imela znamko iz Indije in pošti žig New York-a. Tablete so bile v neoznačeni plastični foliji. Sekundarne in terciarne obojnine ni bilo.
- **Opis navodila za uporabo:** Navodilo je kopija originalnega navodila za Viagra®, kjer manjkata informaciji o shranjevanju in predoziranju.
- **Opis tablet:** 30 filmsko obloženih modrih tablet, z nekoliko prirejeno obliko zaobljenega diamanta, nekoliko manjše od originalnih, izbočene, gladke in zloščene površine, z razdelilno zarezo za prepolovitev tablete. Simbolov in oznak ni imela. Ena od tablet je bila prelomljena. Tablete niso imele primarne obojnine in niso ustrezale sliki pripravka na internetni prodajni strani (primerjaj s sliko 6).

▪ »Generična Viagra«

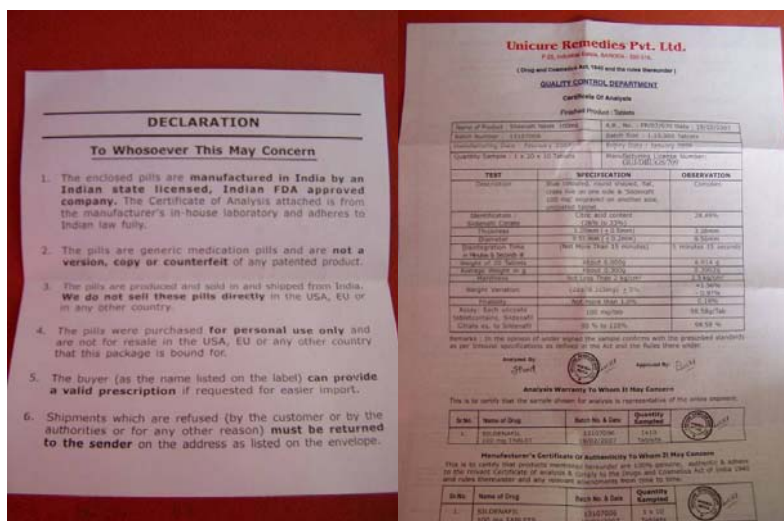


SLIKA 14: Posamezni tableti (levo), tablete v primarni ovojnini (na sredini) in pisemska pošiljka vzorca (desno).

► **Opis pošiljke:** Pisemska pošiljka je prišla iz Indije. Na ovojnici so ime, naslov in telefonska številka kupca napisani z roko, na zadnji strani ovojnice je žig trgovine »SCORIA INCORPORATION«, z naslovom.

► **Opis tablet:** 30 neobloženih modrih tablet v obliki nizkega valja z ravno, negladko in nezloščeno površino in prirezanih robov, z razdelilno zarezo za prelom tablete na četrtinke. Na eni strani imajo odtisnjen napis »sildenafil, 100 mg«. Primarna ovojnina tablet je v neoznačen pretisni ovoj v pakiranju 3 x po 10 tablet. Pretisni ovoji, ki so se nahajali v beli ovojnici, so bil s sponko speti na bel papirček. Sekundarne ovojnine ni bilo.

► **Opis navodila za uporabo:** Navodila za uporabo ni bilo. Namesto tega se je v ovojnici nahajala »deklaracija«, ki navaja, da so tablete odobrene s strani indijske FDA (!!!), proizvedene v Indiji in da imajo dovoljene države Indije. Navajajo, da tablete niso različica, kopija ali ponaredek originalnega proizvoda. Pod 3. točko navajajo, da tablet v ZDA, EU ali drugih državah ne prodajajo neposredno. Navedeno je, da lahko kupec, če želi dobi veljaven recept. Če kupec tablete zavrne, jih mora poslati na naslov, ki je na zadnji strani ovojnice.



SLIKA 15: Priloženi deklaracija (levo) in certifikat (desno).

Priložen je še »certifikat« laboratorijske analize tablet, ki v deklaraciji zagotavlja, da se drži indijskih zakonov. Certifikat je razdeljen na del s podatki o proizvodnji in lastnostih tablet ter na del z žigi in podpisi odgovornih oseb. Na drugi strani je v zgornjem delu nagovor kupcu in v spodnjem navodilo za uporabo. Certifikat navaja podatke o debelini in premeru tablet, času razpadnosti, masi 20 tablet, povprečni masi, trdoti, vsebnosti sildenafilila, variaciji mase. Specifikacija za te tablete ne obstaja.

Tablete, ki jih imenujejo »sildenafil citrat tablets« so opisane kot tablete v obliki zaobljenega diamanta, ki imajo na eni strani odtisnjeno številko 100 mg in so na drugi strani neodtisnjene, kar ne ustreza njihovemu proizvodu. Navaja, da so tablete nova generacija zdravil za primerno stimulacijo spolnega odnosa in sproščanje žil v penisu ter da pomagajo pri erekciji.

▪ »Lovegra Tablets«



SLIKA 16: Tablete »Lovegra« (levo), primarna ovojnina tablet »Lovegra« (na sredini) in pošiljka »Lovegre« (desno).

► **Opis pošiljke:** Ovojnica z mehurčki je bila poslana iz Velike Britanije z letalsko pošto, na zadnji strani je nalepka z označeno vrednostjo pošiljke »10 funtov« in z opisom »neobičajna pošiljka«. Sekundarne ovojnine in navodila za uporabo ni.

► **Opis tablet:** 20 filmsko obloženih tablet v obliki zaobljenega diamanta, roza barve, nekoliko večje od originalnih, s prirezanim robom ter izbočeno, gladko in zloščeno površino. Na eni strani imajo odtisnjeno številko »100« in na drugi odtisnjen znak neznanega pomena. Primarna ovojnina je pakiranje 5 x 4-ih tablet in je kopija originalne primarne ovojnine Viagra®. Na spodnji strani ima odtisnjen napisom »LOVEGRA, sildenafil, 100 mg, tablets«.

Navodilo za uporabo pošiljki ni bilo priloženo.

▪ »Viagra Soft Tabs«



SLIKA 17: Tablete »Viagre Soft« (levo) in pošiljka (desno).

► **Opis pošiljke:** Pošiljka je prispela iz Indije. Na njej je bil žig »B.G. Enterprise« z naslovom, ki ga zaradi slabe kakovosti ni bilo mogoče razbrati. Pošiljka je bila zasežena na carinski pošti, zaradi sumljive vsebine. Sekundarne ovojnine in navodila za uporabo ni. Tablete so bile zavite v časopisni papir in so se nahajale v večji pisemski pošiljki. Pošiljki so bile priložene 4 brezplačne tablete, ki jih je isti prodajalec prodajal kot »originalno Viagra«.

► **Opis tablet :** 30 belih neobloženih tablet v obliki romba, nekoliko večjih od originalnih, s prirezanim robom ter izbočeno, negladko in nezloščeno površino. Na eni strani imajo odtisnjeno številko »100«. Tablete so se krušile in so imele vonj po mentolu. Primarna ovojna je bila pretisni ovoj nenavadne oblike, pakiranje 3 x 10. Navodilo za uporabo pošiljki ni bilo priloženo.

Razprava

► *Internetne prodajne strani*

Dostop do ilegalnih spletnih prodajal z zdravili je bil lahek in hiter. Spletne strani so s časom spreminjale svoj spletni naslov. Tako jih je bilo po enem mesecu težko odkriti. S tem načinom se prodajalci izognejo izsleditvi regulatornih organov. V primeru, da regulatorne organizacije njihov naslov uvrstijo na seznam nedovoljenih in nevarnih spletnih strani, je njihova skrb, da jih kupci ne bodo več obiskali, odveč. Očitno regulatorni organi niso učinkoviti, saj se prodajalci ne potrudijo niti toliko, da bi spremenili vsaj obliko ali ime spletne strani. Ista ostaja tudi ponudba zdravil.

Sama ponudba prikazuje podrejenost trgu oz. povpraševanju. Največ ponujenih zdravil je iz skupine »lifestyle« zdravila, kot so pripravki za hujšanje, pripravki za večno mladost, zdravila za dobro počutje in pripravki za izboljšanje spolnega življenja. Zdravila, ki jih ponujajo, so iz skupine zeliščnih pripravkov, iz skupine OTC, iz skupine zdravil na recept in celo iz skupine zdravil z neodobrenimi učinkovinami.

Ob tako različni ponudbi vseh vrst pripravkov na ilegalnih spletnih straneh je bil izbor vzorcev s sildenafilijevim citratom z zastavljenim ciljem netežaven. Nakup vseh različnih oblik zdravila bi bil mogoč na eni sami spletni strani ilegalne »online« lekarne. Vzorce smo izbirali na različnih straneh zaradi primerjanja samih strani in kakovosti zdravil različnih ponudnikov. Strani so poleg zdravil s sildenafilijevim citratom ponujale tudi pripravke s tadalafilom ali verdanafilom, zeliščne naravne pripravke, afrodiziake in spolne pripomočke. Večina ilegalnih »online« lekarn ne postavlja meje med pornografijo, erotiko

in zdravjem. Zdravila so tako kot pornografske videokasete le še prodajni artikel. Z zdravili kupčujejo brez zadržkov. Za nakup vzorcev je bila razen v enem primeru potrebna le kreditna kartica. Na eni sami spletni strani smo morali skozi postopek izpolnjevanja obrazca o zdravstvenem stanju kupca. Svetovanja s strani zdravnika, farmacevta ali prodajalca nismo bili deležni. Kljub temu, da je Viagra®, edino odobreno zdravilo s sildenafilijevim citratom, možno dobiti le na recept, nas zanj ni nihče spraševal. Informiranje kupcev o zdravilu je možno na prodajnih spletnih podstraneh. Informacije so skope, nepravilne, zavajajoče, nepopolne ali za to zdravilo popolnoma neustrezne.

Nikjer ne zasledimo opozorila za bolnike z diabetesom ali za bolnike z ledvično okvaro. To je zaskrbljujoče tudi zaradi dejstva, da nekatere tablete prispejo neoznačene in brez navodila za uporabo.

Iz teh strani je mogoče razbrati popolno pomankanje strokovnega znanja in pomanjkanje zavednosti o nevarnosti jemanja zdravil. Verjetnost, da je prodajalec popolnoma brezbržen do škode, ki jo povzroča kupcu, je velika, saj je dokazano, da so spletni ilegalni prodajalci zdravil povezani s kriminalom. Informacije na spletnih straneh služijo večinoma le zavajanju kupca, ki zaradi podobnosti z obliko informacij o odobrenih zdravilih, verjame, da kupuje varno. Zavajanje zajema še podobnost v obliki samih spletnih strani, kjer se nahajajo fotografije zdravnikov, simboli in certifikati raznih zaupanja vrednih organizacij, bela barva, ki spominja na lekarniško oz. zdravniško okolje, ter očiščena podoba strani brez nepotrebnih okrasov. Obliki sami laični kupec popolnoma verjame, saj je z ničemer ne more ločiti od legalnih strani spletnih lekarn.

► *Nakup in dostava ilegalnih zdravil*

Cena ilegalnih pripravkov je vsekakor najprepričljivejši razlog, zaradi katerega se kupci odločajo za nakup preko interneta. Cene kupljenih vzorcev so bile v vseh primerih precej nižje od cene Viagre®. Zaradi večjih količin smo dobili še popust. Stroški pošiljanja so bili nizki. Pošiljke so bile transportirane v ovojnicah, ki niso predstavljale za tablete nobene zaščite. Primarna ovojnina je bila v nekaterih primerih na videz ustrezna, v nekaterih primerih je močno spominjala oz. kopirala originalno ovojnino Viagre® (pri »Lovegri«). Pri odobrenih zdravilih morejo imeti vsa zdravila primerno označeno sekundarno ovojnino, ki je med kupljenimi vzorci ni bilo. Prav tako nikjer ni bil označen rok uporabe ali način shranjevanja. Neodgovornost pošiljatelja je očitna, saj izpostavlja kupca njegovi nevednosti in zmanjša varnost jemanja zdravila. Informacij o proizvajalcu ne izvemo

nikjer. V nobenem od primerov ovojnina ni bila primerna za transport. Pošiljke vzorčnih tablet niso bile označene kot zdravilo. Eden od vzorcev je bil zasežen na carinski pošti v Ljubljani, zaradi neplačanega DDV-ja. Po izjavah carinika bi nam le-ta zdravila izročil, če bi mu pokazali plačan račun in recept zanje. Ob izpraševanju carinika na carinski pošti v Ljubljani smo prišli do ugotovitve, da v primeru pošiljk z zdravili carina ne povzema ustreznih ukrepov in ne služi svojemu namenu. Prav tako ne pripomore k zmanjšanju pretoka pošiljk z ilegalnimi zdravili, saj za to nima ustreznih pristojnosti. V primerih, ko zdravila odkrijejo, cariniki ne znajo ustrezno ukrepati, saj so zakoni glede tega nejasni in nepopolni.

Pošiljke vzorcev so prišle v 3 primerih iz Indije in v 1 primeru iz Velike Britanije. Slednja pošiljka ni bila izpostavljena carinskemu postopku, saj je prišla iz države znotraj EU. Za prodajalca bi bilo najlažje, da bi zdravila poslal iz države, kjer so bila proizvedena. Znano pa je, da deluje ilegalna trgovina z zdravili preko številnih posrednikov, ker jih je tako težje odkriti. Ime ali naslov pošiljatelja je bil napisan na pisemski ovojnici v dveh primerih. V enem od primerov so naslov napisali zato, da bi kupec tablete lahko vrnil, če z njimi ne bi bil zadovoljen. »Scoria Incorporation« je indijska družba, ki na svoji internetni strani ponuja zdravstvene pripomočke kot so injekcije, katertri, hemofiltrir in podobno. Povezave z vzorcem »Viagra-classics« ne moremo odkriti. Pod imenom »B.G. Enterprise«, ki se je nahajalo na pisemski ovojnici vzorca »Viagra Soft«, smo na internetu odkrili le ameriško modno agencijo. Domnevamo, da so imena in naslovi lažni. Možnost kraje dobro zvenečih imen daje vtis, da pošiljke nimajo neobičajne vsebine.

► *Ponarejene tablete s sildenafilijevim citratom*

Vsi vzorci so se nahajali v pisemskih pošiljkah, neprimerno zaščiteni za transport, kar pričajo tudi vidne poškodbe tablet. Navodilo za uporabo v 3 primerih ni bilo priloženo. V enem primeru je bilo navodilo kopija navodila za Viagra® z okrnjenimi informacijami. Primarna ovojnina tablet ni bila označena. Kupci v 3 primerih ne dobijo niti osnovnih informacij o tabletah.

Vsi kupljeni vzorci so ponaredki. Nobeden niti na videz ne ustreza originalni Viagri®. Nekatere tablete se od tablet Viagre® močno razlikujejo, kar privede do suma na vsebnost neprimernih sestavin in neprimeren način izdelave. Barva tablet kaže na to, da uporabljajo proizvajalci druga barvila in druge postopke kot pri proizvodnji originalnih tablet.

Tablete so neprimerne za prodajo in uporabo.

5.2. Test razpadnosti tablet

Vse tablete so se popolnoma dezintegrirale v predpisanem času znotraj 30 minut. Na površini diska se nikjer ni pojavila očitna in čvrsta skorja. Na testnem aparatu ni bilo zaostankov pri nobenemu od vzorcev. Opazili smo razliko v času popolnega razpada med različnimi vzorci.

Rezultati:

TABELA II: prikaz časa razpadnosti za posamezne vzorce

Analit	Čas razpadnosti
Viagra®	10 min
»Originalna Viagra«	3 min 40 s
»Generična Viagra«	6 min
»Lovegra Tablets«	2 min 40 s
»Viagra Soft Tabs«	3 min 20 s

Razprava

Test razpadnosti smo izvajali pri vseh vzorcih pod enakimi pogoji, čeprav tablete »Generična Viagre« in »Viagra Soft Tabs« niso bile filmsko obložene. Pri neobloženih tabletah je bil čas popolnega razpada tablet krajši. Vsi vzorci so se razgradili prej kot v 15 minutah, čemur sledi, da so vsi vzorci ustrezali zahtevam za razpadnost po Ph.Eur.5.

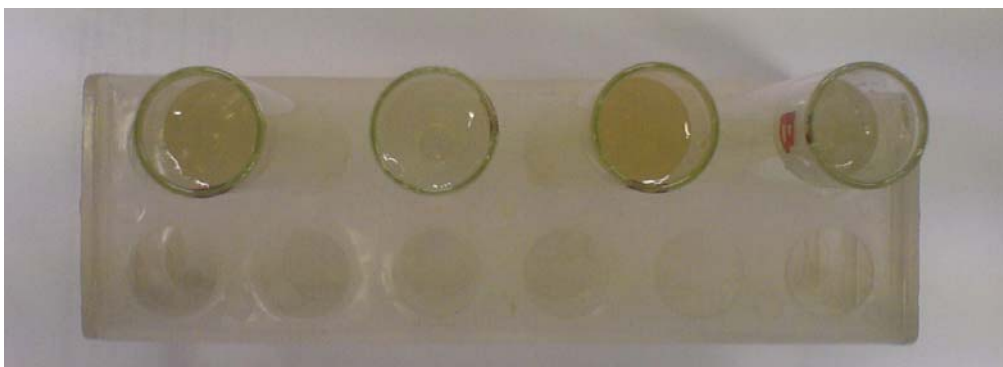
Domnevamo lahko, da trdnost tablet ni bila prevelika in poroznost ne premajhna.

Glede na uspešen preskus razpadnosti pa ne moremo ugotavljati ustreznost posameznih komponent v vzorcih. Prav tako ne moremo delati zaključkov o neustreznosti tablet pri vzorcih s krajšim časom razpadnosti.

5.3. Test na težke kovine

Standardna referenčna raztopina (**2**) je v primerjavi z raztopino slepe probe (**4**) razvila rjavo barvo. Kontrolna raztopina (**3**) je bila primerljiva z standardno referenčno raztopino (**2**). To je potrdilo pravilnost preskusa.

Intenziteta obarvanosti je padala od najintenzivnejše kontrolne raztopine (**3**) proti standardni referenčni raztopini (**2**), še manj intenzivni barvi vzorca (**1**) in najšibkejšem obarvanju raztopine slepe probe (**4**) (slika 18). S preskusom smo potrdili, da vzorec ne vsebuje težkih kovin nad mejno vrednostjo 10 ppm svinca.



SLIKA 18: raztopine **2**, **1**, **3** in **4** (od desne proti levi)

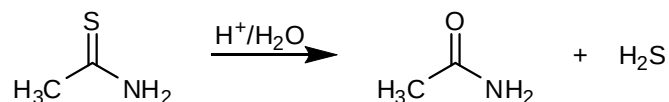
Razprava

Test na težke kovine smo izvajali z vzorcem »Generična Viagra«. Vzorec so bile neobložene tablete, ki so bile homogeno modro obarvane, kar je relativno nenavadno. Barva je torej služila zgolj zato, da naj bi tablete spominjale na 'čudežno modro tabletko'. Ker je bila barva precej intenzivna in očitno drugačna od barve obloge originalnih tablet (te vsebujejo vsebujejo barvilo karminsko modro, ki je derivat indol-5-sulfonske kisline), bi barvilo lahko bilo tudi anorganskega izvora, s čimer bi se povečala možnost prisotnosti težkih kovin. Tablete smo zato preizkusili na vsebnost težkih kovin po Ph. Eur. 5, enak predpis (poglavje 231, metoda III) najdemo tudi v USP 30. Izbrali smo metodo, kjer organske snovi predhodno s segrevanjem v zmesi žveplove in dušikove (V) kisline popolnoma razgradimo: ogljik oksidiramo do CO_2 , nastajajo tudi H_2O , amonijak in dušikovi oksidi. Po segrevanju smo dobili brezbarvno raztopino, kar kaže, da je bilo tudi barvilo v našem vzorcu organskega izvora.

Test na težke kovine je limitna metoda: vzorec primerjamo s standardno raztopino najvišje dovoljene količine svinčevih ionov. Kot zgornjo mejo sprejemljivosti smo postavili 10

ppm svineca, kar je tudi običajna zgornja meja v zdravilih po USP. Opazujemo tvorbo obarvanih sulfidov težkih kovin, pri čemer nam tioacetamidni reagent nam služi kot prekursor H_2S , ki iz njega nastaja v kislem vodnem mediju (slika 19).

Naš preizkus ni pokazal nedovoljenih količin težkih kovin v tabletah »Generična Viagra«.



SLIKA 19: Tvorba vodikovega sulfida iz tioacetamida v kislem.

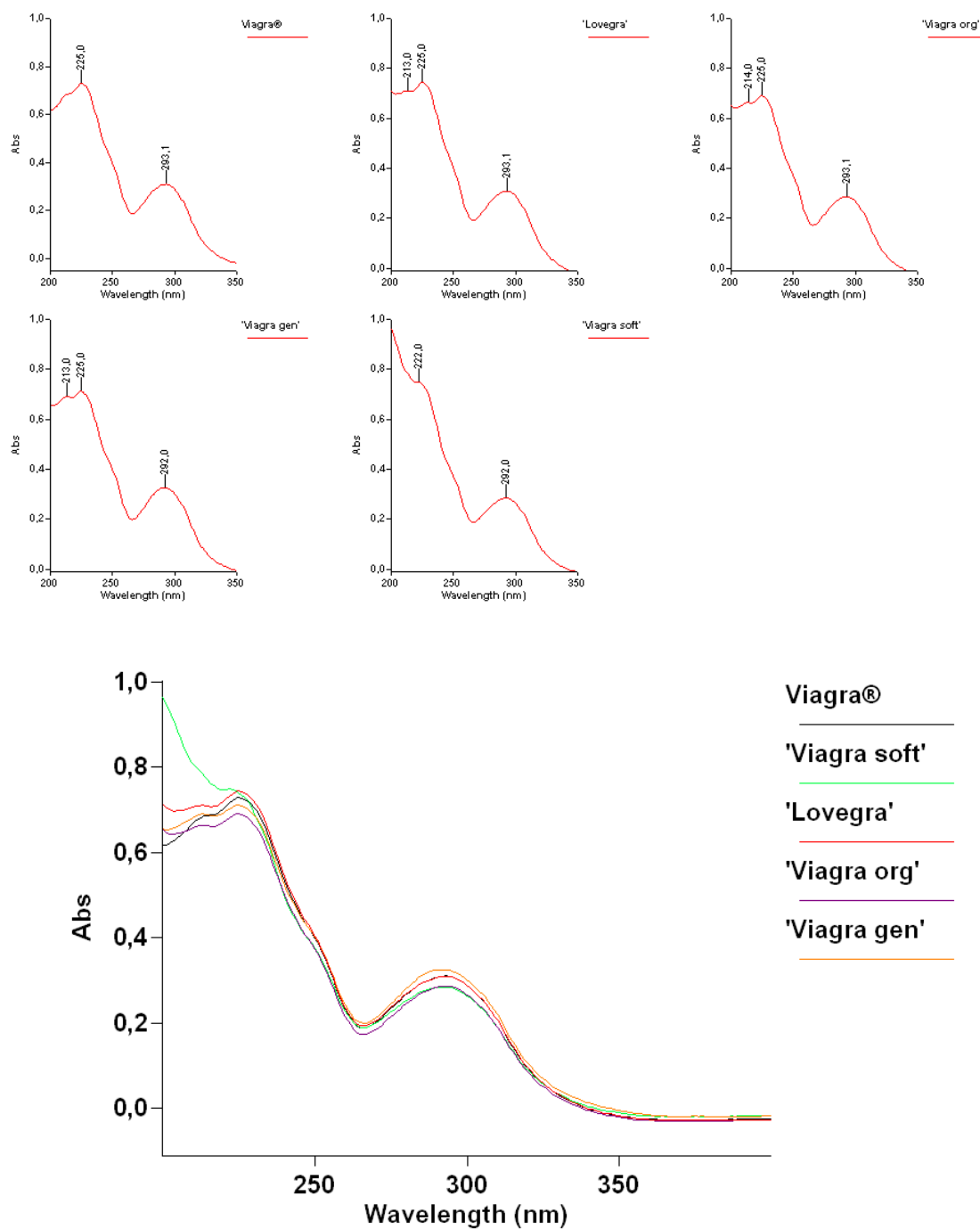
5.4. Identifikacija sildenafila v vzorcih

Prisotnost sildenafila v vzorcih smo potrdili z ujemanjem retencijskega časa glavnega vrha v kromatogramih vzorcev z retencijskim časom glavnega vrha v kromatogramu standarda (tabela II) pri določanju vsebnosti sildenafila (poglavje 5.6.). V vseh primerih smo, kadar smo raztopino vzorca zmešali z raztopino standarda, dobili le en kromatografski vrh.

TABELA II: Prikaz retencijskega časa sildenafila za posamezne vzorce

Vzorec	t_R vzorca (min)	t_R standarda (min)
»Originalna Viagra«	6,43	6,43
»Generična Viagra«	6,43	6,44
»Lovegra Tablets«	6,55	6,55
»Viagra Soft Tabs«	6,4	6,43

Z UV spektrofotometrom smo posneli absorpcijske spektre med 200 in 400 nm raztopin **6** za raztopine standarda in vzorcev (slika 20). Vsi spektri se med sabo ujemajo: prisotna sta 2 absorpcijska maksimuma pri 225 in 292 nm ter minimum pri 266 nm, kar je skladno z literaturnimi podatki (41).



SLIKA 20: UV spektri raztopine standarda in vzorcev

Spektri vzorcev in standarda so se v vseh primerih prekrivali z manjšim odstopanjem.

Razprava

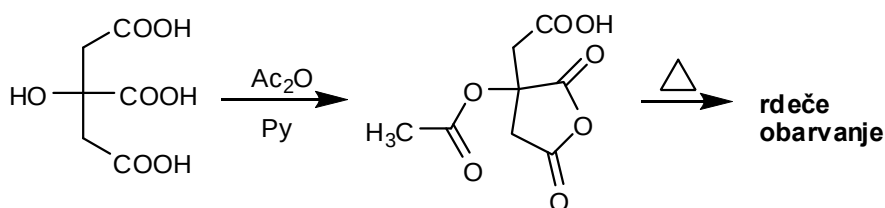
Iz rezultatov obeh analiz sklepamo, da je v vseh vzorcih prisoten sildenafil. V vzorcu »Viagra Soft Tabs« so nedvomno prisotne tudi druge primesi, ki absorbirajo UV svetlobo v območju pod 225 nm.

5.5. Identifikacija citrata

Test identifikacije citrata je bil v vseh primerih pozitiven. Po dodatku acetanhidrida so se vzorci obarvali intenzivno rumeno, razen v primeru »Viagra classics«, kjer je bila že sama zmes v piridinu modro obarvana, zato se je barva z dodatkom acetanhidrida spremenila v zeleno. Ob segrevanju se je barva spremenila v temno rdečo oz. vijolično. Iz rezultatov sklepamo, da so vsi vzorci vsebovali citrat.

Razprava

Za identifikacijo citrata smo uporabili metodo, ki temelji na acetiliranju citronske kisline v piridinu (slika 21). V prvi stopnji nastane ciklični anhidrid, struktura končnega produkta, ki daje temno rdeče obarvanje, pa kljub temu da je reakcija že dolgo znana in v uporabi, ni znana (42). Predvidevajo, da gre za radikalski mehanizem reakcije in da nastane zmes večih produktov.



SLIKA 21: Pretvorba citronske kisline z acetanhidridom v piridinu.

5.6. HPLC kvantitativna analiza vzorcev z UV detekcijo

▪ Izbor analizne metode

Za kvantitativno analizo sildenafilila smo izbrali reverzno-fazno HPLC z UV detekcijo. Kot eksterni standard smo uporabili originalne tablete Viagre® (Pfizer, 100 mg). Z njimi smo izvedli tudi optimizacijo in validacijo metode.

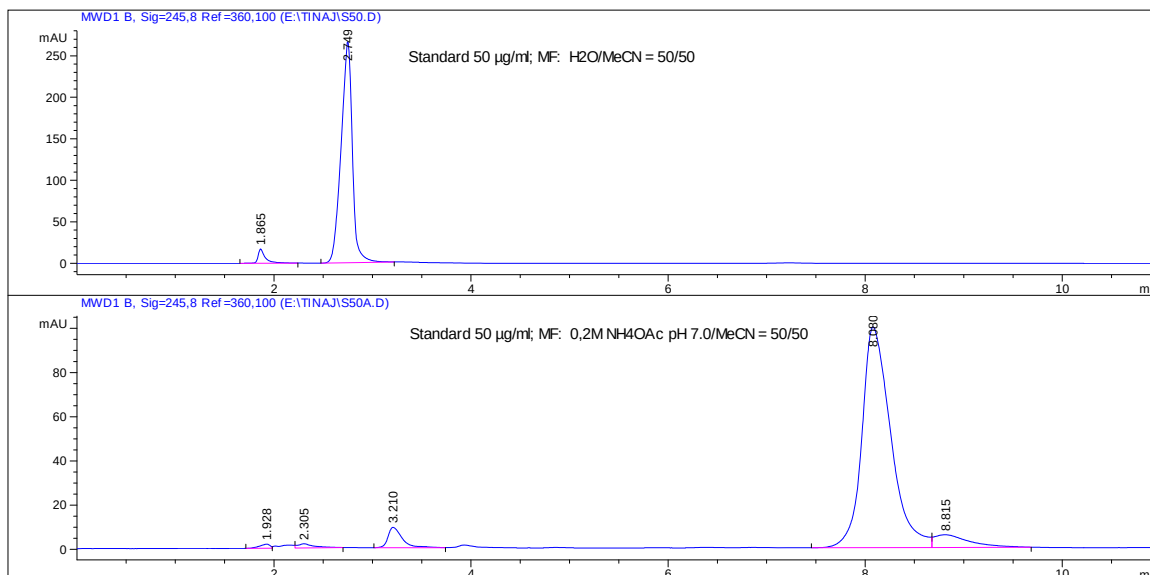
▪ Optimizacija analizne metode

► Izbira valovne dolžine detekcije

Vse kromatograme smo posneli pri 4 različnih valovnih dolžinah: 220, 245, 254 in 290 nm. Za kvantitativno določanje sildenafila (in validacijo analizne metode) smo izbrali odziv pri 245 nm, ki predstavlja kompromis med največjo občutljivostjo (to dosežemo pri 220 nm) in največjo selektivnostjo (pri 290 nm). Ocenjujemo, da bi načeloma vse uporabljene valovne dolžine bile primerne za analizo.

► Izbira optimalne mobilne faze

Pri uporabi *mobilne faze brez pufru* (**8**) je bil retencijski čas sildenafila bistveno krajši (2.75 min, N=2840) kot pri uporabi *mobilne faze s pufrom pH 7,0* (**9**) (8.08 min, N=3678; obakrat v zmesi 50 : 50 z acetonitrilom) (slika 22). Ker je sildenafil šibka baza sklepamo, da je sildenafilijev citrat v vodi v ionizirani obliki, medtem ko se sildenafil nahaja v pufru s pH 7,0 kot prosta baza. Ker se pri zelo kratkih retencijskih časih poveča možnost prekrivanja različnih vrhov (zmanjša se selektivnost), hkrati pa se zaradi odsotnosti pufru poveča tudi vpliv zunanjih dejavnikov na retencijski čas (manjša robustnost), smo v nadaljevanju uporabljali puferno vodno fazo.



SLIKA 22: Kromatograma raztopine standarda sildenafila pri uporabi mobilne faze brez pufru (zgoraj) in s pufrom (spodaj) pred zamenjavo kolone.

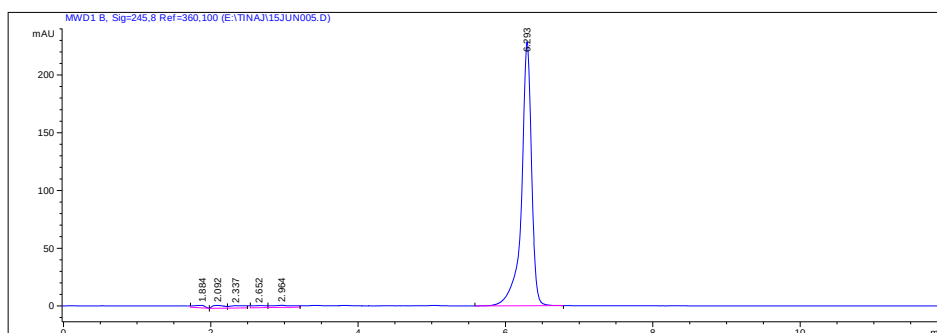
Mobilni fazi s pufrom pH 7,0 (9) smo v nadaljevanju spreminjali razmerje komponent v zmesi pufer / acetonitril:

- zmes 50:50 (v/v): $t_R = 8.08$ min, učinkovitost je zadovoljiva
- zmes 40:60 (v/v) : $t_R = 15.57$ min, vrh je bil širši
- zmes 44:56 (v/v): $t_R = 6.08$ min, ozek vrh

Zaradi krajšega časa analize in boljše učinkovitosti smo se odločili za mobilno fazo z razmerjem pufer : MeCN = 45 :55.

► Izbira kolone

V kromatogramih, posnetih z izbrano mobilno fazo, so se ob vrhih sildenafila pojavili tudi t.i. »ghost« piki oz. ramena (slika 22 spodaj). Ko smo zamenjali kolono z novo je rame izginilo (slika 23), s čimer smo potrdili, da je pojav posledica izrabljene kolone. Povečala se je tudi učinkovitost kolone ($N=11306$). Obe koloni sta bili Phenomenex, Luna C₁₈, 5 μ m, 250mm x 4,6mm.



SLIKA 23: Kromatogram po zamenjavi kolone

► Izbira ostalih parametrov

Ostali parametri so izkazovali dobre rezultate že ob prvi izbiri. Volumen injiciranega vzorca je bil 20 μ l. Pretok 1 ml/min je omogočal kratek čas analize in ne previsokih tlakov (do 300 barov) v kromatografskem sistemu. V času analize 12 min. so se iz sistema izločile vse komponente.

Razprava

Predhodno objavljene metode so nam dale dobro izhodišče za določitev začetnih parametrov HPLC sistema. Retencijski čas in širina vrha sta bila ugodna za izvajanje analize (dobra učinkovitost kolone). Z večkratnim injiciranjem istih vzorcev smo ugotovili, da je bila stabilnost vzorčnih raztopin znotraj 2 tednov analize dobra, saj nismo zaznali dodatnih vrhov.

▪ Validacija analizne metode

► *Selektivnost*

Selektivnost običajno določamo s pomočjo standardov spojin, za katere obstaja verjetnost, da so v vzorcu lahko prisotne (npr. sorodne snovi). V našem primeru teh standardov nismo imeli na voljo. Čim večjo selektivnost metode smo skušali zagotoviti z ustreznim retencijskim časom sildenafilu in izbrano valovno dolžino detekcije. Iz posnetih kromatogramov za standardno raztopino sildenafilu in za slepi vzorec je bilo razvidno, da se vrha topila in sildenafilu ne prekrivata. Pri primerjavi kromatogramov, posnetih z različno sestavo mobilne faze, v nobenem primeru nismo opazili pojavljanja dodatnih vrhov. Tudi oblika glavnega vrha je bila v vseh primerih pri vseh štirih valovnih dolžinah detekcije enaka. Ti rezultati nam kažejo, da je izbrana metoda selektivna.

► *Določitev območja in vrednotenje linearnosti*

V tabeli IV so zbrani izmerjeni ter iz umeritvene krivulje izračunani rezultati posnetih kromatogramov za serijo 10-ih različnih koncentracij raztopin standarda sildenafilu, s pripadajočo enačbo umeritvene premice in korelacijskim koeficientom.

TABELA IV: Rezultati za določanje linearnosti

št. analita	konc. sildenafil	AUC * izmerjen	AUC iz umerit. prem.	% ujemanja
1	100	4195,2	4220,05	100,59
2	50	2165,6	2111,58	97,50
3	20	838,59	846,50	100,94
4	10	421,33	424,81	100,82
5	5	211,43	213,96	101,20
6	2	84,72	87,45	103,22
7	1	43,07	45,28	105,12
8	0,5	21,77	24,20	111,12
9	0,2	9,25	11,55	124,81
10	0,1	4,85	7,33	151,06

Enačba premice: $y = 42.169 \cdot x + 3.112$

AUC* je povprečen odziv 3 zaporednih injiciranj raztopine z enako koncentracijo

Rezultati kažejo, da se izmerjeni odzivi dobro ujemajo s tistimi, izračunanimi iz umeritvene krivulje, pri koncentracijah nad 1 µg/ml, medtem ko so pri nižjih koncentracijah odstopanja precejšnja. Zato smo za območje linearnosti določili območje med 100 in 1 µg/ml (tabela V).

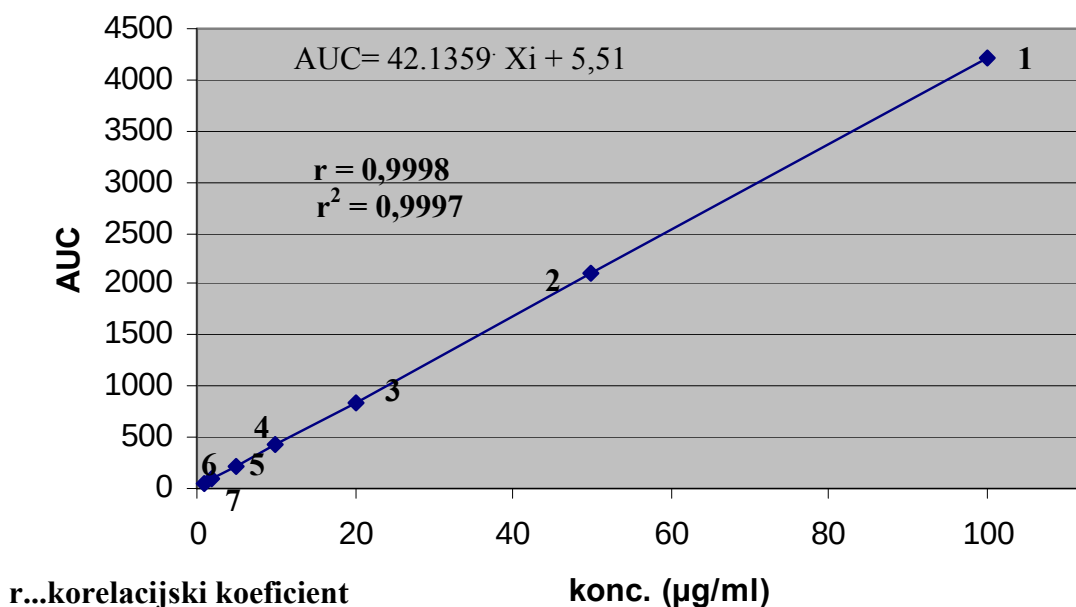
TABELA V: Rezultati znotraj določenega območja analize

št. analita	konc. sildenafil	AUC * izmerjen	AUC iz umerit. prem.	% ujemanja
1	100	4195,2	4219,0	100,6
2	50	2165,6	2112,3	97,5
3	20	838,6	848,2	101,1
4	10	421,3	426,9	101,3
5	5	211,4	216,2	102,2
6	2	84,7	89,8	106,0
7	1	43,1	47,6	110,6

Enačba premice: $y = 42.1359 \cdot x + 5,51$

Odklon premice (a) = 5,51

Naklon premice (b) = 42,135



SLIKA 24: Umeritvena premica za standard sildenafilijev citrat, znotraj določenega območja analize, z enačbo $y = 42,14 x + 3,54$.

Dobljena kalibracijska krivulja kaže razmerje površine pod kromatografskim vrhom (AUC) v odvisnosti od koncentracije. V območju med 100 in 1 µg/ml je kalibracijska krivulja linearna. Enačbo umeritvene premice $y = 42.14 \cdot x + 3,54$ smo določili s pomočjo metode linearne regresije najmanjših kvadratov. »y« v enačbi predstavlja odziv (vrh), »a« je naklon premice in predstavlja merilo za občutljivost metode, »x« je koncentracija analita in »b« odmik na osi y in predstavlja merilo za absolutno sistemsko napako metode.

Računalnik je po statistični metodi izračunal kvadrat koeficienta korelacije (r^2). Za spodnjo mejo sprejemljivosti koeficienta korelacije smo določil $r^2 \geq 0,99$.

► **Natančnost (ponovljivost)**

V tabeli VI so podani odzivi (površine pod vrhom) 10-ih zaporednih injeciranj raztopine standarda koncentracije 60 µg/ml.

TABELA VI: Natančnost (ponovljivost) izbrane metode.

št. injiciranja	AUC izmer.	natančnost v %
1	2485,1	100,00
2	2479,9	99,79
3	2479,8	99,78
4	2480,4	99,81
5	2487,2	100,08
6	2485,5	100,01
7	2490,0	100,19
8	2484,1	99,96
9	2490,3	100,20
10	2488,6	100,14

Povprečje odzivov ($AUC_{\text{standarda}}$): 2485,1

Standardni deviacija (SD): 4,03

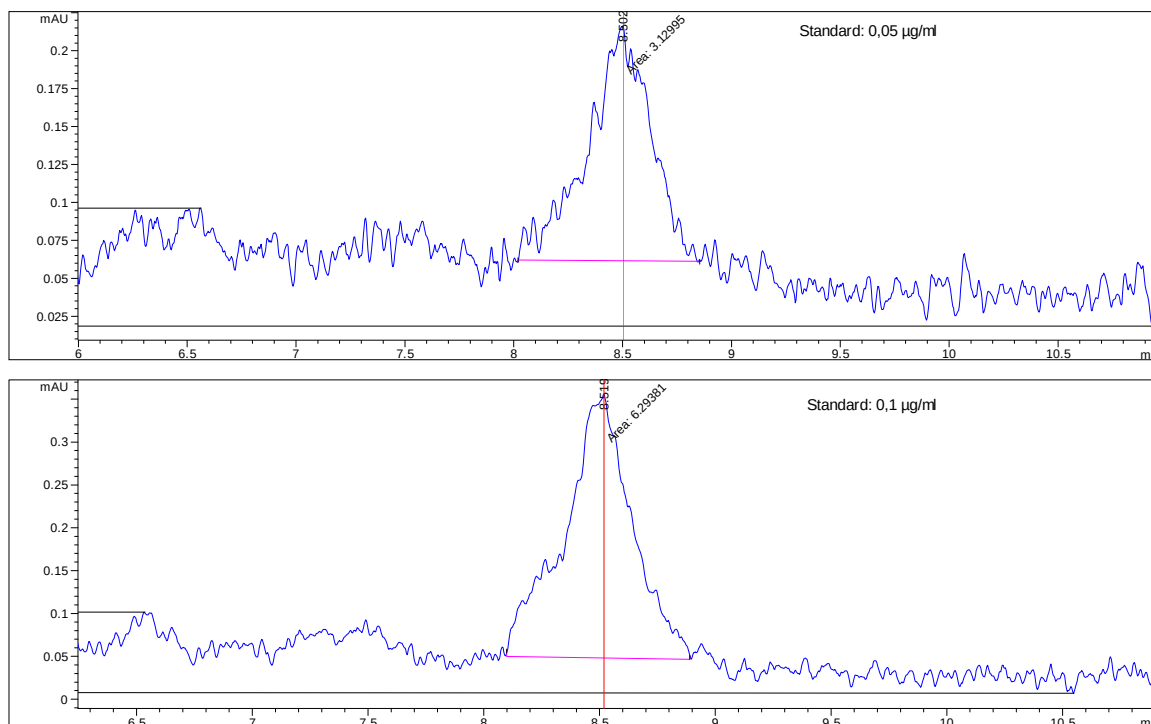
Varianca (s^2)=16,23

Relativna standardna deviacija v procentih (RSD): 0,162%

RSD je bila manjša od 1%, torej smo potrdili, da je bila metoda natančna.

► **Meja zaznavnosti (LOD) in meja kvantifikacije (LOQ)**

Spodnjo mejo zaznavnosti in spodnjo mejo kvantifikacije smo določili vizualno s pomočjo razmerja med signalom in šumom v kromatogramih standardov nizke koncentracije (slika 25). Za LOD smo upoštevali razmerje 3:1 in za LOQ 10:1.



SLIKA 25: Kromatograma standardov s koncentracijo 0,05 µg/ml (zgoraj) in 0,1 µg/ml (spodaj).

LOD = 0,05 µg/ml oz. 1 ng sildenafil

LOQ = 0,1 µg/ml oz. 2 ng sildenafil

► **Spremljanje stabilnosti**

Vrednosti odzivov pod površino vrhov standardne raztopine sildenafil so se spreminjale z različnim dnem meritve. Spremembe smo pripisali menjavi mobilne faze, predvsem spremembi pH-ja mobilne faze, ki je nihal okoli vrednost 7. Pri meritvah vsakega od serije vzorcev smo zaznali razliko v odzivu standardne raztopine sildenafil, kar pa ni močno vplivalo na rezultate optimizacije in validacije. Znotraj analiznega obdobja nismo zaznali razlik v obliki vrhov, niti pojava dodatnih vrhov, tako da domnevamo, da sildenafil znotraj časa meritev ni razpadal.

Razprava

S postopkom validacije smo potrdili, da je izbrana metoda selektivna. V območju med 1-100 $\mu\text{g/ml}$ je bila metoda linearna in natančna. Glede na to, da smo dokazali specifičnost, linearnost in natančnost metode v delovnem območju lahko privzamemo, da je metodo tudi točna. Mejo zaznavnosti smo določili pri koncentraciji 0,05 $\mu\text{g/ml}$ in mejo določitve pri 0,1 $\mu\text{g/ml}$, obe sta bistveno nižji od območja, v katerem smo določali koncentracijo vzorcev. Stabilnost sildenafilila znotraj analiznega obdobja je bila dobra.

▪ Kvantitativna analiza, vsebnost in enakomernost vsebnosti sildenafilijevega citrata v vzorčnih tablet

Spodaj so navedeni rezultati kvantitativne HPLC analize vseh vzorčnih raztopin. Podatke smo zbrali in obdelali v programu »Microsoft Office Excel«.

TABELA VII: »originalna Viagra« :

analit	AUC _{izm.}	% <u>od</u> AUC
org1	2379,9	100,42
org2	2345,9	98,98
org3	2303,7	97,20
org4	2219,1	93,63
org5	2385,3	100,64
org6	2439,0	102,91
org7	2391,1	100,89
org8	2384,3	100,60
org9	2384,5	100,61
org10	2466,2	104,06

—
AUC = 2369,9
AUC_{st} = 2580,4
% vsebnost = 91,84
SD = 69,08
RDS% = 2,91

TABELA VIII: »generična Viagra«

analit	AUC_{izm.}	% <u>od</u> AUC
gen1	2404,2	101,2
gen2	2349,4	98,9
gen3	2396,5	100,8
gen4	2394,9	100,8
gen5	2333,5	98,2
gen6	2443,9	102,8
gen7	2471,5	104,0
gen8	2157,1	90,8
gen9	2424,2	102,0
gen10	2388,8	100,5

—

AUC = 2376,39**AUC_{st} = 2573,1****% vsebnosti = 92,35****SD = 87,06****RDS% = 3,66**

TABELA IX: »Viagra SOFT Tabs« :

analit	AUC_{izm.}	% <u>od</u> AUC
s1	2343,3	98,86
s2	2614,1	110,29
s3	2278,6	96,14
s4	2267,3	95,66
s5	2285,8	96,44
s6	2498,1	105,39
s7	2381,7	100,48
s8	2420,7	102,13
s9	2440,2	102,95
s10	2172,5	91,66

—

AUC = 2370,24**AUC_{st} = 2479,9****% vsebnosti = 95,58****SD = 128,80****RDS% = 5,43**

TABELA X: »Lovegra«

analit	AUC izm.	% <u>od</u> AUC
L1	2632,3	106,17
L2	2484,8	100,22
L3	2534,4	102,22
L4	2428,2	97,93
L5	2374,3	95,76
L6	2383,7	96,14
L7	2468,6	99,56
L8	2515,8	101,47
L9	2502	100,91
L10	2470,2	99,63

AUC = 2479,43

AUC_{st} = 2601,9

% vsebnosti = 95,29

SD = 75,49

RDS% = 3,05

AUC_{izm} izmerjena površina pod vrhom

% od AUC odstotek oz. odstopanja posamezne meritve od povprečne vrednosti AUC

AUC povprečna površina vseh izmerjenih površin pod vrhom

AUC_{st} površina pod vrhom za standard, ki se spreminja z različnimi meritvami v različnih dneh

% vsebnosti odstotek vsebnosti glede na AUC_{st}

Razprava

Ker nismo imeli na razpolago standarda sildenafilijevega citrata, smo primerjali vsebnost tablet s tabletami Viagre[®], ki imajo deklarirano vsebnost 100 mg sildenafila v obliki sildenafilijevega citrata. Ker smo tablete kupili v lekarni v Ljubljani verjamemo, da je njihova vsebnost med 95 in 105 % deklarirane vsebnosti (v vzorcu 20 tablet). Izključno zaradi cenovnih razlogov smo za standard uporabili po eno tableto, tako da moramo upoštevati, da je vsebnost sildenafila v vsaki izmed tablet med 85 in 115 % povprečne vsebnosti. Zaradi tega iz primerjave vzorcev z našim standardom ne moremo z gotovostjo trditi, da vsebnost sildenafila v vzorcih ustreza. Velja pa nasprotno, v kolikor bi vrednosti

vzorcev preveč odstopale od vrednosti standarda (manj kot 78,7 % ali več kot 130,0 %), bi lahko potrdili, da vsebnost sildenafila v vzorcih ne ustreza. To se v nobenem primeru ni zgodilo, tako da sklepamo, da vzorci verjetno vsebujejo ustrezno količino sildenafila.

Vsebnost sildenafila vsake posamezne tablete vzorca je bila v vseh primerih med 85 in 115% povprečne vrednosti 10 tablet vzorca. Vsi vzorci so ustrezali predpisu enakomernosti vsebnosti tablet. Tablete so torej, kljub temu, da so ponarejene, vsaj deloma proizvedene v skladu s smernicami dobre proizvodne prakse.

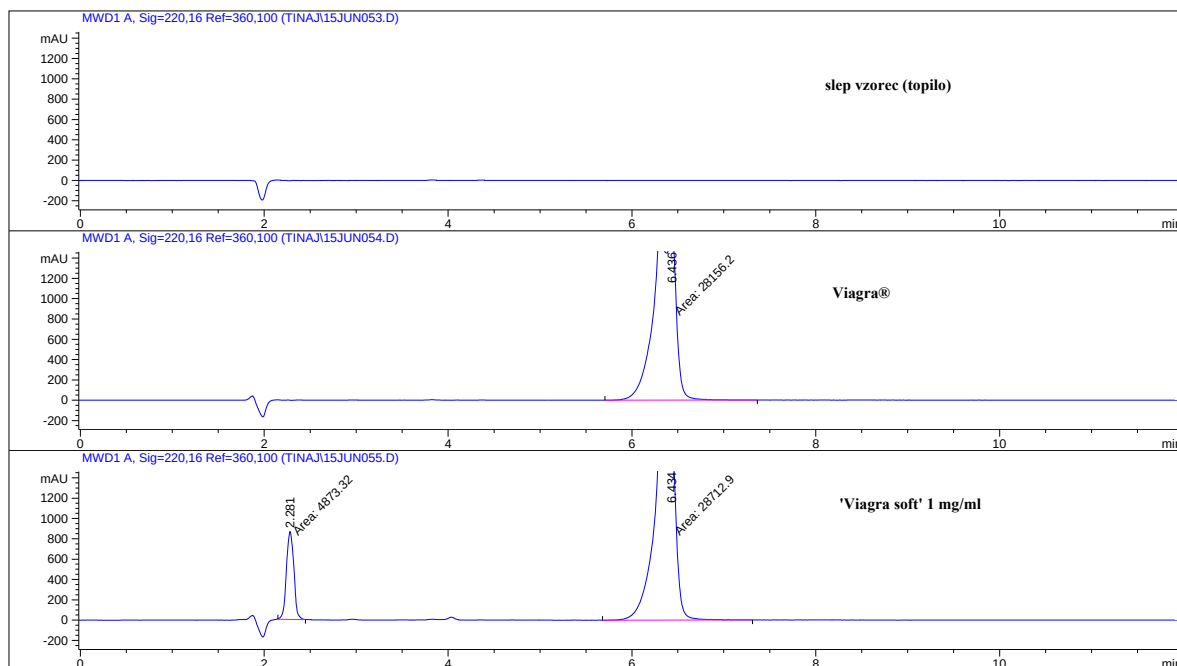
5.7. Organske nečistote

Pri organskih nečistotah običajno govorimo o sorodnih snoveh: gre za spojine, ki so stranski produkti ali vmesni intermediati sinteze učinkovine, ter razgradne produkte, ki nastanejo iz same učinkovine. Nečistote, ki se pojavljajo v zdravilih, lahko povzročajo resne toksične učinke, zato so zgornje meje, do katerih so lahko prisotne, strogo določene.

(43) Vsaka nečistota, ki je v učinkovini prisotna v (nominalnih) količinah nad 0,10% vsebnosti učinkovine, mora biti identificirana, tiste, prisotne v (nominalnih) količinah nad 0,15%, pa morajo biti tudi kvalificirane: potrjena mora biti njihova biološka varnost (toksikološki profil) v prisotnih količinah ob maksimalnem dnevnem vnosu.

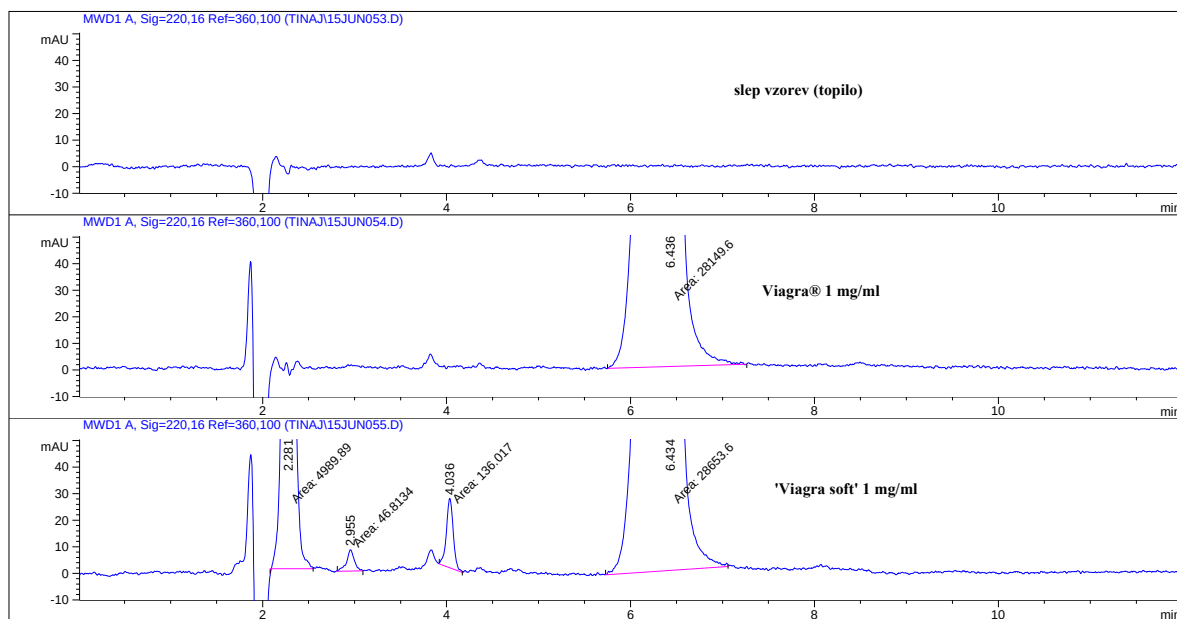
Zdravila, ki niso proizvedena v skladu s temi smernicami, so zaradi eventualnih nečistot še posebej nevarna. Zaradi patentne zaščite in še neobstoja farmakopejske monografije nečistot in njihovih specifikacij pri sildenafilijevem citratu ne poznamo. Največkrat je v monografijah za sorodne snovi za njihovo določanje uporabljena HPLC kromatografska metoda. V okviru diplome smo zato posneli tudi HPLC kromatograme vzorcev z višjo koncentracijo sildenafila (~ 1 mg/ml) od tistih, uporabljenih za določanje vsebnosti. Zaradi večje občutljivost smo primerjali kromatograme pri 220 nm, kjer več spojin absorbira UV svetlobo. Za vrhove, ki se pojavljajo, ne moremo z gotovostjo trditi, ali pripadajo sorodnim snovem, ki izhajajo iz same učinkovine, razgradnim produktom, ki nastajajo v času proizvodnje tablet in tekom njihovega shranjevanja, ali pa izvirajo iz ostalih sestavin, ki so v tableti. Primerjava z originalnimi tabletami pa nam lahko služi kot indikator kakovosti ponarejenih tablet. Pri originalnih tabletah v kromatogramih ni bilo opaznega nobenega vrha, katerega površina bi bila večja od 0,1 % površine glavnega vrha. Pri vzorcu »soft tablet« smo poleg vrha sildenafila opazili tudi dodaten vrh spojine, ki se skoraj ni zadrževala na koloni (retencijski čas je bil skoraj enak retencijskemu času topila) (slika

26). Predvidevamo, da gre za pomožno/e snov/i, najverjetneje dodano/e za izboljšanje okusa.



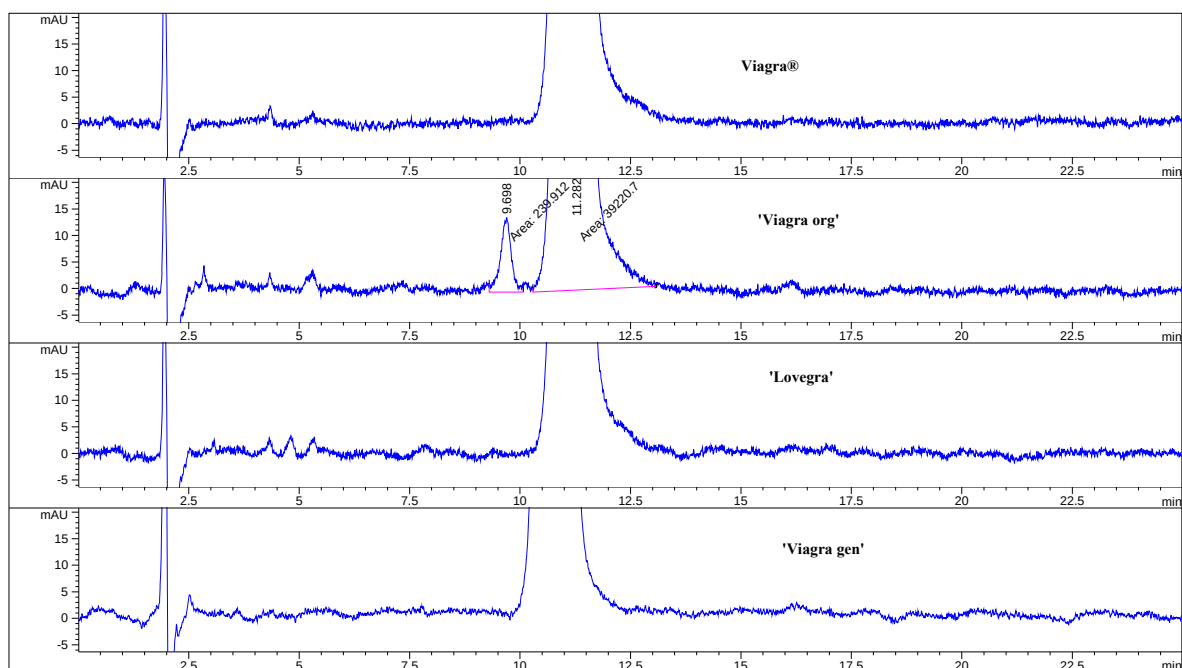
SLIKA 26: Primerjava kromatogramov 'soft tablet' in standarda: tablete poleg sildenafila vsebujejo še vsaj eno spojino, ki absorbira v UV območju in se praktično ne zadržuje na koloni.

Poleg glavnih vrhov sta v kromatogramu 'soft tablet' prisotna še dva šibka vrhova, katerih površini pod krivuljo znašata 0,16 % in 0,48 % površine pod krivuljo vrha sildenafila (slika 27). Sklepamo lahko, da pripadata prisotnim nečistotam, ne moremo pa z gotovostjo trditi, ali izhajajo iz samega sildenafilijevega citrata ali iz katere od drugih prisotnih snovi. Glede na obnašanje pri različnih valovnih dolžinah (rezultati niso prikazani), gre bolj verjetno za nečistoto, ki je sildenafilu sorodna snov.



SLIKA 27: Kromatogram 'soft tablet' v primerjavi s standardom in slepim vzorcem kaže dva dodatna vrha, ki pripadata nečistotam, prisotnim v tabletah. Koncentracija vzorcev je bila približno 1000 µg/ml, mobilna faza je bila pufer : acetonitril = 45 :55.

Primerjava ostalih treh vzorcev s standardom je pokazala, da vzorca 'Lovegre' in 'generične Viagre' nista vsebovala dodatnih nečistot, medtem ko smo dodatni vrh zaznali v kromatogramu »originalnih tablet« (slika 28). Njegova površina pod krivuljo je bila 0,61 % površine pod krivuljo vrha sildenafilu.



SLIKA 28: Primerjava kromatogramov standarda ter vzorcev 'originalnih tablet', 'Lovegra tablet' ter 'generičnih tablet'. Koncentracija vzorcev je bila približno 1000 µg/ml, mobilna faza je bila pufer : acetonitril = 50 :50.

Sklepamo, da vsaj dvoje ponarejene tablete vsebujejo nečistote, ki so lahko potencialno škodljive zdravju. Zelo verjetno proizvajalci teh tablet niso ovrednotili njihovega toksikološkega profila, zato predstavljajo tveganje za zdravje uporabnikov.

SKLEP

Vzorci s sildenafilijevim citratom, ki smo jih preučili v diplomski nalogi, so bili ponarejeni in ilegalno prodani preko različnih internetnih strani. Ilegalni internetni oglasi, preko katerih smo zdravila kupili, so po svoji obliki in vsebini zavajajoči in kršijo Zakon o zdravilih ter ne ustrezajo pravilniku in kodeksu o oglaševanju zdravil na recept. Vse obiskane spletne strani ponujajo širok izbor različnih ponarejenih ali neodobrenih zdravil brez recepta in posvetovanja z zdravnikom ali farmacevtom. Informacije o zdravilih so skope, nepravilne, zavajajoče, nepopolne ali za osamezno zdravilo popolnoma neustrezne. Nakup ilegalnih zdravil s sildenafilijevim citratom je bil lahek in hiter, zanj je bila potrebna le veljavna kreditna kartica. Cene vzorcev so bile več kot pol manjše od uradnih cen Viagre®. Dostavljene pošiljke vzorcev so bile neprimerno označne, neprimerno zaščitene in neprimerno transportirane, zaradi česar je v enem primeru prišlo tudi do poškodbe tablet. Navodila za uporabo so bila neustrezna, pomankljiva ali pa jih sploh ni bilo. Pri nobenemu od vzorcev nista bila označena rok uporabe in način shranjevanja zdravil.

Carinska služba v Sloveniji je v primeru pošiljk z zdravili za osebno rabo prepuščena individualnim interpretacijam zakona, saj so zakoni v teh primerih nejasni in nepopolni.

Vsi vzorci so se od originalnih tablet Viagre® razlikovali po obliki, barvi, in velikosti.

Vzorci so ustrezali testu razpadnosti po Ph. Eur. 5. En vzorec smo preizkusili na vsebnost težkih kovin, ki ni bila nad dovoljeno mejo.

Vsi vzorci so vsebovali sildenafilijev citrat. S HPLC analizo smo ugotovili, da je vsebnost učinkovine primerljiva z vsebnostjo v originalnih tabletah. Enakomernost vsebnosti je bila pri vseh vzorcih ustrezna, kar kaže, da so vsaj deloma izdelani v skladu z dobro proizvodno prakso.

V vsaj dveh vzorcih smo ugotovili tudi prisotnost organskih nečistoč v količinah, večjih od 0,1% vsebnosti sildenafilijevega citrata. Te so lako zdravju škodljive, zato bi proizvajalec teh tablet moral ovrednotiti njihov toksikološki profila. Ker tega zelo verjetno ni storil, predstavljajo tablete tveganje za zdravje uporabnikov.

Kupec, ki kupi zdravilo preko ilegalne spletne lekarne, je torej izpostavljen številnim pastem: od nepopolnih, zavajajočih ali napačnih informacij o zdravilu, njegovih učinkih in stranskih učinkih, preko nevarnosti zaradi možne toksičnosti nekakovostnih zdravil, do finančnih zlorab zaradi nezmožnosti uveljavljanja potrošniških pravic.

Literatura

1. Langtry HD, Markham A: Sildenafil: A review of its use in erectile dysfunction. *Drugs* 1999; 57: 967-989.
2. Kling J: [From hypertension to angina to Viagra](#). *Modern Drug Discovery*, 1998: 31-38.
3. Viagra, Wikipedia
<http://en.wikipedia.org/wiki/Viagra> (dosegljivo januar 2008)
4. Lesjak Klapš S: Viagra dobila konkurenco Nuvivo in Cialis, *Revija Kapital*, 2002; 287.
5. Viagra® (sildenafil citrat) tablets, FDA,
<http://www.fda.gov/cder/foi/label/2005/020895s021lbl.pdf> (dosegljivo jan. 2008)
6. [Over-the-counter Viagra piloted](#), British Broadcasting Corporation,
<http://news.bbc.co.uk/1/hi/health/6351171.stm> (dosegljivo jan. 2008)
7. Viagra®, Pfizer
<http://www.viagra.com> (dosegljivo jan. 2008)
8. Revatio®, Pfizer)
<http://www.revatio.com> (dosegljivo januar 2007)
9. [Smith KM](#), [Romanelli F](#): Recreational Use and Misuse of Phosphodiesterase 5 Inhibitors. 2005; 45:63-72.
10. Waknine Y: Reports of Sudden Vision Loss Added to Labeling for Viagra, Cialis, Levitra, *Medscape*, 2005
<http://www.medscape.com/viewarticle/508112> , (dosegljivo jan. 2008)
11. Postmarketing Safety of Sildenafil Citrate (Viagra), FDA
<http://www.fda.gov/cder/consumerinfo/viagra/viagraupdate721.htm> (dosegljivo jan. 2008)
12. Copeland J, Dillon P, Gascoigne M: Ecstasy and the Concomitant Use of Pharmaceuticals, NDARC Technical Report No. 201
[http://www.med.unsw.edu.au/NDARCWeb.nsf/resources/TR_38/\\$file/TR.201.pdf](http://www.med.unsw.edu.au/NDARCWeb.nsf/resources/TR_38/$file/TR.201.pdf)
(dosegljivo jan. 2008)
13. Peterson K: [Young men add Viagra to their drug arsenal](#), *USAToday*
<http://www.usatoday.com/news/health/2001-03-21-viagra-abuse.htm> (dosegljivo jan. 2008)

14. General information on counterfeit medicines, WHO
<http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/overview/en> (dosegljivo jan. 2008)
15. Pitts P, govor predsednika CMPI, Center for Medicine in the Public Interest,
http://www.uscc.gov/hearings/2006hearings/written_testimonies/06_06_07wrts/06_06_7_8_pitts_peter.php (dosegljivo jan. 2008)
16. Guidelines for the development of measures to combat counterfeit drugs, WHO
<http://www.who.int/medicines/publications/counterfeitguidelines/en/index.html>
 (dosegljivo jan. 2008)
17. Watts J: Drug Piratse Leave Death in Their Wake, Mail&Guardian online, dec.2004
<http://www.guardian.co.uk/china/story/0,,1963363,00.html> (dosegljivo jan. 2008)
18. FDA's Counterfeit Drug Task Force Interim Report, U.S.Department of Health and Human Services, okt. 2003
http://www.fda.gov/oc/initiatives/counterfeit/report/interim_report.html (dosegljivo jan. 2008)
19. Half of Viagra samples purchased on the internet were fake, News-Medical.Net, sept. 2004
<http://www.news-medical.net/?id=5104> (dosegljivo jan. 2008)
20. F.D.A. Warns of Supplements Containing Viagra Ingredient, The New York Times, nov. 2004
<http://www.nytimes.com/2004/11/03/health/03pill.html?fta=y> (dosegljivo jan. 2008)
21. Molzon J A: E-Comerrce.Drug promotion and sales through the Internet, WHO,
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/a79903_\(chp16\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/a79903_(chp16).pdf) (dosegljivo maj 2008)
22. How to Evaluate Health Information on the Internet, FDA
<http://www.fda.gov/oc/opacom/evalhealthinfo.html> (dosegljivo jan. 2008)
23. Gernburd P, Jadad AR: Will Spam Overwhelm Our Defenses? Evaluating Offerings for Drugs and Natural Health Products. PLOS Medicine, 2007: 4: 1460-1463.
24. Petrecca L: No Prescription? No Problem., Prevention Magasine, 2004,
<http://features.prevention.com/article/0,5778,s-6-72-97-3420-1,00.html> (dosegljivo jan. 2008)
25. Recommendations: 12th International Conference of Drug Regulatory Authorities
http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/regulation_legislation/icdra/recc_fi_nal.pdf (dosegljivo jan. 2008)

26. Zakon o zdravilih, Uradni list RS, št. 31/06, z dne 24.3.2006
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200631&stevilka=1266> (dosegljivo jan. 2008)
27. Heinz Redwood: Advertising Prescription Drugs Direct to Patients, Health and Age, 2003
<http://www.healthandage.org/Home/gm=20!gc=36!l=2!gid2=1633> (dosegljivo jan. 2008)
28. Stith j: Pfizer Finds Viagra Spam Hard to Beat in Holland
<http://www.safemedicines.org/resources/003063.php> (dosegljivo jan. 2008)
29. <http://viagra-online.gajba.net> ali <http://modratabletka.com>, (dosegljivo jan. 2008)
30. Kogovšek Vidma T: Internetne lekarne v Sloveniji, Farmacevtski vestnik, 2007, 2: 59-62.
31. OBrien S: What You Need to Know About Canadian Prescription Drugs
<http://seniorliving.about.com/od/lawpolitics/a/reducedrugcosts.htm>, (dosegljivo jun. 2007)
32. Senat allows importation of prescriptions. Measure lets pharmacists purchase lower-cost medicine (Concord Monitor online),
http://www.cmonitor.com/stories/news/recent2003/062103_medicare_2003.shtml
 (dosegljivo jun.2007)
33. Bolta M, Hropot M: Regulatorni in praktični vidik sprejemanja in kontrole carinskih,poštnih in letalskih pošiljk. Farmacevtski vestnik, 2007, 2: 65-66.
34. obrazec za naročanje Viagre preko interneta,
<https://www.net-dr.com/refills/viagra.htm>, (dosegljivo jan. 2008)
35. International Conference on Harmonisation harmonised tripartite guideline:
 Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A.
36. Dinesh N D, Vishukumar B K, Nagaraja P, Made Gowda N M, Rangappa K S:
 Stability indicating RP-LC determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 29: 743-748.
37. Daraghmeh N, Al-Omari M, Badwan A A, Jaber A M Y: Determinaton of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 25: 483-492.

38. International Conference on Harmonisation harmonised tripartite guideline, 1996:
Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1).
Dostopno na: <http://www.ich.org>
39. European Pharmacopoea 5th Edition, Council of Europe, Strasborg, France, 2004.
40. The United States Pharmacopeia 30th Edition, The United States Pharmacopeial
Convention, Baltimore, United States, 2007.
41. Lai KC, Liu YC, Tseng MC et al: Isolation and Identification of a Sildenafil Analogue
Illegally Added in Dietary Supplements. Journal of Food and Drug Analysis 2006; 14:
19-23.
42. Auterhoff H, Schwingel I: Über die Reaktion von Zitronensäure mit Acetanhydrid und
Pyridin, Archiv der Pharmazie 1975; 308: 583-587.
43. International Conference on Harmonisation harmonised tripartite guideline, 2006:
Impurities in new drug products Q3B(R2).
Dostopno na: <http://www.ich.org>

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

TINA JANEŽIČ
DIPLOMSKA NALOGA
Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2008

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

TINA JANEŽIČ

**Viagra® preko spleta: preučevanje
mehanizmov distribucije in vrednotenje
nekaterih parametrov kakovosti zdravil**

**Viagra® online: study of mechanisms of
distribution with evaluation of some
parameters of a drug quality**

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc.dr.Jožka Cesarja..

Zahvaljujem se Jožku Cesarju za vzpodbudo, podporo, vodenje in strokovno svetovanje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc.dr. Jožka Cesarja.

Tina Janežič

Predsednik komisije: prof.dr. Aleš Mrhar

Člani komisije:izr.prof.dr. Stanislav Gobec