

Razvoj i validacija nove sHSS-GC-FID metode za određivanje sadržaja lako hlapljivih sastavnica u dodacima prehrani kod upalnih bolesti crijeva

Skendrović, David

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:205920>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



David Skendrović

**Razvoj i validacija nove sHSS-GC-FID metode za
određivanje sadržaja lako hlapljivih sastavnica u
dodacima prehrani kod upalnih bolesti crijeva**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je prijavljen na predmetu Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ani Mornar Turk, na posvećenom vremenu, znanju kao i brojnim stručnim savjetima kojima je upotpunila izradu i pisanje ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se asistentima Edvinu i Mariu na velikodušnoj pomoći i strpljenju prilikom rada u laboratoriju i savjetima prilikom realizacije samog diplomskog.

I na kraju jedno veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvijek bili potpora u svemu što radim.

Rad je dijelom financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost projekt: *Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva* [HRZZ-UIP-2017-05-3949].



Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Upalne bolesti crijeva.....	1
1.1.1 Definicija.....	1
1.1.2 Epidemiologija	1
1.1.3 Etiologija	1
1.1.4 Klinička slika.....	2
1.1.5 Liječenje upalnih bolesti crijeva.....	3
1.2 Plinska kromatografija	6
1.2.1 Uzorkovanje para iznad tekućina ili krutina	9
1.2.2 Prednosti i ograničenja plinske kromatografije.....	10
2. Obrazloženje teme	11
3. Materijali i metode.....	13
3.1. Materijali	13
3.1.1 Kemikalije	13
3.1.2 Pribor.....	13
3.1.3 Radni instrumenti	14
3.1.4 Programski paketi.....	14
3.2 Metode.....	15
3.2.1 Priprema standardnih otopina.....	15
3.2.2 Priprema uzorka.....	15
3.2.3 HSS-GC-FID analiza	15
4. Rezultati i rasprava	17
4.1 Razvoj i optimizacija HSS-GC-FID metode	17
4.2 Validacija metode	20
4.2.1 Selektivnost	20
4.2.2. Linearnost.....	21
4.2.3. Osjetljivost	22
4.2.4. Preciznost	23
4.2.5. Točnost.....	24
4.2.6. Izdržljivost.....	25
4.3. Primjena metode za određivanje analita.....	27
5. Zaključak.....	29

6. Literatura.....	30
7. Sažetak.....	32
8. Summary.....	33

Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card

1.Uvod

1.1 Upalne bolesti crijeva

1.1.1 Definicija

Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) su idiopatske, inflamatorne, kronične, imunološki posredovane i po svom tijeku nepredvidive bolesti gastrointestinalnog sustava. Mogu zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava od usne šupljine do anusa, ali paralelno mogu izazvati patološke promjene (ekstraintestinalne manifestacije) na mnogim drugim organima (koža, oči, zglobovi). U skupini upalnih bolesti crijeva razlikujemo dva entiteta: Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis te danas smatramo da predstavljaju dva kraja spektra ove bolesti s obzirom na to da je ova skupina bolesnika vrlo heterogena te je samo pitanje vremena kada će se na temelju genetičkih ispitivanja moći učiniti detaljnija podjela različitih kliničkih oblika (fenotipova) ove bolesti (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.2 Epidemiologija

Smatra se da je Alfred Veliki, prvi kralj Engleske bolovao od Crohnove bolesti, no ona nije u potpunosti prepoznata sve do 1913. kada je britanski liječnik Kennedy Dalziel prvi put opisao pacijente s transmuralnom upalom tankog i debelog crijeva. Konačno, 1932. su dr. Burrill Crohn i suradnici objavili rad u kojem su stanje obilježeno upalom terminalnog ileuma nazvali terminalni ili regionalni ileitis, koje je s vremenom postalo poznato kao Crohnova bolest. Ulcerozni kolitis je bio poznat i u vrijeme Stare Grčke, kada je Hipokrat opisao bolest karakteriziranu kroničnom dijarejom i krvavom stolicom, no sama bolest je potpuno identificirana tek 1859. godine (Malik, 2015). Incidencija i prevalencija ovih bolesti jasno su povezane sa urbanim načinom života i sa sjevernim geografskim širinama, a relativno su rijetke u Aziji, Africi i Latinskoj Americi. Incidencija upalnih bolesti crijeva tijekom zadnjeg desetljeća je u porastu, a taj podatak ilustrira i istraživanje u Hrvatskoj provedeno s podatkom o incidenciji za ulcerozni kolitis koja iznosi 4,3/100000, a za Crohnovu bolest 7/100000 (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.3 Etiologija

U svjetlu rezultata nedavnih genetičkih istraživanja danas smatramo da su upalne bolesti crijeva rezultat poremećenog imunosnog odgovora na bakterijsku mikrofloru, koji se manifestira u osoba s određenim genetskim mutacijama, ali i kao posljedica različitih faktora okoliša. Pušenje, oralni kontraceptivi, faktori ranog djetinjstva (pasivno pušenje,

rani prekid dojenja, higijena), infekcije, operacija slijepog crijeva i prehrana igraju ključnu ulogu u nastanku ovih bolesti. Tip imunskog odgovora različit je, u Crohnovoj bolesti prevladava stanično posredovani Th-1 tip, a u ulceroznom kolitisu Th-2 tip imunskog odgovora koji uglavnom generira humoralni imunski odgovor. Ipak, oštra podjela na dva tipa imunskog odgovora nije uvijek točna te se mogu uočiti i preklapanja. Zadnjih godina genetičari su značajno napredovali u pronalaženju gena, odnosno više regija genoma koje su vezane uz pojavu IBD. Prva regija humanog genoma koja je povezana s nastankom IBD-a je lokus 16. kromosoma; u tom lokusu identificirana je promjena gena NOD2/CARD15 koja nudi objašnjenje etiologije ove bolesti. Naime, taj je gen uključen u prepoznavanje bakterijskog muramildipeptida i može stimulirati sekreciju antibakterijskih peptida, stoga pogrešnim prepoznavanjem crijevne mikroflore, uslijed mutacije tog gena, dolazi do neadekvatnog imunskog odgovora koji rezultira upalnim promjenama u gastrointestinalnom sustavu. Genetička istraživanja, osim što pomažu u razjašnjavanju bazičnih poremećaja koji su odgovorni za nastanak ovih bolesti, imaju i drugu važnu ulogu. Naime, potvrđeno je da geni interferiraju s metabolizmom lijekova te na taj način utječu na klinički odgovor i potencijalnu toksičnost terapije (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.4 Klinička slika

Ulcerozni kolitis i Crohnova bolest mogu imati vrlo sličnu kliničku sliku. Kako je ulcerozni kolitis bolest primarno vezana uz debelo crijevo, simptomi primarno ovise o proširenosti bolesti i intenzitetu upale sluznice debelog crijeva. Glavni klinički simptom je rektalno krvarenje, odnosno pojava krvavih stolica, obično sa primjesama sluzi i gnoja. Tegobe su vrlo često praćene tenezmima i urgencijom koji mnogo puta ne rezultiraju stolicom pa ih nazivamo "lažnim pozivima". Ovisno o proširenosti upale na proksimalnije dijelove debelog crijeva prisutni su proljev i bol u trbuhu. Ekstraintestinalne manifestacije bolesti koje koreliraju s intenzitetom upale crijeva su periferni artritis, nodozni eritem, gangrenozna pioderma i episkleritis. Crohnova bolest, s obzirom da može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi, mnogo je raznolikije kliničke slike od ulceroznog kolitisa. Najčešći simptomi su proljev, bol u trbuhu i gubitak na težini. Specifična značajka Crohnove bolesti je zahvaćenost cijele širine stijenke crijeva upalnim promjenama (transmuralnost) za razliku od ulceroznog kolitisa kod kojeg je upala ograničena na sluznicu. Upravo iz te činjenice proizlazi niz intestinalnih komplikacija: fibrostenotičke ili upalne strikture, fistule i intraabdominalni apscesi. Upravo transmuralnost upale koja dovodi do suženja crijeva i fistuliranja odgovorna je za karakterističnu grčevitu bol u trbuhu

i pojavu intraabdominalnih upalnih kolekcija. Što se tiče ekstraintestinalnih manifestacija, one su jednake kao i kod ulceroznog kolitisa, ali znatno češće ako je u pitanju Crohnov kolitis, a ne upala tankog crijeva. U slučaju zahvaćenosti tankog crijeva u pacijenata s Crohnovom bolešću česta je malapsorpcija te pridružena metabolička bolest kostiju, oksalatni nefroliti i žučni kamenci (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.5 Liječenje upalnih bolesti crijeva

1.1.5.1 Farmakoterapija

Mesalazin (5-aminosalicilna kiselina, 5-ASA) je djelatni dio molekule sulfasalazina, koji se već godinama koristi u liječenju upalnih bolesti crijeva. Na temelju kliničkih iskustava ustanovljeno je da se terapijska vrijednost mesalazina nakon peroralne i nakon rektalne primjene temelji na njegovom lokalnom djelovanju na upaljeno crijevno tkivo. Farmakološki učinci mesalazina *in vitro* i *in vivo* temelje se na inhibiciji kemotaksije leukocita, smanjenom stvaranju citokina i leukotrijena te vezanju slobodnih radikala, što smatramo temeljem njegovog protuupalnog djelovanja. Nedavni dokazi upućuju da je učinak mesalazina posredovan preko PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*); vezanjem mesalazina na navedeni receptor dolazi do konformacijske promjene i migracije receptora u jezgru gdje modulira genetsku transkripciju (Bergman i Parks, 2006). Oralno primijenjeni nezaštićeni mesalazin reapsorbirat će se već u tankom crijevu i neće doseći distalne bolesne segmente, stoga je ključno omogućiti mesalazinu da stigne do željenog segmenta crijeva. Postoji više načina da se to postigne; prvi je upotreba azo-konjugata (sulfasalazin, olsalazin i balsalazid) koji intaktni dolaze u kolon gdje se djelovanjem bakterijskih enzima oslobađa aktivna tvar. Drugi je način upotreba ovojnica koje se otapaju kod određenog pH ili se, pak, kontinuirano otapaju prolazeći gastrointestinalnim traktom. Također je lijek moguće primijeniti i lokalno u obliku supozitorija i klizmi (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

Kortikosteroidi su snažni protuupalni lijekovi koji djeluju inhibicijom nizom inflamatornih puteva. Klasični oblici lijekova obuhvaćaju sistemske oblike (oralni - prednizon, prednizolon, metil-prednizolon i intravenski oblici – hidrokortizon i metil-prednizolon) i topičke lijekove (supozitoriji, pjene i klizme) (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006). Kortikosteroidi se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji s odgovarajućom formulacijom mesalazina za indukciju i održavanje remisije. Pacijente možemo podijeliti u tri skupine s obzirom na odgovor na kortikosteroidnu terapiju. Prva skupina (40%) su pacijenti koji pokazuju odgovor na kortikosteroide kroz dva tjedna te ostaju u remisiji dok

se doza postepeno smanjuje i ukida. Drugu skupinu (30-40%) čine pacijenti koji također pokazuju odgovor na terapiju, no smanjenjem doze dolazi do relapsa simptoma. Konačno treću skupinu (15-20%) čine oni pacijenti kod kojih ne dolazi do poboljšanja unatoč višoj dozi kroz duže vrijeme (Pithadia i Jain, 2011).

Imunosupresivi – azatioprin i merkaptopurin se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva od sredine 70-ih godine 20. stoljeća. Dokazan je benefit terapije kod 50-70% pacijenata sa Crohnovom bolesti, dok je manje dostupnih informacija o njihovoj učinkovitosti kod ulceroznog kolitisa. Ovi tiopurinski derivati utječu na biosintezu purina i inhibiraju staničnu proliferaciju. Azatioprin je prolijek koji se konvertira u 6-merkaptopurin te dalje u eritrocitima metabolizira u 6-tiogvanin. Zbog dugog poluvremena 6-tiogvanina u eritrocitima potrebno je više tjedana, a ponekad i mjeseci da se postigne metabolička ravnoteža, što je vjerojatno uzrok njihovog odgođenog djelovanja. Uvode se u terapiju kod bolesnika ovisnih o steroidima, bolesnika rezistentnih na steroide i bolesnika s ekstenzivnom bolešću tankog crijeva (Pithadia i Jain, 2011; Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

Zadnjih desetak godina prepoznavanje detalja slijeda inflamatorne kaskade i razjašnjavanje genetske podloge imunskih promjena dovelo je do otkrića mnoštva lijekova koji su usmjereni na aktivnost pojedinih citokina, odnosno drugih molekula koje sudjeluju u inflamatornom procesu u crijevu. To su u prvom redu antagonisti TNF- α (infliksimab, CDP-71, CDP-870 – certolizumab odnosno pegilirani anti-TNF, adalimumab, etanercept, onercept), a zatim i mnoštvo drugih lijekova poput inhibitora selektivnih adhezijskih molekula: natalizumab – antitijelo na alfa-4 integrin), fontolizumab – protutijelo na alfa-interferon gama, antitijelo na IL-6 receptor i mnogi drugi. Svakako najvažniji među njima je infliksimab, kimerno monoklonsko anti-TNF protutijelo čiji je snažan protuupalni potencijal baziran na apoptozi upalnih stanica. Nadalje infliksimab sam ili u kombinaciji s azatioprinom pokazao je veću učinkovitost od samog azatioprina kod pacijenata sa umjerenom do jakom Crohnovom bolešću koji nisu pokazali odgovor na terapiju mesalazinom i/ili kortikosteroidima (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006; Lichtenstein i sur., 2009).

1.1.5.2 Kurkuma

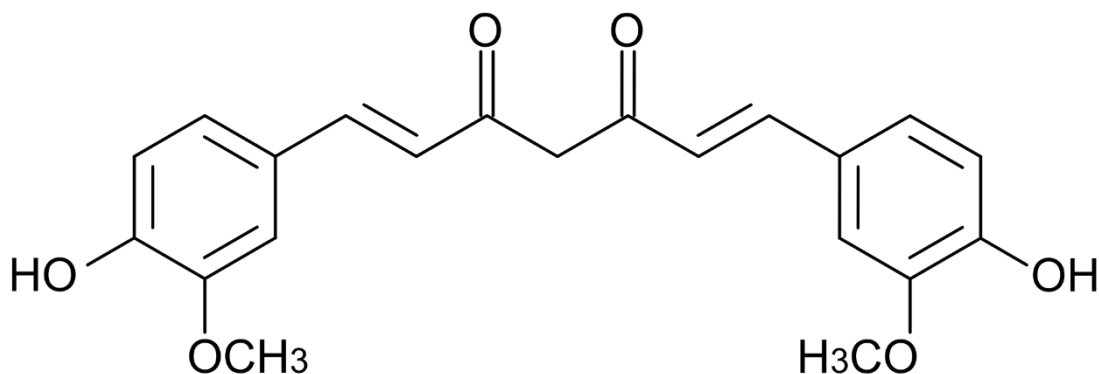
Kurkuma (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb. i *Curcuma longa* L., Zingiberaceae) (Slika 1), je 50-100 cm visoka biljka s iznutra žutim, kvrgavim podankom. Listovi imaju dugu peteljku, a lisna plojka može biti do 45 cm duga i do 18 cm široka. Zaštitni listovi cvata su bijelkastozeleni, dok su gornji prevučeni bijelo i ružičasto. Javanski žuti korijen čine osušeni podanci vrste *Curcuma xanthorrhiza*: biljka samoniklo raste u tropskoj jugoistočnoj Aziji, a uzgaja se u tropskim i suptropskim područjima. Miris podanka je aromatičan, a okus nagorak. U zemljama podrijetla nazivaju ga „temu lawak“ i „temoe lawak“. Javanski žuti korijen sadrži 3-12% eteričnog ulja s monocikličkim seskviterpenima ar-kurkumenom iksantorizolom kao glavnim sastavnicama, dok od ostalih spojeva sadrži 30-40% škroba te minerala (Kuštrak, 2005).



Slika 1. Kurkumin podanak (<https://www.123rf.com/>)

Kao nositelj terapijskog učinka prepoznat je polifenolni spoj kurkumin (Slika 2). Koristi se već stoljećima u tradicionalnoj medicini u liječenju različitih upalnih bolesti kao što su artritis, kolitis i hepatitis. Camacho-Barquero i sur. (2016) su u svjetlu recentnih istraživanja o protuupalnim svojstvima kurkumina ispitali njegov farmakološki učinak na životinjskim modelima. Upalni odgovor je procijenjen histološki i praćenjem aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO). Nadalje, praćena je produkcija Th-1 i Th-2 citokina i nitrata u mukozi kolona, kao i ekspresija inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) te ciklooksigenaza 1 i 2 (COX-1, COX-2). Nakon oralne administracije kurkumina (50 mg/kg/dne) kroz dva tjedna uočena je smanjena mijeloperoksidazna aktivnost i smanjene razine TNF- α . Također, kurkumin je smanjio produkciju nitrata i ekspresiju COX-2 i iNOS; smanjena je i aktivnost p-38 MAP-kinaze koja je uključena u transkripciju različitih protuupalnih gena. Također, učinak kurkume dokazan je

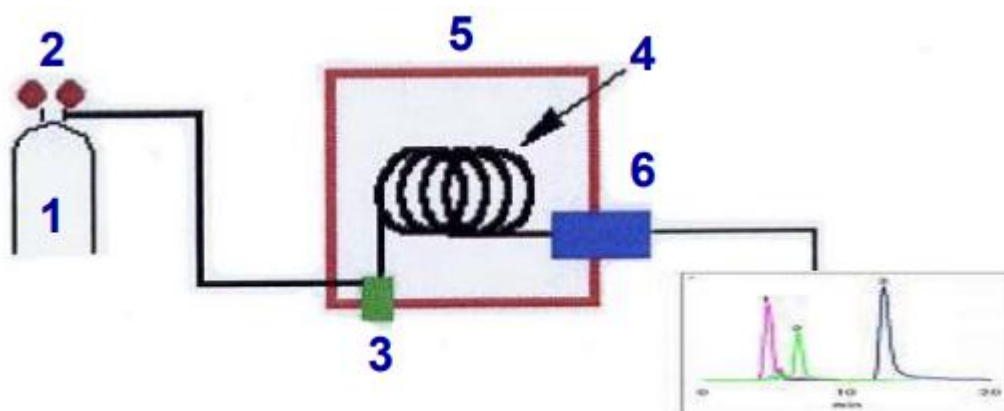
i brojnim kliničkim studijama gdje su autori zaključili da je kurkumin sa standardnom terapijom učinkovitiji od placeba sa standardnom terapijom (Jurenka, 2009).



Slika 2. Kurkumin (<https://en.wikipedia.org/>)

1.2 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je separacijska tehnika u kojoj plinovita mobilna faza eluira sastavnice uzorka prolazeći kolonom sa stacionarnom fazom. Uzorak tijekom unošenja u kolonu trenutno ispari, a odjeljivanje sastojaka u skladu je sa vremenom provedenim u stacionarnoj fazi. Mehanizmi odjeljivanja temelje se na adsorpciji i razdiobi. Plin nositelj je kemijski inertan, a kao mobilna faza upotrebljavaju se helij, dušik i vodik. Plinski kromatograf uključuje dovod (1) i uređaj za regulaciju tlaka i protoka plina nositelja (2), grijani sustav za uštrcavanje uzorka (injektor) (3), kromatografsku kolonu (4), pećnicu za termostatiranje kolone (5) te detektor (6). Slika 3 prikazuje shemu plinskog kromatografa (Nigović, 2014).



Slika 3. Shema plinskog kromatografa (Nigović, 2017.)

U analitici i kontroli lijekova plinska kromatografija se upotrebljava za ispitivanje hlapljivih onečišćenja i zaostalih organskih otapala u lijekovitim tvarima, za određivanje sadržaja hlapljivih lijekovitih i pomoćnih tvari, te rjeđe za potvrdu identiteta. U identifikaciji plinska kromatografija se najčešće primjenjuje u karakterizaciji hlapljivih ulja koja se koriste kao pomoćne tvari, kao i masnih kiselina i sterola u uljima. Ispitivanje čistoće plinskom kromatografijom temelji se na utvrđivanju prisutnosti točno određenog hlapljivog onečišćenja ili je namijenjeno kontroli srodnih onečišćenja. Sve lijekovite i pomoćne tvari podliježu kontroli ostatnih otapala, a dozvoljena koncentracija otapala ovisi o toksičnosti otapala, dozama i načinu primjene lijeka. Kvantitativna analiza se često temelji na metodi s unutarnjim standardom. Unutarnji standard je čista tvar koja se u poznatoj količini dodaje ispitivanoj otopini i otopini poredbene tvari, a koncentracija ispitivanog analita se određuje usporedbom omjera površine pika ispitivane tvari i unutrašnjeg standarda s omjerom površine pika poredbene tvari i unutrašnjeg standarda (Nigović, 2014).

Sustav za unošenje uzoraka (injektor)

Kroz gumeni septum unosi se relativno mala količina uzorka (0,5-2 μ L), što ujedno i smanjuje širenje zona. Sustav za uštrcavanje je zagrijan na 150-250°C ovisno o hlapljivosti uzorka. Prilikom uštrcavanja uzorak trenutno ispari (Watson, 2012).

Posebna vrsta injektiranja obuhvaća *split/splitless* injektiranje: kod kapilarnih kolona uzorak se ne unosi direktno u kolonu već se podijeli na dva nejednaka dijela i pritom se veći dio odventilira. Time sprječavamo širenje i asimetriju pikova zbog ekspanzije otapala u kojem je uzorak otopljen (Nigović, 2017). Takvu vrstu injektiranja nazivamo *split* injektiranje te obuhvaća omjere od 10:1 do 100:1, za razliku od *splitless* injektiranja gdje izlazni ventil ostaje zatvoren te se sav uzorak unosi u kolonu (Watson, 2012).

Kromatografske kolone

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

Punjene kolone su staklene, metalne ili teflonske cijevi dužine 1-3 m te promjera 2-5 mm, punjene čvrstim nosačem velike specifične površine (kalcijev silikat) impregniranim tankim slojem tekuće stacionarne faze. Čvrsti nosač se silanizira čime se smanjuje adsorpcija polarnih sastojaka. Takve kolone su manjeg razlučivanja i podnose temperature do 280 °C jer na višim temperaturama dolazi do isparavanja tekuće stacionarne faze.

Kapilarne kolone od izvučenog kvarca duljine su 12-50 m i promjera 0.2-0.5 mm. Unutrašnja stjenka prevučena je tankim slojem (0,1-5 µm) stacionarne faze koja se kemijski veže na silanolne grupe stjenke kolone. Veće je djelotvornosti od punjenih kolona i podnosi više temperature. Kapilarne kolone mogu biti: nepolarne, ugljikovodične od različitih alkil siloksana i polarne, poliesterske (Nigović, 2017).

Pećnica

U plinskoj kromatografiji temperatura je važan čimbenik koji utječe na uspješnost odjeljivanja sastavnica uzorka; iz tog razloga kolona je smještena u termostatiranom prostoru. Optimalna temperatura ovisi o vrelištima sastojaka ispitivanog uzorka (Nigović, 2014).

U kromatografskom postupku može se primijeniti izotermalno termostatiranje kolone gdje se temperatura drži konstantnom ili programirano povišenje temperature gdje se temperatura kontinuirano ili skokovito povisuje tijekom elucije. Ovakav tip analize omogućuje ispitivanje uzoraka šireg raspona vrelišta i injektiranje uzorka na nižoj temperaturi (Watson, 2012).

Detektori

Plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID) – dolazi do sagorijevanja organskih spojeva u plamenu i pritom nastaju ionski međuprodukti i elektroni koje elektroda u detektoru bilježi kao pojačanje struje. Detektira spojeve koji sadrže ugljik i vodik, a na spojeve koji sadrže ugljik vezan na klor, kisik i dušik ne daje odgovor. U kombinaciji s kapilarnom plinskom kromatografijom može detektirati količinu tvari od 100 pg - 10 ng.

Detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD) – u ovom slučaju radioaktivni izvor ionizira plin nositelj, a u prisutnosti organskih molekula struja se smanjuje.

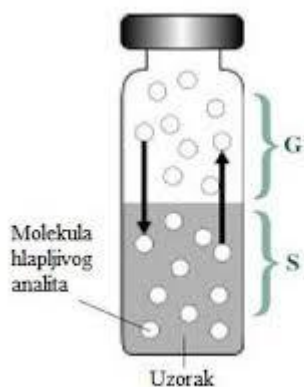
Visoko halogenirani spojevi mogu biti detektirani u količinama od 50 fg do 1 pg, a primjenjuje se u analizi lijekova u tjelesnim tekućinama i analizi ekoloških onečišćenja.

Detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD) – dolazi do promjene toplinske vodljivosti struje plina nositelja zbog prisutnosti analita. U usporedbi sa FID-om je relativno neosjetljiv na organske spojeve, no često se koristi u analizi vodene pare i nedestruktivan je tako da se analiti mogu skupljati nakon detekcije (Watson, 2012).

Maseni detektor (engl. *Mass Spectrometer*, MS) – konjugirani sustavi masene spektrometrije s kromatografskim metodama omogućuju određivanje molekulske mase ionizirane molekule ili bilo kojeg fragmenta molekule nastalog njezinom cijepanjem. Molekule se ioniziraju u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska uzorka u visoki vakum. Ioni se stvaraju u plinovitoj fazi različitim metodama, a potom se primjenom električnog ili magnetnog polja razdvajaju prema masi (Nigović, 2017).

1.2.1 Uzorkovanje para iznad tekućina ili krutina

Uzorkovanje para iznad tekućih ili krutih uzoraka (engl. *Headspace Sampling*, HSS) (Slika 3) je metoda pripreme uzorka za određivanje ostatnih otapala i hlapljivih onečišćenja u krutim ili tekućim uzorcima. Kod plinske kromatografije sa statičkim *headspace* injektiranjem uzorak se drži dovoljno dugo na određenoj temperaturi dok se ne uspostavi ravnoteža između plinovite i krute/tekuće faze, nakon čega slijedi analiza plinovite faze koja sadrži analit koji se pomoću plina nositelja uvodi u kolonu plinskog kromatografa (Nigović, 2017). Kod upotrebe kapilarnih kolona kako bi se olakšalo nanošenje uzorka primjenjuje se *split* injektiranje, primjerice omjer 10:1 osigurava da se uzorak volumena 1 mL injektira unutar 5 sekundi s protokom plina od 1 mL/min (Watson, 2012).



Slika 3. Shematski prikaz *headspace* injektiranja (www.slideshare.net)

Plinska kromatografija s dinamičkim *headspace* injektiranjem koristi “purge trap” metodu. Plin propuhuje uzorak otopljen u odgovarajućem otapalu koje je nehlapljivo i ne interferira s mjerenjem, dok prilikom propuhivanja hlapljivi analiti sa strujom plina dolaze do polimernog asorbensa. Grijanjem se ukoncentrirani analiti desorbiraju te strujom plina prenose u GC (Nigović, 2017) . Ovaj tip uzorkovanja se koristi u analizi ekoloških uzoraka, posebice vode za detekciju onečišćenja u vrlo niskim količinama (Watson, 2012).

1.2.2 Prednosti i ograničenja plinske kromatografije

Plinska kromatografija je točna i precizna metoda analize, posebice uz upotrebu unutarnjeg standarda. U usporedbi s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performace Liquid Chromatography*, HPLC) nudi veću moć odjeljivanja i uže pikove, pogotovo uz upotrebu kapilarnih kolona. Zbog mogućnosti sprezanja s različitim detektorima može se koristiti i kod spojeva koji nemaju kromofore te je mobilna faza jeftinija u usporedbi s organskim otapalima kod HPLC-a, i ne postoje posebni zahtjevi za odlaganjem. Uz upotrebu autosamplera, plinska kromatografija je rutinska i automatizirana metoda.

Ipak, prisutna su i neka ograničenja metode. Mogu se analizirati samo termostabilne i lakohlapljive tvari, te neki analiti koji zahtijevaju derivatizaciju da bi postali hlapljivi što unosi dodatni korak u analizu i ostavlja prostora za moguće interferencije. Moraju se injektirati vrlo mali volumeni uzorka što otežava njegovu kvantitativnu analizu, te se vodene otopine i soli ne mogu injektirati (Nigović, 2017).

2. Obrazloženje teme

Dodaci prehrani su koncentrirani izvor hranjivih ili drugih tvari s prehrambenim ili fiziološkim funkcijama, sami ili u kombinacijama. Svrha im je potpomaganje unosa hranjivih tvari i nadopuna prehrane tvarima koje se uobičajenim unosom hrane u organizam ne dobivaju u dovoljnoj količini, a sve radi povoljnog učinka na zdravlje potrošača. Na taj način povećava se opća otpornost organizma na stresne vanjske utjecaje, te pomaže u održavanju pravilnih fizioloških funkcija organizma i njihovih dijelova (Pollak, 2017).

Dodaci prehrani regulirani su zakonodavstvom o hrani te se kontrola njihove kvalitete prvenstveno odnosi na analizu zdravstvene, odnosno sanitarne ispravnosti, ali ne i na dokazivanje djelotvornosti, kao što je to slučaj kod lijekova. Rastući trend uporabe dodataka prehrani od 90-ih godina 20. stoljeća doveo je do povećanog interesa pacijenata kao i zdravstvenih radnika po pitanju njihove učinkovitosti i sigurnosti. Usred njihove široke dostupnosti javnosti, bilo u ljekarnama i trgovinama ili putem interneta, postaju dio svakodnevne terapije što je posebno opasno u rizičnim skupinama pacijenata; kod starijih ljudi, trudnica i dojilja. Pošto nisu podvrgnuti istim znanstvenim ispitivanjima i nisu tako striktno regulirani i kontrolirani predstavljaju očiti rizik usred njihove sve veće dostupnosti i uporabe. Petroczi i sur. (2011) su u pregledu literature prijavili ne samo patvorenje farmakološki aktivnim supstancijama s ciljem pojačavanja učinka, već i prisutnost mikrobioloških, metalnih i pesticidnih onečišćenja s pojavnošću od približno 25%. Također, tekući biljni ekstrakti mogu sadržavati nedozvoljene količine etanola koji se često koristi kao otapalo za ekstrakciju. Prilikom analize 93 različite formulacije dodataka prehrani Mornar i sur. (2016) prijavili su značajna odstupanja u čak trećini ispitanih uzoraka, dok su neki od uzoraka označeni kao bezalkoholni sadržavali određene količine etanola. Kao metabolički aktivna tvar, etanol predstavlja opasnost za djecu, trudnice i dojilje kao i za pacijente s oštećenjem jetre. Iako postoje određene direktive, propisane bilo farmakopejskim propisima ili smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH), koje jasno definiraju maksimalne dozvoljene količine onečišćenja u farmaceutskim proizvodima, regulatorna tijela različitih država nisu u potpunosti usklađena po pitanju sigurnosti i učinkovitosti dodataka prehrani (Mornar, 2016).

Stoga s analitičkog stajališta određivanje lako hlapljivih organskih otapala u dodacima prehrani predstavlja izazov. Zbog hlapljivosti organskih otapala i svojih separacijskih sposobnosti

plinska kromatografija (GC), uz uporabu kapilarnih kolona, tehnika izbora za analizu takvih spojeva. No ove sastavnice je potrebno prije analize ekstrahirati iz uzorka. HSS tehnika omogućava ekstrakciju lako hlapljivih analita iz složenih uzoraka bez predhodne obrade.

Stoga je cilj ovog rada razviti i validirati metodu za određivanje etanola i lakohlapljivih onečišćenja u dodacima prehrani korištenih kod upalnih bolesti crijeva.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1 Kemikalije

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

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

Aceton (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)

Izoamilni alkohol čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

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

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

t-butanol (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska).

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

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

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

Cikloheksanol (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)

Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas city, MI, SAD)

3.1.2 Pribor

Automatske pipete, (0,5 µl-10 mL), (Ranin instrument LLC, Oakland, California, SAD)

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

Kolona za plinsku kromatografiju, DB-264, dimenzija 30 m x 0,53 mm, debljina filma 3 µm, (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)

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

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

3.1.3 Radni instrumenti

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

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

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

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

Sustav za pročišćavanje vode WaterPro, (Labconco, Kansas city, MI, SAD)

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

3.1.4 Programski paketi

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

Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

3.2 Metode

3.2.1 Priprema standardnih otopina

Matične otopine acetona, izopropanola, *t*-butanola, *n*-propanola, izobutanola, *n*-butanola koncentracije 1% (V/V) su pripremljene miješanjem 1 mL analita s 99 mL ultračiste vode. Nadalje, matična otopina acetonitrila, koji je korišten kao unutarnji standard (engl. *Internal Standard*, IS) koncentracije 0,1% (V/V) pripremljena je pipetiranjem 50 µL apsolutnog acetonitrila i 4950 µL ultra čiste vode , a kao matična otopina etanola korištena je apsolutna otopina. Konačno miješanjem 600 µL metanola s 99,4 mL ultračiste vode pripremljena je matična otopina metanola u koncentraciji od 0,6% (V/V).

Radne otopine su neposredno prije analize pripremljene pipetiranjem matičnih otopina u bočice za uzorkovanje *headspace* tehnikom, uz dodatak unutarnjeg standarda, te nadopunjene ultračistom vodom u prikladnim omjerima.

3.2.2 Priprema uzorka

Neposredno prije analize uzorak je u bočicama za uzorkovanje *headspace* tehnikom razrijeđen u prikladnim omjerima do radnog područja, uz dodatak standardne otopine unutarnjeg standarda. Bočice se potom zatvore aluminijskim čepom pomoću zatvarača bočica.

3.2.3 HSS-GC-FID analiza

Nakon što se uzorci pripreme po prethodno navedenom postupku prenesu se u instrument za HSS analizu. Uzorak se zagrijava tijekom 15 minuta na 90 °C bez trešnje. Potom se unosi u plinski kromatograf tijekom 1 minute na temperaturi od 115 °C. Plinska kromatografija provedena je na instrumentu Agilent 6850 te je za razdvajanje analita korištena kolona DB-624, dimenzija 30 m x 0,53 mm uz debljinu filma od 5 µm. Kao plin nosač za kromatografiju koristio se dušik brzine protoka 5 mL/min. Temperatura injektora iznosila 230 °C, a za detekciju analita korišten je plameno-ionizacijski detektor pri temperaturi od 300 °C. S ciljem postizanja što boljeg razlučivanja, razdvajanje analita provodi se upotrebom temperaturnog programa opisanog u Tablici 1. Dobiveni kromatogrami obrađivani su računalnim programom ChemStation, a rezultati obrađeni te validacijski parametri određeni primjenom računalnog programa Excel.

Tablica 1. Temperaturni program

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

4. Rezultati i rasprava

4.1 Razvoj i optimizacija HSS-GC-FID metode

Optimizaciju metode je moguće podijeliti u dva dijela: *headspace* ekstrakcija i optimizacija same plinske kromatografije.

Postoji mnogo parametara prilikom *headspace* uzorkovanja koji mogu utjecati na ponovljivost i osjetljivost analize. Ispitani parametri uključuju: volumen, vrijeme i temperaturu te trešnju prilikom same ekstrakcije. Metoda je razvijena koristeći 0,1% (V/V) otopine standarda u ultračistoj vodi. Voda je izabrana kao otapalo jer su svi analiti u njoj dobro topljivi, ne sadrži značajne razine onečišćenja koje bi interferirale sa mjerenjima i ne daje odgovor na plameno-ionizacijskim detektoru.

Prilikom odabira unutarnjeg standarda nekoliko kemikalija je testirano (cikloheksanol, izoamilni alkohol i acetonitril). Prilikom analize čistog etanola došlo je do pojave nepoznatog pika u vremenu elucije cikloheksanola. On je odbačen kao unutarnji standard upravo zbog koelucije nepoznatih spojeva i njihove moguće interakcije s analizom. Nadalje ispitan je izoamilni alkohol kao unutarnji standard no nije davao zadovoljavajuću ponovljivost analiza. Zbog izrazite oscilacije u veličini pikova zaključeno je da se izoamilni alkohol ne otapa što narušava ponovljivost analize te je on odbačen kao unutarnji standard. Konačno acetonitril je zbog oštih i simetričnih pikova te dobre separacije od ostalih analita odabran kao unutarnji standard. Također on se ne nalazi u ispitivanim dodacima prehrani što dodatno opravdava njegovu upotrebu.

Sljedeći aspekt koji treba uzeti u obzir je količina uzorka. Povećanje volumena uzorka i posljedično smanjenja *headspace* volumena povećava ekstrahiranu količinu analita te dovodi do povećanja osjetljivosti. Iz tog razloga ispitani su učinci različitog volumena uzorka u bočicama za uzorkovanje od 20 mL (0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL i 2 mL). Rezultati su dokazali povećanje osjetljivosti do volumena od 2 mL koji je prihvaćen kao optimalan volumen uzorka za analizu.

Nadalje, ispitan je učinak vremena i temperature ekstrakcije. Ispitano je vrijeme između 5 i 40 minuta. Dobiveni rezultati su razmatrani kao ovisnost omjera površine pika analita i unutarnjeg standarda o vremenu *headspace* ekstrakcije, te je uočeno da *headspace* koncentracije svih analita dosežu plato nakon 15 minuta koje je prepoznato kao optimalno vrijeme potrebno za postizanje ravnoteže. Temperature ekstrakcije značajno utječu na

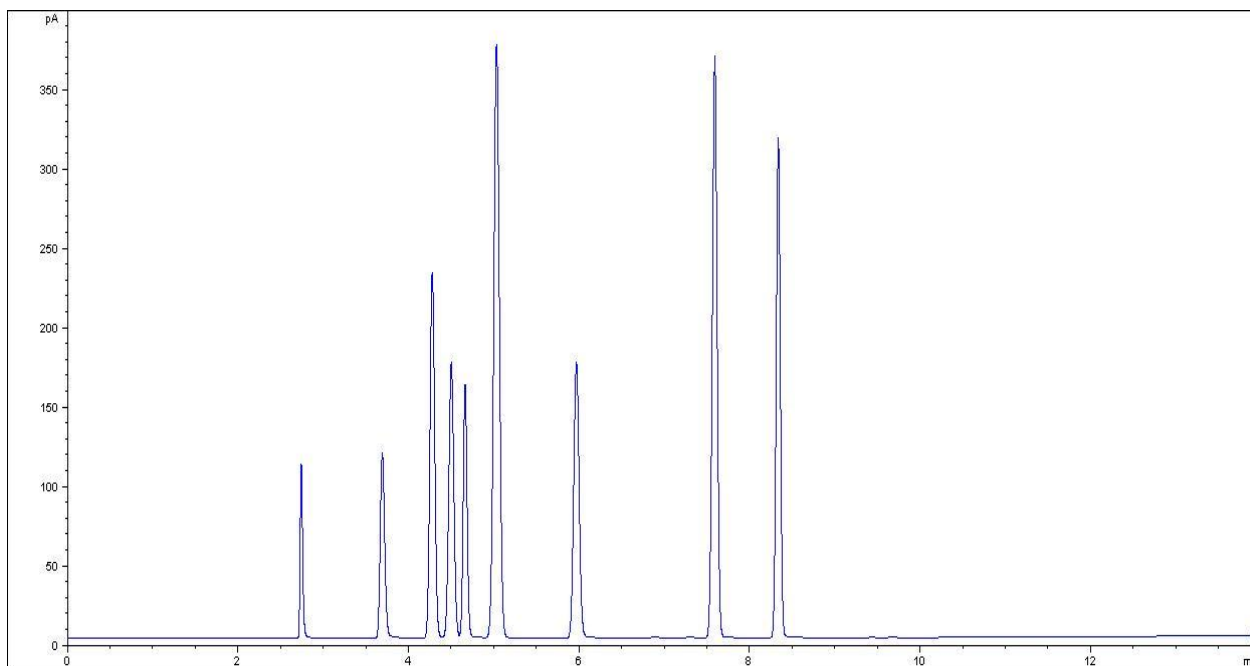
ekstrakciju analita u *headspaceu*. Očekuje se da će povećanje temperature dovesti do povećane ekstrakcijske učinkovitosti i veće količine analita u *headspaceu*, stoga je optimalna ekstrakcijska temperatura ispitana u temperaturnom rasponu od 70 do 90 °C. Najveći odgovor za sve analite postignut je na temperaturi od 90 °C koje je prihvaćena kao optimalna temperatura *headspace* ekstrakcije.

Također, ispitan je učinak trešnje prilikom ekstrakcije koji nije doveo do značajne promjene u veličini pikova.

Prilikom optimizacije uvjeta plinske kromatografije temperatura pećnice igra ključnu ulogu. Zbog nemogućnosti promjene sastava mobilne faze kako bi postigli što bolje odjeljivanje analita korišteno je programirano povišenje temperature. Vrijeme elucije analita značajno ovisi o temperaturi: pri višim temperaturama veći je i tlak para te je manja interakcija analita sa stacionarnom fazom i on eluira ranije. Na redoslijed elucije velik utjecaj ima i temperatura vrelišta analita: spojevi niže temperature vrelišta imaju veći tlak pare stoga eluiraju ranije. Korišten je temperaturni gradijent kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.

Prilikom razvoja metode uočeno je da pri višim koncentracijama etanola dolazi do smanjenja pikova ostalih analita što bi značajno interferiralo s kvantifikacijom. Naime, ovaj problem se javlja zato što je etanol zauzeo cijeli *headspace* prostor i nije dopustio ostalim analitima da se prikladno ekstrahiraju. Također javljalo se i tlačno preopterećenje bočice za uzorkovanje zbog rada na temperaturama iznad vrelišta etanola kao glavnog otapala u uzorku. Stoga da se izbjegnu navedene interferencije i potencijalno pucanje bočica zbog tlačnog opterećenja, odlučeno je analizu provesti na nižim koncentracijama, ali opet na dovoljno visokoj temperaturi da se postignu zadovoljavajuće površine pikova ostalih analita. Kao optimalne koncentracije uzorka prepoznate su 30% etanola za određivanje onečišćenja i oko 5% etanola za njegovo određivanje: razrjeđenje uzorka na 30% etanola je korišteno za analizu onečišćenja zbog nedovoljne osjetljivosti metode da kvantificira toliko niske koncentracije onečišćenja kakve se javljaju u uzorku razrijeđenom na 5% etanola. No pri višim koncentracijama uzorka dolazi do tlačnog preopterećenja bočica za uzorkovanje i zasićenja *headspacea* te gubitka linearnosti, stoga je njegova analiza provedena na 5% .

Razvijenom metodom dobiven je kromatogram smjese standardnih otopina analita (0,1% (V/V)) prikazan na Slici 4, s vremenima zadržavanja navedenim u Tablici 2.



Slika 4. Kromatogram smjese standarda (0,1% (V/V))

Tablica 2. Vremena zadržavanja ispitivanih analita

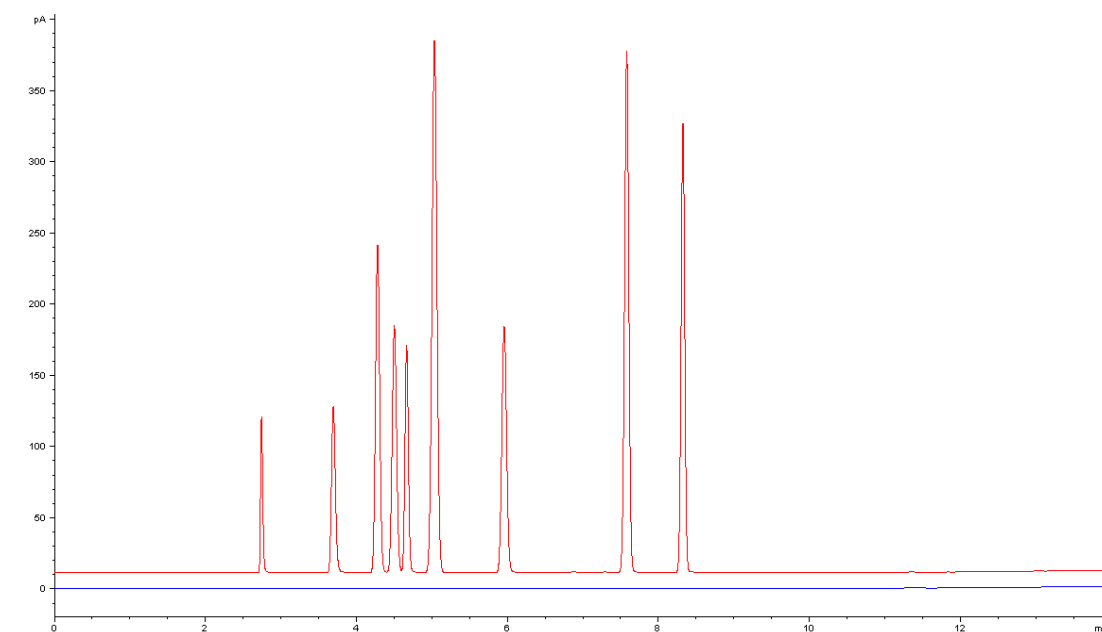
Spoj	Vrijeme zadržavanja (min)
metanol	2,77
etanol	3,73
aceton	4,31
izopropanol	4,53
acetonitril	4,69
<i>t</i> -butanol	5,06
<i>n</i> -propanol	6,01
izobutanol	7,62
<i>n</i> -butanol	8,36

4.2 Validacija metode

Validacija metode je postupak kojim se određuje i dokumentira da je analitička metoda prikladna za određenu primjenu te zahtijeva dovoljno laboratorijskih podataka kojima se dokumentira valjanost metode. Validacija ove metode provedena je prema ICH smjernicama. Ispitani su sljedeći validacijski parametri: selektivnost, linearnost, granica dokazivanja i određivanja, preciznost, točnost i izdržljivost.

4.2.1 Selektivnost

Selektivnost, kao svojstvo metode da može točno odrediti željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti uzorka, ispitana je usporedbom kromatograma dobivenih analizom 0,1% (V/V) otopine standarda i kromatograma dobivenog analizom ultračiste vode kao otapala. Ultračista voda i standardne otopine pripremljene su kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. te su kromatogrami prikazani na Slici 5.

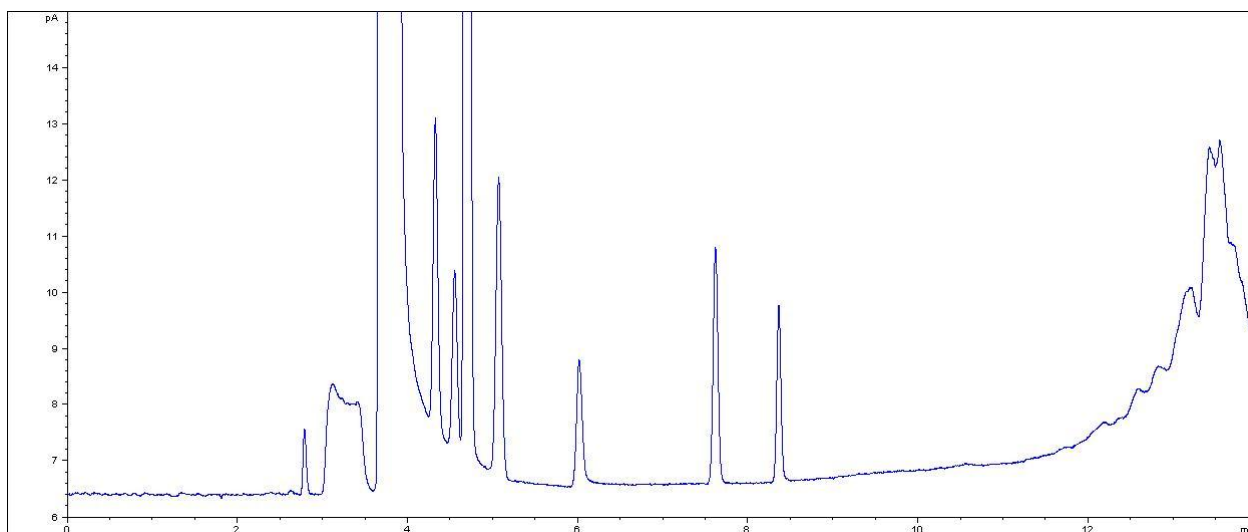


Slika 5. Preklopljeni kromatogrami ultračiste vode (plavo) i 0,1% otopine standarda (crveno)

Iz kromatograma moguće je utvrditi kako nema sastavnica otapala koje koeluiraju s analitima ili s unutarnjim standardom, što upućuje na zadovoljavajuću selektivnost metode.

4.2.2. Linearnost

Linearnost tj. sposobnost analitičke metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita, je sljedeći validacijski parametar koji je ispitan. Ispitivanje linearnosti za etanol je provedeno na pet koncentracijskih razina: 0,1, 1,25, 2,5, 3,75 i 5% (V/V). Otopine su pripremljene kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. Grafički prikaz ovisnosti omjera analitičkih signala unutarnjeg standarda i analita o koncentraciji analita predstavlja kalibracijsku krivulju u obliku linearnog regresijskog pravca. Linearnost za ostale analite ispitana je na sljedećim koncentracijskim razinama: 3, 15, 30, 300, 600, 3600 ppm (V/V) za metanol i 5, 25, 50, 500, 1000, 6000 ppm (V/V) za aceton, izopropanol, acetonitril, *t*-butanol, *n*-propanol, izobutanol i *n*-butanol, gdje je kao gornja točka odabrana vrijednost 120% granice defenirane ICH smjernicama za ostatna otapala. Slika 7. prikazuje dobru separaciju te oštre i simetrične pikove onečišćenja što omogućuje njihovu simultanu kvantifikaciju bez interferencija etanola.



Slika 7. 0,5 % (V/V) onečišćenja u etanolu (30 % (V/V))

Tablica 2. parametri linearnosti

Analit	Linearno područje (ppm)	Jednadžba pravca	Koeficijent korelacije, <i>k</i>
etanol	1000-50000	$y = 8,0136x + 0,3595$	0,99980
metanol	3-3600	$y = 0,00042x - 0,00050$	0,99999
aceton	5-6000	$y = 0,00193x - 0,00139$	1,00000
izopropanol	5-6000	$y = 0,00106x - 0,00657$	1,00000
<i>t</i> -butanol	5-6000	$y = 0,00230x - 0,00500$	0,99996
<i>n</i> -propanol	5-6000	$y = 0,00092x - 0,00358$	0,99999
izobutanol	5-6000	$y = 0,00135x + 0,01049$	0,99997
<i>n</i> -butanol	5-6000	$y = 0,00087x + 0,00090$	0,99997

Koeficijent korelacije veći je od 0,999 za sve analite, na temelju čega zaključujemo da je postignuta zadovoljavajuća linearnost.

4.2.3. Osjetljivost

Granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD) analitičkog postupka je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće nedvojbeno dokazati ali ne nužno i odrediti pri zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) najniža je koncentracija analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. U svrhu validacije ove metode korišten je pristup omjera signal/šum: otopine standarda onečišćenja razrijeđene su do vrijednosti omjera signal/šum 10 za LOQ i 3 za LOD. Taj pristup korišten je za sve analite osim za etanol, koji je određen analizom uzorka iz odsječka kalibracijskog pravca. Vrijednosti granice dokazivanja i određivanja za ispitivane analite su prikazane u Tablici 3.

Tablica 3. Granice dokazivanja i određivanja

Analit	LOD	LOQ
etanol	0,025%	0,075%
metanol	0,50 ppm	1,5 ppm
aceton	0,50 ppm	1,5 ppm
izopropanol	0,50 ppm	1,5 ppm
<i>t</i> -butanol	0,33 ppm	1,0 ppm
<i>n</i> -propanol	0,50 ppm	1,5 ppm
izobutanol	0,33 ppm	1,0 ppm
<i>n</i> -butanol	0,33 ppm	1,0 ppm

4.2.4. Preciznost

Preciznost pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. U validaciji ove metode preciznost je iskazana kao ponovljivost (engl. *Intra day repeatability*) odnosno podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka, istom metodom pod istim uvjetima. Nadalje, preciznost je iskazana i kao srednja preciznost (engl. *Intermediate precision*), odnosno podudaranje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka, istom metodom pod različitim uvjetima u istom laboratoriju, odnosno kroz duže vremensko razdoblje. Svrha ovog ispitivanja je provjera da li će metoda nakon razvoja davati iste rezultate tijekom upotrebe u laboratoriju. Preciznost za etanol je ispitana na uzorku kurkume razrijeđenome na 30 %, dok je za onečišćenja ispitana na otopinama standarda, tj. 30 ppm metanola i 50 ppm ostalih onečišćenja, te je izražena kao RSD omjera analitičkog signala analita i unutarnjeg standarda. Ponovljivost je ispitana kroz 6 mjerenja u istom danu, dok je srednja preciznost ispitana kroz dodatna 3 mjerenja sljedećeg dana (Tablica 4.)

Tablica 4. parametri preciznosti

Analit	Ponovljivost (n = 6) RSD (%)	Srednja preciznost (n = 9) RSD (%)
etanol	1,91	3,68
metanol	3,65	5,51
aceton	2,05	2,88
izopropanol	4,88	4,08
<i>t</i> -butanol	1,67	4,81
<i>n</i> -propanol	2,95	3,48
izobutanol	2,38	2,87
<i>n</i> -butanol	4,76	5,27

Vrijednosti ponovljivosti i srednje preciznosti su unutar definiranih granica za sve analite ($RSD \leq 3\%$ za ponovljivost i $RSD \leq 5\%$ za srednju preciznost), iz čega se može zaključiti da je razvijena metoda precizna.

4.2.5. Točnost

Točnost (engl. *Accuracy*) predstavlja slaganje srednje vrijednosti eksperimentalno dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti te se ispituje analizom uzorka poznate koncentracije te usporedbom izmjerenih i stvarnih vrijednosti. Točnost ove metode ispitana je na tri različite koncentracijske razine otopine standarda: niskoj (etanol - 0,1%, metanol – 15 ppm, ostala onečišćenja – 25 ppm), srednjoj (etanol – 2,5%, metanol – 300 ppm, ostala onečišćenja – 500 ppm) i visokoj (etanol – 5%, metanol – 3600 ppm, ostala onečišćenja – 6000 ppm). Točnost metoda za etanol ispitana je na uzorku metodom standardnog dodatka, a onečišćenja su ispitivana na otopinama standarda.

Na svakoj koncentracijskoj razini provedena su tri mjerenja, a rezultati su iskazani kao analitički prinos (engl. *Recovery*), tj. srednja vrijednost omjera izmjerene koncentracije i stvarne koncentracije izražene u postotku, uz pripadajuće RSD vrijednosti (Tablica 5).

Tablica 5. Parametri točnosti

	Niska konc. razina		Srednja konc. razina		Visoka konc. razina	
Analit	Analitički prinos (%)	RSD (%)	Analitički prinos (%)	RSD (%)	Analitički prinos (%)	RSD (%)
etanol	97,35	6,07	99,81	3,55	102,51	0,80
metanol	104,55	6,70	96,28	2,03	101,84	2,14
aceton	92,65	1,11	96,88	2,14	99,35	0,65
izopropanol	110,02	0,30	96,69	2,15	97,52	2,44
<i>t</i> -butanol	109,65	3,82	104,39	5,76	101,08	2,94
<i>n</i> -propanol	104,72	2,85	96,26	1,49	96,78	3,49
izobutanol	131,11	3,05	101,57	1,75	96,80	3,40
<i>n</i> -butanol	93,65	4,40	97,36	2,87	95,71	4,28

Analitički prinos je na sve tri koncentracijske razine, izuzev manjih odstupanja, u intervalu od 95 do 105 %, što znači da je validirana metoda točna u širokom koncentracijskom rasponu.

4.2.6. Izdržljivost

Izdržljivost (engl. *robustness*) je mjera sposobnosti analitičkog postupka da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode, procjenjuje se variranjem jednog faktora dok ostali ostaju nepromijenjeni. Indikator je pouzdanosti metode tijekom normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode ispitivanja. Ispitan je utjecaj promjene pet parametara: temperatura *headspace* ekstrakcije, *split/splitless* injektiranje, temperatura GC pećnice, protok plina nositelja te upotreba drugih pipeta. Definirani optimalni uvjeti su: *headspace* temperatura od 90 °C, 1:15 *split*, 40/60/180 °C gradijent temperature pećnice i protok plina od 5 mL/min. Promjene u vremenima zadržavanja (Tablica 6) i omjerima signala analita i unutarnjeg standarda (Tablica 7) prikazane su kao RSD naspram vremena zadržavanja i omjera signala pri optimalnim uvjetima. Izdržljivost metode za etanol je ispitivana na uzorku, a za onečišćenja na otopinama standarda.

Tablica 6. Parametri izdržljivosti vremena zadržavanja

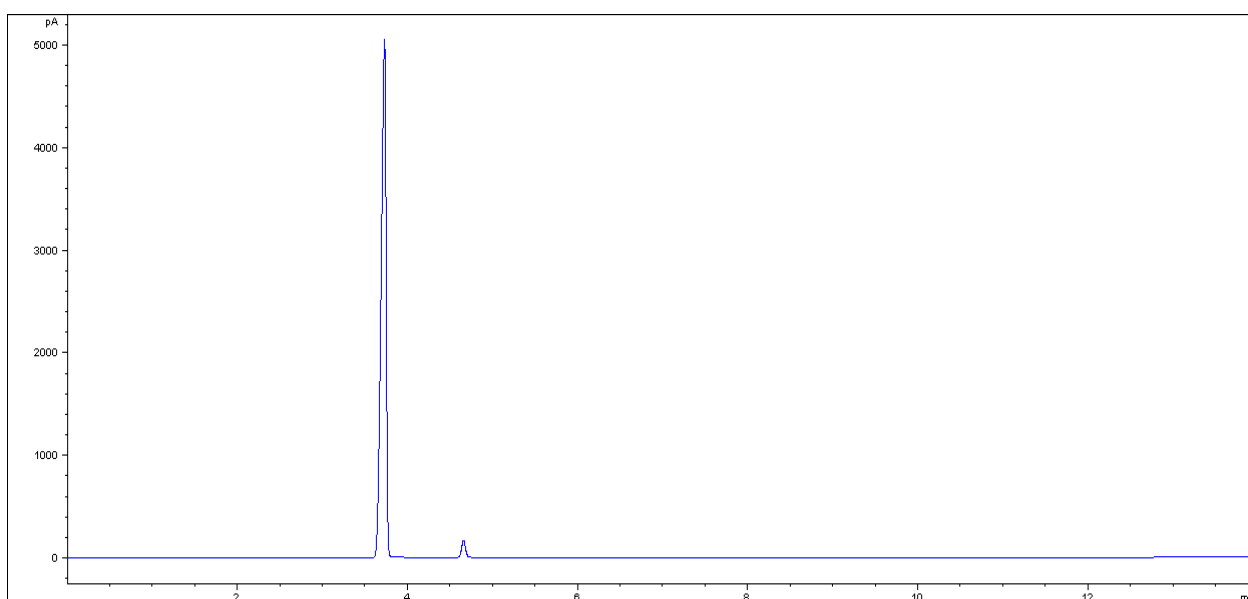
uvjeti	Headspace temperatura		Split injektiranje		Temperatura GC pećnice		Protok plina		Pipete
	89 °C RSD (%)	91 °C RSD (%)	10:1 split RSD (%)	20:1 split RSD (%)	41/61/181 °C RSD (%)	39/59/179 °C RSD (%)	4,9 mL/min RSD (%)	5,1 mL/min RSD (%)	
Analit									Upotreba druge pipete RSD (%)
etanol	0,11	0,07	0,12	0,00	0,38	0,24	0,20	0,58	0,19
metanol	0,08	0,09	0,32	0,05	0,16	0,37	0,09	0,11	0,28
aceton	0,02	0,00	0,07	0,05	0,09	0,11	0,09	0,39	0,06
izopropanol	0,03	0,00	0,06	0,01	0,14	0,08	0,07	0,69	0,00
<i>t</i> -butanol	0,08	0,09	0,32	0,05	0,16	0,37	0,09	0,11	0,28
<i>n</i> -propanol	0,01	0,02	0,07	0,02	0,16	0,21	0,03	0,95	0,07
izobutanol	0,01	0,03	0,24	0,19	0,39	0,24	0,24	1,47	0,18
<i>n</i> -butanol	0,01	0,02	0,29	0,24	0,55	0,41	0,29	1,62	0,27

Tablica 6. Parametri izdržljivosti omjera površine signala

uvjeti	Headspace temperatura		Split injektiranje		Temperatura GC pećnice		Protok plina		Pipete
	89 °C RSD (%)	91 °C RSD (%)	10:1 split RSD (%)	20:1 split RSD (%)	41/61/181 °C RSD (%)	39/59/179 °C RSD (%)	4,9 mL/min RSD (%)	5,1 mL/min RSD (%)	
Analit									Upotreba druge pipete RSD (%)
etanol	0,54	5,14	5,97	2,68	1,88	6,44	4,18	6,03	3,83
metanol	1,46	2,95	0,72	4,38	6,46	2,75	9,62	6,33	0,31
aceton	1,30	1,04	1,74	2,87	4,03	0,61	3,14	5,03	0,57
izopropanol	0,97	1,29	4,24	0,62	1,49	0,36	3,47	1,44	1,03
<i>t</i> -butanol	1,46	2,95	0,72	4,38	6,46	2,75	9,62	6,33	0,30
<i>n</i> -propanol	1,13	0,49	5,21	1,74	3,54	0,43	7,77	2,07	0,58
izobutanol	1,79	2,25	6,89	0,05	1,67	0,29	4,27	1,16	2,42
<i>n</i> -butanol	1,36	1,43	6,74	1,15	5,82	1,37	9,44	3,02	2,05

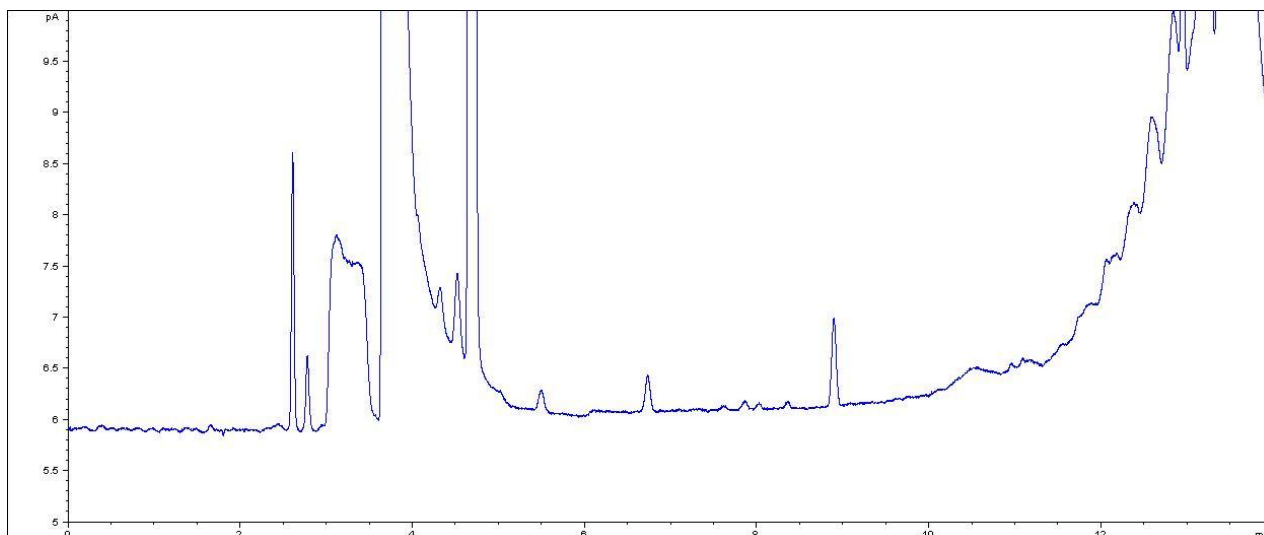
4.3. Primjena metode za određivanje analita

Razvijena i validirana HSS-GC-FID metoda je primijenjena za određivanje etanola i srodnih lako hlapljivih onečišćenja u dodacima prehrani. Kao uzorak je korištena tinktura kurkume koja se zbog svojih protuupalnih svojstava koristi kao adjuvantna terapija kod upalnih bolesti crijeva. Deklarirana koncentracija etanola iznosila je 40-50%. Analiza etanola je provedena u triplikatu na prikladno razrijeđenom uzorku uz dodatak unutarnjeg standarda (Slika 7) te je pronađena koncentracija etanola od 47,08% uz RSD od 2,41%. Određena količina etanola odgovara deklariranom sadržaju.



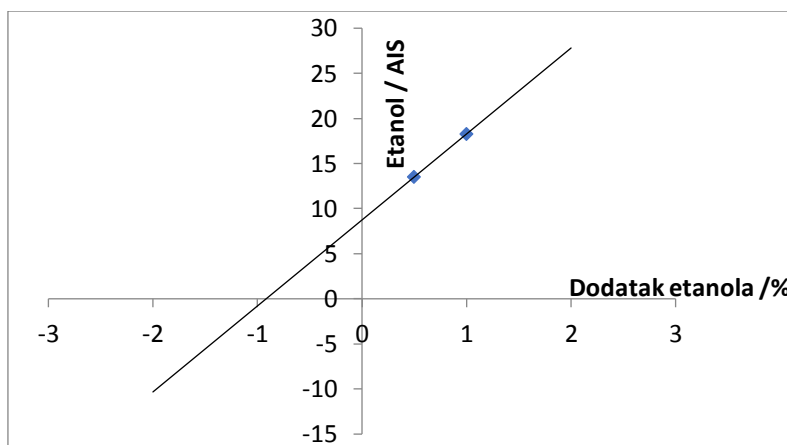
Slika 7. Kromatogram uzorka tinkture kurkume (5%) s acetonitrilom (IS)

Prilikom određivanja metanola, acetona, izopropanola, *t*-butanola, *n*-propanola, izobutanola i *n*-butanola korišten je prikladno razrijeđen uzorak uz dodatak unutarnjeg standarda (Slika 8.). Pronađene su sljedeće koncentracije: 18,12 ppm metanola uz RSD od 1,07%, 3,59 ppm acetona uz RSD od 2,00% i 15,66 ppm izopropanola uz RSD od 1,44% dok su koncentracije ostalih analita bile ispod LOD. Konačno može se zaključiti da su sva ispitivana onečišćenja ispod graničnih vrijednosti propisanih ICH smjernicama što čini ovaj pripravak sigurnim u terapiji upalnih bolesti crijeva.



Slika 8. Kromatogram uzorka kurkume (30%) s acetonitrilom (IS)

Prilikom analize, kako bi se u potpunosti isključio utjecaj matriksa korištena je metoda standardnog dodatka. Pripremljena je serija otopina uzorka uz dodatak unutarnjeg standarda s porastom količine etanola, te je sadržaj etanola određen ekstrapolacijom iz odsjeka dobivenog pravca. Grafički je prikazana ovisnost omjera površina pika etanola i unutarnjeg standarda i koncentracije dodanog etanola (Slika 9), te je dobiven pravac koeficijenta korelacije 0,9997. Određena količina etanola nije značajno odstupala od one dobivene korištenjem metode unutarnjeg standarda što isključuje utjecaj matriksa na kvantifikacijsku sposobnost metode.



Slika 9. Grafički prikaz dobiven metodom standardnog dodatka

5. Zaključak

U ovom radu predložena je HSS-GC-FID metoda za istovremeno određivanje etanola, metanola, acetona, izopropanola, *t*-butanola, *n*-butanola, *n*-propanola i izobutanola u formulacijama dodataka prehrani namijenjenih za terapiju upalnih bolesti crijeva. Ispitivanjem parametara temperature i vremena ekstrakcije te volumena uzorka optimizana je *headspace* ekstrakcija te je davala pouzdane i ponovljive vrijednosti ekstrakcije. Nadalje, optimizirani kromatografski uvjeti omogućili su dobru separaciju analita unutar 14 minuta te je razvijena brza, pouzdana i jednostavna metoda za njihovu simultanu analizu. Svi analiti pokazivali su dobar odgovor i uspješno su detektirani plameno-ionizacijskim detektorom. Metoda je validirana prema ICH smjernicama i pokazuje veliku selektivnost, linearnost ($k \geq 0,999$), točnost (analitički prinos između 90% i 110%), preciznost ($RSD \leq 5,5\%$) u radnom području. Optimirana i validirana metoda primijenjena je za određivanje navedenih analita u uzorku tinkture kurkume. Korištena je metoda unutarnjeg standarda, a moguće interferencije matriksa isključene su metodom standardnog dodatka. Iako su bila detektirana, onečišćenja nisu bila prisutna u količinama većim od propisanih granica (ICH) dok je koncentracija etanola bila unutar deklariranog sadržaja.

Rezultati ispitivanja upućuju na mogućnost detekcije i određivanja lako hlapljivih organskih otapala s ciljem ispitivanja sigurnosti i provjere kvalitete različitih formulacija dodataka prehrani, a korištena HSS-GC-FID metoda se pokazala kao vrlo učinkovita i pouzdana u rješavanju navedenog analitičkog problema.

6. Literatura

Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2017., www.halmed.hr , pristupljeno :15.2.2019.

Bergman R, Parkes M. Systematic review: the use of mesalazine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006, 23(7), 841–855.

Camacho-Barquero L, Villegas I, Sanchez-Calvo JM, Talero E, Sanchez-Fidalgo S, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(3), 333–342.

Grupa autora. Priručnik za samoliječenje. Zagreb, 2017.

Jurenka JS. Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of Curcuma longa: A Review of Preclinical and Clinical Research. *Altern Med Rev*, 2009, 14(3):277.

Kurkumin podanak, 2012., https://www.123rf.com/photo_38446074_turmeric-curcuma-longa-l-root-and-turmeric-powder-for-alternative-medicine-spa-products-and-food-ing.html, datum pristupa:10.2.2019.

Kurkumin,2007.,[https://en.wikipedia.org/wiki/Curcuminoid#/media/File:Curcumin_structure_\(keto\).svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Curcuminoid#/media/File:Curcumin_structure_(keto).svg) datum pristupa: 10.2.2019.

Kuštrak D. Farmakognozija Fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, str 353.

Lichtenstein GR, Diamond RH, Wagner CL, Fasanmade AA, Olson AD, Marano CW, Sandborn WJ. Clinical trial: benefits and risks of immunomodulators and maintenance infliximab for IBD-subgroup analyses across four randomized trials. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009, 30(3), 210–226.

Malik TA. Inflammatory Bowel Disease. *Surgical Clinics of North America*, 2015, 95(6), 1105–1122.

Mathews NM. Prohibited Contaminants in Dietary Supplements. Sports Health: A Multidisciplinary Approach. *Sports Health*, 2017, 10(1), 19–30.

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

Nigović B, Jurišić Grubišić R, Vuković J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova-praktikum. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2014.

Nigović B. Predavanja iz kolegija analitika lijekova, 2017./2018.

Petroczi A, Taylor G, Naughton DP. Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements. *Food Cheml Toxicol*, 2011, 49(2), 393–402.

Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep*, 2011, 63(3), 629–642.

Shematski prikaz headspace injektiranja, 2013,

<https://www.slideshare.net/Analysys/headspace-analysis>, datum pristupa: 10.20.2019

Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.,
<http://www.ich.org> , pristupljeno 19.2.2019.

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

Watson DG. Pharmaceutical analysis. Edingburgh, Elsevier Limited, 2012, str. 207-224.

7. Sažetak

Upalne bolesti crijeva, Crohnova bolest i ulcerozni kolitis, su autoimune, idiopatske bolesti karakterizirane kroničnom upalom lociranom u gastrointestinalnom sustavu. Uz klasičnu farmakoterapiju koju čine aminosalicilati, kortikosteroidi i biološka terapija, u novije doba pacijenti sve više pribjegavaju različitim dodacima prehrani kao adjuvantnoj terapiji. Kurkuma je svojim protuupalnim i imunosupresivnim svojstvima uvjerljivo etablirala svoje mjesto u plejadi tradicionalne farmakoterapije i pokazala obećavajuće rezultate u liječenju ove skupine bolesti. No u zadnjih dvadesetak godina tržište je preplavljeno različitim formulacijama kako kurkume, tako i ostalih dodataka prehrani što predstavlja problem zbog puno slabije zakonske regulative u razvoju i kontroli kakvoće ovih proizvoda.

U svjetlu navedenih činjenica jasna je potreba za razvojem jedinstvene analitičke metode za simultano određivanje glavnih sastojaka i onečišćenja prisutnih u formulacijama dodataka prehrani. U ovom radu prikazan je razvoj i validacija sHSS-GC-FID metode za simultano određivanje etanola, metanola, acetona, izopropanola, *n*-propanola, *t*-butanola, izobutanola i *n*-butanola te njezine primjene u analizi tinkture kurkume. Uz primjenu unutarnjeg standarda dobiveni su pouzdani rezultati te je kvantifikacija uspješno izvršena i ispitivani uzorak je zadovoljio sve kriterije propisane ICH smjernicama što ga čini sigurnim za upotrebu u terapijske svrhe.

8. Summary

Inflammatory bowel diseases, Crohn's disease and ulcerative colitis, are autoimmune, idiopathic diseases characterized by chronic inflammation in the gastrointestinal tract. Beside classical pharmacotherapy which consists of aminosalicylates, corticosteroids, immunosuppressants and biological therapy, in the modern era patients are keen to usage of different dietary supplements as adjuvant therapy. *Curcuma longa* with its anti-inflammatory and immunosuppressive properties has assured its position in the pleads of traditional pharmacotherapy and has promising properties in the future treatment of this type of diseases. In the last twenty years, the market has been flooded with variety of formulations of dietary supplements, which is considered a significant problem due to weaker legislation in their development and quality control.

In the light of these facts, the need for development of unique analytical method for simultaneous determination of main ingredients and its impurities in the dietary supplements is needed. The aim of this research is to develop and validate a sHSS-GC-FID method for simultaneous determination of ethanol, methanol, acetone, isopropanol, *n*-propanol, *t*-butanol, isobutanol and *n*-butanol and to apply it in analysis of turmeric tincture. With the usage of internal standard, the applied method has proven its analytical value and quantification has been successfully achieved. The tested sample has satisfied all the criteria proposed by ICH guidelines and has proven to be safe for therapeutical purposes.

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

RAZVOJ I VALIDACIJA NOVE sHSS-GC-FID METODE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA LAKOHLAPLJIVIH SASTAVNICA U DODACIMA PREHRANI KOD UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

David Skendrović

SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva, Crohnova bolest i ulcerozni kolitis, su autoimune, idiopatske bolesti karakterizirane kroničnom upalom lociranom u gastrointestinalnom sustavu. Uz klasičnu farmakoterapiju koju čine aminosalicilati, kortikosteroidi i biološka terapija, u novije doba pacijenti sve više pribjegavaju različitim dodacima prehrani kao adjuvantnoj terapiji. Kurkuma je svojim protuupalnim i imunosupresivnim svojstvima uvjerljivo etablirala svoje mjesto u plejadi tradicionalne farmakoterapije i pokazala obećavajuće rezultate u liječenju ove skupine bolesti. No u zadnjih dvadesetak godina tržište je preplavljeno različitim formulacijama kako kurkume, tako i ostalih dodataka prehrani što predstavlja problem zbog puno slabije zakonske regulative u razvoju i kontroli kakvoće ovih proizvoda. U svjetlu navedenih činjenica jasna je potreba za razvojem jedinstvene analitičke metode za simultano određivanje glavnih sastojaka i onečišćenja prisutnih u formulacijama dodataka prehrani. U ovom radu prikazan je razvoj i validacija sHSS-GC-FID metode za simultano određivanje etanola, metanola, acetona, izopropanola, *n*-propanola, *t*-butanola, izobutanola i *n*-butanola te njezine primjene u analizi tinkture kurkume. Uz primjenu unutarnjeg standarda dobiveni su pouzdani rezultati te je kvantifikacija uspješno izvršena i ispitivani uzorak je zadovoljio sve kriterije propisane ICH smjernicama što ga čini sigurnim za upotrebu u terapijske svrhe.

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

Rad sadrži: 33 stranica, 9 grafičkih prikaza, 6 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: upalne bolesti crijeva, dodaci prehrani, sHSS-GC-FID, hlapljive sastavnice

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. Biljana Nigović, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Toma Keser, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF NEW sHSS-GC-FID METHOD FOR DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN DIETARY SUPPLEMENTS USED IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

David Skendrović

SUMMARY

Inflammatory bowel diseases, Crohn's disease and ulcerative colitis, are autoimmune, idiopathic diseases characterized by chronic inflammation in the gastrointestinal tract. Beside classical pharmacotherapy which consists of aminosalicylates, corticosteroids, immunosuppressants and biological therapy, in the modern era patients are keen to usage of different dietary supplements as adjuvant therapy. *Curcuma longa* with its anti-inflammatory and immunosuppressive properties has assured its position in the pleads of traditional pharmacotherapy and has promising properties in the future treatment of this type of diseases. In the last twenty years, the market has been flooded with variety of formulations of dietary supplements, which is considered a significant problem due to weaker legislation in their development and quality control. In the light of these facts, the need for development of unique analytical method for simultaneous determination of main ingredients and its impurities in the dietary supplements is needed. The aim of this research is to develop and validate a sHSS-GC-FID method for simultaneous determination of ethanol, methanol, acetone, isopropanol, *n*-propanol, *t*-butanol, isobutanol and *n*-butanol and to apply it in analysis of turmeric tincture. With the usage of internal standard, the applied method has proven its analytical value and quantification has been successfully achieved. The tested sample has satisfied all the criteria proposed by ICH guidelines and has proven to be safe for therapeutical purposes.

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

Thesis includes: 33 pages, 9 figures, 6 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: inflammatory bowel disease, dietary supplements, sHSS-GC-FID, volatile compounds

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

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Toma Keser, Ph.D. Postdoctoral researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2019.