

FALOŠNÉ LIEKY - AKO ICH ODHALIŤ?

**PETER PATLEVIČ^a, FRANTIŠEK DORKO^{a,c},
PAVOL ŠVORC JR.^b, JANKA VAŠKOVÁ^d
a LADISLAV VAŠKO^d**

^a Ústav anatómie, ^b Ústav fyziológie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Syllabova 19, 703 00 Ostrava – Zábřeh, ^c Ústav anatómie, Lékařská Fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Šrobárová 2, 040 80 Košice, ^d Ústav lekárskej a klinickej biochémie a LABMED a.s., Lékařská Fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP č. 1, 040 66 Košice
peter.patlevic@osu.cz

Došlo 8.8.11, prepracované 17.7.12, prijaté 30.7.12.

Kľúčové slová: falošné lieky, spektrálne metódy, artemisinin, sildenafil

Obsah

1. Úvod
2. Analytické metódy aplikované pri skúmaní pravosti liekov
 - 2.1. Kolorimetria
 - 2.2. Tenkovrstvová chromatografia (TLC)
 - 2.3. Plynová chromatografia (GC)
 - 2.4. Vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC)
 - 2.5. Hmotnostná spektrometria (MS)
 - 2.6. FTIR spektroskopia
 - 2.7. NIR spektroskopia
 - 2.8. Ramanova spektroskopia (RS)
 - 2.9. NMR spektroskopia
3. Porovnanie analytických metód z hľadiska odhalenia liekových falzifikátov
4. Záver

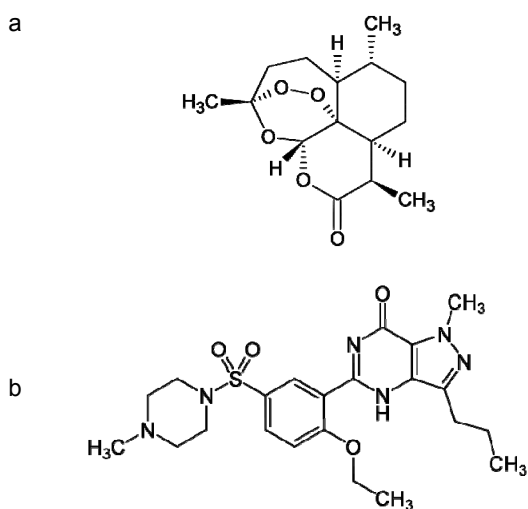
1. Úvod

V posledných rokoch sa dramaticky zvýšil počet falošných liekov. Predpokladá sa, že až 10 % liekov dostupných na svetovom trhu predstavujú práve ich falzifikáty. Ide o veľmi lukratívny obchod, ktorý ponúka lacné lieky, pričom výdavky na ich výrobu sú nižšie ako vo farmaceutickom priemysle. Vo všeobecnosti môžeme liek definovať ako produkt získaný z liečiv a farmaceutických pomocných látok určitým technologickým postupom, všeobecne prispôbený na to, aby sa v ňom obsiahnuté liečivo moh-

lo aplikovať a uplatniť tak biologický účinok, ktorého je nositeľom¹. Pri výrobe falzifikátov nie sú dodržiavané pravidla GMP (Good Manufacture Practice), od pravých liekov sa líšia aj prítomnosťou nebezpečných prísad, ktoré majú za úlohu zjednodušiť a zlacniť výrobný proces. O ilegálne predávaných liekoch nám predajca nedokáže poskytnúť vierohodné informácie. Zloženie, výrobca, účinnok, proces zabezpečenia kvality (výroba, skladovanie, transport) zostávajú neznáme, preto ich môžeme nazývať falošnými liekmi². V krajinách Európskej únie sa najčastejšie falšujú tzv. lieky životosprávy – lieky na chudnutie a zníženie hladiny cholesterolu, lieky na spanie, na zníženie krvného tlaku, lieky na erektilnú dysfunkciu, antikarcinogénne lieky, hormóny a doplnky výživy podporujúce rast svalov. Časté sú aj prípady falšovania liekov kardiovaskulárneho systému, antibiotiká a antivirálné prípravky. V rozvojových krajinách sa bežne falšujú lieky, ktoré sa využívajú na liečbu AIDS, tuberkulózy a malárie. Najvyššia dostupnosť k týmto liekom je cez internet³. Uvedenie falzifikátu na trh je trestným činom a zistenie takehoto preparátu by malo byť okamžite hlásené príslušnému štátnemu orgánu (v SR Štátny ústav pre kontrolu liečiv, v ČR Štátni ústav pro kontrolu léčiv), ktorý daný preparát podrobí analýze a na základe toho vydá rozhodnutie o pravosti alebo nepravosti lieku.

Nebezpečenstvo užívania falošných liekov spočíva v prítomnosti nízkej alebo vysokej koncentrácie účinnej látky a iných potenciálne nebezpečných prímiesí (kyselina boritá, nikel, nemrznúca zmes, olovnatá farba, čistiace prostriedky), ktoré môžu byť zdraviu škodlivé⁴. Pre spotrebiteľa a dokonca aj pre odborníka je niekedy nemožné rozpoznať na pohľad falošnú napodobnenu od pravého lieku. Jedinou cestou je podrobiť potencionálne falošný liek chemickej analýze⁵. Najčastejšie sa využíva vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC), ktorá je považovaná za „zlatú“ štandardnú analytickú metódu pri analýze liekov². Medzi menej náročné metódy, ktoré sa využívajú pri analýze liekov, patria tenkovrstvová chromatografia (TLC) a kolorimetrický test. Z moderných metód sa využívajú hmotnostná spektrometria (MS), Ramanova a infračervená (IR) spektroskopia a nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia (NMR). Medzi ďalšie používané metódy patrí RTG difrakcia, spektrofluorimetria, kapilárna elektroforéza a iné. Spolu tieto analytické metódy umožňujú zistiť nielen chemické zloženie lieku (účinné látky), ale aj koncentráciu jednotlivých zložiek ako aj prítomnosť nečistôt. Na základe toho možno daný liek označiť za pravý alebo falošný².

V referáte sme v krátkosti popísali jednotlivé analytické metódy využívané pri identifikácii pravosti lieku v praxi na príklade derivátov artemisinínu (ARTs), veľmi účinného lieku proti malárii alebo na lieku Viagra, s účinnou látkou sildenafil (obr. 1). Do skupiny ARTs patrí



Obr. 1. Chemická štruktúra artemisinínu (a) a sildenafilu (b)

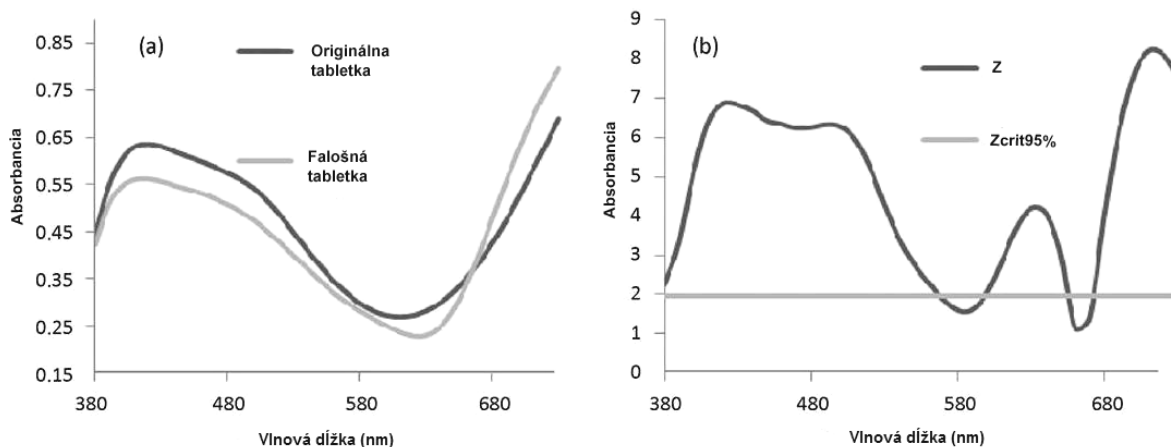
artemeter (AM, metylester dihydroartemisinínu), arteter (etyester dihydroartemisinínu), artesunát (AS, hemisukcinát dihydroartemisinínu rozpustný vo vode) a dihydroartemisinín (DHA, aktívny metabolit artemisinínu).

Z dvanástich liekov proti malárii používaných vo svete, približne osem z nich predstavujú falzifikáty^{2,6}.

2. Analytické metódy aplikované pri skúmaní pravosti liekov

2.1. Kolorimetria

Každá analyzovaná vzorka si vyžaduje svoju špecifickú prípravu pre použitie tejto metódy. Kvalitatívna analýza lieku prebieha vizuálne porovnaním intenzity sfarbenia roztoku s originálnymi štandardmi⁷. V súčasnosti je k dispozícii niekoľko komerčne vyrábaných kolorimetrických testov využívaných na zistenie pravosti ARTs. Pretože ARTs nemajú špecifickú chemickú skupinu, ktorá by okamžite zreagovala s činidlami testu za vzniku farebných produktov, je potrebné nechať zreagovať ARTs s kyselinou alebo zásadou za vzniku reaktívnych produktov, ktoré už poskytujú farebné reakcie. Reakciou AS so zásadou vznikajú produkty, ktoré reagujú s diazóniovou soľou za vzniku žltého sfarbenia roztoku pri pH 4. Pri pH 6–8 dávajú žlté sfarbenie aj iné bežne dostupné antimalariká (artemisinín, sulfadoxín) alebo oranžové sfarbenie (primaquin)⁸. Pri reakcii AM, DHA alebo AS s kyselinou vznikajú produkty, ktoré v reakcii s diazóniovou soľou poskytujú tiež žlté sfarbenie, ale artemisinín, sulfadoxín



Obr. 2. Spektrum (a) a Z test (b) originálnej a analyzovanej tabletky Viagra – 100 mg. Vypočítaná Z hodnota pre väčšinu vlnových dĺžok je oveľa vyššia ako kritická a preto analyzovaná tabletká neprešla testom a bola správne označená ako falzifikát. Prevzaté z cit.¹⁰

a chloroquin dávajú bezfarebnú reakciu. Táto metóda je špecifická pre AM, DHA a AS v reakcii s kyselinou a diazóniovou soľou, avšak nedokáže rozlíšiť jednotlivé účinné látky lieku². Kvantitatívnu analýzu možno vykonať spektrofotometricky a to extrakciou žltého produktu do etylacetátu, pričom absorbancia sa meria pri vlnovej dĺžke 420 nm. Zistiť pravosť lieku proti malárii môžeme aj pomocou optickej metódy refraktometria, kde prostredníctvom merania indexu lomu možno skúmanú látku identifikovať, určiť jej čistotu a koncentráciu. Špecifickosť a správnosť tejto metódy pri antimalarikách predstavuje 87 %, v kombinácii s HPLC je to len 86 %. Ak je refraktometria kombinovaná s kvalitatívnou kolorimetriou, správnosť sa zvyšuje až na 96 %. Takisto účinná je kombinácia kvalitatívnej kolorimetrie s HPLC, pričom správnosť výsledkov je 95 % (cit.^{2,9}).

Obr. 2 zobrazuje analýzu pravej tabletky Viagra a tabletky, ktorá bola zakúpená cez internetový obchod. Vizualne sú tabletky na nerozoznanie, avšak chemická analýza dokázala, že jedna z nich je falzifikát¹⁰.

2.2. Tenkovrstvová chromatografia (TLC)

TLC sa využíva ako rýchla a jednoduchá metóda na kvalitatívne posúdenie zloženia zmesi a na kvantitatívne rozdelenie malých množstiev zmesí, ktorých jednotlivé zložky majú dostatočne rozdielne hodnoty retenčných faktorov (R_f). Pre identifikáciu ARTs je TLC lacný, jednoduchý, rýchly a účinný separačný nástroj¹¹. V roku 2009 Ioset a Kaur vyvinuli nové farebné reakčné postupy využívajúce chromatografické platne s oxidom kremičitým a ako činidlo využili 2,4-dinitrofenylhydrazín (DNP) alebo 4-benzoylamino-2,5-dimetoxybenzéndiazonium chlorid [Fast blue RR salt (FBS)], ktoré v prítomnosti AS, AM alebo DHA dávajú ružový alebo modrý produkt, ale nie v prítomnosti samotného artemisinínu¹². Identifikácia ARTs je jasne stanovená na základe ich R_f po elúcii na TLC platni. Na dôkaz prítomnosti ARTs pomocou DNP a FBS testu je potrebných 2–5 mg látky¹³. TLC modifikovaná podľa Ioset a Kaur (2009) predstavuje vysoko účinnú

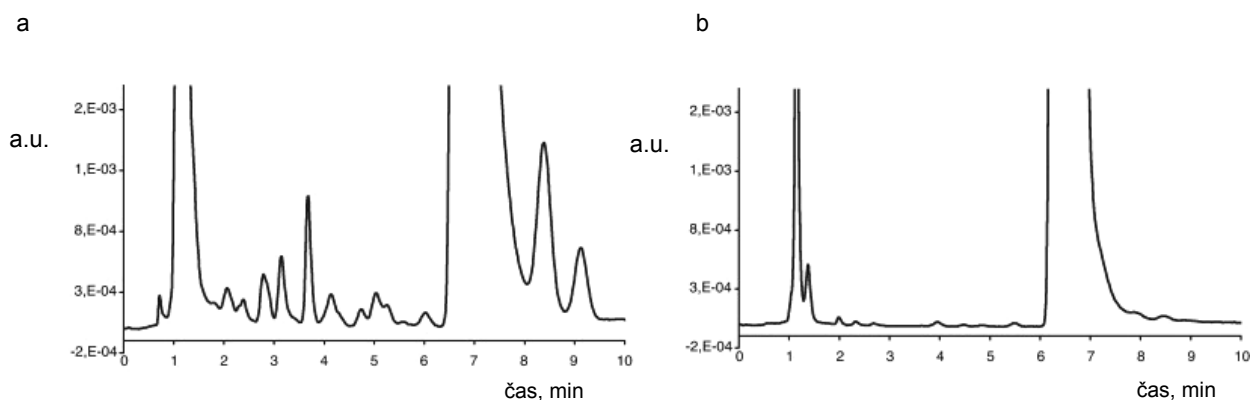
metódu analýzy ARTs, pretože len jedna látka (erytromycín – antibiotikum pôsobiace proti stafylokokom) poskytuje falošne pozitívnu reakciu (dáva ružové sfarbenie podobne ako ARTs pri využití DNP alebo FBS testu) pri analýze antimalarik^{2,14}.

2.3. Plynová chromatografia (GC)

V podmienkach GC môžeme s vysokou citlivosťou a rozlišovacou schopnosťou analyzovať prchavé a stabilné zlúčeniny, ako aj nestabilné a neprchavé zlúčeniny, ktoré môžeme chemickými premenami na takéto upraviť¹⁵. Pred samotnou analýzou je potrebné si vhodne upraviť vzorku (analyzovaná zmes musí byť plynná, alebo ľahko odpariteľná kvapalina, pričom teplota varu je do 300 °C)¹⁶. ARTs sú tepelne nestále a pri teplote 180–200 °C sa rozkladajú na množstvo produktov. Kvantitatívna analýza ARTs sa môže uskutočniť nepriamou trimetylsilyl derivatizáciou alebo prostredníctvom ich najstabilnejších rozkladných produktov¹⁷. Pri kvantitatívnej analýze účinnej látky Viagry sa ako štandardy využívajú jej metabolity, UK-103 a UK-320 (cit.¹⁸).

2.4. Vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

HPLC je moderná forma kvapalinovej chromatografie, ktorá sa uplatňuje vtedy, keď nemožno použiť plynovú chromatografiu pre nízku prchavosť, tepelnú nestabilitu alebo nevyhovujúcu separáciu analytov². V súčasnosti je považovaná za „zlatú“ štandardnú metódu pre kvantitatívnu analýzu účinných látok v liekoch a je využívaná aj ako „potvrdzujúca“ metóda popri iných alternatívnych analytických metód. Jednou z veľkých výhod HPLC je použitie rôznych typov detektorov, napr. UV/VIS detektor, fluorescenčný detektor, elektrochemický a vodivostný detektor, CORONA detektor, ELS (Evaporative Light Scattering Detector) detektor, MS detektor, PDA (Photodiode-array) detektor, ktoré umožňujú detekciu širokej škály látok v danej vzorke. Pre kvantitatívnu analýzu



Obr. 3. HPLC-UV analýza originálnej (a) a falošnej (b) tabletky Viagra. Prevzaté z cit.²⁰

zu ARTs a sildenafilu (obr. 3) sa v súčasnosti využívajú HPLC-PDA (alebo HPLC-UV), HPLC-ELS a HPLC-MS metódy. Citlivosť UV/VIS detektora je pri kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze ARTs nízka v dôsledku toho, že jednotlivé ARTs absorbujú žiarenie o vlnovej dĺžke, ktorá je na spodnej hranici citlivosti detektora (maximálna absorbanca žiarenia je u artemisinínu pri vlnovej dĺžke 192 nm)^{19,20}. ELS a PDA detektory sú v rámci HPLC finančne menej nákladné, citlivé a časovo nenáročné metódy, ktoré umožňujú kvantitatívnu analýzu ARTs už v priebehu desiatich minút²¹.

Spojením HPLC a hmotnostnej spektrometrie (HPLC-MS) možno získať cenné informácie o molekulových hmotnostiach, aj o štruktúre látok s väčšími molekulovými hmotnosťami, väčšou polaritou alebo menšou tepelnou stabilitou než majú zlúčeniny bežne analyzované GC. Technické ťažkosti pri priamom spojení HPLC-MS sú však podstatne väčšie ako pri spojení GC-MS, pretože nosné médium vystupujúce z chromatografickej kolóny je kvapalina. Do iónového zdroja hmotnostného spektrometra preto vstupuje rádovo väčší počet molekúl než pri zavádzaní plynnej fázy a prechod k vysokému vákuu je zložitejší. Postupne sa navrhli rôzne technické riešenia (Elektrospray ionization – ESI, Matrix-assisted laser desorption ionization – MALDI, Atmospheric pressure chemical ionization – APCI) s cieľom zaistiť čo najúčinnější prevod vzorky do hmotnostného spektrometra pri potlačení rušivého vplyvu veľkého nadbytku mobilnej fázy pri prietokoch používaných pri práci s konvenčnými analytickými kolónami. S kvapalinovou chromatografiou sa najčastejšie používajú kvadrupólové analyzátory alebo analyzátory s iónovou pascou, ktoré majú navyše možnosť MSⁿ analýzy v jednom analyzátore (n-krát opakovaná MS/MS analýza). Výhodou týchto dvoch analyzátorov je potreba nižšieho vákuu ako pre magnetické analyzátory². Pre stanovenie ARTs si našli uplatnenie kvadrupólový hmotnostný spektrometer, hmotnostný spektrometer s iónovou pascou a časovo-preletový hmotnostný spektrometer (Time of Flight Mass Spectrometry, TOF-MS). HPLC-TOF-MS je účinný a spoľahlivý nástroj pre okamžitú identifikáciu aktívnych zložiek antimalarik (artemisinín, AS, AM, DHA, sulfadoxín, pyrimetamín) ako aj ich nežiaducich prísad (erytromycín, paracetamol)²².

2.5. Hmotnostná spektrometria (MS)

MS umožňuje vysokú citlivosť detekcie skúmanej látky (detekcia zanedbateľných množstiev aj v mnoho komponentných zmesiach) a možnosť kombinovať so separačnými metódami (GC, HPLC, ITP – capillary isotachopheresis, atď.). V hmotnostnej spektrometrii sa používajú rôzne techniky ionizácie látok (ionizácia elektrickým poľom, ionizácia elektrosprejom – ElectroSpray Ionisation – ESI, ionizácia pri atmosferickom tlaku – API, chemická ionizácia)²³. DART (Direct analysis in real time) je nová metóda hmotnostnej spektrometrie, ktorá vo veľkej miere našla svoje uplatnenie pri analýze ARTs. Táto metóda pracuje v otvorenom priestore s využitím iontových zdro-

jov pre priamu analýzu v reálnom čase. Technika DART využíva plazmou excitované atómy hélia a častice atmosféry (H₂O, O₂) k ionizácii zložiek vzorky. Ióny sú generované v otvorenej atmosfére medzi iónovým zdrojom a hmotnostným spektrometrom a tie sú snímané cez kužeľovitý vstup spektrometra²⁴. Takto sú získané relatívne jednoduché hmotnostné spektrá charakterizované [M+H]⁺ v pozitívnom móde alebo [M-H]⁻ v negatívnom móde²³. Ionizácia vzorky z antimalarik v prítomnosti NH₃ ako dopantu umožňuje jednoduchšiu a rýchlejšiu analýzu ARTs (najmä AS a artemisinínu)². DESI-MS (Desorption-ionizácia elektrosprejom) analýza využíva tekutý sprej s vysokorychlostnými elektricky nabitými časticami (DESI sprej), ktorý je nasmerovaný na vzorku (tabletku) umiestnenú na vonkajšej strane hmotnostného spektrometra. DESI sprej postupne rozptyľuje častice zo vzorky, ktoré sa stávajú súčasťou nabitých kvapôčok. Desolváciou a iónovou evaporáciou nabitých kvapôčok dochádza k vzniku iónov, ktoré sú následne analyzované spektrometrom²⁵. Veľkou výhodou DESI-MS je to, že prúd spreja môžeme nasmerovať na ktorúkoľvek časť povrchu tabletky a tým zistiť chemickú homogenitu lieku^{26,27}. Obidve techniky (DART a DESI) sú vysoko citlivé analytické metódy, ktoré dokážu pracovať s veľmi malými množstvami vzorky (18 µg mg⁻¹) a analyzovať širokú škálu liekov².

2.6. FTIR spektroskopia

V posledných rokoch dochádza k praktickému rozšíreniu infračervených spektrometrov s Fourierovou transformáciou (FTIR)²⁸. Spektrometer FTIR využíva Michelsonov interferometer, ktorý na princípe interferencie zosilňuje, resp. zoslabuje žiarenie z polychromatického zdroja. Spracovaný signál vo forme interferogramu upraví počítač matematickým postupom (Fourierova transformácia). Týmto matematickým procesom sa získa infračervené absorpčné spektrum. Oproti klasickým IR spektrometrom vykazujú FTIR spektrometre celú radu výhod. Pri meraní na detektor dopadá vždy celý zväzok žiarenia. Takéto usporiadanie umožňuje aj experimenty s vysokými energetickými stratami. Pri analýze ARTs sa využíva ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection – metóda zoslabenia úplného odrazu) metóda v spektrálnej oblasti 400–4000 cm⁻¹. ATR-FTIR je rýchla a veľmi citlivá metóda pre autentifikáciu farmaceutických produktov, zvlášť antimalarik. Základnou zložkou príslušenstva pre ATR je kryštál vyrobený z materiálu, ktorý je priepustný pre infračervené žiarenie (napr. ZnSe, Ge, KRS-5 alebo diamant), málo rozpustný vo vode a má vysoký index lomu. Na jeho povrchu sa nachádza meraná vzorka. Vďaka optickej konštrukcii nástavca s malým vzorkovým priestorom je možné priamo analyzovať malé množstvá vzoriek²⁹.

2.7. NIR spektrometria

Spektrometria v blízkej infračervenej oblasti (NIR) využíva spektrálnu oblasť blízkeho infračerveného žiarenia o vlnovej dĺžke 700–2500 nm. NIR spektroskopy sa

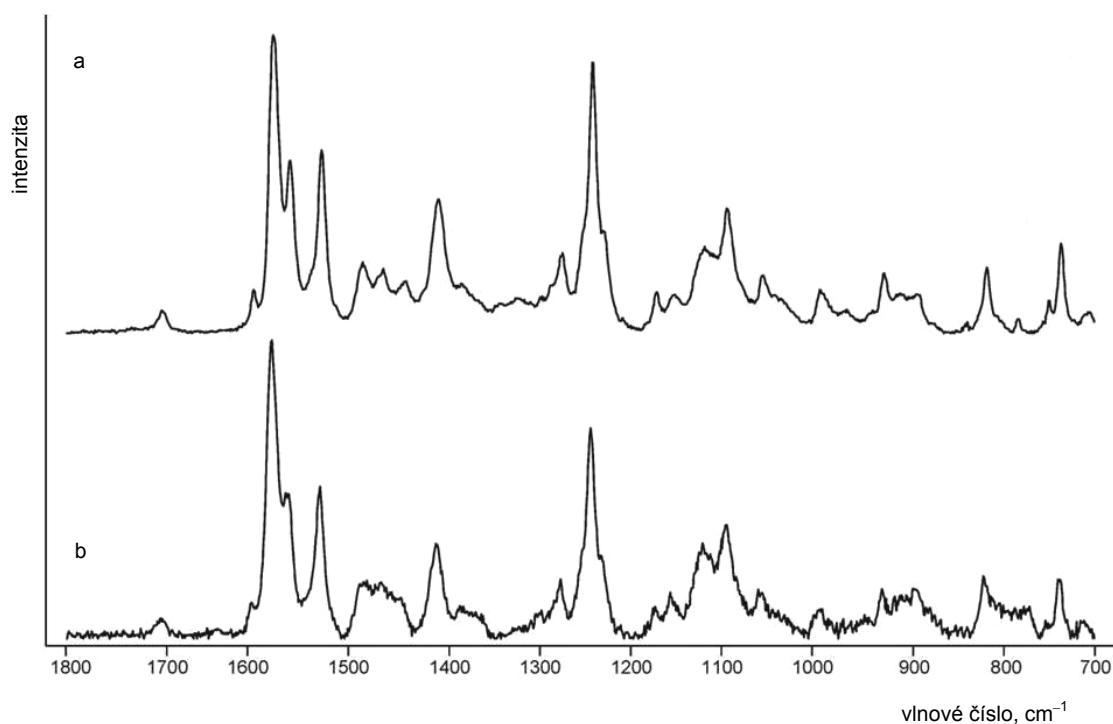
stali kľúčovými prístrojmi pri presných analýzach farmaceutických komponentov a predikcii výrobných parametrov. Pri kvalitatívnej analýze sa získané spektrá porovnávajú s knižnými spektrami. Často sa NIR spektrá triedia a klasifikujú s využitím chemometrických metód. V mnohých prípadoch je možné stanoviť viac zložiek vedľa seba bez toho, aby bolo nutné deliť zložité zmesi. Preto sa NIR spektrometria zvykne zaraďovať aj medzi tzv. procesné analytické metódy, kde sa kladie dôraz na rýchlosť samotnej analýzy vrátane možnosti kontinuálnej on-line analýzy vo výrobnom procese a nie na jej presnosť³⁰. Samotné meranie NIR spektrometriou s využitím rôznych techník merania NIR spektier (transmisné meranie, reflexné techniky, využitie vláknovej optiky s rôznymi typmi sond) je pomerne rýchle, často nedeštruktívne a obvykle nevyžaduje žiadnu špeciálnu úpravu vzoriek. Minimalizuje sa tak spotreba chemikálií a jednorázovo použiteľných analytických setov. Pre kalibráciu je potrebné v NIR spektrometrii vyvíjať kalibračné modely s využitím pokročilých chemometrických algoritmov, ktoré však vyžadujú rozsiahlu sadu štandardov (bežne v praxi viac ako 30 kalibračných vzoriek). Ako základný algoritmus sa v minulosti využívala viacnásobná lineárna regresia (MLR – multiple linear regression). Pre analýzu ARTs sa využíva metóda čiastočných najmenších štvorcov (PLS – partial least squares). Pri použití tejto regresnej metódy sa v rámci kalibračného modelu využívajú nielen hodnoty absorbancie v maximách vybraných pásov, ale väčšinou sa vyhodnocujú širšie spektrálne úseky alebo dokonca celé NIR spektrá. Pri liekoch

proti malárii umožňuje PLS analýza rozlíšiť ich pravosť alebo falzum s vysokou presnosťou³¹.

2.8. Ramanova spektroskopia (RS)

RS je nedeštruktívna analytická metóda, ktorá študuje neelastický rozptyl monochromatického svetla, ktorého zdroj je zvyčajne laser. Látka je presvetlená kontinuálnym laserom s úzkou spektrálnou čiarou (látka nemusí absorbovať svetlo laseru). Získané spektrá nesú v sebe informáciu o špecifických chemických väzbách a symetrii molekúl. V súčasnosti sa RS používa vo viditeľnej, blízkej IČ a tiež v UV oblasti. RS sú identifikované látky (napr. drogy, lieky) skryté v rôznych maticiach. Ramanovo spektrum je nezameniteľný diagnostický znak danej látky – „odtlačok prsta“^{32,33}. Je to rýchla metóda, analýza jedného bodu trvá niekoľko minút, vzorka môže byť v ľubovoľnom skupenstve a nemusí byť vákuovo kompatibilná, meracie zariadenie nie je komplikované, vysoké nároky sú však kladené hlavne na detekčnú časť meracích aparátov. RS sa dajú veľmi rýchlo identifikovať jednotlivé zložky antimalarík. Táto metóda je štandardne využívaná pri analýze pravosti lieku Viagra (obr. 4)³⁴.

SORS (Spatially offset Raman spectroscopy) je variant RS, ktorý umožňuje veľmi presnú analýzu predmetov, ktoré sa nachádzajú pod organickým alebo anorganickým povrchom bez narušenia povrchovej vrstvy (tabletky pašované v tele, tabletky vo vnútri plastových fliaš)². Meranie pozostáva najmenej z dvoch Ramanových meraní



Obr. 4. Ramanove spektrum sildenafilu (a) a originálnej tabletky Viagra (b) ($700\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{ nm}$). Prevzaté z cit.³³

skúmanej vzorky, pričom počet meraní závisí od počtu vrstiev, pod ktorými sa látka nachádza. Ramanove spektrá sa získavajú nielen meraním povrchu skúmanej látky, ale aj priestoru vo vzdialenosti 3–7 mm od dopadu žiarenia na povrch látky. Takto získané spektrá môžeme vyhodnotiť pomocou PCA (Principal Component Analysis).

2.9. NMR spektroskopia

NMR spektroskopiou sa sledujú prechody medzi jednotlivými spinovými stavmi atómových jadier v silnom magnetickom poli. Od roku 1997 je táto metóda považovaná za prísny regulátor trhu s farmaceutickými produktmi – FDA (Food and Drug Administration). NMR spektrometre sú počítačom riadené vysielače a súčasne prijímače rádiových vln. Vzorka je umiestnená v dutine supravodivého magnetu³⁶. V súčasnosti je k dispozícii DOSY NMR spektroskopia (Diffusion-ordered ¹H NMR spectroscopy), ktorá umožňuje komplexnú kvalitatívnu analýzu liekov bez počiatkovej separácie jej rôznych zložiek a preto sa využíva pri analýze ich pravosti. DOSY metóda sa vyznačuje ľahkou štandardizáciou a automatizáciou analýzy³⁷. Kvantifikácia všetkých zložiek liekov môže byť vykonaná bežnou ¹H NMR spektroskopiou. Úplná chemická informácia získaná z 1D a 2D ¹H NMR spektroskopie a DOSY predstavuje účinnú identifikáciu, kvantifikáciu a efektívnu separáciu takmer všetkých organických zložiek liekov. Takáto súhra NMR metód umožňuje rozlíšiť originálny liek od falošných, ako sú antidepresíva, lieky na erektilnú dysfunkciu a antimalariká. Pre antimalariká sú získané DOSY spektrá „odtlačkom prsta“ pre ich účinné látky a falošné zložky².

3. Porovnanie analytických metód z hľadiska odhalenia liekových falzifikátov

Nie všetky analytické metódy využívané pri dôkaze pravosti lieku poskytujú úplne presnú informáciu o chemickej štruktúre skúmanej látky. Mnohé zo spomenutých analytických metód sú nedeštruktívne a zahŕňajú v sebe nielen kvalitatívnu, ale aj kvantitatívnu analýzu (HPLC, NIR, Ramanova spektroskopia). Kolorimetria ako aj tenkovrstvová chromatografia sa využívajú na kvalitatívnu analýzu skúmanej látky, následná kvantitatívna analýza prebieha za využitia spektroskopických metód. Preto kombinácia dvoch alebo viacerých analytických metód predstavuje veľmi silný nástroj pre skrining a charakterizáciu pravých a falošných liekov. ¹H NMR spektroskopia a DOSY sú významným prostriedkom pre identifikáciu všetkých organických zložiek analyzovaného lieku, zatiaľ čo vibračná spektroskopia a RTG difrakcia umožňujú identifikovať anorganické látky. Zobrazovacie analytické metódy ako FTIR spektroskopia a DESI-MS analyzujú priestorovú distribúciu a homogénnosť rôznych zložiek na povrchu tabletky². Veľkou nevýhodou NIR je jej závislosť na referenčných metódach, u niektorých typov spektrometrov obmedzený prevod kalibrovania medzi

rôznymi prístrojmi a zložitý výklad získaných údajov³⁸. Mnohé z týchto analytických metód sú po prístrojovej stránke finančne nákladné a vyžadujú si školený personál nielen pre ich obsluhu, ale aj pre vyhodnocovanie výsledkov².

4. Záver

V referáte sme popísali najbežnejšie používané analytické metódy, ktoré sa využívajú pri kontrole kvality farmaceutických výrobkov. Z hľadiska finančnej dostupnosti sa dnes bežne využívajú chromatografické metódy, ale čím ďalej tým viac sa do popredia dostávajú nedeštruktívne spektroskopické metódy (NIR, FTIR, NMR, Ramanova spektroskopia), pretože poskytujú dostatočné množstvo informácií o štruktúre molekuly účinných látok ako aj ich prímiesi a s vysokou účinnosťou dokážu rozlíšiť originálny liek od falzifikátov. S ohľadom na analýzu pravosti liekov proti malárii a Viagry sú Ramanova spektroskopia a HPLC s PDA alebo MS detekciou „zlaté“ štandardné analytické techniky pre identifikáciu a kvantifikáciu ich účinných látok a rôznych prímiesi. Ostatné popísané analytické metódy v tomto referáte (TLC, GC, kolorimetria) sa využívajú ako doplnkové pre potvrdenie alebo doplnenie výsledkov analyzovaných vzoriek.

LITERATÚRA

1. Newton P. N., Lee S. J., Goodman C., Fernandez F. M., Yeung S., Phanouvong S., Kaur H., Amin A. A., Whitty C. J. M., Kokwaro G. O., Lindegardh N., Lukulay P., White L. J., Day N. P. J., Green M. D., White N. J.: *PLoS Med.* 6, e1000052 (2009).
2. Martino R., Malet-Martino M., Gilard V., Balayssac S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 77 (2010).
3. Cockburn R., Newton P. N., Agyarko E. K., Akunyili D., White N. J.: *PLoS Med.* 2, e100 (2005).
4. Newton P. N., Green M. D., Fernandez F. M., Day N. P. J., White N. J.: *Lancet Infect. Dis.* 6, 602 (2006).
5. Aldhous P.: *Nature* 434, 132 (2005).
6. Lon C. T., Tsuyuoka R., Phanouvong S., Nivanna N., Socheat D., Sokhan C., Blum N., Christophel E. M., Smine A.: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 1019 (2006).
7. Green M. D., Mount D. L., Wirtz R. A., White N. J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, 65 (2000).
8. Green M. D., Mount D. L., Wirtz R. A.: *Trop. Med. Int. Health* 6, 980 (2001).
9. Green M. D., Nettey N., Rojas O. V., Pamanivong Ch., Khounsaknalath L., Ortizc M. G., Newton P. N., Fernández F. M., Vongsack L., Manolin O.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 1890 (2007).
10. Rodomonte A. L., Gaudiano M. C., Antoniella E., Lucente D., Crusco V., Bartolomei M., Bertocchi P., Manna L., Valvo L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 215 (2010).
11. Sherma J.: *Acta Chromatogr.* 19, 5 (2007).

12. Ioset J. R., Kaur H.: PLoS One 4, e7270 (2009).
13. Jahnke R. W. O.: Pharm. Ind. 66, 1187 (2004).
14. Basco L. K.: Am. J. Trop. Med. Hyg. 70, 245 (2004).
15. Mohamed S. S., Khalid S. A., Ward S. A., Wan T. S. M., Tang H. P. O., Zheng M., Haynes R. K., Edwards G.: J. Chromatogr., B 731, 251 (1999).
16. Liu S., Tian N., Li J., Huang J., Liu Z.: Biomed. Chromatogr. 23, 1101 (2009).
17. Peng C. A., Ferreira J. F. S., Wood A. J.: J. Chromatogr., A 1133, 254 (2006).
18. Berzas J. J., Rodríguez J., Villasenor M. J., Contento A. M., Cabello M. P.: Chromatographia 55, 601 (2002).
19. Ferreira J. F. S., Gonzalez J. M.: Phytochem. Anal. 20, 91 (2009).
20. Sacré P. Y., Deconinck E., Daszykowski M., Courselle P., Vancauwberghe R., Chiap P., Crommen J., De Beer J. O.: Anal. Chim. Acta. 701, 224 (2011).
21. Gaudin K., Kauss T., Lagueny A. M., Millet P., Fawaz F., Dubost J. P.: J. Sep. Sci. 32, 231 (2009).
22. Hall K. A., Newton P. N., Green M. D., de Veij M., Vandenabeele P., Pizzanelli D., Mayxay M., Dondorp A., Fernandez F. M.: Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 804 (2006).
23. Chen H., Talaty N. N., Takáts Z., Cooks R. G.: Anal. Chem. 77, 6915 (2005).
24. Daňhelová H., Čajka T., Hajšlová J.: Chem. Listy 105, 16 (2011).
25. Rodriguez-Cruz S. E.: Microgram J. 6, 10 (2008).
26. Petucci Ch., Diffendal J., Kaufman D., Mekonnen B., Terefenko G., Musselman B.: Anal. Chem. 79, 5064 (2007).
27. Wiseman J. M., Laughlin B. C.: Curr. Sep. Drug Dev. 22, 11 (2007).
28. Guiliano M., Asia L., Onoratini G., Mille G.: Spectrochim. Acta, Part A 67, 1407 (2007).
29. Ricci C., Nyadong L., Fernandez F. M., Newton P. N., Kazarian S. G.: Anal. Bioanal. Chem. 387, 551 (2007).
30. Nicolai B. M., Beullens K., Bobelyn E., Peirs A., Saeys W., Theron K. I., Lammertyn J.: Postharvest Biol. Technol. 2007, 99.
31. Dowell F. E., Maghirang E. B., Fernandez F. M., Newton P. N., Green M. D.: J. Pharm. Biomed. Anal. 48, 1011 (2008).
32. Strauch B., Vlčková B., Němec I.: Chem. Listy 104, 1210 (2010).
33. Veij M., Deneckere A., Vandenabeele P., Kaste D., Moens L.: J. Pharm. Biomed. Anal. 46, 303 (2008).
34. Ricci C., Nyadong L., Yang F., Fernandez F. M., Brown C. D., Newton P. N., Kazarian S. G.: Anal. Chim. Acta 623, 178 (2008).
35. Barančíková B.: Chem. Listy 102, 1100 (2008).
36. Antalek B.: Concepts Magn. Res. 14, 225 (2002).
37. Balaýssac S., Gilard V., Delsuc M.-A., Malet-Martino M.: Spectrosc. Eur. 21, 10 (2009).
38. Mlček J., Rop O., Šustová K., Simeonovová J., Gál R.: Chem. Listy 104, 855 (2010).

P. Patlevič^a, F. Dorko^{a,c}, P. Švorc Jr.^b, J. Vašková^d, and L. Vaško^d (^aDepartment of Anatomy, ^bInstitute of Physiology, Faculty of Medicine, University, Ostrava, ^cDepartment of Anatomy, ^dDepartment of Medical and Clinical Biochemistry and Labmed, Faculty of Medicine, Pavol Jozef Šafárik University, Košice): **False Drugs – How to Reveal Them?**

False drugs are unsafe products that are manufactured using incorrect, inactive, or harmful ingredients. These drugs are packaged and labeled to look like real trademark generic drugs to deceive the consumer. Chemical analysis is a crucial step in distinguishing original pharmaceuticals and fakes. HPLC and MS analyses are standard methods for identification and quantitation of active ingredients and impurities. Thus they are often used to corroborate the results of less sophisticated methods such as colorimetry, TLC, GS, Raman, NIR, FTIR and NMR spectrometries. The analytical methods should be employed in forensic laboratories.