

# ANALIZA UNOR SUPLIMENTE ALIMENTARE ȘI MEDICAMENTE PENTRU DISFUNȚIE ERECTILĂ PRIN METODA HPLC-UV

AMELIA TERO-VESCAN<sup>1</sup>, CAMIL-EUGEN VARI<sup>2</sup>, CRISTINA FILIP<sup>3</sup>, BIANCA-EUGENIA ȐSZ<sup>4</sup>,  
DANIELA CEANĂ<sup>5</sup>, SILVIA IMRE<sup>6</sup>, GABRIEL HANCU<sup>7</sup>

<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>Universitatea de Medicină și Farmacie Ȑrgu-Mureș

**Cuvinte cheie:** suplimente alimentare, HPLC-UV, sildenafil, tadalafil, vardenafil

**Rezumat:** Popularitatea de care se bucură pe internet suplimentele alimentare și medicamentele pentru disfuncție erectilă, cadrul legal permisiv în acest domeniu și achiziționarea medicamentelor din farmacie doar pe bază de prescripție medicală, fac ca acestea să fie adesea falsificate. Este descrisă o metoda HPLC-UV de identificare și cuantificare a sildenafilului, tadalafilului și vardenafilului din suplimente alimentare și medicamente. Separarea acestor substanțe s-a făcut pe o coloană Phenomenex C<sub>8</sub> 150x4,6 mm 5μm, folosind ca fază mobilă un amestec de A=0,1% acid formic în apă și B=0,1% acid formic în acetonitril în gradient de concentrație, faza A scăzând de la 80 la 20 % în 15 minute. Detecția s-a făcut la 262 nm. În suplimentele alimentare achiziționate din farmacii nu s-au pus în evidență substanțe din clasa inhibitorilor de fosfodiesterază 5 de tipul celor descrise, dar în două suplimente achiziționate de pe internet a fost determinat cantitativ sildenafilul (13,87 ± 1,79 mg/capsulă și, respectiv, 18,34 ± 2,16 mg/capsulă). Metoda a fost utilizată și pentru dozarea sildenafilului din tablete Viagra<sup>®</sup> de 100 mg achiziționate de pe internet, conținutul acestora fiind mai mare cu 35,80% față de compoziția declarată.

**Keywords:** dietary supplements, HPLC-UV, sildenafil, tadalafil, vardenafil

**Abstract:** The popularity of dietary supplements and drugs for erectile dysfunction on the internet, permissive legal framework in this domain and purchasing these drugs from pharmacy on prescription only, explain why they are often subject to counterfeit. A HPLC-UV method for the identification and quantification of sildenafil, tadalafil and vardenafil in dietary supplements and drugs is described. Separation of these substances was performed on a Phenomenex C<sub>8</sub> 5μm 150x4.6 mm column, using as mobile phase a mixture of phase A = 0.1% formic acid in water and phase B = 0.1% formic acid in acetonitrile, in a concentration gradient, phase A concentration decreasing from 80 to 20% in 15 minutes. The detection was set at 262 nm. The supplements purchased from pharmacies did not contain phosphodiesterase 5 inhibitors, but in two supplements purchased on the internet, sildenafil was quantified (13.87 ± 1.79 mg/capsule and 18.34 ± 2.16 mg/capsule). The method was used for the determination of sildenafil in Viagra<sup>®</sup> 100 mg tablets purchased online, their content was higher by 35.80% from the declared composition.

## INTRODUCERE

Inhibitorii de fosfodiesterază 5 sunt medicamente de primă linie în tratamentul disfuncției erectile la bărbați, iar studiile clinice arată că aceștia sunt eficace și bine tolerați de pacienți.(1) Sildenafilul a fost introdus inițial în terapie pentru tratamentul hipertensiunii arteriale pulmonare, dar s-a dovedit eficace și în tratamentul disfuncțiilor erectile, iar din 2003 FDA a aprobat introducerea pe piață și a vardenafilului și tadalafilului.(2) Utilizarea acestora în suplimente alimentare contrafăcute pentru creșterea potenței masculine este datorată în primul rând legislației permissive în domeniul suplimentelor alimentare (3) și, în al doilea rând, faptului că aceste substanțe se eliberează doar din farmacie și pe bază de prescripție medicală care se reține în farmacie. Literatura de specialitate prezintă numeroase studii privind conținutul în sildenafil, vardenafil sau tadalafil al unor medicamente sau suplimente alimentare achiziționate de pe “piața neagră” sau de pe internet. Medicamentele achiziționate de pe internet nu au o dozare precisă a substanței active sau conțin pe lângă substanța activă și alte substanțe și expun consumatorul la risc de supradozare sau

efect sinergic aditiv.(4) În afară de substanțele ca atare, în literatură sunt identificați în suplimente alimentare și cel puțin 46 de analogi structurali diferiți ai acestor compuși. Spre deosebire de analogii structurali ai inhibitorilor de fosfodiesterază 5, care sunt considerați substanțe experimentale, fără Autorizație de Punere pe Piață, introduse ilicit în suplimente alimentare considerate inofensive, sildenafilul, vardenafilul și tadalafilul au un profil de siguranță și eficacitate clinică cunoscut. FDA avertizează consumatorii că cel puțin o treime din suplimentele alimentare pentru creșterea potenței masculine, presupuse a fi de origine vegetală, conțin substanțe extrem de active nedeclarate pe etichetă, iar la analiza a 17 produse achiziționate de pe internet, 6 astfel de suplimente conțineau sildenafil, vardenafil sau analogi ai acestora. Aceste suplimente falsificate expun consumatorul la interacțiuni de potențare periculoase în special cu antianginoase de tipul nitriților și nitraților organici, pacienții cu disfuncție erectilă, în general, utilizând polimedicatia pentru tratamentul altor patologii asociate de tipul hipertensiunii arteriale, diabetului zaharat, hipercolesterolemiilor etc.(5)

<sup>2</sup>Autor corespondent: Camil-Eugen Vari, Str Gh. Marinescu, Nr. 38, 540139, Ȑrgu-Mureș, România, E-mail: camil.vari@yahoo.fr, Tel: +40265 215551

Articol intrat în redacție în 10.09.2014 și acceptat spre publicare în 03.11.2014  
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Decembrie 2014;2(4):142-144

## ASPECTE CLINICE

### MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

*Suplimentele alimentare analizate și metoda analitică.*

*Standarde și reactivi*

Substanțele etalon (sildenafil, vardenafil, tadalafil) au fost de minim 98,0% puritate și au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich.

Toți solvenții folosiți: metanol, acetonitril, acid formic au fost de puritate HPLC și achiziționați de la firma Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

*Prepararea soluțiilor standard*

Au fost preparate soluții stoc de 1 mg/ml în metanol, iar soluțiile de lucru au fost obținute prin diluarea soluțiilor stoc cu metanol.

*Sistemul cromatografic*

Determinările au fost efectuate pe un sistem cromatografic Merck Hitachi format din: pompă binară L-7100 cu degazor L-7612; injector automat L-7200 cu termostat L-7360 și detector DAD 7455.

*Aparatură utilizată:*

Balanță AB54S (Mettler-Toledo), pH-metru MP225 (Mettler-Toledo), centrifugă 2-15 (Sigma), mixer 10 (Falc Instruments), aparat de purificare a apei Direct Q (Millipore), baie de ultrasunete Transsonic T700H (Elma).

*Coloana cromatografică:* Phenomenex C<sub>8</sub> 150x4,6 mm 5μm

*Faza mobilă*

Faza mobilă a fost formată din faza A=0,1% acid formic în apă și faza B=0,1% acid formic în acetonitril, eluția făcându-se cu gradient de concentrație faza A scăzând de la 80% la 20 % în 15 minute.

*Detecția s-a făcut la 262 nm.*

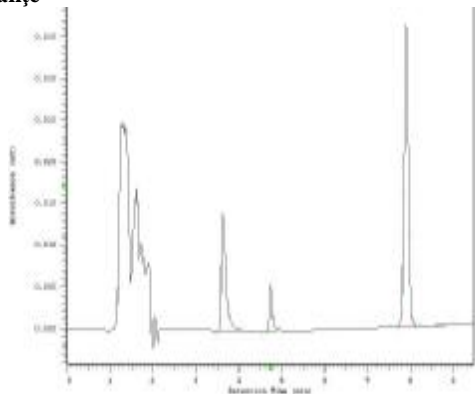
*Suplimentele alimentare și medicamentele achiziționate de pe internet*

Un număr de 5 suplimente alimentare au fost achiziționate din farmacie, iar 5 suplimente și un medicament Viagra® de 100 mg de pe internet. Extracția substanțelor active s-a făcut cu fază mobilă prin agitare în baia de ultrasunete timp de 20 minute la temperatura camerei. Amestecul a fost centrifugat la 3500 rpm timp de 15 minute, iar supernatantul filtrat a fost injectat în sistemul cromatografic.

### REZULTATE

Metoda descrisă permite o bună separare a sildenafilului (t<sub>R</sub>-7,89 min), tadalafilului (t<sub>R</sub>-3,77 min) și a vardenafilului (t<sub>R</sub>-4,67 min) din amestec (figura nr. 1).

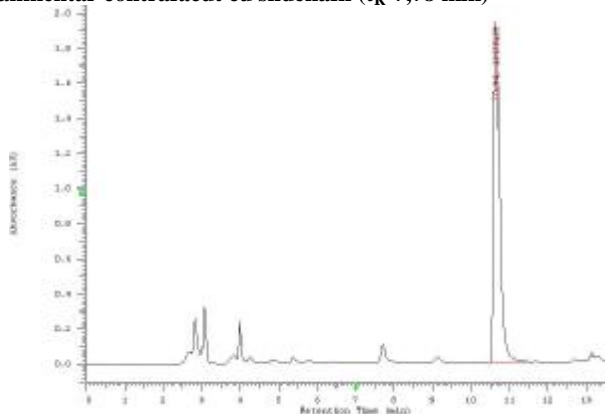
**Figura nr. 1. Cromatograma amestecului standard de tadalafil (t<sub>R</sub>-3,77 min), vardenafil (t<sub>R</sub>-4,67 min), sildenafil (t<sub>R</sub>-7,89 min) cu concentrația de 10 μg/ml în cazul fiecărei substanțe**



Analiza suplimentelor alimentare pentru tratamentul disfuncției erectile la bărbați achiziționate din farmacie (N=5

suplimente) nu a pus în evidență prezența sildenafilului, tadalafilului sau a vardenafilului, în schimb, în cazul suplimentelor achiziționate de pe internet (N=5 suplimente), în două dintre ele a fost identificat sildenafilul (figura nr. 2). Cele două suplimente alimentare, pretinse de origine naturală, au avut un conținut de sildenafil de  $13,87 \pm 1,79$  mg/capsulă și, respectiv,  $18,34 \pm 2,16$  mg/capsulă.

**Figura nr. 2. Cromatograma unei probe de supliment alimentar contrafăcut cu sildenafil (t<sub>R</sub>-7,78 min)**



**Tabelul nr. 1. Conținutul în sildenafil al unor suplimente alimentare achiziționate de pe internet**

Suplimentul alimentar	Timp de retenție (minute)	Sildenafil (mg/formă farmaceutică)
S <sub>1</sub>	7,78	13,87 ± 1,79 mg/capsulă
S <sub>2</sub>	7,72	18,34 ± 2,16 mg/capsulă

Produsul cu conținut declarat de sildenafil (Viagra® 100 mg) achiziționat de pe internet a prezentat un conținut mediu de  $135,80 \pm 5,07$  mg sildenafil/comprimat (+35,80 %).

**Tabelul nr. 2. Conținutul în sildenafil al unor comprimate de Viagra® achiziționate de pe internet**

Proba nr	Conținut declarat mg sildenafil/tabletă	Conținut real mg sildenafil/tabletă	Diferența%
P <sub>1</sub>	100 mg	133,77	33,77
P <sub>2</sub>		141,24	41,24
P <sub>3</sub>		129,76	29,76
P <sub>4</sub>		138,43	38,43
<b>Valoare medie</b>		<b>135,80</b>	<b>35,80</b>
<b>DS</b>		<b>5,07</b>	
<b>CV%</b>		<b>3,73</b>	

### DISCUȚII

Metoda analitică dezvoltată este o alternativă simplă și ieftină comparativ cu determinările prin LC-MS.

După scoaterea în afara legii a magazinelor tip "spice shop", comercializarea produselor contrafăcute presupuse a fi de origine vegetală în România se face pe scară largă prin intermediul internetului.(6)

Analizele efectuate arată că suplimentele alimentare analizate achiziționate din farmacie (5 suplimente alimentare pentru tratamentul disfuncției erectile) nu conțin inhibitori de fosfodiesterază 5 de tipul sildenafilului, tadalafilului sau vardenafilului. Dintre suplimentele achiziționate de pe internet (5 suplimente alimentare) în două dintre ele s-au pus în evidență doze mici de sildenafil (13,87 mg/capsulă și, respectiv, 18,34 mg/capsulă). Un studiu efectuat în Japonia arată că vânzările suplimentelor alimentare contrafăcute sau a medicamentelor de pe piața neagră depășesc de 2,5 ori vânzările legale.(7) Analiza a

## ASPECTE CLINICE

538 suplimente alimentare contrafăcute confiscate în Olanda între anii 2007-2010 arată că 98% conțineau inhibitori de fosfodiesterază 5 (72% conțineau sildenafil, 14% tadalafil și doar 2% vardenafil), acest studiu concluzionând că introducerea acestor substanțe în suplimente alimentare pentru disfuncție erectilă are ca scop vânzarea unor produse eficiente cu riscul punerii în pericol a sănătății.(8) În afara sildenafilului, tadalafilului sau a vardenafilului, suplimentele alimentare pot conține analogi structurali fără autorizație de punere pe piață, cu efecte adverse impredictibile datorită lipsei de selectivitate PDE-5/PDE-6.(9)

În ceea ce privește tabletele de sildenafil (Viagra® 100 mg) achiziționate de pe internet și conținând în realitate 135,80 ± 5,07 mg sildenafil (+35,80%), acestea expun consumatorul în primul rând la efecte adverse cardiovasculare. O metaanaliză din 2010 a mai multor studii arată că bolile cardiovasculare sunt una din cauzele disfuncției erectile la bărbați și, în același timp, utilizarea inhibitorilor de fosfodiesterază 5 la acești pacienți produc efecte adverse cardiovasculare (risc crescut de infarct miocardic acut, palpitații, tahicardie).(10)

O altă posibilă complicație a terapiei cu inhibitori de fosfodiesterază 5 o constituie priapismul descris la 2,5% din pacienți pentru sildenafil de 50 mg și la 2,7% din pacienți la sildenafil de 100 mg.(10) Supradozarea sildenafilului (11) sau medicația concomitentă (antagoniști alfa-adrenergici, psihotrope de tipul amitriptilinei, nortriptilinei sau flufenazinei) pot dubla riscul de priapism.(10)

Acestă "supradozare" a sildenafilului în tabletele achiziționate ilicit nu constituie un fapt singular. În 2008 proiectul VICTORY a analizat 518 tablete de sildenafil de pe piața neagră dintre care 284 (55%) conțineau substanța ca atare în doza menționată (100 mg) și 234 de tablete (45%) erau contrafăcute, conținutul lor în sildenafil variind între 24-157 mg/tableta presupusă a conține 100 mg sildenafil citrate.(4)

Studiul mai recent arată că tadalafilul a fost identificat în suplimente alimentare ilicite în compoziția capsulei gelatinoase, astfel o analiză de rutină a conținutului capsulei nu pune în evidență falsificarea.(12)

### CONCLUZII

Au fost analizate 10 suplimente alimentare, 5 achiziționate din farmacie în care nu s-au pus în evidență inhibitori de fosfodiesterază-5 de tipul sildenafilului, tadalafilului sau a vardenafilului și 5 achiziționate de pe internet, două dintre ele conținând doze subminimale, dar active de sildenafil. În tabletele Viagra® achiziționate de pe internet doza declarată pe ambalaj era depășită semnificativ.

#### Notă:

Cercetările au fost finanțate de Universitatea de Medicină și Farmacie Tirgu-Mureș prin proiectul CIGCS nr. 1098/6/31.01.2013

### REFERINTE

1. Cairoli C, Reyes LA, Henneges C, Sorsaburu S. PDE5 inhibitor treatment persistence and adherence in Brazilian men: post-hoc analyses from a 6-month, prospective, observational study. *Int Braz J Urol* 2014;40(3):390-9.
2. Fejős I, Neumajer G, Béni S, Jankovics P. Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC-UV using sildenafil as a sole reference. *J Pharm Biomed Anal* 2014;98:327-33.
3. Order no. 244/401/2005 of the Minister of Agriculture, Forestry and Rural Development and the Minister of Health of Romania.
4. Taher A, Setiawati A. VICTORY project: a study of

counterfeit PDE5 inhibitor (sildenafil) in Indonesia. *Acta Med Indones* 2013;45(4):290-4.

5. <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm048386.htm> (accesat în data de 10.09.2014).
6. Ancuceanu R, Dinu M, Aramă C. Weight loss food supplements adulteration and multiple quality issues in two products of Chinese origin. *Farmacia* 2013;61(1):28-44.
7. Sugita M, Miyakawa M. Economic analysis of use of counterfeit drugs: health impairment risk of counterfeit phosphodiesterase type 5 inhibitor taken as an example. *Environ Health Prev Med* 2010;15(4):244-51.
8. Venhuis BJ, Zwaagstra ME, van den Berg JDJ, van Riel AJHP, Wagenaar HWG, van Grootheest K, Barends DM, de Kaste D. Illicit erectile dysfunction products in the Netherlands: A decade of trends and a 2007-2010 product update. *RIVM Rapport 370030003*, National Institute for Public Health and the Environment; 2010. p. 75.
9. Pissarnitski D. Phosphodiesterase 5 (PDE 5) inhibitors for the treatment of male erectile disorder: attaining selectivity versus PDE6. *Med Res Rev* 2006;26(3):369-95.
10. Giuliano F, Jackson G, Montorsi F, Martin-Morales A, Raillard P. Safety of sildenafil citrate: review of 67 double-blind placebo-controlled trials and the postmarketing safety database. *Int J Clin Pract* 2010;64(2):240-55.
11. Coralic Z, Lenhoff T, Kanzaria HK, Gerona R. A 120-hour case of priapism from an over-the-counter herbal supplement. *Ann Pharmacother* 2013;47(2):289-90.
12. Venhuis BJ, Tan J, Vredenburg MJ, Ge X, Low MY, de Kaste D. Capsule shells adulterated with tadalafil. *Forensic Sci Int* 2012;214(1-3):20-2.