

Određivanje udjela metanola i etanola plinskom kromatografijom u farmaceutskim proizvodima s propolisom

Novak, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:163:511482>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Ivana Novak

**Određivanje udjela metanola i etanola plinskom
kromatografijom u farmaceutskim proizvodima s
propolisom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom dr.sc. Mirande Sertić.

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Mirandi Sertić na dragocjenim savjetima, strpljenju i pomoći koju mi je pružila pri izradi ovog rada, djelatnicima Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova te svima koji su dali doprinos da ovaj rad poprimi svoj konačan oblik.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA I SIMBOLA

1. UVOD	1
1.1. Dodaci prehrani	2
1.2. Propolis.....	4
1.3. Plinska kromatografija	9
1.3.1. <i>Headspace</i> uzorkovanje u plinskoj kromatografiji	13
1.3.2. Prednosti i nedostaci plinske kromatografije	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Materijali	19
3.1.1. Kemikalije	19
3.1.2. Uzorci	19
3.1.3. Radni instrumenti	20
3.1.4. Pribor.....	20
3.1.5. Programski paketi.....	20
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Priprema standardnih otopina i uzoraka	21
3.2.2. Uzorkovanje <i>headspace</i> tehnikom	21
3.2.3. Provedba kromatografske analize	22
3.2.4. Statistička obrada podataka	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
5. ZAKLJUČCI.....	33
6. LITERATURA.....	35
7. SAŽETAK/SUMMARY	39
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/	41
BASIC DOCUMENTATION CARD	

POPIS KRATICA I SIMBOLA

EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (<i>European Food Safety Authority</i>)
EMA	Europska agencija za lijekove (<i>European Medicines Agency</i>)
EZ	Europska Zajednica
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (<i>Food and Drug Administration</i>)
FID	plameno-ionizacijski detektor (<i>Flame Ionisation Detector</i>)
GC	plinska kromatografija (<i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSS	uzorkovanje <i>headspace</i> tehnikom (<i>Headspace Sampler</i>)
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
ICH	Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za lijekove (<i>International Conference on Harmonisation</i>)
LLE	ekstrakcija tekuće-tekuće, (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
psi	mjerna jedinica za tlak, 1 psi iznosi približno 6894,76 paskala (<i>Pound per square inch</i>)
t_R	vrijeme zadržavanja (<i>retention time</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (<i>World Health Organization</i>)

1. UVOD

1.1. Dodaci prehrani

Dodaci prehrani prema zakonodavstvu Republike Hrvatske i Europske unije spadaju u posebnu kategoriju prehrambenih proizvoda i na njih se, osim posebnih zakonskih akata koji se odnose isključivo na dodatke prehrani, primjenjuju svi općeniti zakonski akti koji se odnose na hranu u pogledu označavanja proizvoda, aditiva i zdravstvenih tvrdnji.

Pojam „dodaci prehrani” označava hranu čija je svrha dopuniti uobičajenu prehranu, a koja predstavlja koncentrirane izvore hranjivih tvari ili druge tvari prehrambenog ili fiziološkog učinka, pojedinačne ili u kombinaciji, na tržištu u doziranom obliku, to jest oblicima kao što su kapsule, pastile, tablete, pilule i slično, vrećice praha, ampule tekućine, bočice na kapaljku, te ostali slični oblici tekućine i praha namijenjeni za uzimanje u odmjerenim malim količinama. Navedene hranjive i druge tvari mogu biti vitamini, minerali, aminokiseline, osnovne masne kiseline, vlakna te razne biljke i biljni ekstrakti (Direktiva 2002/46/EZ).

Posebni zakonski akti kojima se reguliraju dodaci prehrani na tržištu Republike Hrvatske su:

- Zakon o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima (Narodne novine br. 39/13)

Zakon je usklađen s Direktivom 2002/46/EZ Europskoga parlamenta i Vijeća o dodacima prehrani čija je namjena osigurati visoku razinu zaštite potrošača na način da sve tvari koji se koriste u proizvodnji dodataka prehrani moraju biti dokazivo sigurne i raspoložive za korištenje, procijenjene na znanstvenim podacima i pravilno deklarirane.

- Pravilnik o dodacima prehrani (Narodne novine br. 126/13)

Pravilnik definira nužne podatke na etiketi dodataka prehrani, vođenje Registra dodataka prehrani i postupak notifikacije, mjesta prodaje, odredbe o povlačenju i kemijske oblike minerala i vitamina koji se mogu koristiti u dodacima prehrani.

- 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 (Narodne novine br. 83/13)

Pravilnik detaljno definira način notifikacije dodataka prehrani kada se stavljaju na tržište Republike Hrvatske, jednostavniji postupak ako je tvar već ranije definirana i ocijenjena ili

opsežniji postupak ako se radi o novoj tvari pri čemu proizvođač mora dostaviti dokumentaciju o kemijskom sastavu, podatke o količini aktivnih tvari, navode o interakcijama te navode i/ili dokaze o netoksičnosti i sigurnosti primjene kod ljudi.

- Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno (Narodne novine br.160/13)
Pravilnik definira količine vitamina i minerala koji se mogu koristiti u dodacima prehrani i hrani, ostale dopuštene tvari u koje su svrstani propolis, matična mliječ i cvjetni prah, te poseban popis biljnih vrsta koji specificira koji dio biljke se smije koristiti, eventualna granica sadržaja u proizvodu i posebna upozorenja koja se moraju navesti na etiketi.

Trenutno ne postoji pravilnik kojim se uspostavlja jedinstven obavezni sustav nadzora nuspojava i neželjenih učinaka dodataka prehrani, tzv. nutrivigilancija po uzoru na lijekove i kozmetičke proizvode, iako pojedine tvrtke koje proizvode dodatke prehrani već imaju interno implementirane sustave praćenja pritužbi na dodatke prehrani. Jedina zemlja EU koja ima nacionalni sustav prijave nuspojava na dodatke prehrani je Francuska (www.farmaceut.org).

Reklamiranje dodataka prehrani posebno je postroženo pristupanjem Hrvatske Europskoj Uniji i prihvaćanjem Uredbe (EZ) br. 1924/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 20. prosinca 2006. o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani. Tvrdnje su implementirane kroz 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. Na etiketi i pri reklamiranju dodataka prehrani smiju se koristiti samo tvrdnje koje je ocijenila i odobrila EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane. Označavanje, reklamiranje i prezentiranje dodataka prehrani mora biti takvo da proizvodu ne pripisuje svojstva prevencije, terapije i liječenja bolesti ljudi ili upućuje na takva svojstva, te da ne sadrži navode koji upućuju da uravnotežena i raznolika prehrana ne može općenito pružiti primjerene količine hranjivih tvari (www.zdravlje.hr).

1.2. Propolis

Propolis je, uz med i matičnu mliječ, pčelinji proizvod kompleksnog kemijskog sastava s više od 300 do sada identificiranih komponenti od kojih mnoge imaju biološki učinak. Prirodni propolis sadrži oko 50% smola i biljnih balzama, 30% voskova, 10% esencijalnih ili aromatskih ulja, 5% peludi i oko 5% ostalih sastojaka. Smole i balzami, tj. polifenolna frakcija propolisa sastoji se od flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina, estera masnih kiselina i sličnih spojeva. Voštana frakcija u sirovom propolisu je sam pčelinji vosak. Hlapljivi dio čine terpenaska eterična ulja. Udio peludi u literaturi varira do 10%, a ostatak čine ugljikohidrati, minerali i vitamini (Burdock, 1998).

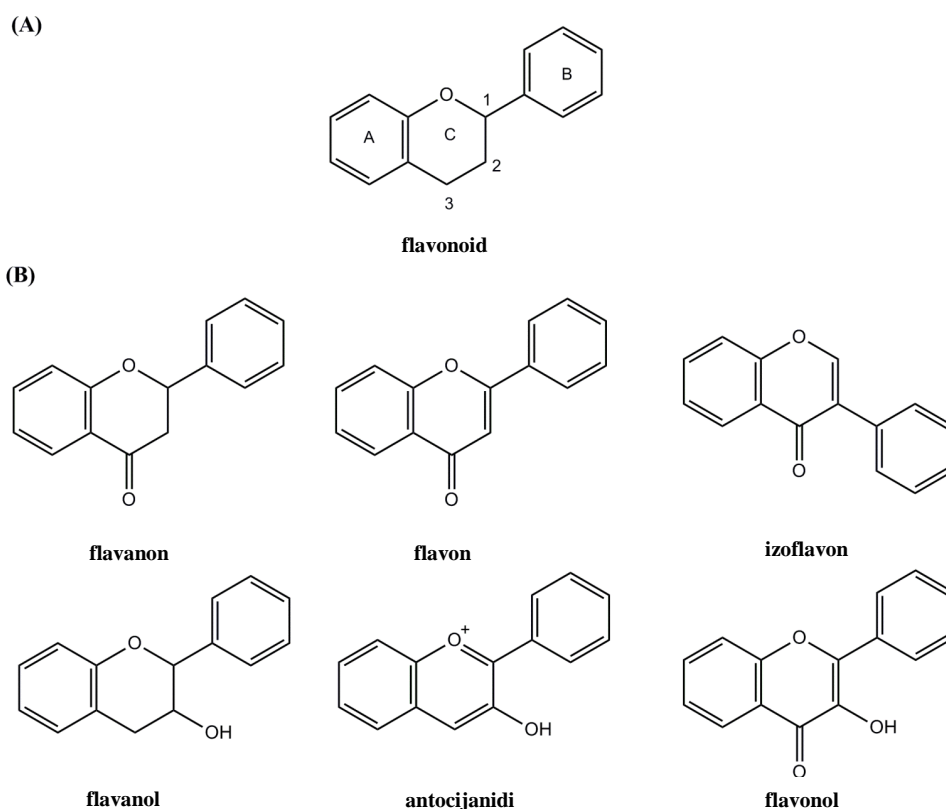
Propolis je porijeklom izlučevina pupova i kore drveća i šiblja, mješavina smolastih sastojaka koje se luče tijekom proljeća i ljeta, najčešće topole, johe, jablana, breze, jasena i kestena. Pčele skupljaju smolu pupoljaka i kore te je koriste za zatvaranje šupljina u košnici, zaglađivanje unutarnjih zidova košnice i oblaganje uginulih nametnika (Burdock, 1998). Prilikom skupljanja propolisa pčele ga miješaju sa sekretom mandibularnih žlijezda što dovodi do enzimske modifikacije te dodaju vosak. Jedna pčela može jednokratno donijeti oko 10 miligrama propolisa, a po sezoni košnica može proizvesti ukupno 100 do 150 grama propolisa. U košnicu se stavljaju mrežice od silikona ili drugih materijala čije rupice pčele nastoje zatvoriti propolisom (www.kosnica.hr).

Obrada propolisa obuhvaća nekoliko osnovnih koraka: struganje materijala sa košnice i procjena kvalitete materijala iz košnice – ako prirodni propolis sadrži puno voska, procesom pranja u toploj vodi uklonit će se većina voska i komadića drva. Propolis prilikom pranja tone na dno posude, budući da se s u vodi slabo otapa (1,0% do 1,7%), a vosak ispliva na površinu. Ostatak se zatim suši na zraku. Ako sirovi propolis sadrži malo voska koji bi se trebao ukloniti, može se preskočiti prvi korak. Drugi korak obuhvaća otapanje propolisa u etanolu čime se odvaja ostatak pčelinjeg voska, dijelova pčela i komadića organskih onečišćenja od propolisa. Propolis je topljiv u etanolu, za razliku od vode, pri čemu topljivost varira o udjelu etanola, temperaturi i trajanju. Najbolja topljivost se postiže korištenjem kombinacija otapala, npr. eter + etanol, kloroform + etanol i dr. Uobičajeno se koristi 70 – 80% etanol. Korištenjem 96%-tnog etanola može se otopiti više propolisa, ali se time povećava i otapanje peludne komponente. Otopina se uz povremeno protresanje čuva dva ili više tjedana. Zadnji korak

obrade je filtracija, pri čemu se tinktura propolisa filtrira kroz seriju filtera kako bi se uklonile preostale male čestice stranih materijala (www.kosnica.hr). Propolis se također može smrznuti (skrućuje se na temperaturi nižoj od 15 °C), samljeti pa koristiti u obliku praha. Takav propolis u prahu se koristi prilikom izrade bezalkoholnih oblika preparata propolisa uz emulgatore poput lecitina da bi se poboljšalo otapanje.

Kemijski sastav i biološka svojstva propolisa mogu varirati ovisno o geografskoj lokaciji i biljnim izvorima, kao i o postupku ekstrakcije (Sforcin, 2007). Prema vrsti ispaše pčela razlikujemo kemotipove propolisa – tip topole (tzv. popolni propolis, prema *Populus sp.*, topola) koji prevladava na području Europe i čije su glavne djelatne sastavnice flavoni, flavanoni, fenolkarboksilne kiseline i njihovi esteri; kemotip breze s područja Rusije u kojem također prevladavaju flavoni i flavonoli, ali različiti od kemotipa topole; zeleni propolis ili kemotip alekrima iz Brazila s glavnim sastavnicama preniliranim p-kumarinskim kiselinama i diterpenskim kiselinama; crveni propolis – kemotip kluzije s Kube čiji glavni sastojak su poliprenilirani benzofenoni; te kanarski propolis u kojem prevladavaju furofuranski lignani (Sforcin, 2011). Osnovna struktura flavonoida i strukture podklasa prikazane su na *Slici 1*.

Među uzorcima propolisa iz Švicarske, Italije i Bugarske zabilježene su velike varijacije u sadržaju pojedinih sastojaka propolisa analiziranih GC-MS metodom, udio fenolnih kiselina varira od 3,2% do 17,5%, estera fenolnih kiselina od 0,2% do 21,96%, flavanona i dihidroflavonola od 0,8% do 39,8%, a flavona i flavonola od 0,3% do 23,2 % (Bankova 2002). I istraživanja na uzorcima propolisa iz raznih dijelova Hrvatske pokazala su očekivane razlike u sadržaju polifenola zbog različite vegetacije na mjestima skupljanja: flavoni i flavonoli 0.53 – 8.24%, flavanoni 5.08 – 11.24%, ukupni flavonoidi 5.81 – 18.28% i ukupni polifenoli 12.72 – 31.72% (Medić-Šarić, 2012). Drugim istraživanjem, također iz Hrvatske, određivane su količine flavonoida u 20 uzoraka propolisa sakupljenih iz košnica s 10 različitih lokaliteta kontinentalne Hrvatske i utvrđeno je da raspon udjela flavonoida u uzorcima sirovog propolisa varira od 5% do 26%, s prosječnim udjelom od 19% (Kosalec, 2004). S obzirom na sve navedeno, bilo bi nemoguće na univerzalan način kemijski karakterizirati propolis.



Slika 1. Flavonoidi, djelatne sastavnice propolisa – osnovna kemijska struktura (A) i strukture 6 podklasa flavonoida (B) - flavanoni, flavoni, izoflavoni, flavanoli, antocijanidini i flavanoli.

Zdravstvene tvrdnje za propolis ili flavonoide propolisa koje su proizvođači dodataka prehrani predložili EFSA-i odnosile su se na sljedeće učinke: "respiratorno zdravlje", "antibakterijski i antifungalni učinak", "zdravlje grla", "zdravlje crijeva", "podržavanje imunosne obrane", "održavanje oralnog zdravlja", "pomaže održati normalnu cirkulaciju krvi" i "hepatoprotektivni učinak". Sve predložene tvrdnje odbijene su 2010. uz obrazloženje da predane reference odražavaju veliku razliku u biološkoj aktivnosti između preparata propolisa iz različitih izvora. Razine aktivnih tvari za koje se pretpostavlja da imaju biološki učinak u nekim proizvodima s propolisom u drugim proizvodima nisu uopće nađene ili su nađene u jako niskim koncentracijama. Također, same reference se odnose na velik broj različitih proizvoda, ekstrakata i izoliranih spojeva i nije jasno za koji tip propolisa/proizvoda se mogu primijeniti pojedine tvrdnje. Glavne zamjerke EFSA-e su da reference nedovoljno karakteriziraju propolis za danu tvrdnju, tip i količina bioflavonoida jako varira ovisno o

izvoru propolisa, načinu ekstrakcije i geografskom podrijetlu, ili povezanost uzimanja propolisa i primijećenih učinaka nije dovoljno objašnjena (EFSA, 2010). Prema tome, sve tvrdnje koje se trenutno koriste kod reklamiranja proizvoda s propolisom nisu dopuštene.

Zbog trenutnog neriješenog pravnog statusa propolisa, upitno je po kojim pravilima bi proizvode s propolisom trebalo deklarirati i kontrolirati. Kod tradicionalnih biljnih lijekova koji se koriste kao etanolni ekstrakti, pri označavanju se primjenjuje pravilnik koji se primjenjuje kod označavanja lijekova po kojem se mora deklarirati i najmanji sadržaj etanola u lijeku (EMA, 2003). S druge strane, nije uopće moguća registracija proizvoda s propolisom kao tradicionalnih biljnih lijekova jer propolis ne odgovara trenutnoj pravnoj definiciji po kojoj tradicionalni biljni lijek mora biti isključivo biljnog porijekla. U dogledno vrijeme očekuje se proširenje problematične definicije (EMA, 2008b).

Unatoč odbijanju tvrdnji od strane EFSA-e postoje brojna istraživanja o djelovanju propolisa, najviše o njegovom antibakterijskom i imunomodulacijskom učinku. Antimikrobno djelovanje propolisa može se iskazati na dva načina – direktnim učinkom na mikroorganizme i indirektno putem stimulacije imunološkog sustava. Razjašnjenje mehanizma djelovanja propolisa je napredovalo u zadnjih nekoliko godina. *In vivo* i *in vitro* ispitivanja pokazala su da propolis može aktivirati makrofage, povećavajući njihovu mikrobicidnu aktivnost. Propolis također povećava litičku aktivnost NK („natural killer“) stanica prema stanicama tumora. Stimulira povećanu proizvodnju antitijela što ukazuje na mogućnost korištenja kao adjuvansa u cjepivima. Inhibitorni učinak na limfoproliferaciju može biti povezan s protuupalnim učincima. Optimalni rezultati prilikom davanja propolisa laboratorijskim životinjama su opaženi kad se propolis koristio u kraćem vremenskom razdoblju, ali potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdila optimalna doza i vrijeme uzimanja za ljude. Propolis pokazuje antitumorski i antikancerogeni učinak te ima veliki antimutageni potencijal, iako su mehanizmi kemoprevencije koju pokazuje propolis još nepoznati (Sforcin, 2007). Poplarni propolis i neke izolirane polifenolne komponente mogu smanjiti broj tumorskih nodula u plućima, pri čemu je antimetastatski efekt propolisa veći nego onaj pojedinih komponenti (Oršolić, 2004).

Dobro je utvrđen i antimikrobni učinak propolisa protiv različitih bakterijskih vrsta, gljivica, virusa i parazita. Propolis također pokazuje sinergistički učinak u kombinaciji s

antimikrobnim lijekovima. Smanjuje rezistenciju bakterija na određene antibiotike (amoksicilin, ampicilin, cefaleksin) i ima sinergistički učinak s antibioticima koji djeluju na ribosome (kloramfenikol, ampicilin, cefaleksin), dok na djelovanje antibiotika koji djeluju na DNA ili folnu kiselinu nema učinak. Dobar učinak pokazuje na bakterije uzročnike karijesa te smanjuje edem kada se topički primjenjuje kod stomatitisa (Sforcin, 2011). Kada se propolis koristi sam, čak i kada sadržaj flavonoida jako varira, posjeduje antimikrobnu aktivnost protiv *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* i *C. albicans* u uzorcima u kojima je količina flavonoida veća od 1% (Kosalec, 2005).

Prilikom korištenja kod alergija i rinitisa, nije primijećen učinak nakon jedne doze, ali značajno smanjenje curenja nosa i kihanja primijećeno je kada se doza od 1000mg/kg koristila kroz dva tjedna. Kod pacijenata s astmom zabilježeno je smanjenje broja noćnih napadaja i poboljšanje funkcije nakon korištenja vodenog ekstrakta propolisa tijekom dva mjeseca. Pretpostavlja se da propolis kod astme djeluje zbog učinka na smanjenje oksidativnog stresa koji sudjeluje u patogenezi astme. Kod istraživanja dijabetesa na štakorima primijećeno je da propolis smanjuje količinu inzulina u plazmi i tjelesnu težinu, bez utjecaja na razinu glukoze u krvi. Također je primijećen pozitivan učinak na zacjeljenje i reepitelizaciju dijabetičkih rana. Neke fenolne kiseline propolisa (kavena, ferulična, p-kumarinska) pokazuju antiulcerogeno djelovanje (Sforcin, 2011).

Imunomodulacijski učinci uzoraka propolisa razlikuju se od učinaka standardnih supstancija. Sastavnice svih propolisa pripadnici su i aktivnih podskupina flavonoida (flavoni i flavonoli) i neaktivnih skupina supstancija (flavanona i fenolnih kiselina), uz još niz neidentificiranih komponenti. Različitost u djelovanju samih standardnih supstancija te prisutnost velikog broja nepoznatih komponenti u uzorcima propolisa onemogućavaju predviđanje biološke aktivnosti tako složene smjese. Biološki učinak propolisa zapravo je rezultat zbroja učinaka i interakcija njegovih sastavnica i potrebno ga je promatrati kao cjelinu te se nikako ne smije poistovjetiti s učinkom određene skupine standarda, bilo fenolnih kiselina, bilo flavonoida (Jasprica, 2007).

1.3. Plinska kromatografija

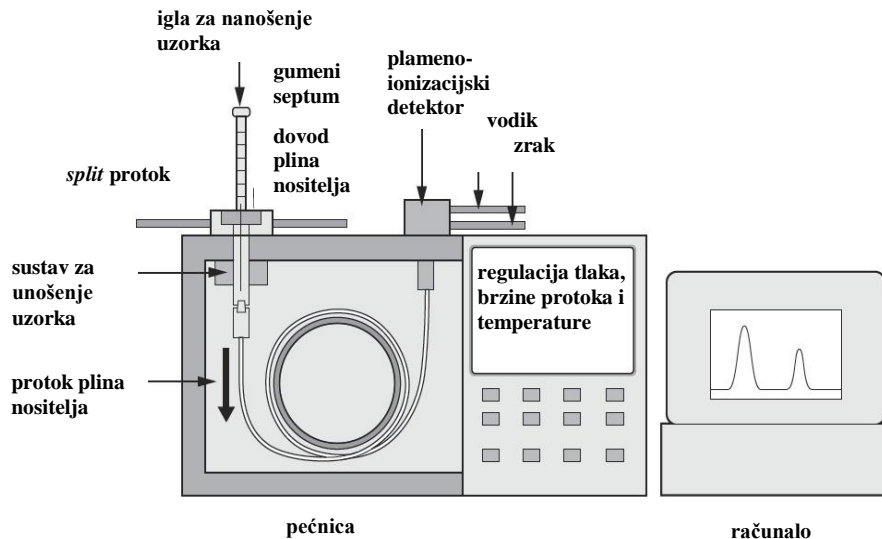
Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je tehnika kojom se mogu odijeliti te kvalitativno i kvantitativno odrediti plinovi, tekućine i krute tvari koje se mogu prevesti u plinovito stanje. Osnova tehnike je odjeljivanje, pri čemu pokretna faza (inertni plin) eluira sastavnice uzorka prolazeći kolonom prevučenom tankim slojem tekuće nepokretne faze ili punjenom čvrstim nosačem impregniranim tekućom nepokretnom fazom. Unošenjem u kolonu uzorak trenutno isparava, a pojedini sastojci uzorka eluiraju u ovisnosti o vremenu kojem sastojak provede u interakciji s nepokretnom fazom (Nigović, 2014).

Plinski kromatograf sastoji se od (*Slika 2*):

- sustava za injiciranje; uzorak se može injicirati ručno ili pomoću *autosamplera*,
- grijanog prostora za unošenje uzorka u kojem uzorak isparava, a zatim kondenzira na početku kolone,
- dovoda mobilne faze i regulatora tlaka plina (obično dušika ili helija) koji nosi uzorak kroz kolonu,
- kolone, koja može biti kapilarna ili punjena,
- pećnice u koju je uklopljena kolona i čija se temperatura može podesiti između sobne temperature i otprilike 400°C,
- detektora; najčešće korištena vrsta detektora je plameno ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID).

Analit se nanosi na početak kolone putem grijanog sustava za nanošenje uzorka pri čemu dolazi do isparavanja analita. Analit se zatim kondenzira na hladnijem, početnom dijelu kolone. Temperatura pećnice u kojoj se nalazi kolona može biti konstantna ili programirana da postepeno raste. Nakon nanošenja uzorka, sastavnice se odvajaju prema relativnom vremenu zadržavanja (t_R) pojedine sastavnice u stacionarnoj fazi. Izlazak sastavnica iz kolone možemo pratiti pomoću različitih vrsta detektora. Općenito, metoda se koristi za karakterizaciju lijekova, posebno profila procesnih onečišćenja te kod limit-testova za ostatna otapala i ostala hlapljiva onečišćenja. Može se koristiti i za kvantifikaciju djelatnih tvari u gotovim formulacijama (ako djelatna tvar ne sadrži kromofore), karakterizaciju sirovina u sintezi ljekovitih tvari, karakterizaciju lakohlapljivih ulja koja se koriste kao ekscipijensi u

ljekovitim oblicima, raznih tonika i mikstura, masnih kiselina u uljima te kvantifikaciju djelatnih tvari i njihovih metabolita u biološkim tekućinama.



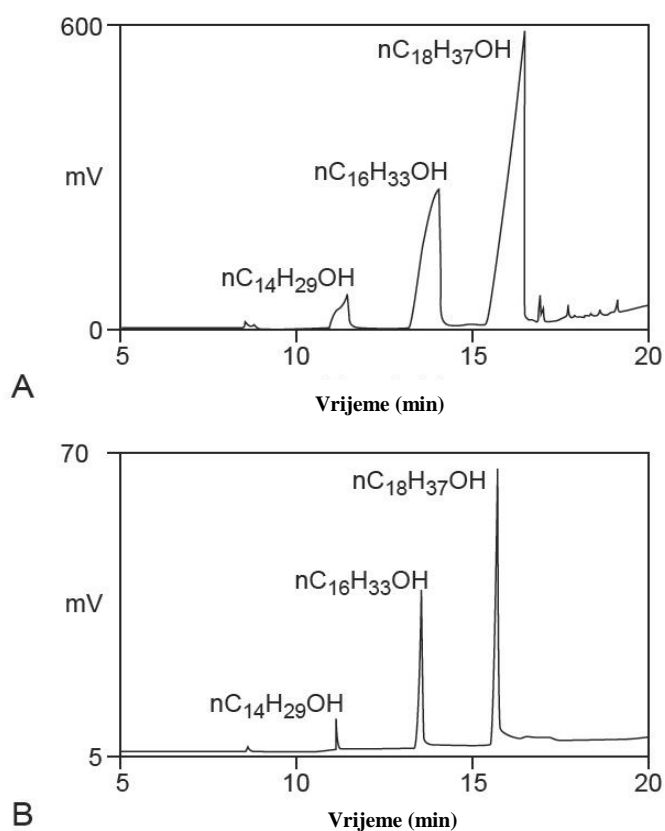
Slika 2. Shema plinskog kromatografa.

Sustav za unošenje uzorka

Samo nanošenje uzorka se događa na zagrijanom staklu ili oblozi od kvarca, a ne direktno na koloni. Uzorak se na kolonu može unositi na dva načina: tako da se cijeli uzorak unese na kolonu (*splitless* unošenje) ili da se uzorak se razdvaja na dva dijela, od čega se manji dio nanosi na kolonu, a ostatak odventilira (*split* unošenje). *Split* omjer iznosi od 10:1 do 100:1, pri čemu se veći dio uzorka odventilira. Ova tehnika se koristi kod koncentriranih uzoraka. *Split* načinom unošenja samo dijela uzorka sprječava se širenje i asimetrija pikova koji mogu nastati zbog preopterećenja kolone i ekspanzije volumena otapala prilikom povećanja temperature.

Na *Slici 3.* prikazan je primjer kromatograma otopine s 4 mg/ml farmaceutskog ekscipijensa cetostearilnog alkohola injiciranog u plinski kromatograf na *splitless* (A) i *split* (B) način injiciranja. Pri *splitless* načinu injiciranja cijeli volumen uzorka se nanosi na kolonu i ventil injektora mora ostati zatvoren 0,5-1 minutu nakon injiciranja. Problem kod *split/splitless* injiciranja na kapilarnu kolonu je i u preciznosti injiciranja. Kako je temperatura u sustavu za injiciranje visoka, može doći do raspada komponenti uzorka prije nego stignu na početak kolone. Kod *split* injiciranja, potrebno je paziti da se sve komponente uzorka (slabije i jače

hlapljive komponente) razmjerno odventiliraju kroz *split* ventil. Volumen uzorka koji se nanosi na kolonu obično iznosi 0,5 – 2 μ L.



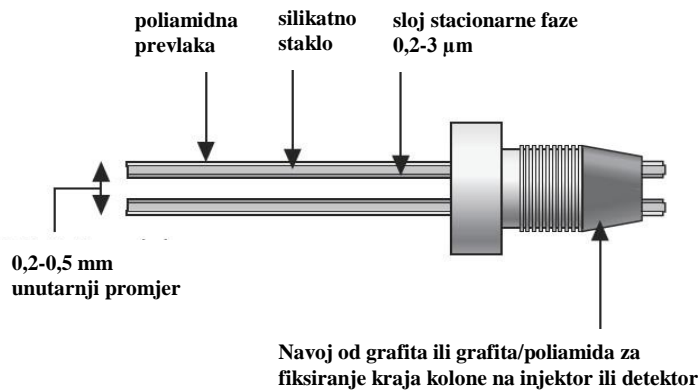
Slika 3. Usporedba kromatograma analize cetostearilnog alkohola, *splitless* način (A) i *split* način 20:1 (B) unošenja uzorka.

Kolone

Punjene kolone obično su načinjene od stakla koje je silanizirano kako bi se s površine uklonile polarne silanolne Si–OH skupine koje mogu doprinijeti rastezanju pikova polarnih analita. Dijametra su 2-5 mm, punjene čvrstim česticama prevučeni tekućom stacionarnom fazom, najčešće dijatomejskom zemljom.

Kapilarne kolone izrađene su od izvučenog kvarca koji je s vanjske strane obično prevučen poliamidom kako bi kolona bila fleksibilnija (*Slika 4*). Kod kolona koje se koriste pri visokim temperaturama, vanjska strana može biti obložena i aluminijem. Unutarnji promjer kapilarne kolone iznosi 0,15 do 0,5 mm, a dužine su između 12 i 50 metara. Stijenka kolone prevučena je tekućom mobilnom fazom debljine sloja 0,1 do 5 μ m. Najčešće se koriste organo-silikonski

polimeri koji su kemijski vezana povezani s silanolnim skupinama stijenske kolone, pri čemu su lanci međusobno unakrsno povezani. Podnose temperature do 325°C, dok neke vrste mogu podnijeti temperature do 370°C. Polimeri koji nisu silikonski, npr. carbowax, manje su termalno stabilni, s temperaturnim limitom od 240°C.



Slika 4. Shema strukture kapilarne kolone za plinsku kromatografiju.

Pećnica

Pećnica plinskog kromatografa, osim grijača, sadrži i ventilator čime se osigurava ravnomjerna distribucija topline. Pećnica može biti programirana da održava konstantnu temperaturu ili da se temperatura postepeno diže. Program može dizati temperaturu brzinama od 1°C/minuti do 40°C/minuti. Kompliciraniji temperaturni programi mogu sadržavati i dijelove kod kojih se temperatura drži konstantnom uz dijelove u kojima se temperatura pećnice postepeno diže.

Prednost programiranja temperature je u mogućnosti analize sastojaka koji se jako razlikuju po isparljivosti u razumnom vremenu. Unošenje uzorka može se vršiti pri nižoj temperaturi pri čemu će uzorak biti zaustavljen na početku kolone dok se temperatura ne podigne dovoljno da dođe do elucije. Kako dalje raste temperatura u koloni, odvajanja dvaju analita se smanjuje jer se stupanj interakcije sa stacionarnom fazom smanjuje s povišenjem tlaka pare analita. Pri nižim temperaturama postiže se bolje razlučivanje.

Plin nosač

Najčešće korišteni plin nosač u kapilarnoj plinskoj kromatografiji je helij. Koristi se brzina protoka od 0,5 do 2 mL/min. Kako je brzina protoka na kraju kapilarne kolone niska u odnosu na unutarnji volumen detektora, protoku na izlasku iz kolone mora se dodati plin za maskiranje (engl. *make up gas*) kako bi uzorak mogao proći kroz unutarnji volumen detektora u razumnom vremenu. U kapilarnoj plinskoj kromatografiji kao plinovi nosači se mogu se koristiti vodik ili helij uz brzinu protoka u rasponu od 30-50 cm/s, te dušik uz optimalnu brzinu protoka od 10-20 cm/s. Povećanjem temperature smanjuje se brzina protoka što može imati utjecaj na efikasnost kolone, stoga instrumenti imaju mogućnost programiranja kako bi protok plina nositelja ostao konstantan pri porastu temperature.

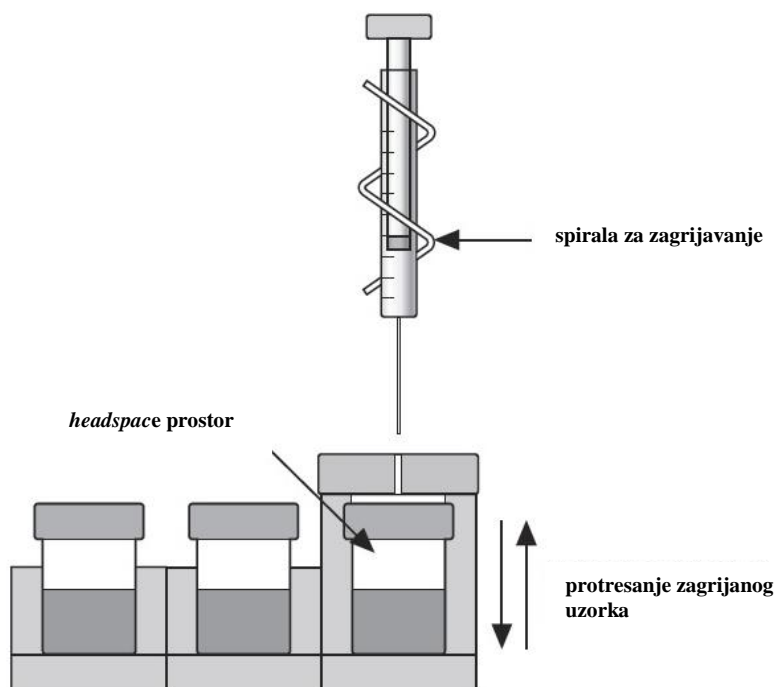
Detektor

Najčešće korištena vrsta detektora u analizi farmaceutskih proizvoda je plameno-ionizacijski detektor (FID). Sastojci analita izgaraju u plamenu pri čemu dolazi do ionizacije i porasta jačine struje između mlaznice i kolektora. Detektira spojeve s atomima ugljika i vodika. U kombinaciji s kapilarnom GC može detektirati količinu od 100 pg-10 ng tvari i širokog je raspona linearnosti.

1.3.1. *Headspace* uzorkovanje u plinskoj kromatografiji

Sofisticiranija metoda za određivanje ostatnih otapala i hlapljivih onečišćenja se temelji na *headspace* analizi (*Slika 5*). Najjednostavnija metoda pripreme uzorka je stavljanje uzorka u staklenu bočicu i zagrijavanje. Uzorak se, ili kao otopina ili umiješan u relativno nehlapljivo otapalo s malim potencijalom za interferencije, npr. vodom ili dimetilacetamidom, unosi u staklenu bočicu koja se zatvara metalnim čepom s gumenom septom) i zagrijava do postizanja ravnoteže između hlapljenja i povratne kondenzacije lakohlapljivih sastavnica. Određeni fiksni volumen para iznad otopine zatim se povlači i injicira u kromatograf uobičajenim putem. Ako se koristi kapilarna kolona, *split* injiciranje se koristi kako bi se olakšalo nanošenje uzorka; omjer 10:1 osigurava da se uzorak volumena 0,25 ml injicira unutar 1,5 sekundi pri brzini protoka kroz kolonu od 1 ml/min.

Vrijeme i temperatura zagrijavanja uzorka mora biti dovoljno da se uspostavi ravnoteža između lakohlapljivog analita u otopini i njegovih para iznad otopine. Uzorak ne smije sadržavati onečišćenja koja pri povišenoj temperaturi mogu reagirati s matriksom uzorka. Također, pri pripremi uzorka (mljevenju ili miješanju) prije analize ne smije doći do gubitka hlapljivih komponenti. Za najbolju reproducibilnost analize proces bi trebao biti automatiziran (*autosampler*), a za kvantitativnu točnost koristi se metoda standardnog dodatka.



Slika 5. Shema sustava za automatsko *headspace* uzorkovanje.

1.3.2. Prednosti i nedostaci plinske kromatografije

Prednosti plinske kromatografije su jednaka kvantitativna točnost i preciznost kao i kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*HPLC*-a), posebno kada se koristi unutarnji standard. Kada se koriste kapilarne kolone, GC ima veću moć odvajanja sastavnica nego HPLC. Uz to, GC sustavi često dolaze u automatiziranom obliku. Protok mobilne faze ne varira i ne postoje posebni zahtjevi za odlaganjem, a čak i u slučaju da se kao plin nositelj koristi helij, njegova cijena je niska u usporedbi s cijenom organskih otapala koja se koriste u HPLC-u.

Nedostaci plinske kromatografije su mogućnost analize samo termalno stabilnih i hlapljivih tvari te moguća potreba za derivatizacijom uzorka čime se u analizu uvodi dodatni korak i moguće interferencije. Zbog unošenja vrlo malog volumena uzorka teško ga je kvantitativno unijeti na kolonu. Također, u instrument nije moguće unijeti vodene otopine i soli. Iako je pojava HPLC-a kao kvantitativne tehnike smanjila korištenje plinske kromatografije, još uvijek se široko koristi u ekološkim znanostima, industriji hrane, parfema i aroma, petrokemijskoj industriji, mikrobiološkim analizama i kliničkoj biokemiji.

Zbog svega navedenog plinska kromatografija je posebno prikladna metoda za kvantifikaciju vrlo lako hlapljivih tvari, u ovom slučaju etanola se često koristi u ljekovitim oblicima kao što su tinkture, pri čemu je za analizu potrebna kolona koja snažno zadržava hlapljive komponente (Watson, 2012.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Na tržištu se nalazi mnoštvo proizvoda registriranih kao dodaci prehrani koji u svojem sastavu sadrže propolis, najčešće dodan u obliku etanolne tinkture ili ekstrakta. Kako postoji mogućnost da se pri pripremi ekstrakta propolisa ne koristi etanol odgovarajuće čistoće ili dođe do nehotečajne zamjene čistog etanola tehničkim/denaturiranim etanolom, moguća je pojava onečišćenja u etanolnom ekstraktu ili tinkturi propolisa koja utječu na kvalitetu i sigurnost primjene gotovog proizvoda. Europska farmakopeja kao najčešća onečišćenja u etanolu navodi metanol, acetaldehid, acetal, benzen, cikloheksan, propanol, butanol i benzen. S obzirom na moguće toksične učinke metanola i etanola kao najčešćeg onečišćenja, cilj ovog rada je odrediti sadržaj i metanola i etanola u farmaceutskim proizvodima s propolisom primjenom tehnike plinske kromatografije s *headspace* uzorkovanjem.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

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

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

aceton (Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.1.2. Uzorci

Apitusik H medni sirup s ekstraktom timijana i propolisom (Apipharma, Zagreb, Hrvatska)

Apipol propolis kapi za jačanje otpornosti organizma (Apipharma, Zagreb, Hrvatska)

Redasan medni sirup s ciklom i propolisom (Apipharma, Zagreb, Hrvatska)

Apipol medni sirup s maceratom sljezovog korijena i tinkturom propolisa (Apipharma, Zagreb, Hrvatska)

Apitusik medni sirup s tinkturom timijana i propolisa (Apipharma, Zagreb, Hrvatska)

Propomel propolis kapi (Esensa, Beograd, Srbija)

Medex Apibaby Super sprej (Medex, Ljubljana, Slovenija)

ESI Propolaid PropolBaby sirup (ESI, Savona, Italija)

ESI Propolaid kapi bez alkohola (ESI, Savona, Italija)

ESI Propolaid PropolGola raspršivač za grlo bez alkohola (ESI, Savona, Italija)

Apipharma Apipol kapi za opuštanje (Apipharma, Zagreb, Hrvatska)

PIP Propolis 12% (PIP, Pisarovina, Hrvatska)

Specchiasol Propoli Plus Epid Junior Flu sirup (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Propoli Plus Epid Junior Tus sirup (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Propoli Plus Epid Junior sprej za usta (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Propoli Plus Epid Gocce kapi (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Propoli Plus Epid Barriera sprej za usta (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Propoli Plus Epid Oligomir sirup (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Propoli Plus Epid Oligomir Balsamico sirup (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Expettorale Adulti sirup (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Expettorale Sedi sirup (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Expettoral Junior sirup (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Propoli Plus Epid sprej za usta uz dodatak ljekovitog bilja (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

Specchiasol Propoli Plus Epid alkoholna tinktura (Specchiasol, Bussolengo, Italija)

3.1.3. Radni instrumenti

Headspace sampler Agilent G1888 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Plinski kromatograf Agilent 6850 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Generator dušika NG250A (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Generator zraka ZAO35A (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Generator vodika CFH200 (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Sustav za pročišćavanje vode (Millipore, Bedford, MA, SAD)

3.1.4. Pribor

Bočica za uzorkovanje *headspace* tehnikom s aluminijskim čepom, 20 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Zatvarač bočica s aluminijskim čepom za uzorkovanje *headspace* tehnikom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Kolona za plinsku kromatografiju DB-624 (6% cijanopropilfenil / 94% dimetilpolisiloksan), dimenzija 25 m x 0,53 mm, debljina filma 0,5 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

3.1.5. Programski paketi

Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

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

OriginPro 7,5 SRO (OriginLab Corporation, Northampton, SAD)

3.2. Metode

Određivanje sadržaja metanola i etanol u uzorcima dodataka prehrani s propolisom provedeno je primjenom plinske kromatografije. Uzorkovanje je provedeno primjenom *headspace* tehnologije.

3.2.1. Priprema standardnih otopina i uzoraka

Standardne otopine etanola i metanola pripremljene su razrjeđivanjem s ultračistom, deioniziranom vodom do koncentracije 0,1% (v/v). Radne otopine korištene za validaciju pripremane su dodatnim razrjeđivanjem ultračistom vodom do konačnih radnih koncentracija uz dodatak acetona kao unutarnjeg standarda u koncentraciji 0,1% (v/v). Ispitivani uzorci analizirani su bez prethodne obrade. Neposredno prije analize 2,00 mL uzorka prenesena su u bočicu za uzorkovanje *headspace* tehnikom volumena 20 mL. Uzorku su dodana 2 µL acetona koji je služio kao unutarnji standard. Bočica je zatim zatvorena aluminijskim čepom s gumenom septom pomoću zatvarača bočica. Neki od uzoraka su zbog velikog udjela etanola morali biti razrijeđeni 100 puta.

3.2.2. Uzorkovanje *headspace* tehnikom

Uzorak se zagrijavao u *headspace* pećnici tijekom 20 minuta pri 90 °C, a zatim unosio u plinski kromatograf tijekom 1 minute pri temperaturi od 120 °C. Vrijeme unošenja iznosilo je 1 minutu pri tlaku od 10,0 psi. Plin nosioc bio je dušik (1 mL/min). Temperatura *headspace* pećnice iznosila je 90 °C, a temperature petlje i prijenosne cijevi iznosile su 115 °C i 120 °C. Vrijeme uravnoteženja tijekom zagrijavanja u *headspace* pećnici iznosilo je 20 min. Bočica za uzorkovanje je tijekom 0,2 min bila izložena tlaku od 10 psi. Vrijeme injektiranja, punjenja i uravnoteženja prijenosne petlje iznosilo je redom 1,0, 0,2, 0,05 min. Korišten je *split* način unošenja uzorka pa je na kolonu injektiran dio uzorka u omjeru 1:15.

3.2.3 Provedba kromatografske analize

Za analizu je korišten instrument Agilent 6850 plinski kromatograf s plamenoionizacijskim detektorom. Razdvajanje se odvijalo na Agilent DB-624 koloni (6% cijanopropilfenil / 94% dimetilpolisiloksan), dimenzija 25 m x 0.33 mm, 0.5 μ m. Temperatura injektora iznosila je 250°C, a detektora 300°C. Korišten je gradijentni temperaturni program za kolonu. Temperatura kolone iznosila je 40°C tijekom prve 2 minute analize, a zatim se kolona zagrijavala do 180°C uz porast od 20°C/min.

3.2.4 Statistička obrada podataka

Podaci su obrađeni jednostavnim statističkim postupcima primjenom programskih paketa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD) i OriginPro 7,5 SRO (OriginLab Corporation, Northampton, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu analizirani su farmaceutski proizvoda s propolisom, komercijalno dostupni u ljekarnama u Republici Hrvatskoj ili inozemstvu. Ispitani proizvodi imaju vrlo složen i raznolik matriks s velikim brojem i lakohlapljivih i teškohlapljivih sastavnica. Kada bi za njihovu analizu koristili uobičajene metode ekstrakcije, poput ultrazvučne ekstrakcije ili ekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE), postupak bi bio dugotrajan i kompliciran te bi iziskivao velike količine organskih otapala. Uobičajenim direktnim injiciranjem uzorka na kolonu teže hlapljive sastavnice uzorka zaostajale bi i nakupljale se u koloni i izazvale deformacije pikova u kasnijim analizama. Da bi na jednostavan i brz način ekstrahirali lakohlapljive organske spojeve iz složenih uzoraka odabrana je upravo *headspace* tehnika. Za analizu spomenutih proizvoda primijenjena je HSS-GC-FID metoda prethodno razvijena na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Metoda je također bila validirana u skladu s ICH smjernicama. Validacijom ove metode pokazano je da je ona prikladna za utvrđivanje udjela metanola i etanola u farmaceutskim proizvodima s propolisom.

U svrhu određivanja sadržaja metanola i etanola u ispitivanim uzorcima korištene su jednadžbe kalibracijskog pravca dobivene u određivanju linearnosti metode, prikazane kao ovisnost površine kromatografskog pika o koncentraciji analita. Za metanol jednadžba pravca glasila je $y = 0.239x + 0.001$, uz koeficijent korelacije $R^2 = 0.988$ i linearni raspon 0.001–0.792 g/L. Za etanol jednadžba pravca glasila je $y = 0.523x + 0.132$, uz koeficijent korelacije $R^2 = 0.992$ te linearni raspon 0.001–39.450 g/L.

Svakom uzorku dodana su 2 μ L acetona kao unutarnjeg standarda koji se koristi kako bi korigirali sadržaj sastavnice s obzirom na moguće razlike u rezultatima zbog postupka pripreme uzorka i varijacija u radu kromatografskog uređaja. Unutarnji standard ne smije biti prisutan kao komponenta uzorka, mora biti stabilan kako se ne bi razgradio prilikom pripreme uzorka i kromatografske analize, mora imati fizikalno-kemijska svojstva slična analitu (točke vrelišta i polarnost), slične funkcionalne skupine te se ne smije eluirati zajedno s nekom od sastavnica uzorka. Poželjno je da se eluira nakon sastavnica čiji sadržaj želimo odrediti jer time što se u svakoj analizi eluira u točno određenom vremenu, možemo znati da su vremena prethodno eluiranih pikova sastavnica točna i kromatografski uvjeti tijekom analize odgovarajući. Dodatak unutarnjeg standarda povećava preciznost i točnost metode. Kod korištene metode dodatak unutarnjeg standarda omogućuje korekciju rezultata jer pri

zagrijavanju uzorka prije *headspace* uzorkovanje lakohlapljive sastavnice ne ispare u potpunosti (www.chromatographyonline.com).

Ukupno su ispitana 24 proizvoda s propolisom u tekućem obliku, deklarirana kao dodaci prehrani, od čega je 14 proizvoda deklarirano za primjenu u djece. U ispitivanim uzorcima metanol i etanol su identificirani usporedbom njihovih vremena zadržavanja na koloni u uzorku i u standardnim otopinama. Na *Slici 6.* prikazani su neki od analiziranih uzoraka.



Slika 6. Medex Apibaby Super sprej, Apipharma Apipol kapi za opuštanje, Specchiasol Propoli Plus Epid Oligomir Balsamico sirup, Specchiasol Propoli Plus Epid alkoholna tinktura.

Tablica 1. Deklarirani sadržaj etanola, naznačena primjena kod djece na deklaraciji, utvrđeni udio etanola, ukupna količina etanola u proizvodu i udio metanola u ispitanim uzrocima.

Uzorak	Deklarirani sadržaj etanola	Upotreba kod djece	Udio etanola (% v/v)	Ukupna količina etanola u proizvodu (mL)	Udio metanola (% v/v)
1	52.50%		75.960	11.394	ispod LOQ
2	60%		41.701	8.340	0,00344
3	65%		71.929	21.579	0,02625
4	70%		58.192	17.457	0,00228
5	bez alkohola	✓	2.978	0.435	
6	bez alkohola	✓	0.774	0.155	
7	bez alkohola	✓	0.264	0.079	
8	bez alkohola		0.158	0.024	
9	bez alkohola	✓	0.030	0.015	
10	bez alkohola	✓	0.015	0.015	
11	deklariran bez količine		77.323	23.197	0,00387
12	deklariran bez količine		62.682	12.536	0,02627
13	deklariran bez količine	✓	2.911	2.911	
14	deklariran bez količine	✓	2.848	2.848	
15	nije navedeno		1.467	2.494	
16	nije navedeno	✓	1.127	2.028	
17	nije navedeno		0.691	1.174	
18	nije navedeno	✓	0.562	0.562	
19	nije navedeno	✓	0.537	0.912	
20	nije navedeno		0.493	0.838	
21	nije navedeno	✓	0.322	0.643	
22	nije navedeno	✓	0.171	0.171	
23	nije navedeno	✓	0.032	0.032	
24	nije navedeno	✓	0.013	0.002	

Rezultati analize, prikazani u *Tablici 1.*, pokazali su da baš svi analizirani proizvodi u svom sastavu sadrže etanol i to u vrlo velikom rasponu od 0,01% do 75,96% (v/v). Proizvodi koji su na deklaraciji imali navod „bez alkohola“ su nažalost također svi imali etanol u svom sastavu i to u rasponu od 0,01% do 2,98% (v/v). Većina proizvoda kod kojih se na deklaraciji ne navodi sadržaj alkohola imali su relativno male količine etanola, od 0,03% do 1,47% (v/v). Slično je bilo i kod proizvoda koji su na deklaraciji naveli etanol, ali na proizvodu nije navedena točna količina etanola. I kod većine tih proizvoda pronađena je mala količina etanola, osim kod jednog proizvoda gdje je pronađena vrlo visoka koncentracija etanola od 77,32% (v/v). Metanol u većini proizvoda nije pronađen, osim kod onih dodataka prehrani koji su sadržavali visoke koncentracije etanola. Analizom je utvrđena prisutnost metanola kod pet ispitanih dodataka prehrani, u količini manjoj od 0,03% (v/v). To je očekivano budući da je metanol očekivano onečišćenje u etanolu, detektibilno u onim proizvodima u kojima je količina etanola značajna.

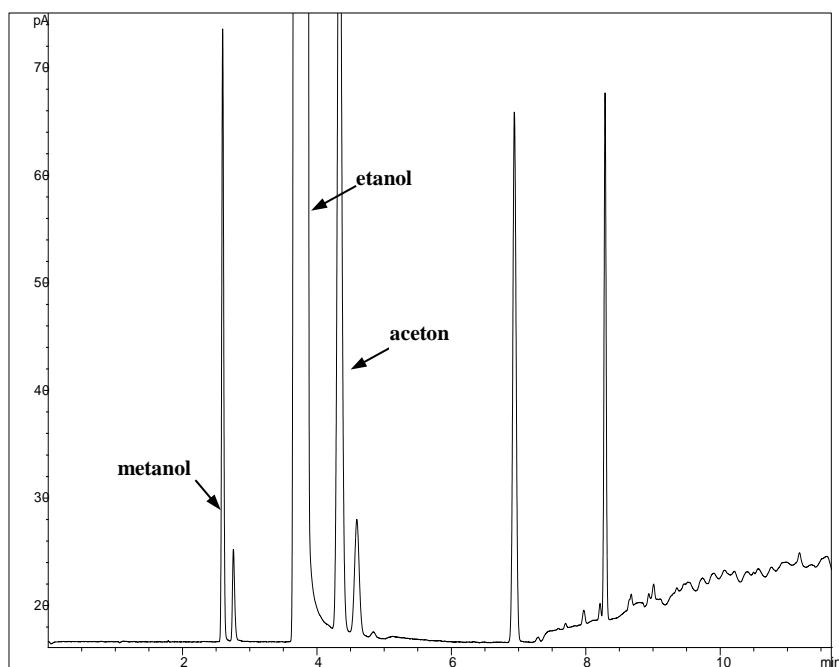
Etanol se često koristi kao ekstrakcijsko otapalo za pripremu raznih biljnih preparata. Učinci akutne intoksikacije ovise o količini i variraju od euforije u nižim dozama do sedacije, depresije disanja i kome kod visokih doza. Dugotrajnom konzumacijom većih količina pokazuje brojne štetne učinke po organizam – gastrointestinalnu toksičnost, hepatotoksičnost, neurotoksičnost, teratogenost, uz razvoj ovisnosti i druge štetne učinke po psihičko zdravlje. Među analiziranim proizvodima problematični su oni s velikom količinom etanola zbog mogućnosti da malo dijete bez nadzora roditelja unese cijeli sadržaj pripravka. Kod male djece, već i količine od 50 do 100 mg po kilogramu tjelesne težine mogu uzrokovati hipoglicemiju, hipotermiju i komu, koje se potiču ingestijom 1 do 2 mL 40%-tnog alkohola po kilogramu težine djeteta. (Fleisher i sur., 2010).

Dugotrajni učinci koje uzimanje malih količina etanola može imati na zdravlje i razvoj djece nisu dobro istraženi. FDA stoga preporučuje da proizvodi namijenjeni djeci ne bi uopće smjeli sadržavati etanol, dok je preporuka WHO-a za OTC lijekove da se sadržaj etanola ograniči na 0,5% kod lijekova namijenjenih djeci starosti do 6 godina, 5% za djecu starosti 6 – 12 godina i 10% kod lijekova za djecu stariju od 12 godina (EMA, 2014). Izvješće Europske agencije za lijekove donosi sljedeće preporuke: biljni farmaceutski pripravci koji sadrže etanol kontraindicirani su kod djece mlađe od 2 godine, istodobnu primjenu više pripravaka koji sadrže etanol treba izbjegavati, razmak između doza treba iznositi najmanje 4 sata kako bi se

izbjegla akumulacija etanola, pakiranje biljnih pripravaka koji sadrže više od 30 ml etanola morala bi se opremiti sigurnosnim zatvaračem za djecu i informacija o količini etanola morala bi biti jasno navedena na deklaraciji proizvoda. Također treba uzeti u obzir da se često koristi više pripravaka u kombinaciji pa etanol može povećati apsorpciju i farmakološki učinak drugih lijekova poput sedativa ili utjecati na eliminaciju drugih lijekova indukcijom ili inhibicijom citokroma (EMA, 2008a).

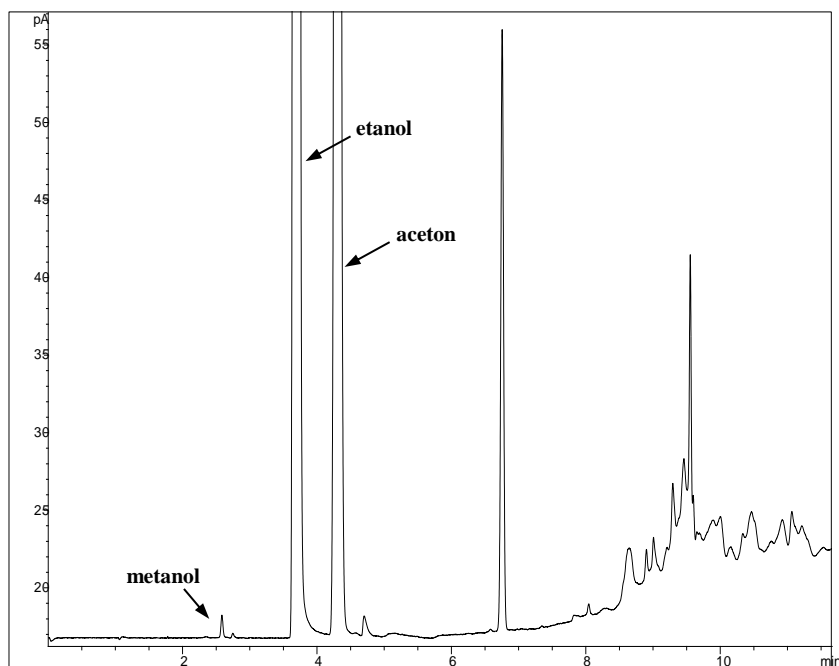
Sam metanol nije toksičan, već se uz enzime alkohol i aldehid dehidrogenazu metabolizira u toksični formaldehid i mravlju kiselinu koji uzrokuju depresiju središnjeg živčanog sustava, metaboličku acidozu i oštećenje vida. (Fleisher i sur., 2010). Prema Europskoj farmakopeji udio metanola u tekućim ekstraktima i tinkturama ne smije biti veći od 0,05% (v/v). Prema propisima američke farmakopeje i ICH smjernica, udio metanola kao ostatnog otapala ili organskog hlapljivog onečišćenja u farmaceutskim formulacijama i pomoćnim tvarima ne bi smio biti veći od 3000 µg/g pa svi ispitani uzorci odgovaraju propisima u pogledu sadržaja metanola.

U uzorku ekstrakta propolisa čiji je kromatogram prikazan na *Slici 7.* vidljivi su pikovi metanola, etanola i unutarnjeg standarda acetona, kao i ostalih lako hlapljivih otapala koja su se dobro ekstrahirala iz otopine. Najveći pik je, očekivano, pik etanola. Na kromatogramu su vidljivi i još neki pikovi koje bi daljnja istraživanja trebala identificirati, a potom i kvantificirati, vjerojatno hlapljivi alkoholi s više ugljikovih atoma poput n-propanola, izopropanola, n-butanola, izobutanola koji su očekivana onečišćenja u etanolu. Na deklaraciji se navodi da proizvod sadrži alkohol, ali količina nije definirana. Može se koristiti kod djece.



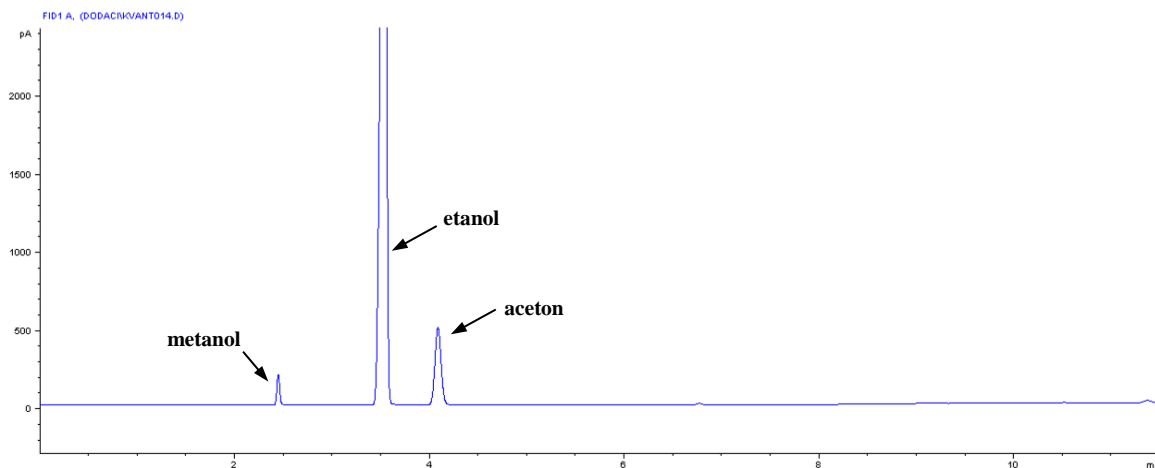
Slika 7. Kromatogram uzorka ekstrakta propolisa.

Na *Slici 8.* prikazan je kromatogram uzorka sirupa s propolisom namijenjen djeci. Vidljivi su pikovi etanola i unutarnjeg standarda acetona te maleni pik metanola. Na kromatogramu su također prisutni i pikovi drugih hlapljivih tvari. Na deklaraciji proizvoda ne navodi se etanol.



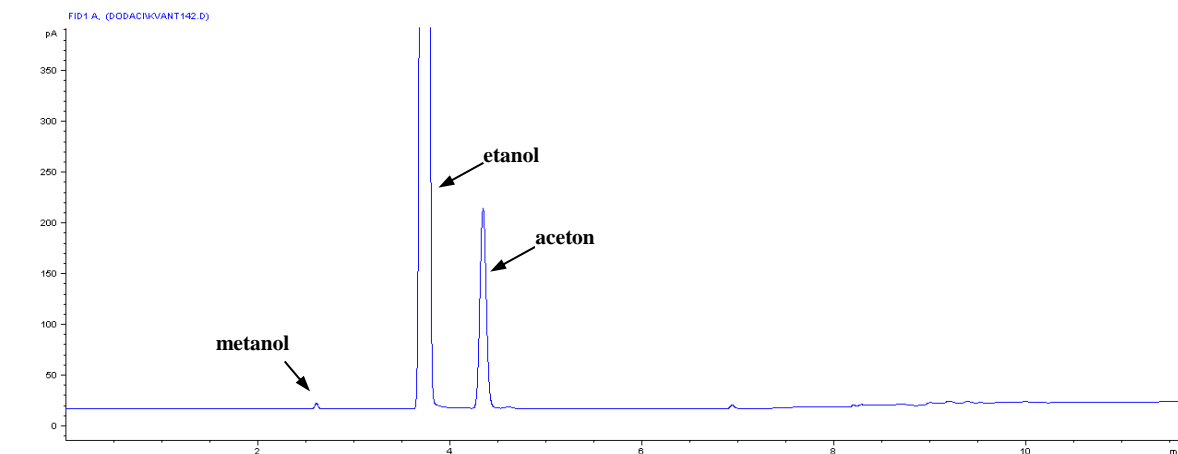
Slika 8. Kromatogram uzorka sirupa s propolisom 1.

Slika 9. prikazuje kromatogram uzorka kapi s propolisom. Uz veliki pik etanola i manji pik acetona, vidljiv je maleni pik metanola u uzorku. Na deklaraciji se ne navodi sadrži li proizvod etanol.

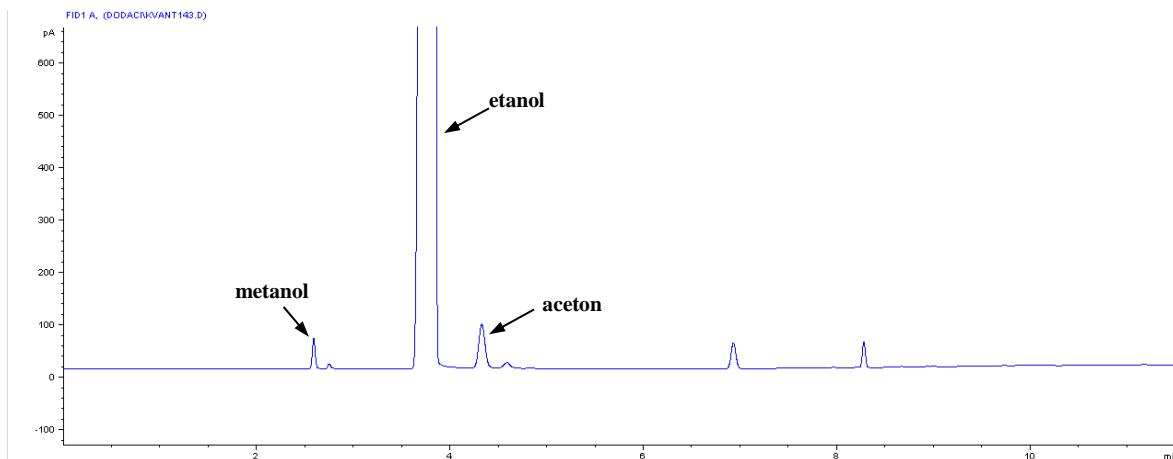


Slika 9. Kromatogram uzorka kapi s propolisom.

Uzorak propolis kapi čiji je kromatogram prikazan na *Slici 10.* sadrži veliku količinu etanola. Stoga je uzorak razrijeđen 100 puta, a dobiveni kromatogram prikazan je *Slici 11.* Uz pik etanola vidljiv je i maleni pik acetona.

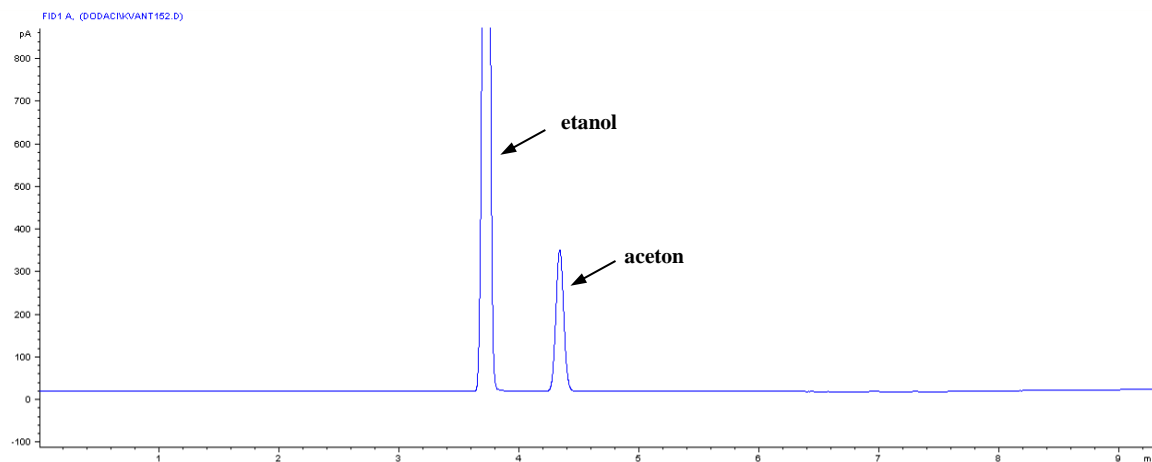


Slika 10. Kromatogram uzorka kapi s propolisom.



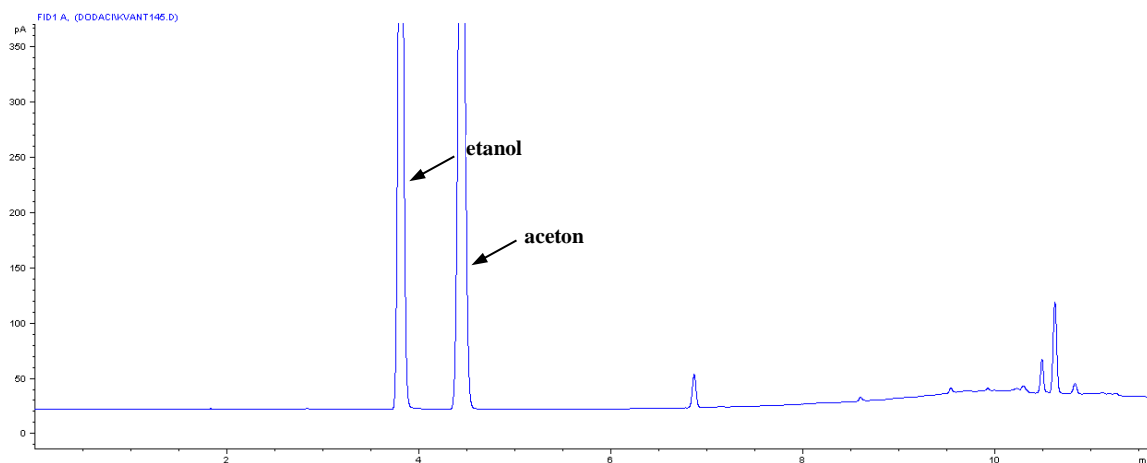
Slika 11. Kromatogram uzorka kapi s propolisom.

Slika 12. prikazuje kromatogram uzorka sirupa s propolisom. Na deklaraciji nije navedeno smije li se proizvod koristiti kod djece. U popisu sastojaka se ne navodi etanol, iako je prisutan u maloj količini. Uz pik etanola na kromatogramu je vidljiv i pik acetona. U uzorku nije prisutan metanol.



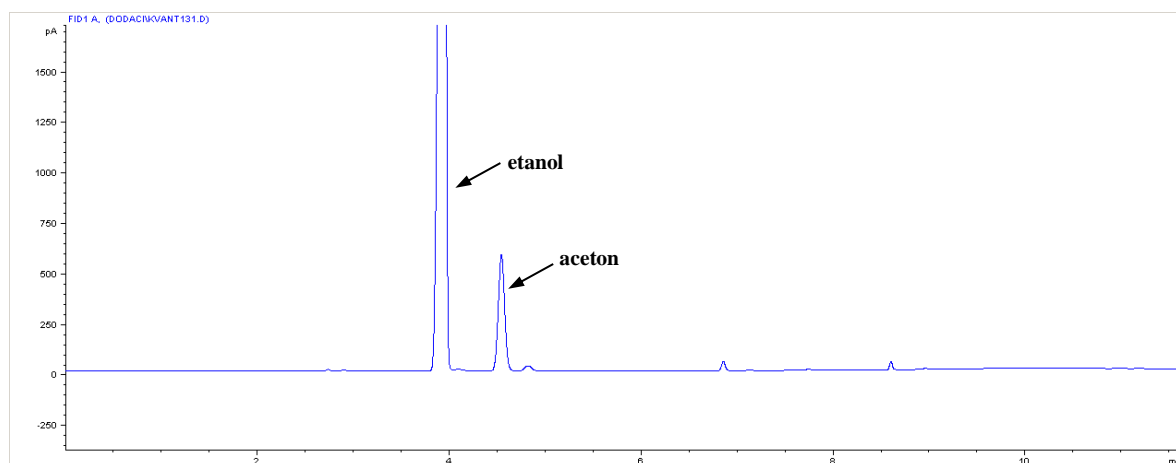
Slika 12. Kromatogram uzorka sirupa s propolisom 2.

Na kromatogramu drugog uzorka sirupa s propolisom za djecu (*Slika 13.*) vidljivi su pikovi etanola i acetona. Iako se etanol ne navodi na deklaraciji, prisutan je u vrlo maloj količini. U uzorku nije nađen metanol.



Slika 13. Kromatogram uzorka sirupa s propolisom za djecu.

Na *Slici 14.*, kromatogramu spreja s propolisom namijenjenog djeci, vidljiv je veći pik etanola uz manji pik acetona. Deklaracija proizvoda navodi da je ekstrakt propolisa u proizvodu na bezalkoholnoj bazi.



Slika 14. Kromatogram uzorka spreja s propolisom.

5. ZAKLJUČCI

Prethodno razvijena HSS-GC-FID metoda za identifikaciju i određivanje lakohlapljivih sastavnica kompleksnih uzoraka tekućih ljekovitih oblika primijenjena je za analizu 24 uzorka dodatka prehrani s propolisom. Rezultati su pokazali da svi uzorci, čak i oni deklarirani kao „bez etanola/alkohola“, sadrže etanol, a neki i male količine metanola. Utvrđeni udio etanola u uzorcima varirao je od 0,01 do 75,96%. U 6 uzoraka utvrđen je i metanol u rasponu od 0,003 do 0,026%, što je ispod propisane granice od 0,05% prema zahtjevima europske farmakopeje za tinkture i ekstrakte. No, utvrđena količina etanola kod nekih se uzoraka značajno razlikuje od deklarirane vrijednosti, ili pak etanol uopće nije bio deklariran, a pronađen je u uzorku. Kako većina proizvoda sadrži i druge biljne ekstrakte uz ekstrakt ili tinkturu propolisa, moguće je da kod nekih proizvoda propolis nije jedini sastojak koji doprinosi sadržaju etanola. Iako su u pitanju male količine etanola i/ili metanola s obzirom na dnevnu dozu, treba uzeti u obzir da se proizvodi s propolisom često daju djeci, a zbog subjektivnog doživljaja potrošača da su proizvodi sa sastojcima prirodnog porijekla manje opasni i štetni, posljedično se manje pazi na pravilno doziranje i čuvanje.

Kod ispitanih uzoraka po tom pitanju problematični su proizvodi s velikom udjelom etanola zbog mogućnosti da malo dijete bez nadzora roditelja unese cijeli sadržaj pripravka. Toksični učinci etanola mogu se pojaviti kod unošenja 1 do 2 mL 40%-tnog alkohola po kilogramu težine djeteta. Ukupne količine etanola u pojedinačnom pakiranju kod nekih proizvoda dosežu polovicu letalne doze za dijete od dvije godine starosti. U jednom analiziranom proizvodu pronađena je ukupna količina etanola od 23,2 mL, što je iznimno velika količina ako se uzme u obzir da je letalna doza etanola 3 g po kilogramu tjelesne težine. Za dijete od 2 godine i prosječnih 12 kg, letalna doza etanola iznosi 45 mL i pripravci s više od 30 mL etanola po pakiranju morali bi biti osigurani sigurnosnim čepom koji djeca ne mogu otvoriti prema FDA smjernicama. S obzirom na to da dugotrajni učinci koje uzimanje malih količina etanola može imati na zdravlje i razvoj djece nisu dobro istraženi, potreban je oprez pri davanju pripravaka koji sadrže etanolne iscrpine djeci.

S obzirom na to da je u svim analiziranim proizvodima pronađen etanol, a u nekima i njegovo najčešće onečišćenje - metanol, može se zaključiti da je iznimno važno kontrolirati sadržaj etanola i metanola u proizvodima s propolisom kod kojih granice ostatnih otapala nisu zakonski propisane.

6. LITERATURA

1. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatincic AG. Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z Naturforsch*, 2002, 57c, 530-533.
2. Burdock GA. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food Chem Toxicol*, 1998, 36, 347-363.
3. Direktiva 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća, 2002, Brusells, Official Journal L 183 (2002/46/EZ).
4. Dodaci prehrani, 2015., <http://www.zdravlje.hr>, pristupljeno 05.09.2015.
5. EMA Guideliene on excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use, 2003, Brusells, European Medicines Agency.
6. EMA Questions and Answers on Ethanol in the context of the 15 revision of the guideline on 'Excipients in the label and 16 package leaflet of medicinal products for human use, 2014, Brusells, European Medicines Agency.
7. EMA Reflection paper on ethanol content in herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products used in children, 2008, Brusells, European Medicines Agency.
8. EMA Report on the experience acquired as a result of the application of the provisions of Chapter 2a of Directive 2001/83/EC, as amended by Directive 2004/24/EC, on specific provisions applicable to traditional herbal medicinal products, 2008, Brusells, European Medicines Agency.
9. European Pharmacopoeia. 6.ed. Strasbourg. Council od Europe, 2007.
10. Fleicher GR, Ludwig S. Textbook of Pediatric Emergency Medicine. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2010, str. 1186.

11. Jasprica I. Imunomodulacijsko djelovanje polifenola iz propolisa – doktorska disertacija. Zagreb, 2007, 104-105.
12. Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Vladimir-Knežević S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm*, 2004, 54, 65-72.
13. Kosalec, I, Pepeljnjak, S, Bakmaz, M, Vladimir-Knežević, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm*, 2005, 423-430.
14. Medić-Šarić M et al. Polyphenols in Propolis and Wine. *Food Technol Biotechnol*, 2013, 51 (2), 159-170.
15. Mornar A, Sertić M, Nigović B, Lepan, B, Zovko Končić, M. Razvoj i validacija HSS-GC-FID metode za određivanje sadržaja lakohlapljivih sastavnica sirupa za iskašljavanje za djecu, *Farm Glas*, 2013, 69, 155-159.
16. Nigović B, Jurišić Grubišić R, Vuković J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - praktikum. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2014.
17. Nutrivigilancija, 2014, <http://www.farmaceut.org>, pristupljeno 05.09.2015.
18. Oršolić N, Knežević AH, Sver L, Terzić S, Bašić I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol*, 2004, 94, 307–315.
19. Pravilnik o dodacima prehrani, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 126 (NN/126/13).
20. 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 (NN/160/13).

21. 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 (NN/83/13).
22. Propolis – udruženje pčelara „Pčelinjak, [http:// www.pcelinjak.hr](http://www.pcelinjak.hr), pristupljeno 05.09.2015.
23. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to propolis (ID 1242, 1245, 1246, 1247, 1248, 3184) and flavonoids in propolis (ID 1244, 1644, 1645, 3526, 3527, 3798, 3799) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061, EFSA Journal, 2010, 8(10):1810.
24. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113, 1-14.
25. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133, 253-260.
26. Volpi N. New recent analytical approaches for the evaluation of the quality of propolis in relationship with scientific opinion of EFSA. *Nutra Cos*, 2012, 14-18.
27. Watson DG. *Pharmaceutical Analysis*. Edingburgh, Elsevier Limited, 2012, str. 265-299.
28. When Should an Internal Standard be Used?, 2012., <http://www.chromatographyonline.com>, pristupljeno 29.02.2016.
29. Zakon o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 39 (NN/39/13).
30. Dodaci prehrani, 2014., <http://www.zdravlje.hr>, pristupljeno 05.09.2015.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Na tržištu se nalazi mnogo farmaceutskih proizvoda koji sadrže propolis, dodan najčešće u obliku etanolnog ekstrakta. Zbog mogućnosti da se pri pripremi propolisa ne koristi etanol odgovarajuće čistoće ili dođe do nehotečajne zamjene s denaturiranim etanolom, moguća je pojava onečišćenja koja utječu na kvalitetu i sigurnost primjene gotovog proizvoda. Najčešće i očekivano onečišćenje u etanolu je metanol. Zbog mogućih toksičnih učinaka etanola i metanola, cilj rada bio je odrediti sadržaj metanola i etanola u farmaceutskim proizvodima s propolisom primjenom plinske kromatografije s *headspace* uzorkovanjem. Ova tehnika je odabrana jer omogućuje analizu hlapljivih tvari u složenim uzorcima uz vrlo malu prethodnu obradu uzorka.

Za analizu 24 uzorka s propolisom korištena je prethodno razvijena i validirana HSS-GC-FID metoda za određivanje sadržaja etanola i metanola u tekućim uzorcima. Podaci o sadržaju etanola i metanola dobiveni su računski uz pomoć jednadžbi kalibracijskih pravaca. Na temelju dobivenih rezultata, ustanovljeno je da svi analizirani uzorci sadrže etanol u rasponu od 0,01 do 75,96% v/v. Kod pojedinih uzoraka, u kojima je bila prisutna veća količina etanola, očekivano je pronađen i metanol u rasponu od 0,003 do 0,026% v/v.

Kod većine analiziranih uzoraka etanol nije bio deklariran, ili je njegova količina bila netočno navedena, čak i kod proizvoda namijenjenih djeci. Metanol, pronađen u nekoliko uzoraka, nije premašivao dopuštene granice. Iako se ne radi o količinama etanola opasnim za odrasle, kod djece puno manje količine mogu dovesti do akutnog trovanja. Prema smjernicama neki od ispitanih proizvoda ne bi se smjeli koristiti kod djece i morali bi biti pakirani sa zaštitnim zatvaračem. Radi se o proizvodima koji ne podliježu strogoj zakonskoj regulativi kao lijekovi, a potrošači manje obraćaju pažnju na pravilno doziranje i čuvanje zbog uvriježenog mišljenja da su dodaci prehrani prirodni, pa stoga i sigurni proizvodi. Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da je potrebna redovita kontrola ovih proizvoda.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/

BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ODREĐIVANJE UDJELA METANOLA I ETANOLA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM U FARMACEUTSKIM PROIZVODIMA S PROPOLISOM

Ivana Novak

SAŽETAK

Na tržištu se nalazi mnogo farmaceutskih proizvoda koji sadrže propolis, dodan najčešće u obliku etanolnog ekstrakta. Zbog mogućnosti da se pri pripremi propolisa ne koristi etanol odgovarajuće čistoće ili dođe do nehote zamjene s denaturiranim etanolom, moguća je pojava onečišćenja koja utječu na kvalitetu i sigurnost primjene gotovog proizvoda. Najčešće i očekivano onečišćenje u etanolu je metanol. Zbog mogućih toksičnih učinaka etanola i metanola, cilj rada bio je odrediti sadržaj metanola i etanola u farmaceutskim proizvodima s propolisom primjenom plinske kromatografije s headspace uzorkovanjem. Ova tehnika je odabrana jer omogućuje analizu hlapljivih tvari u složenim uzorcima uz vrlo malu prethodnu obradu uzorka.

Za analizu 24 uzorka s propolisom korištena je prethodno razvijena i validirana HSS-GC-FID metoda za određivanje sadržaja etanola i metanola u tekućim uzorcima. Podaci o sadržaju etanola i metanola dobiveni su računski uz pomoć jednadžbi kalibracijskih pravaca. Na temelju dobivenih rezultata, ustanovljeno je da svi analizirani uzorci sadrže etanol u rasponu od 0,01 do 75,96% v/v. Kod pojedinih uzoraka, u kojima je bila prisutna veća količina etanola, očekivano je pronađen i metanol u rasponu od 0,003 do 0,026% v/v.

Kod većine analiziranih uzoraka etanol nije bio deklariran, ili je njegova količina bila netočno navedena, čak i kod proizvoda namijenjenih djeci. Metanol, pronađen u nekoliko uzoraka, nije premašivao dopuštene granice. Iako se ne radi o količinama etanola opasnim za odrasle, kod djece puno manje količine mogu dovesti do akutnog trovanja. Prema smjernicama neki od ispitanih proizvoda ne bi se smjeli koristiti kod djece i morali bi biti pakirani sa zaštitnim zatvaračem. Radi se o proizvodima koji ne podliježu strogoj zakonskoj regulativi kao lijekovi, a potrošači manje obraćaju pažnju na pravilno doziranje i čuvanje zbog uvriježenog mišljenja da su dodaci prehrani prirodni, pa stoga i sigurni proizvodi. Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da je potrebna redovita kontrola ovih proizvoda.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 14 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: etanol, metanol, headspace, dodaci prehrani

Mentor: **dr. sc. Miranda Sertić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **dr. sc. Miranda Sertić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

doc. dr. sc. Iva Mucalo, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

prof. dr. sc. Ana Mornar Turk, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Drug Analysis and Control
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DETERMINATION OF METHANOL AND ETHANOL CONTENT IN DIETARY SUPPLEMENTS WITH PROPOLIS

Ivana Novak

SUMMARY

Many pharmaceutical products on the market contain propolis, usually added in the form of ethanolic extract. Because of possibility that during preparation of propolis ethanol of inadequate purity was used or was inadvertently replaced with denatured ethanol, there is a possibility of contamination affecting the quality and safety of the finished products. The expected and most commonly found contamination in ethanol is methanol. Because of potential toxic effects of ethanol and methanol, goal of this thesis was to determine content of methanol and ethanol in pharmaceutical products with propolis using gas chromatography with headspace sampling. This technique was chosen because it allows analysis of volatile compounds in complex samples with very little pretreatment of samples.

A previously developed and validated HSS GC-FID method for determination of ethanol and methanol content in liquid samples was used for analysis of 24 samples with propolis. Data on content of ethanol and methanol was obtained by calculation using calibration equations. Based on the results, it was found that all analyzed samples contained ethanol in a range from 0.01 to 75.96% v/v. In some samples which contained a large amount of ethanol, methanol was found, as expected, ranging from 0.003 to 0.026% v/v.

In most of analyzed samples ethanol was not declared, or its amount was incorrectly listed, even in products intended for children. Methanol, found in several samples, did not exceed the permitted levels. Although determined quantities of ethanol were not dangerous for adults, much smaller amounts can cause acute poisoning in children. According to guidelines some of the tested products should not be used in children and need to be packaged with a safety cap. As these products are not subject to strict legal regulations as medicines, and because general attitude and belief is that those supplements are natural and hence safe products, consumers pay less attention to correct dosing and storage of such products. Results of this thesis indicate that regular inspection of these products is needed.

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

Thesis includes: 43 pages, 14 figures, 1 table and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ethanol, methanol, headspace, dietary supplements

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Iva Mucalo, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ana Mornar Turk, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2016.