HSS-GC-FID analiza ostatnih otapala u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Nalo, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:832298

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Luka Nalo

HSS-GC-FID ANALIZA OSTATNIH OTAPALA U DODACIMA PREHRANI ZA LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom dr.sc. Marija-Livija Jeličića.

Zahvaljujem svojem mentoru, dr. sc. Mariju-Liviju Jeličiću na posvećenom vremenu, znanju i trudu prilikom pisanja ovog diplomskog rada. Također, velike zahvale na strpljenju i pomoći prilikom rada u laboratoriju, ali i na izvrsnoj radnoj atmosferi tokom izrade eksperimentalnog dijela ovog diplomskog ponovno idu njemu, ali i ostatku Zavoda za analitiku lijekova – naročito prof. dr. sc. Mornar-Turk i asistentici Jeleni.
I naravno za kraj, jedno veliko hvala svim mojim prijateljima i kolegama s fakulteta te van njega na mentalnoj podršci koja je proteklih pet godina studija učinila barem malo lakšima.

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].

SADRŽAJ:

1. UVOD ... 1
1.1. Upalne bolesti crijeva ... 2
1.1.1. Definicija upalnih bolesti crijeva ... 2
1.1.2. Patofiziološka pozadina upalnih bolesti crijeva ... 2
1.1.3. Epidemiologija upalnih bolesti crijeva ... 3
1.1.4. Farmakološke mogućnosti u liječenju upalnih bolesti crijeva ... 3
1.2. Biljni preparati u liječenju upalnih bolesti crijeva ... 7
1.2.1. Terapijske mogućnosti ... 7
1.2.2. Zakonska regulativa ... 10
1.2.3. Dodaci prehrani ... 11
1.3. Ostatna otapala ... 12
1.3.1. Definicija ostatnih otapala ... 12
1.3.2. Klasifikacija ostatnih otapala ... 12
1.3.3. Ostatna otapala u dodacima prehrani ... 13
1.4. Plinska kromatografija ... 13
1.4.1. Temeljni principi plinske kromatografije ... 13
1.4.2. Plamenoionizacijski detektor ... 15
1.4.3. *Headspace sampling* metoda ... 16
1.4.4. Prednosti i ograničenja plinske kromatografije ... 16
2. OBRAZLOŽENJE TEME ... 17
3. MATERIJALI I METODE ... 19
3.1. Materijali ... 20
3.1.1. Kemikalije ... 20
3.1.2. Uzorci ... 20
3.1.3. Pribor ... 21
3.1.4. Radni instrumenti ... 21
3.1.5. Programski alati ... 20
3.2. USP metoda ... 21
3.2.1. Priprema standardnih otopina ... 21
3.2.2. Priprema radnih otopina ... 23
3.2.3. Priprema uzoraka ... 23
3.2.4. Parametri HSS-GC-FID metode ... 23
3.2.5. Analiza i obrada podataka ... 24
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 25
5. ZAKLJUČAK ... 35
6. LITERATURA ... 37

7. SAŽETAK / SUMMARY 42
8. PRILOZI 45
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

1.1.1. Definicija upalnih bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory bowel diseases*, IBD) su skupina kroničnih inflamatornih bolesti gastrointestinalnog trakta koje karakterizira nadutost, abdominalna bol, krvarenje, kronični proljev te, zbog navedenih simptoma, gubitak težine a u težim slučajevima, anemija. U skupinu upalnih bolesti crijeva spadaju dva podtipa, Crohnova bolest i ulcerozni kolitis, koji se primarno razlikuju po zahvaćenom području probavnog sustava te dubini tkiva koje je pogođeno bolešću. Ulcerozni kolitis karakterizira kronična kontinuirana upala isključivo sluznice debelog crijeva, a zahvaćeno je jedno područje kolona te je upala centrirana na tome području (Ordás i sur., 2012). Za razliku od ulceroznog kolitisa, Crohnova bolest može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava od anusa do usta. Najčešće zahvaćena područja su ileum i cekum, to jest završni dio tankog crijeva i početni dio debelog crijeva. Nadalje, dok je ulcerozni kolitis kontinuirana upala, kod Crohnove bolesti se upaljena područja mogu pojaviti u diskontinuitetu primjerice, zahvaćeni mogu biti i jejunum i anus, iako upale u ileumu nema (Sartor, 2006).

1.1.2. Patofiziološka pozadina upalnih bolesti crijeva

Patofiziološka pozadina upalnih bolesti crijeva je kompleksna iako etiologija nije potpuno razjašnjena, pretpostavlja se da dolazi do prekomjerne aktivacije imunosnog sustava zbog reakcije na vlastitu mikrofloru. U fiziološkim uvjetima, komenzalne bakterije u ljudskim crijevima nisu patogene, to jest nemaju sposobnost izazvati infekciju. Kada patogeni mikroorganizmi dođu u debelo ili tanko crijevo, oni prodiru kroz epitel te ih tamo prepoznaju dendritične stanice koje se nalaze unutar i ispod mukoznog epitela. Dendritične stanice (engl. *Dendritic cells*, DC) su predočne stanice (engl. *Antigen-presenting cells*, APC) koje igraju važnu ulogu u povezivanju urođene i stečene imunosti stvarajući citokine koji potiču funkciju limfocita te stanica urođene imunosti. Nakon prepoznavanja stranih patogenih mikroorganizama, aktivirane dendritične stanice potiču CD4+ pomoćničke T limfocite na diferencijaciju u Th1 i Th2 stanice. Th1 i Th2 stanice luče citokine, glikoproteine relativno niskih molekulskih masa, koji putem specifičnih receptora potiču aktivaciju i proliferaciju imunosnih stanica te osiguravaju adekvatan imunosni odgovor organizma na patogene mikroorganizme. Komenzalne bakterije ne potiču ovakvu reakciju, u njihovoj prisutnosti se iz

epitelnih i mezenhimskih stanica luče regulatorni citokini kao što su transformirajući faktor rasta β (engl. *Transforming growth factor beta*, TGF-β), prostaglandin E2 (engl. *Prostaglandin E2*, PGE2) te timusni stromalni limfopoietin (engl. *Thymic stromal lymphopoietin*, TLSP) koji inhibiraju potpuno sazrijevanje dendritičkih stanica. Te nezrele dendritičke stanice šalju slabije signale od aktiviranih dendritičkih stanica te CD4+ T limfocite potiču na diferencijaciju u Th3 i T_{reg} stanice koje luče imunosupresijske citokine. U njih spadaju interleukin-10 koji inhibira funkciju makrofaga i sintezu Th1 citokina, interleukin-35 koji inhibira aktivaciju Th1 stanica, te prethodno spomenuti TGF-β koji uz svoje induktivno djelovanje na T_{reg} također suprimira proupalno djelovanje Th1 stanica i makrofaga. Međutim, kada osoba boluje od upalne bolesti crijeva, ovaj mehanizam prepoznavanja takozvanih „dobrih'' bakterija, to jest komenzala, nije razvijen te dolazi do prekomjerne kronične aktivacije imunosnog sustava na ljudsku mikrofloru te oštećenja funkcije epitelnih stanica povodom imunosnog odgovora (Dumić, 2021).

1.1.3. Epidemiologija upalnih bolesti crijeva

Prema podacima iz 2006., incidencija Crohnove bolesti u Republici Hrvatskoj iznosi 7,0/100 000, dok incidencija ulceroznog kolitisa iznosi 4,3/100 000 (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006). Što se stanja u Europskoj Uniji tiče, podaci iz 2020. godine pokazuju da otprilike 0,2 % europske populacije boluje od upalnih bolesti crijeva (Zhao i sur., 2021.). Prema istraživanju koje je proveo Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*), vodeća javnozdravstvena ustanova na području Sjedinjenih Američkih Država, u toj državi je od 2001. do 2018. incidencija Crohnove bolesti porasla za 3,4 % dok je incidencija ulceroznog kolitisa porasla za 2,8 % (Xu i sur., 2021). Na svjetskoj razini, broj pacijenata koji boluju od ovih bolesti je porastao s 3 700 000 u 1990. na 6 800 000 u 2017. (Alatab i sur., 2017). Iz ovih podataka je vidljivo da su upalne bolesti crijeva skupina bolesti koje igraju sve veću ulogu u modernom svijetu te su jasno povezane s modernim načinom života, iako točni okolišni aspekti, izuzev pušenja, koji utječu na uočenu povećanu incidenciju nisu precizno definirani (Cosnes i sur., 2001).

1.1.4. Farmakološke mogućnosti u liječenju upalnih bolesti crijeva

5-aminosalicilati predstavljaju prvu te temeljnu liniju liječenja za pacijente s blagim do umjereno aktivnim ulceroznim kolitisom, dok su u pacijenata s Crohnovom bolešću djelotvorni samo u terapiji koloničkog oblika bolesti. U ovu skupinu lijekova spadaju sulfasalazin, olsalazin

i balsalazid. Mehanizam djelovanja svih aminosalicilata počiva na aktivnom metabolitu koji se naziva mesalazin (5-aminosalicilna kiselina). Metabolizmom olsalazina nastaju dvije aktivne molekule mesalazina, dok metabolizmom basalazida i sulfasalazina nastaje jedna molekula mesalazina te jedna molekula neaktivnog metabolita. Nastali mesalazin u crijevima eksprimira protuupalni učinak inhibicijom ciklooksigenaza (engl. *cyclooxygenase*, COX) i 5-lipooksigenaza (engl. *lypooxygenase,* LOX). COX enzimi su odgovorni za nastajanje proupalnih prostaglandina te tromboksana iz arahidonske kiseline, dok su LOX enzimi odgovorni za nastajanje leukotriena A4, koji služi kao prekursor u nastajanju proupalnih leukotriena B4 i E4. Njihovom inhibicijom smanjuje se sinteza proupalnih čimbenika. Uz ovo djelovanje, mesalazin također djeluje i kao antioksidans, hvatajući slobodne kisikove radikale koji nastaju tijekom upalne reakcije te tako sprječava oksidativno oštećenje stanica (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Bach-Rojecky, 2021). Novija istraživanja upućuju na to da mesalazin također djeluje preko peroksisom proliferator aktiviranih receptora γ (engl. *Peroxisosme proliferator-activated receptor-γ*, PPAR-γ) nuklearnih receptora koji kontroliraju staničnu proliferaciju i apoptozu, inhibirajući ekspresiju proupalnih citokina te potičući ekspresiju protuupalnih citokina (Tyagi i sur., 2011).

Kortikosteroidi se koriste u terapiji srednje jakog oblika ulceroznog kolitisa te Crohnove bolesti u slučajevima u kojima 5-aminosalicilati ne pokazuju terapijski odgovor. Klasični oblici lijeka uključuju sistemske oblike (oralni – prednizon, prednizolon, metilprednizolon i intravenski oblici – hidrokortizon i metilprednizolon) i topičke lijekove (supozitoriji, pjene i klizme). Kortikosteroidi se koriste samo za akutnu terapiju bolesti te su neučinkoviti u održavanju terapije. Primjerice, budesonid je kortikosteroid visokog afiniteta za glukokortikoidne receptore koji se koristi za akutnu terapiju aktivne Crohnove bolesti. Njegova primjena je ograničena na 8 tjedana te se nakon četiri tjedna primjene njegova doza kreće smanjivati (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Bach-Rojecky, 2021). Razlog ovako kratkoj primjeni leži u ozbiljnim sistematskim nuspojavama kortikosteroida. Fiziološki, glukokortikosteroidi su steroidni hormoni kore nadbubrežne žlijezde imaju brojne funkcije u tijelu, oni djeluju antiproliferativno, vazokonstriktorno, imunosupresivno te protuupalno (Liu i sur., 2013). Najčešće zabilježene nuspojave kortikosteroida su temeljene upravo na tim djelovanjima te uključuju razvoj osteoporoze zbog povećane aktivnosti osteoklasta te indukcije apoptoze osteoblasta, hiperglikemija i dijabetes zbog utjecaja glukokortikosteroida na inzulinsku rezistenciju, hipertenziju i ostale kardiovaskularne probleme te pojačani rizik od infekcija. (White, 1994; Schneiter, 1998; Weinstein, 1998). U pozadini pojačanog rizika od

infekcija leži upravo djelovanje glukokortikosteroida koje je značajno u terapiji upalnih bolesti crijeva. Glukokortikosteroidi sprječavaju upalnu reakciju inhibicijom sinteze prostaglandina i proupalnih citokina djelovanjem na transkcripciju gena putem glukokortikoidnih receptora. Time dolazi do ublažavanja simptoma upalnih bolesti crijeva no kako je imunosni odgovor na patogene oslabljen zbog toga, povećava se mogućnost komplikacija prilikom infekcija (Stellato, 2004).

Imunosupresivi se koriste u srednje-jakim i jakim oblicima Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa za održavanje remisije. U ovu skupinu lijekova za terapiju upalnih bolesti crijeva spadaju azatioprin, metotreksat te takrolimus.

Azatioprin se koristi u jakim refraktornim oblicima bolesti isključivo kao terapija održavanja remisije. Azatioprin je prolijek koji u tijelu prelazi u aktivni metabolit 6-merkaptopurin kojeg karakterizira sporo unutarstanično nakupljanje upravo zbog toga se ovaj lijek koristi samo u cilju održavanja remisije potrebno je čak i do 12 tjedana kako bi se postigle terapijske koncentracije aktivnog metabolita. Uz to, taj aktivni metabolit zbog svojeg djelovanja, koje je temeljeno na inhibiciji biosinteze nukleotida u stanicama, može djelovati citotoksično i izazvati ozbiljne nuspojave, uključujući oštećenja bubrežne ili jetrene funkcije, kromosomske poremećaje, progresivnu multifokalnu leukoencefalopatiju te, zbog svojeg imunosupresivnog djelovanja, povećanu osjetljivost na infekcije. Kako bi se spriječile ove neželjene posljedice u tijelu su potrebne dovoljne razine enzima koji razgrađuju 6-merkaptopurin ti enzimi su ksantin-oksidaze te tiopurin-S-metiltransferaza. Prije uvođenja azatioprina u terapiju je potrebno pacijenta uputiti na određivanje genotipa tiopurin-S-metiltransferaze kako bi se spriječile neželjene nuspojave, dok kod pacijenata koji koriste inhibitor ksantin-oksidaze, kao što je alopurinol, dozu azatioprina treba smanjiti ovisno o pacijentovoj terapiji (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Bach-Rojecky, 2021).

Metotreksat se koristi za održavanje remisije Crohnove bolesti u pacijenata koji ne podnose azatioprin. Za razliku od azatioprina koji se oralno primjenuje jednom dnevno, metotreksat se pacijentima daje u obliku intramuskularne injekcije jedanput mjesečno. Po svojoj strukturi, metotreksat je antagonist folata on izravno inhibira proliferaciju proupalnih stanica, potiče njihovu apoptozu te suprimira djelovanje proupalnih citokina. Problem s terapijom metotreksatom te razlog zašto je azatioprin preferirana terapija ukoliko ga pacijenti podnose je njegova toksičnost na početku terapije manifestira se gastrointenstinalnim tegobama koje uključuju mučninu, povraćanje te proljev. Nakon dugotrajne primjene metotreksat može

djelovati hepato te mijelotoksično te se, s ciljem sprječavanja tih nuspojava, lijek primjenjuje uz nadomjesnu terapiju folnom kiselinom (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Bach-Rojecky, 2021).

Takrolimus je imunosupresiv koji se koristi kao zadnja linija pri liječenju aktivne bolesti rezistentne na terapiju kortikosteroidima. Takrolimus inhibira aktivaciju i proliferaciju T-stanica i stvaranje proupalnih citokina stvaranjem kompleksa s FKBP (engl. *FK506 binding protein*). Tako nastali kompleks inhibira kalcineurin te posljedično sve dijelove imunosnog odgovora koji ovise o prisutnosti kalcija. Taj kompleks također potiče djelovanje glukokortikosteroida i progesterona sprječavajući degradaciju glukokortikoidnih i progesteronskih receptora (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Bach-Rojecky, 2021).

Protutijela na faktor nekroze tumora-α (engl. *Tumour necrosis factor-α,* TNF-α) uključuju infliskimab (kimerno monoklonsko protutijelo), adalimumab (humano monoklonsko protutijelo), golimumab (humano monoklonsko protutijelo), certolizumab pegol (humanizirani Fab fragment) te etanercept (kimerni fuzijski protein). Ovi lijekovi koriste se isključivo u refraktornim slučajevima ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti koji ne regairaju na ostalu terapiju. Primjenjuju se u obliku intravenskih infuzija ili subkutanih injekcija. Njihov mehanizam djelovanja se sastoji od vezanja membranskog i topljivog TNF-α te sprječavanje njegovog vezanja na receptor na stanicama imunosnog sustava. TNF-α je citokin urođene imunosti kojeg stvaraju mononuklearni fagociti koji potiče imunosni odgovor aktivacijom endotelnih stanica, antigen-prezentirajućih stanica te aktivacijom neutrofila i poticanjem stvaranja slobodnih kisikovih radikala i proupalnih citokina. Inhibicijom djelovanja TNF-α dolazi do imunosupresivnog djelovanja te ublažavanja upalne reakcije u zahvaćenom dijelu gastrointestinalnog trakta. S obzirom na jako imunosupresivno djelovanje ovih lijekova, pacijenti su skloni infekcijama te, kao i kod druge biološke terapije, prilikom duge primjene može doći do razvoja autoimunih protutijela te protutijela na sami lijek (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Bach-Rojecky, 2021).

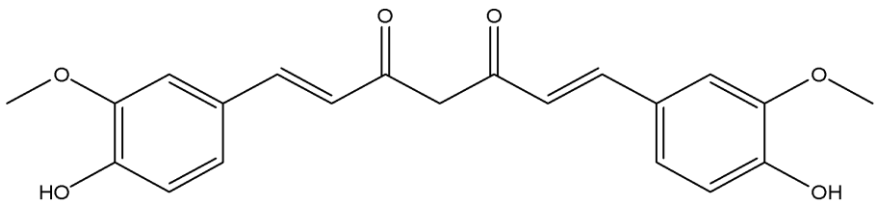
Jedini lijek iz skupine anti-integrinske terapije koji je zasada prošao sve faze kliničkih istraživanja te je registriran na hrvatskom tržištu od 2014. je vedolizumab. Vedolizumab se koristi za liječenje odraslih bolesnika s izrazito aktivnom Crohnovom bolesti ili ulceroznim kolitisom kojima terapija protutijelima na TNF-α nije bila učinkovita. Vedolizumab je humanizirano monoklonsko protutijelo selektivno za integrin α4β7 koji je primarno izražen na podskupu memorijskih T limfocita koji pretežno migriraju u gastrointestinalni trakt te posreduju

upalnim reakcijama u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu. Vedolizumab se specifično veže na integrin α4β7 te sprječava adheziju tih stanica na mukozno adresinsku staničnu adhezijsku molekulu-1 (MAdCAM-1) koja je prisutna gotovo isključivo na endotelnim stanicama gastrointestinalnog sustava (Bach-Rojecky, 2021).

1.2. Biljni preparati u liječenju upalnih bolesti crijeva

1.2.1. Terapijske mogućnosti

Kurkuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae), je 50 — 100 cm visoka biljka s iznutra žutim, kvrgavim podankom. Listovi imaju dugu peteljku, a lisna plojka može biti do 45 cm duga i do 18 cm široka. Zaštitni listovi cvata su bijelkastozeleni, dok su gornji prevučeni bijelo i ružičasto. Javanski žuti korijen čine osušeni podanci vrste *Curcuma xanthorrhiza*: biljka samoniklo raste u tropskoj jugoistočnoj Aziji, a uzgaja se u tropskim i suptropskim područjima. Miris podanka je aromatičan, a okus nagorak. (Kuštrak, 2005). Sastojak kurkume zaslužan za njeno blagotvorno djelovanje u upalnim bolestima crijeva je kurkumin (*Slika 1.*), polifenol s opisanim protuupalnim, antioksidacijskim, imunomodulatornim i antiproliferatornim djelovanjem (Ammon i Wahl, 1991). Na molekulskoj razini on djeluje na NF-κB, faktor transkripcije koji je prisutan na T- i B-staničnim receptorima, transmembranskim proteinima koji se nalaze na površini T i B limfocita. Aktivacijom istih dolazi do poticanja imunosnog odgovora i upalne reakcije. Kurkumin inaktivira taj transkripcijski faktor, regulirajući staničnu aktivnost i ublažujući upalnu reakciju. Njegova djelotvornost je dokazana i u kliničkim studijama u istraživanju na 50 pacijenata s aktivnom bolesti, unatoč punoj dozi 5-aminosalicilata, dodatak od 3 g / dan kurkumina bio je bolji od placeba i 5-aminosalicilata u indukciji kliničke remisije, kliničkom odgovoru i smanjenoj upali sluznice (Krznarić i sur., 2018).



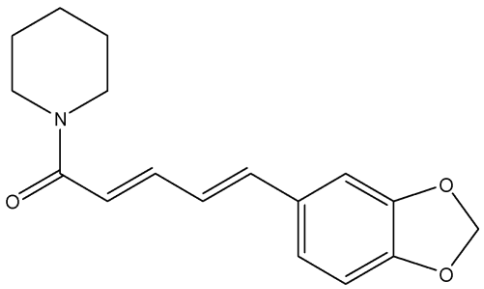
Slika 1. Strukturna formula kurkumina

Aloe barbadensis Mill. (*Aloe vera* L., Asphodelaceae) je biljka s velikim sukulentnim listovima koji su skupljeni u rozetu, dugački 40 — 50 centimetara, imaju bodljikav rub i površin

te ušiljen rub. Podrijetlom je iz s Arapskog poluotoka, no tokom povijesti se proširila po čitavome svijetu. Prema Europskoj farmakopeji, droga *Aloe barbadensis* definira se kao ukoncentriran i osušen sok listova vrste *Aloe barbadensis* Miller koji sadrži najmanje 28,0 % hidroksiantracenskih derivata, izraženo kao barbaloin ($C_{21}H_{22}O_9$) i izračunano u odnosu na suhu tvar. U istraživanju provedenom na 44 pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa kojima je nasumice dan oralni pripravak aloe vera gela i placeba u količini od 100 mililitara dva puta na dan kroz mjesec dana, dodatak aloe vera gela je bio učinkovitiji u izazivanju kliničkog odgovora na terapiju, bez izazivanja negativnih nuspojava (Langmead i sur., 2004).

Crni papar (*Piper nigrum* L., Piperaceae) je biljka penjačica jednostavnih listova koja može doseći visinu do 10 metara. Podrijetlom je iz južne i jugoistočne Azije, no plodovi ove biljke, bobice kojima boja ovisi o stupnju zrelosti, spadaju među najčešće korištene začine na svijetu. Crnom papru se pripisuju različita djelovanja antimikrobno, imunomodulatorno, hepatoprotektivno, antioksidativno i antineoplastično (Stojanović-Radić i sur., 2019).

Sastojak kojemu se pripisuju djelovanja papra je piperin (*Slika 2.)*, alkaloid odgovoran za specifičnu aromu papra. Protuupalno djelovanje piperina pripisuje se inhibiciji stvaranja TNF-α, interleukina-6, interleukina-1β, PGE2 i dušikova oksida pod utjecajem lipopolisaharida. Također, piperin se pokazao koristan kao dodatak kurkuminu. Kod štakora, kada je kurkumin, koji se slabo apsorbira, primijenjen zajedno s piperinom, bioraspoloživost kurkumina je povećana za 154 %. U ljudi je zabilježeno još značajnije povećanje bioraspoloživosti kurkumina do 2000 % (Shoba, 1998).

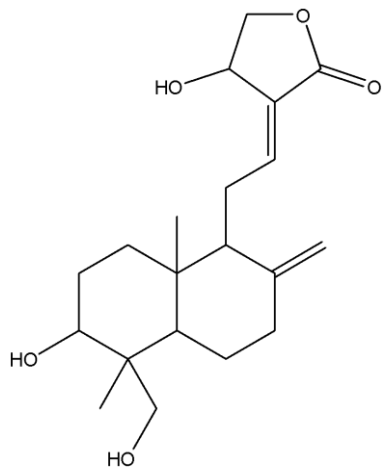


Slika 2. Strukturna formula piperina

Justicija (*Andrographis paniculata* Burm.f. Nees i *Justicia paniculata*, Burm.f., Acanthaceae) je uspravna biljka visine od 30 — 110 centimetara koja potječe iz južne Azije. Plod izgleda kao kapsula duga oko 2 centimetra koja sadrži mnogo smeđih sjemenki. Justicija se široko koristi u narodnoj medicine u više svrha, vjeruje se da ima protuupalno, antimikrobno, citotoksično, antioksidativno, imunostimulativno te antineoplastično djelovanje. Iz biljke je

izolirano 46 spojeva poznatih struktura od kojih je za protuupalno djelovanje korišteno u terapiji upalnih bolesti crijeva najzaslužniji su andrografolid i neoandrografolid, diterpenoidi sličnog djelovanja kao kurkumin (Hossain - Sanower i sur., 2014).

Andrografolid (*Slika 3.*) inhibicijom NF-κB značajno inhibira aktivacija COX-2 enzima te dolazi do značajnog ublaženja upalne reakcije. Primjena oralnih doza od 30, 100 i 300 miligrama po kilogramu je pokazalo protuupalno djelovanje u miševa, dok je primjena andrografolid sulfonata koji je topljiv u vodi u miševa s induciranim ulceroznim kolitisom značajno smanjila dijareju, gubitak tjelesne težine te upalna oštećenja gastrointestinalnog trakta supresijom funkcije proupalnih citokina te djelovanja Th1 i Th17 stanica (Zhai i sur., 2014).



Slika 3. Strukturna formula andrografolida

Indijski tamjanovac (*Boswellia serrata* Roxb., Burseraceae) listopadno je stablo koje može doseći visinu od 9 — 15 metara. Podrijetlom je s prostora zapadne Indije i Pakistana te je u lokalnoj kulturi poznata po svojoj smoli ugodna mirisa. Vodeća komponenta ulja tamjana indijskog tamjanovca je α-tujon, monoterpen koji čini 61,36 % (Verghese i sur., 2016). U ajurvedskim tekstovima iz 1.- 2. stoljeća poslije Krista, nalaze se upute za pripremu kore, odnosno smole iz biljke *Boswellia serrata* kod upalnih crijevnih oboljenja. Međutim, tamjan se u Indiji rabi i pri drugim upalnim oboljenjima kao što su reumatoidni artritis, osteoartritis i cervikalna spondiloza (Kuštrak, 2001). Djelovanje tamjana indijskog tamjanovca se ne pripisuje prethodno spomenutom α-tujonu već bosveličnim kiselinama, i to specifično 11-keto-β-bosveličnoj kiselini te acetil-11-keto-β-bosveličnoj kiselini, triterpenima koji suprimiraju nastajanje leukotriena inhibirajući djelovanje LOX enzima. Međutim, kliničke studije nisu potvrdile ovakvo djelovanje ove droge. Naime, u istraživanju provedenom na 108 pacijenata s Crohnovom bolesti u remisiji kojima su nasumice dane kapsule s indijskim tamjanovcem i

placebom kroz 52 tjedna, nikakva poboljšanja u kliničkoj slici u usporedbi s placebom nisu zabilježena (Holtmeier i sur., 2011).

1.2.2. Zakonska regulativa

Medicinski proizvodi koji kao djelatne tvari sadrže samo tvari biljnog podrijetla ili biljne pripravke u Republici Hrvatskoj mogu biti dostupni na tržištu kao biljni lijek ili kao tradicionalni biljni lijek. Iz Zakona o lijekovima (NN 76/13); Biljni lijek je lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više biljnih tvari ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka. Tradicionalni biljni lijek je biljni lijek čiju je sigurnost primjene i djelotvornost moguće prepoznati na temelju njegove tradicionalne uporabe i koji ispunjava uvjete određene ovim Zakonom. Biljne tvari jesu cijele ili narezane biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi, gljive, u osušenom ili svježem obliku te neobrađene izlučine biljaka; biljne tvari označavaju se korištenim dijelom biljke i botaničkim nazivom biljke u skladu s binomnim sustavom (rod, vrsta, podvrsta i autor). Biljni pripravci jesu pripravci dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (usitnjavanje, ekstrakcija, fermentacija, destilacija, pročišćavanje, koncentriranje, tiještenje) te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka. S obzirom da je Republika Hrvatska članica Europske Unije, definicija i kriteriji za biljni lijek su usklađeni s direktivom 2001/83/EC, dok su definicija i kriteriji za tradicionalni biljni lijek usklađeni s Direktivom 2004/24/EC.

S druge strane, prema Pravilniku o dodacima prehrani (NN 126/13), koji je usklađen s odredbama Direktive 2002/46/EZ Europske komisije, dodacima prehrani smatraju se pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja. Prema tome pravilniku, hranjivim tvarima se smatraju vitamini i minerali, dok se drugim tvarima smatraju: aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, organi i ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom. Na tržište dolaze u obliku kapsula, pastila, tableta, praha, granula te tekućina. Prilikom stavljanja dodataka prehrani na tržište, ne smiju im se propisivati svojstva prevencije, terapije i liječenja bolesti ljudi te se ne smiju navoditi kao dostatna zamjena uravnoteženoj prehrani. Prilikom stavljanja dodataka prehrani na tržište, oni ulaze u monitoring program Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske te se tek tada smiju plasirati na tržište. Za

razliku od biljnih lijekova i tradicionalnih biljnih lijekova, dodaci prehrani spadaju u kategoriju prehrambenih proizvoda te se za njih primjenjuju propisi o prehrambenim propisima što je regulirano Zakonom o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima (NN 39/13), Pravilnikom o uvjetima za uvrštavanje u program monitoringa i provođenje programa monitoringa dodataka prehrani, hrane kojoj su dodani vitamini, minerali i druge tvari i hrane s prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama (NN 83/13), Pravilnikom o dodacima prehrani (NN 126/13) te Pravilnikom o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno (NN 160/13). Zbog ovih razlika u regulacijama pri kontroli kvalitete i stavljanju na tržište, dodaci prehrani podliježu slabijoj kontroli kvalitete od biljnih lijekova te je to često odlučujući korak za proizvođače kada odlučuju kako će plasirati svoj proizvod na tržište.

1.2.3. Dodaci prehrani

Na globalno, a posljedično i hrvatsko tržište svake se godine plasira sve više i više dodataka prehrani. Zbog tog razloga, sve više i više ljudi poseže za dodacima prehrani kao nadopuni ili alternativi farmakološkoj terapiji zbog čega je vrijednost globalnog tržišta dodataka prehrani je 2020. godine iznosila 61,2 milijarde američkih dolara dok je ta vrijednost 2021. godine porasla na 71,81 milijardi američkih dolara. Ovaj rast je izrazito visok u ovome periodu zbog globalne pandemije bolesti COVID-19 tokom koje je iznadprosječno visoki udio populacije posezao za dodacima prehrani zbog straha od infekcije. Međutim, prema procjenama taj rast se ne bi trebao usporiti te bi vrijednost globalnog tržišta mogla doseći vrijednost od 128,64 milijardi američkih dolara do 2028. godine. Dio ovog tržišta čine i dodaci prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva. Pacijenti koji žele ublažiti simptome svoje bolesti posežu za raznovrsnim dodacima prehrani koji su bazirani na prethodno spomenutim biljnim ekstraktima.

Za razliku od biljnih lijekova i tradicionalnih biljnih lijekova, dodaci prehrani se smatraju prehrambenim proizvodima, a ne lijekovima, te prilikom stavljanja na tržište ne podliježu istim standardima kontrole kvalitete kao drugi medicinski proizvodi. Ne samo da im djelotvornost nije dokazana, već podliježu znatno slabijim kontrolama kvalitete u usporedbi s drugim medicinskim proizvodima. Zbog toga, opasnost njihove primjene bez nadzora raste proporcionalno rastu njihove prodaje na globalnom tržištu. Uz to, pacijenti generalno smatraju dodatke prehrani sigurnima. Prema anketi iz 2016. o znanju te stavovima roditelja o dodacima prehrani u kojoj je sudjelovalo 415 ispitanika, većina roditelja se složilo da su dodaci prehrani

sigurni, korisni i učinkoviti, ukazujući na nisku razinu osviještenosti o potencijalnim negativnim posljedicama primjene tih proizvoda (Sertić i sur., 2016).

1.3. Ostatna otapala

1.3.1. Definicija ostatnih otapala

Prema Američkoj farmakopeji (engl. *United States Pharmacopeia*, USP), ostatna otapala se definiraju kao hlapljive organske tvari koje se koriste ili nastaju u proizvodnji ljekovitih ili pomoćnih tvari. S obzirom da sama ne nose terapijsko djelovanje, ostatna otapala ne bi smjela biti prisutna u gotovim medicinskim proizvodima.

1.3.2. Klasifikacija ostatnih otapala

Prema USP-ju ostatna otapala su podijeljena u tri klase temeljeno na njihovom riziku za ljudsko zdravlje. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organisation,* WHO), ovaj rizik je određen na temelju prihvatljivog dnevnog unosa (engl. *Acceptable daily intake*, ADI), no u farmakopejske svrhe koristi se prihvatljiva dnevna izloženost (engl. *Permitted daily exposure,* PDE). Prema Međunarodnoj konferenciji o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), inicijativi regulatornih tijela Europske Unije, Japana i Sjedinjenih Američkih Država kojoj je cilj uskladiti zakonske regulative na području ta tri tržišta, postoji i četvrta kategorija ostatna otapala u koju spadaju otapala o kojima ne postoje adekvatna količina toksikoloških podataka kako bi se mogao odrediti PDE.

Tablica 1. Podjela ostatnih otapala prema toksičnosti za ljude

Klasa 1	Ostatna otapala koja treba izbjegavati; Dokazani karcinogeni; Postoji snažna sumnja na karcinogenost; Tvari opasne za okoliš
Klasa 2	Ostatna otapala koja treba ograničiti; Negenotoksični životinjski karcinogeni ili uzročnici drugih vrsta ireverzibilne toksičnosti, na primjer neurotoksičnost ili teratogenost;
Klasa 3	Ostatna otapala niske toksičnosti i malog rizika za zdravlje ljudi.
Ostala ostatna otapala	Ostatna otapala nepoznate toksičnosti za ljude

1.3.3. Ostatna otapala u dodacima prehrani

Moguće opasnosti primjene dodataka prehrani uključuju interakcije s postojećom terapijom, prisutnost anorganskih i organskih onečišćenja kao što su teški metali i toksini, patvorenje ili slučajna zamjena s drugim biljkama, no ovaj rad fokus stavlja na prisutnost ostatnih otapala kao potencijalnu opasnost pri primjeni dodataka prehrani u liječenju upalnih bolesti crijeva. Na primjer, etanol spada u klasu 3 ostatnih otapala, što znači da se nalazi u skupini ostatnih otapala niske toksičnosti i malog rizika za zdravlje ljudi. Međutim, on predstavlja rizik za pedijatrijsku populaciju, trudnice te pacijente s oštećenom funkcijom jetre. Tako su pri analizi 93 formulacija dodataka prehrani s različitim deklariranim udjelima etanola u čak trećini uzoraka zabilježena odstupanja od deklariranih vrijednosti. Štoviše, visok udio etanola je zabilježen i u nekoliko proizvoda koji su dizajnirani specifično za djecu te plasirani na tržište kao proizvodi ‘’bez alkohola’’ (Mornar, 2016).

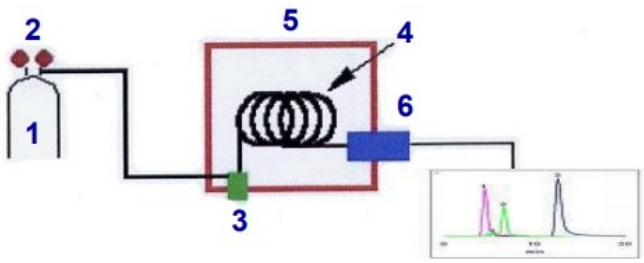
1.4. Plinska kromatografija

1.4.1. Temeljni principi plinske kromatografije

Plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC) je kromatografska separacijska metoda u kojoj plinovita mobilna faza eluira sastavnice uzorka kroz grijanu kolonu presvučenu tekućom stacionarnom fazom ili punjenu čvrstim nosačem impregniranim tekućom

stacionarnom fazom. Putovanjem kroz kolonu sastavnice se odvajaju temeljeno na afinitetu za stacionarnu fazu. Sastavnice visokog afiniteta za stacionarnu fazu dulje ostaju u koloni, dok sastavnice niskog afiniteta za stacionarnu fazu brže eluiraju te dolaze do detektora.

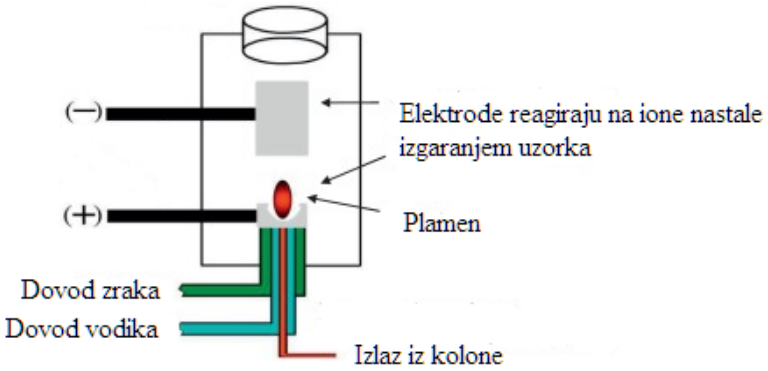
Plinski kromatograf (*Slika 4.*) se sastoji od šest ključnih djelova. Prvi od njih je dovod plina nositelja u sustav (1). Plinovi nositelji moraju biti inertni kako ne bi stupili u reakciju sa sastavnicama te su najčešći plinovi izbora argon, dušik i helij. U svrhu ovog rada korišten je dušik. Sljedeći dio je uređaj za regulaciju tlaka i protoka plinova (2). Svaka kromatografska metoda iznimno ovisi o uvjetima u koloni za vrijeme eluiranja sastavnica te je potrebna stroga kontrola uvjeta tokom cijelog procesa. Treći dio je sustav za uštrcavanje uzorka, to jest injektor (3). Prilikom unošenja uzorka u plinski kromatograf, unosi se svega 0,5 - 2 µl uzorka koji trenutačno isparava. Posebna vrsta injektora je 'split / splitless' injektor koji se koristi kod kapilarnih kolona. U takvom sustavu uzorak se ne unosi direktno u kolonu već se podijeli u dva nejednaka dijela od kojih se veći dio izbaci iz sustava. Ovom metodom uklonjena je ekspanzija otapala u kojem je uzorak otopljen te se dobivaju jasniji kromatogrami. Nakon injektiranja uzorka, on putuje kroz kolonu (4). Kromatografske kolone mogu biti punjene i kapilarne. Punjene kolone su cijevi napravljene od stakla, teflona ili nehrđajućeg čelika punjene čvrstim nosačem velike površine koji je impregniran tankim slojem tekuće stacionarne faze te silaniziran kako bi se smanjila adsorpcija polarnih sastojaka na njega. Kromatogrami dobiveni ovim kolonama u prosjeku imaju slabije razlučivanje te široke pikove, ali prednost leži u tome što pune kolone mogu podnijeti velike volumene i onečišćenja. Kapilarne kolone su cijevi napravljene od izvučenog kvarca duljine 12 – 50 m, a promjera 0,2 – 0,5 mm. Unutrašnja stijenka tih kolona je presvučena tankim slojem stacionarne faze koja se kemijski veže na silanolne grupe stijenke kolone. Kapilarne kolone su djelotvornije te podnose više temperature od onih punjenih. Kolona se nalazi unutar pećnice (5). Temperatura čitavog sustava je izrazito važna u plinskoj kromatografiji te ima izniman utjecaj na odvajanje sastavnica u koloni. Temperatura se može podesiti ovisno o potrebi analize koja se radi, pri čemu kolona može biti postavljena na konstantnu temperaturu ili se može programirati kontinuirano ili postepeno povisivanje temperature tijekom analize uzoraka. Nakon prolaska kroz kolonu, uzorci dolaze do detektora (6). U plinskoj kromatografiji se može koristiti više vrsta detektora: plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame ionization detector*, FID), detektor apsorpcije elektrona (*Electron capture detector*, ECD), detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal conductivity detector*, TCD) te maseni detektor (engl. *Mass spectrometer*, MS) (Nigović, 2020).



Slika 4. Shema plinskog kromatografa (Nigović, 2020)

1.4.2. Plamenoionizacijski detektor

U svrhe ovog rada korišten je plamenoionizacijski detektor (*Slika 5.*). Kada ispitivane supstance izađu iz kolone te dođu u detektor, plin nositelj se miješa s vodikom dok ispitivane sastavnice eluiraju u plamen koji se nalazi u okolišu bogatom kisikom. Sagorijevanjem ovih organskih spojeva u plamenu nastaju nabijeni ionski međuprodukti i elektroni koje detektira elektroda koja se nalazi iznad plamena. Otprilike jedna od svakih 10 000 sagorjenih molekula izaziva signal u detektoru kojemu jačina dobivenog signala direktno ovisi o masi ugljika koja dođe do elektrode na detektoru. Taj signal se koristi za kvantifikaciju i detekciju eluirajućih spojeva. Ova metoda je jednostavna i pouzdana te omogućuje jasno raspoznavanje isključivo ispitivanih organskih spojeva jer ne bilježi signale plinova nositelja niti najčešćih onečišćenja u njima, kao što su voda i kisik. Najveći nedostatak ove metode je to što se ne može spariti s niti jednim drugim detektorom zato što plamen trajno uništi eluirani uzorak te se ne može dalje prenijeti na niti jedan drugi detektor (Hage, 2018).



Slika 5. Shema plamenoionizacijskog detektora (preuzeto i prilagođeno s www.shsu.edu/~chm_tgc/primers/FID.html)

1.4.3. *Headspace sampling* metoda

Uzorkovanje para iznad tekućih ili krutih uzoraka (engl. *Headspace sampling*, HSS) je metoda pripremanja uzoraka koja se koristi pri analizi hlapljivih spojeva dobivenih iz čvrstih ili tekućih uzoraka. U ovoj metodi se u kolonu ne unose sami uzorci već se, nakon što se uzorak drži na određenoj temperaturi do postizanja ravnoteže između plinovite faze te krute ili tekuće faze uzorka, u kolonu injektira samo plinovita faza sadržana iznad samog uzorka. U stanju ravnoteže omjer koncentracija analita u plinovitoj i tekućoj, to jest krutoj, fazi je stalan te se opisuje konstantom koja se naziva koeficijent razdiobe K. K je definiran izrazom [1]:

$$K = \frac{Cs}{CG}, \qquad [1]$$

gdje je C_s koncentracija ispitivane tvari u uzorku nakon uspostavljanja stanja dinamičke ravnoteže, a C_G koncentracija ispitivane tvari u plinovitoj fazi nakon uspostavljanja stanja dinamičke ravnoteže. Koeficijent K se smanjuje povećanjem temperature te promjenama u matriksu primjerice, dodatkom soli u otopinu organskih analita u vodi smanjuje se K. Nakon postizanja stanja dinamičke ravnoteže uzorak se vadi iz ampule za *headspace* GC te unosi u sami kromatograf (Nigović, 2020).

1.4.4. Prednosti i ograničenja plinske kromatografije

Plinska kromatografija je točna i precizna metoda analize veće moći odjeljivanja od tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC). Značajna prednost ove metode je njena automatizacija koja skraćuje posao analitičaru ne zahtijevajući od njega ručno unošenje svakog uzorka. Također, zahvaljujući mogućnosti da se metoda spregne s velikim izborom detektora može se koristiti za određivanje i kvantifikaciju širokog raspona spojeva, uključujući spojeve bez kromofora koji se ne bi mogli detektira UV-VIS spektrofotometrijom. Još jedna prednost je relativno niska cijenu mobilne faze u ovoj metodi. Plinovi nositelji su jeftiniji i šire dostupniji u laboratorijima od skupljih organskih otapala koja se koriste u HPLC-u. Naravno, GC veže i svoja ograničenjaunatoč širokom rasponu spojeva koji se mogu njome analizirati, zbog visokih temperatura tokom postupka analizirati se mogu samo termostabilne i hlapljive tvari koje se ne raspadaju pri tim temperaturama. Uz to, kako bi postali hlapljivi neki analiti zahtijevaju derivatizaciju koja predstavlja dodatni korak u analizi, stvarajući više prostora za moguće pogreške (Nigović, 2020).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Dodaci prehrani koji sadrže različite formulacije kurkume (*Curcuma longa*), *Aloe barbadensis*, crnog papra (*Piper nigrum*), justicije (*Andrographis paniculata*) te indijskog tamjanovca (*Boswellia serrata*) predstavljaju alternativu farmakološkoj terapiji upalnih bolesti crijeva. Ostatna otapala prisutna u višim koncentracijama od dozvoljenih mogu predstavljati opasnost za ljudsko zdravlje. Ovaj rad je izrađen s ciljem određivanja sigurnosti ljudske primjene dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva s obzirom na prisutnost ostatnih otapala. 44 dodataka prehrani s hrvatskog tržišta pripremljeno je te analizirano HSS-GC-FID-om koristeći metodu definiranu prema članku <467> Američke farmakopeje. Kromatogrami ovih uzoraka uspoređeni su s kromatogramima standardnih otopina ostatnih otapala klase 2, koja je dalje podijeljena u klasu 2A i klasu 2B, i ostatnih otapala klase 3 te je na temelju dobivenih podataka provedena procjena sigurnosti njihove primjene.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Dimetilformamid, 99,9 % čistoće (VWR Chemicals, Radnor, PA, Sjedinjene Američke Države
- Standardna otopina ostatnih otapala klase 2A prema USP-ju (Restek, Bellefonte, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Standardna otopina ostatnih otapala klase 2B prema USP-ju (Restek, Bellefonte, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Standardna otopina ostatnih otapala klase 3 prema USP-ju, (Restek, Bellefonte, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Ukapljeni vodik, 99,999 % čistoće, Messer Croatia Plin d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Ultračista voda (<0.1 µS/cm) pročišćena sa "Series Ultra Clear and Integra Ultra-pure water system" (SG Water, Barsbuttel, Njemačka)

3.1.2. Uzorci

U svrhe ovog rada analizirano je 44 uzoraka s hrvatskog tržišta. Popis analiziranih uzoraka nalazi se u *Tablici P1.* u dijelu *8. Prilozi*.

3.1.3. Pribor

- Automatske pipete (0,5 µl-10 mL), (Ranin instrument LLC, Oakland, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Vijale za uzorkovanje *headspace* tehnikom s aluminijskim čepom, 20 mL (Agilent technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Kolona za plinsku kromatografiju, DB-624, dimenzija 30 m x 0,53 mm, debljina filma 3 µm, (Agilent technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Otvarač vijala s aluminijskim čepom (Agilent technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Zatvarač vijala s aluminijskim čepom (Agilent technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)

3.1.4. Radni instrumenti

- Analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo, Columbus, OH, Sjedinjene Američke Države)
- Generator dušika, model NG250A (PEAK Scientific, Renfrewshire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Kompresor zraka, model ZAO35A (PEAK Scientific, Renfrewshire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Plinski kromatograf, model 6850 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Sustav za pročišćavanje vode WaterPro, (Labconco, Kansas City, MI, Sjedinjene Američke Države)
- Ultrazvučna kupelj, model Elmasonic XtraTT (Biosan, Riga, Latvija)
- Uređaj za head space uzorkovanje, model G1888 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)

3.1.5. Programski alati

- GC Chemstation, Rev. A. 10 02 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, Seattle, WA, Sjedinjene Američke Države)

3.2. USP metoda

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Za potrebe ovog istraživanja nabavljene su standardne otopine ostatnih otapala, odnosno standardna otopina klase 2A prema USP-ju, standardna otopina ostatnih otapala klase 2B prema USP-ju te standardna otopina ostatnih otapala klase 3 prema USP-ju. Sastav standardne otopine naveden je u *Tablici 2.*

Tablica 2. Sastav u standardnim otopinama klase 2A, klase 2B te klase 3

Klasa	Tvar	Deklarirana koncentracija / µg/mL
2A	metanol	15,0
	acetonitril	2,1
	metilen-klorid (diklorometan)	3,0
	trans-1,2-dikloreten	4,7
	cis-1,2-dikloreten	4,7
	tetrahidrofuran	3,5
	cikloheksan	19,41
	metilcikloheksan	5,9
	1,4-dioksan	1,9
	toluen	4,5
	klorbenzen	1,8
	etilbenzen	1,9
	m-ksilen	6,5
	p-ksilen	1,5
	o-ksilen	1,0
2B	heksan	1457,0
	nitrometan	252,4
	kloroform	301,2
	1,2-dimetoksietan	504,4
	trikloretan	401,2
	piridin	1002,0
	2-heksanon	251,0
	tetralin	504,0
3	*n*-pentan	5039,2
	etanol	5014,8
	dietil-eter	5039,2
	aceton	5046,0
	2-propanol (isopropanol)	5048,0
	etil-format (etil-metanoat)	5041,6
	metil-acetat	5029,6
	metil-*tert*-butil eter	5031,2
	1-propanol	5045,6
	2-butanon	5044,8
	etil-acetate	5018,4
	2-butanol	5049,2
	izopropil-acetat	5047,6
	izobutanol	5048,0
	n-heptan	*5028,8*
	1-butanol	5034,4
	propil-acetat	5038,0
	4-metil-2-pentanon	5031,6
	3-metil-1-butanol	5038,4
	izobutil-acetat	5040,4
	1-pentanol	5049,6
	butil-acetat	5034,4
	dimetil-sulfoksid	5036,0
	anisol	5029,2

3.2.2. Priprema radnih otopina

Radne otopine korištene kao poredbene otopine u kromatografiji su pripravljene iz standardnih otopina prema sljedećem postupku: 1,0 mL standardne otopine prenesen je u volumetrijsku tikvicu od 100 mL te je nadopunjena dimetilformamidom (DMF-om) do oznake. 1,0 mL tako dobivene radne otopine prenesen je u vijalu za uzorkovanje *headspace* tehnikom, dodano je 5,0 mL vode te je vijala zatvorena. Uzorak je analiziran HSS-GC-FID metodom kako bi se dobili kromatogrami radnih otopina.

3.2.3. Priprema uzoraka

Pri pripremi uzoraka za analizu, izvagano je 500 ± 5 mg ispitivanog uzorka, preneseno u volumetrijsku tikvicu od 10 mL te nadopunjeno DMF-om do oznake. Tako napunjene volumetrijske tikvice prenesene su u ultrazvučnu kupelj te ostavljene u njoj 10 minuta kako bi se pospješila ekstrakcija. 1,0 mL tako pripremljene otopine uzorka prenesen je u vijalu za uzorkovanje *headspace* tehnikom, dodano je 5,0 mL vode te je vijala zatvorena. Uzorak je analiziran HSS-GC-FID metodom kako bi se dobili kromatogrami pripremljenih uzoraka.

3.2.4. Parametri HSS-GC-FID metode

Nakon pripreme uzoraka po prethodno opisanome postupku definiranom USP-jem, uzorci se prenose u instrument za HSS-GC-FID analizu. U *Tablici 3.* navedeni su uvjeti *headspace samplinga*.

Tablica 3. Uvjeti *headspace samplinga*

Temperatura uravnoteženja / °C	105
Vrijeme uravnoteženja / min	45
Temperatura transfer linije / °C	110
Temperatura injektora / °C	105-115
Vrijeme uspostavljanja tlaka / s	≥ 60
Injektirani volumen / mL	1
Plin nosač	dušik

Nakon postignutih uvjeta za HSS, uzorak se prenosi u plinski kromatograf. Plinska kromatografija provedena je na uređaju Agilent 6850, koji za razdvajanje analita koristi kolonu dimenzija 30 m x 0,53 mm uz debljinu filma od 5 μm. Temperatura injektora je podešena na 140°C, a omjer odvajanja iznosi 1:5. Kao plin nosač korišten je dušik brzine toka od 35 cm/s. Temperaturne postavke analize korištene s ciljem uspješnog razdvajanja analita navedene su u *Tablici 4*.

Tablica 4. Temperaturne postavke plinske kromatografije

Početna temperatura / °C	**Promjena temperature (°C / min)**	**Završna temperatura / °C**	**Držanje temperature / min**
40	0	40	20
40	10	240	20
240	0	240	20

Za detekciju ispitivanih analita je korišten plamenoionizacijski detektor pri temperaturi od 250°C.

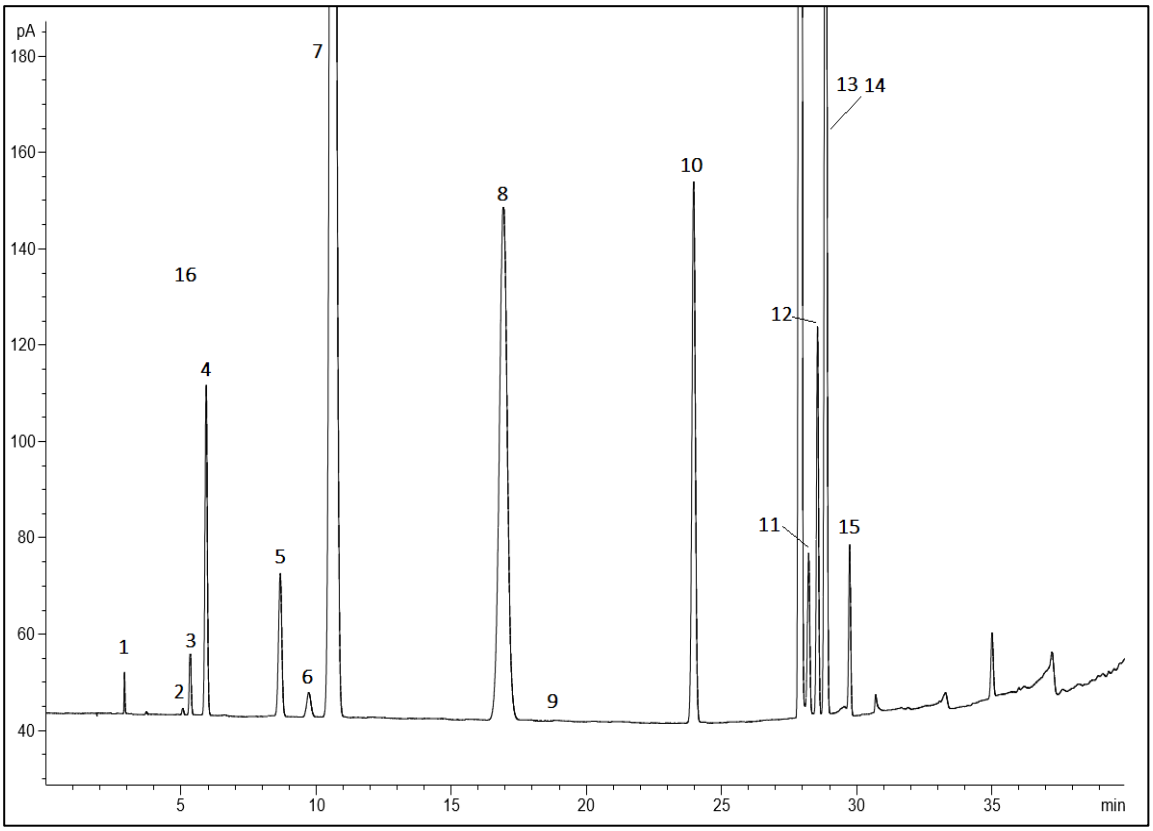
3.2.5. Analiza i obrada podataka

Dobiveni kromatogrami obrađeni su u programu GC Chemstation, dok su rezultati i podaci uneseni i obrađeni u tablicama izrađenim u Microsoft Excelu 2016.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Određivanje prisutnosti ostatnih otapala u uzorcima 44 dodataka prehrani s globalnog tržišta provedeno je HSS-GC-FID metodom opisanoj u članku <467> USP-ja. Kako bi se mogao odrediti sadržaj ostatnih otapala u ispitivanim uzorcima, potrebno je bilo pripremiti otopine i razviti kromatograme standardnih otopina ostatnih otapala klase 2A, 2B i 3. Standardne otopine su pripremljene prethodno opisanim postupkom te je provedena kromatografska analiza.

Na *Slici 6.* prikazan je kromatogram radne otopine ostatnih otapala klase 2A, dok su vremena zadržavanja te površine ispod krivulja (engl. *area under curve*, AUC) pojedinih analita navedena u *Tablici 5*.

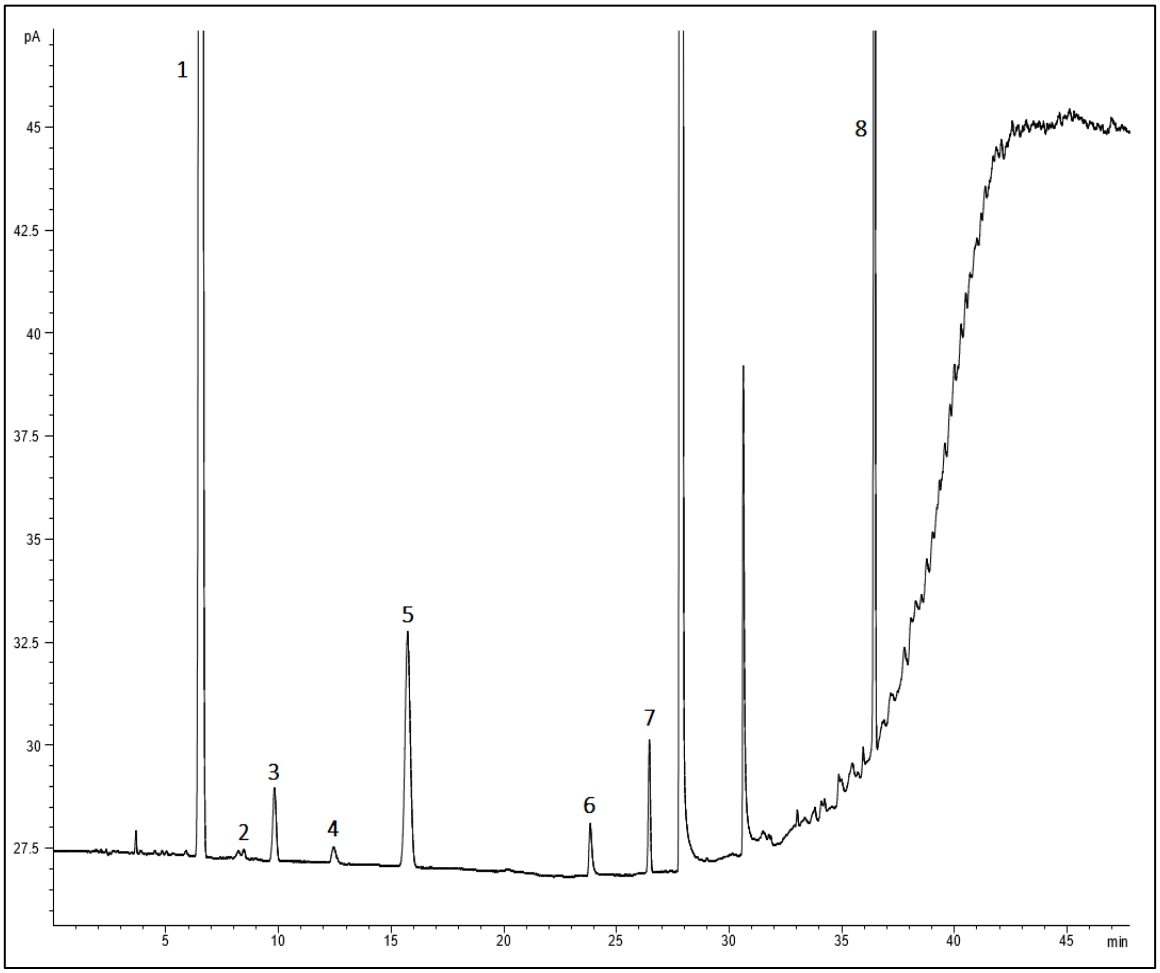


Slika 6. Kromatogram radne otopine ostatnih otapala klase 2A pripremljene prema USP-ju.

Tablica 5. Vremena zadržavanja i površina ispod krivulje ostatnih otapala klase 2A prema USP-ju

	Analit	**Vrijeme zadržavanja (t_R) / min**	**Površina ispod krivulje**
1	metanol	2,89	19,58
2	acetonitril	5,06	6,71
3	metilen-klorid (diklorometan)	5,36	73,26
4	trans-1,2-dikloreten	5,95	398,13
5	cis-1,2-dikloreten	8,67	265,43
6	tetrahidrofuran	9,72	53,82
7	cikloheksan	10,63	7161,08
8	metilcikloheksan	16,92	2275,34
9	1,4-dioksan	18,81	3,38
10	toluen	23,99	1003,53
11	klorbenzen	28,22	202,04
12	etilbenzen	28,55	446,10
13	m-ksilen	28,84	1837,40
14	p-ksilen		
15	o-ksilen	29,74	179,80

Na *Slici 7.* prikazan je kromatogram radne otopine ostatnih otapala klase 2B, dok su vremena zadržavanja pojedinih analita te površine ispod krivulje navedeni u *Tablici 6.*

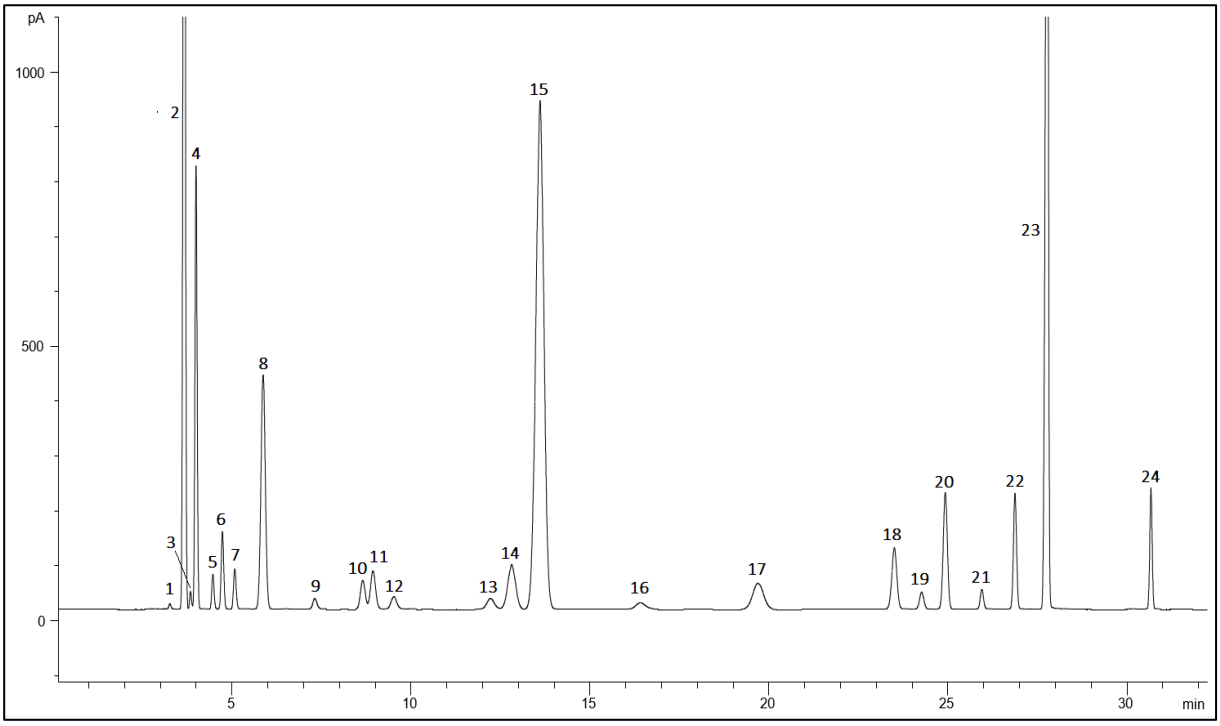


Slika 7. Kromatogram standardne otopine ostatnih otapala klase 2B pripremljene prema USP-ju

Tablica 6. Vremena zadržavanja i površina ispod krivulje ostatnih otapala klase 2B prema USP-ju

	Analit	Vrijeme zadržavanja (t_R) / min	Površina ispod krivulje
1	heksan	6,59	1466,82
2	nitrometan	8,51	1,85
3	kloroform	9,84	19,10
4	1,2-dimetoksietan	12,47	4,94
5	trikloretan	15,76	94,95
6	piridin	23,85	11,88
7	2-heksanon	26,49	20,71
8	tetralin	36,48	192,80

Na *Slici 8.* prikazan je kromatogram radne otopine ostatnih otapala klase 3, dok su vremena zadržavanja pojedinih analita navedena u *Tablici 7.*



Slika 8. Kromatogram radne otopine ostatnih otapala klase 3 pripremljene prema USP-ju

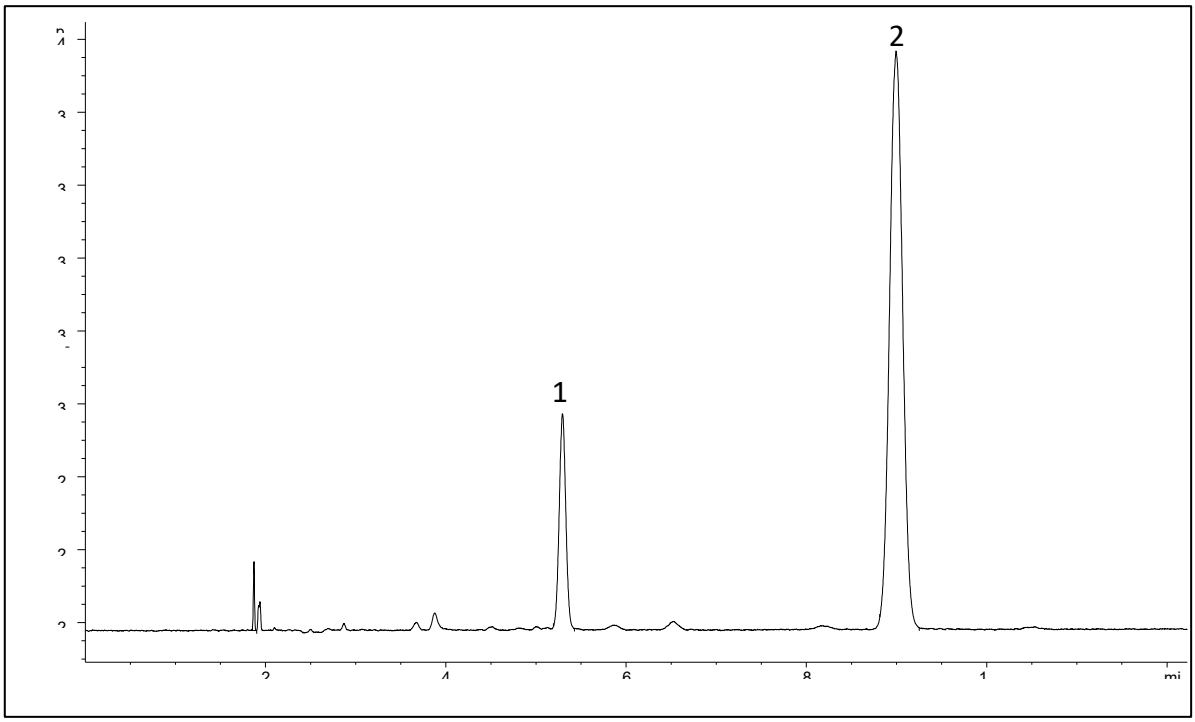
Tablica 7. Vremena zadržavanja i površina ispod krivulje ostatnih otapala klase 3 prema USP-ju

	Analit	Vrijeme zadržavanja (t_R) / min	Površina ispod krivulje
1	*n*-pentan	3,26	42,43
2	etanol	3,63	11313,40
3	dietil-eter	3,83	93,01
4	aceton	3,99	3425,54
5	2-propanol (isopropanol)	4,47	288,86
6	etil-format (etil-metanoat)	4,74	720,03
7	metil-acetat	5,09	383,93
8	metil-*tert*-butil eter	5,87	3655,04
9	1-propanol	7,31	158,13
10	2-butanon	8,66	386,36
11	etil-acetate	8,94	571,73
12	2-butanol	9,53	246,49
13	izopropil-acetat	12,22	266,83
14	izobutanol	12,82	1204,04
15	*n*-heptan	13,60	14751,24
16	1-butanol	16,41	198,80
17	propil-acetat	19,68	1013,60
18	4-metil-2-pentanon	23,49	1109,06
19	3-metil-1-butanol	24,28	258,89
20	izobutil-acetat	24,93	1711,46
21	1-pentanol	25,95	226,37
22	butil-acetat	26,87	1316,94
23	dimetil-sulfoksid	27,78	11469,46
24	anisol	30,67	1031,65

Na kromatogramima standardnih otopina dobiveni su jasno razdvojeni pikovi (rezolucija veća od 1,5) te su određena pripadajuća vremena zadržavanja svakog pojedinog analita. Bazirano na dobivenim vremenima zadržavanja pri uvjetima analize radnih otopina i njihovom usporedbom s kromatogramima pripremljenih uzoraka analiziranih pri istim

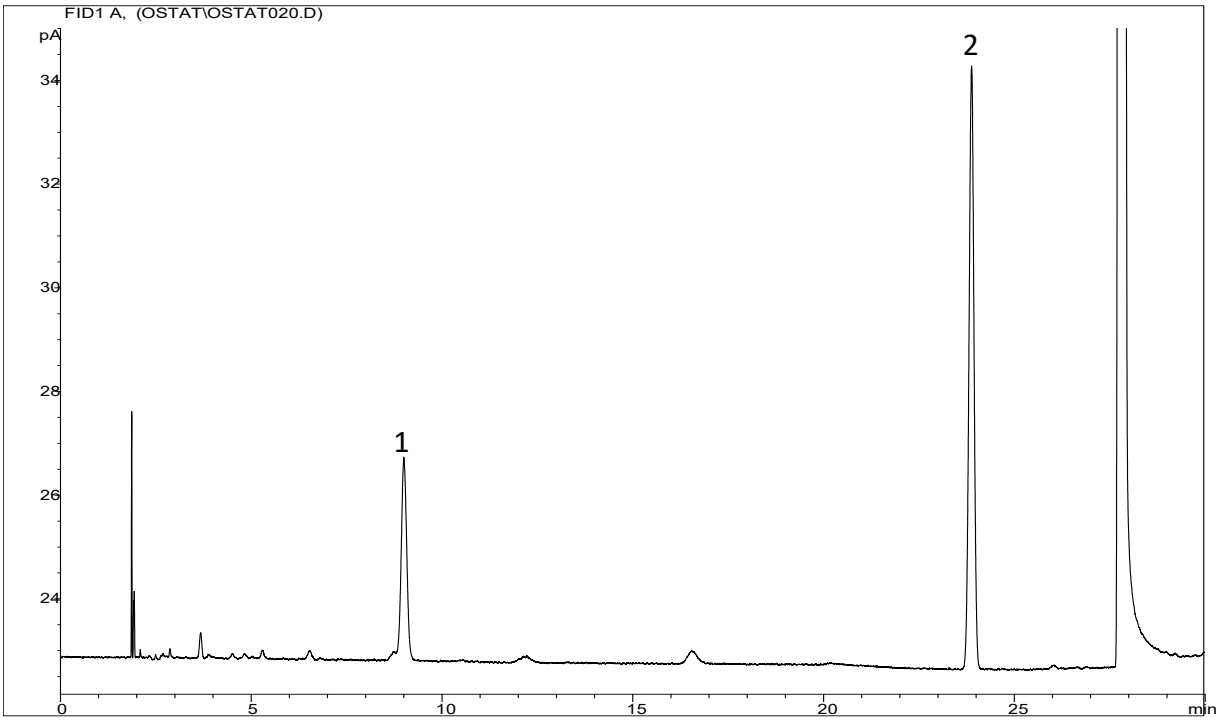
uvjetima, u uzorcima biljnih dodataka prehrani ispitan je sadržaj ostatnih otapala u svih 44 uzoraka.

Na kromatogramu uzorka 3 (*Slika 9.*) vidljiva su dva pika - jedan pripada etil-acetatu (t_R *=8,99; AUC = 157,13*), ostatnom otapalu klase 3, te se radi ove izrazito visoke koncentracije ovog analita ovaj uzorak istaknuo. Drugi pik pripada metilen-kloridu (t_R *= 5,32; AUC = 28,95)*, ostatnom otapalu klase 2. Usporedbom s pikovima etil-acetata (t_R *= 8,943; AUC = 571,70*) i metilen-klorida (t_R *= 5,356; AUC = 73,26*) dobivenih u kromatogramu radne otopine utvrđeno je da su koncentracije oba pronađena ostatna otapala unutar prihvatljivih granica te je uzorak prihvatljiv za ljudsku upotrebu.



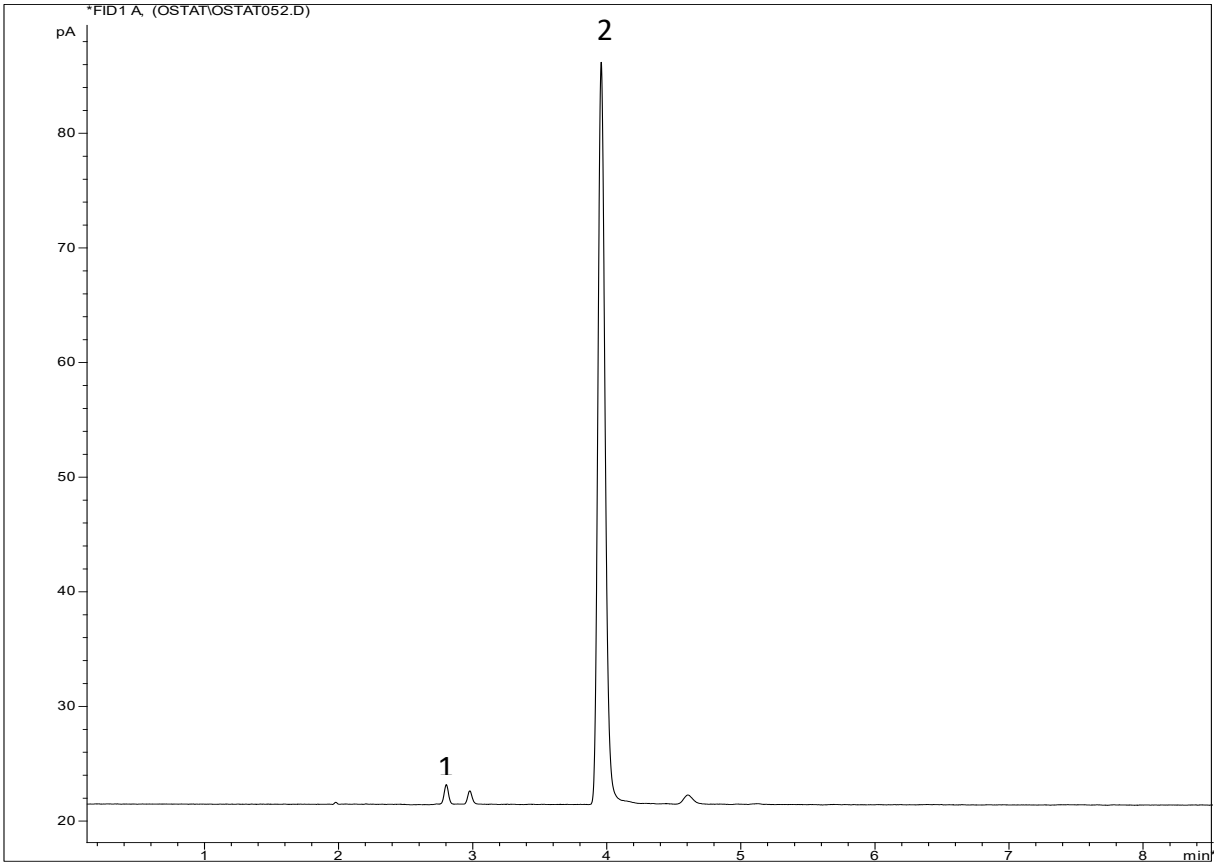
Slika 9. Kromatogram uzorka 3 (1 - metilen klorid, 2 - etil-acetat)

Na kromatogramu uzorka 13 (*Slika 10.*) vidljiva su dva pika - jedan pripada etil-acetatu (t_R = *8,99; AUC = 32,70*), ostatnom otapalu klase 3 dok drugi pripada toluenu (t_R = *23,88; AUC = 103,44*), ostatnom otapalu klase 2 te je ovo jedini uzorak u kojem je taj analit identificiran. Usporedbom s pikovima etil-acetata (t_R = *8,943; AUC = 571,7*) i toluena (t_R = *23,96; AUC = 1003,5*) dobivenih u kromatogramu radne otopine utvrđeno je da su koncentracije oba pronađena ostatna otapala unutar prihvatljivih granica te je uzorak prihvatljiv za ljudsku upotrebu.



Slika 10. Kromatogram uzorka 13 (1 - etil acetat, 2 - toluen)

Na kromatogramu uzorka 42 (*Slika 11.*) vidljiva su dva pika - jedan pripada acetonu (t_R = *3,986; AUC = 238,06*), ostatnom otapalu klase 3 te je ovo jedini uzorak koji sadrži aceton. Drugi pik pripada metanolu (t_R = *2,83; AUC = 3,75)*, ostatnom otapalu klase 2 koje je izrazito štetno za ljude. Usporedbom s pikovima acetona (t_R = *3,990; AUC = 3425,5*) i metanola (t_R = *2,899; AUC = 19,58*) dobivenih u kromatogramu radne otopine utvrđeno je da su koncentracije oba pronađena ostatna otapala unutar prihvatljivih granica te je uzorak prihvatljiv za ljudsku upotrebu.



Slika 11. Kromatogram uzorka 42 (1 - metanol, 2 - aceton)

Od 44 analiziranih uzoraka, 21 (47,72 %) njih je sadržavalo tragove ostatnih otapala. Najčešće detektirani analit je bio etil-acetat, ostatno otapalo često korišteno kao ekstrakcijsko sredstvo u proizvodnji farmaceutskih proizvoda te je detektiran u 13 (29,55 %) ispitivanih uzoraka. Ostala detektirana ostatna otapala uključuju ostatna otapala klase 2 i ostatna otapala klase 3. Ostatna otapala klase 2 pronađena u ispitivanim uzorcima uključuju metilenklorid koji je pronađena u jednom uzorku, metanol koji je pronađen u jednom uzorku te heksan koji je pronađen u četiri uzoraka. Ostatna otapala klase 3 pronađena u ispitivanim uzorcima uključuju, uz prethodno spomenuti etil-acetat, još i etanol te etil-format koji su pronađeni u dva uzorka, aceton pronađen u jednom uzorku, cikloheksan pronađen u jednom uzorku, dietieter pronađen u jednom uzorku te toluen pronađen u jednom uzorku. Unatoč visokom postotku uzoraka koji sadrže tragove ostatnih otapala (47,72 %), niti jedan nije prekoračio limite prihvatljivih koncentracija te je svih 44 uzoraka prihvatljivo za ljudsku uporabu. Uzorci su prihvatljivi za ljudsku uporabu zato što površina ispod krivulje identificiranih ostatnih otapala u kromatogramima uzoraka nije prekoračila površinu ispod krivulje tih istih ostatnih otapala u radnim otopinama, kao što je prikazano u *Tablici 8*.

Tablica 8. Površine ispod krivulje detektiranih ostatnih otapala te površine analita koje predstavljaju njihov limit

Uzorak	Pronađeno ostatno otapalo	Površina ispod krivulje	Limit (izražen kao površina)
3	etil-acetat	157,13	571,7
	metilen-klorid	28,95	73,26
4	etil-acetat	130,99	571,7
5	etil-acetat	131,14	571,7
6	etil-acetat	43,80	571,7
7	etil-acetat	99,50	571,7
8	etil-acetat	102,29	571,7
10	etil-acetat	179,91	571,7
13	etil-acetat	32,70	571,7
	toluen	103,44	1003,5
14	etil-acetat	5,91	571,7
	etil-format	20,44	720,0
16	etil-acetat	103,22	571,7
	heksan	13,85	1466,8
18	heksan	7,53	1466,8
23	heksan	8,59	1466,8
25	etil-format	2,03	720,0
	heksan	3,30	1466,8
27	2-propanol	3,25	288,8
29	dietil-eter	6,09	93,0
34	etil-acetat	2,23	571,7
35	dietil-eter	1,37	93,0
	etil-acetat	17,47	571,7
36	etil-acetat	6,85	571,7
38	etil-acetat	5,51	571,7
39	etanol	1,67	11313,4
42	aceton	238,06	3425,5
	metanol	3,75	19,58

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je provesti kontrolu te uspješno izvršiti analizu sadržaja ostatnih otapala u dodacima prehrani korištenih za terapiju upalnih bolesti crijeva.

U okviru ovog rada analizirana su 44 uzoraka dodataka prehrani dostupnih na hrvatskome tržištu s ciljem utvrđivanja sadržaja ostatnih otapala te određivanje zdravstvene sigurnosti uporabe tih pripravaka u ljudi. U svrhu utvrđivanja onečišćenja uzoraka ostatnim otapalima korištena je HSS-GC-MS metoda - plinska kromatografija s *headspace sampling* metodom unošenja uzoraka te plamenoionizirajućim detektorom za identifikaciju analita.

Metoda analize je provedena prema uvjetima opisanima u članku <467> USP-ja. Prvo su razvijeni kromatogrami standardnih otopina koje sadrže ostatna otapala klase 2 (podijeljene u klasu 2A i 2B) te klase 3 u koncentracijama na koje je metoda osjetljiva. Iz ovih kromatograma dobivena su vremena zadržavanja ostatnih otapala tih dvaju klasa te su kromatogrami uzoraka dodataka prehrani uspoređeni s njima kako bi se odredilo prisustvo ostatnih otapala u odabranim proizvodima plasiranim na tržište Republike Hrvatske

Od 44 analiziranih uzoraka, 21 njih, to jest 47,72 %, je sadržavalo tragove ostatnih otapala. Najčešće pronađeno ostatno otapalo je bio etil-acetat, dok druga otapala identificirana uključuju aceton, cikloheksan, dietileter, etanol, etil-format, metanol, metilen-klorid, heksan te toluen.

Niti jedno od detektiranih ostatnih otapala nije prekoračilo granične vrijednosti koncentracija ostatnih otapala te ne predstavlja ozbiljnu opasnost za ljudsko zdravlje, no veliki broj uzoraka u kojima su pronađena ostatna otapala ukazuje na važnost pravilne kontrole tržišta i analize ne samo farmaceutskih proizvoda registriranih kao lijekovi, biljni lijekovi ili tradicionalni biljni lijekovi, već i dodataka prehrani koji ne podliježu strogim kontrolama kvalitete zbog svog zakonskog statusa.

6. LITERATURA

<467> Residual Solvents, https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/gc-467-residual-solvents-ira-20190927.pdf , pristupljeno 14.3.2022.

Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2022, www.halmed.hr, pristupljeno 15.3.2022.

Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Safiri S, Sadeghi A, Nixon MR, Abdoli A, Abolhassani H, Alipour V. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol,* 2020, 5, 17-30.

Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta med*, 1991, 57, 1-7.

Bach-Rojecky L. Predavanja iz kolegija Farmakologija. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2020./2021.

Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology*, 2001, 120, 1093-1099.

Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. 2001, Strasbourg, Official Journal of the European Union, broj 311/67 (L311/67).

Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending, as regards traditional herbal medicinal products, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. 2004, Strasbourg, Official Journal of the European Union, broj 136/36 (L136/36).

Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004, 2, 731-743.

Dumić J. Predavanja iz kolegija Imunologija. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2020./2021.

Hage, DS. Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry. Amsterdam, Elsevier, 2018, str. 1 – 32.

Holtmeier W, Zeuzem S, Preiβ J, Kruis W, Böhm S, Maaser C, Caspary W. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of Boswellia serrata in maintaining remission of Crohn's disease: good safety profile but lack of efficacy. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17, 573-582.

Hossain, MD, Urbi Z, Sule A, Rahman KM. Andrographis paniculata (Burm. f.) Wall. ex Nees: a review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. *Sci World J*, 2014, 2014, 28.

Kuštrak, D. Tamjan-Olibanum Boswellia sacra. *Farm Glas*, 2003, 59, 235-247.

Langmead L, Feakins RM, Goldthorpe S, Holt H, Tsironi E, De Silva A, Jewell DP, Rampton DS. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral aloe vera gel for active ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacol Ther*, 2004, 19, 739-747.

Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, Brown JP, Cohen A, Kim H. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2013, 9, 1-25.

Mornar A, Sertić M, Amidžić Klarić D, Klarić I, Stipanović K, Nigović B. Evaluation of alcohol content and metal impurities in liquid dietary suplements by sHSS-GC-FID and GFAAS techniques. *Food Chem*, 2016, 211, 285-93.

Nigović B. Predavanja iz kolegija Analitika lijekova. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2020./2021.

Ordás I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 91, 635-646.

Pravilnik o dodacima prehrani, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 126/13 (NN/126/13).

Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno, 2013., Zagreb, Narodne novine, broj 160/13 (NN/160/13).

Pravilnik o uvjetima za uvrštavanje u program monitoringa i provođenje programa monitoringa dodataka prehrani, hrane kojoj su dodani vitamini, minerali i druge tvari i hrane s prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 83/13 (NN/83/13).

Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol,* 2006, 3, 390-407.

Schneiter P, Tappy L. Kinetics of dexamethasone-induced alterations of glucose metabolism in healthy humans. *Am J Physiol*, 1998, 275, 806-813.

Sertić M, Mornar A, Salapić A, Šepetavc M, Juričić Ž. Znanje, stavovi i mišljenja roditelja o dodacima prehrani: važnost savjetodavne uloge ljekarnika. *Farm Glas*, 2016, 72, 69-83.

Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PSSR. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*, 1998, 64, 353-356.

Stellato C. Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc*, 2004, 1, 255-263.

Stojanović-Radić Z, Pejčić M, Dimitrijević M, Aleksić A, V Anil Kumar N, Salehi B, Cho CW, Sharifi-Rad J. Piperine-A Major Principle of Black Pepper: A review of its bioactivity and studies. *Appl Sci*, 2019, 9, 4270.

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

Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*, 2011, 2, 236.

Verghese J, Joy MT, Retamar JA, Malinskas GG, Catalan CAN and Gros EG. A fresh look at the constituents of Indian olibanum oil. *Flavour Fragr J*, 1987, 2, 99-102.

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

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*, 1998, 102, 274-282.

White KP, Driscoll MS, Rothe MJ, Grant-Kels JM. Severe adverse cardiovascular effects of pulse steroid therapy: is continuous cardiac monitoring necessary? *J Am Acad Dermatol*, 1994, 30, 768-773.

Zakon o medicinskim proizvodima, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 76/13 (NN/76/13).

Zakon o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima, 2019, Zagreb, Narodne novine, broj 39/13 (NN/39/13).

Zhai ZJ, Li HW, Liu GW, Qu XH, Tian B, Yan W, Lin Z, Tang TT, Qin A., Dai KR. Andrographolide suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo. *Br J Pharmacol*, 2014, 171, 663-675.

Zhao M, Gönczi L, Lakatos PL, Burisch J. The burden of inflammatory bowel disease in Europe in 2020. *J Crohn Colitis,* 2021, 15, 1573-1587.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Upalne bolesti crijeva su kronične upalne bolesti gastrointestinalnog trakta karakterizirane rekurentnim upalama segmenata probavnog trakta koje se manifestiraju kao nadutost, abdominalna bol, grčevi, krvarenje te kronični proljev. U ovu skupinu bolesti spadaju dva podtipa, a to su Cronhova bolest i ulcerozni kolitis. Unatoč sigurnim i efektivnim farmakološkim metodama liječenja, koje uključuju aminosalicilate, kortikosteroide, imunosupresive te biološku terapiju, mnogi pacijenti koji pate od ovih složenih bolesti posežu za rješenjima svojih tegoba u drugim područjima. Tako ih sve više efektivne odgovore na svoje probleme traži u dodacima prehrani. Neki od njih mogu predstavljati javnozdravstvenu opasnost zbog prisutnosti neprijavljenih ostatnih otapala u svojem sastavu. Ostatna otapala su hlapljivi organski spojevi koji se koriste ili nastaju u proizvodnji medicinskih proizvoda. Klasificiraju se od klase 1 do klase 3 ovisno o opasnosti koje predstavljaju za ljudsko zdravlje. Kako bi se odredila prisutnost ostatnih otapala u dodacima prehrani namijenjenim za liječenje upalnih bolesti crijeva korištena je analitička metoda definirana člankom <467> Američke farmakopeje. 44 uzoraka s hrvatskog tržišta je pripremljeno i analizirano koristeći HSS-GC-FID za identifikaciju analita te onda uspoređeno s kromatogramima analiziranih standardnih otopina koji sadrže ostatna otapala klase 2 i klase 3. Analizom je određena prisutnost ostatnih otapala u 21 od 44 ispitanih uzoraka no u svim tim uzorcima koncentracije detektiranih ostatnih otapala bile su unutar prihvatljivih granica za ljudsku upotrebu.

Inflammatory bowel diseases are chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract characterised by recurring inflammations of particular segments of the gastrointestinal tract, the clinical manifestation of which include bloatedness, abdominal pains, cramps, bleeping and chronic diarrhoea. Two diseases belong to this group: Crohn's disease and ulcerative colitis. Despite safe and effective pharmacological treatment options, which include aminosalicylates, corticosteroids, immunosuppressives and biological therapy, many patients suffering from these complex diseases are seeking solutions to their medical issues in food supplements. Some of these food supplements may pose public health risks due to the presence of residual solvents in them not being properly reported. Residual solvents are volatile organic chemical substances that may have been used or produced in the preparation of a medicinal product. They are classified from Class 1 to Class 3 based on their potential dangers to human health. In order to determine the presence of residual solvents in food supplements used for the treatment of inflammatory bowel disease, method <467> defined by the United States Pharmacopeia was used. Multiple samples from the Croatian market were prepared and analysed using HSS-GC-FID and then compared with chromatograms of analysed standards containing Class 2 and Class 3 residual solvents. Using this method, the presence of residual solvents was determined in 21 out of 44 analysed samples, with all of the detected residual solvents being within acceptable limits, making them safe for human use.

8. PRILOZI

Tablica P1. Popis uzoraka

Oznaka	Način prikupljanja	Zemlja porijekla	Oblik	Sadržaj (prema deklaraciji)
1	internetska trgovina	Indija	tvrde kapsule	kurkuma, indijski tamjanovac plod crnog papra
2	ljekarna	Hrvatska	tvrde kapsule	ekstrakt kurkume, ekstrakt crnog papra
3	ljekarna	Hrvatska	meke kapsule	ekstrakt kurkume, ekstrakt crnog papra, vitamin D
4	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	tvrde kapsule	smjesa suhog ekstrakta kurkume i ulja korijena kurkume
5	ljekarna	Hrvatska	tvrde kapsule	smjesa suhog ekstrakta kurkume i ulja korijena kurkume, ekstrakt indijskog tamjanovca
6	internetska trgovina	Tajland	tablete	ekstrakt kurkume, ekstrakt crnog papra
7	ljekarna	Belgija	meke kapsule	bio-optimizirani ekstrakt kurkume
8	ljekarna	Italija	tvrde kapsule	ekstrakt kurkume
9	ljekarna	Austrija	tvrde kapsule	ekstrakt kurkume, ekstrakt ploda crnog papra
10	ljekarna	Sjedinjene Američke Države	meke kapsule	ekstrakt kurkume
11	ljekarna	Hrvatska	tvrde kapsule	suhi ekstrakt podanka kurkume, suhi ekstrakt ploda crnog papra, vitamin B_6, vitamin B_{12}, vitamin D_3, selen

12	ljekarna	Hrvatska	tvrde kapsule	suhi ekstrakt podanka kurkume, vitamin C, suhi ekstrakt smole indijskog tamjanovca, hijaluronska kiselina, mangan, suhi ekstrakt crnog papra, vitamin D_3
13	internetska trgovina	nije navedeno	tvrde kapsule	ekstrakt korijena kurkume, BioPerine ekstrakt crnog papra
14	internetska trgovina	Indija	rinfuza	kurkumin, ekstrakt indijskog tamjnanovca, ekstrakt crnog papra
15	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	tinktura	"eko" kurkuma
16	internetska trgovina	Bugarska	tinktura	kurkuma
17	ljekarna	Hrvatska	meke kapsule	kurkumin, vitamin D_3
18	trgovina zdravom hranom	Sjedinjene Američke Države	tablete	ekstrakt korijena kurkume, vitamin B, vitamin C, vitamin E, željezo, ekstrakt brokule, ekstrakt čajevca
19	trgovina zdravom hranom	Ujedinjeno Kraljevstvo	tablete	ekstrakt kurkume
20	internetska trgovina	Sjedinjene Američke Države	tablete	ekstrakt smole indijskog tamjanovca, ekstrakt korijena kurkume, glukozamin, hondroitin, metilsulfonilmetan, fenilalanin, bromelain, kalcij, cink, mangan, bor
21	internetska trgovina	Indija	Rinfuza	standardiziran na min. 95 % piperina
22	internetska trgovina	Indija	rinfuza	minimalno 60 % bosveličnih kiselina

23	internetska trgovina	Indija	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca
24	internetska trgovina	Indija	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca
25	internetska trgovina	Ujedinjeno Kraljevstvo	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca
26	internetska trgovina	Indija	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca
27	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca. ekstrakt balzamovca, goveđi kolostrum
28	ljekarna	Hrvatska	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca, glukozamin, hondroitin, vitamin C, hijaluronska kiselina
29	ljekarna	Sjedinjene Američke Države	tablete	5-LOXIN® AKBA, glukozamin, vitamin C, mangan, bor, hijaluronska kiselina
30	internetska trgovina	Indija	tvrde kapsule	standardiziran na min. 98 % andrografolida
31	internetska trgovina	Indija	tvrde kapsule	ekstrakt justicije, ustinjena zelen justicije
32	internetska trgovina	Indija	tvrde kapsule	ekstrakt justicije, usitnjena zelen justicije
33	internetska trgovina	Sjedinjene Američke Države	tvrde kapsule	mješavina ekstrakata kurkume, justicije i indijskog tamjanovca, piperin, glukozamin, kolagen, hijaluronska kiselina
34	internetska trgovina	Sjedinjene Američke Države	tvrde kapsule	ekstrakt kurkume, PARACTIN®

35	internetska trgovina	Sjedinjene Američke Države	tvrde kapsule	zelen justicije, ekstrakt korijena, vitamini C i D, magnezij, selen, cink, ekstrakt ploda bazge, ekstrakt lista masline, prah korijena kudzu biljke, N-acetilcistein, usitnjena lukovica bijelog luka, kvercetin, usitnjeni list origana
36	ljekarna	Kanada	tvrde kapsule	podanak kurkume, ekstrakt podanka kurkume
37	trgovina zdravom hranom	Nizozemska	tvrde kapsule	usitnjeni korijen kurkume, usitnjeni korijen đumbira, ekstrakt ploda crnog papra
38	internetska trgovina	Tajland	tvrde kapsule	usitnjena kurkuma, usitnjeni papar
39	internetska trgovina	Tajland	tvrde kapsule	usitnjena kurkuma
40	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	sirovi materijal	usitnjena kurkuma
41	internetska trgovina	Indija	rinfuza	justicija
42	internetska trgovina	Tajland	tvrde kapsule	justicija
43	internetska trgovina	Portugal	tvrde kapsule	aloe vera (aloe barbadensis)
44	internetska trgovina	Italija	tablete	ekstrakt *Aloe barbadensis*, ekstrakt lista alue, prah sjemena komorača, prah korijena maslačka, suhi ekstrakt korijena žutog srčanika, suhi ekstrakt korijena sladića, suhi ekstrakt lista paprene metvice

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

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

HSS-GC-FID ANALIZA OSTATNIH OTAPALA U DODACIMA PREHRANI ZA LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Luka Nalo

SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva su kronične upalne bolesti gastrointestinalnog trakta karakterizirane rekurentnim upalama segmenata probavnog trakta koje se manifestiraju kao nadutost, abdominalna bol, grčevi, krvarenje te kronični proljev. U ovu skupinu bolesti spadaju dva podtipa, a to su Cronhova bolest i ulcerozni kolitis. Unatoč sigurnim i efektivnim farmakološkim metodama liječenja, koje uključuju aminosalicilate, kortikosteroide, imunosupresive te biološku terapiju, mnogi pacijenti koji pate od ovih složenih bolesti posežu za rješenjima svojih tegoba u drugim područjima. Tako ih sve više efektivne odgovore na svoje probleme traži u dodacima prehrani. Neki od njih mogu predstavljati javnozdravstvenu opasnost zbog prisutnosti neprijavljenih ostatnih otapala u svojem sastavu. Ostatna otapala su hlapljivi organski spojevi koji se koriste ili nastaju u proizvodnji medicinskih proizvoda. Klasificiraju se od klase 1 do klase 3 ovisno o opasnosti koje predstavljaju za ljudsko zdravlje. Kako bi se odredila prisutnost ostatnih otapala u dodacima prehrani namijenjenim za liječenje upalnih bolesti crijeva korištena je analitička metoda definirana člankom <467> Američke farmakopeje. 44 uzoraka s hrvatskog tržišta je pripremljeno i analizirano koristeći HSS-GC-FID za identifikaciju analita te onda uspoređeno s kromatogramima analiziranih standardnih otopina koji sadrže ostatna otapala klase 2 i klase 3. Analizom je određena prisutnost ostatnih otapala u 21 od 44 ispitanih uzoraka no u svim tim uzorcima koncentracije detektiranih ostatnih otapala bile su unutar prihvatljivih granica za ljudsku upotrebu.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 11 grafičkih prikaza, 9 tablica i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: upalne bolesti crijeva, dodaci prehrani, ostatna otapala, HSS-GC-FID

Mentor: **Dr. sc. Mario-Livio Jeličić**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mario-Livio Jeličić**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Doc. dr. sc. Hrvoje Rimac, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Doc. dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

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

HSS-GC-FID ANALYSIS OF RESIDUAL SOLVENTS IN FOOD SUPPLEMENTS USED IN THE TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Luka Nalo

SUMMARY

Inflammatory bowel diseases are chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract characterised by recurring inflammations of particular segments of the gastrointestinal tract, the clinical manifestation of which include bloatedness, abdominal pains, cramps, bleeping and chronic diarrhea. Two diseases belong to this group: Crohn's disease and ulcerative colitis. Despite safe and effective pharmacological treatment options, which include aminosalicylates, corticosteroids, immunosuppressives and biological therapy, many patients suffering from these complex diseases are seeking solutions to their medical issues in food supplements. Some of these food supplements may pose public health risks due to the presence of residual solvents in them not being properly reported. Residual solvents are volatile organic chemical substances that may have been used or produced in the preparation of a medicinal product. They are classified from Class 1 to Class 3 based on their potential dangers to human health. In order to determine the presence of residual solvents in food supplements used for the treatment of inflammatory bowel disease, method <467> defined by the United States Pharmacopeia was used. Multiple samples from the Croatian market were prepared and analysed using HSS-GC-FID and then compared with chromatograms of analysed standards containing Class 2 and Class 3 residual solvents. Using this method, the presence of residual solvents was determined in 21 out of 44 analysed samples, with all of the detected residual solvents being within acceptable limits, making them safe for human use.

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

Thesis includes: 48 pages, 11 figures, 9 tables and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: inflammatory bowel disease, food supplements, residual solvents, HSS-GC-FID

Mentor: **Mario-Livio Jeličić**, **Ph.D.** *Postdoctoral researcher,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mario-Livio Jeličić**, **Ph.D.** *Postdoctoral researcher,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Hrvoje Rimac, **Ph.D** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Amidžić Klarić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2022