Određivanje sadržaja sibutramina tehnikom tekućinske kromatografije u dodacima prehrani

Karakašić, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:338270

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

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

image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

DIGITALNA KNJIŽNICA

image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Monika Karakašić

Određivanje sadržaja sibutramina tehnikom tekućinske kromatografije u dodacima prehrani

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godina

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Graduate programme

Biotechnology in medicine

Monika Karakašić

Determination of sibutramine content in food supplements by HPLC

Graduate thesis

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Monika Karakašić

Određivanje sadržaja sibutramina tehnikom tekućinske kromatografije u dodacima prehrani

Diplomski rad

Rijeka, 2018. Godina

Mentor : Izv. prof.dr.sc. Siniša Tomić

Ovaj diplomski rad predan je Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci i izrađen u službenom laboratoriju za provjeru kakvoće lijekova (OMCL) Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) pod vodstvom mentora izv.prof.dr.sc. Siniše Tomić , Rajke Truban-Žulj, mag. pharm.,spec., i mr.sc. Snježane Zubčić.

Diplomski rad obranjen je dana 17.rujna 2018. godine na Odjelu za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom :

1. Izv.prof.dr.sc. Miranda Mladinić Pejatović, predsjednica povjerenstva
2. Doc.dr.sc. Karlo Wittine, član povjerenstva
3. Izv.prof.dr.sc. Siniša Tomić, mentor

Rad ima 43 stranice,13 slika, 2 tablice i 37 literaturnih navoda

Sažetak

U današnje vrijeme znatno su raširenidodaci prehrani sa svrhom pomaganja mršavljenju. Djelovanje takvih suplemenata se temelji na lažnom osjećaju sitosti. Djelatna tvar u lijekovima za mršavljenje je sibutramin koji djeluje na mehanizam ponovne resorpcije serotonina i norepinefrina. Sibutramin je prema strukturi sličan amfetaminima i stoga spada u strogo kontrolirane djelatne tvari. Unazad 15-tak godina pojavio se veliki broj slučajeva srčanih udara i moždane kapi osoba koje su uzimale lijekove čija je djelatna tvar sibutramin. Nakon provedenih istraživanja Europska agencija za lijekove (EMA) je obustavila distribuciju lijeka po Europi. Ubrzo nakon povlačenja lijekova s tržišta sibutramin se pojavio u raznim dodacima prehrani poput zelene kave, čajeva za mršavljenje i sl. koji su deklarirani kao prirodni proizvodi. Krivotvorenje lijekova i dodataka prehrani je sve veći globalni problem koji može rezultirati narušavanjem sigurnosti i zdravlja pacijenata.

Navedeno istraživanje provedeno je identifikacijom i određivanjem sadržaja sibutramina u dodacima prehrani s hrvatskog tržišta tehnikom tekućinske kromatografije. Poznato je da uzimanje 10 mg sibutramina dnevno dovodi do značajnih nuspojava poput povećanog krvnog tlaka, povećanog broja otkucaja srca, srčanog i moždanog udara.

Ispitano je 8 uzoraka dodataka prehrani za pomoć pri mršavljenju prikupljenih na hrvatskom tržištu. Niti jedan od ispitanih uzoraka nije pokazao pozitivne rezultate na sibutramin.

Ključne riječi: sibutramin,mršavljenje, HPLC, krivotvoreni lijekovi

Summary

Nowadays, dietary supplements whose purpose is to reduce body weight are considerably widespread. The action of such supplements is based on a false sense of satiety. The active drug for weight loss is sibutramine that acts on the mechanism of re-absorption of serotonin and norepinephrine. Sibutramine, according to a structure similar to amphetamines, therefore belongs to strictly controlled substances. In the last 15 years, a large number of cases of heart attacks and brain drops occurred in people who consumed drugs whose active substance is sibutramine. After the research has been carried out, the European Medicines Agency has suspended the distribution of drugs across Europe. Soon after the withdrawal of the drugs from the market, substantial concentrations of sibutramine were found in various dietary supplements such as green coffee, weight loss teas, etc., declared as natural products. Counterfeiting of medicines and food supplements is an increasing global problem that can result in disruption of patient safety and health.

This research will be conducted by identification and content determination of sibutramine in dietary supplements from the Croatian market by liquid chromatography technique(HPLC). It is well known that consuming 10 mg of sibutramine daily leads to significant side effects such as increased blood pressure, increased heart rate, heart attack and stroke.

Eight samples of dietary supplements collected on the Croatian market were tested and none of the respondents gave positive results on sibutramine.

Key words: sibutramine, weight loss, HPLC, counterfeit medicines

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
1.1 Prekomjerna tjelesna težina i pretilost 1
1.2 Neurotransmiteri 2
1.2.1 Mehanizam ponovne pohrane neurotransmitera 3
1.2.2 Noradrenalin 4
1.2.3 Serotonin 4
1.1 Inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina 5
1.1.1 Sibutramin 6
1.2 Krivotvorenje lijekova i dodataka prehrani 8
1.2.1 Krivotvoreni lijek 8
1.2.2 Borba protiv krivotvorina u Republici Hrvatskoj 10
1.3 Kromatografske tehnike odjeljivanja 12
1.3.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 14
1.4 Provjera prikladnosti sustava za HPLC metodu 17
1.4.1 Kromatografski parametri 17
1.4.2 Preciznost i linearnost metode 18
1.4.3 Granica određivanja (Limit of quantificatin,LOQ) 19
1.4.4 Preciznost vremena zadržavanja, preciznost injektiranja i prijenos analita 20
2. Obrazloženje teme 21
3. Materijali i metode 22
3.1 Materijali 22
3.1.1 Referentne tvari 22
3.1.2 Otapala i reagensi 22
3.1.3 Uzorci 22

3.1.4 Laboratorijski instrumenti 23
3.1.5 Programski paketi 23
3.2 Metode 24
3.2.1 Kromatografski uvjeti 24
3.2.2 Priprema otopina 24
4. Rezultati 26
4.1 Linearnost 26
4.2 Faktor simetrije 27
4.3 Detekcija sibutramina u uzorcima 28
5. Diskusija 35
6. Zaključak 37
7. Literatura 38
8. Zahvala 41
9. Životopis 42

1. UVOD

1.1 Prekomjerna tjelesna težina i pretilost

Pretilost je velik zdravstveni problem današnjice koji poprima razmjere globalne epidemije. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je definirala pretilost kao bolest u kojoj se višak masnog tkiva nakuplja u tolikoj mjeri da ugrožava zdravlje(1). Pretilost je kompleksna multifaktorska bolest razvijena pod utjecajem genetskih i metaboličkih faktora, okoliša, socijalne i kulturološke sredine, te loših životnih navika(2). Brojni su uzroci pretilosti no najčešćim se smatra pojava energetske neuravnoteženosti u organizmu. Unosi li se previše visokokalorične hrane bogate mastima i rafiniranim šećerima, uz smanjenu tjelesnu aktivnost, stvara se suvišak energije koji se pohranjuje u obliku masti(3). Pohrana masti se u najvećem dijelu odvija u adipocitima masnog tkiva što dovodi do njihove hipertrofije, odnosno povećanja opsega. Također se pohrana odvija i u drugim organima poput jetre i koštano-mišićnog sustava, osobito kod pretilih ljudi što dovodi do stanja opasnog po zdravlje. Pretilost se dijagnosticira antropometrijskim mjerenjima a to su određivanje indeksa tjelesne mase (ITM), opsega struka, te omjera opsega struka i bokova čime se dobije uvid u tip pretilosti kojem pacijent pripada i kojem je zdravstvenom riziku izložen. S obzirom na ITM pretilost se dijeli u 3 stupnja. Prvom stupnju pretilosti pripadaju osobe s ITM između 30 i 34,9, drugom stupnju pretilosti pripadaju osobe s ITM između 35 i 39,9 dok trećem stupnju pripadaju osobe s ITM većim od 40(4).Svjetska zdravstvena organizacija (SZO, engl. WHO) je objavila da čak 1,5 milijardi ljudi ima prekomjernu tjelesnu težinu od čega se više od 500 milijuna smatra pretilima, a s obzirom na način života današnjice predviđa se porast prevalencije u narednim godinama. Stanje je zabrinjavajuće i u Hrvatskoj koja se po broju pretilih osoba nalazi na osmom mjestu, od 28 članica Europske unije (EU). Prema spolu, u

Hrvatskoj je u odnosu na druge zemlje EU značajnije veći broj pretilih muškaraca (20,7 posto) u odnosu na žene (16,8 posto). Podaci govore da sklonost debljanju raste s godinama te se najveći broj pretilih ljudi nalazi u dobi između 45-74 godine života. Značajnu ulogu ima stupanj obrazovanja, pa je najviše pretilih ljudi iz skupine manje obrazovanih (24,9 %) ,dok se među visoko obrazovanim nalazi 12,6 %. Pretilost raznim patofiziološkim mehanizmima utječe na rad i funkciju više organskih sustava pa se tako povezuje s nastankom bolesti kardiovaskularnog, lokomotornog, endokrinog, gastro-intestinalnog sustava i drugih(3). Kako bi se prevenirale bolesti nastale pod utjecajem pretilosti pacijentu se preporuča mršavljenje u kombinaciji s lijekovima za smanjenje tjelesne težine koji funkcioniraju na način da postižu lažan osjećaj sitosti pacijenta koji će posljedično dovesti do smanjenja unosa hrane te samim time potaknuti trošenje masnih zaliha što rezultira mršavljenjem.

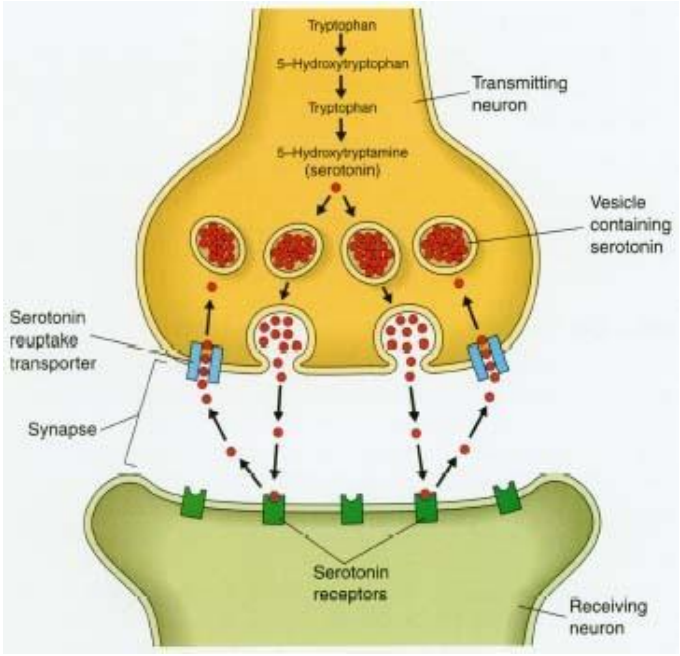
1.2 Neurotransmiteri

Neurotransmiteri su molekule koje prenose signale između živčanih stanica ali i između živčanih stanica i efektorskih stanica te ih se naziva kemijskim glasnicima.(5) Neurotransmiteri su molekule male molekulske mase i brzog djelovanja a sintetiziraju se u živčanim odnosno sinaptičkim završetcima dok kao prenositelji signala između neurona djeluju u sinaptičkoj pukotini gdje se vežu za receptore na membrani postsinaptičkog neurona ili neke druge stanice npr. mišićne(6). Četiri su osnovne skupine neurotransmitera: acetil-kolin, monoamini ili biogeni amini, aminokiseline i peptidi(7).Neurotransmiteri se uobičajeno luče u prekomjernim količinama i stoga se procesom ponovne pohrane ponovno vraćaju u presinaptički mjehurić ili se razgrađuju posebnim enzimima. Višak ili manjak neurotransmitera uzrokuje psihičke i mentalne

poremećaje kao i promjene u kontroli apetita koji mogu rezultirati smanjenom ili prekomjernom tjelesnom težinom(8).

1.2.1 Mehanizam ponovne pohrane neurotransmitera

Ponovna pohrana ili reasorpcija neurotransmitera je mehanizam kojim se recikliraju neurotransmiteri s ciljem regulacije razine neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini nakon izvršenja svoje funkcije(9). Zbog svoje veličine i hidrofilnog karaktera neurotransmiteri ne mogu difundirati kroz membranu te su im potrebni transportni proteini za pohranu u presinaptički mjehurić aktivnim transportom koji zahtjeva utrošak energije(10). Transportni proteini koriste ionski gradijent Na^+/Cl^- kako bi neurotransmitere transportirali kroz membranu. Takvi transporteri nazivaju se neurotransmiter-natrij simporteri (engl. NSS) i koriste elektrokemijski gradijent natrijevih i kloridnih iona kako bi katalizirali termodinamički „uzvodni" prijenos molekula poput biogenih amina(11).



Slika 1. Mehanizam ponovne pohrane serotonina (preuzeto s : http://www.healyourselfathome.com/SUPPORT/CELL_MESSENGERS/NEUROTRANSMITTERS/ABOUT/NEUROTRANSMITTERS_MAIN.aspx)

1.2.2 Noradrenalin

Norepinefrin ili noradrenalin je katekolamin koji pripada skupini biogenih amina a djeluje kao hormon i neurotransmiter. Srž nadbubrežne žlijezde izlučuje norepinefrin u krv gdje djeluje kao hormon, dok kao neurotransmiter djeluje u središnjem i simpatičkom živčanom sustavu gdje se izlučuje iz noradrenergičkih neurona(12,13). Norepinefrin je prekursor hormona epinefrina odnosno adrenalina. Noradrenalin je jedan od hormona stresa te uslijed stresnih reakcija dolazi do aktivacije simpatičkog sustava i njegovog otpuštanja(14). Djeluje na aktivaciju moždanih struktura i usmjeravanja pažnje, ubrzanje rada srca i povećanja snage srca, vazokonstrikciju, proširenje zjenica (midrijaza) te djeluje na inhibiciju rada crijeva i mjehura. Također je uključen u intrinzičnu regulaciju boli, no uloga mu je kompleksna jer može djelovati i kao supresor i kao aktivator boli(15). Danas je poznata uloga noerpinefrina u paraventrikularnoj jezgri (PVN) hipotalamusa gdje izaziva osjećaj sitosti ili gladi. Dva su receptora PVN-a koji su zaslužni za to djelovanje a to su α_1 - i α_2 –adrenoceptori . Aktivacija α1 receptora norepinefrinom potiskuje glad dok aktivacija α2 receptora daje osjećaj gladi te potiče na hranjenje(16). Farmakološkim manipuliranjem navedenih receptora moguće je djelovati na izazivanje osjećaja sitosti ili gladi kao terapija za pretilost ili anoreksiju.

1.2.3 Serotonin

Serotonin ili 5-hidroksitriptamin je monoaminski neurotransmiter uključen u kontrolu spavanja, apetita, tjelesne temperature, otpuštanje hormona, raspoloženje, motornu aktivnost i kognitivne funkcije(17). Nalazi se u središnjem živčanom sustavu,gastrointestinalnom traktu ali i trombocitima gdje sudjeluje u procesu zgrušavanja krvi. Promjene u razini

serotonina ili poremećeno receptorsko signaliziranje potonjeg se povezuje s promjenama ponašanja poput depresije, agresivnosti, poremećaja spavanja kao i poremećenoj kontroli apetita koja dovodi do prekomjerne konzumacije ugljikohidrata i šećera. Stoga,normalna koncentracija serotonina važna je za održavanje osjećaja sitosti koji je ključan korak u održavanje normalne tjelesne težine. Dva su najvažnija receptora koja se povezuju s djelovanjem serotonina na osjećaj sitosti a to su 5-hidoksitriptaminski 1B (5-HT1B) i 5-hidroksitriptaminski 2C (5-HT2C) receptori koji su rasprostranjeni u središnjem živčanom sustavu. Vezanjem serotonina za navedene receptore dolazi do osjećaja sitosti koji je važan u tretmanu mršavljenja pretilih osoba, stoga se farmakološke terapije baziraju na povećanju razine serotonina mehanizmom inhibicije ponovne pohrane koji dovodi do produljenog podražaja receptora i posljedičnim osjećajem sitosti koji rezultira smanjenim unosom hrane(15).

1.1 Inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina

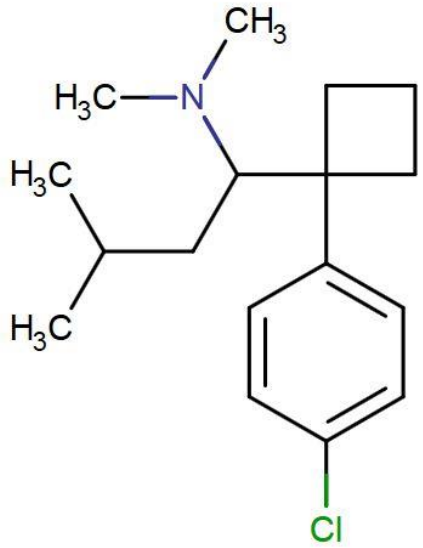
Neurotransmiteri, serotonin i noradrenalin, imaju važnu ulogu u kontroli energetske ravnoteže u središnjem živčanom sustavu (SŽS) te su uključeni i u simptomatologiju pretilosti i depresije(18). Smatra se da je deficit noradrenalina povezan s letargijom, smanjenom opreznosti, smanjenom energijom i abnormalnom konzumacijom hrane (19), dok se deficit serotonina povezuje s kompulzivnim simptomima, disforijom, prekomjernom konzumacijom hrane, poremećajima prehrane i poremećajem prejedanja(eng.binge eating disorder). Stoga se velika pažnja pridaje serotoninskom i noradrenalinskom signalnom putu u središnjem živčanom sustavu kao potencijalnim metama u liječenju depresije, pretilosti i poremećajima prehrane poput anoreksije i bulimije(18). Selektivni inhibitori ponovne pohrane (engl.SRI. selective reuptake inhibitors) neurotransmitera funkcioniraju na način da se

selektivno vežu za receptore odgovarajućih neurotransmitera s ciljem blokade ponovne pohrane istih kako bi se produžio podražaj u sinaptičkoj pukotini a učinak neurotransmitera bio duži i intenzivniji. Do sada je već veliki broj lijekova otkriven za liječenje pretilosti i poremećaja prehrane koji funkcioniraju kao stimulansi središnjeg živčanog sustava, no velik broj istih je povučen s tržišta zbog visoke toksičnosti(20). Primjerice, fentermin koji djeluje kao inhibitor ponovne pohrane adrenalina i noradrenalina uspješno je djelovao u liječenju pretilosti no nuspojave povezane s njegovim djelovanje dovele su do povlačenja s tržišta u brojnim zemljama. Fenfluramin i deksflenfuramin djeluju kao otpuštajući agensi serotonina kao i inhibitori ponovne pohrane serotonina no povučeni su s tržišta zbog razvoja bolesti srčanih zalistaka(21). Antidepresivi poput fluoksetina, sertralina i citaloprama su uspješno doveli do gubitka tjelesne težine, no učinak je kratkotrajan te nisu uspješni u dugoročnom tretmanu pretilosti. Reboksetin je antidepresiv koji djeluje kao inhibitor ponovne pohrane noradrenalina čije se djelovanje ispitivalo u pacijentima normalne tjelesne težine te je zabiljžen značajan gubitak tjelesne mase pacijenata što otvara mogućnost ispitivanja reboksetina kao lijeka za pretilost(22). Velike su nade položene u lijek sibutramin koji je svojevremeno bio najvažniji lijek u dugoročnom liječenju pretilosti no otkrivanje nuspojava dovelo je do povlačenja s tržišta i zabrane korištenja sibutramina (18).

1.1.1 Sibutramin

Sibutramin (SIB) je aktivna tvar slična amfetaminima koja djeluje kao inhibitor ponovne pohrane serotonina i noradrenalina. Inhibicijom ponovne pohrane gore spomenutih neurotransmitera stvara se osjećaj sitosti i zadovoljstva koji posljedično dovodi do smanjenja unosa hrane(23). Lijekovi koji kao aktivnu tvar sadrže sibutramin prepisuju se pretilim pacijentima kojima tjelesna aktivnost i niskokalorična dijeta nije pomogla

u gubitku tjelesne mase. Budući da je sibutramin sličan amfetaminima spada u strogo kontrolirane lijekove. Uporaba sibutramina datira od 1997. godine u Americi dok je europskim zemljama, prvotno u Njemačkoj, odobren 1999. godine. Ubrzo su i ostale članice Europske unije odobrile sibutramin kao lijek za pretilost jer je pokazao visoku djelotvornost a djelovanje je bilo dugoročno. Hrvatska 2000.godine daje odobrenje za stavljanje u promet tableta Reductil, s djelatnom tvari sibutraminom, nositelja odobrenja Abbot Laboratories d.o.o. koji se isključivo prepisivao na liječnički recept. Samo nekoliko godina od puštanja lijeka u promet zabilježene su ozbiljne prijave nuspojava povezane s primjenom tableta koje kao djelatnu tvar sadrže sibutramin. Najznačajnije nuspojave odnosile su se na kardiovaskularni učinak, psihičke poremećaje, poremećaj ravnoteže elektrolita i serotoninski sindrom. Serotoninski sindrom se odnosi na stanje povezano s povećanom koncentracijom serotonina u tijelu što dovodi do dijareje, groznice, napadaja, proširenih zjenica, ubrzanog rada srca i visokog krvnog tlaka(24). Ishodi serotoninskog sindroma mogu biti smrtonosni ukoliko se ne liječe.



Slika 2. Strukturni prikaz molekule sibutramina

(Preuzeto s : http://www.t3db.ca/toxins/T3D2986)

Zabilježen je velik broj slučajeva alergijskih reakcija na lijekove koji sadrže sibutramin a odnosile su se na osip, otežano disanje, oticanje lica i usana, jezika i grla. FDA je do 2002. godine, što je samo 3 godine nakon odobrenja za stavljanje lijeka u promet, zabilježila 397 teških slučajeva nuspojava prilikom primjene sibutramina. 152 pacijenata je hospitalizirano od kojih je 29 preminulo usljed teških kardiovaskularnih poremećaja. Kod 143 pacijenata je zabilježena artimija te blagi infarkt miokarda. Podaci su bili i više nego dovoljni za pokretanje peticije za povlačenje lijekova koji sadrže sibutramin s tržišta. Prvi su to napravili Talijani iste te godine kao reakciju na 50 prijavljenih nuspojava koje su se odnosile na tahikardiju, aritmiju i povišeni krvni tlak te 2 smrti uzrokovane infarktom(25). U Hrvatskoj je, kao i ostatku Europe, povučen s tržišta tek 2010. godine. Nažalost, priča tu ne završava jer se od tada pojavljuju krivotvoreni lijekovi, odnosno dodaci prehrani, koji se deklariraju kao proizvodi prirodnog podrijetla dok u sebi sadrže nedeklariranu djelatnu tvar sibutramin.

1.2 Krivotvorenje lijekova i dodataka prehrani

1.2.1 Krivotvoreni lijek

Krivotvoreni lijekovi i medicinski proizvodi velik su problem u svijetu čija se brojka iz godine u godinu povećava a ugrožavaju zdravlje i sigurnost pacijenta. Ovi su lijekovi rezultat dobro organiziranog kriminala koji u svrhu stvaranja dobiti plasira na tržište lažne lijekove. U otkrivanje i sprječavanje trgovine krivotvorenim proizvodima uključena su regulatorna tijela za lijekove, policija, carina, pravosudna tijela i farmaceutska industrija. Samo tržište krivotvorenih lijekova danas predstavlja 10% ukupne globalne trgovine lijekovima(26).

Zakon o lijekovima Republike Hrvatske u stavci 49, članka 3 iz Narodnih Novina (2013.,N.N.) definira krivotvoreni lijek kao lijek koji je neistinito predstavljen s namjerom prijevare,s obzirom na :

- identitet, uključujući pakiranje i označivanje lijeka, naziv ili sastav lijeka u pogledu bilo kojeg sastojka lijeka uključujući pomoćne tvari i jačinu lijeka;
- podrijetlo, uključujući proizvođača, državu proizvodnje i državu podrijetla lijeka ili nositelja odobrenja za stavljanje lijeka u promet;
- sljedivost, uključujući zapise i dokumente koji se odnose na promet lijeka.

Veliku opasnost predstavlja prodaja lijekova internetskim putem gdje potrošači ne dobivaju vjerodostojne podatke o lijekovima a Svjetska zdravstvena organizacija procjenjuje da je čak 50% lijekova koji se prodaju internetskim putem krivotvoreno. Stoga takvi lijekovi nisu sigurni za primjenu, te se savjetuje građanima da ne konzumiraju lijekove iz ilegalnog lanca opskrbe jer na taj način izlažu svoje zdravlje velikom riziku. Dosad, najveći broj krivotvorenih lijekova odnosio se na lijekove protiv erektilne disfunkcije i za mršavljenje, a takvi slučajevi su zabilježeni i u Republici Hrvatskoj u ilegalnom lancu opskrbe. Danas je problem što su, ponajviše u zemljama u razvoju, u optjecaju krivotvoreni lijekovi za liječenje po život opasnih bolesti (antibiotici, onkološki lijekovi, analgetici, kardiovaskularni lijekovi, antivirotici, antimalarici i dr.).

Dodaci prehrani, za razliku od lijekova, ne služe liječenju već samo pomažu u održavanju zdravlja. Dodaci prehrani su pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja, ali nisu namijenjeni liječenju bolesti(27). Stoga oni ne prolaze kroz postupak odobravanja poput lijekova i nisu u nadležnosti HALMED-a. Velik broj dodataka prehrani se

krivotvori na način da se dodaje djelatna tvar poznatog djelovanja, koja se ne deklarira na pakiranju a zahtjeva strogu kontrolu kakvoće, kliničke djelotvornosti i sigurnosti primjene. Na taj način se dovodi u opasnost svaki potrošač koji je uvjeren da konzumira proizvode prirodnog podrijetla.

1.2.2 Borba protiv krivotvorina u Republici Hrvatskoj

Prije stavljanja na tržište, svaki lijek mora proći ocjenu nadležnog tijela (HALMED-a ili EMA-e) te zadovoljiti postavljene stroge zahtjeve kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti. Nakon odobrenja lijekova za stavljanje na tržište njihova se kakvoća neprekidno provjerava kao što se prate i nuspojave lijekova u prometu. Na taj način se hrvatskim pacijentima neprekidno osiguravaju jednako kvalitetni i sigurni lijekovi u zakonitim prodajnim mjestima.

U svrhu borbe protiv krivotvorenih lijekova, u Hrvatskoj je uspostavljena suradnja između carine, policije, Ministarstva zdravstva i HALMED-a, u kojoj su definirane kontakt osobe, te se provodi intenzivna razmjena informacija u skladu s nadležnostima. HALMED pruža stručne informacije u pogledu razvrstavanja i identifikacije proizvoda te usmjerava na daljnje nadležno postupanje, a u određenim slučajevima provodi i provjeru kakvoće proizvoda/lijeka pod sumnjom.

Zakonom o lijekovima i odgovarajućim pravilnicima jasno se naglašava da sve pravne i fizičke osobe koje obavljaju promet na veliko i malo lijekovima, kao i proizvođači lijekova, moraju odmah obavijestiti HALMED o krivotvorenom lijeku koji zaprime ili im je ponuđen ili je riječ o sumnji na krivotvoreni lijek.

U borbi protiv krivotvorina ključna je, uz usku suradnju institucija kako na nacionalnom, tako i na međunarodnom nivou, i stalna edukacija i

informiranje građana kako bi mogli kritički pristupiti sadržajima na internetu i kako ne bi došli u napast kupiti lijek na ilegalnom prodajnom mjestu. Stoga HALMED kontinuirano radi na osvješćivanju građana o ovim opasnostima objavljivanjem edukativnih oglasa i tekstova u medijima i na internetskim stranicama HALMED-a(27).

Budući da je internetska trgovina jedan od vodećih izvora krivotorenih lijekova, Europska komisija je u lipnju 2014. godine predstavila zajednički logo koji će se nalaziti na ovlaštenim internetskim trgovinama na području Europske unije te će se na taj način omogućiti ljekarnama da izbjegnu opasnost od kupnje krivotvorina. Hrvatske građane će logo odvesti na internetske stranice HALMED-a, gdje će biti objavljen popis ovlaštenih internetskih ljekarni s poslovnim sjedištem u RH. Ako ljekarna nije na tom popisu, građanima se preporučuje da putem nje ne nabavljaju lijekove. Logo s lijeve strane pravokutnika ima zastavu države članice u kojoj je sjedište ljekarne, a tekst je preveden na službeni jezik te države(27).

1.3 Kromatografske tehnike odjeljivanja

Kromatografske tehnike odjeljivanja su tehnike odjeljivanja u više koraka u kojima se sastavnice uzorka razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna stacionarna, a druga mobilna. Stacionarna faza može biti krutina ili tekućina nanesena na krutinu ili gel. Stacionarna faza može biti pakirana u koloni, raširena u sloju, ili raspodijeljena kao film itd. Mobilna faza može biti plinovita, tekuća ili superkritična tekućina(2016.,HRF).

Kromatografske metode možemo podijeliti prema mehanizmu odvajanja komponenti:

- razdjelna (particijska) kromatografija – odjeljivanje molekula između dvije tekuće faze
- adsorpcijska kromatografija – odjeljivanje se temelji na različitim afinitetima sastojaka uzorka prema adsorpciji na površini aktivne čvrste tvari
- ionsko-izmjenjivačka kromatografija – vezanje iona (kationa, aniona) na nepokretnu fazu ionskom izmjenom
- kromatografija isključenjem – razdvajanje prema veličini molekula
- afinitetna kromatografija - za mehanizam separacije se koristi jedinstvena biološka interakcija analita i liganda(28).

Opće metode kromatografije su :

- Papirna kromatografija - otopljene tvari nanešene u vrlo malim količinama na filter papir se razdjeljuju između otapala kojim je impregniran filter papir (nepokretna faza) i otapala koje putuje po papiru (pokretna faza)
- Tankoslojna kromatografija – odjeljivanje se temelji na adsorpciji, razdjeljenju, ionskoj izmjeni, isključenju veličinom ili na kombinaciji tih mehanizama. Nepokretna faza je tanki sloj fino dispergiranih

čestica nanesen na staklenu ili plastičnu ploču, a pokretna se faza kreće kapilarnim silama ili silom gravitacije uzduž sloja(29).

- Plinska kromatografija - separacijska tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata analiziranog uzoraka u kojoj se kao pokretna faza koristi plin(He, Ar, H_2, N_2...) a nepokretna faza je selektivna tekućina velike viskoznosti ili selektivna krutina nanesena na kruti nosač. Budući da je pokretna faza plin, pri analizi komponente smjese se moraju prevesti u plinsku fazu(30).

- Tekućinska kromatografija - tehnika razdvajanja komponenti u kojoj je pokretna faza tekućina koja prolazi kroz kolonu koja sadrži stacionarnu fazu sastavljenu od nepravilnih ili sferičnih čestica, poroznog monolitnog sloja ili porozne membrane. Komponente se razdvajaju na temelju njihovih interakcija sa stacionarnom fazom dok prolaze kroz kolonu(31).

- Kromatografija isključenjem po veličini – razdvajanje komponenti temelji se na veličini čestica. Stacionarna faza je gel ili porozna matrica u kojoj manje molekule zaostaju te kasnije izlaze s kolone, dok velike molekule koje ne difundiraju u pore brže izlaze s kolone(32).

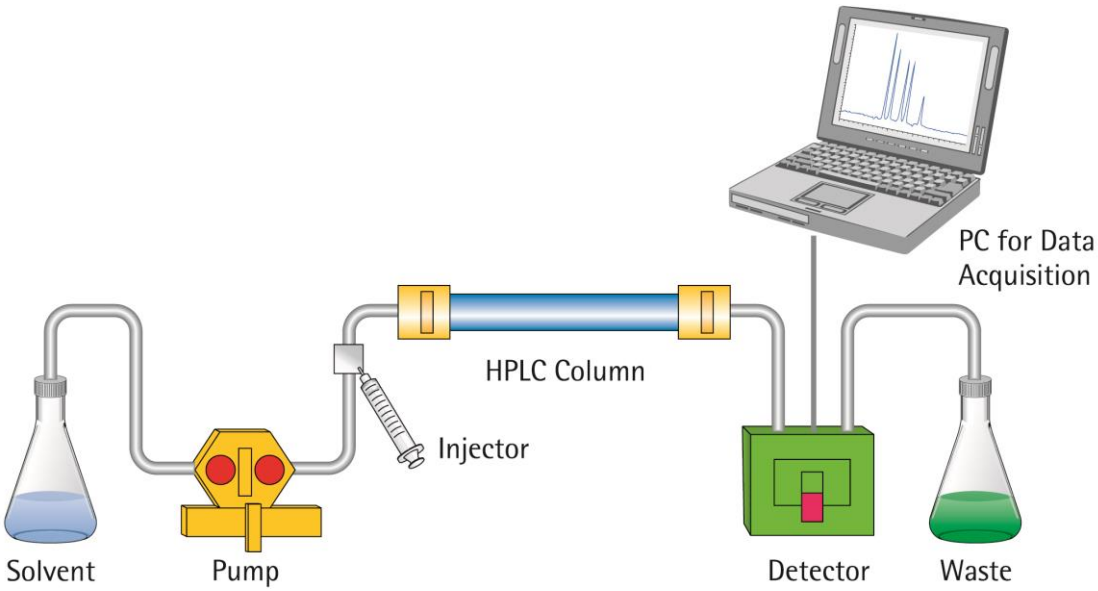
- Kromatografija sa superkritičnom tekućinom –mobilna faza je plin na temperaturi i tlaku iznad kritičnih vrijednosti odn.superkritični fluid. Najčešće se koristi CO_2 , čija je gustoća pri kritičnim uvjetima slična tekućinama, pa se ponaša kao otapalo(31).

1.3.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je kromatografska metoda koja se koristi u biokemiji i analitici za razdvajanje, identificiranje i kvantifikaciju djelatne tvari(33). Razdvajanje se postiže prolaskom uzorka, otopljenog u mobilnoj fazi, kroz kolonu koja je ispunjena česticama stacionarne faze djelovanjem visokog tlaka. Komponente se razdvajaju na temelju njihovih interakcija sa stacionarnom fazom dok prolaze kroz kolonu.

HPLC uređaj se sastoji od sljedećih komponenti:

- rezervoar mobilne faze
- pumpa
- injektor
- stupac
- detektor



Slika 3. Shematski prikaz HPLC uređaja (preuzeto s : http://freeweed.it/hplc-funziona-test-laboratorio-determinare-valori-thc-cbd/)

Najčešće mobilne faze uključuju mješavinu vode s organskim otapalima poput acetonitrila ili metanola. Tokom kromatografske analize sastav mobilne faze može biti konstantan tzv. izokratno eluiranje, ili se mjenjati tokom analize što se naziva gradijentno eluiranje. Odabir odgovarajuće mobilne faze ovisi o intenzitetu interakcija različitih sastavnica uzorka i čestica stacionarne faze. Mobilna faza se u kolonu uvodi pod visokim tlakom (50-350 bar) pomoću pumpe koja također održava stalnu brzinu (0,1-10 ml/min) prolaska mobilne faze.

Kolone su cijevi napravljene od nehrđajućeg čelika koja je punjena česticama stacionarne faze promjera 3-10 μm u kojoj se usred različitih fizikalno-kemijskih interakcija odvija razdvajanje spojeva prisutnih u analiziranom uzorku. Vrijeme od injektiranja analita u tok mobilne faze do vremena kada pik analita izađe iz kolone i uđe u detektor naziva se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (Rt).

Detektor stvara signal proporcionalan količini komponente uzorka koja izlazi iz kolone, čime se u kombinaciji s programskim paketima na računalu omogućuje kvantitativna analiza komponenata uzorka.

Vrste tekućinske kromatografije koje se najčešće koriste:

- kromatografija normalnih faza – stacionarna faza je polarna dok je mobilna faza nepolarna te se odvajanje analita temelji na polarnosti. Adsorpcijska snaga se povećava povećanjem polarnosti analita i interakcijama između polarnog analita i polarne stacionarne faze čime se ujedno produžuje vrijeme eluacije analita iz kolone.
- kromatografija obrnutih faza – stacionarna faza je nepolarna a mobilna faza polarna. Odvajanje analita temelji se na hidrofobnim interakcijama koje su rezultat repulzije između polarnog eluensa, nepolarnog analita i nepolarne stacionarne faze.

- ionsko-izmjenjivačka kromatografija – razdvajanje se temelji na naboju analiziranog analita. Razdvajanje analiziranih spojeva se temelji na interakcijama kiselinskih odnosno bazičnih skupina vezanih na stacionarnoj fazi i iona u analitu koji se razdvajaju.
- kromatografija isključenjem (gel kromatografija) – razdvajanje analiziranih spojeva vrši se na temelju veličine molekula analiziranih spojeva.
- bioafinitetna kromatografija – razdvajanje se temelji na interakcijama proteina i liganada koji se nalaze na stacionarnoj fazi i u analitu. Odlika ove tehnike je što se već u jednom koraku može postići vrlo visoki stupanj čistoće analiziranih spojeva(33).

Vrste detektora su:

- UV/VIS detektor
- Fluorescentni detektor
- Elektrokemijski detektor
- Detektor indeksa loma
- Maseni spektometar (MS)

Rezultat HPLC analize je kromatogram, prikaz eluacijskih krivulja odnosno vrhova koji su nastali nakon prolaska analita kroz kolonu i detektor. Kromatogram je određen vremenom koje je potrebno analitu za dolazak do detektora, tj. izlazak iz kolone i površinom pojedinog vrha koja ovisi o koncentraciji analita. Idealni kromatogrami predstavljeni su kao niz Gaussovih vrhova na baznoj liniji. Položaj vrha na vremenskoj osi predstavlja zadržavanje analita na koloni i specifičan je za pojedini analit u određenim kromatografskim uvjetima te je zbog toga ovaj podatak koristan u identifikaciji analita. S druge strane, površina vrha nam služi za određivanje sadržaja analita jer iz nje možemo izračunati količinu naše tvari pomoću otopina standarda i kalibracijske krivulje.

1.4 Provjera prikladnosti sustava za HPLC metodu

Prije početka provođenja ispitivanja na HPLC uređaju potrebno je provesti provjeru prikladnosti sustava za navedenu standardnu metodu Odjela službenog laboratorija za provjeru lijekova u HALMED-u za određivanje sibutramina koja je prethodno validirana a u svrhu potvrde da je sustav sposoban provesti dosljednu analizu.

Prikladnost sustava je provjera da li će sustav u cjelini davati rezultate očekivane točnosti i preciznosti već validirane metode / postupka.

Postupak provjere prikladnosti sustava (SST) uključuje provjeru parametara :

- Kromatografski parametri – faktor simetrije, rezolucija između pikova
- Preciznost i linearnost metode
- Granica određivanja (LOQ)
- Provjera valjanosti kromatografskog sustava – preciznost retencijskog vremena analita, preciznost injektiranja, prijenos analita

1.4.1 Kromatografski parametri

1.4.1.1 Faktor simetrije odnosi se na izgled vrha. Provjerava se na 5 % visine pika 100%-tnog standarda od bazne linije , a mora biti od 0,8–1,5

1.4.1.2 Rezolucija između vrhova je najmanji razmak između kritičnog para vrhova čija je najmanja dozvoljena vrijednost 1,5. Kao mjera rezolucije ponekad se navodi kriterij peak-to-valley po kojem se rezolucija računa kao omjer nižeg vrha i visine između tog i susjednog vrha.

1.4.2 Preciznost i linearnost metode

1.4.2.1. Preciznost analitičkog postupka predstavlja iskaz o bliskosti podudaranja između neovisnih rezultata provedenog analitičkog postupka.

- ponovljivost (repetibilnost) je preciznost pod ponovljivim uvjetima mjerenja: isti analitički postupak, isti laboratorij, isti analitičar, kratko vrijeme između mjerenja

-intermedijarna preciznost (unutarlaboratorijska obnovljivost) je preciznost pod ponovljivim uvjetima mjerenja kroz duži vremenski period:isti analitički postupak, isti laboratorij, različiti analitičari, duži period izmeđumjerenja

- obnovljivost (reproducibilnost) je preciznost pod reproducibilnim uvjetimamjerenja:isti analitički postupak, različiti laboratoriji, različiti analitičari, duži period između mjerenja.

1.4.2.2 Linearnost podrazumijeva mogućnost metode/postupka da, unutar danog područja, daje rezultate mjerenja koji su izravno proporcionalni količini analita u uzorku. Ako je metoda linearna, koeficijent korelacije (k) mora biti u granicama 0,900 – 1,000.

1.4.2.3 Određivanje sadržaja djelatne komponente provodi se pripremom standardne otopine u koncentracijama od 80%, 100% i 120%. Svaka otopina standarda injektira se 2 puta te se za svako injektiranje računa faktor odaziva detektora (RF). Relativna standardna devijacija (RSD) svih 6 mjerenje RF vrijednosti mora biti manja od 2% za HPLC.

Za određivanje sadržaja onečišćenja pripremaju se standardne otopine u koncentracijama od 80%, 100%, 120% . Svaka otopina standarda injektira se 2 puta te se za svako injektiranje računa faktor odaziva

detektora (RF). Zahtjeva se da relativna standardna devijacija (RSD) svih 6 mjerenje RF vrijednosti mora biti manja od 5% za HPLC.

U slučajevima kada dođe do prekida rada analize ili se analiza mora ponoviti iz odgovarajućih razloga, moguće je koristiti ranije pripremljene standarde pod uvjetom da se ispita stabilnost standardnih otopina. Ispitivanje se započinje injektiranjem 100%-tnog standarda te se njegova površina uspoređuje s površinom njegovog prvog injektiranja poslije pripreme. Ukoliko se omjer površine pika u otopini koja se ponovno injektirala i površine pika u prvom injektiranju nalazi u rasponu 0,98–1,02 možemo reći da je potvrđena stabilnost standarda.(34)

1.4.3 Granica određivanja (Limit of quantificatin,LOQ)

Granica određivanja (granica mjerljivosti) je najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti/mjeriti uz odgovarajuću preciznost i točnost.

Granica određivanja je važan parametar kod određivanja srodnih spojeva HPLC tehnikom. Provjerava se omjer signala i šuma bazne linije u otopini standarda čija je koncentracija 0,05% od kocentracije aktivne tvari u uzorku iz kojeg se određuju onečišćenja (S/N) te on mora biti jednak ili veći od 10. S/N se računa po formuli :

S/N = 2H (visina pika) / h (visina šuma)

Otopina koja zadovolji LOQ kriterije injektira se najmanje 5 puta , a dobiveni podaci se ujedno koriste i za potvrdu parametra Preciznost injektiranja.(34)

1.4.4 Preciznost vremena zadržavanja, preciznost injektiranja i prijenos analita

Kod određivanja sadržaja aktivne komponente , preciznost vremena zadržavanja prati se na 5 injektiranja 100%-tnog standarda koji se injektiraju tokom analize, a obavezno mora biti uključeno injektiranje standarda na kraju sekvence. Odstupanje vremena zadržavanja pojednog standarda mora biti unutar granice ± 5%.

Preciznost injektiranja za određivanje sadržaja aktivne komponente se prati za 5 injektiranja 100%-tnog standarda tijekom analize. RSD površine pikova moraju biti manji ili jednaki 1,5%. Preciznost injektiranja za određivanje onečišćenja provjerava se na koncentraciji standarda koja odgovara LOQ i mora za 5 injektiranja biti $\leq$ 10%.

Posljednji kriterij provjere je prijenos analita koji se određuje injektiranjem 100%-tnog standarda kojeg slijedi injektiranje otapalo. Prijenos analita u sljedeće injektiranje mora biti $\leq$ 0,2% vrijednosti površine 100%-tnog standarda.

Ukoliko se zadovolje svi kriteriji provjere prikladnosti sustava za HPLC metodu, moguće je izvršiti ispitivanje uzoraka i očekivati vjerodostojne rezultate(34).

2. Obrazloženje teme

U današnje vrijeme sve veći broj pretilih i osoba s povećanom tjelesnom masom konzumiraju prirodne preparate za mršavljenje. Potrošači vjeruju da su prirodni proizvodi sigurniji od lijekova te na svoju ruku započinju s tretmanima. Na hrvatskom tržištu je dostupan velik broj proizvoda biljnog podrijetla u obliku kapsula ili čajeva, a koji obećavaju učinak mršavljenja. U Europi je velik broj proizvoda koji sadrže nedeklariranu farmaceutski aktivnu tvar, te se time smatraju krivotvorenima. Uočilo se kako velik broj proizvoda sadrži upravo aktivnu tvar sibutramin koja je zbog velikog broja nuspojava povučena te zabranjena na hrvatskom i europskom tržištu.

Cilj ispitivanja bio je provjeriti prikladnost metode tekućinske kromatografije, koja se koristi u laboratoriju Agencije za lijekove te ispitati proizvode biljnog podrijetla iz hrvatskih ljekarni koji deklariraju samo prirodne sastojke a za koje postoji mogućnost da sadrže tvar sibutramin te time predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača.

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Referentne tvari

Sibutramine hydrochloride monohydrate, Toronto research Chemicals Ind.,Canada Kataloški broj: S422500

3.1.2 Otapala i reagensi

Methanol, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, kat.br.: 1.06007.2500, br.serije: 10933607807

Acetonitrile, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, kat.br.: 1.00030.2500, br.serije:I854630639

*Butane sulphonic acid sodium salt,*Merck KGaA, Darmstadt,Njemačka, kat.br.:2386-54-1 , br.serije : K47389203631

Orthophosphoric acid, Honeywell, New Jersey,SAD, br.serije: 10290

Ultračista voda,Halmed

3.1.3 Uzorci

1. Tonalin CLA, kapsule Proizvođač: Natrol,Inc. USA, br.serije: 2073812

2.Ella's čaj Proizvođač: Epimen d.o.o.,Hrvatska , br.serije: L48652

3.Juicy slim, voćne karamele Proizvođač: Milsing d.o.o.,Hrvatska

4.Capsiplex, kapsule Proizvođač: Bauer Nutrition,UK , br.serije:130976

5.Herbafast lady, kapsule Proizvođač: Abela Pharm,Srbija br.serije:160428

6.Thermogenic complex, kapsule Proizvođač: Solgar Inc.,USA br.serije: 20104416

7.Green coffe, kapsule Proizvođač: Luminus Mod,Hrvatska br.serije:20503028

8.Garcinia Cambogia, kapsule Proizvođač: Natures Aid,Ltd, UK br.serije: 90271001

3.1.4 Laboratorijski instrumenti

Tarionik s tučkom

Vaga Mettler Toledo

Vibracijska mješalica

HPLC Agilent technologies 1200

Ledenica za reagense

3.1.5 Programski paketi

Agilent MassHunter Workstation Data Aquisition

Agilent MassHunter Workstation Data Analytics

3.2 Metode

3.2.1 Kromatografski uvjeti

Ispitivanje je provedeno HPLC tehnologijom s UV detektorom

Instrument: Agilent 1200 RR

Kolona: μBondapack C18, 3,9x150 mm, 10 μm, serija: 0224340361

Protok: 1,5 ml/min.

Temperatura kolone: 25° C

Volumen injektiranja: 20 μL

Valna duljina: 220 nm

Mobilna otopina: Butan-1-sulfonatna kiselina, natrijeva sol(pH 3,0 ortofosfatna kis.) i acetonitril

3.2.2 Priprema otopina

Priprema mobilne faze

1 g butan-1-sulfonatna kiselina,natrijeva sol se otopi u 675 mL ultračiste vode te se ortofosfornom kiselinom podesi pH 3 otopine. Doda se 325 mL acetonitrila i promješa.

Priprema standardnih otopina

Izvažu se dvije odvage od 15 mg standarda sibutramina te se otope u 100 ml metanola. Iz dobivenih 150%-tnih osnovnih (stock) otopina pripremaju

se razrjeđenja: 100%, 50%, 10%, 1%, 0,1 % i 0,05%. Ukupno je 12 standradnih otopina za dvije odvage.

Priprema uzoraka

Uzorci u obliku čaja se usitne u električnom mlinu za droge. Odvaže se 1 g usitnjenog uzorka i otopi u 100 mL metanola. 30 minuta se drži na vibracijskoj mješalici. Uzorak čaja u kojem prethodnim ispitivanjem nije nađen sibutramin korišten je kao placebo.

Uzorci u obliku voćnih karamela se usitne u tarioniku s tučkom te se izvaže 1 g uzorka i otopi u 100 mL metanola.

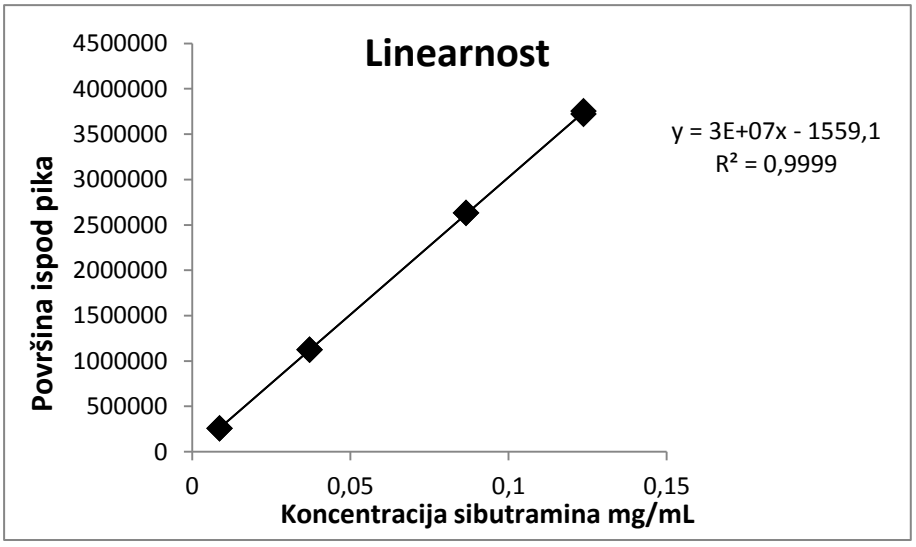
Uzorci u obliku kapsula se pripreme otapanjem 1 kapsule u 100 mL metanola.

4. Rezultati

U ispitivanju prisutnosti i određivanju sadržaja sibutramina u dodacima prehrani na hrvatskom tržištu korištena je standardna metoda određivanja sibutramina Odjela službenog laboratorija za provjeru lijekova-OMCL. Prije početka analize provjerili smo parametre prikladnosti metode. Potvrdom da je metoda prikladna za analizu započeli smo s ispitivanjem pribavljenih uzoraka dodataka prehrani s ciljem provjere sadrže li potonji nedeklariranu aktivnu tvar sibutramin. U ispitivanju smo koristili HPLC tehniku s DAD detektorom te su rezultati u ovom radu prikazani kromatogramima pojedinih uzoraka.

4.1 Linearnost

Analizu linearnosti smo proveli na 4 razrjeđenja otopina standarda po dvije odvage. Iz dobivenih vrijednosti površina pika i pripadajuće koncentracije napravili smo baždarnu krivulju s pripadajućom jednadžbom pravca pomoću koje smo izračunali teorijske vrijednosti površine ispod pika te dobili korelaciju regresijskog pravca 0,9999 .



Slika 4. Graf ovisnosti koncentracije standarda sibutramina i površine pika na kromatogramu

Uzorak	Vrijeme zadržavanja (min)	Površina pika	Koncentracija uzorka (mg/mL)	Retencijski faktor
SIB 10%	6,827	256954	0,008659	3,37002E-08
SIB2 10%	6,834	256509	0,008659	3,37587E-08
SIB 50%	6,739	1123802	0,037112	3,30234E-08
SIB2 50%	6,739	1122576	0,037112	3,30595E-08
SIB 100%	6,602	2629727	0,086594	3,29289E-08
SIB2 100%	6,621	2631851	0,086594	3,29024E-08
SIB 150%	5,81	3722162	0,123706	3,3235E-08
SIB2 150%	6,53	3752845	0,123706	3,29632E-08
Nagib pravca			30282397	
Koef. korelacije			0,9999	
RSD			1,038	

Tablica 1: Tablični prikaz rezultata provjere linearnosti metode za HPLC

Izračunom relativne standardne devijacije (RSD) retencijskih faktora svih mjerenja dobili smo RSD = 1,038 te zadovoljili zahtjev za provjeru prikladnosti sustava.

4.2 Faktor simetrije

Srednja vrijednost faktora simetrije dobivenih na kromatogramu svih ispitanih koncentracija standarada nalaze se u rangu 0,8–1,5 te je uvjet zadovoljen.

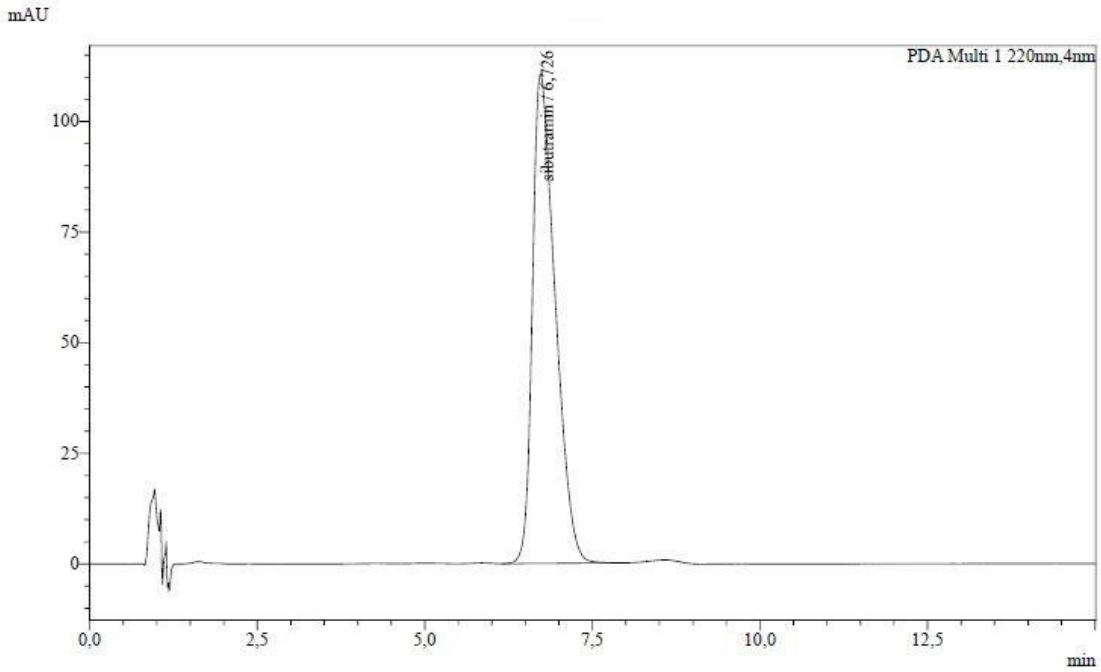
Uzorci	Faktor simetrije
SIB 10 %	1,0
SIB 2 10 %	1,0
SIB 50 %	1,1
SIB2 50 %	1,1
SIB 100 %	1,5
SIB2 100%	1,5
SIB 150%	1,6
SIB2 150 %	1,7
Srednja vrijednost	1,3

Tablica 2: Tablični prikaz faktora simetrije svih ispitanih standarada sibutramina dobivenih na kromatogramu

4.3 Detekcija sibutramina u uzorcima

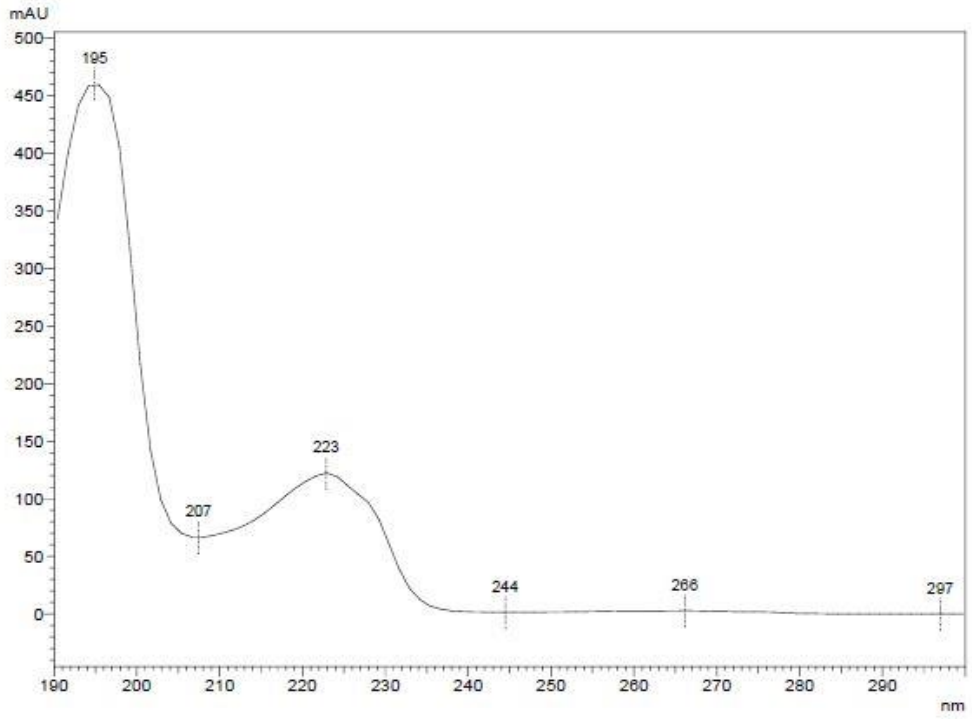
Detekcija sibutramina u standarnim otopinama provedena je HPLC tehnikom s UV/VIS (DAD) detektorom.

Na slici 5. prikazan je kromatogram standarda sibutramina s vremenom zadržavanja 6,726 minuta. U slučaju da je u ispitivanim uzorcima prisutan sibutramin očekujemo da će se eluirati između 6,5–7,0 min. Ukoliko se potvrdi prisutnost sibutramina rezultati se pored vremena zadržavanja provjeravaju i spektrom valnih duljina sibutramina prikazan na slici 6. koji je dobiven DAD detektorom koji je dio HPLC uređaja.



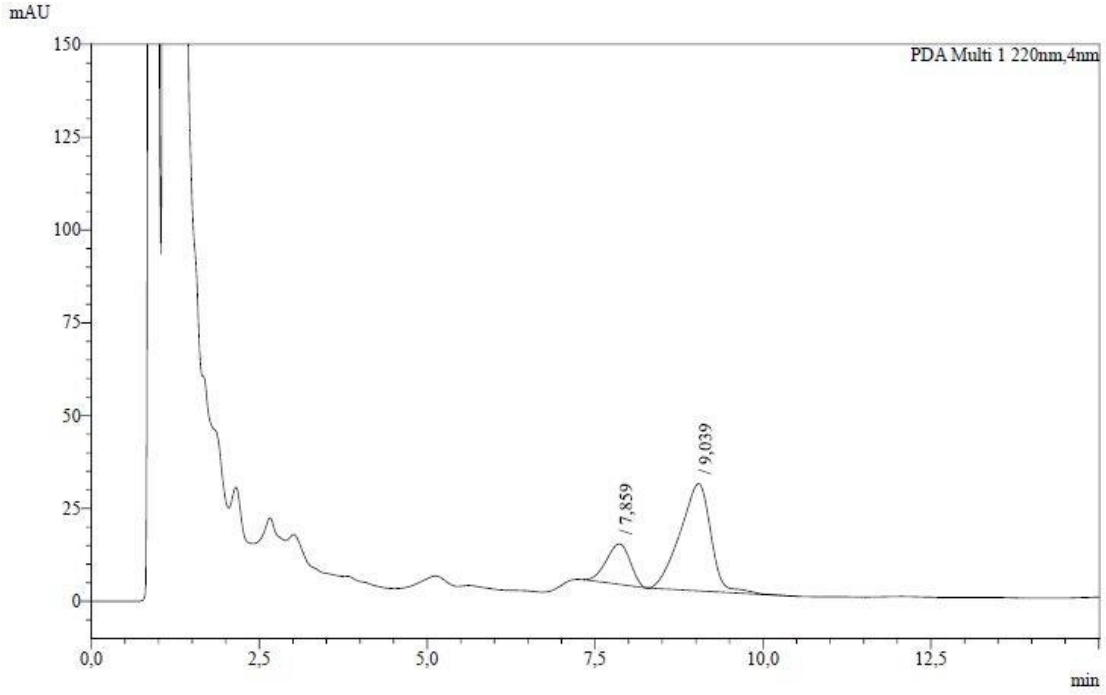
Slika 5. Kromatogram standarda sibutramina

dobiven HPLC analizom otopine standarda u metanolu . Rezultat prikazuje retencijsko vrijeme (RT) sibutramina koje iznosi 6,726 min.



Slika 6. Spektar valnih duljina sibutramina snimljen pri 220 nm

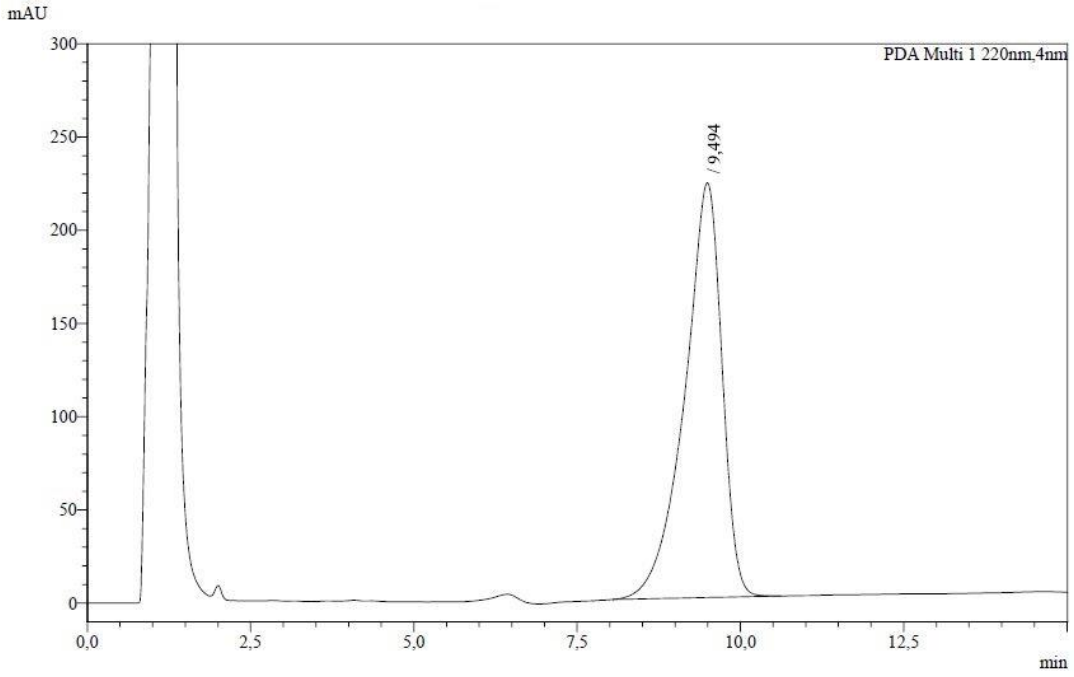
Kao negativna kontrola ,odnosno placebo, korišten je kromatogram Ella's čaja u kojem prethodno nije nađen sibutramin. Na proizvodu su deklarirani sastojci: List bijelog jasena (*Fraxinus excelsior*) 2 g, list obične breze (*Betula alba*) 1,6 g, cvijet crne bazge (*Sambucus nigra*) 1,6 g, zelen europske zlaznice (*Solidago virgaurea*) 1,2 g, list paprene metvice (*Mentha x piperita*) 0,8 g, plod običnog komorača (*Foeniculum vulgare*) 0,8 g. Na slici br.6 vidiljivo je da nema pika na RT = 6,726 što dokazuje odsustvo sibutramina.



Slika 6. Kromatogram Ella's čaja korišten kao placebo

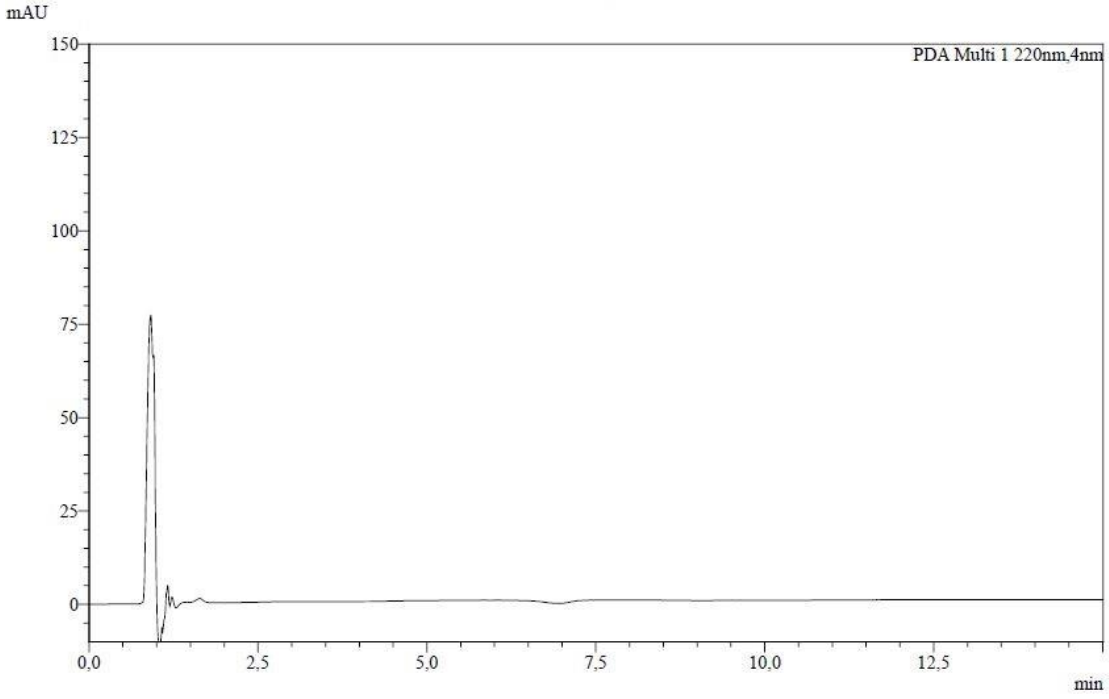
dobiven HPLC analizom otopine uzorka u metanolu

Nakon analize standardnih otopina i placeba ispitani su i uzorci te su priloženi kromatogrami. Od 7 uzoraka priloženih u nastavku rada niti u jednom nije nađen sibutramin te se na vremenu zadržavanja 6,726 ne nalazi pik koji odgovara sibutraminu.



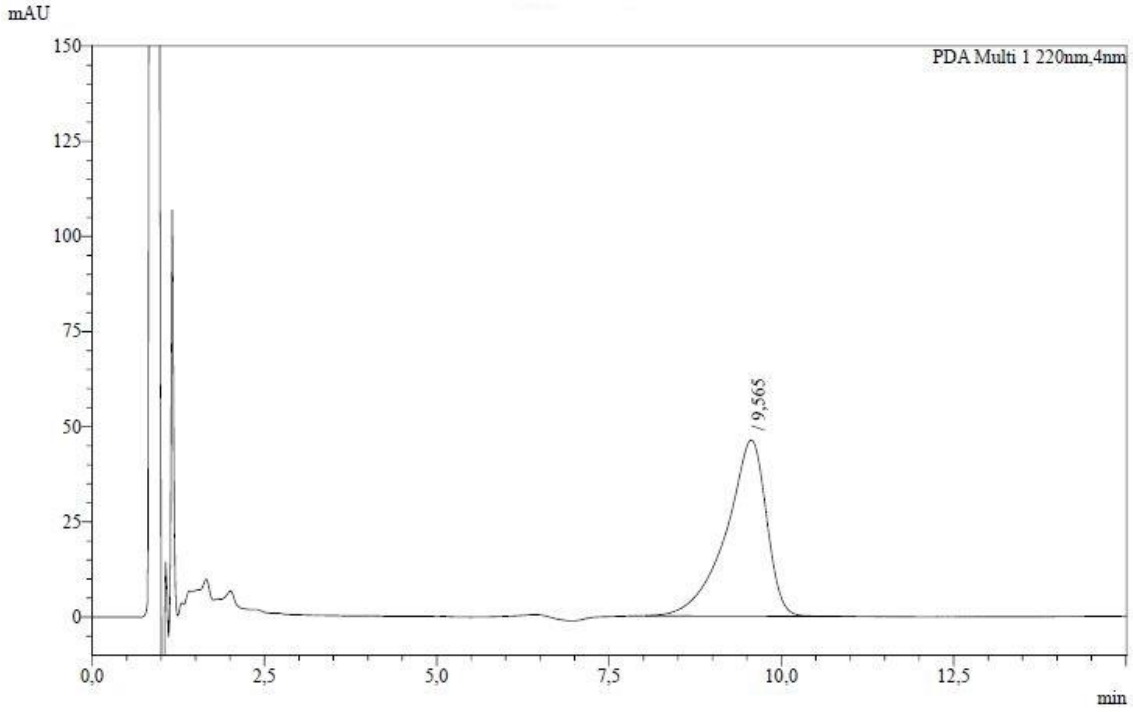
Slika 7. Kromatogram Capsiplex kapsula

dobiven HPLC analizom otopine 1 kapsule u metanolu



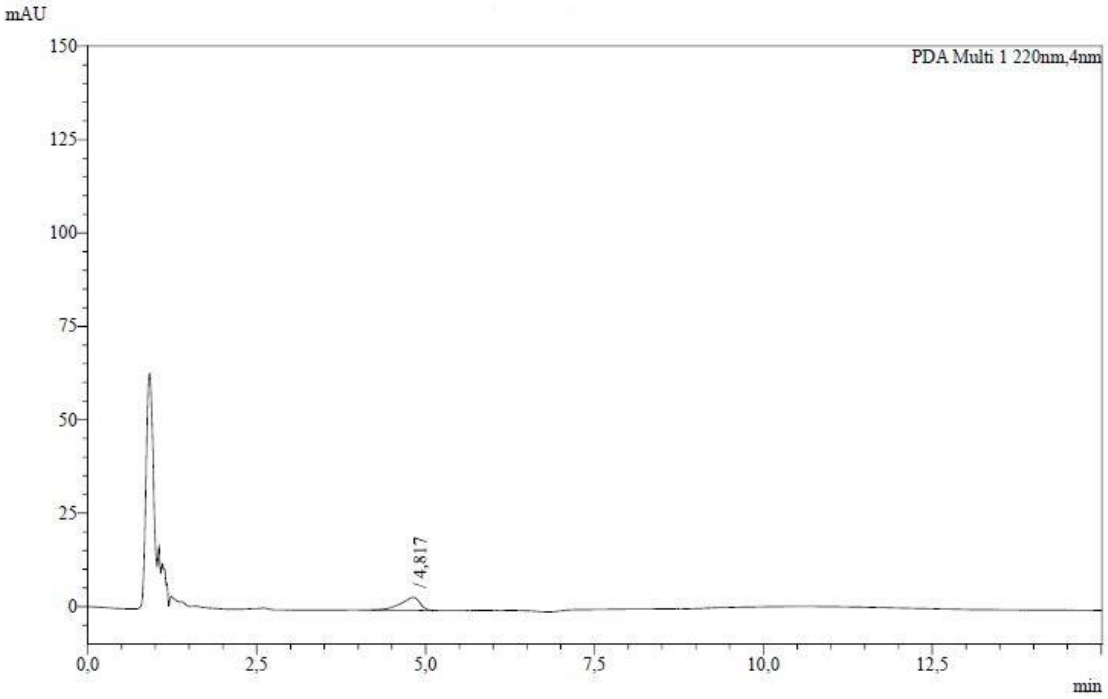
Slika 8. Kromatogram Garcinia cambogia kapsula

dobiven HPLC analizom otopine 1 kapsule u metanolu



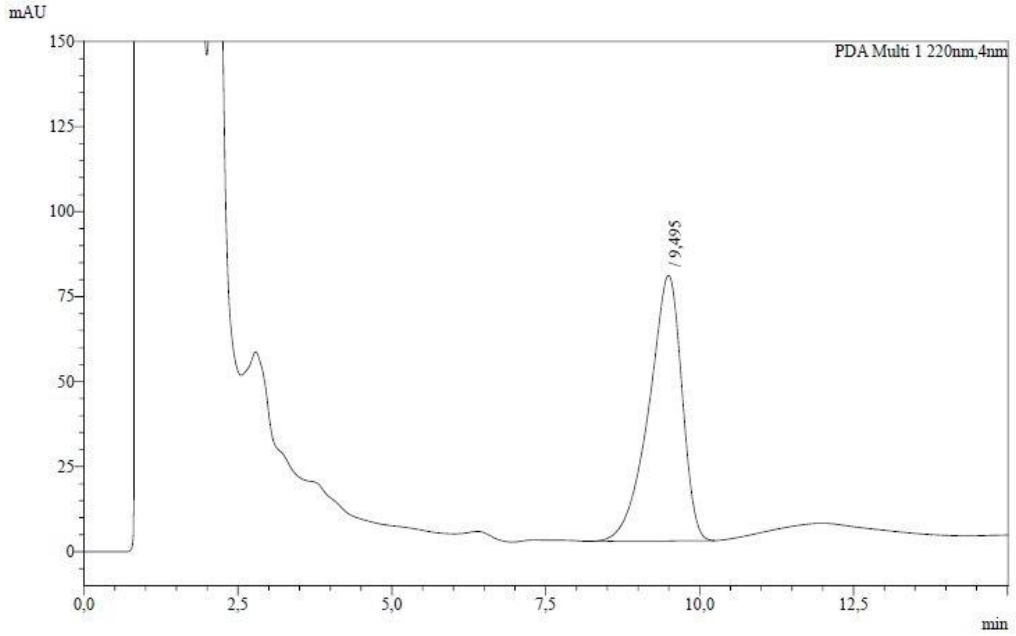
Slika 9. Kromatogram herbafast kapsula

dobiven HPLC analizom otopine 1 kapsule u metanolu



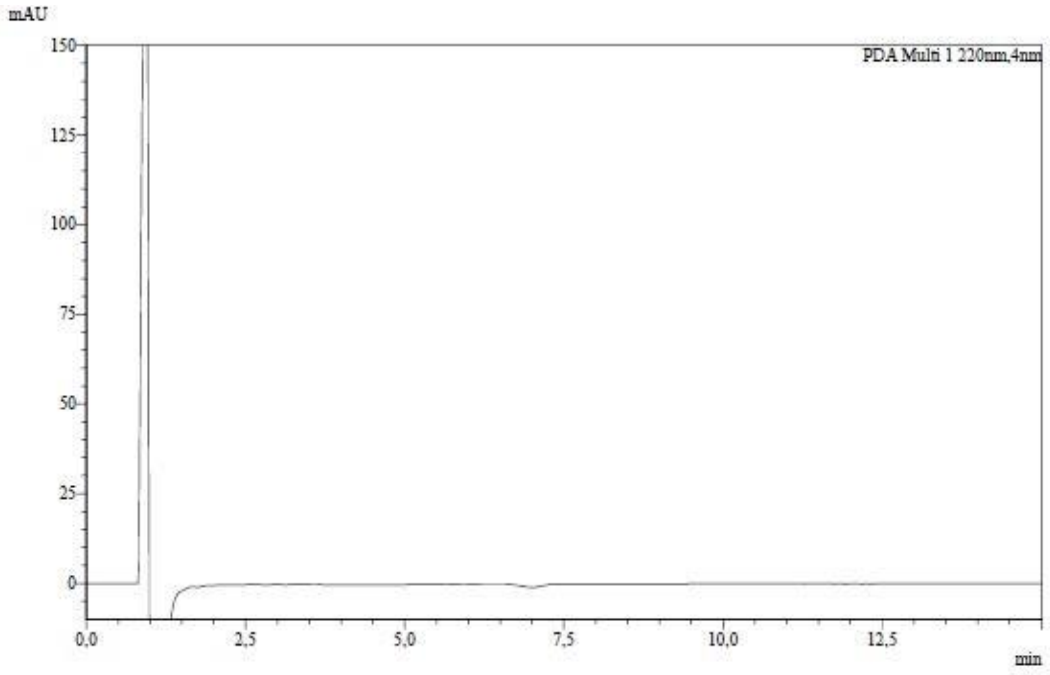
Slika 10. Kromatogram Juicy Slim voćnih karamela

dobiven HPLC analizom otopine 1 g karamele u metanolu



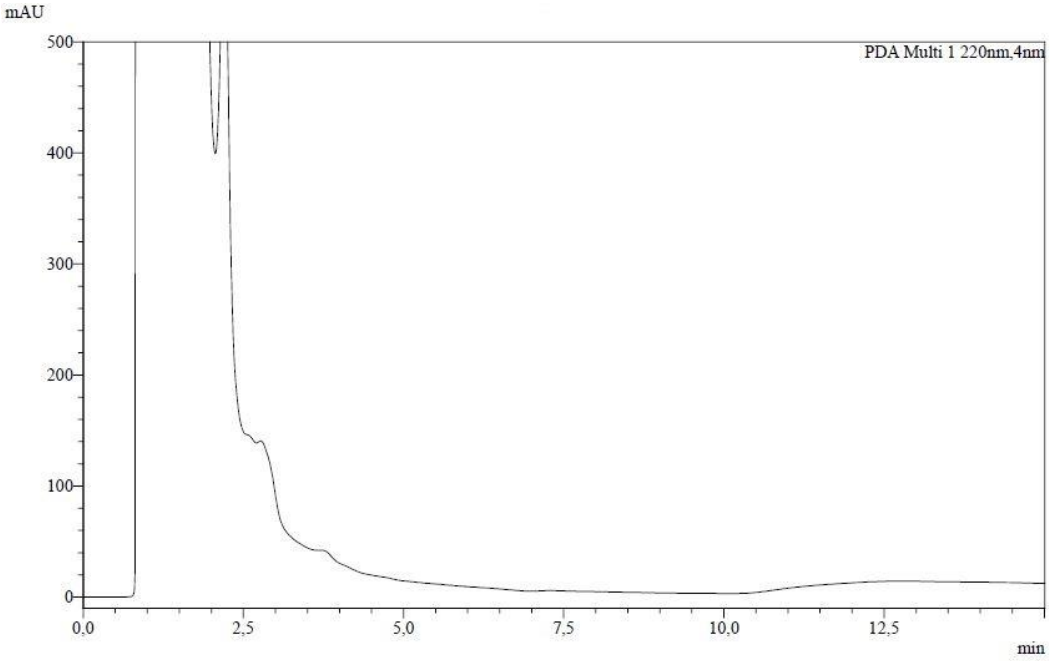
Slika 11. Kromatogram Thermogenic complex kapsula

dobiven HPLC analizom otopine 1 kapsule u metanolu



Slika 12. Kromatogram Tonalin mekih kapsula

dobiven HPLC analizom otopine 1 kapsule u metanolu



Slika 13. Kromatogram kapsula zelene kave

dobiven HPLC analizom otopine 1 kapsule u metanolu

5. Diskusija

S obzirom da je u ovom ispitivanju korištena standardna metoda Odjela službenog laboratorija za provjeru lijekova u HALMED-u te je ona u potpunosti validirana prije nego li je objavljena u SOP-u (Standardni operativni postupak), bilo je dovoljno provjeriti prikladnost sustava. Linearnost sustava je provjerena otopinama standarda u različitim koncentracijama po dvije odvage od svake koncentracije te nam rezultati u tablici 1. prikazuju koeficijent korelacije koji iznosi 0,9999. Koeficijent nam govori da između varijabli promatranog modela, odnosno između koncentracija standarda sibutramina postoji linearna povezanost i neprekidna normalna distribucija.

Drugi kriterij koji je provjeren je faktor simetrije koji govori o izgledu pika. Pripremljene otopine standarda različitih koncentracija injektirane su te su iz dobivenih kromatograma očitani faktori simetrije koji su priloženi u tablici 2. u poglavlju Rezultati.

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da su zadovoljeni kriteriji linearnosti i faktor simetrije te je metoda bila pogodna za ispitivanje uzoraka dodataka prehrani za mršavljenje prikupljenih na hrvatskom tržištu.

Ispitano je 8 dodataka prehrani u obliku čaja, voćnih karamela i kapsula. Svi rezultati su negativni na sibutramin što znači da su dodaci prehrani bili valjano deklarirani i ne sadrže sibutramin. Budući da je sibutramin zabranjen radi velikog broja nuspojava koje su se uglavnom odnosile na kardiovaskularne poremećaje i moždane udare (35), važno je pratiti kakvoću dodataka prehrani kako bi se umanjila pojava krivotvorina. Zabilježeni su slučajevi krivotvorina zelene kave koji su se unazad 8 godina pojavili na tržištu Crne Gore te su po kapsuli sadržavali i do 30 mg sibutramina. Nisu nam dostupni podaci o ispitivanju sibutramina u kapsulama zelene kave tada, no našom metodom,8 godina kasnije,

sibutramin nije nađen u kapsulama zelene kave (proizvođača Luminus Mod).

Velik broj zemalja je zabilježio pojavu dodataka prehrani za mršavljenje koji su deklarirani kao prirodni proizvodi a sadržavali su sibutramin. Primjerice, Nizozemska je 2015. godine objavila rezultate ispitivanja tržišta na krivotvorene lijekove i dodatke prehrani gdje su od 50 uzoraka biljnih preparata za mršavljenje pronašli sibutramin u čak njih 24(36). Ako se usporede njihovi podaci s našim ispitivanjem gdje od 8 uzoraka nije pronađen niti jedan pozitivan na sibutramin možemo zaključiti kako su na hrvatskom tržištu krivotvoreni dodaci prehrani rijetki. Nažalost, ne može se sa sigurnošću isključiti prisustvo takvih proizvoda na hrvatskom tržištu budući da bi za takav zaključak bilo potrebno ispitati sve dostupne dodatke prehrani za mršavljenje. Pored toga, internet trgovina predstavlja glavni izvor krivotvorenih lijekova i dodataka prehrani i u Hrvatskoj.

Svake godine provodi se u svrhu borbe protiv krivotvorina operacija Pangea u organizaciji INTERPOL-a u kojoj redovito sudjeluje i Hrvatska policija, carina i Agencija za lijekove i medicinske proizvode kao regulatorno tijelo, zaustavljanjem krivotvorenih lijekova i medicinskih proizvoda u poštanskim pošiljkama, na granicama te zatvaranjem internetskih stranica koje prodaju krivotvorene lijekove i medicinske proizvode. U operaciji provedenoj 2015. Godine zaustavljeno je više od 20 milijuna krivotvorenih lijekova, 2414 web stranica je zatoreno te je provedeno približno 430 istraga protiv krivotvoritelja(37). Važno je javnost upozoriti na oprez prilikom kupovine dodataka prehrani koji se nalaze u slobodnoj prodaji budući da nedeklarirane tvari u krivotvorenim lijekovima mogu narušiti zdravlje pojedinca i dovesti život u opasnost.

6. Zaključak

Provedeno ispitivanje nekoliko dodataka prehrani prikupljenih na hrvatskom tržištu dalo je negativne rezultate na sibutramin. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se pokazala kao prikladna tehnika za ispitivanje sastava dodataka prehrani. Budući da nisu ispitani svi dostupni dodaci prehrani za mršavljenje ne može se reći kako u Hrvatskoj što se tiče sibutramina, nema krivotvorina. Vrlo je važno ispitati sve dostupne dodatke prehrani za mršavljenje na hrvatskom tržištu kako bi dodaci prehrani prestali biti dostupni pučanstvu te bi se time pomoglo u osiguranju sigurnosti i zdravlja pacijenata.

7. Literatura

1. Poirier P, Cornier M-A, Mazzone T, Stiles S, Cummings S, Klein S, et al. Bariatric Surgery and Cardiovascular Risk Factors: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation. 2011 Apr 19;123(15):1683–701.

2. Paškov D. Usporedjivanje stanja uhranjenosti učenica strukovnih škola i gimnazija [PhD Thesis]. University of Zagreb. School of Medicine. Chair of Medical Statistics, Epidemiology and Medical Informatics.; 2016.

3. Medanić D, Pucarin-Cvetković J. Obesity–a public health problem and challenge. Acta Med Croatica. 2013;66(5):347–354.

4. Aronne LJ. Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. Obesity. 2002;10(S12).

5. Brglez E. Dopamin i njegove uloge u živčanom sustavu [PhD Thesis]. University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology.; 2017.

6. Prodić J. Polimorfizam gena za serotoninski prijenosnik u osoba oboljelih od epilepsije [PhD Thesis]. University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology.; 2011.

7. Velički V, Topolovčan T. Neuroscience, teaching, learning and speech development. In: Nastava i škola za net-generacije. Učiteljski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2017.

8. Leo J, Lacasse JR. The Media and the Chemical Imbalance Theory of Depression. Society. 2008 Feb;45(1):35–45.

9. Chaturvedi R, Reddig K, Li H-S. Long-distance mechanism of neurotransmitter recycling mediated by glial network facilitates visual function in Drosophila. Proc Natl Acad Sci. 2014 Feb 18;111(7):2812–7.

10. Esau K. Anatomy of seed plants. Soil Sci. 1960;90(2):149.

11. Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na+/Cl--dependent neurotransmitter transporters. Nature. 2005 Sep;437(7056):215–23.

12. Raum WJ. Adrenal Medulla (Catecholamine and Peptides). In: Endocrinology. Springer; 1997. p. 377–391.

13. Schulz C, Eisenhofer G, Lehnert H. Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. In: Pheochromocytoma. Karger Publishers; 2004. p. 1–25.

14. Mihaljević S, Mihaljević L, Orešković S, Elve\d ji-Gašparović V, Ignjatić Zokić T, Ćaćić M. Vasoactive stress hormone (adrenaline, noradrenaline and cortisol) concentration in plasma after administration of low doses of S-(+)-ketamine epidurally. Period Biol. 2009;111(2):257–261.

15. Kolić D. Funkcije biogenih amina kao neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu [PhD Thesis]. University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology.; 2016.

16. Wellman PJ. Norepinephrine and the control of food intake. Nutrition. 2000;16(10):837–842.

17. Feijó F de M, Bertoluci MC, Reis C. Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. Rev Assoc Médica Bras. 2011;57(1):74–77.

18. Hainer V, Kabrnova K, Aldhoon B, Kunesova M, Wagenknecht M. Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibition and Eating Behavior. Ann N Y Acad Sci. 2006 Nov 1;1083(1):252–69.

19. Maas JW, Landis HD. Brain Norepinephrine and Behavior: A Behavioral and Kinetic Study. Psychosom Med. 1965;27(5):399–407.

20. Misra AK, Verma SK. An Overview of pharmacotherapy of obesity: AN Update. Int J Pharm Sci Res. 2013;4(3):881.

21. Guy-Grand B, Crepaldi G, Vre P, Apfelbaum M, Gries A, Turner P. International trial of long-term dexfenfluramine in obesity. The Lancet. 1989;334(8672):1142–1145.

22. Lu TY-T, Kupa A, Easterbrook G, Mangoni AA. Profound weight loss associated with reboxetine use in a 44-year-old woman. Br J Clin Pharmacol. 2005 Aug;60(2):218–20.

23. Krivohlavek A, Žuntar I, Ivešić M. Sibutramine in slimming food supplements on the Croatian market determined by validated high-pressure liquid chromatographyelectrospray tandem mass spectrometry method. 2016;

24. Volpi-Abadie J, Kaye AM, Kaye AD. Serotonin syndrome. Ochsner J. 2013;13(4):533–540.

25. Eric Wooltorto. Obesity drug sibutramine (Meridia): hypertension and cardiac arrhythmias. Can Med Assoc J. 2002;166(10):1306–1307.

26. Tomić S, Milčić N, Sokolić M, Filipović Sučić A, Ilić Martinac A. Are there counterfeit medicines in Croatia? Liječnički Vjesn. 2010;132(3–4):81–86.

27. Agencija za lijekove i medicinske proizvode [Internet]. 2007. Available from:http://www.halmed.hr/Promet-proizvodnja-i-inspekcija/Krivotvoreni-lijekovi/

28. Bolanča T, Ukić Š. Ionska kromatografija. Sveučilište U Zagrebu Fak Kem Inženjerstva Tehnol Zagreb. 2013;

29. Car-Pavlic B. Razvoj UHPLC metode za odre\d jivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina prema načelu kvalitete ugra\d jene u dizajn [PhD Thesis]. University of Zagreb. Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Department of pharmaceutical analysis.; 2016.

30. Jerković I. Utjecaj termičkog tretiranja i skladištenja na zadržavanje aromatičnih spojeva soka od šipka s dodatkom šećera [PhD Thesis]. Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY. Department of Food Technologies. Sub-department of Food Engineering.; 2017.

31. Goldsmith JG. Modern Analytical Chemistry, 1st Edition (Harvey, David). J Chem Educ. 2000 Jun;77(6):705.

32. Holding S. Mechanisms: Size Exclusion Chromatography. Encycl Sep Sci. 2000;

33. SHORT A. Journal of Global Pharma Technology. 2009;

34. Zubčić, Snježana, Marković ,Božena. Provjera prikladnosti sustava za HPLC i GC metode. Agencija za lijekove i medicinske proizvode; 2017.

35. James WPT, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal LF, Maggioni AP, et al. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. N Engl J Med. 2010;363(10):905–917.

36. Van Hunsel F, Venhuis BJ, Keizers PHJ, Kant A. A 'natural' weight loss product containing sibutramine: Adulterated herbal product. Drug Test Anal. 2016 Mar;8(3–4):311–4.

37. Hensey CC, Gwee A. Counterfeit drugs: an Australian perspective. Med J Aust. 2016 May 16;204(9):344.

8. Zahvala

Zahvaljujem mentoru izv.prof.dr.sc. Siniši Tomiću koji mi je omogućio izradu diplomskog rada u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode i na taj način mi pružio mogućnost da steknem prvo radno iskustvo.

Veliko hvala mr.sc.Snježani Zubčić i mag.pharm. Rajki Truban Žulj na strpljenju, trudu i prenesenom znanju i vještinama tokom izrade ovog rada.

Hvala svim djelatnicima Agencije za lijekove i medicinske proizvode koji su me sa smiješkom i podrškom dočekali te mi na taj način osigurali pozitivnu, opuštenu radnu okolinu u kojoj je bilo zadovoljstvo boraviti.

Posebnu zahvalnost iskazujem roditeljima koji su mi omogućili visoko školovanje te uvijek bili najveća podrška i utjeha u najtežim trenucima.

9. Životopis

OSOBNE INFORMACIJE Karakašić Monika

Bodovaljci 74, 35420 Staro Petrovo Selo (Hrvatska)

0955330279

monika.karakasic@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 28/04/1994

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

16/04/2018–10/08/2018 **Izrada diplomskog rada**

Agencija za lijekove i medicinske proizvode (Hrvatska)

Tema :" Određivanje koncentracije sibutramina u dodacima prehrani HPLC tehnikom"

Mentor : Izv.prof.dr.sc. Siniša Tomić

Komentor : mag. Snježana Zubčić

2016–danas **Diplomski sveučilišni studij "Biotehnologija u medicini"**, Rijeka (Hrvatska)

22/07/2016–danas **Prvostupnik Biotehnologije i istraživanja lijekova**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

univ.bacc.biotech.et.pharm.inv.

Diplomirala s pohvalom "cum laude"

2013–2016 **Preddiplomski studij "Biotehnologija i istraživanje lijekova"**

Odjel za biotehnologiju,Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

2009–2013 **Gimnazija Nova Gradiška**

Nova Gradiška (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

27/06/2016–09/07/2016 **Stručna praksa**

Jadran galenski laboratorij, JGL d.d., Rijeka (Hrvatska)

-kontrola kvalitete

01/06/2016–10/07/2017

Prodavač
H&M, Rijeka

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B1
njemački	A2	B1	B1	A1	B1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine vješta u komunikaciji i prezentiranju ,iskustvo stečeno tokom školovanja i debata

Poslovne vještine

Upoznata radom odjela kontrole kvalitete Jadran galenskog laboratorija tokom prakse ,Hrvatska

Upoznata radom na HPLC uređaju tokom izrade diplomskog rada u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode, Hrvatska

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni kroisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik

- usavršeno korištenje Microsoft Office™ tools (Word, PowerPoint, Excel) Interneta
- dobro poznavanje programa za molekularno modeliranje(PyMOL, UCSF Chimera, Marvin, Avogadro, MacMol Plot,NAMD,VMD)

Ostale vještine

- tečaj engleskog jezika na International village,Slovačka (2012)
- demonstratura eksperimenata na otvorenim danima odjela za biotehnologiju (8/4/2014)
- demonstratura eksperimenata na otvorenim danima odjela za biotehnologiju (19/4/2016)

Vozačka dozvola AM, B