

# Validacija sHSS-GC-FID metode za određivanje ostatnih otapala u oralnim suhim oblicima biljnih dodataka prehrani korištenima uz terapiju upalnih bolesti crijeva

---

Lagundžić, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:154647>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



**Nina Lagundžić**

**Validacija sHSS-GC-FID metode za određivanje  
ostatnih otapala u oralnim suhim oblicima biljnih  
dodataka prehrani korištenima uz terapiju  
upalnih bolesti crijeva**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk. Rad je dijelom financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost projekt: Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva [HRZZ-UIP- 2017-05-3949].

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na uloženom vremenu i trudu, te stručnom vodstvu koje mi je pomoglo tijekom izrade diplomskog rada. Nadalje, zahvaljujem najboljim asistentima, Mariju i Edvinu, na brojnim prijateljskim savjetima, strpljenju i nesebičnoj pomoći svaki put kad mi je trebala. Na kraju, najviše zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima, koji su u svakoj situaciji bili tu za mene i podržavali me u mojim odlukama, te protekle godine studiranja učinili barem malo lakšima.*

## Sadržaj

1. Uvod.....	4
1.1 Upalne bolesti crijeva.....	1
1.1.1 Definicija i povijest .....	1
1.1.2 Epidemiologija i etiologija .....	1
1.1.3 Klinička slika.....	2
1.1.4 Liječenje upalnih bolesti crijeva lijekovima.....	3
1.1.5 Dodaci prehrani koji se primjenjuju uz terapiju IBD-a .....	4
1.2 Plinska kromatografija .....	6
1.2.1 Sustav za unos uzorka.....	6
1.2.2 GC pećnica .....	8
1.2.3 Kromatografske kolone .....	8
1.2.4 Detektori .....	9
1.2.5 Prednosti i ograničenja plinske kromatografije .....	9
1.2.6 Primjena plinske kromatografije u analitici lijekova.....	10
2. Obrazloženje teme .....	11
3. Materijali i metode .....	13
3.1 Materijali .....	13
3.2 Metode.....	14
3.2.1 Priprema standardnih otopina, radnih otopina i uzoraka .....	14
3.2.2 sHSS-GC-FID analiza .....	14
4. Rezultati i rasprava .....	15
4.1 Validacija analitičke metode .....	15
4.1.1 Selektivnost .....	15
4.1.2 Linearnost .....	17
4.1.3 Osjetljivost.....	18
4.1.4 Preciznost.....	19
4.1.5 Točnost .....	20
4.1.6 Izdržljivost .....	21
4.2 Primjena metode za određivanje analita.....	23
5. Zaključak.....	25
6. Literatura.....	26
7. Sažetak/ Summary .....	28

7.1 Sažetak .....	28
7.2 Summary .....	29
8. Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card	

## 1. Uvod

### 1.1 Upalne bolesti crijeva

#### 1.1.1 Definicija i povijest

Termin upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) označuje idiopatske kronične upalne bolesti gastrointestinalnog sustava u koje se ubrajaju ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*) i Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*). Navedene bolesti karakterizirane su ponavljajućim upalama segmenata probavnog trakta, s raznolikim kliničkim manifestacijama i nepredvidivim tijekom bolesti. Ulcerozni kolitis zahvaća rektum i kolon, dok Crohnova bolest može zahvatiti bilo koji dio probavnog trakta od usne šupljine do anusa uz pojavu brojnih ekstraintestinalnih manifestacija bolesti. Približno 10 % bolesnika s IBD-om ima nedeterminirani kolitis kod kojeg se upalne promjene kolona ne mogu svrstati ni u ulcerozni ni u Crohnov kolitis (Vucelić i sur., 2002).

Ono što danas smatramo Crohnovom bolešću nije prepoznato sve do 1913. godine, kada je Kennedy Dalziel, britanski liječnik, opisao pacijente s transmuralnom upalom tankog i debelog crijeva. Zatim su 1932. godine, dr. Crohn, dr. Ginzburg i dr. Oppenheimer objavili rad u kojem su opisali stanje koje uzrokuje upalu terminalnog ileuma i nazvali ga terminalnim ileitisom. S vremenom se ovu bolest prozvalo Crohnova bolest.

Ulcerozni kolitis prvi je opisao Hipokrat u antičkoj Grčkoj kao stanje karakterizirano kroničnim proljevom i krvavom stolicom, koje se kasnije povezivalo s ulceracijom i upalom debelog crijeva. Tek ga je 1859. godine Samuel Wilks, još jedan britanski liječnik, identificirao kao ulcerozni kolitis. 1950-ih godina utvrđeno je da su upalne bolesti crijeva primarne intestinalne autoimune bolesti, nakon što je uočeno da simptomi i jedne i druge bolesti odgovaraju na kortikosteroide (Malik, 2015).

#### 1.1.2 Epidemiologija i etiologija

Rezultati istraživanja niza epidemioloških studija jesu visoka incidencija upalnih bolesti crijeva u industrijaliziranim zemljama poput Skandinavije, Velike Britanije, sjeverozapadne Europe i SAD-a, dok je niska incidencija u Aziji, Africi i južnoj Americi. Potrebno je istaknuti kako je incidencija ulceroznog kolitisa viša od incidencije Crohnove bolesti (Vucelić i sur., 2002).

Što se faktora rizika tiče, popis je dugačak. Pušenje, oralni kontraceptivi, faktori ranog djetinjstva (rani prekid dojenja, pasivno pušenje, higijena i sl.), infekcije, operacija slijepog

crijeva, prehrana (rafinirani šećeri, gazirana pića, margarin i sl.), sve su to faktori okoliša koji se povezuju s pojavom upalnih bolesti crijeva. Međutim, pušenje je jedini jasno dokazani faktor koji povećava rizik od Crohnove bolesti zbog negativnog vaskularnog efekta, a smanjuje rizik od ulceroznog kolitisa zbog pozitivnog učinka na sadržaj sluzi kolona (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

Prve naznake povezanosti genskih promjena i pojave ovih bolesti dale su epidemiološke studije: etničke, studije familijarne agregacije i studije na blizancima. Istraživanja su jasno pokazala kako genski faktori imaju vodeću ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Prva regija humanog genoma koja je sigurno povezana s nastankom Crohnove bolesti je IBD1 lokus 16. kromosoma, gdje su identificirane promjene gena NOD2/CARD15. Naime taj gen sudjeluje u prepoznavanju bakterijskog muramildipeptida i može stimulirati sekreciju antimikrobnih peptida, primarno defenzina, koji štite domaćina od bakterijske invazije. Pogrešnim prepoznavanjem crijevne mikrobne flore u bolesnika s mutacijama gena NOD2 nastaje neadekvatan odgovor imunskog sustava koji uzrokuje upalne promjene u probavnoj cijevi (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006). Vjerojatno je da promijenjeni kolonični mukus kod ulceroznog kolitisa, te abnormalna intestinalna permeabilnost u obje bolesti, olakšavaju pristup luminalnih dijetalnih i bakterijskih produkata sluznici. Tamo bivaju prezentirani od antigen-prezentirajućih stanica, što dovodi do aktivacije T-stanica specifičnih za taj antigen. U zdravih će osoba rezultirati imuna tolerancija, a u slučaju pacijenata s IBD-om dolazi do nekontroliranog i prolongiranog upalnog odgovora. Tip imunog odgovora različit je u obje bolesti. Kod Crohnove bolesti pojavljuje se stanično posredovani Th1 tip imunog odgovora, a kod ulceroznog kolitisa Th2 tip koji generira humoralni imuni odgovor. Međutim, treba uočiti da oštra podjela na dva tipa imunog odgovora nije uvijek prisutna te može doći do preklapanja (Vucelić i sur., 2002).

### 1.1.3 Klinička slika

Ulcerozni kolitis je bolest vezana isključivo za debelo crijevo te simptomi ovise o proširenosti u debelom crijevu i intenzitetu upale sluznice. S obzirom na to da bolest zahvaća debelo crijevo od samog početka rektuma, glavni klinički simptom je rektalno krvarenje, odnosno pojava krvavih stolica pomiješanih sa sluzi i gnojem. Tegobe su vrlo često praćene tenezmima i urgencijom koji mnogo puta ne rezultiraju stolicom pa ih nazivamo "lažnim pozivima". Bolest je popraćena ekstraintestinalnim manifestacijama bolesti koje koreliraju s intenzitetom upale crijeva među koje su ubrajaju periferni artritis, nodozni eritem, gangrenozna pioderma i episkleritis.

S obzirom na to da Crohnova bolest može zahvaćati bilo koji dio probavnog trakta, mnogo je raznolikije kliničke slike od ulceroznog kolitisa. Najčešći simptomi su proljev, bol u trbuhu i gubitak na težini. Specifična značajka Crohnove bolesti je zahvaćenost cijele širine stijenke crijeva upalnim promjenama, tj. transmuralnost, a iz te činjenice proizlazi niz intestinalnih komplikacija Crohnove bolesti poput fibrostenotičkih ili upalnih striktura, fistula i intraabdominalnih apscesa. Upravo transmuralnost upale koja dovodi do suženja crijeva i fistuliranja kroz stijenku crijeva odgovorna je za karakteristične grčevite bolove u trbuhu bolesnika. Ekstraintestinalne manifestacije bolesti jednake su kao za ulcerozni kolitis, ali znatno češće. Kod bolesnika kod kojih bolest zahvaća tanko crijevo, česta je malapsorpcija te pridružena metabolička bolest kostiju, oksalatni nefroliti i žučni kamenci (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

#### 1.1.4 Liječenje upalnih bolesti crijeva lijekovima

Klasični lijekovi koje upotrebljavamo u liječenju upalnih bolesti crijeva su aminosalicilati, kortikosteroidi, imunomodulatori i antibiotici. U novije vrijeme i biološka terapija zauzima sve važnije mjesto u liječenju ovih bolesti (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

Aminosalicilati se koriste u kombinaciji sa steroidima za postizanje i održavanje remisije u pacijenata s IBD-om. Prva linija liječenja umjerenog ulceroznog kolitisa obično uključuje mesalazin (5-aminosalicilna kiselina). Mesalazin je aktivna supstanca koja djeluje protuupalno inhibicijom produkcije citokina i inflamatornih medijatora. Nedavno je otkriveno da je njegov učinak posredovan preko PPAR- $\gamma$  (engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma*). Vezanjem mesalazina na navedeni receptor dolazi do konformacijske promjene i migracije receptora u jezgru gdje modulira gensku transkripciju. Oralno primijenjen nezaštićeni mesalazin brzo bi se resorbirao u proksimalnom dijelu tankoga crijeva i ne bi dosegao udaljenije upaljene segmente, stoga je ključno omogućiti da nepromijenjen stigne u ciljani segment crijeva. Jedan od načina je uporabom azo-konjugata (primjeri prolijekova su sulfasalazin, olsalazin te balsalazid) koji nepromijenjeni dolaze u kolon gdje enzim azo-reduktaza cijepanjem azo-veze oslobađa mesalazin iz strukture. Drugi je način obložiti lijek ovojnicom koja se otapa tek kod određenog pH ili se postepeno otapa prolazeći kroz probavni trakt. Treći je način primijeniti lijek lokalno u obliku supozitorija ili klizmi.

Kortikosteroidi su snažni protuupalni lijekovi koji inhibiraju upalne puteve. Glukokortikoidna svojstva hidrokortizona i prednizolona čine osnovu terapije IBD-a. Najčešći odabir je prednizolon koji se može primijeniti oralno, rektalno ili, u hitnim situacijama, parenteralno. Kako su nuspojave sistemskih steroida relativno česte (akne, intolerancija



glukoze, osteoporoza, zastoj rasta, sklonost infekcijama itd.), razvijeni su i nesistemski kortikosteroidi koji ih imaju znatno manje, npr. budesonid. Kortikosteroidi se mogu koristiti sami ili u kombinaciji s prikladnom formulacijom mesalazina kako bi se postigla remisija. Iako su učinkoviti u liječenju aktivne bolesti i relapsa, nemaju nikakvu ulogu u održavanju remisije ni jedne ni druge bolesti.

Nekoliko lijekova koji su prvotno razvijeni kao citostatici u kemoterapiji tumora ili imunosupresivi kod transplantacije organa prihvaćeno je za terapiju IBD-a. Azatioprin i 6-merkaptopurin pripadaju u skupinu tiopurina, lijekova koji utječu na biosintezu purina i inhibiraju staničnu proliferaciju. Azatioprin je prolijek koji prelazi u 6-merkaptopurin, te se dalje u eritrocitima metabolizira u 6-tiogvanin djelovanjem enzima tiopurin metiltransferaze. Budući da 6-tiogvanin ima dugo poluvrijeme u eritrocitima, potrebno je više tjedana da se postigne metabolička ravnoteža, što je vjerojatno uzrok odgođenog djelovanja lijeka. Azatioprin ili 6-merkaptopurin se uvode u terapiju kod bolesnika ovisnih o steroidima, rezistentnih na steroide, te bolesnika s ekstenzivnom bolešću tankog crijeva, dakle služe kao lijekovi koji omogućavaju smanjivanje i ukidanje steroida (*engl. steroid sparing agents*), odnosno održavanje stabilne remisije bolesti (Pithadia i Jain, 2011; Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

Od antibiotika u liječenju IBD-a koriste se metronidazol i ciprofloksacin. Navedeni antibiotici propisuju su za liječenje septičkih komplikacija, simptoma vezanih uz bakterijsko prerastanje u crijevu i perianalnu bolest. Terapija može trajati do ukupno 6 mjeseci, ali pri pojavi nuspojava ove antibiotike treba odmah prestati davati (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

Biološku terapiju čine lijekovi koji utječu na upalni odgovor organizma. Od posebnog interesa su lijekovi koji inhibiraju funkcionalnu aktivnost upalnog citokina TNF- $\alpha$ . Prvi takav lijek, infliximab, dostupan je za liječenje refraktorne Crohnove bolesti. Infliximab je kimerni imunoglobulin (25% mišji, 75% humani) koji veže i neutralizira TNF- $\alpha$ . Iako u upaljenim crijevima nastaju mnogi upalni citokini, razumno je ciljati na TNF- $\alpha$  jer je on jedan od glavnih citokina koji nastaje u Th1 imunom odgovoru karakterističnom za Crohnovu bolest. Primjena humanih monoklonskih protutijela relativno je nov i za pojedine pacijente vrlo uspješan koncept za liječenje IBD-a (Pithadia i Jain, 2011).

#### 1.1.5 Dodaci prehrani koji se primjenjuju uz terapiju IBD-a

*Curcuma Longa* je biljka iz porodice Zingiberaceae, tipična za tropsku vlažnu klimu jugoistočne Azije i tropskih šuma Indije. Njezini podanci se tradicionalno koriste u terapiji

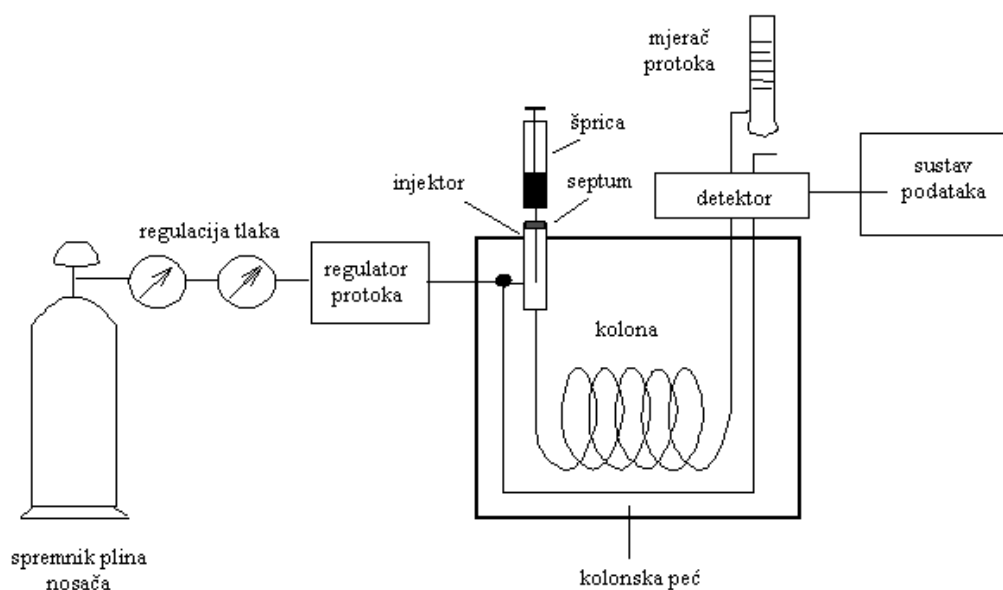
artritisa, ateroskleroze, amenoreje i mnogih drugih stanja. Najvažniji spoj u podancima je polifenolni spoj kurkumin, uz koji se povezuje protuupalno, antioksidativno i antimutageno djelovanje. Kurkumin djeluje inhibitorno na ciklooksigenazu-1 i 2 (COX-1, COX-2), TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , inducibilnu dušikovu oksid sintazu (iNOS) i NF- $\kappa$ B. Povišena razina upalnog citokina TNF- $\alpha$  aktivira NF- $\kappa$ B upalni put što rezultira oštećenjem mukoze u crijevima, zato je inhibicija NF- $\kappa$ B upalnog puta kurkuminom jako važna za smanjenje upale u IBD-u. Nadalje, kurkumin potiče ekspresiju i aktivaciju receptora PPAR $\gamma$  koji kontroliraju aktivaciju COX-2 i intracelularnih adhezijskih molekula-1 (ICAM-1), stoga je PPAR $\gamma$  važan medijator povoljnih učinaka kurkumina. Dakle, kurkumin je prirodni protuupalni agens koji predstavlja privlačnu, sigurnu i povoljnu alternativu terapiji IBD-a (Mazieiro i sur., 2018).

*Boswellia serrata* je biljka iz porodice Burseraceae čija se aromatska smola, odnosno tamjan, tradicionalno koristi u ayurvedskoj medicini za liječenje upalnih bolesti, uključujući ulcerozni kolitis. Od različitih kemijskih spojeva u smoli, najprisutniji su triterpeni, s tamjanskim kiselinama kao najvažnijim sastavnicama kojima se pripisuje protuupalno djelovanje. Smatra se da 11-keto- $\beta$ -tamjanska kiselina i acetil-11-keto- $\beta$ -tamjanska kiselina inhibicijom 5-lipooksigenaze suzbijaju stvaranje leukotriena, što je svakako pozitivan učinak ovih spojeva jer su leukotrieni u velikoj mjeri uključeni u patogenezu IBD-a. Nadalje, protuupalno djelovanje tamjanskih kiselina uključuje i inhibiciju transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B koji inducira ekspresiju mnogih proupalnih citokina ključnih za razvoj i održavanje intestinalne upale. Novija klinička istraživanja ukazuju na to da bi smola tamjanovca uistinu mogla biti učinkovita u liječenju IBD-a (Algieri i sur., 2015; Triantafyllidi i sur., 2015).

*Andrographis paniculata* je biljka iz porodice Acanthaceae koju nalazimo u Indiji, Šri Lanki i jugoistočnoj Aziji, gdje se njezini ekstrakti koriste za ublažavanje upala. HMPL-004 je zaštićeni naziv ekstrakta ove biljke čije se potencijalno intestinalno protuupalno djelovanje već neko vrijeme procjenjuje u istraživanjima na ljudima. Najvažnije sastavnice ekstrakta su diterpenski laktoni, prvenstveno andrografolid i njegovi derivati, koji pokazuju protuupalno djelovanje inhibicijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B. Nadalje, andrografolid smanjuje ekspresiju inducibilne dušikove oksid sintaze (iNOS), što za posljedicu ima redukciju stvaranja dušikovog oksida. Također djeluje i na stanice urođene imunosti, uključujući makrofage, dendritičke i T-stanice, smanjujući tako stvaranje proupalnih citokina. Provedena su već brojna istraživanja koja mogu potvrditi inhibitorno djelovanje ekstrakta andrografisa na različite imunosne stanice uključene u razvoj upale kod IBD-a (Algieri i sur., 2015).

## 1.2 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je metoda odjeljivanja u kojoj plinovita pokretna faza eluira sastavnice uzorka koje prolaze zagrijanom kolonom s nepokretnom fazom. Uzorak se tijekom unošenja u kolonu nalazi u plinovitom agregatnom stanju, a odjeljivanje sastojaka ovisi prvenstveno o njihovoj prirodi te definiranim kromatografskim uvjetima. U plinskoj kromatografiji nepokretna faza je tekućina, a na čvrsti nosač se veže adsorpcijom ili kemijski. Mehanizam odjeljivanja temelji se na adsorpciji i razdiobi. Plin nositelj je kemijski inertan, kako ne bi došlo do reakcije s analitima, a upotrebljavaju se helij, dušik i vodik. Odijeljene se sastavnice uzorka dokazuju različitim vrstama detektora u koje se ubraja i plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID) (Nigović i sur., 2014). Cijelokupni sustav za plinsku kromatografiju uključuje dovod plinova te uređaje za regulaciju tlaka i protoka, sustav za unos uzorka (injektor), kromatografsku kolonu, pećnicu za termostatiranje kolone, detektor te računalni sustav za obradu podataka (Slika 1).



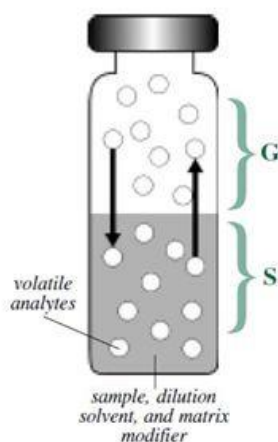
Slika 1. Shema plinskog kromatografa (Luterotti, 2014)

### 1.2.1 Sustav za unos uzorka

Kod sustava za klasično unošenje uzorka, takozvano direktno injektiranje, u zagrijani plinski kromatograf unosi se mala količina tekućeg uzorka (0,5-2  $\mu\text{L}$ ) što osigurava da uzorak trenutačno ispari. Injektiranje u punjene kolone je jednostavnije nego injektiranje u kapilarne kolone jer se u punjene kolone unosi cijeli uzorak. Iako ne daju visoko razlučivanje, ovo je prednost punjenih kolona. Kod kapilarnih kolona koristimo tzv. split/splitless injektiranje.

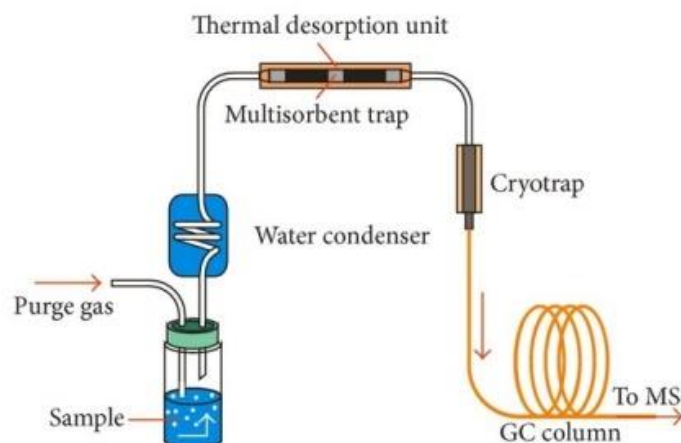
Split injektiranje znači da se uzorak ne unosi u potpunosti u kolonu nego se podijeli na dva nejednaka dijela i pritom se veći dio izbaci iz sustava kroz izlazni ventil što sprječava ekspanziju otapala u kojem je uzorak otopljen. Najčešće korišteni omjeri su od 10:1 do 100:1, pri čemu se manji dio uzorka unosi u kolonu. Ova tehnika koristi se za koncentrirane uzorke kako bi se smanjilo širenje pikova i postiglo bolje razlučivanje. Splitless injektiranje znači da cijeli uzorak ulazi u kolonu, a izlazni ventil pritom ostaje zatvoren. Kod ovakvog injektiranja dolazi do širenja pikova zbog preopterećenja kolone s previše uzorka (Nigović, 2018; Watson, 2012).

Uzorkovanje para iznad tekućih ili krutih uzoraka (engl. *Headspace Sampling*, HSS) metoda je pripreme uzorka za određivanje hlapljivih analita u krutim ili tekućim uzorcima. Koristi se u analizi ostatnih otapala i hlapljivih onečišćenja zbog mogućnosti određivanja niskih koncentracija analita u uzorcima složenog matriksa. Kod plinske kromatografije sa statičkim *headspace* uzorkovanjem (engl. *static Headspace Sampling*, sHSS) uzorak se zagrijava na određenoj temperaturi dovoljno dugo dok se ne uspostavi ravnoteža između plinovite i krute/tekuće faze (Slika 2). Potom slijedi povlačenje zadanog volumena plinovite faze iznad uzorka koji se pomoću plina nositelja uvodi u kolonu plinskog kromatografa.



Slika 2. Shematski prikaz statičkog headspace uzorkovanja (<https://chem.libretexts.org/>)

Plinska kromatografija s dinamičkim *headspace* injektiranjem koristi “*purge trap*” metodu. Plin propuhuje uzorak otopljen u odgovarajućem otapalu koje je nehlapljivo i ne interferira s mjerenjem, prilikom čega hlapljivi analiti sa strujom plina dolaze do polimernog adsorbensa. Zatim se ukoncentrirani analiti grijanjem desorbiraju te strujom plina prenose u plinski kromatograf (Nigović, 2018).



Slika 3. Shematski prikaz dinamičkog *headspace* uzorkovanja (<https://www.researchgate.net/>)

### 1.2.2 GC pećnica

U plinskoj kromatografiji glavni čimbenik koji utječe na uspješnost odjeljivanja sastavnica uzorka je temperatura. Iz tog razloga kolona je smještena u termostatiranom prostoru u kojem se temperatura može precizno održavati i mijenjati u ovisnosti o vremenu. Optimalna temperatura ovisi o vrelištima sastavnica ispitivanog uzorka. U kromatografskom postupku može se primijeniti izotermalno ili gradijentno termostatiranje kolone. U prvom slučaju održava se konstantna temperatura kolone, dok se kod gradijentnog termostatiranja temperatura tijekom analize povisuje kontinuirano ili skokovito. Prednost programiranog povišenja temperature je to što se analiti širokog raspona vrelišta mogu razdvojiti u prikladnom vremenu, a injektiranje uzorka može biti na nižoj temperaturi kako ne bi došlo do razgradnje lako hlapljivih tvari (Nigović i sur., 2014; Watson, 2012).

### 1.2.3 Kromatografske kolone

U plinskoj kromatografiji nepokretna faza je tekućina, a na čvrsti nosač se veže adsorpcijom ili kemijski. U farmaceutskoj kontroli kakvoće u novije se vrijeme najčešće upotrebljavaju kapilarne kolone, iako se u farmakopejskim monografijama nudi kao mogućnost i primjena punjenih kolona u rutinskim analizama (Nigović i sur., 2014).

Punjene kolone su staklene, metalne ili teflonske cijevi dužine od 1 do 3 m te promjera od 2 do 5 mm, punjene čvrstim nosačem velike specifične površine (kalcijevim silikatom) koji je impregniran tankim slojem tekuće stacionarne faze. Čvrsti nosač se silanizira zbog smanjenja adsorpcije polarnih sastojaka. Takve kolone su manjeg razlučivanja i podnose temperature do 280 °C jer na višim temperaturama dolazi do isparavanja tekuće stacionarne faze.

Kapilarne kolone su izrađene od izvučenog kvarca te su najčešće duljine od 12 do 50 m i promjera od 0,2 do 0,5 mm. Unutrašnja stijenka prevučena je tankim slojem nepokretne faze koja se kemijski veže na silanolne skupine stijenke kolone. Veće su djelotvornosti od punjenih kolona i podnose više temperature. Kapilarne kolone mogu biti nepolarne (ugljkovodične, alkil siloksani), umjereno polarne i polarne (poliesterske) (Nigović, 2018).

#### 1.2.4 Detektori

U plinskoj kromatografiji koriste se nekoliko vrsta detektora.

Plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID) detektira analite na principu sagorijevanja organskih spojeva u plamenu, pri čemu nastaju ionski međuprodukti i elektroni koje elektroda u detektoru bilježi kao pojačanje struje. Detektira ugljikove i vodikove spojeve, ali je neosjetljiv na ugljikove atome vezane na kisik, dušik ili klor. Najveća prednost ovog detektora je iznimna osjetljivost. U kombinaciji s kapilarnom plinskom kromatografijom može detektirati količinu tvari od 100 pg do 10 ng. Potrebno je istaknuti kako ima i širok raspon linearnog odgovora.

Detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD) radi na principu ionizacije plina nositelja radioaktivnim izvorom, pri čemu se u prisutnosti organskih molekula struja smanjuje jer analiti preuzmu elektrone. Detektira visoko halogenirane spojeve u količini od 50 fg do 1 pg, ali nema širok raspon linearnog odgovora kao FID-a.

Detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD) radi na principu mjerenja promjene toplinske vodljivosti struje plina nositelja zbog prisutnosti analita. Univerzalni je detektor koji se može koristiti za određivanje vodene pare, a također je i nedestruktivan tako da se analiti mogu skupiti nakon detekcije. Relativno je neosjetljiv na organske spojeve u usporedbi s FID-om (Nigović, 2018; Watson 2012).

Maseni detektor (engl. *Mass Spectrometer*, MS) radi na principu ionizacije molekula analita, a nastali se ioni razdvajaju prema svojoj masi primjenom električnog ili magnetskog polja. Dakle, maseni detektor omogućuje određivanje molekulske mase ionizirane molekule ili bilo kojeg fragmenta molekule nastalog njezinim cijepanjem (Nigović, 2018).

#### 1.2.5 Prednosti i ograničenja plinske kromatografije

Plinska kromatografija točna je i precizna instrumentalna analitička tehnika namjenjena analitici lakohlapljivih spojeva. Pouzdanost mjerenja dobivenih plinskom kromatografijom povećava se uz korištenje unutarnjeg standarda.

Glavna ograničenja tehnike su to što se mogu analizirati samo termostabilne i hlapljive tvari i to što neki uzorci zahtijevaju derivatizaciju kako bi postali hlapljivi, a to unosi dodatni

korak u analizu, moguće interferencije te smanjenu pouzdanost mjerenja. Također, moraju se injektirati vrlo mali volumeni uzorka što otežava njegovu pouzdanu kvantitativnu analizu (Nigović, 2018).

#### 1.2.6 Primjena plinske kromatografije u analitici lijekova

U analitici i kontroli lijekova plinska kromatografija upotrebljava se za ispitivanje hlapljivih onečišćenja i zaostalih organskih otapala u ljekovitim tvarima, za određivanje sadržaja hlapljivih ljekovitih i pomoćnih tvari, te rijetko za potvrdu identiteta. U identifikaciji se plinska kromatografija najčešće primjenjuje u karakterizaciji hlapljivih ulja koja se koriste kao pomoćne tvari u ljekovitim oblicima, kao i masnih kiselina i sterola u njima. Ispitivanje čistoće plinskom kromatografijom u farmaceutskoj kontroli obuhvaća utvrđivanje prisutnosti određenog hlapljivog onečišćenja ili je namijenjeno kontroliranju srodnih onečišćenja. Sve ljekovite i pomoćne tvari podliježu kontroli ostatnih otapala, a dozvoljena koncentracija otapala ovisi o toksičnosti otapala, dozama i načinu primjene lijeka. Ostatna otapala se ispituju plinskom kromatografijom s gore opisanim statičkim *headspace* injektiranjem (sHSS-GC). Kvantitativna analiza često se temelji na metodi s unutrašnjim standardom. Unutrašnji standard je tvar koja se u poznatoj količini dodaje ispitivanoj i poredbenoj otopini. Koncentracija ispitivanog analita određuje se usporedbom omjera površine pika analita i unutrašnjeg standarda u uzorku i poredbenoj otopini (Nigović i sur., 2014).

## 2. Obrazloženje teme

Dodaci prehrani su izvor hranjivih ili drugih sastojaka s prehrambenim ili fiziološkim funkcijama, sami ili u kombinacijama, plasirani na tržište u doziranom obliku s ciljem da potpomognu unos hranjivih sastojaka u uobičajenoj prehrani, a sve u svrhu povoljnog učinka na zdravlje pacijenata. Na taj se način povećava opća otpornost organizma na stresne vanjske utjecaje te pomaže u održavanju pravilnih fizioloških funkcija organizma i njegovih dijelova. Dodaci prehrani mogu se stavljati u promet u različitim dozirnim oblicima (tablete, kapsule, prašci, tekućine, bar pločice, čajevi, kapi, sirupi), a na deklaraciji moraju nositi oznaku “dodatak prehrani” (Pollak, 2008). Zbog svjesnosti o rizicima povezanim s određenim hormonskim supstancama i stimulansima, ljudi se često odlučuju za dodatke prehrani, navodno oslobođene takvih sastojaka. No unatoč takvom vjerovanju, mnogi dodaci prehrani prijavljeni su upravo zbog zdravstvenih rizika uzrokovanih kontaminacijom s tvarima koje uzrokuju kratkoročne i dugoročne nuspojave (Petroczi i sur., 2011).

Od 1990-ih postoji jak uzlazni trend u korištenju dodataka prehrani koji je rezultirao u široko rasprostranjenom interesu, kako zdravstvenih radnika, tako i pacijenata, za ove proizvode, kao i za njihovu učinkovitost i sigurnost. Dodaci prehrani su javnosti dostupni u ljekarnama, drogerijama, trgovinama zdrave hrane i preko interneta, a veliku većinu proizvoda na dnevnoj bazi uzimaju i starije osobe, trudnice, dojilje i mala djeca. Međutim, u usporedbi s lijekovima, dodaci prehrani nisu podvrgnuti istim znanstvenim ispitivanjima i nisu jednako striktno regulirani i kontrolirani. Stoga se brojni dodaci prehrani kontaminirani s teškim metalima, pesticidima, kao i s dodanim farmakološki aktivnim tvarima, prodaju pacijentima koji ne sumnjaju u njihovu kvalitetu i sigurnost. Biljni dodaci prehrani također često mogu sadržavati značajnu količinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo u tekućim oblicima te ostatno otapalo u krutim oblicima. S obzirom na to da je etanol metabolički aktivan, trebalo bi birati formulacije bez ili s najnižom mogućom razinom etanola kako bi se izbjegla sistemska apsorpcija, posebno kada su ciljane populacija trudnice i dojilje, mala djeca ili visokorizične skupine pacijenata poput onih s bolestima jetre ili epilepsijom. Unatoč pokušajima proizvođača da zamijene ili barem smanje udio etanola u dodacima prehrani, mnogi ga još uvijek sadrže u koncentracijama čak do 70 %. Mornar i sur. (2016) uspješno su primijenili sHSS-GC-FID metodu za analizu 93 uzorka dodataka prehrani s različitim udjelima etanola. Treba istaknuti da su dramatična odstupanja od izjava proizvođača pronađena čak u jednoj trećini proizvoda, a značajne količine etanola pronađene su i u nekoliko proizvoda napravljenih posebno za djecu, kao i u jednome koji je bio označen kao bezalkoholan.



Dodaci prehrani koji se pojavljuju na tržištu mogu se svrstati u jednu od pet kategorija: (I) proizvodi s točno navedenim i biološki aktivnim tvarima i njihovim količinama; (II) proizvodi s navedenim biološki aktivnim tvarima, ali u netočnim količinama; (III) proizvodi s navedenim biološki aktivnim tvarima, ali se one ne nalaze u proizvodu; (IV) proizvodi s prisutnim biološki aktivnim tvarima, ali nisu navedene na proizvodu i (V) proizvodi sa sastojcima koji nisu ni navedeni niti dopušteni. Iako regulativa jasno zabranjuje pogrešno navođenje medicinskih tvrdnji i zahtjeva točno označavanje proizvoda, provjere su rjeđe i manje rigorozne nego za prehrambene proizvode, a posljedice mogu biti i puno ozbiljnije jer su u dodacima prehrani biološke tvari ukoncentrirane (Petroczi i sur., 2011).

Posebna uputstva objavljena u farmakopejama i ICH smjernicama (*International Conference on Harmonization*) određuju najveće dopuštene količine ostatnih otapala u farmaceutskim proizvodima. Međutim, unatoč značajnim pokušajima da se poboljša sigurnost i kvaliteta, procjena sigurnosti etanola i drugih organskih otapala u dodacima prehrani još uvijek nije usklađena među regulatornim tijelima različitih država.

Do danas, različite metode poput termogravimetrijske analize i diferencijalne pretražne kalorimetrije razvijene su za određivanje ostatnih otapala u farmaceutskim proizvodima. Međutim, s obzirom na hlapljivost organskih otapala i značajnu separacijsku sposobnost kapilarnih kolona, plinska kromatografija je vodeća tehnika za njihovo određivanje. Iz uzoraka koji sadrže i nehlapljive supstance koje bi mogle kontaminirati injektor i kolonu, potrebno je prvo odvojiti hlapljiva organska otapala u plinovitu fazu, stoga plinsku kromatografiju povezujemo s HSS metodom pripreme uzorka (Mornar i sur., 2016).

Cilj ovoga rada je validirati sHSS-GC-FID metodu za određivanje ostatnih otapala u krutim biljnim dodacima prehrani koji se koriste uz terapiju upalnih bolesti crijeva.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1 Materijali

##### Kemikalije

Aceton (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)

Diklormetan (T.T.T., Sveta Nedjelja, Republika Hrvatska)

Dimetilformamid (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)

Etanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Etil acetat (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)

Izopropanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Kloroform (CARLO ERBA reagents, Val de Reuil, Francuska)

Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

n-butanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

##### Pribor

Automatske pipete 0,5 - 1000  $\mu$ L (Ranin instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

GC vijale za uzorkovanje *headspace* tehnikom s aluminijskim čepom, 20 ml (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Kolona za plinsku kromatografiju DB-264, dimenzije 30 m x 0,53 mm, debljine filma 3  $\mu$ m (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Otvarač GC vijala s aluminijskim čepom (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Zatvarač GC vijala s aluminijskim čepom (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)

##### Radni instrumenti

Generator dušika, model NG250A (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Generator vodika, model CFH200 (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Kompresor zraka, model ZAO35A (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Plinski kromatograf, model 6850 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Uređaj za *headspace* uzorkovanje, model G1888 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)

##### Programski paketi

GC Chemstation, Rev. A. 10 02 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema standardnih otopina, radnih otopina i uzoraka

Matične otopine etanola, acetona, izopropanola i etil acetata koncentracije 1 % (V/V) pripremljene su dodavanjem 1 mL analita u odmjernu tikvicu od 100 mL. Matična otopina metanola koncentracije 0,6 % (V/V) pripremljena je dodavanjem 600 µL metanola u odmjernu tikvicu od 100 mL. Nadalje, otopina diklormetana koncentracije 0,12 % (V/V) pripremljena je dodavanjem 120 µL diklormetana, a otopina kloroforma koncentracije 0,012 % (V/V) dodavanjem 12 µL kloroforma u odmjerne tikvice od 100 mL. Sve odmjerne tikvice nadopunjene su dimetilformamidom do oznake. Konačno, dodavanjem 100 µL n-butanola u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjavanjem do oznake dimetilformamidom pripravljena je matična otopina n-butanola koncentracije 0,1 % (V/V), korištena kao unutarnji standard (engl. *Internal Standard*, IS).

Radne otopine su, neposredno prije analize, pripremljene pipetiranjem matičnih otopina te unutarnjeg standarda u GC vijale, i konačno nadopunjavanjem dimetilformamidom u prikladnim omjerima. GC vijale su na kraju zatvorene aluminijskim čepovima pomoću zatvarača vijala.

Uzorci biljnih dodataka prehrani su pripremljeni preciznim vaganjem 250 mg krute tvari te su premješteni u GC vijale od 20 mL. U svaku vijalu dodano je 2 mL 0,1% otopine unutarnjeg standarda otopljenog u dimetilformamidu. Vijale su začepljene aluminijskim čepovima te analizirane. Svi uzorci pripremljeni su i analizirani u triplikatu.

### 3.2.2 sHSS-GC-FID analiza

Pripremljeni uzorci preneseni su u HSS te su zagrijavani 20 minuta na 90 °C uz primjenu trešnje. Potom su tijekom 1 minute preneseni u plinski kromatograf pri temperaturi od 120 °C. Razdvajanje analita provedeno je koristeći kolonu DB-624, dimenzija 30 m x 0,53 mm, uz debljinu filma od 5 µm. Kao plin nosač za kromatografiju korišten je dušik čija brzina protoka iznosila je 5 mL/min. Temperatura injektora postavljena je na 250 °C, a za detekciju analita korišten je plamenoionizacijski detektor pri temperaturi od 300 °C. S ciljem postizanja što boljeg razlučivanja, razdvajanje analita provedeno je upotrebom temperaturnog programa navedenog u Tablici 1. Dobiveni kromatogrami obrađeni su računalnim programom ChemStation, a validacijski parametri određeni primjenom računalnog programa Microsoft Excel.

Tablica 1. Temperaturni program

Vrijeme (min)	Temperatura pećnice (°C)
0	40
4	40
5	60
6	60
14	180

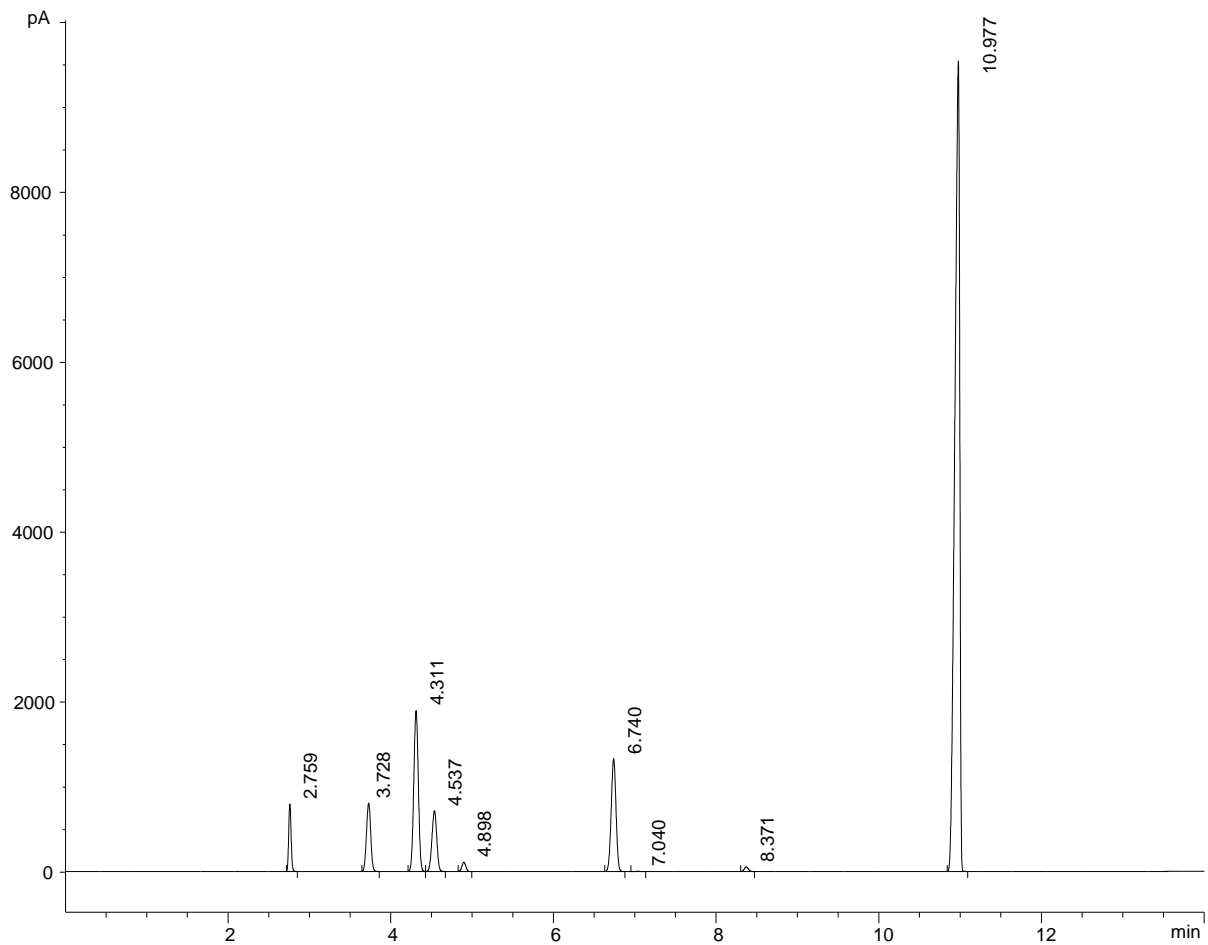
#### 4. Rezultati i rasprava

##### 4.1 Validacija analitičke metode

Validacijom analitičke metode utvrđuje se i dokumentira prikladnost ispitivane metode za određenu primjenu. Ona zahtijeva dovoljno laboratorijskih podataka kojima se dokumentira pouzdanost metode te jamči da će se u propisanim uvjetima njezine primjene dobiti valjani rezultati. Prema regulatornim zahtjevima Dobre proizvođačke prakse (engl. *Good Manufacturing Praxis*, GMP) i Dobre laboratorijske prakse (engl. *Good Laboratory Praxis*, GLP), postupci validacije analitičkih metoda postali su obveza. Validacija gore opisane analitičke metode provedena je prema smjernicama koji je donijela Međunarodna konferencija o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutika primijenjenih na ljudima (engl. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) u dokumentu *ICH Harmonized Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)* (2005). Ispitani su sljedeći validacijski parametri: selektivnost, linearnost, granica dokazivanja i određivanja, preciznost, točnost i izdržljivost.

##### 4.1.1 Selektivnost

Selektivnost je mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih sastavnica uzorka, poput onečišćenja, razgradnih produkata, pomoćnih tvari ili općenito matrice uzorka. Selektivnost metode ispitana je analizom standardnih otopina analita i unutarnjeg standarda te dimetilformamida kao otapala. Standardne otopine pripremljene su kako je opisano u poglavlju 3.2.1 te je kromatogram prikazan na slici 4. Iz kromatograma, kao i iz vremena zadržavanja koja su prikazana u tablici 2, može se vidjeti kako otapalo, premda uzorkovano HSS tehnikom te preneseno u plinski kromatograf, ne koeluirao s analitima niti unutarnjim standardom. Također se vidi da su svi pikovi analita razdvojeni, a detaljnom vizualnom procjenom dobivenog kromatograma utvrđeno je da nema interferencija s analitima, što sve upućuje na zadovoljavajuću selektivnost metode.



Slika 4. Kromatogram standardnih otopina analita, unutarnjeg standarda i otapala

Tablica 2. Vremena zadržavanja analita, unutarnjeg standarda i otapala

<b>Analit</b>	<b>Vrijeme zadržavanja (min)</b>
Metanol	2,76
Etanol	3,73
Aceton	4,31
Izopropanol	4,54
Diklormetan	4,90
Etil acetat	6,74
Kloroform	7,04
n-butanol	8,37
Dimetilformamid	10,98

#### 4.1.2 Linearnost

Linearnost analitičke metode predstavlja njezinu sposobnost da unutar određenog koncentracijskog raspona daje odazive koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost metode utvrđuje se mjerenjem na pet koncentracijskih razina pri čemu se svaka razina ispituje u triplicatu. Ispitivanje linearnosti provedeno je posebno u području nižih i posebno u području viših koncentracija, pomoću dva regresijska pravca, kako ne bi došlo do odskakanja u analitičkom prinosu zbog prevelikog raspona koncentracija. U području nižih koncentracija provedeno je na sljedećim koncentracijskim razinama: 50, 75, 100, 500, 1000 ppm (V/V) za etanol, aceton, izopropanol i etil acetat; 30, 45, 60, 300, 600 ppm (V/V) za metanol; 6, 9, 12, 60, 120 ppm (V/V) za diklormetan i 1,2, 6, 12 ppm (V/V) za kloroform. U području viših koncentracija provedeno je na: 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 ppm (V/V) za etanol, aceton, izopropanol i etil acetat; 1200, 1800, 2400, 3000, 3600 ppm (V/V) za metanol; 240, 360, 480, 600, 720 ppm (V/V) za diklormetan i 24, 36, 48, 60, 72 ppm (V/V) za kloroform. Zadnje tri koncentracijske razine u kalibracijskim pravcima za više koncentracije predstavljaju 80 %, 100 % te 120 % od koncentracijskog limita definiranog u ICH smjernicama. Otopine su pripravljene kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. Grafički prikazi ovisnosti omjera analitičkih signala analita i unutarnjeg standarda o koncentracijama analita predstavljaju kalibracijske krivulje u obliku linearnih regresijskih pravaca, čije su jednadžbe prikazane u tablicama 3 i 4. Da bi odgovarajuća linearnost bila postignuta, koeficijenti korelacije pravaca, koji su također prikazani u tablicama, moraju biti veći ili jednaki 0,999.

Tablica 3. Parametri linearnosti u području nižih koncentracija

<b>Analit</b>	<b>Linearno područje (ppm)</b>	<b>Jednadžba pravca</b>	<b>Koeficijent korelacije, <i>k</i></b>
Metanol	30-600	$y = 0,0023x - 0,0027$	0,9999
Etanol	50-1000	$y = 0,0026x - 0,0129$	1,0000
Aceton	50-1000	$y = 0,0056x + 0,1048$	0,9998
Izopropanol	50-1000	$y = 0,0027x - 0,0343$	0,9997
Diklormetan	6-120	$y = 0,0024x + 0,0048$	0,9998
Etil acetat	50-1000	$y = 0,0045x + 0,0341$	1,0000
Kloroform	1,2-12	$y = 0,0007x - 0,0001$	1,0000

Tablica 4. Parametri linearnosti u području viših koncentracija

<b>Analit</b>	<b>Linearno područje (ppm)</b>	<b>Jednadžba pravca</b>	<b>Koeficijent korelacije, <i>k</i></b>
Metanol	600-3600	$y = 0,0024x - 0,1134$	0,9995
Etanol	1000-6000	$y = 0,0025x - 0,0523$	0,9995
Aceton	1000-6000	$y = 0,0064x - 1,0095$	0,9995
Izopropanol	1000-6000	$y = 0,0025x + 0,0441$	0,9996
Diklormetan	120-720	$y = 0,0027x - 0,0351$	0,9998
Etil acetat	1000-6000	$y = 0,0047x - 0,3602$	0,9996
Kloroform	12-72	$y = 0,0006x + 0,0003$	0,9998

Koeficijent korelacije veći je od 0,999 za sve analite na svim koncentracijskim razinama, iz čega zaključujemo da je postignuta zadovoljavajuća linearnost.

#### 4.1.3 Osjetljivost

Granica detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može sa sigurnošću detektirati, ali ne i kvantificirati pri zadanim uvjetima metode. Granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. Prema ICH smjernicama LOD i LOQ vrijednosti mogu se odrediti na nekoliko načina. Jedan od njih je razrjeđivanjem ispitivane otopine, a one predstavljaju omjer signala analita i šuma (LOD = 3:1 ili 2:1; LOQ = 10:1). Također se mogu odrediti i iz standardne devijacije signala i nagiba kalibracijskog pravca. U svrhu validacije ove metode korišten je pristup omjera signala i šuma. Standardne otopine razrijeđene su do vrijednosti omjera signala i šuma 3:1 za LOD i 10:1 za LOQ, kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Vrijednosti granice dokazivanja i određivanja za ispitivane analite prikazane su u tablici 5. Visoke vrijednosti LOQ i LOD kloroforma u usporedbi s onima dobivenim za druge analite su rezultat slabog odziva analita na detektoru u odnosu na druge analite. Ipak, metoda se pokazala zadovoljavajuće osjetljivom za određivanje niskih razina ispitanih otapala.

Tablica 5. Granice dokazivanja i određivanja

<b>Analit</b>	<b>LOD (ppm)</b>	<b>LOQ (ppm)</b>
Metanol	0,20	0,62
Etanol	0,07	0,23
Aceton	0,04	0,13
Izopropanol	0,05	0,14
Diklormetan	0,10	0,30
Etil acetat	0,06	0,18
Kloroform	0,32	1,20

#### 4.1.4 Preciznost

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Moguće ju je iskazati kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost izražava podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu; srednja preciznost iskazuje odstupanje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti dani, analitičari ili instrumenti); dok obnovljivost označava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima. Svrha ovog ispitivanja je provjera metode u smislu da li će davati iste rezultate tijekom upotrebe u laboratoriju. U validaciji gore opisane metode, preciznost je iskazana kao ponovljivost i srednja preciznost. Ispitana je na standardnim otopinama analita u koncentraciji od 1000 ppm, te izražena kao RSD omjera analitičkog signala analita i unutarnjeg standarda. Otopine su pripremljene kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Ponovljivost je ispitana kroz 6 mjerenja unutar istoga dana, dok je srednja preciznost ispitana kroz 6 mjerenja unutar istoga dana i dodatna 3 mjerenja sljedećeg dana, te su rezultati prikazani u tablici 6. Da bi validirana metoda bila precizna, RSD mora iznositi manje ili jednako 5 % za sve analite.



Tablica 6. Parametri preciznosti

<b>Analit</b>	<b>Ponovljivost (n = 6) RSD (%)</b>	<b>Srednja preciznost (n = 9) RSD (%)</b>
Metanol	0,62	0,56
Etanol	0,70	0,60
Aceton	0,78	0,70
Izopropanol	1,21	1,00
Diklormetan	0,69	0,59
Etil acetat	0,84	0,70
Kloroform	3,30	3,39

Vrijednosti ponovljivosti i srednje preciznosti izražene kao RSD manje su od 5 % za sve analite. Štoviše, dobivene vrijednosti bile su manje od 1,21 % osim za kloroform kod kojeg su dobivene vrijednosti bile 3,30 % odnosno 3,93 %. Nešto veće RSD vrijednosti za kloroform se mogu objasniti niskim koncentracijskim razinama uključenim u validaciju metode. Iz dobivenih podataka moguće je zaključiti kako je razvijena metoda zadovoljavajuće precizna.

#### 4.1.5 Točnost

Točnost (engl. *accuracy*) analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ispituje se analizom uzoraka poznate koncentracije i usporedbom izmjerenih i stvarnih vrijednosti. Za utvrđivanje točnosti provode se najmanje tri mjerenja uzorka na tri koncentracijske razine u radnome području metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti najčešće se iskazuje kao analitički prinos (engl. *recovery*), tj. kao omjer srednje izmjerene vrijednosti i stvarne vrijednosti analita u uzorku, izražen u postotku. Točnost metode ispitana je primjenom standardnih otopina analita na tri različite koncentracijske razine u području nižih i u području viših koncentracija. U području nižih koncentracija, ispitana je na niskoj, srednjoj i visokoj koncentracijskoj razini, s tim da su na svakoj koncentracijskoj razini provedena po tri mjerenja. U području viših koncentracija, ispitana je također na niskoj, srednjoj i visokoj koncentraciji. Otopine su pripravljene kako je opisano u poglavlju 3.2.1, a rezultati su iskazani kao analitički prinos uz pripadajuće RSD vrijednosti u tablicama 7 i 8. Da bi validirana metoda bila točna, analitički prinos mora iznositi između 95 i 105 % za sve analite.

Tablica 7. Parametri točnosti u području nižih koncentracija

Analit	Niska konc. razina		Srednja konc. razina		Visoka konc. razina	
	Analitički prinos (%)	RSD (%)	Analitički prinos (%)	RSD (%)	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Metanol	103,54	0,91	99,88	0,43	99,54	1,15
Etanol	100,61	1,38	98,25	3,21	97,96	2,87
Aceton	103,65	1,09	105,17	3,85	102,17	2,22
Izopropanol	105,63	0,47	95,35	1,38	96,48	2,72
Diklormetan	96,37	0,75	103,28	1,30	103,09	2,08
Etil acetat	98,91	0,83	102,85	3,20	100,14	1,18

Tablica 8. Parametri točnosti u području viših koncentracija

Analit	Niska konc. razina		Srednja konc. razina		Visoka konc. razina	
	Analitički prinos (%)	RSD (%)	Analitički prinos (%)	RSD (%)	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Metanol	102,11	1,52	102,04	1,16	103,21	0,64
Etanol	100,76	3,24	99,88	0,84	102,15	1,47
Aceton	98,68	2,18	100,70	1,13	101,18	0,39
Izopropanol	100,95	3,63	99,76	1,01	101,08	2,33
Diklormetan	100,60	2,28	101,41	0,90	102,02	0,40
Etil acetat	101,28	1,46	102,81	0,86	102,27	0,68
Kloroform	102,39	6,25	101,39	2,99	102,25	1,90

Analitički prinos je na svih šest koncentracijskih razina unutar intervala od 95 do 105 % za sve analite, iz čega zaključujemo da je validirana metoda točna u širokom koncentracijskom rasponu.

#### 4.1.6 Izdržljivost

Izdržljivost analitičke metode (engl. *robustness*) mjera je njezine sposobnosti da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih, promjena parametara metode. Indikator je pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine primjene u laboratoriju uz promjene uvjeta u kojima se realno provode analize. Prosuđuje se variranjem jednog parametra, dok ostali ostaju nepromijenjeni, a njegov izbor ovisi o samoj metodi. U ovom istraživanju provedena je promjena četiri parametra koja se odnose na pripremu i analizu uzoraka: temperatura *headspace* pećnice, trajanja *headspace* zagrijavanja, brzine protoka plina nositelja i gradijenta temperature GC pećnice. Definirani uvjeti su: temperatura *headspace* pećnice od 90 °C, trajanje *headspace* zagrijavanja od 20 min, brzina protoka plina nositelja od 5,0 mL/min i gradijent temperature GC pećnice od 40/60/180 °C. Promjena parametara ispitana je na standardnim otopinama analita pripremljenim kako je opisano u

poglavlju 3.2.1. Promjena u omjerima analitičkih signala analita i unutarnjeg standarda prikazana je u tablici 9, a promjena u vremenima zadržavanja analita u tablici 10. Promjene su prikazane kao RSD naspram omjera analitičkih signala i vremena zadržavanja analita u optimalnim uvjetima. Da bi metoda bila izdržljiva, RSD vrijednosti moraju biti manje ili jednake 3 %.

Tablica 9. Parametri izdržljivosti omjera analitičkih signala analita i unutarnjeg standarda

	<i>Headspace</i> temperatura		<i>Headspace</i> trajanje		Protok plina		Temperatura GC pećnice	
	89°C RSD (%)	91°C RSD (%)	19 min. RSD (%)	21 min. RSD (%)	4,9 mL/min RSD (%)	5,1 mL/min RSD (%)	39/59/179° C RSD (%)	41/61/181° C RSD (%)
Metanol	2,37	3,46	1,65	0,68	0,07	0,79	0,26	1,48
Etanol	2,16	2,50	3,36	5,40	0,19	0,49	0,42	1,47
Aceton	0,07	5,06	2,84	1,24	1,07	2,62	0,49	0,72
Izopropanol	1,88	2,42	3,40	0,04	0,42	1,24	0,05	0,72
Diklormetan	0,77	4,24	1,74	0,77	0,83	2,09	0,36	0,09
Etil acetat	0,53	3,97	1,89	1,14	1,12	2,57	0,47	0,73
Kloroform	4,29	2,26	5,14	3,16	2,42	0,11	5,50	6,98

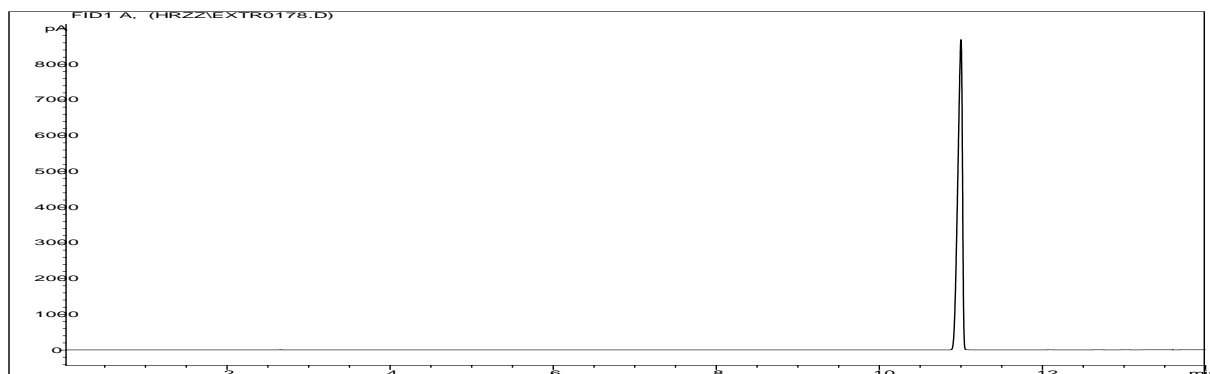
Tablica 10. Parametri izdržljivosti vremena zadržavanja analita

	<i>Headspace</i> temperatura		<i>Headspace</i> trajanje		Protok plina		Temperatura GC pećnice	
	89°C RSD (%)	91°C RSD (%)	19 min. RSD (%)	21 min. RSD (%)	4,9 mL/min RSD (%)	5,1 mL/min RSD (%)	39/59/179°C RSD (%)	41/61/181° C RSD (%)
Metanol	0,00	0,00	0,00	0,00	1,03	1,02	1,02	1,03
Etanol	0,00	0,00	0,00	0,00	1,92	1,31	1,31	1,92
Aceton	0,00	0,00	0,00	0,00	1,49	1,30	1,30	1,49
Izopropanol	0,00	0,00	0,00	0,00	1,58	1,39	1,39	1,58
Diklormetan	0,00	0,00	0,00	0,00	1,31	1,15	1,15	1,31
Etil acetat	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	1,14	1,14	1,27
Kloroform	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	2,04	1,00	1,22

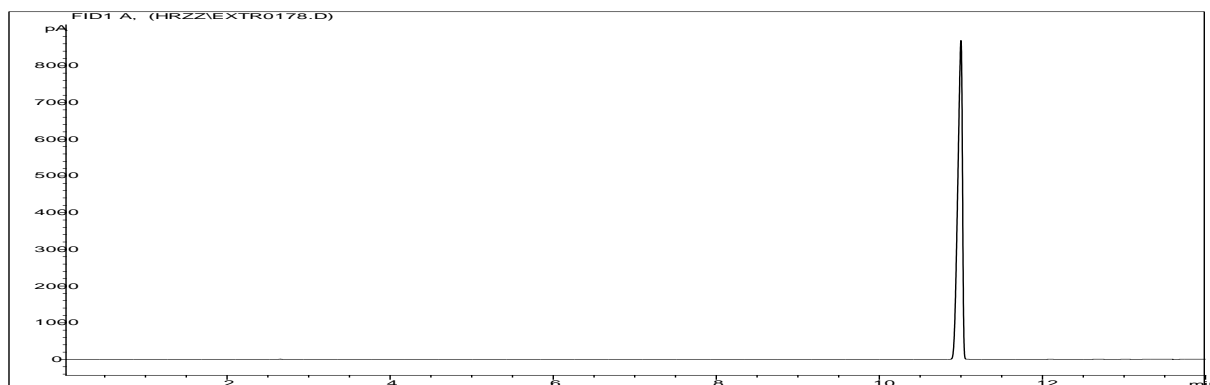
Za svaki od četiri promijenjena parametra, RSD omjera analitičkih signala, kao i RSD vremena zadržavanja analita, je unutar definiranih granica ( $RSD \leq 3\%$ ). Do malih odstupanja došlo je jedino kod RSD vrijednosti za trajanje *headspace* zagrijavanja analita etanola i izopropanola, kao i kod RSD vrijednosti za temperaturu *headspace* pećnice u slučaju etil acetata. Ispitivanjem kloroforma, došlo je do odstupanja RSD vrijednosti za nekoliko parametara, no to se pripisuje jako niskoj koncentraciji analita. Zaključujemo da je validirana metoda izdržljiva, odnosno pouzdana za primjenu uz promjene uvjeta u kojima se realno provode analize. Pri promjenama parametara *headspace* uzorkovanja ne dolazi do promjene vremena zadržavanja analita, kao što je i bilo za očekivati jer vrijeme zadržavanja analita ne ovisi o pripremi uzorka nego samo o parametrima plinskog kromatografa.

#### 4.2 Primjena metode za određivanje analita

Validirana sHSS-GC-FID metoda primijenjena je za određivanje ostalih otapala u krutim biljnim dodacima prehrani koji se koriste pri liječenju upalnih bolesti crijeva. Korištena su dva uzorka neobrađene usitnjene kurkume, čiji su kromatogrami prikazani na slikama 5 i 6.



Slika 5. Kromatogram uzorka 1 neobrađene usitnjene kurkume



Slika 6. Kromatogram uzorka 2 neobrađene usitnjene kurkume

Iz kromatograma se vidi da ni u jednom ni u drugom uzorku kurkume nisu pronađena ostatna otapala, tj. vide se samo pikovi koji potječu od otapala. Možemo zaključiti da su ovi biljni dodaci prehrani sigurni za uporabu kod liječenja upalnih bolesti crijeva.

Za očekivati je da se u neobrađenim uzorcima biljnih dodataka prehrani neće pronaći ostatna otapala jer nije provedena ekstrakcija s organskim otapalima. Međutim, organska otapala u uzorcima ne moraju potjecati isključivo od procesa ekstrakcije. Alkoholi mogu prirodno biti prisutni kao hlapljive sastavnice biljnoga materijala. U listovima određenih biljaka možemo pronaći slobodni metanol koji nastaje demetilacijom pektina pektinskom metilesterazom, a stvara se tijekom ranog stadija rasta lista, stoga razina alkohola u biljnome materijalu može ovisiti o fazi rasta tijekom koje je materijal prikupljen. Nadalje, alkoholi mogu nastati tijekom proizvodnje ili skladištenja zbog hidrolize određenih spojeva u sirovom materijalu ili fermentacijskih procesa. Također, mogu nastati tijekom kemijske analize hidrolizom sastavnica na visokoj temperaturi. Jasno je da se kvaliteta sirovog materijala korištenog u proizvodnji odražava na kvalitetu gotovog proizvoda, stoga u slučaju biljnih dodataka prehrani moraju biti jasno utvrđeni standardi za biljne materijale. Međutim, teško je utjecati na varijacije do kojih dolazi za vrijeme različitih godišnjih doba, zbog utjecaja različite vrste tla ili kvalitete vode za navodnjavanje, a koje sve imaju utjecaja na sastav kemijskih spojeva u biljnome materijalu.

## 5. Zaključak

U ovome radu validirana je nova sHSS-GC-FID metoda za određivanje ostatnih otapala u krutim biljnim dodacima prehrani za terapiju upalnih bolesti crijeva - metanola, etanola, acetona, izopropanola, diklormetana, etil acetata i kloroforma. Validacija metode provedena je prema dokumentu *ICH Harmonized Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)* (2005), a ispitani su parametri selektivnosti, linearnosti, granice dokazivanja i određivanja, preciznosti, točnosti i izdržljivosti. Selektivnost metode je zadovoljavajuća, što se može vidjeti iz vremena zadržavanja analita i iz dobivenog kromatograma na kojem su svi pikovi analita razdvojeni, kao i pik otapala. Linearnost metode također je zadovoljavajuća jer pokazuje koeficijent korelacije veći od 0,999 za sve analite u području svih koncentracijskih razina. Određene su i granice dokazivanja i određivanja analita. Nadalje, validirana metoda je precizna, jer su dobivene RSD vrijednosti za ponovljivost i srednju preciznost manje od 3 %, a i točna, jer su vrijednosti analitičkog prinosa unutar intervala od 95 do 105 % za sve analite. Također, metoda je izdržljiva, odnosno pouzdana za primjenu uz male promjene uvjeta, jer su dobivene RSD vrijednosti za svaki od promijenjenih parametara manje od 3 %, osim malih odstupanja RSD vrijednosti za neke od parametara izdržljivosti omjera analitičkih signala analita i unutarnjeg standarda etanola, izopropanola, etil acetata i kloroforma.

Validirana sHSS-GC-FID metoda primijenjena je za određivanje navedenih ostatnih otapala u neobrađenim uzorcima kurkume. U uzorcima nije pronađeno nijedno ostatno otapalo, iz čega zaključujemo i da su navedeni biljni dodaci prehrani sigurni za uporabu uz terapiju upalnih bolesti crijeva.

Ovim ispitivanjem utvrđena je i dokumentirana prikladnost ispitivane analitičke metode za određivanje ostatnih otapala u krutim biljnim dodacima prehrani koji se primjenjuju uz terapiju upalnih bolesti crijeva.

## 6. Literatura

Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Rodriguez-Cabezas ME, Risco S, Ocete MA, Galvez J. Botanical Drugs as an Emerging Strategy in Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015, 1-14.

International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005., <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>, pristupljeno 10.02.20.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 212.

Malik TA. Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin N Am*, 2015, 95(6), 1105-1122.

Mazieiro R, Frizon RR, Barbalho SM, Goulart RA. Is Curcumin a Possibility to Treat Inflammatory Bowel Diseases? *J Med Food*, 2018, 00(0), 1-9.

Mornar A, Sertić M, Amidžić Klarić D, Klarić I, Stipanović K, Nigović B. Evaluation of alcohol content and metal impurities in liquid dietary supplements by sHSS-GC-FID and GFAAS techniques. *Food Chem*, 2016, 211, 285-293.

Mundkinajeddu D, Agarwal A. Residual Methanol in Botanical Dietary Ingredients – Perspectives of a Manufacturer. *HerbalEGram*, 2014, 11(8).

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova- praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 113-114; 135-137.

Nigović B. Predavanja iz kolegija Analitika lijekova. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018./2019.

Petroczi A, Taylor G, Naughton DP. Mission impossible? Regulatory and enforcement issue to ensure safety of dietary supplements. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49, 393-402.

Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep*, 2011, 63, 629–642.

Pollak L. Dodaci prehrani i hrana za posebne prehrambene potrebe. *Medicus*, 2008, 17, 47-55.

Shematski prikaz dinamičkog *headspace* uzorkovanja, 2015., [https://www.researchgate.net/figure/Diagram-of-analysis-with-online-purge-and-trap-gas-chromatography-mass-spectrometry\\_fig1\\_274709453](https://www.researchgate.net/figure/Diagram-of-analysis-with-online-purge-and-trap-gas-chromatography-mass-spectrometry_fig1_274709453), pristupljeno 07.02.2020.

Shematski prikaz statičkog *headspace* uzorkovanja, 2020., [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Book%3A\\_Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_\(Barron\)/05%3A\\_Reactions\\_Kinetics\\_and\\_Pathways/5.01%3A\\_Dynamic\\_Headspace\\_Gas\\_Chromatography\\_Analysis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/05%3A_Reactions_Kinetics_and_Pathways/5.01%3A_Dynamic_Headspace_Gas_Chromatography_Analysis), pristupljeno 07.02.2020.

Srinivasan VS. Challenges and scientific issues in the standardization of botanicals and their preparations. United States Pharmacopeia's dietary supplement verification program – A public health program. *Life Sci*, 2006, 78, 2039-2043.

Triantafyllidi A, Xanthos T, Papalois A, Triantafyllidis JK. Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*, 2015, 28, 210-220.

Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. *Medicus*, 2006, 15, 53-62.

Vucelić B. Gastroenterologija i hepatologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2002, str. 723-728.

Watson DG. Pharmaceutical analysis. Edinburgh, Elsevier, 2012., str. 266-272; 284-286.



## 7. Sažetak/ Summary

### 7.1 Sažetak

Upalne bolesti crijeva spadaju u kronične idiopatske upalne bolesti gastrointestinalnog sustava karakterizirane upalama segmenata probavnog trakta s raznolikim kliničkim manifestacijama poput krvavih stolica, proljeva, tenezma, urgencije te grčevitih bolova. Razlikujemo dva entiteta: Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. U pozadini Crohnove bolesti je stanično posredovani Th1 tip imunog odgovora, a kod ulceroznog kolitisa Th2 tip koji generira humoralni imuni odgovor. Od lijekova koji se koriste za liječenje upalnih bolesti crijeva prevladavaju aminosalicilati, kortikosteroidi, imunosupresivi i biološka terapija, no u posljednje vrijeme sve više pacijenata uz terapiju uključuje i biljne dodake prehrani. Neki od korištenih dodataka prehrani su ekstrakt andrografisa i smola tamjanovca, no svakako najvažnija je kurkuma u čijim podancima se nalazi spoj kurkumin uz koji se povezuje snažno protuupalno, antioksidativno i antimutageno djelovanje.

S obzirom na to da od 1990-ih postoji jak uzlazni trend u korištenju dodataka prehrani, jasno je da se povećao i interes pacijenata i zdravstvenih radnika za njihovu sigurnost i učinkovitost. U usporedbi s lijekovima, dodaci prehrani nisu podvrgnuti istim znanstvenim ispitivanjima i nisu tako striktno regulirani i kontrolirani, stoga se mogu naći proizvodi kontaminirani s teškim metalima, pesticidima i dodanim farmakološkim tvarima. Kod biljnih dodataka prehrani, najveći problem je što često sadržavaju značajnu količinu zaostalih organskih otapala, posebice etanola koji je metabolički aktivan i kao takav predstavlja rizik za pojedine skupine pacijenata. Dakle, potreban je razvoj jedinstvene analitičke metode koja bi mogla brzo i pouzdano odrediti ostatna otapala prisutna u biljnim dodacima prehrani.

Plinska kromatografija je metoda odjeljivanja u kojoj uzorak tijekom unošenja u kolonu trenutno ispari, nakon čega plinovita pokretna faza eluira sastavnice uzorka prolazeći kolonom sa nepokretnom fazom, a odijeljene se sastavnice najčešće dokazuju plamenoionizacijskim detektorom. Iz uzorka je potrebno prvo odvojiti hlapljiva organska otapala u plinovitu fazu, stoga se plinska kromatografija povezuje s metodom *headspace* uzorkovanja. S obzirom na hlapljivost organskih otapala i značajnu separacijsku sposobnost kapilarnih kolona, plinska kromatografija vodeća je tehnika za njihovo određivanje.

U ovom radu validirana je sHSS-GC-FID metode za određivanje metanola, etanola, acetona, izopropanola, diklormetana, etil acetata i kloroforma u krutim biljnim dodacima prehrani koji se koriste uz terapiju upalnih bolesti crijeva. Ispitivanje parametara selektivnosti, linearnosti, granica dokazivanja i određivanja, preciznosti, točnosti i izdržljivosti dalo je

zadovoljavajuće rezultate, te se metoda pokazala prikladnom za određivanje navedenih ostatnih otapala. Validirana metoda primijenjena je za analizu dva uzorka neobrađene usitnjene kurkume u kojima nije pronađeno nijedno ostatno otapalo, što čini ove biljne dodatke prehrani sigurnima za uporabu u liječenju upalnih bolesti crijeva.

## 7.2 Summary

Inflammatory bowel diseases, which include Crohn's disease and ulcerative colitis, are idiopathic chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract, characterized by recurrent inflammations of segments of gastrointestinal tract with various clinical manifestations such as blood in the stool, diarrhea, urging and abdominal pain. The pathogenesis of Crohn's disease involves the cell-mediated Th1 immune response, while pathogenesis of ulcerative colitis involves Th2 response which generates humoral immunity. Current drug treatment consists of aminosalicylates, corticosteroids, immunosuppressants and biological therapy, but nowadays more and more patients are turning to herbal therapy because of drug side effects. Some of herbal dietary supplements that are used are extract from green chireta and resin from olibanum-tree, but the most important one is turmeric with its main component curcumin. Numerous pharmacological activities have been reported for curcumin, including anti-inflammatory, antioxidant and anticancer properties.

There is a sharp upward trend in the use of dietary supplements since 1990s, which resulted in widespread interest of health care practitioners and patients in their safety and quality. Comparing to medications, dietary supplements are not subjected to the same scientific scrutiny and are not as strictly regulated and controlled, so they are products sold contaminated with heavy metals, pesticides or prescription drugs. In addition, herbal dietary supplements may contain significant levels of organic volatile compounds, especially ethanol which is metabolically active, so it represents high risk for certain groups of patients. Therefore, development of rapid and reliable method for determination of organic volatile compounds in herbal dietary supplements is much needed.

Gas chromatography is an analytical method in which the sample is loaded onto the head of the column via a heated injection port, where it evaporates, and then a gaseous mobile phase elutes its components flowing through a heated tube coated with a liquid stationary phase. Separated components are usually detected with the flame ionization detector. Gas chromatography may be connected to headspace sampling technique to analyze the samples with complex matrices that also contain non-volatile substances. Due to the volatility of

organic solvents and the substantial separating capability of capillary columns, gas chromatography is dominated technique for organic solvents determination.

This work focuses upon validation of sHSS-GC-FID method for simultaneous determination of methanol, ethanol, acetone, isopropanol, dichloromethane, ethyl acetate and chloroform in solid herbal dietary supplements for inflammatory bowel diseases. The method was validated for selectivity, linearity, limits of determination and quantitation, precision, accuracy and robustness. All the results were satisfactory; therefore, the method has proven to be reliable for determination of these organic volatile compounds. Validated method was used in analysing two different turmeric food products, where none of the organic volatile compounds were found, which has proven their safety in therapeutical use in the inflammatory bowel diseases.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### VALIDACIJA sHSS-GC-FID METODE ZA ODREĐIVANJE OSTATNIH OTAPALA U ORALNIM SUHIM OBLICIMA BILJNIH DODATAKA PREHRANI KORIŠTENIMA UZ TERAPIJU UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Nina Lagundžić

#### SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva spadaju u kronične idiopatske upalne bolesti gastrointestinalnog sustava karakterizirane upalama segmenata probavnog trakta s raznolikim kliničkim manifestacijama poput krvavih stolica, proljeva, tenezma, urgencije te grčevitih bolova. Razlikujemo dva entiteta: Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. U pozadini Crohnove bolesti je stanično posredovani Th1 tip imunog odgovora, a kod ulceroznog kolitisa Th2 tip koji generira humoralni imuni odgovor. Od lijekova koji se koriste za liječenje upalnih bolesti crijeva prevladavaju aminosalicilati, kortikosteroidi, imunosupresivi i biološka terapija, no u posljednje vrijeme sve se više pacijenata uključuje uz terapiju i biljne dodake prehrani. Neki od korištenih dodataka prehrani su ekstrakt andrografisa i smola tamjanovca, no svakako najvažnija je kurkuma u čijim podancima se nalazi spoj kurkumin uz koji se povezuje snažno protuupalno, antioksidativno i antimutageno djelovanje. S obzirom na to da od 1990-ih postoji jak uzlazni trend u korištenju dodataka prehrani, jasno je da se povećao i interes pacijenata i zdravstvenih radnika za njihovu sigurnost i učinkovitost. U usporedbi s lijekovima, dodaci prehrani nisu podvrgnuti istim znanstvenim ispitivanjima i nisu tako striktno regulirani i kontrolirani, stoga se mogu naći proizvodi kontaminirani s teškim metalima, pesticidima i dodanim farmakološkim tvarima. Kod biljnih dodataka prehrani, najveći problem je što često sadržavaju značajnu količinu zaostalih organskih otapala, posebice etanola koji je metabolički aktivan i kao takav predstavlja rizik za pojedine skupine pacijenata. Dakle, potreban je razvoj jedinstvene analitičke metode koja bi mogla brzo i pouzdano odrediti ostatna otapala prisutna u biljnim dodacima prehrani.

Plinska kromatografija je metoda odjeljivanja u kojoj uzorak tijekom unošenja u kolonu trenutno ispari, nakon čega plinovita pokretna faza eluira sastavnice uzorka prolazeći kolonom sa nepokretnom fazom, a odijeljene se sastavnice najčešće dokazuju plamenoionizacijskim detektorom. Iz uzorka je potrebno prvo odvojiti hlapljiva organska otapala u plinovitu fazu, stoga se plinska kromatografija povezuje s metodom *headspace* uzorkovanja. S obzirom na hlapljivost organskih otapala i značajnu separacijsku sposobnost kapilarnih kolona, plinska kromatografija vodeća je tehnika za njihovo određivanje.

U ovom radu validirana je sHSS-GC-FID metode za određivanje metanola, etanola, acetona, izopropanola, diklormetana, etil acetata i kloroforma u krutim biljnim dodacima prehrani koji se koriste uz terapiju upalnih bolesti crijeva. Ispitivanje parametara selektivnosti, linearnosti, granica dokazivanja i određivanja, preciznosti, točnosti i izdržljivosti dalo je zadovoljavajuće rezultate, te se metoda pokazala prikladnom za određivanje navedenih ostatnih otapala. Validirana metoda primijenjena je za analizu dva uzorka neobrađene usitnjene kurkume u kojima nije pronađeno nijedno ostatno otapalo, što čini ove biljne dodatke prehrani sigurnima za uporabu u liječenju upalnih bolesti crijeva.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 30 stranica, 6 grafičkih prikaza, 10 tablica i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: upalne bolesti crijeva, biljni dodaci prehrani, plinska kromatografija, validacija, ostatna otapala

Mentor: **Prof. dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Izv. prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **VALIDATION OF sHSS-GC-FID METHOD FOR DETERMINATION OF ORGANIC VOLATILE COMPOUNDS IN ORALLY ADMINISTERED SOLID HERBAL DIETARY SUPPLEMENTS FOR INFLAMMATORY BOWEL DISEASES**

**Nina Lagundžić**

#### **SUMMARY**

Inflammatory bowel diseases, which include Crohn's disease and ulcerative colitis, are idiopathic chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract, characterized by recurrent inflammations of segments of gastrointestinal tract with various clinical manifestations such as blood in the stool, diarrhea, urging and abdominal pain. The pathogenesis of Crohn's disease involves the cell-mediated Th1 immune response, while pathogenesis of ulcerative colitis involves Th2 response which generates humoral immunity. Current drug treatment consists of aminosalicylates, corticosteroids, immunosuppressants and biological therapy, but nowadays more and more patients are turning to herbal therapy because of drug side effects. Some of herbal dietary supplements that are used are extract from green chireta and resin from olibanum-tree, but the most important one is turmeric with its main component curcumin. Numerous pharmacological activities have been reported for curcumin, including anti-inflammatory, antioxidant and anticancer properties.

There is a sharp upward trend in the use of dietary supplements since 1990s, which resulted in widespread interest of health care practitioners and patients in their safety and quality. Comparing to medications, dietary supplements are not subjected to the same scientific scrutiny and are not as strictly regulated and controlled, so they are products sold contaminated with heavy metals, pesticides or prescription drugs. In addition, herbal dietary supplements may contain significant levels of organic volatile compounds, especially ethanol which is metabolically active, so it represents high risk for certain groups of patients. Therefore, development of rapid and reliable method for determination of organic volatile compounds in herbal dietary supplements is much needed.

Gas chromatography is an analytical method in which the sample is loaded onto the head of the column via a heated injection port, where it evaporates, and then a gaseous mobile phase elutes its components flowing through a heated tube coated with a liquid stationary phase. Separated components are usually detected with the flame ionization detector. Gas chromatography may be connected to headspace sampling technique to analyze the samples with complex matrices that also contain non-volatile substances. Due to the volatility of organic solvents and the substantial separating capability of capillary columns, gas chromatography is dominated technique for organic solvents determination.

This work focuses upon validation of sHSS-GC-FID method for simultaneous determination of methanol, ethanol, acetone, isopropanol, dichloromethane, ethyl acetate and chloroform in solid herbal dietary supplements for inflammatory bowel diseases. The method was validated for selectivity, linearity, limits of determination and quantitation, precision, accuracy and robustness. All the results were satisfactory; therefore, the method has proven to be reliable for determination

of these organic volatile compounds. Validated method was used in analysing two different turmeric food products, where none of the organic volatile compounds were found, which has proven their safety in therapeutical use in the inflammatory bowel diseases.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 30 pages, 6 figures, 10 tables and 19 references. Original is in Croatian language.

**Keywords:** inflammatory bowel diseases, herbal dietary supplements, gas chromatography, validation, organic volatile compounds

**Mentor:** **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Reviewers:** **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.