

# Određivanje etilen oksida u dodacima prehrani koji se koriste za liječenju upalne bolesti crijeva

---

Potočnjak, Jure

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:945527>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



**Jure Potočnjak**

**Određivanje etilen oksida u dodacima prehrani  
koji se koriste za liječenje upalne bolesti crijeva**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.



## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Primjena etilen oksida .....	2
1.2.	Toksičnost.....	2
1.3.	Znakovi upozorenja i piktogrami koji se koriste kod opasnosti za etilen oksid3	
1.4.	Strategije EU u smanjivanju štetnih učinaka EO na ljude .....	4
1.5.	Dodaci prehrani .....	5
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	9
3.	MATERIJALI I METODE.....	10
3.1.	Opis istraživanja .....	10
3.2.	Standardne otopine i priprema uzoraka .....	14
3.3.	Postupak analize .....	14
4.	REZULTATI .....	15
4.1.	Validacija metode .....	15
4.2.	Analiza uzoraka .....	17
5.	RASPRAVA.....	20
6.	ZAKLJUČAK.....	21
7.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	22
8.	LITERATURA.....	24
9.	SAŽETAK/SUMMARY .....	26

*Ovaj rad prijavljen je na kolegiju Analitika i kontrola lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova te u laboratorijima Sample Control d.o.o. pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk.*

Izrada diplomskog rada financirana je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost projektom „Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari koje se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva“ (HRZZ-UIP-2017-05-3949) voditeljice prof. dr. sc. Ane Mornar Turk



*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Ani Mornar Turk na stručnom vodstvu, savjetima i pomoći u izradi ovog diplomskog rada.*

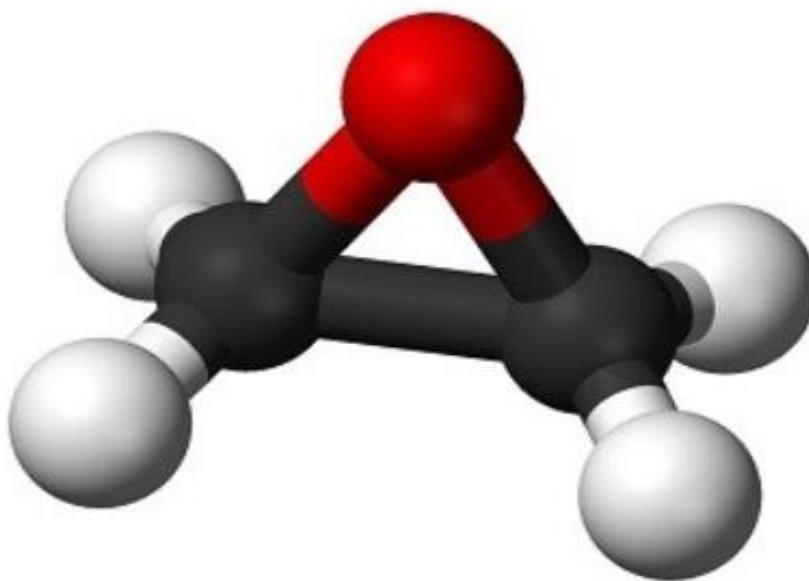
*Veliko hvala mojim prijateljima i studentskim kolegama koji su cijelo ovo vrijeme bili tu za mene i uljepšali mi studentske dane.*

*Na kraju, hvala mojim roditeljima i sestrama koji su me oduvijek podržavali u mojem obrazovanju i bez kojih ne bih bio ovo što danas jesam.*

## 1. UVOD

Etilen oksid, poznat još i kao oksiran ili epoksietan, tročlani je ciklički eter kemijske formule  $(\text{CH}_2)_2\text{O}$ . Na sobnoj temperaturi on je bezbojan i zapaljiv plin koji u kontaktu sa zrakom stvara eksplozivnu smjesu. Talište etilen oksida je na temperaturi  $-112,5^\circ\text{C}$ , a vrelište na temperaturi  $10,4^\circ\text{C}$ . Industrijski se dobiva reakcijom katalitičke oksidacije etilena (Vrsaljko, 2018). Spoj je topljiv u vodi, acetonu, benzenu, etanolu i dietil eteru (Lide, 1991).

Prvi puta etilen oksid je proizveden 1914. godine u procesu proizvodnje klorohidrina, u kojemu se etilen klorohidrin priprema reakcijom etilena s hipoklornom kiselinom te se prevodi u etilen oksid reakcijom s kalcijevim oksidom (Cawse i sur., 1980). Od 1931. ovaj se proces modernizirao radi bolje iskoristivosti reakcije, procesom direktne oksidacije plinovitog etilena u prisutstvu zraka ili kisika uz srebro kao katalizator pri povišenom tlaku 1-3 MPa i temperaturi  $200-300^\circ\text{C}$  (Rebsdatt i Mayer, 1987; Berglund i sur., 1990).



**Slika 1.** Trodimenzionalni model molekule etilen oksida (preuzeto iz Raos, 2021)

## 1.1. Primjena etilen oksida

Najrašireniju i ujedno najznačajniju primjenu etilen oksid ima u sterilizacijskom postupku pri sobnoj temperaturi koji se obično primjenjuje prilikom sterilizacije termolabilnih namirnica i tvari te kao takav predstavlja „zlatni standard“ za sterilizaciju pri niskim temperaturama. U procesu sterilizacije upotrebljava se kao fumigant za prehrambene proizvode i tekstil, kao sterilizacijsko sredstvo za kirurške instrumente, a primjenu je pronašao i kao sirovina za industrijsku proizvodnju akrilonitrila, etanilamina, etilen glikola i neionskih površinski aktivnih tvari (Hrvatska enciklopedija, 2021).

## 1.2. Toksičnost

Unatoč svim prednostima koje ovakav oblik sterilizacije sa sobom donosi, valja napomenuti kako upravo ovaj spoj izaziva zabrinutost u znanstvenim krugovima zbog svojih toksičnih učinaka, kako na čovjeka, tako i na okoliš. Na temelju različitih dokumenata i uredbi, etilen oksid je okarakteriziran kao karcinogena, mutagena i reproduktivno toksična tvar, stoga zahtjeva poseban oprez kao i određene granične vrijednosti u namirnicama i drugim sirovinama.

Na biološkoj razini, etilen oksid djeluje kao alkilirajući agens za DNA molekulu čime onemogućuje njezinu daljnju replikaciju a time i život same stanice. Kako ovakav učinak djeluje na mikroorganizme koje industrija ima za cilj uništiti, tako treba biti vrlo oprezan u pogledu zaštite krajnjih korisnika sirovine jer je djelovanje etilen oksida na mikrobe analogno djelovanju istog u ljudskim stanicama.

Postoje brojni prijavljeni slučajevi malignih oboljenja koji se mogu povezati s kroničnom izloženošću etilen oksidu iz okoliša u kojem su se nalazili pacijenti. Tako se za primjer mogu navesti tri slučaja leukemije koji su se pojavili između 1972. i 1977. u švedskoj tvornici u kojoj se primjenjivao etilen oksid za sterilizaciju medicinske opreme. U procesu sterilizacije koristila se smjesa etilen oksida i metil formata u jednakim omjerima. Dvije pacijentice, kod jedne je dijagnosticirana kronična mijeloidna leukemija dok je kod druge dijagnosticirana akutna mijeloidna leukemija, bile su izložene parama etilen oksida prosječno 8 sati dnevno u skladištu u kojem su radile. Treći slučaj je bio dijagnoza primarne mikroglobulinemije kod pacijenta koji je bio upravitelj te iste tvornice od 1965. te je bio izložen parama etilen oksida prosječno 3 sata tjedno (Hogstedt i sur., 1979b). U jednoj drugoj studiji istog autora ispitivan je učinak etilen oksida na pojavnost karcinoma kod radnika u švedskoj tvornici za sterilizaciju medicinskog pribora u kojoj se etilen oksid proizvodio u klorohidrijskom procesu. Ovo kohortno istraživanje uključivalo je 89 zaposlenika koji su kontinuirano bili izloženi etilen oksidu, 86 zaposlenika u

održavanju koji su bili isprekidano izloženi te 66 zaposlenika koji nisu bili izloženi učinku etilen oksida. Svi zaposlenici bili su izloženi ili zaposleni bez izlaganja etilen oksidu minimalno godinu dana. Prosječna izloženost u razdoblju od 1941.-1947. procijenjena je na ispod 25 mg/m<sup>3</sup>, uz povremeno odstupanje od čak 1300 mg/m<sup>3</sup>. 1963. godine proizvodnja etilen oksida je prestala, međutim sam spoj se nastavio koristiti u industrijskim postupcima zbog čega se u određenim uzorcima izabranima nasumično pokazalo kako sadrže etilen oksid prosječno 1-10 mg/m<sup>3</sup>, uz povremeni porast koncentracije. Od preostalih kemikalija, ispitanici su bili izloženi i kloralu, DDT-u, kloroformu, etilen-glikolu i drugima. Skupina je praćena u periodu od siječnja 1961. do prosinca 1985. Izlaganje etilen oksidu rezultiralo je smrću 34 zaposlenika i to svih onih koji su bili neprekidno izloženi spoju. Među njima, 14 ispitanika je umrlo od karcinoma od kojih je 5 imalo karcinom želuca, a 2 ispitanika imala su leukemiju. Među ispitanicima koji su bili isprekidano izloženi kao i među onima koji nisu bili izloženi, nije bilo smrtnih slučajeva (Hogstedt i sur., 1988).

### 1.3. Znakovi upozorenja i piktogrami koji se koriste kod opasnosti za etilen oksid



**Slika 2.** Piktogrami koji se koriste pri upozoravanju na opasnost od etilen oksida

Na gore navedenoj slici nalaze se znakovi upozorenja koji se koriste prilikom označavanja prostorijske, ambalaže i sl. u kojima se nalazi opasnost od štetnog učinka etilen oksida. Redom s lijeva na desno: „Zapaljivo“; „Nagrizajuće“; „Akutna toksičnost“ i „Opasnost od aspiracije, karcinogeno, mutageno, reproduktivno toksično“.



#### 1.4. Strategije EU u smanjivanju štetnih učinaka EO na ljude

Referirajući se na brojne studije o štetnosti etilen oksida, Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicinal Agency*, EMA) je donijela poseban dokument koji točno i precizno određuje uvjete pod kojima je dozvoljena sterilizacija sirovina ovim spojem. Proces sterilizacije etilen oksidom potrebno je izvoditi i uskladiti s Ph. Eur. 5.1.1 i 5.1.2. Ovakav oblik sterilizacije je moguć samo u slučajevima kada niti jedan drugi predviđeni postupak nije moguće ostvariti. Procjena rizika bi trebala uključiti rezidue poznatih genotoksičnih spojeva (uključujući etilen oksid i halogenirane etilenhidrine). Ovo bi trebalo biti evaluirano u skladu sa zahtjevima ICH M7 „Procjena i kontrola DNA reaktivnih (mutagenih) nečistoća u farmaceutskim sirovinama s ciljem ograničavanja potencijalnog rizika nastanka karcinoma“, osim u slučajevima kada sirovina o kojoj se radi nije u domeni ovih smjernica (EMA, 2019).

**Tablica 1.** Granične vrijednosti za toksične rezidue nakon sterilizacije etilenom kod materijala i sirovina kod kojih se ICH M7 granične vrijednosti ne primjenjuju

Materijal	Etilen oksid	Etilen klorohidrin (ili bilo koji drugi halogenirani etilenhidrin)
Sirovine	1µg/g	50µg/g
Gotovi proizvodi (ako se koristi na gotovom proizvodu)	1µg/g	50µg/g
Spremnik	1µg/ml	50µg/ml

„Uredbom (EU) br. 231/2012 predviđeno je da se etilen oksid ne smije upotrebljavati za sterilizaciju prehrambenih aditiva. Međutim, ne postoji granična količina prisutnosti etilen oksida u pogledu svih prehrambenih aditiva. U skladu s tom uredbom granična vrijednost od najviše 0,2 mg/kg etilen oksida utvrđena je samo za prehrambene aditive u čijoj se proizvodnji upotrebljava etilen oksid“ (UREDBA KOMISIJE (EU) 2022/1396, 2002). Kasnije su se pravila vezana za dopuštene razine etilen oksida dodatno postrojila čime se donosi i novi dokument na temelju kojega granične vrijednosti etilen oksida (kao zbroj etilen oksida i 2-kloretanola izraženi kao etilen oksid) ne smiju prelaziti 0,1 mg/kg za određene prehrambene aditive kao i za njihove mješavine (UREDBA KOMISIJE (EU) 2022/1396, 2022).

Na temelju prethodno donesenih zaključaka te prikupljenih spoznaja i cjelokupnog znanja o etilen oksidu, može se zaključiti kako je stroga kontrola sadržaja etilen oksida od ključnog značaja za zdravlje i sigurnost potrošača. Javnost je već dulji period upoznata s ovom problematikom preko različitih medija preko kojih se nerijetko prikazuju vijesti vezane za povlačenje brojnih namirnica i drugih sirovina s tržišta zbog prisutnosti rezidua etilen oksida

koje prelaze minimalne dozvoljene koncentracije u samom proizvodu. U tom pogledu zahvaćene su brojne industrije, kako prehrambena tako i farmaceutska, tekstilna i brojne druge.

### **1.5. Dodaci prehrani**

Dodaci prehrani pripravci su proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom te im je svrha dodatno obogatiti uobičajenu prehranu. Oni nisu namijenjeni liječenju bolesti, nego očuvanju zdravlja. Praksa pokazuje kako je pacijentima nejasna granica između bezreceptnog lijeka i dodatka prehrani; a hoće li neki proizvod biti registriran kao prvo ili drugo, često ovisi samo o dozi aktivnih tvari u proizvodu. Međutim, dodaci prehrani ne prolaze postupak odobravanja kao lijekovi i njihova je legislativa opisana u Zakonu o hrani te je u nadležnosti Ministarstva zdravlja, dok su bezreceptni lijekovi u nadležnosti HALMED-a (Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode) i regulirani su Zakonom o lijekovima. Nadalje, dok za sve lijekove, uključujući one s bezreceptnim statusom, postoji razvijen sustav obaveznog prijavljivanja i praćenja nuspojava (i nakon što se već nađu na tržištu), za dodatke prehrani ne postoji takva obaveza te sigurnost njihove primjene nije pod stalnim nadzorom. To znači da kontrola kvalitete dodataka prehrani seže do analize zdravstvene i sanitarne ispravnosti, no ne i do dokazivanja djelotvornosti kao kod „pravih“ lijekova (Batistić, 2020). Zdravstvene i prehrambene tvrdnje koje se koriste pri označavanju i reklamiranju dodataka prehrani moraju biti regulirane kako bi se zaštitilo zdravlje potrošača, ali i njihova prava na informiranost. Uredba br. 1924/2006. Europskog parlamenta i Vijeća postavila je osnovu za izradu javnog registra prehrambenih i zdravstvenih tvrdnji. Registar sadrži sve tvrdnje za koje je predan zahtjev za odobrenje od strane Komisije, zajedno s informacijama o njihovom odobrenju i uvjetima korištenja (<http://ec.europa.eu/nuhclaims/>). Proizvođači su dužni pri predaji zahtjeva za odobrenje tvrdnje priložiti znanstvene dokaze (Salapić, 2015).

Zahtjeve za odobrenje tvrdnji zaprimaju nacionalne nadležne institucije, što je u slučaju Republike Hrvatske Ministarstvo zdravlja. Ministarstvo je dužno obavijestiti Europsku agenciju za sigurnost hrane o zaprimanju zahtjeva te ustupiti sve dokumente koje zahtjev sadrži (NN/39/2013). Agencija donosi mišljenje o zaprimljenom zahtjevu te može postaviti dodatne uvjete i ograničenja za korištenje tvrdnje. Odluku o odobrenju donosi Europska komisija te se ona može razlikovati od mišljenja Agencije, no u tom slučaju Komisija treba obrazložiti različito mišljenje od Agencije (EC 1924/2006).

Među biljkama koje se koriste za izradu dodataka prehrani za liječenje upalne bolesti crijeva postoji nekoliko različitih vrsta koje pokazuju učinak u borbi protiv Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Neke od njih su:

- *Aloe vera*, *Xanthorrhoeaceae* – aloe vera
- *Andrographis paniculata*, *Acanthaceae* – kineski androfagis
- *Artemisia absinthium*, *Asteraceae* – gorki pelin
- *Boswellia serrata*, *Burseraceae* – indijski tamjanovac
- *Cannabis sativa*, *Cannabaceae* – indijska konoplja
- *Curcuma longa*, *Zingiberaceae* – kurkuma

*Aloe vera* je tropska biljka koju ljudi koriste od davnina, ponajviše radi zamijećenog protuupalnog učinka koji daje sok/gel iz listova ove biljke. Gel koji se koristi i u kozmetičke svrhe sadrži acetilirane manane, polimanane, antrakinonske C-glikozide, antrone, emodin i lektine koji imaju biološki učinak. U istom istraživanju otkriveno je da je kromon aloesin ključan za kontrolu upalnog procesa u crijevima. Uz njega, utvrđeno je da i aloin, kao i aloj- emodin, imaju funkciju inhibicije aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO) koja je uključena u aktivnost neutrofila koji su jedan od bitnih faktora upalnog procesa kod IBD-a (Algieri i sur., 2015).



**Slika 3.** Polisaharidni gel iz listova biljke *Aloe vera* (preuzeto iz Sachar, 2018)

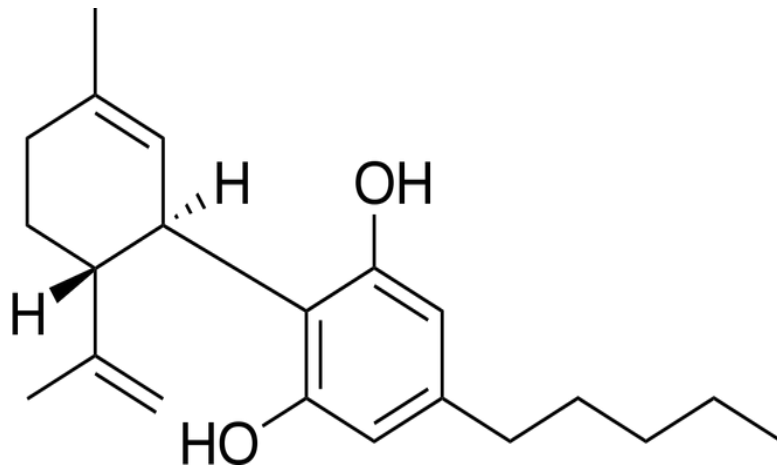
*Andrographis paniculata* je biljka koja se može pronaći uglavnom u Indiji i na Šri Lanki, te u nekim dijelovima Jugoistočne Azije, gdje se ekstrakti ove biljke koriste za liječenje upalnih procesa u ljudi. Fitokemijske analize ove biljne droge pokazale su da ključnu ulogu u

protuupalnom odgovoru imaju diterpenski laktoni, od kojih je najznačajniji andrografolid. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja andrografolida temelji se na inhibiciji transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B koji je bitan za sintezu prouupalnih citokina i ostalih medijatora upale kod IBD (Algieri i sur., 2015).

*Artemisia absinthium* biljka je poznata širom svijeta te se nerijetko koristi u medicinske svrhe za liječenje različitih upalnih procesa u tijelu. Gorki pelin je opisan u brojnim svjetskim farmakopejama, a prema njima, ljekoviti dijelovi biljke su listovi i stabljike. Dva različita klinička istraživanja pokazala su pozitivan učinak gorkog pelina na liječenje Crohnove bolesti. Smatra se da je TNF- $\alpha$  ključan upalni medijator kod imunskog odgovora u pacijenata s Crohnovom bolesti. Istraživanje je pokazalo da flavonoidi iz ove biljke, poput 5,6,3',5'-tetrametoksi 7,4'-hidroksiflavona (p7F), pokazuju značajni protuupalni učinak, djelomično inhibicijom COX-2 i iNOS u stimuliranim imunskim stanicama (Algieri i sur., 2015).

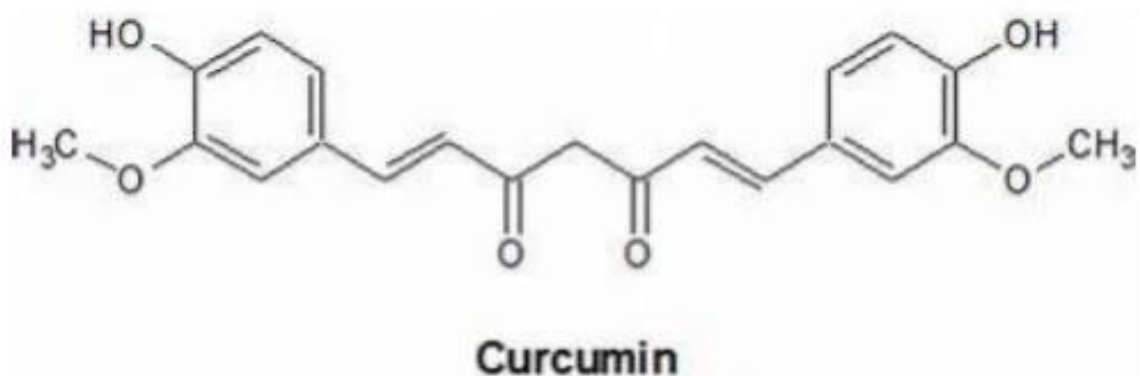
Smola dobivena ekstrakcijom iz biljke *Boswellia serrata*, kod nas poznate kao Indijski tamjanovac, tradicionalno se koristi u Ajurvedskoj medicini u liječenju upalnih bolesti, poglavito ulceroznog kolitisa. Prema nekim člancima objavljenima u Njemačkoj, čak 36 % pacijenata s upalnom bolesti crijeva koristi ovu biljku u terapijske svrhe te se kod svih pacijenata pokazalo da ekstrakt indijskog tamjanovca ima pozitivan učinak na ublažavanje simptoma ulceroznog kolitisa. Pretpostavlja se da triterpeni, od kojih su najzastupljenije bosvelične kiseline, imaju glavnu ulogu u smanjenju upalnih reakcija uzrokovanih pojavom ulceroznog kolitisa. *In vivo* pokusi na štakorima s ulceroznim kolitisom pokazali su da triterpeni ove biljke imaju antioksidativan učinak te da smanjuju lipidnu peroksidaciju u stanicama crijeva, što je djelomično odgovorno za nastanak upalne bolesti crijeva (Algieri i sur., 2015).

*Cannabis sativa*, kod nas poznata kao indijska konoplja, je biljka koja se već duže vrijeme koristi i u Hrvatskoj za ublažavanje tegoba poput kronične boli kod pacijenata s multiplom sklerozom i karcinomima različitih tipova. Nadalje, često se koristi za liječenje različitih gastrointestinalnih bolesti, poput anoreksije, povraćanja, abdominalne boli, proljeva i dijabetičke gastropareze. Na temelju različitih istraživanja, pokazalo se da indijska konoplja sadrži preko 60 različitih kanabinoida koji imaju ljekovito djelovanje. Otkriveno je da sustav kanabinoidnih receptora u ljudi ima bitnu ulogu u regulaciji imunoreakcije, uključujući i u gastrointestinalnom sustavu. Na tragu takve spoznaje, može se zaključiti kako kanabinoidi, predvođeni kanabidiolom (CBD), mogu imati terapijski potencijal kod pacijenata s upalnim bolestima crijeva (Algieri i sur., 2015).



**Slika 4.** Kemijska struktura kanabidiola – jednog od glavnih aktivnih sastojaka biljke *Cannabis sativa* (preuzeto iz Žuna, 2018)

*Curcuma logna* biljka je iz porodice đumbirovki, podrijetlom iz Indije, čiji se podanak od davnina koristi u terapijske svrhe ponajprije u Ajurvedskoj medicini i to za liječenje upalnih stanja. Glavni aktivni sastojak ove biljke je kurkumin koji je u novije doba postao predmetom istraživanja, iz čega su doneseni zaključci kako ovaj spoj ima izraženo antioksidativno, antifungalno, antimikrobno, antikancerogeno i protuupalno djelovanje. Između ostalog, pokazalo se da kurkumin ima pozitivan učinak na prevenciju i liječenje stanja povezanih s upalnim bolestima crijeva. Pretklinička istraživanja pokazala su da kurkumin ima povoljan učinak na liječenje različitih vrsta kolitisa. Također, smatra se da antioksidativno djelovanje kurkumina, u vidu neutralizacije slobodnih radikala u stanicama crijeva, igra bitnu ulogu u sprječavanju razvoja upalnih bolesti crijeva (Algieri i sur., 2015).



**Slika 5.** Kemijska struktura kurkumina (preuzeto iz Soletti i sur., 2022)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Etilen oksid kemijski je spoj koji je, između ostalog, pronašao značajnu primjenu u sterilizacijskom postupku, ponajviše za sterilizaciju medicinskih instrumenata i farmaceutskih sirovina za izradu lijekova i dodataka prehrani. Glavna prepreka koja koči širu primjenu ovog sterilizacijskog agensa jest njegova citotoksičnost, točnije genotoksičnost, koja je već davnije otkrivena kao bitan problem. Shodno tome doneseni su brojni zakoni i regulative diljem svijeta pa tako i u EU s ciljem određivanja minimalnih vrijednosti rezidua etilen oksida u sirovinama, gotovim proizvodima i spremnicima koji se koriste u medicinske i prehrambene svrhe. Opća javnost sve je više informirana o štetnom djelovanju ovog spoja te mediji kao glavni oglašivači pokušavaju osvijestiti ozbiljnost problema koji sa sobom etilen oksid donosi, zbog čega građani mogu svjedočiti brojnim povlačenjima namirnica i ostalih proizvoda s polica ljekarni i trgovina radi nedozvoljenih vrijednosti koncentracije etilen oksida u njima.

Cilj ovog diplomskog rada je, na primjeru dodataka prehrani koji se koriste za liječenje upalne bolesti crijeva sakupljenih iz različitih dijelova svijeta, istražiti postoji li zaista opravdana zabrinutost stručnjaka u pogledu kontaminacije tih proizvoda etilen oksidom. U istraživanje su uključena 53 uzorka različitih dodataka prehrani koji dolaze u različitim dozirnim oblicima iz različitih dijelova svijeta. Bitna zadaća jest i utvrditi u kojem od farmaceutskih oblika se nalazi veća količina onečišćenja etilen oksidom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Opis istraživanja

U istraživanje su bila uključena 53 dozirna oblika komercijalno dostupnih dodataka prehrani (S1-S35) i sastojaka dodataka prehrani (S36-S51) napravljeni na bazi kurkume, indijskog tamjana, kineskog androfagisa i crnog papra dobivenih iz različitih lokalnih ljekarni, trgovina zdrave prehrane i internetskih trgovina. Uzorci su šifrirani i skladišteni prema uputama proizvođača. Na svim uzorcima provedena je analiza kojom se utvrdila točnost roka valjanosti proizvoda. Detaljan opis svih uzoraka nalazi se na **Tablici 2**, a napravljen je na temelju informacija koje se nalaze na pakiranju svakog od dodataka prehrani. Među analiziranim uzorcima, 25 njih dolazi u obliku tvrdih kapsula (S1-S25), 4 u obliku mekih kapsula (S26-S29), 6 u obliku tableta (S30-S35), dok su 2 uzorka dobivena iz dodatka prehrani napravljenog u obliku tinkture (S52 i S53). Ostatak koji čini 16 uzoraka potječe od dodataka prehrani napravljenih u formi praha korijena, praha lista, ekstrakta smole i uljne smole. Ovi proizvodi su napravljeni u 37 različitih tvornica koje potječu iz 15 različitih zemalja u svijetu. Rokovi valjanosti svih proizvoda varirali su između 2023. i 2024. godine te je svaki uzorak testiran prije isteka roka valjanosti odgovarajućeg dodatka prehrani. Dodaci prehrani međusobno su se razlikovali s obzirom na dio biljke od kojeg su načinjeni, odnosno s obzirom na oblik iscrpine biljne droge, stoga se mogu razlikovati suhi ekstrakt, polusuhi ekstrakt, tekući ekstrakt, smola, liofilizat i micelarna otopina. Među uzorcima, 19 njih je sadržavalo ekstrakte jedne biljke, dok je 16 njih sadržavalo ekstrakte nekoliko različitih biljaka.

**Tablica 2.** Podatci od proizvođača koji se nalaze na oznaci dodataka prehrani.

Oznaka uzorka	Formulacija uzorka	Biljna vrsta	Preporučena dnevna doza	Broj dozirnih jedinica u pakiranju	Neto težina proizvoda	Zemlja podrijetla
S1	tvrde kapsule	Kurkuma, Crni papar	2 kapsule	60	24 g	Hrvatska
S2	tvrde kapsule	Kurkuma	2 kapsule	60	30 g	Hrvatska
S3	tvrde kapsule	Kurkuma	2 kapsule	60	nije označeno	Italija
S4	tvrde kapsule	Kurkuma, Crni papar	1 kapsula uz jelo	30	19 g	Austrija

S5	tvrde kapsule	Kurkuma, Crni papar	2 kapsule uz jelo	60	35,22 g	Hrvatska
S6	tvrde kapsule	Kurkuma, Crni papar	6 kapsula 45 min. prije obroka	60	nije označeno	nema informacija
S7	tvrde kapsule	Kurkuma	1 kapsula	66	77 g	Kanada
S8	tvrde kapsule	Kurkuma, Crni papar	2 kapsule uz obrok	60	30 g	Nizozemska
S9	tvrde kapsule	Kurkuma, Crni papar	6 kapsula	60	nije označeno	Tajland
S10	tvrde kapsule	Kurkuma	3 kapsule poslije obroka	100	nije označeno	Tajland
S11	tvrde kapsule	Indijski tamjan	2 kapsule	60	nije označeno	Indija
S12	tvrde kapsule	Indijski tamjan	2 kapsule uz obrok	60	nije označeno	Indija
S13	tvrde kapsule	Indijski tamjan	2 kapsule	60	nije označeno	UK
S14	tvrde kapsule	Indijski tamjan	2 kapsule	60	nije označeno	Indija
S15	tvrde kapsule	Indijski tamjan	1 kapsula uz obrok	60	nije označeno	Hrvatska
S16	tvrde kapsule	Indijski tamjan	2 kapsule uz obrok	80	nije označeno	Hrvatska
S17	tvrde kapsule	Kineski androfagis	1 kapsula	60	nije označeno	Indija
S18	tvrde kapsule	Kineski androfagis	2 kapsule	30	nije označeno	Indija
S19	tvrde kapsule	Kineski androfagis	4 kapsule uz obrok	60	nije označeno	Tajland
S20	tvrde kapsule	Kurkuma, Kineski androfagis	1 kapsula uz obrok	60	nije označeno	Indija
S21	tvrde kapsule	Kurkuma, Crni papar	2 kapsule poslije obroka	60	30 g	Hrvatska



S22	tvrde kapsule	Kurkuma, Indijski tamjan	2 kapsule uz obrok	60	58,8 g	Hrvatska
S23	tvrde kapsule	Kurkuma, Kineski androfagis	2 kapsule	60	nije označeno	SAD
S24	tvrde kapsule	Kurkuma, Kineski androfagis	6 kapsula uz obrok	60	nije označeno	SAD
S25	tvrde kapsule	Kurkuma, Indijski tamjan	3 kapsule	60	nije označeno	SAD
S26	meke kapsule	Kurkuma, Crni papar	1 kapsula uz obrok	30	nije označeno	Hrvatska
S27	meke kapsule	Kurkuma	8 kapsula	60	55 g	Belgija
S28	meke kapsule	Kurkuma	1 kapsula uz obrok	30	38,4 g	SAD
S29	meke kapsule	Kurkuma	1 kapsula uz obrok	30	17,8 g	Hrvatska
S30	tablete	Kurkuma, Crni papar	2 tablete prije obroka	nije označeno	nije označeno	Tajland
S31	tablete	Kurkuma	1 tableta uz obrok	30	49 g	SAD
S32	tablete	Kurkuma	2 tablete	nije označeno	nije označeno	UK
S33	tablete	Kurkuma, Crni papar	10 tableta	300	90 g	Njemačka
S34	tablete	Indijski tamjan	2 tablete uz obrok	40	67,2 g	SAD
S35	tablete	Kurkuma, Indijski tamjan	2 tablete prije obroka	60	Nije označeno	SAD
S36	prašak	Kurkuma, Indijski tamjan, Crni papar	nije označeno	nije označeno	100 g	Indija

S37	prašak	Kurkuma, Crni papar	nije označeno	nije označeno	27 g	Nizozemska
S38	prašak	Indijski tamjan	nije označeno	nije označeno	100 g	Indija
S39	prašak	Kineski androfagis	nije označeno	nije označeno	100 g	Indija
S40	prašak	Kineski androfagis	nije označeno	nije označeno	100 g	Indija
S41	prašak	Kineski androfagis	nije označeno	nije označeno	100 g	Indija
S42	prašak	Crni papar	nije označeno	nije označeno	100 g	Indija
S43	prašak	Kurkuma	nije označeno	nije označeno	200 g	Hrvatska
S44	prašak	Kurkuma	nije označeno	nije označeno	100 g	Njemačka
S45	prašak	Kurkuma	nije označeno	nije označeno	100 g	Hrvatska
S46	prašak	Kurkuma	nije označeno	nije označeno	100 g	Hrvatska
S47	prašak	Kurkuma	nije označeno	nije označeno	100 g	Austrija
S48	prašak	Kurkuma	nije označeno	nije označeno	50 g	Hrvatska
S49	smola	Indijski tamjan	nije označeno	nije označeno	100 g	Grčka
S50	smola	Indijski tamjan	nije označeno	nije označeno	200 g	Turska
S51	smola	Indijski tamjan	nije označeno	nije označeno	100 g	Nema informacija
S52	tinktura	Kurkuma	1,2 ml	nije označeno	50 mL	Bugarska
S53	tinktura	Kurkuma	60 kapi	nije označeno	50 mL	Hrvatska

### 3.2. Standardne otopine i priprema uzoraka

S obzirom na veliku reaktivnost etilen oksida, ispitivane otopine pripremale su se na niskim temperaturama. Također, svi reagensi kao i ispitivane otopine čuvali su se na hladnom prije upotrebe. Otvoreno je 20 dozirnih jedinica svakog uzorka tvrdih kapsula (S1-S25) kako bi se skupio prašak te su uzorci samljeveni ukoliko je bilo potrebno. Također, 20 dozirnih jedinica svakog od uzoraka tableta samljeveno je u porculanskom tarioniku pistilom (S30-S35). Od preparata prašaka i smole uzeto je po 100 g te je samljeveno u fini prašak (S36-S51). Dodaci prehrani koji su bili u tekućim formulacijama prije uzorkovanja su dobro promućkani radi homogenizacije uzorka (S52 i S53). Nadalje, po 2 g svakog od homogeniziranih uzoraka dodano je u polipropilensku epruvetu nakon čega je u svaku epruvetu dodan unutarnji standard (2-kloretanol D4) te smjese acetonitrila i ultračiste vode u volumnom omjeru 9:1. Tako pripremljeni uzorci homogenizirani su na homogenizatoru (Mini GTM 1600, Spex Sample Prep, SAD) te centrifugirani 10 min na 5000 x g na temperaturi od -10°C uz korištenje centrifuge (Z 32 HK, Hermle, Gosheim, Njemačka). U završnom koraku, uzorci su se otparavali uz primjenu rotacijskog evaporizatora (model EV311H by LabTech S.R.L., Sorisole, Italija). Na poslijetku, uzorci su se rekonstituirali otapanjem u acetonitrilu te su prebačeni u bočice za GC-MS/MS analizu.

### 3.3. Postupak analize

Analiza uzoraka provedena je spregnutom tehnikom plinske kromatografije s tandemskom masenom spektrometrijom (GC-MS/MS TQ8050, Shimadzu, Kyoto, Japan) i DB-17MS kapilarom (dužine 20 m, promjera 0,18 mm te debljine filma 0,18  $\mu\text{m}$ ) od Agilent Technologies (Santa Clara, California, SAD). Prilikom plinske kromatografije primjenjivana je gradijentna metoda uz početnu temperaturu pećnice 50°C 2 minute, te postupno podizanje temperature za 15°C/min do 250°C. Ionizacija analita je provedena na temperaturi izvora od 230°C. Rezultati su detektirani koristeći tandemsku masenu spektrometriju uz višestruki način praćenja reakcija (MRM) uz praćenje 2-kloretanola: 80,0  $\rightarrow$  31,0 (kvantifikator) i 82,0  $\rightarrow$  31,0 (kvalifikator). Unutarnji standard 2-kloretanol D4 pratio se: 84,0  $\rightarrow$  33,0 (kvantifikator) i 86,0  $\rightarrow$  33,0 (kvalifikator). Prikupljanje podataka kao i njihova kasnija obrada provedeni su primjenom LabSolution Software Version 4,52 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Validacija metode

Validacija analitičke metode je postupak kojim se određuje i dokumentira da je analitička metoda prikladna za određenu primjenu. Validacija osigurava da će se u propisanim uvjetima primjenom validirane metode dobiti valjani rezultati. Prema regulatornim zahtjevima dobre proizvođačke i laboratorijske prakse (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP i engl. *Good Laboratory Practice*, GLP) postupci validacije analitičkih postupaka postali su obveza i provode se prema ICH smjernicama (engl. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) članak Q2. Potrebno ju je provesti pri razvoju i uvođenju nove metode te kod promjene bilo kojeg dijela već validirane analitičke metode (Ahuja, 2001).

Validacija optimiranog analitičkog postupka provedena je sukladno ICH smjernicama Q2 (R2). Ispitani su sljedeći validacijski parametri: linearnost, granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD), granica određivanja (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ), točnost i preciznost.

Linearnost analitičke metode jest njezina mogućnost da unutar određenog koncentracijskog raspona daje odazive koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku (ICH, 2005). Utvrđuje se mjerenjem na pet koncentracijskih razina pri čemu se svaka razina ispituje u triplicatu. U ovom radu ispitano je linearno područje metode za određivanje etilen oksida u rasponu od 0,02 ppm do 0,2 ppm. U navedenom području postignuta je izvrsna linearnost metode (**Tablica 3**).

Granica identifikacije (LOD) najniža je koncentracija analita koja se može sa sigurnošću identificirati, ali ne i odrediti pri zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (LOQ) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode (ICH, 2005).

Prema ICH smjernicama LOD i LOQ moguće je odrediti na nekoliko različitih načina. Jedan od načina je razrjeđivanje standardne otopine dok se ne dobije otopina kod koje je omjer signala analita i šuma za LOD u omjeru 3:1 ili 2:1, a za LOQ u omjeru 10:1. Nadalje, LOD i LOQ mogu se odrediti iz standardne devijacije signala i nagiba kalibracijskog pravca. U provedenom istraživanju korištena je tehnika razrjeđivanja standardne otopine, a vrijednosti LOD i LOQ koje su dobivene za ispitivane analite prikazane su u **Tablici 3**. Niske vrijednosti LOD i LOQ ukazuju na prikladnu osjetljivost metode.

**Tablica 3.** Podaci dobiveni validacijom GC/MS/MS metode.

Analit	Retencijsko vrijeme ( $t_R$ , min/RSD <sup>1</sup> ,%)	Linearnost (ppm) <sup>2</sup>	Pravac regresije	$r^3$	LOD (ppm) <sup>4</sup>	LOQ (ppm) <sup>5</sup>
2-CE	2,80	0,02-0,2	$y=16470x+44,757$	0,996	0,003	0,009

Analit	Preciznost (RSD,%) <sup>6</sup>		Točnost (obnovljivost i RSD,%) <sup>7</sup>		
	Ponovljivost ( $n=5$ )	Srednja preciznost ( $n=10$ )	Niska ( $n=3$ )	Srednja ( $n=3$ )	Visoka ( $n=3$ )
2-CE	2,60	7,24	97,11	94,13	103,88

Preciznost analitičke metode služi kako bi se moglo procijeniti podudaranje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Može se izraziti kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost izražava podudaranje rezultata dobivenih istim analitičkim postupkom, pod istim uvjetima i u kratkom vremenskom rasponu. Srednja preciznost označava odstupanje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (analize provedene kroz dulji vremenski period, različiti analitičari ili instrumenti). Obnovljivost označava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima (ICH, 2005). U ovom istraživanju preciznost je procijenjena kroz ponovljivost i srednju preciznost. Ponovljivost je procijenjena analizirajući pet individualnih uzoraka radnih otopina gdje je razina ponovljivosti 0,1 ppm, u istom danu. Srednja preciznost je ispitana i određena na temelju pet različitih uzoraka tijekom dva dana. Podatci za određivanje preciznosti su izraženi kao relativne standardne devijacije.

<sup>1</sup> RSD- (engl. *Relative Standard Deviation*) relativna standardna devijacija

<sup>2</sup> Linearnost je ispitana na minimalno pet koncentracijskih razina u trima individualno pripremljenim standardnim otopinama iz kojih je napravljen zajednički pravac regresije.

<sup>3</sup> r- koeficijent korelacije

<sup>4</sup> LOD- (engl. *Limit of Detection*) limit detekcije

<sup>5</sup> LOQ- (engl. *Limit of Quantitation*) limit kvantifikacije

<sup>6</sup> Ponovljivost je procijenjena analizirajući pet individualnih uzoraka radnih otopina (razina ponovljivosti je 0,1 ppm) u istom danu, dok je srednja preciznost ispitana i određena na temelju pet različitih uzoraka tijekom dva dana. Podatci su izraženi kao relativne standardne devijacije.

<sup>7</sup> Točnost metode ispitana je analizom standardnih otopina u triplicatu na tri koncentracijske razine (niska: 0,02 ppm; srednja: 0,1 ppm; visoka: 0,2 ppm). Podatci su izraženi kao analitički prinos i relativne standardne devijacije.

Točnost analitičkog postupka (engl. *accuracy*) pokazuje podudaranje srednje vrijednosti dobivenih rezultata sa stvarnim ili prihvaćenim referentnim vrijednostima (ICH, 2005). U ovom eksperimentu točnost metode je ispitana analizom standardnih otopina u triplikatu na tri koncentracijske razine (niska: 0,02 ppm; srednja: 0,1 ppm; visoka: 0,2 ppm). Podatci analize točnosti izraženi su kao analitički prinos i relativne standardne devijacije.

#### **4.2. Analiza uzoraka**

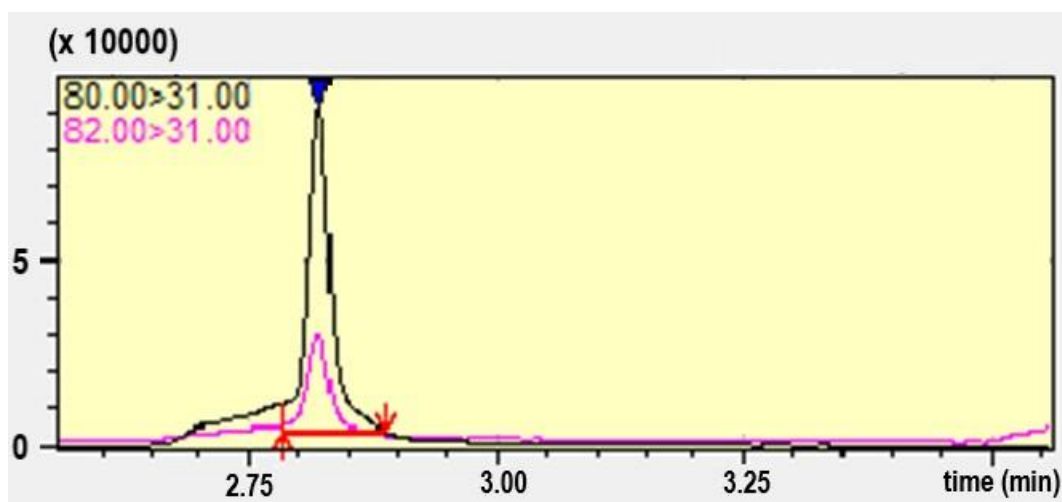
Problem koji je već dugo vremena poznat u znanstvenim krugovima jest kontaminacija biljnog materijala patogenim bakterijama i gljivicama, a pripisuje se okolišnim čimbenicima kao i uvjetima uzgoja i skladištenja biljnog materijala. Također, bitan čimbenik u rastu patogenih mikroorganizama jest i nedostatak dobre proizvođačke prakse prilikom uzgoja biljnih sirovina, što se može pripisati pojedinim uzgajivačima biljaka i biljnih sirovina.

Kao što je već prethodno spomenuto, upravo je sterilizacija etilen oksidom jedna od najboljih metoda sterilizacije pri niskim temperaturama biljnog materijala u kojem se nalaze djelatne sastavnice koje imaju termolabilan karakter. Također, pakiranja koja ulaze u sastav dodataka prehrani spadaju pod materijale koje je se preporuča sterilizirati ovom metodom sterilizacije. Na žalost, ovakav oblik sterilizacije postaje sve više ograničavajući zahvaljujući genotoksičnom učinku etilen oksida kod ljudi koji su izloženi njegovim štetnim utjecajima tijekom obrade sirovina. Upravo iz ovog razloga, etilen oksid postaje sve češća tema rasprave u stručnim krugovima. Od nedavno je kontaminacija biljnih dodataka prehrani etilen oksidom postala iznimno velik problem za farmaceutsku industriju; iznimno visoke koncentracije njegovih rezidua zamijećene su prilikom analiza nekih dodataka prehrani. U skladu s prethodno citiranim najnovijim smjernicama EK za maksimalne moguće koncentracije etilen oksida u farmaceutskim proizvodima koje iznose 0,1 mg/kg, provedena je analiza dodataka prehrani koji u ovom kontekstu predstavljaju opasnost ponajprije za pacijente koji pate od upalne bolesti crijeva. Primijenjena je analiza spregnutim tehnikama plinske kromatografije i tandemске masene spektrometrije kako bi se odredila koncentracija etilen oksida u čvrstim i tekućim dozirnim oblicima kao i u određenim popratnim sastojcima dodataka prehrani poput polimernih ovojnica od kojih se izrađuju kapsule za dodatke prehrani. Uzorci obuhvaćaju i biljne sirovine koje se koriste u izradi dodataka odnosno kao ekvivalenti etilen oksida ili kao zbir etilen oksida i njegovog nusprodukta 2-kloretanola dobivenog reakcijom acetaldehida s kloridnim ionom (**Tablica 4**).

**Tablica 4.** Sadržaj etilen oksida izražen kao EO<sub>Total</sub> u dozirnim oblicima dodataka prehrani i biljnim sirovinama koje se koriste u izradi dodataka prehrani.

Vrsta uzorka	Incidencija [%] <sup>1</sup> Broj kvantificiranih uzoraka	Srednja vrijednost (mg/kg)	Medijan (mg/kg)	Raspon kvantificiranih vrijednosti (mg/kg)
Tvrda kapsula	52,00 (13)	0,61	0,14	0,02-3,29
Meka kapsula	25,00 (1)		0,05	
Tableta	66,66 (4)	0,42	0,04	0,02-1,58
Biljne sirovine	43,75 (7)	0,37	0,02	0,02-0,09
Tinktura	0 (0)	nije primjenjivo	nije primjenjivo	nije primjenjivo

<sup>1</sup> Incidencija=[(broj kvantificiranih uzoraka)/(ukupan broj uzoraka)] x 100



**Slika 6.** GC/MS/MS kromatogram uzorka S35.

Izneseni rezultati istraživanja prikazuju kako su mjerljive razine EO<sub>Total</sub> zamijećene u gotovo polovici uzoraka. Najveću zabrinutost pokazuje činjenica da je čak 8 uzoraka sadržavalo razine etilen oksida koje su iznad dopuštenih razina za ovaj spoj u EU. Bitno je naglasiti i to da su svi proizvodi kupljeni u dozirnim oblicima kakvi se koriste za dodatke prehrani (7 njih u obliku tvrdih kapsula i 1 u formi tableta).

Na temelju ovog istraživanja postoji osnovana sumnja da se izvor nedozvoljenih koncentracija etilen oksida nalazi u pakiranjima samih dodataka prehrani koji su u neposrednom

kontakta s djelatnom tvari, a to se ponajprije odnosi na kapsule (polimerne ovojnice) i blistere. Ovo saznanje ima za cilj osvijestiti regulatorna tijela Europske unije na činjenicu da je potreba za regulativom rezidua etilen oksida iznimno bitna i velika. Nadalje, najalarmantnija informacija jest ta da su razine EO u pojedinim uzorcima (S15 i S22) bile čak i preko 30 puta veće od onih koje su dozvoljene u EU. U ovom trenutku, ovakva otkrića stvaraju čvrsti temelj za još strože i temeljitije kontrole rezidua ovog toksičnog agensa u farmaceutskim proizvodima, njihovim pakiranjima, kao i sirovinama iz kojih se oni izrađuju.



## 5. RASPRAVA

Na temelju provedenog istraživanja nameće se glavno pitanje, a to je pitanje sigurnosti, kako pacijenata, tako i svih potrošača koji koriste proizvode koji se u svojem postupku proizvodnje obrađuju/steriliziraju etilen oksidom. Samo istraživanje daje na uvid činjenicu da unatoč strogoj regulativi od strane EMA-e i dalje postoji mogućnost da se na području Europske unije može pronaći/naručiti proizvod (u ovom slučaju dodatak prehrani) koji sadrži nedozvoljene koncentracije rezidua etilen oksida te se na taj način značajno može ugroziti zdravlje kako pojedinca tako i cijele jedne populacije pacijenata, a to su u ovom slučaju ranjive skupine bolesnika koji pate od upalne bolesti crijeva. Zdravstvene organizacije širom svijeta trebale bi moći poraditi na ovoj temi te bliže i temeljitije surađivati kako ne bi dolazilo do ovakvih otkrića koja zaista imaju bitan učinak na svijest populacije i njihovu bojazan od toksičnosti različitih kemikalija koje se koriste u proizvodnim procesima.

Sljedeće pitanje koje je moguće postaviti jest pitanje podrijetla samog etilen oksida u dodacima prehrani. Kada bi se pojednostavilo, pitanje je u kojoj od sirovina koje se koriste u procesu proizvodnje ovih dodataka prehrani postoji najveća zastupljenost rezidua etilen oksida. Odgovor na to daje analiza dodataka prehrani različitih formulacija te se na temelju toga moglo odrediti koja formulacija ima veći postotak rezidua etilen oksida, a u kojim formulacijama ne dolazi do odstupanja od graničnih vrijednosti. Nakon razmatranja rezultata GC/MS/MS metodom može se zaključiti kako tvrde kapsule, kao i sastojci dodataka prehrani sadrže najveći udio nedopuštene koncentracije etilen oksida, što je vidljivo iz **Tablice 4**. Na tragu ovakvih rezultata može se otvoriti rasprava u kojoj struka treba istražiti je li problem zaista u polimernim ovojnica u koje se stavlja prašak dodatka prehrani ili je možda problem u samom pakiranju kao što su blisteri kapsula ili vanjsko pakiranje samog dodatka prehrani. Nakon provedenih istraživanja otvara se mogućnost bolje regulacije sterilizacijskog procesa pojedinih sastojaka i sirovina etilen oksidom.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja koje je provedeno na bazi 53 različita uzorka dodataka prehrani iz različitih dijelova svijeta, uključujući Europu, SAD te Južnu i Jugoistočnu Aziju, moguće je zaključiti kako su rezultati određivanja koncentracije rezidua etilen oksida u tim uzorcima poražavajući, gdje čak više od 50 % analiziranih uzoraka sadrži mjerljive razine etilen oksida, dok 8 uzoraka sadrži koncentracije etilen oksida koje su više od onih dozvoljenih u EU (0,1 mg/kg). Još više zabrinjava činjenica da su čak dva uzorka (S15 i S22) među testiranimima imala koncentracije etilen oksida i do 30 puta veće od onih koje su dozvoljene u EU. Unatoč svim uredbama koje reguliraju dopuštene količine ovog spoja, zaključak ovog rada jest taj da je potrebno te iste mjere temeljitije provoditi u praksi. Prijedlog je i taj da se internet trgovina, preko koje je dio dodataka prehrani kupljen, treba strože kontrolirati i uskladiti s općim odredbama donesenim od strane EMA-e kako bi se ovakvi slučajevi koji ukazuju na opasnost za ljudsko zdravlje mogli što lakše izbjeći. Svakako bi i usklađivanje regulativa različitih zdravstvenih regulatornih tijela iz cijelog svijeta značajno doprinijelo uklanjanju poteškoća i opasnosti za zdravlje populacije.

## 7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

CBD - kanabidiol

COX-2 – (engl. *Cyclooxygenase type 2*) ciklooksigenaza tipa 2

DDT – diklorodifeniltrikloroetan

DNA – (engl. *DeoxyriboNucleic Acid*) deoksiribonukleinska kiselina

EK – Europska komisija

EMA – (engl. *European Medical Agency*) Europska agencija za lijekove

EO – etilen oksid

EO<sub>Total</sub> – koncentracija etilen oksida

EU – Europska unija

GC/MS/MS – spregnuta tehnika plinske kromatografije s tandemskom masenom spektrometrijom

GMP – (engl. *Good Manufacturing Praxis*) dobra proizvođačka praksa

GLP – (engl. *Good Laboratory Praxis*) dobra laboratorijska praksa

HALMED – Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode

IBD – (engl. *Inflammatory Bowell Disease*) upalna bolest crijeva

ICH – (engl. *he International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) Međunarodna organizacija za harmonizaciju

iNOS – (engl. *Inducible NO-synthase*) inducibilna NO-sintaza

LOD – (engl. *Limit of Detection*) granica dokazivanja

LOQ – (engl. *Limit of Quantitation*) granica određivanja

MPa – megapaskal

MPO – mijeloperoksidaza

MRM – tandemski maseni spektrometrija uz višestruki način praćenja reakcija

NF-  $\kappa$ B – nuklearni faktor  $\kappa$ B

Ph. Eur. – Europska farmakopeja

$r$  – koeficijent korelacije

RSD – (engl. *Relative Standard Deviation*) relativna standardna devijacija

TNF- $\alpha$  – (engl. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) faktor tumorske nekroze  $\alpha$

## 8. LITERATURA

Ahuja S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. London, San Diego, Academic press 2001, Vol. III, str. 340.-341.

Algieri F., Rodriguez-Nogales A., Rodriguez-Cabezas M., Risco S., Ocete M., Galvez J. Botanical Drugs as an Emerging Strategy in Inflammatory Bowel Disease: A Review, 2015.

Batistić M. Upravljanje kategorijama dodataka prehrani u ljekarnama, 2020. str. 38.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 24. 4. 2023. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18506>>.

European Chemicals Agency. Ethylene oxide; Substance infocard. Dostupno na: <https://echa.europa.eu/hr/substance-information/-/substanceinfo/100.000.773> . Pristupljeno 12.06.2023.

<https://krenizdravo.dnevnik.hr/wp-content/uploads/2018/01/kanabidiol.png?x15198>

<https://ba.xjcistanche.com/Content/uploads/2022842169/202202251516492a706546ef0c409192ab7886e535d98e.png>

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2d/Ethylene-oxide-from-xtal-3D-balls.png/200px-Ethylene-oxide-from-xtal-3D-balls.png>

<https://www.vogue.in/content/what-to-keep-in-mind-when-shopping-for-pure-aloe-vera-gel>

International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 1994.

International Agency for Research on Cancer, 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 60, Some industrial chemicals.

Salapić A. Stavovi i navike roditelja o dodacima prehrani za djecu, 2015. str. 6.

UREDBA KOMISIJE (EU) 2022/1396 od 11. kolovoza 2022. o izmjeni Priloga Uredbi (EU) br. 231/2012 o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu prisutnosti etilen oksida u prehrambenim aditivima

Vrsaljko D. PREGLED TEHNIČKE LITERATURE I DOKUMENTACIJE, Kem. Ind. 67 (11-12) (2018) 573–575 573 str. 3.

## 9. SAŽETAK/SUMMARY

Etilen oksid kemijski je spoj otkriven još početkom 20. stoljeća te se od tada njegova primjena počela širiti, a glavnu ulogu pronašao je u niskotemperaturnom sterilizacijskom procesu koji se primjenjuje za sterilizaciju medicinske opreme, farmaceutskih i prehrambenih sirovina i materijala. Polovicom 20. stoljeća postalo je jasno kako ovaj spoj nije bezopasan te da se njegova primjena i koncentracija u sirovinama mora strogo regulirati. Brojne znanstvene studije ukazuju na to da etilen oksid ima karcinogeno, mutageno i reproduktivno toksično djelovanje zbog čega je javnost postala sve više zabrinuta i skeptična u pogledu primjene ovog sterilizacijskog agensa.

Istraživanje, koje je provedeno na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, temelji se na analizi 53 različita uzorka dodataka prehrani nabavljenih u Europi i ostatku svijeta. Rezultati istraživanja su, na žalost, poražavajući jer je čak preko polovine analiziranih uzoraka sadržavalo detektabilne razine etilen oksida, dok je 8 uzoraka sadržavalo razine etilen oksida veće od 0.1mg/kg, što je gornja dozvoljena granica koncentracije rezidua etilen oksida u Europskoj uniji. Čak 2 uzorka sadržavala su 30 puta veće razine etilen oksida od dopuštenih.

Ovo istraživanje ima za cilj ukazati regulatornim tijelima Europske unije i cijelog svijeta na štetnost ovog spoja i potrebu za strožim nadzorom farmaceutskih, prehrambenih, tekstilnih i drugih sirovina kod kojih se koristi oblik sterilizacije etilen oksidom.

Ethylene oxide is chemical compound that is discovered at the beginning of 20th century and, since that, its application started spreading, but the main application it found in low-temperature sterilisation process that is used for sterilisation of medical equipment, pharmaceutical materials and food products. At the half of 20th century, people found out that this compound is not so safe for human health, so health organisations started exercise control of concentrations of ethylene oxide in raw materials that were sterilised with this compound. Numerous scientific researchs indicate that ethylene oxide has carcinogenic and mutagenic impact, and also is considered as reproductive toxic agent. That is the reason why so many people are concerned about using ethylene oxide as sterilisation agent.

Research, that is conducted on the Institute for drug analysis and control on Faculty of Pharmacy and Medical Biochemistry of the University of Zagreb, is based on the analysis of 53 different samples of dietary supplements that are found in Europe and in the rest of the world. Results of the research are, unfortunately, devastating because there were more than a half of 53 samples that had detectable ethylene oxide concentrations in their composition. 8 of them had ethylene oxide concentrations that are more than allowed in the European Union (0.1mg/kg). Furthermore, 2 of the samples had ethylene oxide concentrations that were 30 times more than allowed in the EU.

The purpose of this research is to indicate to the regulatory authorities of the EU and the rest of the world that ethylene oxide is very toxic compound and that there should be stricter surveillance of pharmaceutical, textile, food and other materials that pass through ethylene oxide sterilisation process.



## 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

### ODREĐIVANJE ETILEN OKSIDA U DODACIMA PREHRANI KOJI SE KORISTE ZA LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Jure Potočnjak

#### SAŽETAK

Etilen oksid kemijski je spoj otkriven još početkom 20. stoljeća te se od tada njegova primjena počela širiti, a glavnu ulogu pronašao je u niskotemperaturnom sterilizacijskom procesu koji se primjenjuje za sterilizaciju medicinske opreme, farmaceutskih i prehrambenih sirovina i materijala. Polovicom 20. stoljeća postalo je jasno kako ovaj spoj nije bezopasan te da se njegova primjena i koncentracija u sirovinama mora strogo regulirati. Brojne znanstvene studije ukazuju na to da etilen oksid ima karcinogeno, mutageno i reproduktivno toksično djelovanje zbog čega je javnost postala sve više zabrinuta i skeptična u pogledu primjene ovog sterilizacijskog agensa.

Istraživanje, koje je provedeno na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, temelji se na analizi 53 različita uzorka dodataka prehrani nabavljenih u Europi i ostatku svijeta. Rezultati istraživanja su, na žalost, poražavajući jer je čak preko polovine analiziranih uzoraka sadržavalo detektabilne razine etilen oksida, dok je 8 uzoraka sadržavalo razine etilen oksida veće od 0.1mg/kg, što je gornja dozvoljena granica koncentracije rezidua etilen oksida u Europskoj uniji. Čak 2 uzorka sadržavala su 30 puta veće razine etilen oksida od dopuštenih.

Ovo istraživanje ima za cilj ukazati regulatornim tijelima Europske unije i cijelog svijeta na štetnost ovog spoja i potrebu za strožim nadzorom farmaceutskih, prehrambenih, tekstilnih i drugih sirovina kod kojih se koristi oblik sterilizacije etilen oksidom.

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

Rad sadrži: 27 stranica, 1 grafičkog prikaza, 4 tablice i 10 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Etilen oksid, dodaci prehrani, upalna bolest crijeva

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

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

**Dr. sc. Danijela Amidžić Klarić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Goran Poje**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of analysis and drug control  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### QUANTIFICATION OF ETHYLENE OXIDE IN DIETARY SUPPLEMENTS USED FOR TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

**Jure Potočnjak**

#### SUMMARY

Ethylene oxide is chemical compound that is discovered at the beginning of 20th century and, since that, its application started spreading, but the main application it found in low-temperature sterilisation process that is used for sterilisation of medical equipment, pharmaceutical materials and food products. At the half of 20th century, people found out that this compound is not so safe for human health, so health organisations started exercise control of concentrations of ethylene oxide in raw materials that were sterilised with this compound. Numerous scientific researchs indicate that ethylene oxide has carcinogenic and mutagenic impact, and also is considered as reproductive toxic agent. That is the reason why so many people are concerned about using ethylene oxide as sterilisation agent.

Research, that is conducted on the Institute for drug analysis and control on Faculty of Pharmacy and Medical Biochemistry of the University of Zagreb, is based on the analysis of 53 different samples of dietary supplements that are found in Europe and in the rest of the world. Results of the research are, unfortunately, devastating because there were more than a half of 53 samples that had detectable ethylene oxide concentrations in their composition. 8 of them had ethylene oxide concentrations that are more than allowed in the European Union (0.1mg/kg). Furthermore, 2 of the samples had ethylene oxide concentrations that were 30 times more than allowed in the EU.

The purpose of this research is to indicate to the regulatory authorities of the EU and the rest of the world that ethylene oxide is very toxic compound and that there should be stricter surveillance of pharmaceutical, textile, food and other materials that pass through ethylene oxide sterilisation process.

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

Thesis includes: 27 pages, 1 figure, 4 tables and 10 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Ethylene oxide, dietary supplements, inflammatory bowel disease

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

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

**Danijela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Goran Poje, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.