

Analitičke i kemometrijske strategije u fingerprint karakterizaciji prirodnih bioaktivnih tvari

Lazarevski, Jelena

Professional thesis / Završni specijalistički

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:035875>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO BIOKEMIJSKI FAKULTET

Jelena Lazarevski

**ANALITIČKE I KEMOMETRIJSKE STRATEGIJE U "FINGERPRINT"
KARAKTERIZACIJI PRIRODNIH BIOAKTIVNIH TVARI**

Specijalistički rad

Zagreb, 2019.

Rad je predan na ocjenu Vijeću za specijalističke studije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, radi stjecanja akademskog stupnja sveučilišnog magistra iz područja Razvoja lijekova.

Mentor rada: prof. dr. sc. Renata Jurišić Grubešić

Specijalistički rad obranjen je dana _____ na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.

Rad ima ___ listova.

PREDGOVOR

Rad je izrađen u okviru poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Ovim sam radom proširila znanja iz razvoja i primjene prikladnih analitičkih metoda za karakterizaciju prirodnih bioaktivnih tvari, s naglaskom na *fingerprint* analizi, te stekla nova znanja o kemometrijskim pristupima analizi i prikazivanju kompleksnih rezultata dobivenih kromatografskim fingerprintiranjem uzoraka prirodnog podrijetla.

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Renata Jurišić Grubešić na pristupačnosti i stručnim savjetima vezanim uz izradu završnog specijalističkog rada.

SAŽETAK

Prirodne ljekovite tvari od pamtivijeka se primjenjuju u tretmanu različitih zdravstvenih tegoba. Općenito se vjeruje da je rizik njihove uporabe nizak, no izvješća o neželjenim reakcijama upućuju na potrebu razvoja djelotvornih sustava njihove karakterizacije. To je od iznimne važnosti jer su takvi pripravci često vrlo kompleksnog sastava, a razumijevanje njihovog ponašanja u organizmu te profila kakvoće neophodno je za prosudbu sigurnosti primjene. U karakterizaciji prirodnih tvari koriste se mnoge analitičke tehnike, među kojima kromatografski *fingerprint* zauzima značajno mjesto. Brzi razvoj kromatografije te poboljšani instrumentalni sustavi pridonijeli su generiranju ogromne količine analitičkih podataka, a primjena kemometrije, koja koristi relevantne matematičke i statističke modele, omogućuje oblikovanje optimalnog mjeriteljskog postupka i dobivanje maksimalnog broja informacija iz eksperimentalnih podataka.

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je analiza literature vezane uz karakterizaciju prirodnih bioaktivnih tvari i proizvoda, s naglaskom na pristupima koji se temelje na kemijskom i biološkom *fingerprintu*. Obradit će se relevantne analitičke metode koje se primjenjuju u *fingerprint* karakterizaciji uzoraka prirodnog podrijetla, s naglaskom na kromatografske metode.

Prikazat će se kemometrijske strategije u prosudbi eksperimentalnih podataka dobivenih *fingerprint* analizom.

Materijali i metode

Istraživanja provedena u okviru ovoga specijalističkog rada teorijskog su karaktera i obuhvaćaju detaljan pregled dostupne stručne i znanstvene literature čija je tematika vezana za područje teme rada. Pretraživane su sve dostupne bibliografske baze podataka rada i servisi (Medline/PubMed, ScienceDirect, EMBASE i dr.), uz primjenu ključnih riječi poput: *fingerprint, quality control, chromatography, data analysis, chemometrics* i sl.

Baza podataka o do sada poznatim vrstama *fingerprint* analitičkih metoda i njihovim karakteristikama prikupljena je detaljnim pregledom dostupne literature iz područja kontrole kakvoće prirodnih bioaktivnih tvari, s naglaskom na kromatografskoj *fingerprint* analizi i odgovarajućim kemometrijskim pristupima. Pregledom relevantnih publikacija, prikupljeni su podatci vezani uz kemometrijske alate u obradi sirovih podataka dobivenih *fingerprint* karakterizacijom. Pregledane su također publikacije Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), Američka farmakopeja (USP), Europska farmakopeja (Ph. Eur. 9), međunarodne smjernice o dobroj praksi na području biljnih lijekova, te recentni znanstveni i stručni članci čija je tematika vezana uz temu i sadržaj završnog specijalističkog rada.

Rezultati

Uloga i značaj uvođenja kromatografskog *fingerprinta* te kemometrijskog pristupa za karakterizaciju, prosudbu i kontrolu kakvoće uzoraka prirodnog podrijetla prikazana je iz pregleda studija provedenih u zadnjem desetljeću, s posebnim naglaskom na recentnim studijama provedenim u posljednjih nekoliko godina.

U pregledu je naglašena važnost ovakvog pristupa karakterizaciji uzoraka prirodnog podrijetla te njihovog razlikovanja od krivotvorina na temelju glavnih bioaktivnih komponenata te ukupne fitokemijske različitosti.

Zaključak

Lijekovi prirodnog podrijetla koji ulaze u sastav tradicionalnih medicina široko se primjenjuju diljem svijeta. No, zbog složenosti njihovog sastava, raspoloživi podatci o njihovoj autentifikaciji, djelotvornosti i sigurnosti ne ispunjavaju kriterije koji bi podržali njihovu globalnu uporabu. Metoda *fingerprinta* opisuje integralnu karakterizaciju i odražava interaktivne aspekte složenih komponenata te stoga može ponuditi mogućnost ocjenjivanja kakvoće spomenute skupine terapeutika slijedeći cjeloviti pristup. Kemometrijske tehnike uvode multivarijatne analitičke metode u *fingerprint* radi dobivanja čim više korisnih informacija, a što je u skladu s holističkim pristupom te igra značajnu ulogu u osnovi istraživanja. Najvažnije analitičke tehnike korištene u *fingerprintu* uključuju kromatografske i spektroskopske metode. Iako je kemometrija ključna u procjeni kakvoće lijekova prirodnog podrijetla, kromatografski *fingerprint* nije u svim slučajevima idealno rješenje za određivanje svih prisutnih spojeva. Stoga se istražuju i kombinacije kemijskog *fingerprinta* s biološkim metodama, *biofingerprintom* i *metaboličkim fingerprintom*. Farmakodinamika i eksportni sustavi lijekova prirodnog podrijetla nalaze se u fokusu znanstvenih istraživanja, međutim još uvijek je potrebno uložiti znatne napore kako bi se dobio savršen sustav za karakterizaciju i procjenu kakvoće kompleksnih uzoraka iz prirodnih izvora.

SUMMARY

Natural medicinal substances are used in the treatment of various health problems since time immemorial. It is generally believed that the risk of their use is low, but reports of adverse reactions suggest the need to develop effective system of characterization. This is crucial because such preparations are often very complex, and understanding of their behaviour in the human organism, as well as the quality profile is essential for evaluation of their safety use. Many cutting-edge analytical technologies have been introduced to evaluate the quality of natural products and significant amount of measurement data has been produced. Among the analytical methods, chromatographic fingerprinting has been recommended as a potential and reliable methodology for characterization and quality control of natural products. The fast evolution of chromatographic science and the improved instrumentation generates enormous amount of analytical data. Chemometrics, which uses relevant mathematical and statistical models, enables the design of optimal metrological process and obtaining the maximum information from experimental data.

Objectives

The aim of the research is to analyse the literature related to the characterization of natural medicinal products with an emphasis on chemical and biological *fingerprint* analyses. Relevant analytical methods applied in *fingerprint* characterization with emphasis on chromatographic methods will be processed.

Chemometric strategies will be presented in the evaluation of experimental data obtained by *fingerprint* analysis.

Materials and methods

Research carried out within this specialist work includes an overview of all available publications using available bibliographic databases and services (Medline / PubMed, ScienceDirect, EMBASE and others), with the use of keywords such as *fingerprint*, quality control, chromatography, data analysis, chemometrics etc.

The database of well-known types of *fingerprint* analytical methods and their characteristics was collected through a detailed review of available literature in the field of quality control of natural bioactive substances, with an emphasis on chromatographic *fingerprint* analysis. The World Health Organization (WHO), the US Pharmacopoeia (USP), the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), International Good PhytoChannel Guidelines, and recent scientific and expert articles have also been reviewed.

By reviewing the relevant literature, data were collected on the chemometric tools used in the processing of raw data obtained by *fingerprint* characterization.

Results

The role and importance of the introduction of chromatographic *fingerprinting* and the chemometric approach for characterization, judgment, and quality control of samples of natural origin is presented from a review of studies conducted in the last decade, with emphasis on recent studies conducted over the last few years. The review emphasizes the importance of this approach for distinguishing many samples of natural origin from their counterfeits based on their principal, bioactive components and phytochemical diversity.

Conclusion

The usage of traditional medicines has expanded globally, but the data about authentication, efficacy, and safety is far from sufficient to meet the criteria supporting their use worldwide due to complexity in the composition. *Fingerprinting* describes integral characterization and reflects interactive aspects of complex components; therefore, it can offer the possibility of evaluating quality of traditional medicines following the overall principle. Chemometric techniques introduce multivariate analytical methods into *fingerprinting* to obtain more information that is useful, which is consistent with the holistic thought and plays an important role in research on the substantial basis. The most important analytical techniques used in developing *fingerprints* include chromatographic and spectroscopic methods. Although chemometrics is crucial in assessing the quality of natural medicines, chromatographic *fingerprinting* is not always the ideal solution for determining all adherent compounds. Therefore, combinations of chemical *fingerprinting* with biological methods, *bio-fingerprinting* and metabolic *fingerprinting* are also explored. The pharmacodynamics and export systems of herbal medicines are the focus of research by scientists; however, efforts are still needed to obtain the perfect system for evaluating the quality of such complex samples from different natural sources.

SADRŽAJ

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	3
3.	MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	4
3.1.	Propisi i smjernice o provjeri kakvoće biljnih lijekova.....	4
3.2.	Analitičke strategije.....	6
3.3.	<i>Fingerprint</i> biljnih uzoraka.....	8
3.3.1.	Biološka <i>fingerprint</i> karakterizacija.....	10
3.3.2.	Kemijska <i>fingerprint</i> karakterizacija	13
3.3.3.	Kromatografski <i>fingerprint</i>	15
3.3.4.	Spektroskopski <i>fingerprint</i>	22
3.4.	Kemometrija.....	23
3.4.1.	Univarijatna analiza.....	26
3.4.1.1.	χ^2 - test	27
3.4.1.2.	<i>Kolmogorov-Smirnov test</i>	27
3.4.1.3.	<i>Analiza varijance (Fischerova analiza varijance ili ANOVA)</i>	28
3.4.1.4.	<i>Scheffé-ov post hoc test</i>	28
3.4.1.5.	<i>Obrada podataka i statistička analiza</i>	29
3.4.2.	Multivarijatna analiza	31
3.4.2.1.	<i>Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLS)</i>	34
3.4.2.2.	<i>Analiza glavnih komponenata (PCA)</i>	35
3.4.2.3.	<i>Faktorska analiza (FA)</i>	36
3.4.2.4.	<i>Klaster analiza (CA)</i>	36
3.4.2.5.	<i>Diskriminacijska analiza (DA)</i>	37
3.5.	Validacija kemometrijskih modela i analiza nepoznatih uzoraka.....	38
3.6.	Primjena <i>fingerprinta</i> i kemometrije u analizi uzoraka prirodnog podrijetla	40

4.	RASPRAVA.....	53
5.	ZAKLJUČAK.....	62
6.	LITERATURA.....	65
7.	KRATICE.....	70
8.	ŽIVOTOPIS.....	73

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Brzorastuća industrija proizvoda prirodnog podrijetla, posebice biljnih pripravaka, kao i nedostatak odgovarajuće regulative, uzrokom su zabrinutosti Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i drugih regulatornih tijela za sigurnost primjene i učinkovitost takvih proizvoda. Stoga je WHO dala smjernice za procjenu kakvoće spomenute skupine terapeutika (1).

Prirodne ljekovite tvari mogu sadržavati velik broj spojeva koji su, iako ponekad prisutni u niskim koncentracijama, značajni za njihovu kakvoću, sigurnost i učinkovitost. No, njihovo sinergijsko djelovanje i terapijski učinci vezani su uz interakcije s brojnim tvarima s kojima se primjenjuju.

U karakterizaciji prirodnih bioaktivnih tvari, kromatografija predstavlja moćan alat za odjeljivanje pojedinačnih komponenata te za utvrđivanje karakterističnog profila uzorka koji se naziva *fingerprint*. U *fingerprint* karakterizaciji primjenjuju se različite analitičke tehnike, poput tankoslojne kromatografije (TLC), plinske kromatografije (GC), tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), kapilarne elektroforeze (CE) i mnogih drugih. Spregnute kromatografske i spektroskopske tehnike, npr. HPLC-DAD, HPLC-MS, GC-MS, CE-DAD, HPLC-NMR i dr., daju dodatne informacije nužne za kvalitativnu i kvantitativnu analizu te određivanje strukture prirodnih bioaktivnih tvari. Spregnute tehnike pokazuju značajan napredak u eliminaciji instrumentalnih interferencija, pomaka retencijskih vremena, u selektivnosti, sposobnosti odjeljivanja pojedinih srodnih komponenata složenih smjesa te preciznosti mjerenja.

Navedene tehnike generiraju veliku količinu analitičkih podataka koju je potrebno kvalitetno obraditi budući da karakterizacija složenih sustava može biti problematična. Idealan put u rješavanju tog problema predstavlja kemometrija, disciplina koja koristi matematičke i statističke metode kako bi oblikovala ili odabrala optimalan mjeriteljski postupak te omogućila dobivanje maksimalnog broja informacija analizom dobivenih podataka. Kemijski *fingerprint* u kombinaciji s kemometrijskim metodama omogućava kvalitetno praćenje i upravljanje procesom karakterizacije i kontrole kakvoće složenih prirodnih uzoraka (2).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je analiza literature vezane uz karakterizaciju prirodnih ljekovitih proizvoda, s naglaskom na analizama temeljenim na kemijskom i biološkom *fingerprintu*. Obradit će se relevantne analitičke metode koje se primjenjuju u *fingerprint* karakterizaciji, s naglaskom na kromatografskim metodama.

Prikazat će se kemometrijske strategije u prosudbi eksperimentalnih podataka dobivenih *fingerprint* analizom.

Istaknut će se uloga i značaj uvođenja takvog analitičkog i kemometrijskog pristupa za karakterizaciju, prosudbu i kontrolu kakvoće uzoraka prirodnog podrijetla.

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. Propisi i smjernice o provjeri kakvoće biljnih lijekova

Prirodne ljekovite tvari od pamtivijeka se primjenjuju u tretmanu različitih zdravstvenih tegoba. Općenito se vjeruje da je rizik njihove uporabe nizak, no izvješća o neželjenim reakcijama upućuju na potrebu razvoja djelotvornih sustava njihove karakterizacije. To je od iznimne važnosti jer su takvi pripravci često vrlo kompleksnog sastava, a razumijevanje njihovog ponašanja u organizmu te profila kakvoće neophodno je za prosudbu sigurnosti njihove primjene (3).

Zabilježeni su brojni slučajevi kada su biljni proizvodi bili dostupni na tržištu, a da prethodno nisu ispitani na prikladan način, odnosno, njihova je kakvoća bila upitna, često i neodgovarajuća. Uočena je također kontaminacija biljnih proizvoda različitim pesticidima, neki su uzorci bili neodgovarajuće mikrobiološke čistoće, zabilježene su i nedopuštene razine teških metala te drugih onečišćenja, kao i prisutnost nekih kemijskih aktivnih tvari koje se koriste i odobrene su za proizvodnju lijekova (4, 5). Uzroci prisutnosti pesticida, teških metala i neodgovarajuće mikrobiološke čistoće mogu biti povezani s izvorom i podrijetlom biljnog materijala (rast u onečišćenom okolišu ili onečišćenje prilikom sabiranja biljnog materijala), dok ostala onečišćenja mogu nastati tijekom neprikladnog čuvanja biljnog materijala ili neodgovarajućom obradom (6). Neki od navedenih nepovoljnih čimbenika mogu se izbjeći implementacijom standardnih operativnih postupaka (SOP) i prihvaćanjem smjernica Dobre prakse: poljoprivredne (GAP), sakupljačke (GCP), laboratorijske (GLP), dobavljačke (GSP), te Dobre proizvođačke prakse u proizvodnji biljnih proizvoda (GMP) (7, 8).

Upravo je nedostatak propisa i smjernica u brzorastućoj industriji prirodnih ljekovitih tvari uzrokovao zabrinutost Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i drugih regulatornih tijela za sigurnost i učinkovitost biljnih lijekova. Prvi dokumentirani zapis o potrebi uključivanja tradicionalnih lijekova u nacionalne zakone o lijekovima datira iz 1978. godine te potječe od WHO. Od tada su uloženi veliki naponi kako bi se uvele analitičke metode za provjeru kakvoće biljnih lijekova i drugih terapeutika tradicionalnih medicina, uz objavljivanje nekoliko smjernica koje su služile kao regulatorni okvir za druge agencije. Američka agencija za hranu i lijekove (USFDA) i Europska agencija za lijekove (EMA) prihvatile su također prednosti kromatografskog *fingerprinta* te promiču njegovu primjenu u provjeri kakvoće biljnih lijekova (3).

EMA je revidirala smjernice o kakvoći tradicionalnih biljnih lijekova u ožujku 2011. Smjernice uključuju zahtjeve za provjeru kakvoće polaznih materijala te gotovog biljnog lijeka. Kromatografski *fingerprint* se navodi kao zahtjev u ispitivanju stabilnosti biljnih lijekova (9).

USFDA je u prosincu 2016. izdala smjernice za industriju koje zamjenjuju smjernice izdane u lipnju 2004. te predstavljaju najnovija stajališta Agencije vezana uz razvoj biljnih lijekova. USFDA smjernice također definiraju zahtjeve za provjeru kakvoće koji uključuju potvrdu identiteta, kao i kemijsku karakterizaciju biljnih aktivnih supstancija te biljnih lijekova. Polazni materijali biljnog podrijetla karakteriziraju se primjenom spektroskopskih i kromatografskih metoda te, ukoliko je potrebno, DNA *fingerprint* metodom (10).

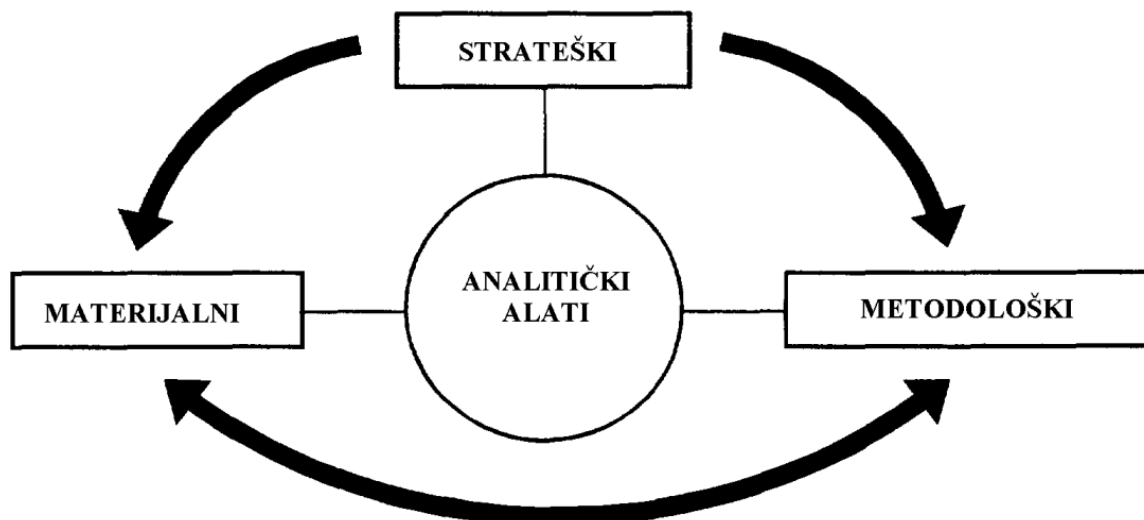
Razvoj zakonskih okvira za pojedine skupine proizvoda utjecao je na njihovu bolju kakvoću na tržištu te uključuje pregled registracijske dokumentacije, provjeru prikladnosti označavanja proizvoda i upute za korisnika od strane nadležnih regulatornih tijela te postmarketinško praćenje i prijavu nuspojava.

Budući da su biljni sustavi iznimno kompleksni, a sadržaj bioaktivnih sastavnica često promjenjiv i ovisan o brojnim i raznolikim čimbenicima, očita je potreba uvođenja novih pristupa identifikaciji i kontroli kakvoće takvih kompleksnih uzoraka; oni mogu biti usmjereni ili prema pojedinačnom, specifičnom spoju (analiza temeljena na biljezima) ili obuhvaćaju čitav uzorak (*fingerprint analiza*) (11), što je i predmet istraživanja ovoga specijalističkog rada.

3.2. Analitičke strategije

Tijekom zadnjih desetljeća razvile su se brojne metode za obradu signala u analitičkoj kemiji. Obrada signala u modernoj analitičkoj kemiji podrazumijeva korištenje računala, a prikupljeni podatci o analitu obrađuju se matematičkim i statističkim metodama pomoću računalnih programa. Moderna analitička kemija ima također važnu ulogu u ispitivanju kakvoće tradicionalnih biljnih lijekova.

Analitička kemija se može definirati kao grana kemije koja se bavi istraživanjem kvalitativnih i kvantitativnih informacija preko kojih dolazi do podataka o sastavu materije. Najopsežnija definicija analitičke kemije koja u sebi sadrži i definira primjenu takvih alata (Slika 1), zajedno s informacijom o različitim vrstama analita, bila bi sljedeća: *„Analitička kemija je metrologijska znanost koja razvija, unaprjeđuje te primjenjuje strateške (planiranje, dizajn, unapređivanje, prilagođavanje), metodološke i materijalne (aparatura, instrumenti i kemikalije) alate široke primjene (kemijske, fizikalne, matematičke, biološke, biokemijske itd.) koji se koriste za prikupljanje što kvalitetnijih (bio)kemijskih informacija o djelomičnoj (prisutnost, koncentracija ili struktura analita) i globalnoj prirodi materijala ili sustava vrlo promjenjive naravi (kemijski, biološki i biokemijski) u prostoru i vremenu da bi se riješili problemi čiji su izvor znanstveni, tehnički ili društveni problemi“.*



Slika 1: Analitički alati koji se koriste prilikom provođenja analitičkog procesa (31).

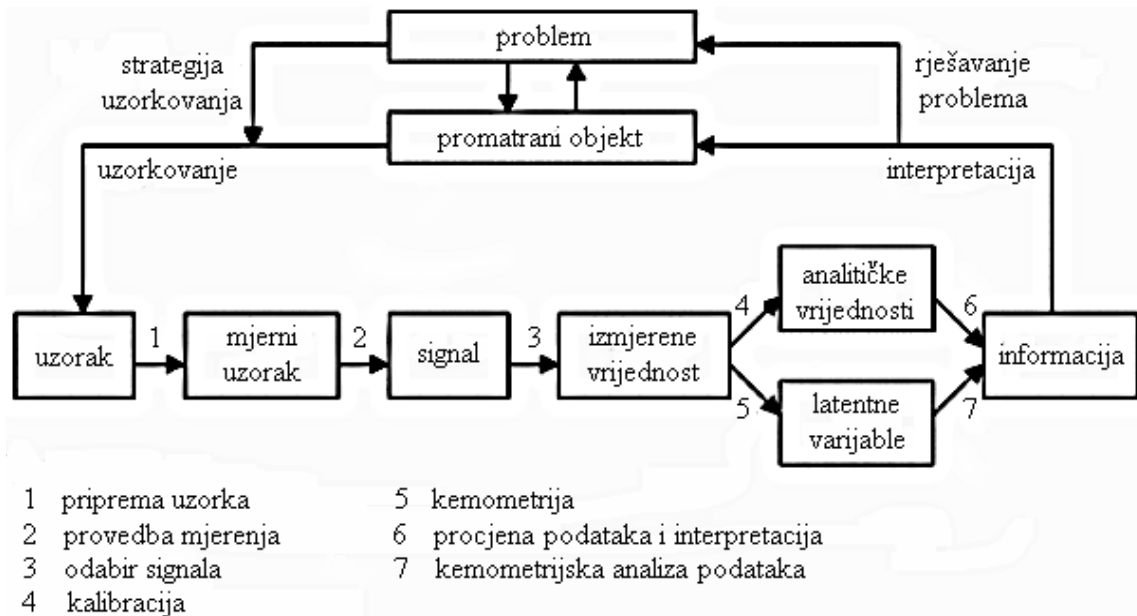
Ovakva definicija svrstava analitičku kemiju u dio metrologije, znanosti o mjerenju (grč. *metron logos*), koja proučava kvantitativne informacije o materijalu (ili sustavu) kojeg proučavamo. Vidi se da je zaista glavna zadaća analitičke kemije dobiti što kvalitetnije i pouzdanije informacije o sastavu materije, ali se pritom ne smije zaboraviti da je dužnost analitičkog kemičara konstantno razvijanje i poboljšavanje analitičkih metoda kojima se do njih dolazi.

Iz predloženih se definicija može uočiti da su ključne riječi u definiranju što je to analitička kemija uzajamno povezane preko pojma *informacija* pa se može reći da je analitička kemija postala svojevrsna znanost o informacijama.

Dobivena informacija uvijek je povezana sa signalima. Pojam *analitički signal* odnosi se na sve tipove odziva koji nastaju različitim analitičkim metodama i posljedica su interakcije između uzorka i mjernog sustava.

Podrijetlo signala dobivenih u analitičkoj kemiji determinira uvijek određena vrsta ili strukturalni odnosi između komponenata koje čine uzorak.

Može se reći da su signali glavni cilj svakog analitičara u svim analitičkim metodama te u svim područjima njihove primjene. Postupak dobivanja analitičkih informacija iz prikladnih signala, koji se općenito sastoji od uzorkovanja, analize i procjene, naziva se *analitički proces*, shematski prikazan na Slici 2.



Slika 2: Shematski prikaz analitičkog procesa (31).

3.3. *Fingerprint* biljnih uzoraka

Pojam *fingerprint* najčešće se povezuje s kriminalnim pravom i forenzikom. U širem smislu riječi, međutim, široko se primjenjuje u različitim znanstvenim disciplinama: medicini, biologiji, genetici (kao DNA *fingerprint*) te u farmaceutici (kao *fingerprint* novih supstancija u uzorcima prirodnog podrijetla).

Na materijalima poput kamenja, tla i sedimenata, *fingerprint* se primjenjuje već dugi niz godina. Određivanje njihove genetičke veze je relativno jednostavno u usporedbi s određivanjem istoga u biljnom svijetu.

Mogućnost i želja da se *fingerprint* biljnog materijala koristi za određivanje distribucije kemijskih elemenata očekivana je, budući da njihov sastav značajno ovisi o geokemijskim karakteristikama okoliša u kojem su rasle. S obzirom da je moguće odrediti anorganske komponente takvog okoliša, trebalo bi biti moguće odrediti i sastav biljaka koje su tamo rasle.

Fingerprint biljnog materijala mogao bi olakšati istraživanja u brojnim područjima, od istraživanja okoliša, preko biomonitoringa do bioloških istraživanja.

Neke od mogućih primjena *fingerprinta* jesu:

(1) bolje razumijevanje biljaka i evaluacija načina distribucije elemenata u ekosustavu usporedbom različitih biljnih *fingerprinta*;

(2) brza procjena stupnja zagađenja ekosistema;

(3) mogućnost usporedbe, tipiziranja i sistematiziranja skupina biljaka (12).

Prema Yongyu i suradnicima (13), razlikuje se kemijska i biološka *fingerprint* karakterizacija. **Kemijski fingerprint** koristi se u analizi kemijskog sastava biljnih pripravaka primjenom uglavnom kromatografskih tehnika (TLC, HPLC, GC), kapilarne elektroforeze (CE), spektroskopskih tehnika (UV, IR, MS, XRD) te njihovih spregnutih tehnika. Uz kvalitativne i kvantitativne informacije koje daje klasični kromatografski *fingerprint*, naglašena je i potreba određivanja biološke aktivnosti prirodnih pripravaka.

Biološki fingerprint (14) se definira kao set kromatografskih i/ili spektroskopskih signala koji omogućuju identifikaciju aktivnih komponenata prisutnih u složenom biljnom uzorku. Biološki *fingerprint* se može koristiti u procjeni djelovanja aktivnih komponenata *in vivo* (npr. interakciji sa staničnim membranama, receptorima, enzimima i sl.). Upravo je evaluacija *fingerprinta* ključan dio procjene kakvoće biljnog materijala/proizvoda, dok je najvažniji korak u ispitivanju kakvoće biljnih lijekova ispravna identifikacija (15).

3.3.1. Biološka *fingerprint* karakterizacija

Biološkom *fingerprintu* lijekova/pripravaka koji se primjenjuju u okviru tradicionalne medicine diljem svijeta pridaje se velika pozornost zbog njegove dobre selektivnosti te visoke performanse prilikom razumijevanja farmakologije spomenutih terapeutika. Hanfa Zou i suradnici prvi su inicirali koncept *biološkog fingerprinta* koji je definiran kao usporedba *fingerprint* kromatograma prije i nakon interakcije s biološkim sustavima (DNA, proteini, stanica itd.). Tehnike *biološkog fingerprinta* su kombinacija *kemijskog fingerprinta* i biološke procjene.

Spomenuta je strategija prikladna za karakterizaciju lijekova tradicionalne medicine, točnije, dobro odgovara njihovoj multikomponentnoj prirodi.

Prednost *biološkog fingerprinta* očituje se u sljedećem:

1) simultano prikupljanje dviju vrsta informacija: bioaktivnost i toksičnost komponenata tradicionalnog lijeka te kemijska informacija o aktivnoj ili toksičnoj komponenti korištenjem analitičkih instrumenata;

2) određivanje načina interakcije te dinamike između malih molekula i meta (npr. DNA, specifičnih receptora ili enzima) te evaluacija interakcija između molekula i meta u prisutnosti drugih komponenata što dovodi do otkrića sinergijskog ili supresijskog učinka između različitih komponenata.

Uključene su visokoučinkovite tehnike, u smislu davanja velikog broja informacija, a koje su pritom ekološki prihvatljive jer ne uključuju tradicionalne metode separacije i purifikacije. Separacijske i purifikacijske metode često uključuju znatnu upotrebu organskih otapala, što rezultira i velikom količinom otpadnih otapala poput etera, etil acetata i kloroforma koji su štetni, ne samo za ljude, već i za okoliš. Spomenute tehnike ujedno omogućuju i uspostavljanje pozitivne komunikacije i veze između tradicionalne i konvencionalne medicine.

Ultrafiltracija *online* tandem s tekućinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (**UF-LC/MS**) jedna je od prvih predloženih metoda za *biološki fingerprint* tradicionalnih kineskih lijekova. Uspostavljeni sistem je automatiziran, iako je potrebno repetitivno ispiranje malih molekula. Ukoliko se ne primjenjuje opetovano ispiranje, može doći do lažno pozitivnih rezultata zbog utjecaja na detekciju liganada pomoću masenog detektora. S obzirom na potrebu kućne izrade pojedinih dijelova opreme, rekonstrukcija metode od strane drugih laboratorija je sve samo ne trivijalna. Ultrafiltracija *offline* spregnuta s tekućinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (LC/MS) ne zahtijeva sofisticirane procedure te je široko prihvaćena od strane istraživača. Dodatno, ultrafiltracijske cjevčice potrebne za izdvajanje molekula različite molekulske mase su komercijalno lako dostupne.

Stanična membranska kromatografija (**CMC**) još je jedna tehnika *biološkog fingerprinta* koja se uspješno primjenjuje kod tradicionalnih kineskih lijekova, osobito biljnih injekcija (16). CMC je jednostavna, specifična i brza metoda za istraživanje interakcija između lijekova i receptora, probir aktivnih komponenata iz kompleksnih smjesa i kontrolu kakvoće tradicionalnih kineskih lijekova. Međutim, kratki životni vijek kolona, slaba osjetljivost i efikasnost kolona prilikom razdvajanja komponenata iz smjese te neučinkovitost u identifikaciji strukture predstavljali su usko grlo u primjeni tehnike. Kombiniranje stanične membranske kromatografije s dvodimenzionalnom tekućinskom kromatografijom i detektorima visoke osjetljivosti, poput masenog detektora, značajno je smanjilo gore navedene nedostatke tehnike (17).

Biološki fingerprint temeljen na imobiliziranim nanočesticama (**INP**) je proces u kojem se *fingerprint* kromatogrami tradicionalnih kineskih lijekova uspoređuju prije i nakon inkubacije s ciljanim imobiliziranim nanočesticama. Površinu nanočestica je moguće jednostavno modificirati i obložiti antitijelima, enzimima ili receptorima. U slučaju skupih

meta, ova tehnika je vrlo korisna jer se ciljane imobilizirane nanočestice mogu reciklirati te opetovano koristiti u *biološkom fingerprintu*.

Kapilarna elektroforeza (**CE**) nije samo snažna separacijska tehnika, već je ujedno i svestrana platforma za istraživanje interakcija prepoznavanja na molekularnoj razini, uključujući interakcije protein-niskomolekularni lijekovi, protein-protein, protein-DNA, protein-aptamer, proteinsko agregiranje i antitijelo-antigen. CE služi kao alternativa tekućinskoj kromatografiji te pruža jedinstvene prednosti, poput niskih troškova reagensija, kratkog vremena analize te malih količina potrebnog uzorka za analizu.

Biološki fingerprint baziran na adsorpciji na šupljim vlaknima (**AHF-BF**) koristi se u istraživanju interakcija između tradicionalnih kineskih lijekova i fizički adsorbiranih meta i stanica. Šuplja vlakna služe kao potpora za mete i stanice. Navedena tehnika pokazuje sljedeće nedostatke: **(i)** kako bi se nacijepile stanice, šuplja vlakna se moraju podvrgnuti mnogim, kompleksnim sterilizacijskim procedurama, poput ultrasonifikacije korištenjem acetona, metanola, kiselina, lužina i destilirane vode; **(ii)** mehanizam djelovanja i farmakološki efekt staničnih veziva zahtijeva dodatna istraživanja višestrukim korištenjem *bioassay* tehnike te **(iii)** moraju se provesti nespecifična vezivanja kako bi se isključilo vezivanje nespecifičnih molekula.

Gore navedene tehnike *biološkog fingerprinta* kombinacija su *kemijskog fingerprinta* i biološke procjene. Jednostavne i robusne tehnike poput ultrafiltracije koriste se rutinski, dok se *biološki fingerprint* baziran na kapilarnoj elektroforezi, imobiliziranim nanočesticama, adsorpciji na šupljim vlaknima, koristi kao alternativa. Automatizacija i minijaturizacija bit će trend u budućnosti ovih tehnika. Automatizacija će povećati njihovu učinkovitost i ponovljivost, dok će minijaturizacija osigurati smanjenje potrošnje otapala, skratiti vrijeme analize i učiniti sustave prenosivima (16).

Biološki fingerprint podrazumijeva genomsku analizu. S obzirom da je genetički materijal jedinstven za svaku pojedinu biljnu vrstu, metode koje se zasnivaju na analizi DNA manje su podložne promjenama koje se kod biljaka događaju njihovim starenjem, okolišnim uvjetima, sabiranjem, čuvanjem i obradom. Iako se određivanje *bioloških fingerprinta* koristi pri identifikaciji biljne vrste, takvom vrstom ispitivanja ne mogu se otkriti razlike u kakvoći biljnog materijala koje nastaju radi vanjskih čimbenika. Stoga se *biološki fingerprint* uglavnom koristi kao nadopuna određivanju *kemijskih fingerprinta* koji su orijentirani na kakvoću (18).

3.3.2. Kemijska *fingerprint* karakterizacija

Kemijska *fingerprint* karakterizacija uz pomoć kromatografskih tehnika predstavlja preporučeni način ispitivanja kakvoće biljnih lijekova. *Kemijski fingerprint* opisuje kemijski integritet biljnih lijekova te se stoga može koristiti za identifikaciju te utvrđivanje njihove autentičnosti.

Po definiciji, kromatografski *fingerprint* biljnog lijeka predstavlja u praksi kromatografski uzorak farmakološki aktivne i/ili kemijski karakteristične komponente prisutne u uzorku. Kromatografski *fingerprint* može uspješno demonstrirati istovjetnost i različitost između različitih uzoraka te se autentičnost i identifikacija biljnih uzoraka može uspješno provesti, čak i kada broj i/ili koncentracija kemijski karakterističnih komponenata nije vrlo slična u različitim uzorcima biljnih pripravaka.

Biljni uzorci, pojedinačno i u kombinacijama, sadrže mnoštvo komponenata u složenim matriksima u kojima jedna pojedinačna aktivna supstanca često nije zaslužna za cjelokupnu učinkovitost lijeka. Ova činjenica predstavlja izazov u standardizaciji provjere kakvoće, kako polaznih biljnih materijala, tako i gotovih lijekova.

Terapeutski učinak biljnih lijekova temelji se na kompleksnim interakcijama mnogobrojnih komponenata koje su u potpunosti drugačije od onih u lijekovima dobivenim kemijskom sintezom. Stoga su se postupno uvodile mnogobrojne analitičke metode *kemijskog fingerprinta* u svrhu kontrole kakvoće biljnih lijekova i to tehnike poput tankoslojne kromatografije (TLC), plinske kromatografije (GC), tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) itd.

Kromatografska *fingerprint* analiza biljnih lijekova predstavlja složeni kvalitativni pristup u svrhu potvrde autentičnosti, evaluacije kakvoće te osiguranja ujednačenosti i stabilnosti biljnih lijekova. *Kemijski fingerprint* dobiven pomoću kromatografskih tehnika, osobito pomoću spregnutih kromatografskih tehnika, izrazito je preporučen u provjeri kakvoće biljnih lijekova budući da može predstavljati njihov kemijski integritet te se stoga može koristiti za njihovu autentifikaciju te identifikaciju.

Učinkovitost kromatografskog *fingerprinta* usko je povezana sa stupnjem kromatografske separacije i distribucije svih kemijskih komponenata u ispitivanom biljnom uzorku. Na sreću, kromatografija nudi visoku sposobnost separacije, takvu da se kompleksne kemijske komponente u biljnim ekstraktima mogu razdvojiti u mnoge, relativno jednostavne subfrakcije. Nadalje, pristup u primjeni spregnutih kromatografskih tehnika i spektroskopije, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s foto diodom (HPLC-DAD), plinska kromatografija s spektrometrijom masa (GC-MS), tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (LC-MS) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s nuklearnom magnetskom rezonancijom (HPLC-NMR), mogu dati dodatne spektralne informacije, korisne za kvalitativnu, te čak i strukturnu analizu (19).

Specifičnosti pojedinih kromatografskih tehnika opisane su u narednim poglavljima, 3.3.3 i 3.3.4.

3.3.3. Kromatografski *fingerprint*

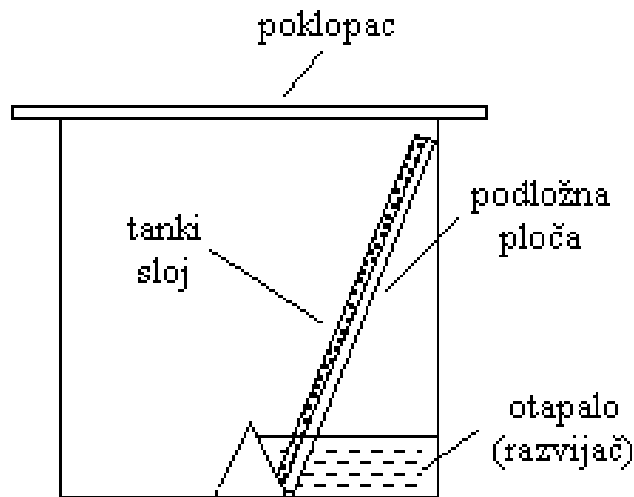
Kromatografski *fingerprint* može sadržavati do stotine komponenata. Iako su mnoge prisutne u niskim koncentracijama, mogu biti važne za kakvoću, sigurnost te učinkovitost biljnih lijekova, budući da su njihovi terapijski učinci bazirani na sinergijskim interakcijama između brojnih sastavnica. Kromatografija u kombinaciji s odgovarajućim detektorom nudi snažan alat za razdvajanje individualnih komponenata te razvoj karakterističnog profila zvanog *fingerprint*. Ovisno o njihovom cilju, znanstvenici razvijaju kromatografski biljni *fingerprint* za kontrola kakvoće temeljenu na biomarkerima, kako bi analizirali određenu grupu komponenata ili kako bi se fokusirali na analizu cjelokupnog uzorka (3).

Kromatografske separacijske tehnike predstavljaju višefazne tehnike odjeljivanja u kojima se komponente uzorka raspodjeljuju između nepokretne/stacionarne i pokretne/mobilne faze. Pri tome stacionarna faza može biti krutina ili tekućina vezana za krutinu/gel, dok je mobilna faza u tekućem ili plinovitom obliku. Kromatografije se temelje na pojavama adsorpcije, razdjeljenja, ionske izmjene ili isključenja koje omogućuju odjeljivanje sastojaka u smjesi. Uzorak otopljen u mobilnoj fazi koja je tekućina, plin ili superkritična tekućina kreće se preko stacionarne faze koja može biti u koloni ili na plohi. Dakle, kromatografski postupci odjeljivanja temelje se na razdiobi između stacionarne faze velike površine i mobilne faze koja prelazi preko stacionarne. Ravnoteže koje određuju fenomene razdiobe ovise o svojstvima obje faze i distribuiranih tvari.

Zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata zove se kromatogram. S obzirom na tip razvijanja kromatograma, razlikujemo plošne i diferencijalne kromatograme. Kod plošnih tehnika, PC i TLC, stacionarna faza je ploha ili se nalazi na plohi, a mobilna se faza kreće silama kapilariteta ili pod utjecajem gravitacije preko

stacionarne faze. Tako nastaju plošni kromatogrami kod kojih razne sastavnice uzorka prelaze različite udaljenosti u istom vremenu pa se po završetku odjeljivanja detektiraju na stacionarnoj fazi. Diferencijalni kromatogrami dobivaju se kolonskim tehnikama, npr. HPLC, GC, SFC. Ovdje svi sastojci prelaze isti put, ali zbog specifičnih interakcija sa stacionarnom fazom, na izlazu iz kolone pojavljuju se u različitom vremenu pa ih se detektira izvan stacionarne faze. Idealni kromatogrami predstavljaju niz Gaussovih krivulja na baznoj liniji (19 , 21).

Tankoslojna kromatografija (**TLC**) je dostupna tehnika koja se koristi za brzi probir uzoraka kako bi se identificirali biljni produkti te razlikovale biljne vrste (Slika 3). Jedna od najvećih prednosti TLC je u fleksibilnosti podešavanja radnih parametara, poput nanošenja uzorka, razvoja ploče, dokumentacije i derivatizacije. No, primjena TLC u analizi i kontroli kakvoće biljnih lijekova ograničena je, s niskom reproducibilnošću i razlučivanjem, visokom koncentracijom komponenata koja je potrebna za detekciju te polukvantitativnom prirodom tehnike. Nekoliko faktora kod tankoslojne kromatografije teško je precizno kontrolirati; detekciju uzorka (mrlja), tlak para unutar komore za razvijanje ploča te nestabilnu koloraciju mrlja prilikom korištenja kromogenih reagensa za detekciju. Ipak, TLC je i dalje često korištena tehnika zbog njezine jednostavnosti te ekonomičnosti, budući da zahtijeva jeftinu opremu i otapala.



Slika 3: Shema TLC kromatografskog sustava.

Razvoj i modifikacije same tehnike pridonijeli su povećanju reproducibilnosti, razlučivanja te osjetljivosti same tehnike. Zajedno s poboljšanim digitalnim skeniranjem te dokumentacijskim softverom koji rezultiraju adekvatnijom ekstrakcijom informacija, primjenjivost TLC u sveobuhvatnoj identifikaciji i evaluaciji biljnih lijekova drastično se povećala.

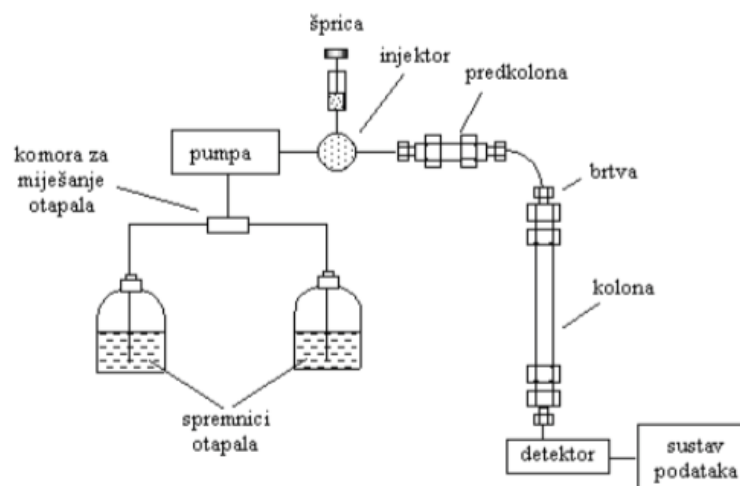
Tankoslojna kromatografija visoke učinkovitosti (**HPTLC**) povećala je reproducibilnost tehnike i razlučivanje komponenata automatizacijom različitih koraka te korištenjem stacionarne faze manjih čestica (5 μm umjesto 20 μm).

Razvoj mikroemulzijske tankoslojne kromatografije (**ME-TLC**) rezultirao je povećanom učinkovitošću separacije i dobivenog signala, smanjujući time limite detekcije te ujedno rezultirajući poboljšanom osjetljivošću tehnike.

Druge popularne modifikacije u biljnoj analizi uključuju denzitometriju koja se koristi za kvantifikaciju komponenata korištenjem digitalnog softvera za skeniranje; dvodimenzionalnu tankoslojnu kromatografiju (**2D-TLC**) u kojoj je uzorak podvrgnut dvama uzastopnim razvijanjima, čime se povećava moć separacije te spregnutu slojevit

planarnu kromatografiju (**graft-TLC**), u kojoj su komponente djelomično razdvojene kod prvog razvijanja te su naknadno transferirane na drugi adsorbens i razvijene u drugoj dimenziji.

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (**HPLC**) je najpopularnija analitička tehnika za analizu biljnih pripravaka/lijekova. HPLC je jednostavna, potpuno automatizirana tehnika visoke rezolucije, selektivnosti i osjetljivosti (Slika 4).



Slika 4: Shema HPLC instrumenta.

Jedna od najvećih prednosti HPLC tehnike je mogućnost sprege s različitim detektorima. U biljnom *fingerprintu*, mnoge objavljene studije koristile su UV i DAD detektor za komponente koje absorbiraju UV svjetlo, ELSD i CL detektor za komponente koje ne absorbiraju UV svjetlo, nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR) za metabolomičko profiliranje te spektrometriju masa (MS) za identifikaciju razdvojenih spojeva. No, HPLC zahtijeva primjenu relativno skupe opreme te često koristi velike količine ekološki neprihvatljivih otapala. Druge mane uključuju i nedetektiranu koeluciju spojeva na konvencionalnim silikatnim kolonama prilikom korištenja mobilnih faza s pH > 9 te pH < 2 te pri visokim temperaturama.

Važan faktor u razvoju *fingerprinta* je i odabir stacionarne faze. Najčešće korištena stacionarna faza u biljnom *fingerprintu* je C18 kolona. Efikasnost ovih kolona jako ovisi o veličini čestica stacionarne faze (najčešće 3-5 μm). Manja veličina čestica stacionarne faze drastično povećava podtlak; kad se veličina čestica prepolovi, tlak se učetverostruči.

Kod HPLC instrumenata koji podnose tlak do 400 bara, ograničena je veća učinkovitost te kraće vrijeme separacije smanjivanjem veličine čestica i povećanjem protoka mobilne faze.

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (**UHPLC**) jedna je od ključnih tehnika za kontrolu kakvoće biljnih lijekova. Dok HPLC može podnijeti tlak do 400 bara, UHPLC modifikacijom instrumenta podiže kromatografiju na novu razinu. UHPLC omogućuje postizanje više rezolucije separacije korištenjem čestica stacionarne faze veličine 2 μm koja je superiorna u odnosu na HPLC analizu. Kako manja veličina čestica doprinosi većoj efikasnosti separacije, mogu se koristiti kraće kolone, uz skraćivanje vremena analize te smanjenje potrošnje otapala. Kako bi se osiguralo optimalno bilježenje uskih pikova u brznoj UHPLC analizi, ovi sistemi zahtijevaju modificirane detektore s manjim protočnim ćelijama manjeg volumena i brzim vremenom akvizicije u usporedbi s konvencionalnim HPLC detektorima.

Posljednjih je godina u mnogim studijama UHPLC *fingerprint* biljnih produkata češće korišten u odnosu na konvencionalni HPLC *fingerprint*. Komparativne studije između HPLC i UHPLC analize pokazale su smanjenje vremena analize za faktor osam, bez gubitka informacija u korist UHPLC. Korištenjem tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti spregnute s masenim detektorima (UHPLC-DAD-TOF-MS), smanjilo se vrijeme analize te se značajno povećala selektivnost tehnike u usporedbi s konvencionalnom HPLC analizom (3).

Jedan od smjerova razvoja analitičkih tehnika i metoda rješavanja kompleksnih analitičkih problema jest primjena sprezanja koja podrazumijeva kombiniranje različitih analitičkih tehnika uz pomoć odgovarajućeg sučelja. Ono podrazumijeva uparivanje tehnike odjeljivanja, kao što je kromatografija, sa spektralnim tehnikama. Pojam sprezanja ("*hyphenation*") prvi je upotrijebio Hirschfield još 1980. godine kako bi opisao moguću kombinaciju dviju ili više instrumentalnih analitičkih metoda u pojedinačnoj analizi (22).

Zbog brzine, razlučivanja i osjetljivosti, UHPLC instrumenti se često kombiniraju s detektorima za spektrometriju masa. Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti spregnuta s masenim detektorom (**UHPLC-MS**) je tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase, točnije ionizirane molekule se razdvajaju na osnovi razlike u omjeru mase i naboja (m/z).

LC-MS/MS predstavlja dodatnu mogućnost analize iona u vremenu ili prostoru, s ciljem da se unaprijedi separacija ili izazove dodatna fragmentacija s pomoću koje se može kvalitetnije odrediti struktura analiziranog iona.

Korištenje LC-MS/MS tehnike (tandemska spektrometrija masa) ima prednost nad LC-MS tehnikom upravo zbog povećane osjetljivosti (u QQQ zbog smanjenog šuma detektora) i povećane specifičnosti detekcije. Ova detekcija i separacija odvija se u sekundama, tako da do detekcije određenih fragmenata dolazi dok se još odvija separacija na samoj koloni UHPLC instrumenta. Primjer prednosti korištenja LC-MS/MS tehnike nad LC-MS tehnikom su strukturalni izomeri sličnog kemijskog ponašanja na koloni koji jednostrukim ioniziranjem (LC-MS) daju iste ione u masenom spektru, a dodatnom fragmentacijom (LC-MS/MS) daju različite ionske fragmente (23).

Plinska kromatografija (**GC**) je poznata analitička tehnika koja se široko primjenjuje za karakterizaciju i identifikaciju hlapljivih komponenata. Snažna učinkovitost separacije

i osjetljivost detekcije (plameno-ionizacijskog, FID, ili masenog detektora, MS) čine GC snažnim alatom u analizi kompleksnih hlapljivih bioloških spojeva i eteričnih ulja u slučaju biljnih produkata. Unatoč prednostima ove tehnike, GC analiza biljnih produkata najčešće je limitirana na eterična ulja. Moguća razgradnja temperaturno nestabilnih spojeva te preduvjet da ispitivani spojevi moraju biti hlapljivi, čine GC neprikladnom tehnikom za analizu mnogih biljnih uzoraka kod kojih nije moguća derivatizacija (3).

Na području analitike prirodnih ljekovitih proizvoda, GC se primjenjuje zajedno s HPLC tehnikom za identifikaciju i kvantifikaciju sastojaka biljnih ekstrakata, kromatografsko *fingerprintiranje* i pri analizama *in vivo* metabolizma biljnih sastojaka kod farmakokinetičkih studija (24).

Nadalje, GC se primjenjuje u određivanju onečišćenja: pesticida, herbicida i ostalih otapala te u karakterizaciji biološki aktivnih tvari: alkaloida, flavonoida, trjeslovina, terpena, eteričnih ulja, a često se koristi u kombinaciji s masenim detektorom, koji je ujedno i najčešće spreznata tehnika s GC (25).

Spregnuta plinska kromatografija podrazumijeva uparivanje separacije visoke učinkovitosti koju posjeduje plinska kromatografija sa 1) sofisticiranim detektorima visoke podatkovne moći koji mogu funkcionirati i kao samostalni instrumenti i 2) automatiziranim sustavima za pripremu uzoraka (26).

Razvoj plinske kromatografije spregnute s masenim detektorom (**GC-MS**) doveo je do smanjenja vremena analize eteričnih ulja do 40-100 s, kao i do smanjenja limita detekcije (3). Plinska kromatografija (GC) analitička je tehnika s dugogodišnjom zastupljenošću u farmaceutskoj analizi. No, razvojem drugih analitičkih tehnika i metoda, posebice tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), čije su značajke pogodnije za analizu farmaceutika, važnost GC u farmaceutskoj analizi znatno opada (27).

Danas se kromatografski *fingerprint* smatra općeprihvaćenom tehnikom za provjeru

kakvoće polaznih biljnih tvari i gotovih biljnih proizvoda.

3.3.4. Spektroskopski *fingerprint*

Kromatografske tehnike navedene u poglavlju 3.3.3. razvijene su i primjenjuju se u *fingerprintu* biljnih pripravaka/lijekova. Spomenute tehnike daju visoko pouzdane i precizne rezultate, međutim, generalno zahtijevaju nezgrapnu i dugotrajnu predobradu uzoraka. Dodatno, postavljanje eksperimentalnih uvjeta je rigorozno, a instrumenti su skupi, što ograničava njihovu primjenu u praksi. Upotreba spektroskopskih tehnika, poput **infracrvene (IR)** te **Raman spektroskopije** može imati prednosti, budući da su ove analize brze, nisu destruktivne ni invazivne za uzorke, te se uzorci jednostavno pripremaju za analizu.

Navedene tehnike omogućavaju *fingerprint* informacije, poput molekularne strukture, intermolekularnih interakcija te kemijskih veza, bilježenjem molekularnih vibracija te izmjena energije rotacije. IR spektroskopija se temelji na apsorpciji, dok se Raman spektroskopija temelji na raspršivanju svjetla.

Raman spektroskopija je komplementarna IR spektroskopiji te je od posebnog interesa u farmaceutskoj industriji zbog svoje visoke kemijske specifičnosti i mogućnosti da osigura molekularnu informaciju bez dodatnog označavanja, niske je osjetljivosti na vodu te posljedično tomu omogućava analizu vodenih i vlažnih materijala. Navedene prednosti uz korištenje optičkih vlakana i mikroskopa omogućavaju Raman spektroskopiji značajnu primjenu u farmaceutskoj industriji u kontroli kakvoće (28).

Prednosti **NIR spektroskopije** u kontroli kakvoće terapeutika tradicionalne medicine brojene su, uključujući i onu najvažniju – brzinu analize. NIR tehnika, kombinirana s odgovarajućim matematičkim modelima i tehnikama raspoznavanja, omogućava brzu analizu različitih tipova uzoraka. NIR nije destruktivna tehnika, čime se izbjegava

kompleksna priprema uzorka primjenom kemijskih ili fizičkih procesa. Zapravo, kruti i tekući uzorci u različitim pakiranjima, skladišteni u različitim uvjetima, mogu biti analizirani bez prethodne kompleksne obrade uzoraka zbog bolje penetracije optičkih vlakana koja se koriste u NIR spektroskopiji. Dodatno, NIR daje kvalitativne i kvantitativne rezultate prihvatljive točnosti koje zadovoljavaju zahtjeve kontrole kakvoće (29).

Nuklearna magnetska rezonancija (**NMR**) se tradicionalno smatra primarnim alatom u identifikaciji, karakterizaciji te određivanju strukture molekula. Popularnost NMR u metabolomičkim studijama značajno raste. Osim niske osjetljivosti, NMR ima svojstva koja ga stavljaju u prednost pred ostalim analitičkim tehnikama, poput nedestruktivnosti, jednostavne pripreme uzorka, kratkog vremena analize, jednostavne kvantifikacije i neselektivnosti u odnosu na specifične metabolite. NMR se koristi u metabolomičkom profiliranju različitih vrsta uzoraka, i to u kombinaciji s različitim alatima multivarijatne analize podataka. Takva se kombinacija pokazala vrlo uspješnom u razlikovanju srodnih biljnih vrsta, kao i u studijama o različitim čimbenicima koji utječu na njihov rast (30).

3.4. Kemometrija

Sve učestalija uporaba matematičkih, statističkih i drugih metoda baziranih na logici u području kemije i to posebice u analitičkoj kemiji, koja se bavi istraživanjem kvalitativnih i kvantitativnih informacija materije, dovelo je do uvođenja pojma *kemometrija*.

Švedski znanstvenik Svante Wold je 1971. skovao na švedskom jeziku termin „kemometri“ te njegov engleski ekvivalent „chemometrics“. 1986. te 1987. godine pokrenuti su časopisi „Chemometrics and Intelligent Laboratory systems“ i „Journal of Chemometrics“ koji su promovirali korištenje napredne opreme te razvoj instrumentacije

za spregnute tehnike. Razvoj spregnutih tehnika omogućio je razvoj naprednih analitičkih metoda. Kemometrija danas ima važnu ulogu u analitičkoj kemiji (2).

Kemometrija je zasebna interdisciplinarna znanost koja uključuje multivarijabilnu statistiku, matematičko modeliranje, računarstvo i analitičku kemiju, čija se primjena u užem smislu može podijeliti u tri osnovne skupine:

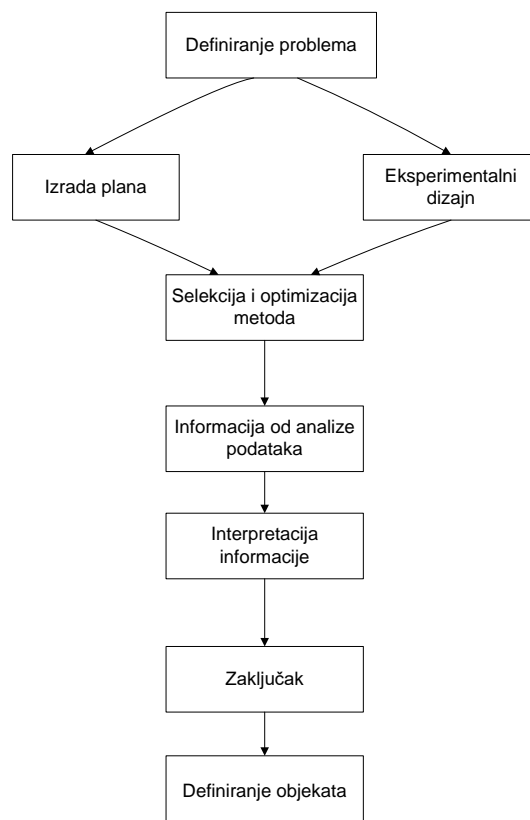
- i. kalibracija, validacija i testovi signifikantnosti;
- ii. optimizacija mjerenja i eksperimentalnih postupaka;
- iii. ekstrakcija maksimalne količine informacija o materiji iz analitičkih podataka.

Razvoj tehnologije u proteklih 40-ak godina omogućio je primjenu različitih instrumenata i računalnih metoda u analitičkoj kemiji, što je pridonijelo važnosti i razvoju kemometrije kao znanosti. Prednost kemometrijskih metoda leži u multivarijabilnom pristupu. Pažljivim istovremenim razmatranjem više različitih varijabli dobiva se više informacija nego što bi se dobilo razmatranjem svake varijable zasebno. Razmatrajući kemometrijske metode, može se primijetiti holistički pristup u prikupljanju informacija (Slika 5), a rezultat toga jest upravo ta dodatna količina informacija koja je rezultirala korelacijom među varijablama. Kada se promatra svaka varijabla zasebno, zanemaruje se korelacija među njima pa time promiče onaj dio informacije koji može biti ključan u rješavanju problema.

Dio kemometrije koji ima važnu ulogu u samom analitičkom procesu zove se *obrada signala*. Obrada signala podrazumijeva operaciju u kojoj informacija o analitu postaje razumljivija. Cilj takve operacije jest raznolik, no može se općenito podijeliti u dvije važnije skupine: **a)** procjena relevantnih parametara signala (npr. maksimum amplitude, površina signala te općenito oblik signala) i **b)** povećanje informacijskog sadržaja, kako bi se izvukla što veća količina relevantnih informacija. Takve tehnike imaju vrlo važnu ulogu u svim

analitičkim procesima i znatno utječu na preciznost krajnjeg rezultata. Standardizacija mjerenja tijekom obrade signala mora biti jasno definirana da bi rezultati koji potječu iz raznih laboratorija bili usporedivi. Većina tehnika u današnjoj analitičkoj kemiji uključuje brojne mjerne instrumente pa podatci o analitu koji se prikupljaju dolaze u obliku elektroničkih signala i obrađuju se uz pomoć odgovarajućih programskih paketa. Obrada signala je stoga ključna kemometrijska tehnika, koja je u konstantnom razvoju, paralelno s razvojem tehnologije. Zatim se iz izmjerenih vrijednosti dobivaju *analitičke vrijednosti* (analitičke varijable, kao npr. koncentracija ispitivane tvari u uzorku), no isto se tako u analitičkom procesu prikupljaju i *latentne varijable* koje se dobivaju iz signala pomoću različitih matematičkih operacija. One su rezultat kemometrijskih tehnika obrade i mogu predstavljati prikladan analitički rezultat. Njihov je informacijski sadržaj bogatiji, zbog toga što se ne sastoji samo od kemijskih informacija. Krajnju odluku o kakvoći, pouzdanosti, autentičnosti, homogenosti, pa i o samom podrijetlu uzorka, moguće je donijeti na temelju dobivenih analitičkih vrijednosti i/ili kemometrijski obrađenih izmjerenih vrijednosti (*latentnih varijabli*).

U kemijskim analizama, analitičar prima signal od nekog pragmatičnog, senzorskog sustava. Dobiveni signal obično ima sintaktički slijed i nedvosmisleno semantičko značenje koje se pomoću denotacijske funkcije prevodi s jezika signala na jezik znanstvene komunikacije (31).



Slika 5: Holistički prikaz rješavanja kemometrijskog problema.

3.4.1. Univarijatna analiza

Deskriptivna statistika predstavlja različite postupke za opisivanje svojstava na temelju prikupljenih podataka, a pri tome se služi grafikonima i tabelama za prikazivanje opažanja. Takvi prikazi sadrže frekvencije u kojima se pojedine vrijednosti pojavljuju (iz čega se mogu uočiti tipične i atipične vrijednosti), odnose između dvaju ili više svojstava i sl. Dakle, deskriptivna statistika služi za uređivanje podataka zbog uočavanja bitnih značajki, a sve u svrhu pripreme podataka za kasniju statističku obradu te izračunavanje različitih brojčanih pokazatelja koji izražavaju karakterističke promatrane pojave. Svi se rezultati odnose samo na analizirani skup podataka i ne poopćavaju se. Stoga, pogriješi li

se već u tom koraku, može doći do pogrešnih zaključaka (primjerice, izbor samo određenih podataka, a odstranjivanje onih koji na neki način „odudaraju“) (32).

Glavni deskriptivni statistički pokazatelji:

N = broj izmjerenih uzoraka

Mean ili \bar{x} = aritmetička sredina

SD = standardna devijacija

CV = koeficijent varijabilnosti; dobije se računski $(SD / \bar{x}) \times 100$, a izražava u %

Min. = minimalna izmjerena vrijednost

Max. = maksimalna izmjerena vrijednost

3.4.1.1. χ^2 - test

Pomoću toga testa ispituje se opažana i teorijska distribucija. Nul hipoteza (H_0) jest da nema razlike između tih distribucija. Ako stvarno ne postoji razlika, tada je $\chi^2 = 0$.

χ^2 - distribucija tabelirana je brojem stupnjeva slobode i željenom vjerojatnošću.

Pri ispitivanju opažane i očekivane distribucije, χ^2 se računa na sljedeći način:

$$\chi^2 = \sum [(h_{op} - h_{o\check{c}})^2 / h_{o\check{c}}]$$

h_{op} - opažana frekvencija klase

$h_{o\check{c}}$ - očekivana frekvencija klase

Ako je izračunati χ^2 veći od tabelarnog, kod odabrane granice pouzdanosti hipoteza se nije održala. To znači da između opažane i teorijske distribucije postoji statistički značajna razlika (33).

3.4.1.2. Kolmogorov-Smirnov test

Pomoću toga testa ispituju se kumulativne frekvencije. Može se ispitati je li neka teorijska funkcija dobro uklopljena u opažanu frekvenciju. Tim se testom također ispituje

pripadaju li dva neovisna uzorka istoj kontinuiranoj distribuciji. Kolmogorov-Smirnov test se koristi za ispitivanje malih uzoraka, gdje se χ^2 -test ne upotrebljava. No, χ^2 -test se može primijeniti i na diskretne distribucije, gdje se Kolmogorov-Smirnov test ne može koristiti. Kolmogorov-Smirnov test se zasniva na maksimalnoj apsolutnoj razlici (D) kumulativne frekvencije opažanog uzorka i teorijske distribucije. Ispituje se razlikuje li se ta maksimalna razlika značajno od očekivane, koja je za određenu veličinu uzorka i vjerojatnosti tabelirana (33).

3.4.1.3. Analiza varijance (Fischerova analiza varijance ili ANOVA)

Analiza varijance je metoda kojom se definira ukupna varijabilnost (odstupanja svake varijante uzorka od prosječne vrijednosti uzorka) i raščlanjuje (analizira) na dijelove uvjetovane različitim čimbenicima. Iako se metoda zove analiza varijance, ona je zapravo postupak za proučavanje varijabilnosti između prosječnih vrijednosti koja se mjeri varijancom. U postupku analize varijance primjenjuje se test za ispitivanje varijanci i test za ispitivanje razlika između prosječnih vrijednosti (F-test i t-test). Pretpostavke koje moraju biti zadovoljene za analizu varijance su sljedeće: da su uzorci iz populacije uzeti slučajno, da su pogreške neovisne i normalno distribuirane, te da imaju iste (homogene) varijance (32).

3.4.1.4. Scheffé-ov post hoc test

Post hoc analiza služi retrospektivnom razmatranju podataka. To je test multiple usporedbe koji daje uvid koje se skupine varijabli signifikantno razlikuju unutar grupe, što nije moguće definirati analizom varijance. Scheffé-ov test konzervativna je *post-hoc* metoda visokog stupnja pouzdanosti, koja simultano ispituje i uspoređuje sve parove različitih vrijednosti i sve moguće kombinacije varijabli. Prednost mu je ta što se može

koristiti za usporedbu skupina nejednakih veličina i uzima u obzir sve moguće vrijednosti koje se mogu razmatrati unutar jedne skupine (34).

3.4.1.5. Obrada podataka i statistička analiza

Kao što je poznato, HPLC se široko primjenjuje u kontroli kakvoće biljnih tvari i proizvoda zbog njezine osjetljivosti, superiorne preciznosti, visoke rezolucije te široke primjene. LC-MS, GC-MS i LC-NMR se koriste u sve većoj mjeri u kompleksnoj kemijskoj identifikaciji biljnih uzoraka. Takav je napredak u instrumentaciji omogućio generiranje velike količine podataka koji bilježe male razlike među uzorcima, što omogućuje detaljnu analizu i razlikovanje kompleksnih biljnih uzoraka.

No, prije same analize podataka, njihova predobrada je ključan korak, budući da nepoznate komponente nejasnih interferencija uzrokuju preklapanje pikova te pomak bazne linije.

Kako bi se eliminirali i reducirali neželjeni izvori varijacija zbog instrumentalnog odgovora spregnutih tehnika te dobili učinkoviti rezultati, primjenjuje se predobrada podataka. Učestalo korištena tehnika predobrade uključuje **normalizaciju** i metodu najmanjih kvadrata (**LLS**). Kako bi se dobili točni, kvantitativni rezultati iz *fingerprinta*, predobrada kromatografskih podataka je nužna.

Varijacija u koncentraciji uzorka može utjecati na multivarijatnu analizu cjelokupnog kromatografskog profila. Prije provođenja multivarijatne analize, provodi se normalizacija podataka na način da se svaki kromatogram sastoji od N pikova, od koji svaki pik ima površinu c_i od i broja komponenata.

Ukupna površina svih pikova računa se na način:

$$C = \sum_{i=1}^N c_i$$

Površina pika nakon normalizacije je:

$$c_i = \frac{c_i}{C}$$

Tada je svaki pik izražen kao postotak od sume površina svih pikova.

Veliki problem u analizi biljnih uzoraka je i pojava pomaka signala koja snažno utječe na kromatografski profil. Kako bi se eliminirao pomak, koristi se metoda najmanjih kvadrata (LLS). Kako bi se uparili svi kromatografski profili s njihovim retencijskim vremenima, svi uobičajeni spojevi će se odabrati i koristiti u kromatografskom poravnavanju.

Alati za ekstrakciju kemijskih informacija važni su za pronalaženje analita od interesa u kompleksnim smjesama biljnog *fingerprinta*.

Spektralna korelativna kromatografija (**SCC**) je tehnika koja se temelji na činjenici da iste kemijske komponente moraju imati isti spektar bez obzira na koji način eluiraju kroz različite kromatografske kolone. Dobiveni rezultati su vrlo pouzdani, pogotovo u slučaju MS-a, budući da spektar masa pruža jedinstvenost u odnosu na UV spektar.

Prema *Informacijskoj teoriji (IT)*, vrijednost informacije ovisi o stupnju separacije i raspodjeli koncentracije svake kemijske komponente na kromatogramu.

Što je bolje i uniformnije njihovo razdvajanje, više podataka se može dobiti iz kromatograma. Sadržaj informacije kromatograma računa se na sljedeći način:

$$\theta = - \int \frac{p_x}{\text{sum}(p_x)} \frac{\log(p_x)}{\text{sum}(p_x)} dx$$

gdje p_x predstavlja realni kromatografski odgovor svih kemijskih komponenata na kromatogramu.

Usporedbom svih dobivenih kemijskih informacija pod određenim kromatografskim uvjetima, moguće je pronaći parametre za njihovu detekciju (2).

3.4.2. Multivarijatna analiza

Izgled moderne analitičke kemije fundamentalno se promijenio s pojavom tzv. kemometrijskih evaluacijskih tehnika. Termin kemometrija danas predstavlja sve multivarijabilne kalibracijske metode u analitičkoj kemiji. U usporedbi s klasičnom jednovarijabilnom kalibracijom, ove tehnike ne koriste samo jednu točku u spektru za kalibraciju, već cijelu spektralnu strukturu. Prednost kalibracije ovog tipa je količina korištenih spektralnih informacija tako da se mogu razaznati i najmanje razlike u spektrima.

Općenito govoreći, cilj svake kvantitativne analitičke metode je određivanje svojstva Y kvantitativnom iz izmjerenih parametara X . Ovo određivanje normalno podrazumijeva dva koraka: kalibraciju i analizu (predviđanje). Tijekom kalibracije traži se korelacija između mjerene vrijednosti X i svojstva sustava Y .

Ova korelacija je opisana kalibracijskim modelom;

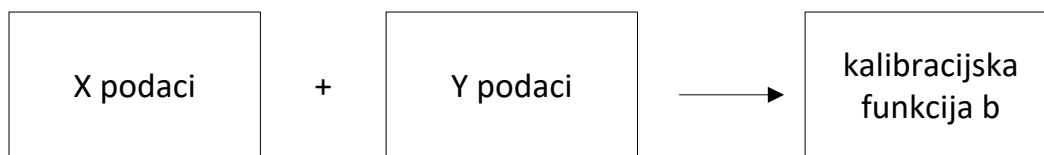
$$Y = X \cdot b$$

gdje b predstavlja „koeficijent regresije“:

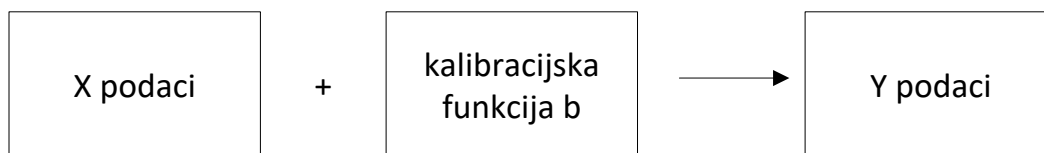
$$b = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y$$

Nakon kalibracije, slijedi analiza podataka. Povezivanjem kalibracijskog modela s mjerenim parametrom X , može se odrediti svojstvo sustava Y u nepoznatom uzorku. Navedeno je shematski prikazano na Slici 6.

Korak 1: Kalibracija



Korak 2: Analiza



Slika 6: Shematska procedura kvantitativne analize tvari.

U slučaju kvantitativne evaluacije NIR, IR ili Raman spektara, mjerena vrijednost je tipično apsorpcijski ili emisijski spektar, te vrijednost sustava koju želimo odrediti predstavlja koncentraciju analita. Postoje dvije metode postavljanja kalibracijskog modela za takav sistem: **(1) kalibracija preko jedne varijable** te sve popularnija **(2) multivarijabilna kalibracija**.

Kod jednovarijabilne kalibracije, iscrtavaju se apsorpcijske vrijednosti ispod maksimuma pika u odnosu na koncentraciju analita. Fit funkcija izračunata iz odnosa apsorpcije i koncentracije, omogućava računanje koncentracije iz mjerenih apsorpcijskih vrijednosti te obrnuto.

Analiza novog, nepoznatog uzorka provodi se spektroskopskim mjerenjem te određivanjem vrijednosti apsorpcije na maksimumu pika. Ova vrijednost se zatim korelira s kalibracijskom funkcijom b koja je izračunata ranije te rezultira s određenom vrijednošću analita. U slučaju jednovarijabilne kalibracije, dostatno je evaluirati spektar na jednoj valnoj duljini. Određivanje dvokomponentnog sustava postiže se mjerenjem druge valne duljine koja je karakteristična za analiziranu supstanciju. Multikomponentni

sustavi mogu se analizirati na način da se u kalibracijski set dodaje po jedna valna duljina karakteristična za pojedinu komponentu.

U mnogim slučajevima, jednovarijabilna kalibracija ne pokazuje dostatnu mogućnost predviđanja te ima nekoliko nedostataka.

- Koncentracija analita korelira s jednom točkom u spektru i stoga prilikom evaluacije novih, nekalibriranih uzoraka nije moguće prepoznati *outlier*-e ili nepoznate interferirajuće komponente.
- Statistička varijacija signala, poput šuma detektora, direktno je inkorporirana u podatke o koncentraciji. Ovu nepouzdanost u mjerenju potrebno je kasnije minimizirati mjerenjem mnogobrojnih uzoraka te uprosječivanjem rezultata.
- Zadovoljavajuća kalibracija multikomponentnih sustava zahtijeva zadovoljavajuću separaciju maksimuma pikova. U mnogim slučajevima to jednostavno nije moguće, posebno u NIR spektroskopiji.
- U analizi multikomponentnih sustava, pretpostavlja se linearno dodavanje apsorbancijskih vrijednosti svih analita pri mjerenoj valnoj duljini (Lambert-Beerov zakon). Iscrtavanjem apsorbancijskih vrijednosti u odnosu na koncentraciju daje linearnu kalibracijsku funkciju $b \cdot c$. No, u mnogim slučajevima ovo ne vrijedi za realne sustave. Sile između molekula ili temperaturni efekti mogu dovesti do iskrivljenja vrpce analita. Dodatno, postoji nekoliko analitičkih tehnika kod kojih ne vrijedi Lambert-Beerov zakon, poput difuzne reflektancije, tehnike koja se često koristi u IR spektroskopiji.

Stoga analiza primjenom klasične jednovarijabilne kalibracijske metode često dovodi do beskorisnih rezultata u analizi multikomponentnih sustava.

Jedna od metoda rješavanja spomenutog problema je korištenje multivarijabilnih kalibracijskih metoda, poput parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata (**PLS**), regresije glavnih komponentata (**PCR**) i multiple linearne regresije (**MLR**) (35).

Najčešće korišteni alati multivarijabilne analize opisani su u narednim poglavljima.

3.4.2.1. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLS)

Kako bi se provela parcijalna regresija za odabrani sustav, informacije o spektru analizirane supstancije moraju se usporediti s odgovarajućim vrijednostima koncentracije. Promjene koje se događaju kod obiju vrijednosti moraju biti prepoznate te međusobno korelirane. U ovu svrhu potrebno je analizirati velik broj uzoraka. Za matematički prikaz, promjene u oba seta podataka su zapisana matriksu te su generirani njihovi svojstveni vektori (*eigenvector*). Ovi svojstveni vektori se još nazivaju faktorima ili primarnim komponentama. Oni se mogu koristiti za predviđanje koncentracija umjesto originalnih spektara budući da sadrže sve relevantne informacije ispitivanog sustava. Prednosti ovakve dekompozicije su očite: analitički relevantne informacije iz velikog seta podataka su komprimirane u faktore te se mogu koristiti za kalibraciju.

U slučaju PLS kalibracije, svojstveni vektori su poredani u silaznom nizu. Prvi faktor karakterizira glavnu promjenu u promatranom spektru te ima najvažniji ulogu u kalibracijskom modelu. S povećanim brojem faktora, čak i najmanje razlike u strukturi podataka mogu biti karakterizirane. Ovo ima važne posljedice na evaluaciju spektara ispitivanih supstancija: niži faktori većinom karakteriziraju važne promjene u strukturi spektra, dok viši faktori uglavnom predstavljaju dio spektralnog šuma. Odabir optimalnog broja faktora od ključne je važnosti za kvalitetu PLS modela. Korištenjem premalo faktora, spektralne strukture nije moguće razaznati, dok primjena prevelikog broja faktora vodi do pogoršavanja kvalitete analize budući da je u model uključen i spektralni šum.

Kod realnih uzoraka, pogreške prilikom pripreme uzoraka, pogreške kod referentnih metoda za određivanje vrijednosti koncentracija, *drift* instrumenta te spektralni šum dovest će do različite vrijednosti vektora. Stoga se kod PLS metode pretpostavlja vrijednost vektora za oba seta podataka s datim brojem faktora. Oni su odabrani na način da predstavljaju najmanje moguće odstupanje od originalnih vrijednosti (35).

3.4.2.2. Analiza glavnih komponenata (PCA)

Analiza glavnih komponenata (Principal Component Analysis) je multivarijatna tehnika koju je otkrio Pearson (1901), a provodi se s ciljem pronalaženja prostorno bliskih skupina, OTU-a (*Operational Taxonomic Unit*), u višedimenzionalnom prostoru, uz analizu njihovih međusobnih odnosa te ulozi pojedinih varijabli u tim odnosima. Pri tome se kombiniranjem izvornih varijabli formiraju nove koje nisu međusobno korelirane, a naziva ih se glavnim komponentama. Najveći broj novih varijabli koji može nastati jednak je broju izvornih. Prema Pecini (1998), glavni aspekti analize glavnih komponenata su sažimanje i analiza linearne povezanosti većeg broja multivarijatno distribuiranih, kvantitativnih, međusobno koreliranih varijabli u smislu njihove kondenzacije u manji broj komponenata, novih varijabli, međusobno nekoreliranih, s minimalnim gubitkom informacija. Zbrajanjem varijanci svih izvornih varijabli dobije se ukupna varijanca, a dio ukupne varijance koji objašnjava jedna glavna komponenta poznat je kao svojstvena vrijednost, latentni korijen ili *eigen* vrijednost (*eigenvalue*). Prva glavna komponenta ima najveću svojstvenu vrijednost, druga manju, treća još manju i tako dalje. Suma svih svojstvenih vrijednosti jednaka je ukupnoj varijanci, a cilj je izdvojiti što veći dio ukupne varijance u nekoliko prvih glavnih komponenata i na taj način reducirati broj izvornih varijabli. Pri upoznavanju s ovom metodom korišteni su radovi Hotellinga (1933),

Sneatha i Sokala (1973), Hussannia i suradnika (1977), Bartuala (1985), Browna (1991), Pecine (1998), te Höfta i suradnika (1999).

Jedan od glavnih razloga za korištenje analize glavnih komponentata je u njegovoj ogromnoj količini podataka izvedenoj iz modernih računala i tehnika mjerenja. Ta metoda je bila samo teorijska metoda, no pojavom generacije poboljšanih računala, razvila se i u praktičnom smislu te postaje dominantna metoda faktorske analize. Najveći razlog je u njezinoj matematičkoj točnosti (36).

3.4.2.3. Faktorska analiza (FA)

Faktorska analiza (FA), statistički je pristup za analizu strukture međusobnih odnosa većeg broja varijabli definiranjem seta zajedničkih skrivenih dimenzija, tj. faktora. U faktorskoj analizi, kao i u analizi glavnih komponentata, osnovna je ideja još uvijek da set od p varijabli (i n individua) može biti definiran manjim brojem faktora, pa tako može poslužiti kao redukcijska metoda. No, primarni je cilj identifikacija faktora i određivanje stupnja do kojeg su izvorne varijable objašnjene svakom dimenzijom - faktorom. Za razliku od PCA koja nije bazirana ni na kakvom statističkom modelu, FA je određena specifičnim statističkim modelom. Zajednički (*common*) faktor nevidljiva je, hipotetska varijabla koja pridonosi varijanci iz barem dvije izvorne varijable. Izraz faktor najčešće se odnosi na zajednički faktor. Jedinstveni ili specifični (*unique*) faktor, također je nevidljiva, hipotetska varijabla koja pridonosi varijanci u samo jednoj izvornoj varijabli (37).

3.4.2.4. Klaster analiza (CA)

Klaster analiza (Cluster Analysis) je skupina multivarijatnih tehnika koja se koristi za klasificiranje primarno neklasificiranih objekata u grupe, tako da je svaka grupa (klaster) homogena s obzirom na određene varijable, odnosno da se jedna od druge grupe razlikuje s obzirom na te varijable. U klaster analizi grupna pripadnost objekata nije poznata, kao ni

konačni broj grupa. Cilj klaster analize jest utvrđivanje homogenih grupa ili klastera. Termin klaster dolazi iz engl. riječi *cluster* (skupina "istovrsnih stvari", grozd, skupiti u hrpu). Klaster metode se dijele na hijerarhijske i nehijerarhijske, a hijerarhijske se dalje dijele na aglomerativne i divizivne metode. Jedinice grupiranja nazivaju se OTU, *Operational Taxonomic Unit*. Sve aglomerativne hijerarhijske metode imaju svojstvo da istovremeno samo jednu OTU pripajaju drugoj, ili jednu skupinu OTU-a drugoj. Prema Peetersu i Martinelliu (1989), hijerarhijskom klaster analizom može se brzo odrediti povezanost i udaljenost bilo kojeg uzorka karakteriziranog opisom bilo kojega tipa.

Klaster analiza se provodi s ciljem nalaženja skupina objekata (OTU-a) koje pokazuju tendenciju grupiranja temeljem sličnosti mjerenih karakteristika. Više ili manje detaljan opis klaster analize daju Sneath i Sokal (1973), Hartigan (1975), Späth (1975), Höft i sur.,(1999), te Kremer (2003) (38, 39, 40, 41, 42, 43).

Primjerice, biološka udaljenost između biljaka unutar populacije procjenjuje se pomoću Euklidove udaljenosti, koja se računa kao drugi korijen iz kvadrata razlika vrijednosti za svaku varijablu, tj. prema jednadžbi:

$$\text{udaljenost } (\mathbf{x}, \mathbf{y}) = (\sum_i (\mathbf{x}_i - \mathbf{y}_i)^2)^{1/2}.$$

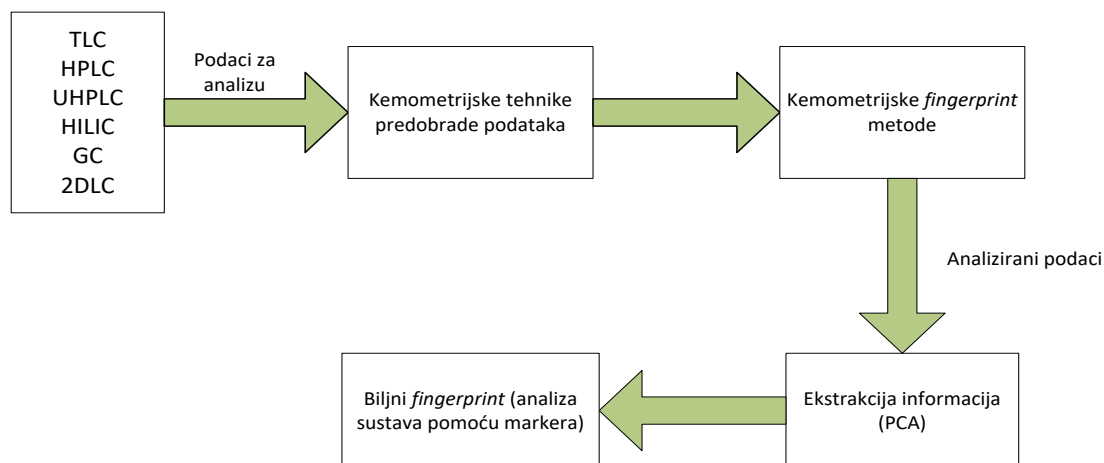
3.4.2.5. Diskriminacijska analiza (DA)

Diskriminacijska analiza je metoda koja omogućava utvrđivanje koje varijable prave razliku između dviju ili više prirodno formiranih grupa/objekata (Slika 7). Cilj analize je da se definira manji broj novih varijabli, koje bi opisale razlike među grupama. Te se nove varijable nazivaju diskriminacijskim varijablama.

Zadaća diskriminacijske analize je:

- određivanje varijabli na temelju kojih istraživač može izvršiti diskriminaciju između različitih (prirodno formiranih) grupa i

- klasificiranje entiteta (objekata) u različite grupe s većom točnošću nego što je slučajna (nasumična) klasifikacija (36).



Slika 7: Shematska interpretacija podataka dobivenih kromatografskim *fingerprintom* pomoću kemometrijskih tehnika (36).

3.5. Validacija kemometrijskih modela i analiza nepoznatih uzoraka

Stupanj korelacije postignut kombinacijom podataka o spektrima i koncentracijama je od iznimne važnosti za kvalitetu analize. S dobrom korelacijom, analiza je relativno točna, dok suprotno, loša korelacija nikada ne može rezultirati točnim podacima. Stoga je ključno odrediti najbolji faktor korelacije, a time i najbolje moguće rezultate analize.

Za ovu svrhu dobiveni kemometrijski model potrebno je validirati, tj. evaluirati. Takva evaluacija provodi se predviđanjem određenog broja uzoraka s poznatom koncentracijom analita s kemometrijskim modelom. Usporedba predviđenih sa stvarnim vrijednostima pokazuje preciznost odabranog modela. Ovo se provodi s velikim brojem različitih parametara modela. Onaj parametar koji vodi do najmanje pogreške u predviđanju, karakterizira najbolju metodu. Validacija različitih kemometrijskih metoda dozvoljava

razlikovanje *outlier*-a te omogućuje određivanje optimalnog broja faktora. Moguća su dva tipa validacije: interna validacija (*kros-validacija*) i eksterna validacija (validacija uz pomoću seta standarada).

U slučaju interne validacije, individualni uzorci (određeni od strane korisnika) izuzimaju se iz kalibracijskog seta. Korištenjem preostalih uzoraka uspostavlja se kemometrijski model koji se zatim koristi u analizi preostalih uzoraka. Usporedba rezultata sa stvarnim vrijednostima koncentracije pokazuje koliko točno model predviđa uzorke. Izuzimanjem uzoraka unaprijed, garantira se njihova nepoznatost u kalibracijskom modelu te time i njihova neovisnost. Samo se na ovaj način stvarna preciznost predviđanja može realistično ocijeniti.

Kako bi se evaluirao cijeli set podataka, prethodno analizirani uzorci vraćaju se u set te se drugi set uzoraka izuzima za analizu. Ova procedura izuzimanja uzoraka, njihovog analiziranja te vraćanja u kalibracijski set ponavlja se sukcesivno, dok se svi uzorci jednom ne analiziraju. Usporedba rezultata analize s originalnim sirovim podacima omogućava kalkulaciju pogreške predviđanja za cjelokupni sustav podataka, tzv. RMSECV („**Root Mean Square Error of Cross Validation**“). Ovo je kvantitativna mjera za točnost mogućnosti predviđanja modela. Što je manja pogreška, veća je kvaliteta modela.

Za internu validaciju važno je ukloniti samo nekoliko uzoraka iz seta podataka, budući da model koji se gradi iz preostalog seta uzoraka mora biti vrlo sličan modelu kreiranom iz originalnih podataka. Za set podataka s manje od 50 uzoraka, snažno se preporučuje izuzimanje ne više od jednog uzorka za *kros-validaciju*.

Druga metoda za procjenu kvalitete kemometrijske metode je eksterna validacija. U kontrastu s internom validacijom, svi uzorci iz kalibracijskog seta koriste se za generiranje modela. Ovaj model je konstantan, tj. analizirani spektri se više ne izuzimaju iz kalibracijskog seta podataka. Kako bi se procijenila pogreška predviđanja modela,

dodatni uzorci se analiziraju te dodaju u tzv. test set. Usporedbom rezultata analize s izvornim koncentracijama analiziranih uzoraka, računa se **RMSEP** (*Root Mean Square Error of Prediction*). Ova vrijednost također predstavlja kvantitativnu mjeru za točnost predviđanja modela. Dobre modele karakterizira niska RMSEP vrijednost. Interna i eksterna validacija bi trebale dati usporedive rezultate. Ukoliko to nije slučaj, premalo uzoraka je korišteno za uspostavu pouzdane metode (35).

3.6. Primjena *fingerprinta* i kemometrije u analizi uzoraka prirodnog podrijetla

Brojne studije bave se izazovima kontrole kakvoće biljnih lijekova i biljnih pripravaka. S obzirom na složeni sastav biljnog materijala, znanstvenici se trude razviti metode ispitivanja kojima će se moći odrediti sastav biljnih pripravaka/lijekova, kao i razviti jedinstveni identifikator – *fingerprint* koji će omogućiti viši stupanj sigurnosti u izvornost i djelotvornost proizvoda na tržištu.

Kemometrija ima vrlo važnu ulogu u iskorištenju čitavog kromatografskog profila. Uz dodatak velikog broja multivarijabilnih modela, kemometrija ujedno daje mnoge metode za procesiranje podataka kako bi se obradili originalni signali dobiveni mjerenjima na različitim analitičkim instrumentima. Primjenjuju se tehnike obrade podataka kako bi se eliminirale ili smanjile kromatografske varijacije koje nisu u korelaciji s analiziranim uzorcima (44).

Kromatografski *fingerprint* u kombinaciji s kemometrijskim metodama predstavlja sofisticiranu metodu za autentifikaciju, karakterizaciju spojeva i procjenu kvalitete terapeutika koji su u primjeni u okviru različitih modaliteta tradicionalne medicine.

Citri Reticulatae Pericarpium (PCR) i *Citri Reticulatae Pericarpium Viride* (PCR_V) droge su koje potječu iz kore mandarine. Iako je njihov biljni izvor isti, njihov kemijski sastav bi

trebao biti različit zbog različitog vremena berbe. Yi i suradnici demonstrirali su uvjerljivu strategiju metabolomičkog profiliranja kombiniranjem GC-MS metode s kemometrijom. Hlapljive komponente 24 različita uzorka kore mandarine ubrane u različitim stupnjevima zrelosti od srpnja do prosinca analizirane su GC-MS metodom. Zbog kompleksnosti hlapljivih komponenata, došlo je do preklapanja pikova na kromatogramu. Faktorska analiza (AMWFA) primijenjena je kako bi se uklonio spomenuti problem te su dobiveni kvalitativni i kvantitativni rezultati za 82 hlapljive komponente. Uz pomoć PCA, termalne mape i Paersonove korelacijske analize, demonstriran je metabolički otisak tijekom 3 faze sazrijevanja. Stoga je metabolomička analiza u kombinaciji s kemometrijom predložena kao uspješna strategija u kontroli kakvoće srodnog biljnog materijala.

Polisaharidi vrste *Angelica sinensis* jedan su od najčešće korištenih tvari u tradicionalnoj kineskoj medicini. Imaju potvrđen protektivni učinak na jetru, iako mehanizam djelovanja još nije razjašnjen. Novi pristup koji uključuje biokemijske parametre uparene s metabolomikom te bazirane na GC-MS metodi i kemometriji ustanovljen je kako bi se objasnio zaštitni učinak polisaharida na jetru. Prvo su filtrirani originalni GC-MS podatci, korigirana su retencijska vremena te je prepoznavanje i integracija pikova provedena s Agilent kromatografskim softverom. Metoda prepoznavanja, temeljena na analizi glavnih komponenata (PCA) i metodi najmanjih kvadrata (PLS-DA), postignuta je primjenom matematičko-statističkim softverom SIMCA (*Soft Independent Modelling by Class*).

Posebice je korisno korištenje metabolomičkog profiliranja u kombinaciji s kemometrijom kako bi se evaluirao farmakološki mehanizam tradicionalnih kineskih lijekova. Primjerice, antibakterijsko djelovanje berberina na vrstu *Staphylococcus aureus* istraženo je uz pomoć metabolomičkog profiliranja i devet antibakterijskih supstancija s poznatim mehanizmom djelovanja. Uz pomoć tehnike HPLC/ESI-MS, dobiven je

metabolički profil vrste *S. aureus* tretirane s berberinom i devet antibakterijskih tvari s poznatim mehanizmom djelovanja. Nakon predobrade podataka, PCA metoda je primijenjena za klasifikaciju nastalih metabolita prema njihovom mehanizmu djelovanja. Dobiveni rezultat uporabom PCA metode otkrio je mogući antibakterijski mehanizam djelovanja berberina.

Navedena istraživanja pokazuju kako je metabolomika u kombinaciji s kemometrijom snažno sredstvo u istraživanju terapijskog djelovanja pripravaka/lijekova koje primjenjuju tradicionalne medicine (45).

Niz studija potvrdilo je potencijal HPLC *fingerprinta* u kombinaciji s kemometrijskim metodama u procjeni kvalitete tradicionalnih kineskih lijekova.

Fan i suradnici razvili su brzu i učinkovitu metodu tekućinske kromatografije visoke razlučivosti (RRLC) u kombinaciji s PCA i HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) za razlikovanje i kontrolu kakvoće vrste *Angelica dahurica* tretirane sumporom. Uz pomoć HCA, evaluirane su sličnosti i razlike uzoraka koji su sušeni na suncu te biljaka tretiranih sumporom. Metodom PCA klasificirani su kromatografski podatci te utvrđene razlike između 40 uzoraka vrste *A. dahurica* tretirane sumporom i osušene na suncu. Naime, prethodna kvantitativna analiza imperatorina u 40 uzoraka pokazala je da su svi uzorci zadovoljili kriterije kontrole kakvoće postavljene u kineskoj farmakopeji. No, suvremeni matematičko-statistički pristup pokazuje kako je primjena imperatorina kao jedinog markera neprikladna za kontrolu kakvoće ispitane biljne vrste. Naime, PCA *plot* je pokazao prisutnost dodatnih markera uz imperatorin koji su ukazivali na razliku između vrste *A. dahurica* tretirane sumporom te osušene na suncu pa se može zaključiti da HCA i PCA metode u kombinaciji daju pouzdaniju informaciju za procjenu kakvoće tradicionalnih kineskih lijekova.

Cui i suradnici koristili su tehnike PCA, SA (*Similarity Analysis*) i HCA kako bi odredili

faktore koji utječu na kakvoću vrste *Andrographis paniculata*, tradicionalnog kineskog lijeka s antimikrobnim i antimalaričkim učinkom koji se koristi za liječenje groznice, dizenterije, upale grla te zmijskih ugriza. Priprema uzoraka za analizu uključivala je ekstrakciju mikrovalovima te određivanje *fingerprinta* uz primjenu HPLC-DAD metode. Uzorci iz različitih izvora identificirani su uz pomoć HCA metode koja se temeljila na karakteristikama pikova.

Ramat je razvio novi pristup u *fingerprint* analizi vrste *Chrysanthemum morifolium* kombiniranjem kemometrijskih metoda, posebice SA, HCA i PCA s metodom UPLC. Računanjem korelacijskog koeficijenta (r), pouzdano je utvrđena sličnost 20 uzoraka vrste *C. morifolium* iz različitih izvora. Svi analizirani uzorci pokazali su visok stupanj sličnosti po retencijskim vremenima, iako su se značajno razlikovali po broju pikova. Smatra se da su dva uzorka značajno različita kada im je koeficijent korelacije manji od 0,8 ($r < 0,8$), dok pokazuju visok stupanj sličnosti uz $r > 0,9$. Kako bi se dodatno istražile sličnosti i razlike između uzoraka, primijenjena je HCA metoda temeljena na relativnoj površini 25 uobičajenih pikova. Nakon utvrđivanja metode za određivanje prikladne udaljenosti, uzorci su razvrstani u tri klastera. Kraća udaljenost između 2 uzorka, dokazala je veću sličnosti u kvaliteti uzoraka.

Očito je da se kemometrijske tehnike PCA, SA i HCA često koriste u kombinaciji s analitičkim tehnikama poput HPLC/UPLC za diferencijaciju i kvantifikaciju biljnih uzoraka različitog podrijetla. Upotreba spomenute tri kemometrijske tehnike u procjeni kakvoće biljnih lijekova dosljedna je. Općenito, SA, HCA i PCA primjenjuju se navedenim kronološkim slijedom. Ukoliko se tehnikom SA ne prepoznaju različitost između uzoraka različitog porijekla, HCA i PCA se mogu uspješno primijeniti za utvrđivanje istih.

Ginseng je vrlo poznati tradicionalni kineski lijek koristan za smanjenje stresa, poboljšanje zdravlja, održavanje i poboljšanje središnjeg živčanog i imunološkog sustava

te za prevenciju nekih kroničnih bolesti. Među njegovim biološki aktivnim tvarima, ginsenozidi su poznati bioaktivni sastojci te se smatraju markerima za kontrolu kakvoće ginsenga. Uz pomoć elektronskog senzora (*E-nose*) spregnutog s kemometrijom (PCA, DFA – *Discriminant Factor Analysis* i SIMCA), razvijen je brz i nedestruktivan postupak za razlikovanje crvenog kineskog od korejskog ginsenga.

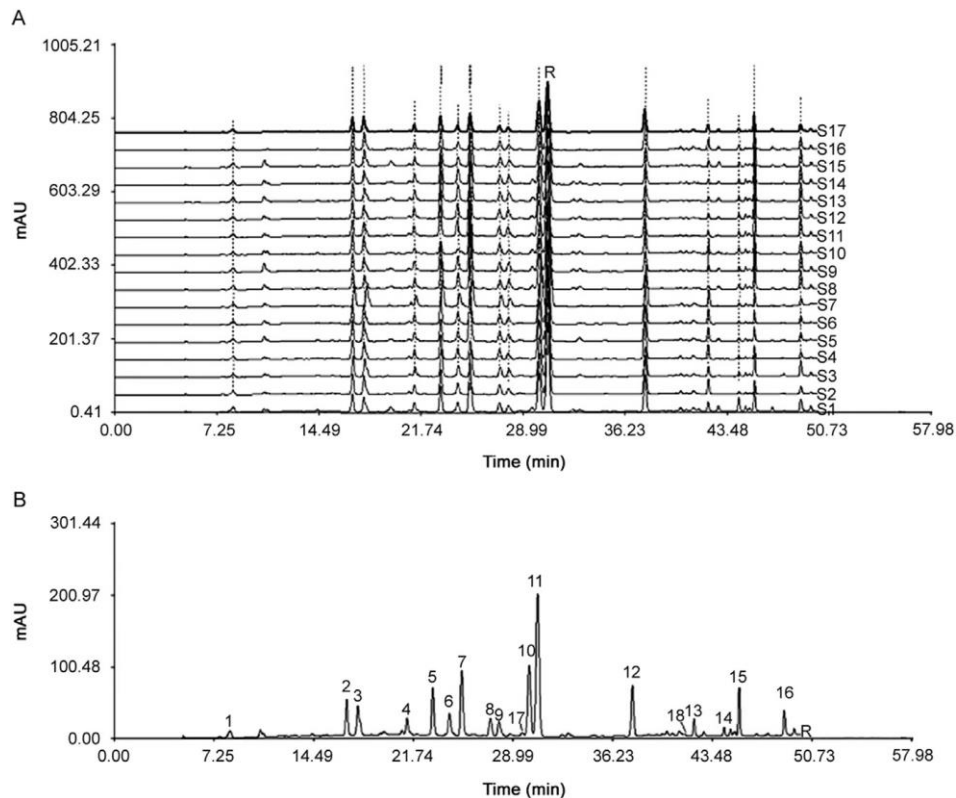
SIMCA je statistička metoda za superviziranu klasifikaciju podataka koja razlikuje dobre ili loše, kvalificirane ili nekvalificirane rezultate te na taj način identificira pripada li uzorak ili pak ne pripada određenoj skupini prema utvrđenom modelu (46).

Huaijiao kapsule (HP) su drevni tradicionalni kineski lijek pripremljen od 6 ljekovitih biljaka. U Kini kapsule proizvodi više od 100 različitih proizvođača. Sastav biljaka u pripravku varira ovisno o geografskim uvjetima, uvjetima uzgoja, žetvi, uvjetima čuvanja i predobradi. No, samo su tri bioaktivne komponente – soforikozid, naringin i baikalin – identificirane kroz ispitivanje kontrole kakvoće HP-a. Konzumiranje HP-a može izazvati anafilaktičku reakciju, stoga je bilo neophodno ustanoviti jedinstven postupak ispitivanja spomenutog terapeutika kako bi se osigurala njegova kakvoća i sigurnost primjene. *Fingerprint* je internacionalno prihvaćen kao učinkovita tehnika za autentifikaciju i kontrolu kakvoće tradicionalnih kineskih lijekova. Tehnika kromatografskog *fingerprinta* može se koristiti i za karakterizaciju komponenti biljega (markera) te ujedno i nepoznatih komponenata u kompleksnom sustavu. Takvu strategiju procjene kakvoće biljnih proizvoda preporučuju SFDA, EMA i USFDA.

No, sam *fingerprint* nije dovoljan za kontrolu cjelokupne kvalitete tradicionalnih kineskih lijekova, budući da ne može kvantificirati bioaktivne sastavnice koje izravno utječu na njihovu kakvoću. Pri kontroli kakvoće HP-a bile su poznate metode za određivanje jedne ili najviše dvije komponente. S. Wang i suradnici prvi su razvili metodu koristeći HPLC *fingerprint* za istodobnu kvantitativnu analizu 7 komponenata koje se nalaze u HP-u

(soforikozid, naringin, baikalin, genistein, rutin, kvercetin i 5-O-metilvizamiozid).

Kromatografski *fingerprint* dobiven je za 17 HP uzoraka od tri različita proizvođača te je u svakom uzorku pronađeno 16 pojedinačnih pikova. Generiran je *fingerprint* medijan od 17 analiziranih uzoraka korištenjem profesionalnog softvera. Simulirani medijan kromatogram HP-a imao je 16 dobro razdvojenih „karakterističnih pikova“ (Slika 8).

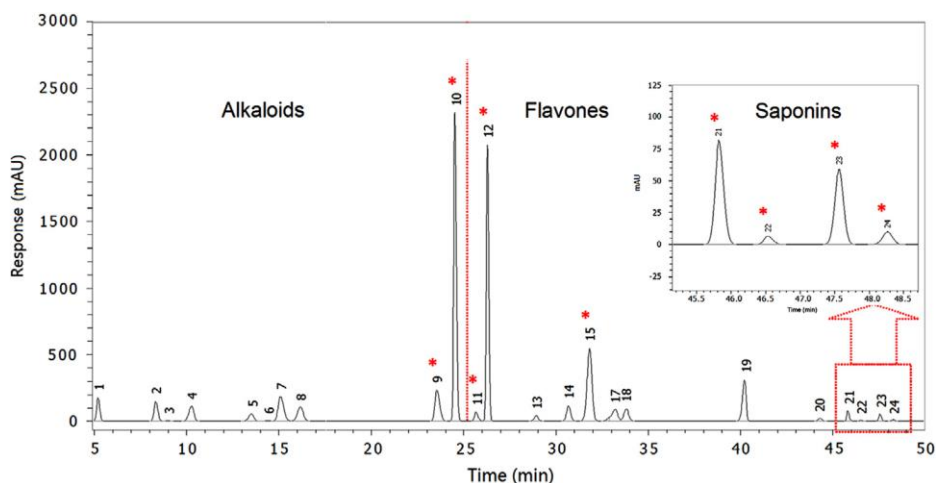


Slika 8: (A) HPLC kromatografski *fingerprint* 17 HP uzoraka i (B) simulirani medijan kromatogram dobiven pomoću *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine software (2004A)*. Kromatogrami označeni sa S1-S17 predstavljaju 17 HP uzoraka, dok kromatogram označen s R predstavlja simulirani medijan kromatogram. Pikovi označeni s 1 do 16 u simuliranom medijan kromatogramu predstavljaju 16 karakterističnih pikova, a pikovi 17 i 18 su naringin i kvercetin.

Soforikozid (pik 11) je važna bioaktivna komponenta HP-a, s ujednačeno visokim sadržajem i odgovarajućim vremenom zadržavanja te je stoga odabran kao referentni pik za računanje RRT-a (relativno vrijeme retencije) i RPA (relativna površina pika).

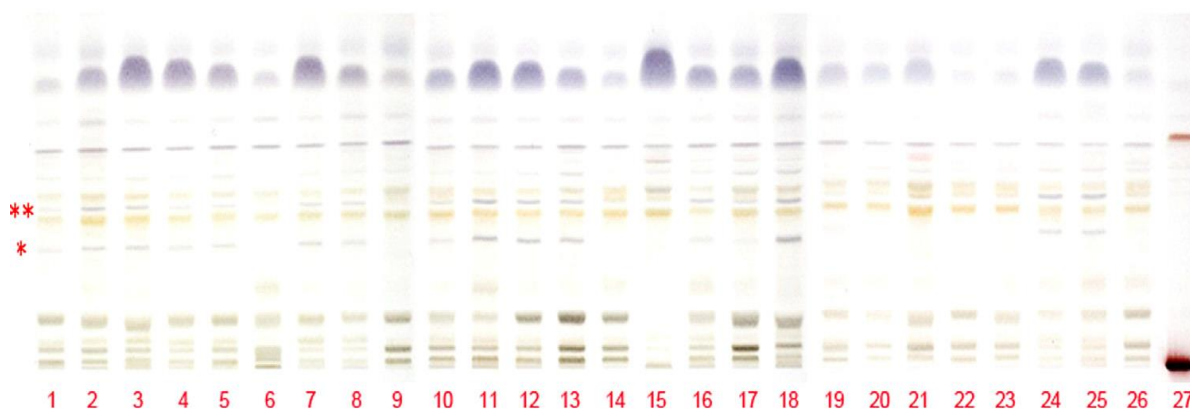
Izračunata je sličnost svakog kromatograma u odnosu prema simuliranom medijan kromatogramu. Svi koeficijenti sličnosti bili su u rasponu 0,966-0,998, čime je pokazano kako su slične kemijske komponente bile prisutne u analiziranim uzorcima različitih proizvođača. Predložena HPLC *fingerprint* metoda u kombinaciji s kvantitativnom analizom predstavlja učinkovit i sveobuhvatan alat za kontrolu kakvoće HP-a (46).

S. Sun i suradnici razvili su brzu i jeftinu HPTLC metodu za ispitivanje i kontrolu kakvoće droge *Ziziphi spinosae semen* (ZSS), sušenih, zrelih sjemenki vrste *Ziziphus jujuba*. ZSS je najčešće korištena droga u tradicionalnoj kineskoj medicini namijenjena liječenju tjeskobe i nesаницe zbog njenih sedativnih i hipnotičkih učinaka. Spomenuta biljna vrsta raste samostalno u prirodnom ekosistemu te potražnja za njom značajno nadmašuje njenu dostupnost. Saponini, flavoni i alkaloidi predstavljaju dominantne komponente ZSS-a. Kontrola kakvoće ZSS-a prema Kineskoj farmakopeji iz 2010. temeljila se na određivanju spinozina i jujubozida A. No, teško je zamisliti kako samo te dvije komponente pridonose farmakološkoj aktivnosti ZSS-a, dok drugi spojevi slične strukture nemaju takav učinak. Tako se povijesni model "jedna veličina odgovara svima" postupno prestao koristiti te je kromatografski *fingerprint* ušao u upotrebu kao glavna metoda ispitivanja i kontrole kakvoće tradicionalnih kineskih lijekova. Kombinacija *fingerprint* tehnika s kemometrijom predstavlja još snažniji alat za ispitivanje njihove kvalitete i učinkovitosti. Kako bi se uspostavila brza metoda za analizu ZSS uzoraka, S. Sunn i suradnici razvili su glavni HPLC *fingerprint* primjenom srednje vrijednosti površine pikova dobivenih analizom 24 uzorka (bez 1 ekstrakta i 2 krivotvorine). Kromatogram je podijeljen na tri dijela. Prvi dio se sastoji od nekoliko pikova alkaloida s retencijskim vremenima manjim od 25 minuta. Drugi dio kromatograma sastoji se od pikova flavona s retencijskim vremenima između 25 i 45 minuta, dok treći dio sačinjavaju 4 pika saponina s retencijskim vremenima između 45 i 50 minuta (Slika 9).



Slika 9: Zajednički HPLC kromatogram ZSS-a razvijen od 24 uzorka s 3 glavne bioaktivne komponente. Pikovi #10, #21 i #23 su nedvosmisleno identificirani kao spinozin, jujubozid A i jujubozid B. Drugi pikovi označeni na kromatogramu sa zvjezdicom uvjetno su identificirani pomoću HPLC-MS/MS tehnike, ovisno o karakteristikama njihove masene fragmentacije.

S obzirom na to da saponini imaju slab odziv kod mjerenja apsorpcije na valnoj duljini od 203 nm, primijenjena je jeftina HPTLC metoda. Plavkastosive vrpce saponina vizualizirane su derivatizacijom s vanilinom u sumpornoj kiselini. Kao što je vidljivo iz kromatograma (Slika 10), uzorci su se razlikovali primarno s obzirom na udio jujubozida A i jujubozida B, koji su jedva detektirani u mnogim uzorcima, poglavito u uzorcima krivotvorina.



Slika 10: HPTLC kromatogram saponina u ZSS-u (* vrpca jujubozida A; **vrpca jujubozida B).

Analiza glavnih komponenata (PCA) korištena je za klasifikaciju analiziranih uzoraka u dvije grupe s obzirom na udio jujubozida A i B (visoki rezultat PC1 = 0,84 te niski rezultat PC1 = 0,43). Uzorci s niskim udjelom jujubozida A i B smatraju se inferiornim u kakvoći. Ovakav rezultat se odlično slagao s PCA analizom HPLC *fingerprinta* te se stoga ova jednostavna HPTLC metoda smatra efikasnom za analizu ZSS-a kako bi se diskriminirali adulteranti te lijekovi inferiorne kakvoće (48).

Cilj studije koju su proveli Mona Salih Mohammed i suradnici razvoj je HPTLC *fingerprint* profila aktivnih kloroformskih frakcija nakon ekstrakcije u metanolu nadzemnih dijelova vrste *Tribulus terrestris* (porodica *Zygophyllaceae*). Vrsta *T. terrestris* potječe iz umjereno toplih i tropskih regija južne Europe, južne Azije, Afrike, Australije i Sudana. HPTLC tehnika je postala konvencionalna analitička tehnika u standardizaciji biljnih pripravaka zbog niske cijene, mogućnosti analize velikog broja uzoraka te njihove minimalne predobrade. HPTLC se uobičajeno koristi za identifikaciju, ispitivanje čistoće, stabilnosti, određivanje sadržaja, *dissolution* profila te ujednačenosti sadržaja biljnih sirovina (biljni ekstrakti, fermentacijske smjese, pomoćne tvari, biljni lijekovi). Protutupalni učinak metanolnih i kloroformskih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *T. terrestris* određena ispitivanjem na štakorima. Kloroformske frakcije su se pokazale

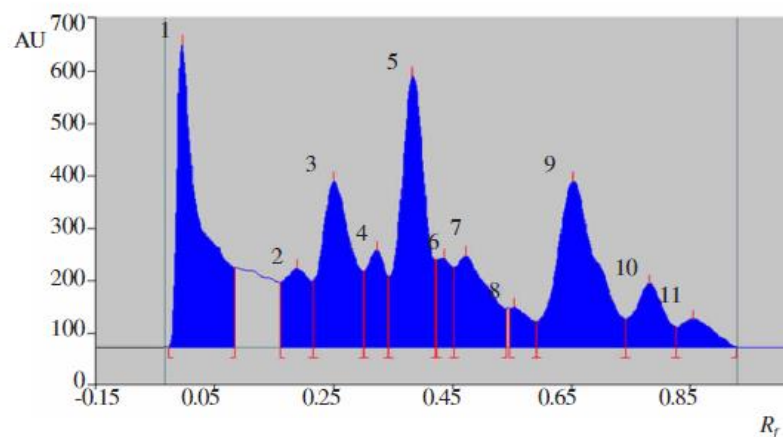
najučinkovitijima s obzirom na njihovu protuupalnu aktivnost. Ove aktivne, kloroformske frakcije su zatim odijeljene na silikagelnoj koloni kako bi se dobilo 15 dodatnih frakcija. Od dobivenih 15 frakcija, za 8 je ustanovljena farmakološka aktivnost te su one dalje analizirane HPTLC metodom. Po 10 µL od svake aktivne kloroformske frakcije (F1, F2, F4, F5, F7, F9, F11 i F14) točkasto je nanoseno na HPTLC ploču. Snimka razvijene suhe ploče na valnoj duljini od 254 nm pohranjena je u dokumentacijskom TLC sustavu proizvođača Camag. Analiza različitih kloroformskih frakcija otkrila je od 4 do 9 glavnih mrlja na HPTLC kromatogramu. Čistoća uzorka potvrđena je usporedbom absorbancije dobivenih spektara na početku, sredini te kraju vrpce. Nekoliko pikova određenih u ovom eksperimentu ukazuje na raznolik sastav vrste *T. terrestris*. Posljedično tome, razvijena HPTLC *fingerprint* metoda se može koristiti kao referenca u kontroli kakvoće sirovina, krivotvorina te farmaceutskih pripravaka koji sadrže biljku *T. terrestris* (49).

Vrata *Piper nigrum* crni papar) vrijedna je ljekovita biljka koja pripada porodici *Piperaceae*. Crni papar također je jedan od najznačajnijih začina te se stoga i naziva „kraljem začina”. Vrata *P. nigrum* sadrži opori alkaloid poznat kao piperin (1-peperoil piperidin). Papar se primjenjivao u liječenju različitih bolesti kroz mnoga stoljeća u tradicionalnoj i pučkoj medicini. Terapeutski potencijal vrste *P. nigrum*, njegovih ekstrakata ili njegovog najvažnijeg kemijski aktivnog spoja piperina bio je u fokusu mnogih studija. Aftab Ahmad i suradnici dizajnirali su svoju studiju kako bi proveli fizikalno-kemijsku i fitokemijsku analizu različitih ekstrakata vrste *P. nigrum* pomoću HPTLC metode.

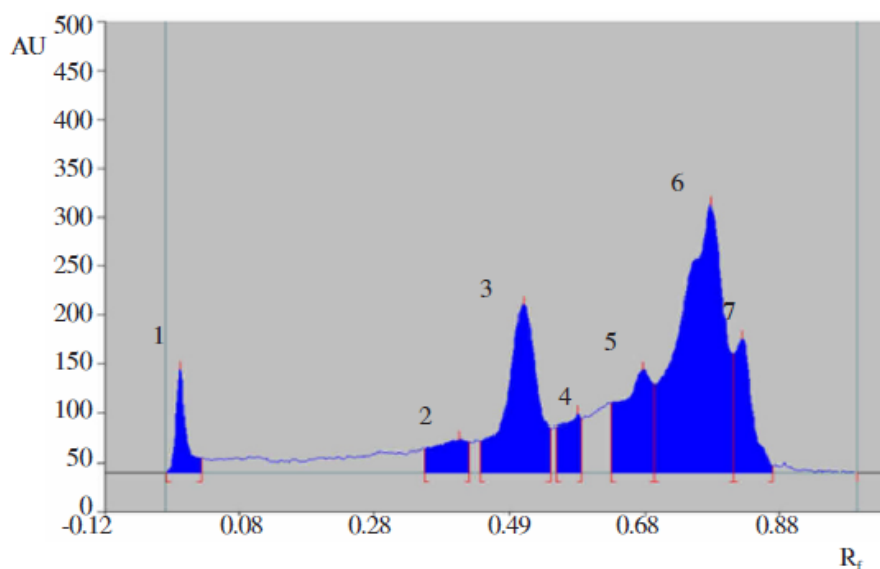
Plod vrste *P. nigrum* korišten u analizi prikupljen je na lokalnoj tržnici. Usitnjeni, suhi prah biljne droge ekstrahiran je u različitim otapalima, poput etera, n-butanola, kloroforma i metanola. Standardizacija ekstrakata ploda vrste *P. nigrum* provedena je u skladu s uputama WHO te korištenjem različitih farmakopejskih ispitivanja. Čistoća

biljnih ekstrakata ispitana je različitim fizikalno-kemijskim testovima, poput ispitivanja pH, određivanja sadržaja vlage, gubitka sušenjem, ostatka žarenjem itd. Metanolni ekstrakti analizirani HPTLC metodom, kolorimetrijski, plinskom kromatografijom s masenim detektorom te HPLC metodom pokazali su prisutnost alkaloida, ugljikohidrata, fenolnih spojeva, flavonoida, tanina, saponina, proteina, lipida i steroida.

Rezultati HPTLC *fingerprint* analize metanolnih ekstrakata ploda vrste *P. nigrum* pokazali su prisutnost različitih kemijskih spojeva u ispitanim ekstraktima. HPTLC kromatogram otkrio je 11 pikova različitih R_f vrijednosti te površina na 366 nm (Slika 11), dok je 7 pikova bilo prisutno na HPTLC kromatogramu snimanom na valnoj duljini od 254 nm (Slika 12). Broj pikova ukazuje na broj spojeva u ekstraktima. Sumarno, *fingerprint* slike vrste *P. nigrum* dobivene HPTLC analizom u ovoj studiji mogu se smatrati standardnim *fingerprintom* te referencom u autentifikaciji, identifikaciji, purifikaciji te razlikovanju ploda vrste *P. nigrum* od njegovih krivotvorina (50).



Slika 11: Kromatogram metanolnog ekstrakta ploda vrste *P. nigrum* na 366 nm.



Slika 12: Kromatogram metanolnog ekstrakta ploda vrste *P. nigrum* na 254 nm.

Polygoni Multiflori Radix (PMR) sve se više primjenjuje, ne samo kao tradicionalni biljni pripravak, već i kao popularna funkcionalna namirnica. U studiji koju su proveli Sun L-L i suradnici kombinirane su multivarijatne kemometrijske metode i masena spektrometrija za analizu UPLC *fingerprinta* droge PMR uzorkovane u šest različitih geografskih područja. Predložena je kemometrijska strategija koja se temelji na multivarijatnoj rezoluciji krivulja-alternaciji najmanjih kvadrata (MCR-ALS) te tri metode klasifikacije za analizu dobivenog UPLC *fingerprinta*. Uobičajeni kromatografski problemi, uključujući pozadinski šum, šum bazne linije te preklapanje pikova, riješeni su s uspostavljenim MCR-ALS modelom. Ukupno su određene 22 komponente. Analiza glavnih komponenata (PCA) i Ward-ova metoda primijenjeni su za razvrstavanje 72 PMR uzorka iz šest različitih geografskih područja. Prema PCA plotu, PMR uzorci su razvrstani u četiri skupine, ovisno o zemljopisnom položaju i klimi. Rezultati su potom potvrđeni Ward-ovom metodom. Osim toga, prema varijanci ponderirane udaljenosti između dobivenih klusterskih centara iz Wardove metode identificirano je pet komponenata kao najznačajnijih varijabli (kemijskih markera) za diskriminaciju klastera. Pet kemijskih

markera ključnih za kontrolu kakvoće PMR-a dodatno je identificirano koristeći UPLC-kvadrupol maseni spektrometar. Dobiveni rezultati su pokazali točnost razvijene kemometrijske strategije. S obzirom na navedeno, predložena metoda se može primjenjivati u sveobuhvatnoj analizi prirodnih uzoraka (51).

Studija koju su proveli Xiaona Xu i suradnici rezultirala je korisnom kemijskom bazom za buduće analize droge *Fructus Aurantii Immaturus* (FAI). U sklopu studije dobiveni su HPLC *fingerprinti* 12 autentičnih uzoraka i 26 komercijalnih uzoraka droge FAI dobivenih iz različitih kineskih izvora. Prvo su identificirani i kvantificirani glavni bioaktivni spojevi u drogi, naringin i hesperidin. Zatim je provedena analiza glavnih komponenata (PCA) radi razlikovanja i razvrstavanja ispitivanih uzoraka na temelju glavnih pikova i cijelih kromatograma. Hijerarhijska klaster analiza (HCA) i analiza sličnosti (SA) dalje su provedene kako bi se validirali rezultati klastera. Optimizirana HPLC-DAD metoda uz pomoć spomenutih kemometrijskih metoda pokazuje da se kemijski *fingerprint* 38 uzoraka iz različitih izvora može relativno jednostavno identificirati i sustavno analizirati, što nudi novu mogućnost u izučavanju tradicionalnih kineskih lijekova. Dobiveni rezultati također pružaju koristan temelj za kontrolu kvalitete različitih i kompleksnih biljnih proizvoda (52).

4. RASPRAVA

Iz pregleda razvoja analitičkih tehnika i kemometrijskih metoda predstavljenog u prethodnim poglavljima, očita je uloga i značaj prikazanih alata u dobivanju kemijskog *fingerprinta* i kontroli kakvoće prirodnih bioaktivnih tvari.

Moderne spregnute kromatografske tehnike, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s diodnim nizom (HPLC-DAD), plinske kromatografije spregnute s masenim detektorom (GC-MS) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenim detektorom (HPLC-MS), postale su najčešće primjenjivane te najsnažnije tehnike u analizi kompleksnih biljnih uzoraka. U kombinaciji sa suvremenim kemometrijskim metodama, kromatografski *fingerprint* (cjelokupni kromatografski profil) pokazao se kao koristan i praktičan alat u procjeni kakvoće pojedine biljne vrste, biljne droge ili biljnog pripravka. Uz ranije dokazanu primjenu kromatografskog *fingerprinta* u autentifikaciji ili potvrdi različitog geografskog podrijetla složenih biljnih proizvoda, novija istraživanja potvrđuju mogućnost utvrđivanja njihovog kvantitativnog sastava. U stvarnosti, zamjetna je tendencija korištenja cjelokupnog kromatografskog profila u dobivanju kvalitativne i kvantitativne informacije o analiziranim uzorcima (44).

U nastavku su prikazane odabrane studije u kojima su primijenjene moderne analitičke i kemometrijske strategije u svrhu *fingerprint* karakterizacije odabranih prirodnih bioaktivnih tvari.

P. Aminfar i suradnici u svom su radu primijenili opsežnu kemometrijsku strategiju za klasifikaciju GC *fingerprinta* vrste *Salix lanata* (*S. lanata*). Ujedno su uspjeli povezati dobiveni *fingerprint* s antioksidativnom aktivnošću ispitivanih biljnih uzoraka.

S. lanata se tradicionalno koristi kao ljekovita biljka zbog njezinog antioksidativnog učinka. Stoga je njezina identifikacija i kontrola kakvoće od presudnog značenja. Za *fingerprint* analizu vrste *S. lanata* preporučan je kromatografski *fingerprint* korištenjem plinske kromatografije (GC) u kombinaciji s kemometrijom. Kako bi se povezale hlapljive komponente u ekstraktima ispitivane biljne vrste dobivene GC *fingerprintom* s njihovim antioksidativnim svojstvima, korištene su različite kemometrijske tehnike. Za spomenutu svrhu korištene kemijske komponente dobivene iz 28 uzoraka vrste *S. lanata* uzetih iz 8 različitih regija u Iranu.

Lišće, cvjetovi i pupoljci vrste *S. lanata* odvojeni su od ostatka biljke te samljeveni u prah. Ekstrakcija hlapljivih komponenata provedena je različitim otapalima (metanol, otopina natrijevog klorida, perkloretilen). Perkloretilenska faza je odvojena od vodene faze te korištena za GC-FID i GC-MS analizu.

Kako bi se uklonili kromatografski artefakti, provedena je predobrada dobivenih GC *fingerprinta*, poput korekcije bazne linije, korekcije pomaka u vremenima elucije te poravnavanja signala algoritmom Savitzky-Goley.

Analiza glavnih komponenata (PCA), hijerarhijska klaster analiza (HCA) i parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata-diskriminacijska analiza (PLS-DA) primijenjene su kemometrijske metode za klasifikaciju GC *fingerprinta* dobivenih iz uzoraka vrste *S. lanata*.

Provedena je *kros-validacija* odabranog kemometrijskog modela. Kako bi se dobiveni GC *fingerprint* razvrstao s obzirom na njihova antioksidativna svojstva, primijenjena je metoda regresije najmanjih kvadrata (PLS-R). Mogućnost PLS metode da previđa

antioksidativna svojstva testirana je repetitivnim mjerenjem uzoraka. Pomoću izgrađenog PLS modela, uzorci vrste *S. lanata* klasificirani su prema njihovoj antioksidativnoj aktivnosti. Završno, provedena je GC-MS analiza za identifikaciju odabranih pikova antioksidansa. Osam važnih antioksidativnih markera uspješno je otkriveno korištenjem PLS modela na ekstraktima vrste *S. lanata*. Zaključeno je da su identificirane antioksidativne tvari komponente od velikog značaja i mogu se koristiti kao hlapljivi markeri u procjeni i kontroli antioksidativne aktivnosti uzoraka vrste *S. lanata* (53).

Prodaja i potrošnja biljnih suplemenata je u porastu, posebice u zapadnom svijetu. Mnogo je ovakvih suplemenata moguće nabaviti putem interneta, koji je ujedno i prostor značajne ilegalne trgovine lijekovima. Svake se godine zaplijenjeni ilegalni pripravci šalju u laboratorije kako bi se testirali na prisutnost kemijskih dodataka ili ilegalno dodanih aktivnih farmaceutskih supstancija. U studiji koju su proveli E. Deconinck i suradnici (54) prezentiran je pristup koji se temelji na *fingerprintu* 5 biljaka koji je dobiven pomoću infracrvene spektroskopije (IR) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Odabrane biljke koriste se u proizvodnji biljnih pripravaka namijenjenih mršavljenju te povećanju potencije. Obje vrste *fingerprinta* (kromatografski i spektroskopski) kombinirani su s kemometrijskim tehnikama kako bi se dobili klasifikacijski modeli. Prvi se klasifikacijski model temelji na spektroskopskim podacima te daje naznaku o biljci za koju se pretpostavlja da je prisutna u uzorku. Konačna potvrda dobiva se analizom kromatografskog *fingerprinta* ispitivanog biljnog uzorka. Izabrana studija bavi se problemom prisutnosti potencijalno toksičnih, reguliranih biljaka u biljnim pripravcima koji se primjenjuju kao dodaci prehrani. Ispitivačka skupina je demonstrirala mogućnost detekcije toksičnih i zakonski reguliranih biljnih droga u dijetetskim biljnim pripravcima korištenjem *fingerprinta* baziranog na infracrvenoj spektroskopiji i kromatografiji.

Kromatografski *fingerprint* je široko prihvaćena tehnika u farmakognoziji i kontroli kakvoće biljnog materijala, iako se sporadično koristio i u identifikaciji pojedinih biljnih vrsta u smjesama tvari, poput dijetetskih biljnih pripravaka. Dodatno se kromatografski *fingerprinti* često razvijaju za svaku biljku pojedinačno te u situacijama kada se želi probirati nekoliko biljaka, potrebno je razviti nekoliko *fingerprinta* korištenjem različitih kromatografskih metoda. Stoga je potrebno provesti predodabir kako bi se mogli fokusirati *fingerprint* analizu u kromatografiji na jednu biljku. Infracrvena spektroskopija (IR) može biti korisna upravo u ovakvom slučaju. Na temelju *fingerprinta* snimljenog u srednjem infracrvenom području te kemometrijskog modeliranja, moguće je razlikovati različite biljne dijetetske pripravke.

U odabranoj studiji, prethodna ispitivanja u infracrvenoj spektroskopiji i kromatografiji kombinirana su u jednu zajedničku strategiju kako bi se ispitala i utvrdila prisutnost pet reguliranih biljaka u biljnim dodacima prehrani. Strategija je primijenjena u nadzoru 69 biljnih pripravaka prisutnih na belgijskom tržištu, od kojih se za 35 tvrdilo da pomažu pri mršavljenju, a preostalih 34 u poboljšanju potencije kod muškaraca.

Referentni standardi biljnih vrsta *Aristolochia fanghi*, *Ilex paraguariensis*, listovi vrste *Epimedium spp.*, kora vrste *Pausinystalia yohimbe* i plod vrste *Tribulus terrestris* kupljeni su od Američke biljne farmakopeje (American Herbal Pharmacopoeia). Kao slijepa proba korištena je laktoza te šest biljnih uzoraka zaplijenjenih od strane belgijske agencije za lijekove (FAHMP). Uzorci korišteni kao slijepa proba bili su negativni na prisutnost sintetskih spojeva te nisu sadržavali niti jedan od pet odabranih biljaka u ovoj studiji. Svi su odabrani proizvodi bili u obliku kapsula ili tableta.

Za IR analizu standarda korišten je usitnjeni prašak kupljenog farmakopejskog biljnog materijala. Uzorci primijenjeni kao slijepa proba snimljeni su u obliku kako su pribavljeni ("as is"). Test uzorci, svaki pojedinačno, samljeveni su te pomiješani u različitim omjerima

s praškastim standardima (1:2, 1:5, 1:10, 1:15 i 1:20). Na isti je način pripremljena laktoza i šest zaplijenjenih biljnih uzoraka.

Za snimanje spektara ispitivanih uzoraka uzet je prah iz kapsula, tj. tablete samljevene u prah.

Kako bi se snimio kromatografski *fingerprint*, pripremljeni su različiti ekstrakti standarada usitnjenih u prah, slijepa probe, pripremljeni test uzorci te ispitivani uzorci.

Tijekom obrade podataka, razlikovala su se dva seta podataka. IR te HPLC *fingerprint* snimljenih slijepih probi, čistog biljnog materijala, pripremljenih mješavina u različitim omjerima te ispitivanih uzoraka. Spektralni podatci obrađeni su metodom normalizacije kojom su uklonjene varijacije u podacima proizašle iz samog mjerenja, poput razlike u valnim duljinama, efektu raspršivanja svjetlosti, razlike u detektorima itd.

HPLC *fingerprint* je korišten „as is“. Zbog kompleksnosti dobivenog *fingerprinta*, odlučeno je da se dobiveni *fingerprint* neće obrađivati. Suprotno od odabranog pristupa u IR *fingerprintu*, kromatografski podatci su modelirani za svaku biljku pojedinačno. Kreirani su setovi binarnih modela, od kojih je svaki sadržavao pozitivnu i negativnu klasu za pojedinu biljku. Odabrani pristup je imao smisla budući da se inicijalno koristio jeftin probir primjenom IR spektroskopije koju je slijedilo HPLC *fingerprint*.

Klaster metoda (k-NN), analiza glavnih komponenata (PCA) i parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata-diskriminacijska analiza (PLS-DA) korištene su za modeliranje svake klase seta podataka zasebno. Klaster metoda (k-NN) je najuspješnija u klasifikaciji binarnih problema te je stoga primijenjena na set kromatografskih podataka. Statistička metoda SIMCA u PCA modelu je primijenjena u klasifikaciji podataka dobivenih spektroskopskim i kromatografskim *fingerprintom*. PLS-DA je korištena za kalkulaciju kvalitativnih modela koji razlikuju različite biljke prema IR spektrima te razlikuju pozitivne i negativne klase pojedinačnih biljaka prema HPLC *fingerprintu*.

Prema dvostupanjskom probiru prezentiranom u ovoj studiji, 1 od 35 biljnih pripravaka za mršavljenje sadržavao je toksičnu vrstu *Aristolochia fanghi*, a 11 uzoraka *Ilex paraguariensis*. *A. fanghi* je zabranjena zbog nefrotoksičnosti, a *I. paraguariensis* je dozvoljen, ali mora biti naveden na pakiranju, što nije bio slučaj kod analiziranih uzoraka.

Dobiveni rezultati su također pokazali da je dvostupanjska procedura nužna budući da se prisutnost pojedinih biljaka ne može odrediti samo uz pomoć spektroskopskog *fingerprinta*. Ovo također nije ni bio početni cilj cjelokupne strategije. S obzirom na to da se HPLC *fingerprint* najčešće razvija ciljano za jednu biljku, ideja je bila da se analiza uzorka fokusira na jednu biljku pomoću brzog probira IR *fingerprintom*. Kao potvrdu koncepta u studiji, HPLC metoda je korištena u analizi svih uzoraka, iako su rezultati pokazali da su svi uzorci koji su se potvrdili pozitivnima u HPLC *fingerprintu* ujedno bili pozitivni i u IR *fingerprintu*. Također, niti jedan od uzoraka koji se pokazao negativnim na jednu testiranu biljku nije dao pozitivni rezultat za drugu biljku. Ovo je dokaz da strategija funkcionira te da se u budućnosti HPLC *fingerprint* treba snimiti samo za uzorke koje se budu testirali kao pozitivni u IR *fingerprintu*. Koncept je potvrđen reanalizom uzoraka koji su se pokazali pozitivnima na jednu od ciljanih biljaka pomoću tehnike LC-MS/MS. Za 19 od 21 analiziranih uzoraka rezultati LC-MS/MS analize su se slagali s prethodno predloženom procedurom u dva stupnja. Rezultati studije su potvrdili da je kontrola kakvoće dodataka prehrani nužna od strane regulatornih tijela, osobito u slučaju pripravaka koji se prodaju putem interneta.

Kontrola se također ne bi smjela ograničiti samo na ispitivanje prisutnosti nedozvoljenih supstancija kemijskog podrijetla, već i na prisutnost nedozvoljenih biljnih tvari, kako je i dokazano predmetnom studijom (54).

Y. Zhang i suradnici bavili su se ispitivanjem konzistencije kakvoće tableta sladića. Za potrebu ispitivanja razvijen je *fingerprint* snimanjem na različitim valnim duljinama 480 uzoraka tableta sladića, proizvedenih od strane 32 različita proizvođača.

Sladić (*Radix Glycyrrhizae*) je suhi korijen tri vrste roda *Glycyrrhiza*, *G. uralensis* Fisch., *G. inflata* Bat. i *G. glabra* L. koji se koristio u drevnom Egiptu, Grčkoj i Kini. Sladić je jedna od najvažnijih sirovina u lijekovima tradicionalne kineske medicine. Spomenuti biljni lijek primjenjuje se kao pomoć pri liječenju alergo-imunoloških i kardiovaskularnih bolesti, gastrointestinalnih problema, bolesti bubrega te raka. Do sada je iz sladića izolirano oko 300 komponenata, poput flavonoida i triterpenskih saponina odgovornih za antioksidativno, protuupalno, anitivirusno i antitumorsko djelovanje. Trenutno sladić u tabletama proizvode 33 proizvođača u Kini. Sladić u tabletama (eng. CLT) sastoji se od smjese ljekovitih biljaka, *Glycyrrhizza* ekstrakta, ekstrakta usitnjenih sjemenki maka, zvjezdastog anisa, kamfora te natrijevog benzoata u omjeru 56:25:2:1:1:1. Tablete sladića pripadaju kinesko-zapadnjačkoj mješavini i kontroliranim anestheticima te su regulirane kao lijek dobiven kemijskom sintezom. U praksi se kontrola kakvoće tipično provodi određivanjem kvantitativnog sadržaja markera, poput morfina i glicirizne kiseline pomoću CE ili HPLC. No, očigledno je da kvantitativno određivanje limitiranog broja markera nije dostatno za kontrolu kakvoće složenih biljnih pripravaka. *Fingerprint* tehnike koje se oslanjaju na prirodnu poveznicu između mnogobrojnih spojeva te prikazuju kemijski uzorak biljnih lijekova *in toto*, široko su prihvaćeni od strane regulatornih agencija, poput Kineske agencije za hranu i lijekove (CFDA), Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) te Europske agencije za lijekove (EMA) (55).

Konvencionalne kromatografske *fingerprint* metode tipično korištene za identifikaciju i autentifikaciju ukazivale su isključivo na kvalitativnu sličnost između uzoraka te im je nedostajao kvantitativni sadržaj. Stoga je razvijena matematička metoda za procesiranje

podataka bazirana na *fingerprint* vektorima koja sadrži kvalitativnu i kvantitativnu analizu *fingerprinta* (eng. ALQMF). Devet ispitivanih spojeva također je kvantificirano uporabom validirane HPLC metode. Dodatno, primijenjena je PCA tehnika na kromatografsku *fingerprint* analizu za diskriminaciju između *fingerprinta* dobivenih na različitim valnim duljinama. Osim toga, jednom kada je razvijena teoretska priprema standarada pomoću HCA, ALQFM je mogla kvantificirati mnogobrojne spojeve tableta sladića bez korištenja kemijskih standarada, čime je značajno smanjena količina otpada te potreba za ljudskim resursima, u usporedbi s bilo kojom drugom metodom koja upotrebljava mnogobrojne markere. Štoviše, kemijski *fingerprint* korišten zasebno samo poboljšava kontrolu kakvoće i standardizaciju, međutim, ne daje informaciju o komponentama koje su odgovorne za farmakološku aktivnost biljnih lijekova tradicionalne medicine.

Kao što je dobro poznato, disbalans između proizvodnje enzima s antioksidativnim djelovanjem i reaktivnih spojeva kisika izazvat će oksidativni stres koji uzrokuje progresivno starenje, rak i brojne druge bolesti. Srećom, recentna istraživanja su pokazala kako ispravni unos hrane/lijekova koji posjeduju antioksidativna svojstva mogu smanjiti oštećenja uzorkovana slobodnim radikalima. Glycyrrhiza ekstrakt i ekstrakt usitnjenih kapsula maka, kao glavnih sastojaka u tabletama sladića, uglavnom sadrže flavanoide, triterpenske saponine i alkaloidne koji se smatraju glavnim antioksidativnim sastavnicama te se tipično evaluiraju tijekom kontrole kakvoće. Kako bi se istražio odnos između antioksidativne aktivnosti tableta sladića i kemijskog *fingerprinta*, primijenjeno je određivanje sadržaja antioksidativnog aktiviteta i PLS model. Kombinatorna uloga multiplih aktivnih lijekova je često zanemarivana u postojećim farmakološkim studijama. Stoga su autori Yujing Zhang i suradnici smatrali da se ispitivanje farmakološke aktivnosti ne treba ograničiti na jedan sastojak. Pomak u određivanju „jednog bioaktivnog sastojka“

prema određivanju „jednog bioaktivnog sastojka, jednog bioaktivnog biljnog lijeka, kombinacija biljnih lijekova-interakcija biljnih lijekova“ može biti značajan u istraživanju mehanizma biljnih lijekova koje primjenjuju tradicionalne medicine. Konačno, kombinacijski indeks (CI), spregnut sa spektroskopskim određivanjem sadržaja DPPH (1,1-difenil-2-pirilhidrazil), primijenjen je za evaluaciju interakcija Glycyrrhiza ekstrakta i ekstrakta usitnjenih kapsula maka. Posljedično, objavljeni rad se nije fokusirao samo na analizu poboljšanja kontrole kakvoće kompleksnih smjesa ili matriksa, posebice biljnih ekstrakata, već i na njihovu aktivnost smanjenja slobodnih radikala te interakcije između smjesa.

U odabranoj studiji, HPLC *fingerprint* metoda spregnuta s multivarijatnim statističkim tehnikama, poput analize glavnih komponenata (PCA), hijerarhijske klaster analize (HCA) i analize sličnosti (SA), uvedena je u procjenu kakvoće tableta. Dodatno, studija je kombinirala kemijski *fingerprint* i antioksidativnu aktivnost tableta sladića kako bi odredila integrirani sustav evaluacije korištenjem PLS modela za istraživanje navodnih aktivnih komponenti spomenutog biljnog lijeka tradicionalne medicine, predstavljajući njegovu antioksidativnu aktivnost. Pristup opisan u ovoj studiji ponudio je učinkovit, snažan te preferirani model za kontrolu kakvoće tableta sladića (55).

Kao što je prikazano, kromatografski *fingerprint* kombiniran s povezanim kemometrijskim tehnikama predstavlja moćan alat za identifikaciju i prepoznavanje te kontrolu kakvoće pojedinih kompleksnih produkata prirodnog podrijetla. Posljednja istraživanja upravo nude strategiju za kvantitativnu analizu formuliranog kompleksnog sustava korištenjem čitavog kromatografskog profila i nekih kemometrijskih modela. Može se zaključiti da se kombinacijom kromatografskog *fingerprinta* i kemometrijskih tehnika ne postiže samo identifikacija i prepoznavanje, već ujedno i kvantifikacija složenog analitičkog sustava (44).

5. ZAKLJUČAK

Interes za identifikacijom kemijskih komponenata u kompleksnim uzorcima prirodnog podrijetla u značajnom je porastu. Postojeći interes utjecao je na istraživanje kemijskih signala kompleksnih uzoraka, tj. kemijski *fingerprint*.

Fingerprint se može definirati kao karakteristični profil koji proizlazi iz kompleksnog kemijskog sastava analiziranog uzorka, a određuje se kromatografskim, spektroskopskim ili elektroforetskim tehnikama. Kromatografski *fingerprint*, kao obećavajući alat u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi kompleksnih prirodnih proizvoda, poput biljnih lijekova tradicionalnih medicina, u širokoj je primjeni u različitim modalitetima. Brzo širenje primjene takve vrste terapijika ukazalo je na značaj i potrebu uvođenja suvremenih i obuhvatnih postupaka kontrole njihove kakvoće. Zahvaljujući mogućnostima prikazivanja cjelokupne slike svih aktivnih, bioloških i farmaceutskih komponenata kompleksnog biljnog uzorka, kromatografski *fingerprint* je široko prihvaćen i preporučan kao učinkovita metoda kontrole kakvoće složenih biljnih lijekova od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) te Američke agencije za hranu i lijekove (FDA). Dodatno, kromatografski *fingerprint* se uobičajeno primjenjuje u identifikaciji, autentifikaciji, karakterizaciji i klasifikaciji biljnog materijala. S obzirom na činjenicu da biljni pripravci/proizvodi sadrže kompleksne matrikse, postoje fundamentalni izazovi u njihovoj kromatografskoj *fingerprint* analizi, poput pomaka u vremenu elucije, preklapanju pikova, pozadinskom šumu i šumu bazne linije, te niskom omjeru signala i šuma (*signal-to-noise ratio* S/N). Posljedično tome, analiza takvih kompleksnih matriksa težak je i vremenski zahtjevan proces.

Sukladno navedenom, multivarijatne kemometrijske metode imaju značajnu ulogu u rješavanju kromatografskih problema te u ekstrakciji maksimalne količine korisnih informacija iz kromatografskog *fingerprinta* (53).

Iako je *fingerprint* široko prihvaćen kao učinkovita metoda za procjenu kakvoće tradicionalnih kineskih lijekova, predstoji još dug put prije nego što *fingerprint* i zaista postane priznat kao internacionalni standard za kontrolu kakvoće.

Prvi problem je standardizacija *fingerprinta*. Očito je kako se profili, dobiveni različitim analitičkim tehnikama kod kojih pikovi nisu identificirani ili ih je teško razaznati, ne mogu smatrati *fingerprintima*. Opći pristup u razvoju *fingerprinta* je prikazati što je moguće više pikova u profilu, iako za to ne postoji izričito navedeni kriterij. Istodobno, problemi se javljaju u postojećim metodama za procjenu i prepoznavanje *fingerprinta*. Na primjer, sličnost *fingerprinta* s referentnim profilima često dostiže prag određen postupkom kvalifikacije. No, taj je prag često određen empirijski te ga je teško precizno odrediti, stoga je granica između kvalificiranih i nekvalificiranih tradicionalnih kineskih lijekova nejasna.

Drugi problem je nekonzistentnost *fingerprinta*. Postoje razlike u *fingerprintima* koje proizlaze iz analize na različitim analitičkim instrumentima ili kolonama, a pri istim kromatografskim uvjetima. Taj se problem donekle može riješiti korekcijom retencijskih vremena standardnih supstancija ili korištenjem relativnih retencijskih vremena.

Treći problem predstavlja kompleksna korelacija između pikova *fingerprinta* i kemijskih komponenata, pri čemu čistoća pika u *fingerprintu* može biti niska te jedan pik može sadržavati različite spojeve.

Dodatno, *fingerprintom* se može samo kvalitativno procijeniti kompleksni pripravak/terapeutik tradicionalne medicine, tj. može se provesti njegova identifikacija, ili mu se može potvrditi autentičnost, ili podrijetlo. Teško je provesti kvantitativnu analizu

takvih terapeutika kompleksnog sastava te tako ukazati na uzorak veće kakvoće usporedbom između različitih *fingerprinta*. Istodobno, još je uvijek nejasna korelacija između sličnosti *fingerprinta* i konzistencije u njihovoj kakvoći i učinkovitosti. Oba navedena ograničenja ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima evaluacije kakvoće terapeutika tradicionalnih medicina koje su temeljene na *fingerprintu*.

U konačnici, velika se pozornost pridaje kemijskom sastavu prilikom evaluacije lijekova koji ulaze u sastav tradicionalnih medicina diljem svijeta, a znatno manja ispitivanjima čistoće i ljekovitog učinka takvih terapeutika, iako imaju iznimnu važnost u konačnoj procjeni njihove kvalitete i djelotvornosti. Upravo su istraživanja odnosa kvalitetnog *fingerprinta* i farmakološkog učinka ljekovitih pripravaka/lijekova nužna za konačnu evaluaciju spomenute skupine terapeutika. Zabilježen je napredak u studijama koje su se bavile otkrivanjem pikova u *fingerprintu* koji vezani za djelotvornost terapeutika. Dodatno, dobro je poznato kako učinkovitost lijekova tradicionalnih medicina proizlazi iz mnogobrojnih komponenata u njihovom sastavu i vezani *fingerprint* ne može samostalno razriješiti mehanizam djelovanja prisutnih kemijskih komponenata kao ni njihovu ulogu u djelotvornosti terapeutika. Isto tako, *fingerprint* ne može u potpunosti opisati/razjasniti niti sinergiju ili antagonizam između mnogobrojnih komponenata te njihov utjecaj na uspješnost liječenja. S tim u svezi, za ljekovite pripravke/terapeutike koje primjenjuju tradicionalne medicine diljem svijeta u budućnosti će biti potrebno provesti brojna istraživanja, kako njihovog kemijskog sastava, tako i farmakodinamike, farmakokinetike te bioekvivalencije, kako bi razvijeni vezani *fingerprinti*, u kombinaciji s prikladnim kemometrijskim modalitetima, zaista opisivali učinkovitost i sigurnosti takvih terapeutika, pridonoseći pritom njihovoj modernizaciji i internacionalizaciji (56).

6. LITERATURA

1. World Health Organization, General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines, 2000, p. 1.
2. Bansal A, Chhabra V, Rawal RK, Sharma S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *J Pharm Anal.* 2014 Aug;4(4):223-233.
3. Tistaert C, Dejaegher B, Heyden YV. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Anal Chim Acta.* 2011 Apr 1;690(2):148-61.
4. Yongyu Z, Shujun S, Jianye D, Wenyu W, Huijuan C, Jianbing W i sur. Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis. *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas.* Prof. Shoyama Y (Ed.). InTech. 2011; DOI: 10.5772/23962.
5. Kamboj A. Analytical Evaluation of Herbal Drugs. *Drug Discovery Research in Pharmacognosy.* Prof. Vallisuta O (Ed.). InTech. 2012; DOI: 10.5772/26109.
6. Ravikanth K, Kanaujia A, Takur D, Sharma AK, Singh P. Establishing the phytoequivalence of an antidiarrhoeal and function modulator feed additive – Salcochek. *International Journal of Advanced Research.* Volume 1. Issue 10. 2013; 119-128.
7. WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants; WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva WHO. 2003.
8. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. World Health Organization. Dept. of Technical Cooperation for Essential Drugs and Traditional Medicine. Geneva WHO. 2007.
9. European Medicines Agency, Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products, EMA/CPMP/QWP/2819/00 Rev. 2 31 March 2011.
10. Food and Drug Administration, Botanical Drug Development Guidance for Industry, Pharmaceutical Quality/CMC Revision 1. December 2016.
11. Janeković Petras K. Kemijski fingerprint u identifikaciji i kontroli kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka. Specijalistički rad, 2017.

12. Djingova R, Kuleff I, Markert B. Chemical fingerprint of plants; *Ecological Research* (2004)19: 3–11.
13. Yongyu Z, Shujun S, Jianye D, Wenyu W, Huijuan C, Jianbing W i sur. Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis, Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, Prof. Yukihiro Shoyama (Ed.), ISBN: 978-953-307-682-9, InTech, 2011, Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/quality-control-of-herbal-medicines-and-related-areas/quality-controlmethod-for-herbal-medicine-chemical-fingerprint-analysis>
14. Ciesla L. Biological fingerprinting of Herbal Samples by Means of Liquid Chromatography, *Chromatography Research international*, Volume 2012, article ID 532418, 9 pages , 2012. doi:10.1155/2012/532418
15. Sharma PP. How to practice GMPs Vandana publications. 1995.
16. Tao Y, Gu X, Li W, Wu H, Cai B, Zhang B. Techniques for biological fingerprinting of traditional Chinese medicine, *Trends in Analytical Chemistry* 2017; (19)272-282.
17. Muhammad S, Han S, Xie X, Wang S, Aziz MM. Overview of online two-dimensional liquid chromatography based on cell membrane chromatography for screening target components from traditional Chinese medicines. *J Sep Sci.* 2017 Jan;40(1):299-313
18. World Health Organization. Pharmaceuticals Unit. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva WHO. 1992.
19. Giri L, Andola HC, Purohit VK, Rawat MSM, Rawal RS, Bhatt ID. Chromatographic and Spectral Fingerprinting Standarditaion of traditional Medicines: An Overview as Modern Tools, *Research Journal of Phytochemistry* 2010; 4(4): 234-241,
20. Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2009; str. 204,207,213, 215-218.
21. European Pharmacopoeia 9.5. Online. 2018. General chapters: 2.2.46., 2.4.24., 2.4.22., 2.4.23., 2.2.28. Dostupno na: <http://online6.edqm.eu/ep900/>
22. Sandra P, David F, Szücs R. Some applications of state-of-art cappillary gas chromatography in the pharmaceutical industry. *TrAC Trends in analytical chemistry*, 2002;21:662.

23. Cindrić M, Marković A, Horvać A: Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: Osnove metodologije i primjene. *Medicina* 2009;45(3):218-232. Dostupno na: hrcak.srce.hr/file/68074
24. Liu W. J. H. *Traditional Herbal Medicine Research Methods – Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies*. A John Wiley & Sons; 2011, str. 1, 3,24,69-70,392,402,422-423.
25. Joshi DD. *Herbal Drugs and Fingerprints Evidence Based Herbal*, Springer India; 2012, str. 83-85.
26. Mohd MA. *Advanced gas chromatography – progress in agricultural, biomedical and industrial applications*. InTech; 2012, str. 93.
27. Dusper I. *Pregled i razvoj spregnutih metoda plinske kromatografije u kontroli kakvoće farmaceutskih tvari i proizvoda*; Specijalistički rad, 2018.
28. Chen DD, Xe XF, Ao H, Liu JL, Peng C. Raman spectroscopy in quality control of Chinese herbal medicine. *Journal of the Chinese medical Association*, 2017; 80(5):288-296.
29. Zhang C, Su J Application of near infrared spectroscopy to the analysis and fast quality assessment of traditional Chinese medicinal products; *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2014;4(3):182-192.
30. Ali K, Maltese F, Fortes AM, Pais MS, Verpoorte R, Choi YH. Pre-analytical method for NMR-based grape metabolic fingerprinting and chemometrics; *Analytica Chimica Acta* 2011;703:179-186.
31. Kasač J. *Obrada signala u analitičkoj kemiji*; Završni rad, 2015.
32. Vasilj Đ. *Biometrika i eksperimentiranje u bilinogojstvu*. Hrvatsko Agronomsko društvo; 2000.
33. Pranjić A. *Šumarska biometrika*. Sveučilište u Zagrebu; 1990. str.107-128.
34. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood; 2000. str. 166-167.
35. Conzen JP. *Multivariate Calibration; A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry*. Bruker Optik GmbH; 2006
36. Dragoš M *Eksploracijska analiza podataka*. Završni rad; 2015.
37. Pecina M. *Metode Multivarijatne analize Osnove*. Sveučilšte u Zagrebu, Agronomski fakultet. 2006. Dostupno na: http://www.agr.unizg.hr/multimedia/pdf/ds1905_metode_mva_osnove_2006.pdf

38. Hartigan JA. Clustering algorithms. Wiley; 1975, str.351.
39. Höft M, Barik SK, Lykke AM. Quantitative Ethnobotany, Applications of multivariate and statistical analyses in ethnobotany. People and Plants working paper 6, UNESCO. Paris; 1999, str.46.
40. Kremer D. Rasprostranjenost, varijabilnost, rast i prirast američkih vrsta jasena u nizinskim šumama u Hrvatskoj. Disertacija. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2003, str 335
41. Peeters JP, Martinelli JA. Hierarchical cluster analysis as a tool to manage variation in germplasm collections. Theor Appl Genet 1989; 78:42-48.
42. Sneath PHA, Sokal RR. Numerical Taxonomy, The Principles and Practice of Numerical Classification. W. H. Freeman and Company; 1973, str. 573.
43. Späth H. Cluster Analyse Algorithmen. R. Oldenbourg Verlag; 1975, str.217.
44. Zhong X, Yan J, Li YC, Kong B, Lu HB, Liang YZ. A novel strategy for quantitative analysis of the formulated complex system using chromatographic fingerprints combined with some chemometric techniques. Journal of Chromatography A 2014;370:179-186.
45. Liu S, Liang YZ, Liu HT. Chemometrics applied to quality control and metabolomics for traditional Chinese medicines. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016 Mar 15;1015-1016:82-91.
46. Huang Y, Wu Z, Su R, Ruan G, Du F, Li G. Current application of chemometrics in traditional Chinese herbal medicine research. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016 Jul 15;1026:27-35.
47. Wang S, Zhang J, Liu J, Qian G, Fu C. Quality evaluation of Huaijiao pill by chromatographic fingerprint and simultaneous determination of its major bioactive components; Journal of Pharmaceutical Analysis 6 2016;249-255.
48. Sun S, Liu H, Xu S, Yan Y, Xie P. Quality analysis of commercial samples of Ziziphi spinosae semen (suanzaoren) by means of chromatographic fingerprinting assisted by principal component analysis. Journal of Pharmaceutical Analysis 2014;4(3):217-222.

49. Mohammed MS, Alajmi MF, Alam P, Khalid HS, Mahmoud AM, Ahmed WJ. Chromatographic fingerprint analysis of anti-inflammatory active extract fractions of aerial parts of *Tribulus terrestris* by HPTLC technique. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(3): 203-208.
50. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Alhadrami HAA, Bhandari A. Quantification of total phenol, flavonoid content and pharmacognostical evaluation including HPTLC fingerprinting for the standardization of *Piper nigrum* Linn fruits. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(2): 101-107.
51. Sun LL, Wang M, Zhang HL, Liu YN, Ren XL, Deng YR i sur. Comprehensive analysis of *Polygoni Multiflori Radix* of different geographical origins using ultra high- performance liquid chromatography fingerprints and multivariate chemometric methods. *J Food Drug Anal.* 2018 Jan;26(1):90-99.
52. Xu X, Jiang J, Liang Y, Yia L, Cheng J. Chemical fingerprint analysis for quality control of *Fructus Aurantii Immaturus* based on HPLC-DAD combined with chemometric methods| *Anal. Methods*, 2010;2(12):2002-2010.
53. Amnifar P, Abtahi M, Parastar H. Gas chromatographic fingerprint analysis of secondary metabolites of *Stachys lanata* (*Stachys byzantine* C. Koch) combined with antioxidant activity modelling using multivariate chemometric methods, *J Chromatogr A.* 2019 Sep 27;1602:432-440.
54. Deconinck E, Vanhamme M, Bothy JL, Courselle P. A strategy based on fingerprinting and chemometrics for the detection of regulated plants in plant food supplements from the Belgian market: Two case studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2019;166:189-196.
55. Zhang Y, Yang F, Zhang J, Sun G, Wang C, Guo Y, Wen R, Sun W. Quantitative fingerprint and quality control analysis of Compound Liquorice Tablet combined with antioxidant activities and chemometrics methods. *Phytomedicine.* 2019;59:152790.
56. Liu X, Jiang W, Su M, Sun Y, Liu H, Nie L, Zang H. Review article: Quality evaluation of traditional Chinese medicines based on fingerprinting; *J Sep Sci* 2019; 1-12.

7. KRATICE

Kratice	Engleski jezik	Hrvatski jezik
AHF	Adsorbed hollow fiber	Adsorbirana šuplja vlakna
ALQMF	Averagely linear quantified fingerprint method	Prosječna linearna kvantificirana <i>fingerprint</i> metoda
AMWFA	Alternative moving window factor analysis	Alternativna faktorska analiza pomičnog prozora
BF	Biological fingerprint	Biološki fingerprint
CE	Capillary electrophoresis	Kapilarna elektroforeza
CL	Chemoluminescence	Kemoluminiscencija
CLT	Compound Licorice Tablet	Tablete sladića
CMC	Cellular membrane chromatography	Celularna membranska kromatografija
DAD	Diode Array Detector	Detektor s diodnim nizom
INP	Immobilized nanoparticles	Imobilizirane nanočestice
IT	Information theory	Informacijska teorija
ELSD	Evaporative light scattering detector	Detektor raspršivanja svjetlosti
EMA	European medicines agency	Europska agencija za lijekove
ESI	Electrospray ionization	Elektrosprej ionizacija
FA	Factor analysis	Faktorska analiza
FID	Flame Ionization Detector	Plameno-ionizacijski detektor
GC	Gas Chromatography	Plinska kromatografija
HCA	Hierarchical cluster analysis	Hijerarhijska klaster analiza
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kratica	Engleski jezik	Hrvatski jezik
HPTLC	High performance thin layer chromatography	Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti
IR	Infrared	Infracrveno
LC	Liquid chromatography	Tekućinska kromatografija
LLS	Local least square	Metoda najmanjih kvadrata
ME-TLC	Micro emulsion thin layer chromatography	Mikroemulzijska tankoslojna kromatografija
MLR	Multiple linear regression	Multipla linearna regresija
MS	Mass spectrometry	Masena spektrometrija
NIR	Near infrared	Blisko infracrveno
NMR	Nuclear magnetic resonance	Nuklearna magnetska rezonancija
PC	Paper Chromatography	Papirna kromatografija
PCA	Principal components analysis	Analiza glavnih komponenata
PCR	Principal component regression	Regresija glavnih komponenata
PLS	Partial least square	Najmanji kvadrat
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation	Pogreška korijena srednjeg kvadrata u unakrsnoj validaciji
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction	Korijen srednjeg kvadratnog predviđanja
RRLC	Rapid resolution liquid chromatography	Tekućinska kromatografija visoke razlučivosti
SA	Similarity analysis	Analiza sličnosti
SCC	Spectral correlative chromatography	Spektralna korelativna kromatografija
SFC	Supercritical Fluid Chromatography	Kromatografija superkritičnom tekućinom
SFDA	State Food and Drug Administration of China	Državna agencija za hranu i lijekove Kine

Kratica	Engleski jezik	Hrvatski jezik
SIMCA	Soft independent modelling by class analogy	Nezavisno modeliranje analogijom klase
TLC	Thin layer chromatography	Tankoslojna kromatografija
UF	Ultrafiltration	Ultrafiltracija
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti
UPLC	Ultra performance liquid chromatography	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti
USFDA	United States Food and Drug Administration	Američka agencija za hranu i lijekove
UV	Ultraviolet	Ultraljubičasto
WHO	World Health Organization	Svjetska zdravstvena organizacija