Utjecaj ekstrakcijskog otapala na određivanje odabranih kortikosteroida u prirodnim dermatološkim proizvodima

Matičević, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:458474

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Martina Matičević

Utjecaj ekstrakcijskog otapala na određivanje odabranih kortikosteroida u prirodnim dermatološkim proizvodima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) pod stručnim vodstvom doc. dr.sc. Mirande Sertić i mr. sc. Snježane Zubčić.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Mirandi Sertić što mi je omogućila izradu diplomskog rada u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode te što je pružila podršku u svakom trenutku i uvelike olakšala finalizaciju ovog rada. Zahvaljujem se komentorici, mr.sc. Snježani Zubčić na prenesenom znanju, uloženom vremenu i pruženoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela našeg rada. Hvala i svim zaposlenicima Agencije koji su pridonijeli izgradnji ovog diplomskog rada i učinili moj boravak u Agenciji ugodnim.
Veliko hvala mojoj obitelji, mami Mirjani, tati Davoru i bratu Marku, na vječnoj potpori i razumijevanju. Hvala svim prijateljima što su bili tu i učinili sve dane studiranja ugodnijim!

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Kortikosteroidi 1
1.1.1. Djelovanje glukokortikoida 2
1.1.2. Posebnost topičke primjene lijeka 2
1.1.3. Primjena topičkih kortikosteroida 3
1.1.4. Protuupalno djelovanje topičkih kortikosteroida 4
1.1.5. Mehanizam protuupalnog djelovanja topičkih koritkosteroida 4
1.1.6. Nuspojave topičke primjene 5
1.2. Krivotvorenje lijekova 6
1.2.1. Definicija krivotvorina 6
1.2.2. Borba protiv krivotvorina 6
1.2.3. Stanje u svijetu i Hrvatskoj 7
1.3. Kvantitativna analiza 8
1.3.1. Priprema uzoraka kortikosteroida 10
1.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 11
2. OBRAZLOŽENJE TEME 15
3. MATERIJALI I METODE 16
3.1. Materijali 16
3.1.1. Referentne tvari 16
3.1.2. Otapala i reagensi 16
3.1.3. Uzorak 17
3.1.4. Laboratorijski instrumenti 17
3.1.5. Programski paketi 17
3.2. Metode 18
3.2.1. Kromatografski uvijeti 18
3.2.2. Priprema otopina 18
4. REZULTATI I fRASPRAVA 20
4.1. Identifikacija kortikosteroida 20
4.2. Utjecaj otapala na ekstrakciju kortikosteroida iz uzorka 24
4.2.1. Rezultati analitičkog prinosa 30
5. ZAKLJUČCI 35
6. LITERATURA 37
7. SAŽETAK/SUMMARY 39
7.1. Sažetak 39
7.2. Summary 40

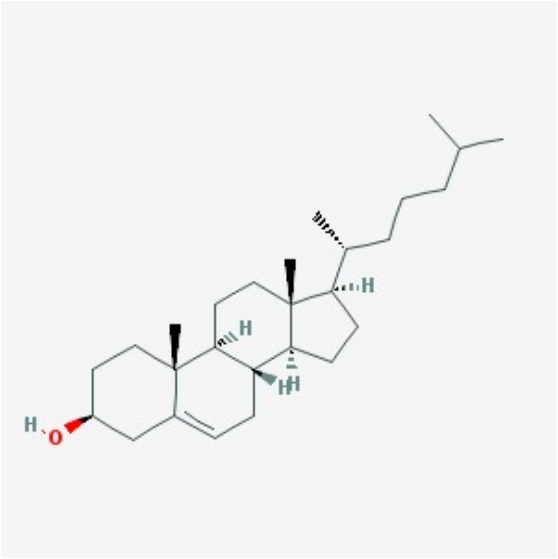
1. UVOD

1.1. Kortikosteroidi

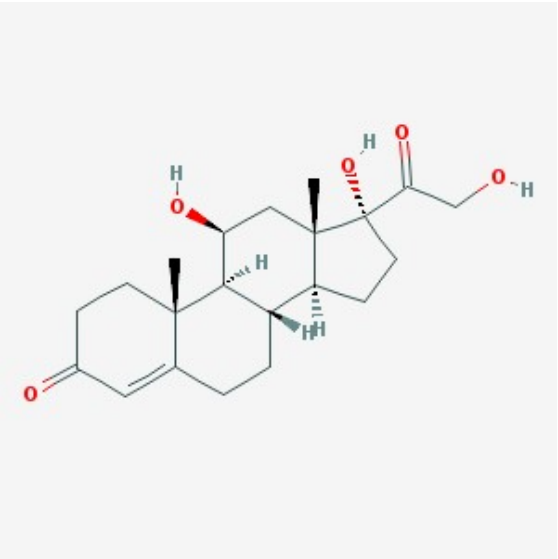
Kortikosteroidi su hormoni koji se prirodno u organizmu luče iz kore nadbubrežne žlijezde.

Sintetiziraju se iz kolesterola pa su im kemijske formule vrlo slične (Slika 1). Dvije su vrste kortikosteroida koji se luče u organizmu - mineralokortikoidi i glukokortikoidi. Mineralokortikoidi većinom djeluju na elektrolite u izvanstaničnoj tekućini (aldosteron najvažniji), dok glukokortikoidi djeluju protuupalno te na metabolizam masti, bjelančevina i ugljikohidrata (kortizol najvažniji). U daljnjem radu govorit ćemo o glukokortikoidima.

Prirodni glukokortikoidi su hidrokortizon (kortizol) i kortizon. U upotrebi su brojni polusintetski derivati (najčešće strukturne modifikacije: dvostruka veza C1-C2, dodavanje halogena, metilnih ili hidroksilnih skupina) (Guyton, 1995).



kolesterol



kortizol

Slika 1. Strukturne formule kolesterola i kortizola (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

1.1.1. Djelovanje glukokortikoida

Glukokortikoidi imaju širok spektar djelovanja. Nabrojit ćemo neke:

1. Potiču glukoneogenezu (stvaranje glukoze iz bjelančevina i drugih tvari u jetri) zbog utjecaja na transkripciju DNA i posljedično nastajanja potrebnih enzima. S druge strane smanjeno je iskorištavanje glukoze u stanicama.
2. Smanjuju količinu bjelančevina u stanicama, a povećavaju u jetri i plazmi.
3. Metaboliziraju masti iz masnog tkiva zbog čega dolazi do povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi i njihovog energijskog iskorištavanja.
4. Djeluju protuupalno.

Tijekom faze upale zbog oštećenja tkiva dolazi do oslobađanja proupalnih kemijskih supstanca (histamin, bradikinin, proteolitički enzimi). To dovodi do povećanja krvnog protoka i nastajanja eritema, mobilizacije plazme iz kapilara u oštećeno područje, infiltracije leukocita u upaljeno područje te urastanja veziva i zacjeljenja tkiva. Jedan od bitnih protuupalnih učinaka glukokortikoida je stabilizacija lizosomske membrane unutar stanica, ona puca mnogo teže te se smanjuje količina proteolitičkih enzima otpuštenih iz oštećenih stanica koji uzrokuju upalu (Guyton, 1995).

1.1.2. Posebnost topičke primjene lijeka

Glavni čimbenici koji određuju farmakološki učinak lijeka primijenjenog na kožu su:

1. *lokalne varijacije u prodiranju lijeka* (na određenim dijelovima tijela je potrebna manja količina lijeka za postizanje istog učinka; npr. skrotum, lice i pazuho naspram podlaktice)
2. *koncentracijski gradijent* (povećanje koncentracijskog gradijenta povećava masu lijeka koja penetrira po jedinici vremena)
3. *shema doziranja* (lijekovi mogu imati dugo lokalno poluvrijeme eliminacije pa se mogu primijeniti samo jednom na dan)
4. *podloge i okluzije* (odgovarajuća podloga i okluzivni zavoj mogu povećati prodiranje lijeka kroz slojeve kože i posljedično povećati učinak) (Katzung i sur., 2011).

1.1.3. Primjena topičkih kortikosteroida

Djelotvornost topičkih kortikosteroida temelji se ponajprije na njihovu protuupalnom učinku čiji mehanizmi nisu još u potpunosti razjašnjeni. Antimitotski učinak kortikosteroida na humani epidermis dodatni je mehanizam djelovanja u bolestima s povećanom staničnom obnovom (psorijaza). Primjena topičkih kortikosteroida je učinkovita u stanjima koje karakterizira upala, proliferacija tkiva te utjecaj imunosnih faktora. Za uspješno liječenje potrebna je točna dijagnoza, farmaceutski oblik za dostavu lijeka, potentnost, učestalost aplikacije, trajanje liječenja i nuspojave. Topički kortikosteroidi su prema potentnosti podijeljeni u 7 grupa, što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Podjela kortikosteroida prema potentnosti.

Ultra-visoko potentni	Visoko-potentni		Umjereno-potentni		Nisko-potentni	
Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV	Grupa V	Grupa VI	Grupa VII
Clobetasol propionat krema 0,05% Diflorason diacetat mast 0,05%	Amcinonid mast 0,1% Betametazon dipropionat mast 0,05% Dezoksimetazon mast ili krema 0,025% Flucinonid krema, mast ili gel 0,05% Halcinonid krema 0,1%	Betametazon dipropionat krema 0,05% Betametazon valerat mast 0,1% Diflorason diacetat krema 0,05% Triamcinolon acetonid mast 0,1%	Dezoksimetazon krema 0,05% Flucinonid acetonid mast 0,025% Hidrokortizon valerat mast 0,2% Triamcinolon acetonid krema 0,1%	Betametazon dipropionat losion 0,02% Betametazon valerat krema 0,1% Flucinonid acetonid krema 0,025% Hidrokortizon butirat krema 0,1% Hidrokortizon valerat krema 0,2% Triamcinolon acetonid losion 0,1%	Betametazon valerat losion 0,05% Desonid krema 0,05% Flucinolon acetonid otopina 0,01%	Deksametazon natrij fosfat krema 0,1% Hidrokortizon acetat krema 1% Metilprednizolon acetat krema 1%

Ultra-visoko i visoko potentni kortikosteroidi su namijenjeni za liječenje stanja poput alopecia aerata-e, rezistentnog atopijskog dermatitisa, hiperkeratinoznih ekcema i drugih te se ne bi trebali primjenjivati na licu, preponama, pazuhu i pod okluzijom. Umjereno potentni kortikosteroidi su namijenjeni za liječenje stanja poput atopijskog i seboreičnog dermatitisa i drugih dok se nisko potentni koriste u liječenju dermatitisa pelenske regije, lica i upala perianalne regije te su sigurniji za primjenu kod djece.

Kliničke preporuke za liječenje (razina dokaza C) su:

- psorijaza, vitiligo, lichen sclerosus (upalna dermatoza anogenitalnog područja), atopijski dermatitis, ekcemi i akutni dermatitisi mogu se liječiti topičkim kortikosteroidima

- ultra-visoko potentni topički kortikosteroidi se ne bi smjeli koristiti dulje od tri tjedna u kontinuitetu
- nisko i visoko-potentni kortikosteroidi se ne bi smjeli koristiti dulje od tri mjeseca u kontinuitetu
- treba izbjegavati kombiniranu upotrebu topičkih kortikosteroida i antifungalnih lijekova

  (Barclay, 2009)

1.1.4. Protuupalno djelovanje topičkih kortikosteroida

Topički kortikosteroidi su metoda izbora za brojne upalne bolesti. Iako se ovi lijekovi ekstenzivno koriste kao prva linija u terapiji mnogih upalnih bolesti, mehanizam njihovog djelovanja nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da je niz različitih djelovanja odgovorno za konačni učinak (Ahluwalia, 1998).

1.1.5. Mehanizam protuupalnog djelovanja topičkih koritkosteroida

Kortikosteroidi ispoljavaju svoj farmakološki učinak zbog djelovanja na molekulskoj razini u stanici. Modificiraju funkciju epidermalnih i dermalnih stanica koje sudjeluju u upali. Nakon prolaska kroz staničnu membranu vežu se za proteinske receptore u citoplazmi (iako neki radovi navode da ti receptori nisu u citoplazmi) i stvaraju steroid-receptor kompleks. Dva su djelovanja kortikosteroid-receptor kompleksa: direktno vezanje za DNA i djelovanje preko protein-protein interakcija sa transkripcijskim faktorima. Oba puta djelovanja stvaraju iste rezultate.

1. Interakcija sa DNA

Nakon vezanja kortikosteroid-receptor kompleksa na vezno mjesto na DNA dolazi do alternacija u transkripciji (pozitivnih ili negativnih) i posljedično promjena u translaciji glasničke RNA (mRNA) te nastanka proteina. Ovim putem dolazi do indukcije sinteze glikoproteina lipokortin 1 (aneksin 1) koji ima glavni protuupalni učinak zbog supresije indukcije fosfolipaze A2 (PLA2) i ciklooksigenaze-2 (COX-2). PLA2 je enzim koji pretvara membranske fosfolipide u arahidonsku kiselinu, na koju onda djeluju dva enzima COX-1 i

COX-2 te na taj način nastaju razni prostaoidi od kojih su neki proupalni. Inhibicijom PLA2 smanjuje se razina prostanoida, ali i produkcija leukotriena i trombocit aktivirajućeg faktora, također medijatora upale.

2. Protein-protein interakcije

Inhibicijsko djelovanje kortikosteroida na proupalne transkripcijske faktore AP-1 i NFkB koji reguliraju ekspresiju proupalnih citokina (TNFa, IL-6, IL-8, IL-2) i adhezijskih molekula u citoplazmi.

Modulira se aktivnost mast stanica. Mast stanice sadrže na sebi velik broj IgE receptora. Vezanjem IgE-antigen kompleksa na receptore dolazi do degranulacije mastocita i otpuštanja proupalnog histamina. Topički kortikosteroidi smanjuju broj mast stanica u koži što rezultira smanjenjem otpuštenog histamina.

Inhibira se produkcija NO sintaze, enzima bitnog za nastajanje dušikovog oksida NO koji djeluje vazodilatacijski.

Sve zajedno rezultira protuupalnim, imunosupresivnim i antimitgoenim djelovanjem kortikosteroida (Kragballe, 1989).

1.1.6. Nuspojave topičke primjene

Topički kortikosteroidi imaju potencijalne nuspojave isto kao i sistemsko primijenjeni. Lokalne nuspojave mogu biti: atrofijske promjene, blagi podlijevi, povećana fragilnost kože, steroidna atrofija, strije, ulceracije, purpura, teleangiektazija, kontaktni dermatitis, otežano zacjeljivanje rana, promjene u pigmentaciji kože, hirzutizam, peroralni dermatitis i fotosenzitivnost. Također, mogu povećati rizik od infekcija, uključujući pogoršanje kutane infekcije, granuloma gluteale infantum-a (ograničena gnojna upala) i nastajanje sekundarne infekcije. Kronična primjena može rezultirati tolerancijom i tahifilaksijom.

Iako su nuspojave topičkih kortikosteroida uglavnom lokalne, visoka apsorpcija topički primijenjenih visoko potentnih kortikosteroida može rezultirati sistemskim nuspojavama kao npr. supresija djelovanja puta hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, nekroza glave femoralne kosti, hiperglikemija, hipertenzija i dr (Barclay, 2009). Poseban razlog zabrinutosti u dječjoj dobi jest mogući zastoj u rastu (Katzung, 2011).

1.2. Krivotvorenje lijekova

1.2.1. Definicija krivotvorina

U Republici Hrvatskoj krivotvoreni lijek je definiran Zakonom o lijekovima, 2013. (NN), članak 3, stavak 49. : "Krivotvoreni lijek je lijek koji je neistinito predstavljen s namjerom prijevare, s obzirom na:

a) identitet, uključujući pakiranje i označivanje lijeka, naziv ili sastav lijeka u pogledu bilo kojeg sastojka lijeka uključujući pomoćne tvari i jačinu lijeka;

b) podrijetlo, uključujući proizvođača, državu proizvodnje i državu podrijetla lijeka ili nositelja odobrenja za stavljanje lijeka u promet;

c) sljedivost, uključujući zapise i dokumente koji se odnose na promet lijeka.

Definicija se ne odnosi na lijek s nenamjernim nedostacima u kakvoći i ne odnosi se na pitanja o kršenju prava intelektualnog vlasništva."

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) navodi pojam SSFFC medicinskog proizvoda (Substandard, spurious, falsely labelled, falsified and counterfeit). Takav lijek može biti bez aktivnog sastojka ili krive količine istog. Neki SSFFC medicinski proizvodi su detektirani kao toksični zbog velikih količina krivih aktivnih sastojaka ili zbog visokog udijela toksičnih kemikalija koje sadrže. SZO napominje kako su SSFFC proizvodi često proizvedeni u nehigijenskim uvjetima od strane nekvalificiranih osoba te sadrže nepoznata onečišćenja, a mogu biti i kontaminirani bakterijama. (www.who.int).

1.2.2. Borba protiv krivotvorina

Problem krivotvorenih lijekova u porastu je na svjetskoj razini, sa sve više krivotvorenih lijekova. Problem krivotvorina prepoznat je u Europskoj uniji te je na temelju toga donesena Direktiva 2011/62/EU, u kojoj su temeljito razrađeni mehanizmi za borbu protiv krivotvorenih lijekova u legalnom distribucijskom lancu zemalja EU.

U Republici Hrvatskoj, Agencija za lijekove i medicinske proizvode HALMED kontinuirano surađuje sa svim hrvatskim i europskim nadležnim institucijama u cilju

sprečavanja prometa krivotvorenim lijekovima i medicinskim proizvodima te unapređivanja razine zaštite zdravlja pacijenata i korisnika lijekova u EU (www.halmed.hr). Također, u slučaju bilo kakve sumnje na krivotvoreni lijek potrebno je obavijestiti HALMED.

1.2.3. Stanje u svijetu i Hrvatskoj

Krivotvoreni lijekovi su zbog svoje prirode veoma teški za detektiranje. Često su dizajnirani tako da se doimaju identični kao pravi lijek i ne moraju odmah izazivati ozbiljne nuspojave, iako na kraju nisu dostatni za liječenje ili tretiranje bolesti za koju su navodno indicirani.

Podaci SZO-a pokazuju da se u razvijenim zemljama najviše krivotvore lijekovi za poboljšanje stila života (lijekovi za liječenje erektilne disfunkcije, lijekovi za liječenje pretilosti, intelektualni stimulansi, kortikosteroidi, antihistaminici i sl.), dok u zemljama u razvoju ima najviše krivotvorina među lijekovima za liječenje po život opasnih bolesti (antibiotici, onkološki lijekovi, analgetici, kardiovaskularni lijekovi, antivirotici, antimalarici i sl.).

Iako nadležne institucije intenzivno rade na suzbijanju pojave krivotvorenih lijekova i podizanju svijesti građana o opasnostima kojima se izlažu kupnjom lijekova iz ilegalnog distribucijskog lanca, riječ je o globalnom problemu velikih razmjera kojemu je teško stati na kraj. Zbog svoje neuspješnosti u liječenju te vrlo čestih nuspojava i štete koju čine pacijentima, prisutnost krivotvorenih lijekova dovodi do gubitka povjerenja u lijekove, zdravstveni sustav, ali i same zdravstvene djelatnike.

1.3. Kvantitativna analiza

U kemijskoj analizi, priprema uzorka je osnova za kvalitetnu izvedbu analitičke metode. Cijeli proces je usmjeren dobivanju reprezentativne, reproducibilne i homogene otopine prikladne za injektiranje u kromatografsku kolonu (u slučaju pripreme uzorka za kromatografsku analizu).

Cilj uspješne pripreme uzorka je dobivanje alikvota uzorka koji:

- je relativno očišćen od interferencija
- neće oštetiti kolonu ili instrument na kojem se provodi metoda
- ima ukoncentriran analit
- je kompatibilan sa analitičkom metodom.

Finalni uspjeh metode ovisi o shvaćanju cijelog procesa analize određenog analita u uzorku i njegovih fizičko-kemijskih svojstava te svojstva matriksa u kojem se nalazi - npr. topljivost u različitim otapalima, isparavanje, polarnost itd. (Ezel i sur.,2015).

Ovisno o agregacijskom stanju, pripreme uzorka se provode na različite načine. Priprema krutog uzorka je obično zahtjevnija od pripreme tekućeg uzorka jer se kruti uzorak najčešće treba prevesti u tekući oblik. Za hidrofilne komponente preferiraju se polarna, a za lipofilne nepolarna otapala. U nekim slučajevima uzorak je lako topljiv u otapalu i odmah spreman za injekciju u kromatografsku kolonu ili daljnju preobradu. U drugim slučajevima, matriks uzorka može biti netopljiv u određenom otapalu pa se analit mora ekstrahirati iz takvog matriksa.

U kromatografiji, otapalo koje koristimo za otapanje uzorka treba biti kompatibilno sa mobilnom fazom u smislu da :

- ne utječe na retencijsko vrijeme analita i rezoluciju između pikova
- ne utječe na stacionarnu fazu
- ne interferira sa detekcijom.

Također, postoje slučajevi gdje je analit teško odvojiv od matriksa zbog stvaranja inkluzija ili adsorpcije. Nakon otapanja topljivih komponenti uzorka u otapalu, taj dio se odvaja od netopljivog dijela i koristi u daljnjoj analizi.

Priprema tekućeg uzorka (ili naknadna obrada krutog uzorka prevedenog u tekući oblik) se najčešće provodi tekućinskom ekstrakcijom LLE (engl. *liquid-liquid extraction*) ili

SPE (engl. *solid phase extraction*). Koriste se i jednostavnije metode koje uvelike pomažu ekstrakciji analita:

Razrjeđivanje. Uzorak se razrjeđuje sa otapalom kompatibilnim sa kromatografskim uređajem kako bi se smanjilo opterećenje kolone, detektora ili smanjila snaga prvog otapala.

Evaporacija. Odstranjivanje tekućine laganim grijanjem pri atmosferskom tlaku pod strujom inertnog plina.

Destilacija. Uzorak se grije do točke vrenja otapala, a analiti u plinovitoj fazi se kondenziraju i skupljaju.

Mikrodijaliza. Polupropusna membrana se stavi između dvije vodene tekuće faze te dolazi do prijenosa analita na temelju različitih koncentracija otopina.

Liofilizacija. Vodeni uzorci se zalede, a voda se ukloni sublimacijom pod vakuumom.

Filtracija. Tekućina se propušta kroz membranski filtar kako bi se uklonile suspendirane čestice.

Centrifugiranje. Uzorak se stavi u epruvetu za centrifugiranje i podvrgne centrifugiranju na nekoliko tisuća okretaja u minuti. Dekantiranjem odvojimo supernatant od istaloženog dijela.

Sedimentacija. Uzorak se slegne nakon što se ostavi netaknut određeno vrijeme. Brzina ovog procesa ovisi o Stoke-ovom radiusu.

Najčešće su HPLC analize izvode 'dilute and shoot' postupkom, gdje se koncentracija otopljenog analita smanjuje postupnim razrjeđivanjem uzorka do prihvatljive koncentracije koja ne može oštetiti kolonu ili detektor.

Iako ne postoji univerzalna metoda za pripremu uzorka, najčešće se koriste tekućinske ekstrakcije LLE (enlg. *liquid-liquid extraction*) i SPE (engl. *solid phase extraction*). U primjeni su također i neke moderne ekstrakcije metode za krute uzorke: PFE (engl. *presurised fluid extraction*), ASE (engl. *accelerated solvent extraction*), automatizirana Soxhlet ekstrakcija, SF (superkritični fluid) ekstrakcija, ekstrakcija pomoću mikrovalova i dr. (www.agilent.com).

1.3.1. Priprema uzoraka kortikosteroida

Kortikosteroidi su steroidi izgrađeni od lipofilne ciklopentanoperhidrofenantrenske jezgre koja je modificirana na periferiji jezgre ili na postraničnom lancu dodatkom hidrofilnih skupina. Na temelju svojih fizikalno-kemijskih svojstava najbolje se otapaju u nepolarnim otapalima, a topljivost se može poboljšati kombinacijom nepolarnih i polarnih otapala (Makin i Gower, 1995).

1.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je metoda najčešće korištena za kvantifikaciju ljekovitih tvari u formulacijama.

Tekućinska kromatografija je metoda odjeljivanja tvari u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz kolonu od nehrđajućeg čelika koja je punjena česticama stacionarne faze promjera 3-10 μm. Najčešće su stacionarne faze silikagel ili modificirani silikagel, ovisno o izvedbi metode. Uzorak se unosi preko ventila sa više izmjenjivih petlji. Odjeljivanje tvari ovisi o vrsti stacionarne faze odnosno o vremenima zadržavanja pojedinih sastavnica uzorka na stacionarnoj fazi.

Dijelovi HPLC instrumenta:

1.spremnik za mobilne faze

2.crpka za visoke tlakove

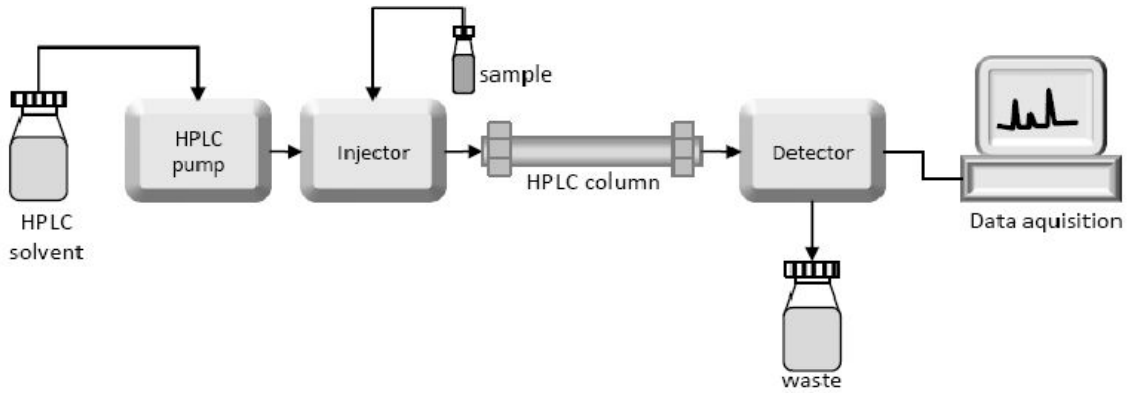
3.injektor za uzorke

3.kolona od nehrđajućeg čelika

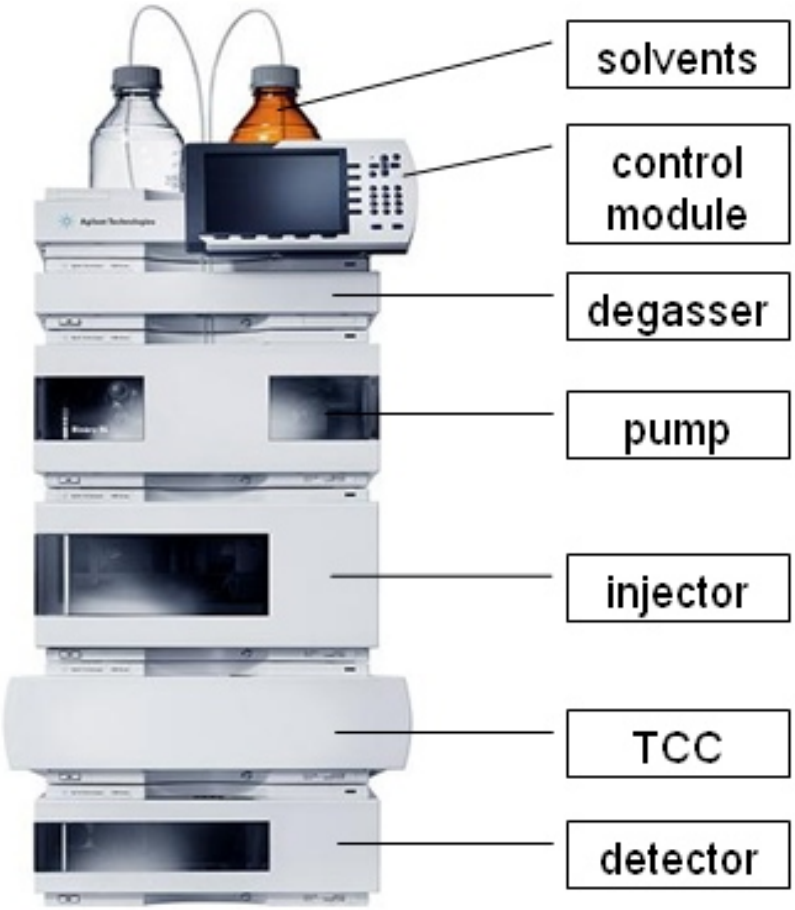
4.detektor

5.spremnik za skupljanje otapala

Dijelovi HPLC-a su shematski prikazani na Slici 2, a na Slici 3 je primjer HPLC uređaja.



Slika 2. Shematski prikaz dijelova HPLC uređaja (www.google.com)



Slika 3. Primjer HPLC uređaja (www.google.com)

Prema principu odjeljivanja HPLC metoda može biti normalno-fazna, gdje dolazi do interakcije polarnih grupa analita i polarne stacionarne faze, i obrnuto-fazna, gdje imamo interakciju nepolarnih grupa analita i nepolarne stacionarne faze. Kako su kortikosteroidi nepolarne, neutralne tvari, u ovom radu smo koristili obrnuto-faznu kromatografiju te ćemo u nastavku govoriti o njoj.

U obrnuto-faznoj kromatografiji kao stacionarna faza koristi se modificirani silikagel, najčešće oktadecilsilil ili oktilsilil silikagel (C18 i C8). Mobilna faza su manje ili više nepolarna otapala ili češće kombinacije otapala - voda, metanol, acetonitril, tetrahidrofuran. Često se koriste puferske otopine u kombinaciji sa organskim otapalima. Smanjenjem udjela polarnog otapala u kromatografiji obrnute faze smanjuje se vrijeme zadržavanja analita na koloni. Tijekom analize sastav mobilne faze može biti konstantan - izokratna eluacija, a ako

se na taj način ne postiže željeno odjeljivanje s vremenom se može mijenjati sastav mobilne faze kontinuirano ili skokovito - gradijentna eluacija.

Brzina eluiranja neutralnog analita iz kolone ovisi o omjeru njegovih polarnih i nepolarnih skupina - što je analit lipofilniji, jače su interakcije sa stacionarnom fazom, dulje je zadržavanje na njoj te analit izlazi kasnije iz kolone. Temperatura također utječe na brzinu eluiranja, ali i na razlučivanje. Povišenje temperature povećava brzinu eluacije analita i skraćuje analizu.

Najčešće korišteni detektori su Uv/Vis detektor, 'Diode array' detektor (DAD), elektrokemijski detektor, pulsni amperometrijski detektor, fluorescentni detektor, detektor refrakcijskog indeksa (RI), 'Evaporative light scatering' dektor (ELSD), maseni detektor. Vrste detektora odabire se prema kemijskim odredbama analiziranog uzorak.

Rezultat HPLC analize je kromatogram, prikaz eluacijskih krivulja odnosno pikova 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 pika koja ovisi o koncentraciji analita. Položaj pika 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 pika nam služi za određivanje sadržaja analita jer iz nje možemo izračunati količinu naše supstance. Dakle, HPLC metoda nam daje podatke kako za kvalitativnu tako i za kvantitatvnu analizu.

Kvantitativna analiza provodi se uz pomoć metode sa vanjskim (eksternim) standardom, metode sa unutarnjim (internim) standardom ili postupkom kalibracije. Sadržaj aktivne tvari u ljekovitom obliku određuje se HPLC metodom s vanjskim standardom ili postupkom kalibracije, dok se metoda sa unutarnjim standardom koristi samo kada se teško postiže potpuna ekstrakcija aktivne tvari iz matriksa uzorka oblika poput masti, krema i terapijskih sustava sa polimernim nosačima.

Metodom s vanjskim standardom sadržaj ispitivane tvari određuje se usporedbom površine pika ispitivane tvari i pripadajuće površine pika otopine standarda.

U postupku kalibracije koristimo kalibracijsku krivulju koju smo dobili mjerenjem niza otopina standarda različitih koncentracija za koje je odnos površine pikova i koncentracije linearan. Na temelju izmjerene površine pika ispitivane tvari, uz pomoć kalibracijske krivulje izračunamo sadržaj ispitivane tvari.

Kod metode unutarnjeg standarda, kao unutarnji standard koristimo spoj koji je strukturno sličan analitu od interesa. Unutarnji standard dodajemo u istim koncentracijama u

otopinu standarda i u otopinu uzorka koji sadrži analit. Izračunamo faktore odgovora kao omjer površine pikova standarda i unutarnjeg standarda odnosno analita iz uzorka i unutarnjeg standarda te na temelju tih podataka izaračunamo koncentraciju analita u uzorku.

Kombinacija tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i detekcije UV/Vis metodom pruža točnu, preciznu i robusnu metodu za kvantitativnu analizu farmaceutskih proizvoda te je u industriji standardna metoda za ovu primjenu. Može se koristiti i za praćenje stabilnosti ljekovitih supstanci, praćenje metabolizma u biološkim tekućinama, određivanje koeficijenta razdjeljenja i pKa pri vezanju na proteine. (Watson, 1999)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U posljednje vrijeme, svjedoci smo sve većeg trenda korištenja prirodnih proizvoda u svrhu očuvanja zdravlja. Jedan od glavnih razloga takvog ponašanja je vjerovanje pacijenata kako su prirodni proizvodi sigurna alternativa tradicionalno korištenim medicinskim preparatima. Za mnoge takozvane prirodne proizvode otkriveno je da se radi o krivotvorinama jer su u njima nađeni dodaci aktivnih farmaceutskih supstancija.
Kao fokus našeg interesa u ovom istraživanju odabrali smo prirodne topičke proizvode. Cilj našeg istraživanja je pronaći najprikladnije ekstrakcijsko otapalo koje daje najbolji analitički prinos za dodane sintetske koritkosteroide u topičke pripravke prije određivanja sadržaja kortikosteroida kromatografskom metodom.

U prijašnjim istraživanjima u HALMED-u pokazalo se da je acetonitril:voda:octena kiselina = 60:40:0,1% dobro ekstrakcijsko otapalo za odabrane kortikosteroide iz matriksa kreme. U našem radu, htjeli smo ispitati kako na ekstrakciju utječu druga slična otapala, ali i to kako vrsta matriksa utječe na ekstrakcijsku učinkovitost. Koristili smo otapala različite polarnosti za ekstrakciju različito polarnih kortikosteroida. Na temelju vrijednosti logP (logaritam koeficijenta raspodijele neutralne tvari koji predstavlja omjer koncentracije tvari u oktanolu i vodi), od najpolarnijih prema manje polarnima navedeni su korišteni koritkosteroidi: deksametazon, triamcinolon acetonid, hidrokortizon acetat, metilprednizolon acetat, alklometazon dipropionat, betametazon dipropionat, klobetazol propionat, betametazon valerat, mometazon furoat. Korištena otapala, od najpolarnijih prema manje polarnima: 0,1% octena kiselina, metanol, etanol, acetonitiril. Također, htjeli smo vidjeti kako će na ekstrakciju utjecati zakiseljenje medija sa octenom kiselinom koja će utjecati na ionizaciju funkcionalnih skupina i topljivost u konačnici. Kao matriks korištena je hidrofilnija krema u odnosu na prijašnja istraživanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Referentne tvari

Triamcinolone acetonide, USP RS, Twinbrook Pkwy, Cat.No.: 1677002, w=99,9%
Clobetasolpropionate, CRS Ph.Eur. RS, Code: Y0000559, Id: 0034r4, w=99,7%
Dexamtethasone, Sigma-Aldrich, Analytical standard, PCode: 101800790, w=99,7%
Bethamethasone17-valerate, Sigma-Aldrich, Anlaytical standard, w=99,3%
Mometasonefuroate, Sigma-Aldrich, PCode: 1416, w=99,9%
Alklometazondipropionat, Belupo, br.serije: RS-19031213, w=98,56%
Bethametasonedipropionat, Merck&Co, L-004853263-000H011
Belupo, br.serije: RS-42740612 (B), w=99,8%
Methylprednisoloneacetate, RS, Pfizer 090242-QCS-15,w=99,6%
Hydrocortisone21-acetate, Sigma-Aldrich, Analytical standard, w=98,4%

3.1.2. Otapala i reagensi

Methanol, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, kat.br.: 1.06007.2500, br.serije I844007630
Ethanol, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, kat.br.: 1.11727.2500, br.serije: K46828627528
Acetonitrile, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, kat.br.: 1.00030.2500, br.serije: I854630639
Acetic acid, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, kat.br.: 1.00063.1000, br.serije: K45130063347
Ultračista voda, HALMED

3.1.3. Uzorak

Placebo neutralne kozmetičke kreme.

3.1.4. Laboratorijski instrumenti

Vaga Mettler Toledo, model PB1502-sk,
Vaga Mettler Toledo, model XP205DR
Vodena kupelj Buchi Waterbath B-480
Vibracijska mješalica Ika-Werke GmnH&Co KG
HPLC Agilent technologies 1200
Centrifuga Rotina 38R
Ledenica za reagense Labena

3.1.5. Programski paketi

Mass Hunter Workstation Software, version B.05.01

3.2. Metode

3.2.1. Kromatografski uvijeti

Analize su provedene metodom Tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

Instrument: Agilent 1200 RR
Kolona: ZORBAX Eclipse XDB-C18, 150x4,6 mm, 3,5 µm, serije: USWA011992
Protok: 1 mL/min.
Temperatura kolone: 25°C
Volumen injektiranja: 20 µL
Valna duljina: 254 nm
Eluacija: mobilna ot.A: mobilna ot.B=90:10
Mobilna otopina A: acetonitril/voda=60:40
Mobilna otopina B: pročišćena voda

3.2.2. Priprema otopina

Za pripremu otopina koristimo četiri otapala: metanol, etanol, acetonitril ili 0,1% octenu kiselinu u metanolu (Giaccone i sur., 2017; Nam i sur., 2011; Gaudiano i sur., 2010). Mjerenja se rade sa dvije odvage standarda i tri koncentracije standarda u uzorku, u duplikatu.

<u>Priprema stock otopine</u> (A i B odvage)
Pripremaju se otopine svakog pojedinačnog standarda. Izvaže se 10 mg standarda u odmjernu tikvicu od 10 mL, otopi u metanolu i nadopuni do oznake. Odmjeri se po 2 mL od svake otopine standarda u odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopuni metanolom do oznake.
<u>Priprema uzorka</u>
U kivetu za centrifugiranje izvaže se 1 g kreme, 10 ml jednog od otapala te 50, 100 ili 150 µL stock otopine. Zagrijava se 10 min na 60 C na vodenoj kupelji i mućka 5 min na vibracijskoj mješalici, postupak se ponovi tri puta. Uzorci se stave u ledenicu 15 min i centrifugiraju 10 min na 4000 rpm.

Za jedno otapalo imamo 12 uzoraka - dvije odvage standarda za pripremu stock A i B otopine i tri koncentracije standarda u uzorku, u duplikatu. Ukupno za 4 otapala se radi 48 uzoraka.

Priprema otopine standarda

50, 100 ili 150 μL stock otopine prenesemo u tikvicu od 10 mL i nadopunimo jednim od otapala.

Za jedno otapalo imamo 12 otopina standarda - dvije odvage standarda za pripremu stock A i B otopine i tri koncentracije standarda u otopini, u duplikatu. Ukupno za 4 otapala se radi 48 otopina.

Priprema slijepe probe

Izvažemo 1 g kreme i dodamo 10 mL jednog od otapala. Slijepu probu pripremimo na isti način kao i uzorak.

Za jedno otapalo radimo slijepu probu u duplikatu. Ukupno za 4 otapala imamo 8 slijepih probi.

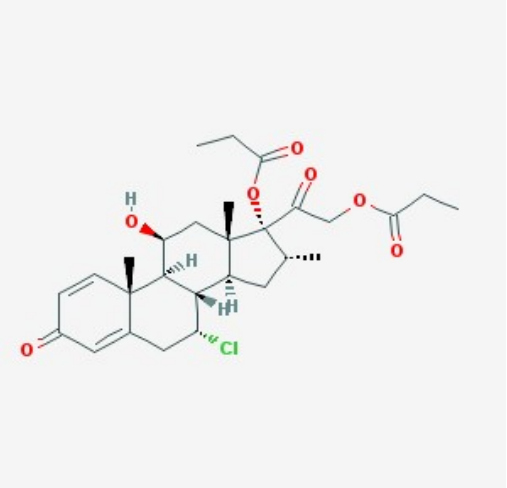
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Identifikacija kortikosteroida

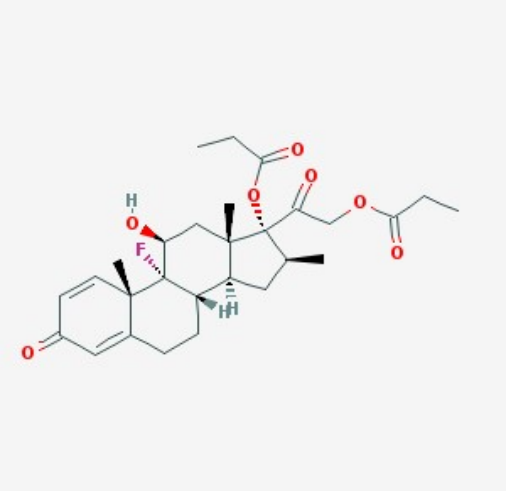
U Tablici 4 prikazana je usporedba retencijskog vremena kortikosteroida (Rt) i njihove polarnosti temeljem logP vrijednosti. Kortikosteroidi su poredani od najviše polarnog (deksametazon) do najmanje polarnog (mometazon furoat). Očekivano, što je veća logP vrijednost kortikosteroida, odnosno što je kortikosteroid manje polaran, vrijeme zadržavanja na C18 koloni je dulje. Također, vidimo da ne utječe samo polarnost kortikosteroida na retencijsko vrijeme, već i njihova struktura (Slika 4). Što je struktura kortikosteroida razgranatija to je njegovo zadržavanje na koloni dulje. Na Slici 5 je primjer kromatograma otopine smjese standarda ispitivanih kortikosteroida.

Tablica 4. Usporedni prikaz kromatografskog pika, retencijskog vremena i logP kortikosteroida.

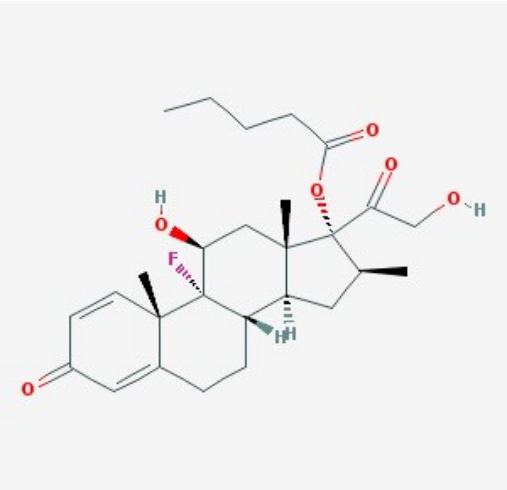
Kortikosteroid	**Kromatografski pik**	$R_{\frac{t}{min}}$	**logP**
Deksametazon	1	2,217	1,93
Triamcinolon acetonid	2	2,497	2,31
Hidrokortizon acetat	3	2,908	2,31
Metilprednizolon acetat	4	3,508	2,58
Aklometazon dipropionat	5	9,13	3,28
Betametazon dipropionat	6	11,289	3,38
Klobetazol propionat	7	9,823	3,49
Betametazon valerat	8	6,775	3,76
Mometazon furoat	9	10,648	4,27



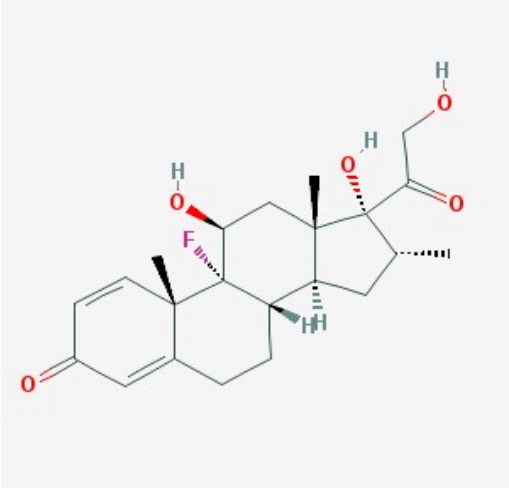
Alklometazon dipropionat



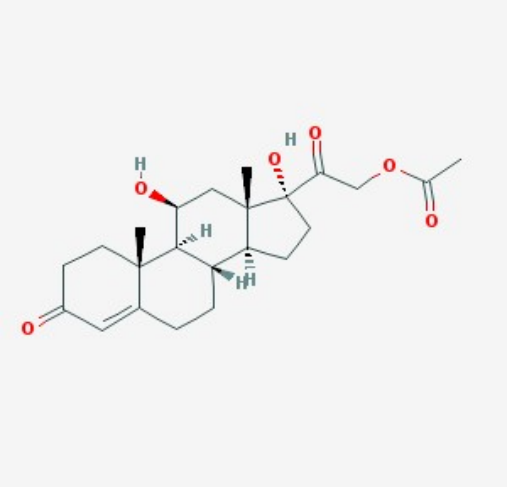
Betametazon dipropionat



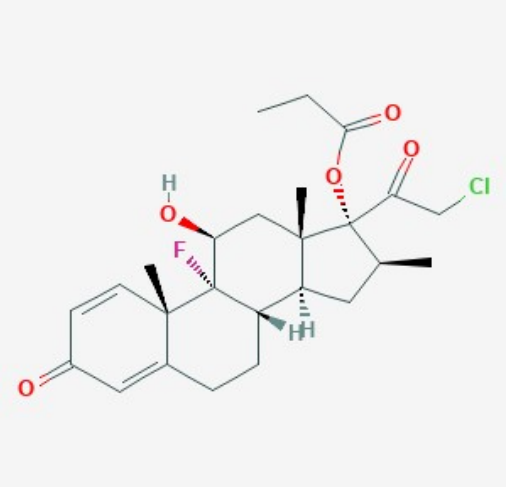
Betametazon valerat



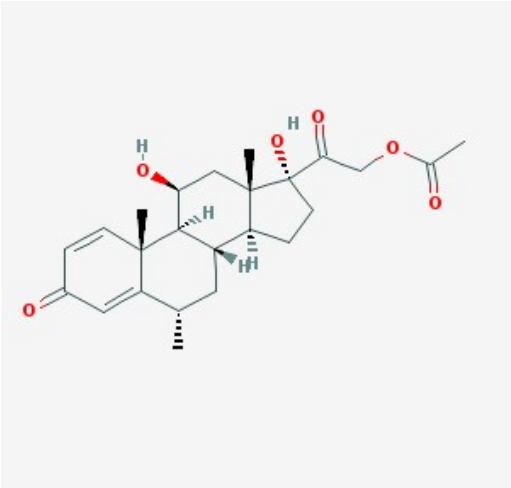
Deksametazon



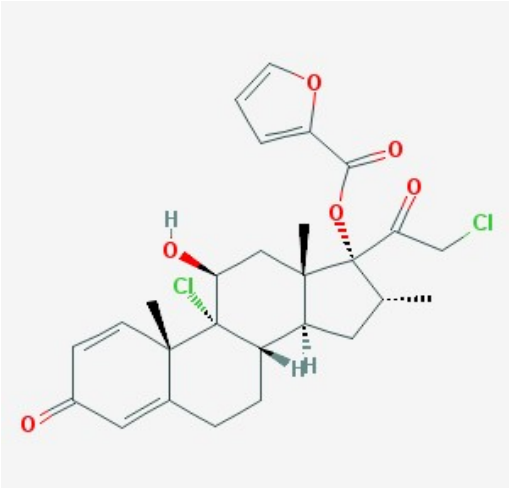
Hidrokortizon acetat



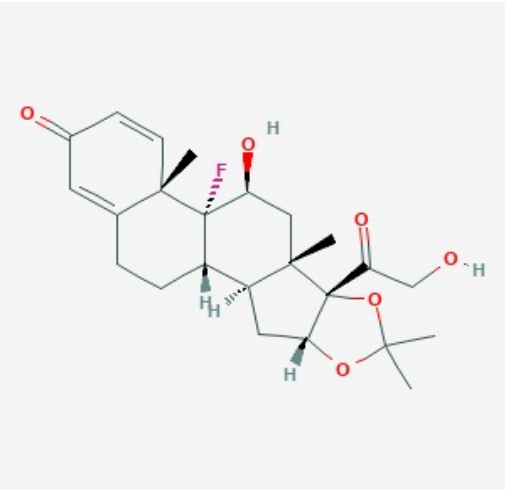
Klobetazol propionat



Metilprednizolon acetat

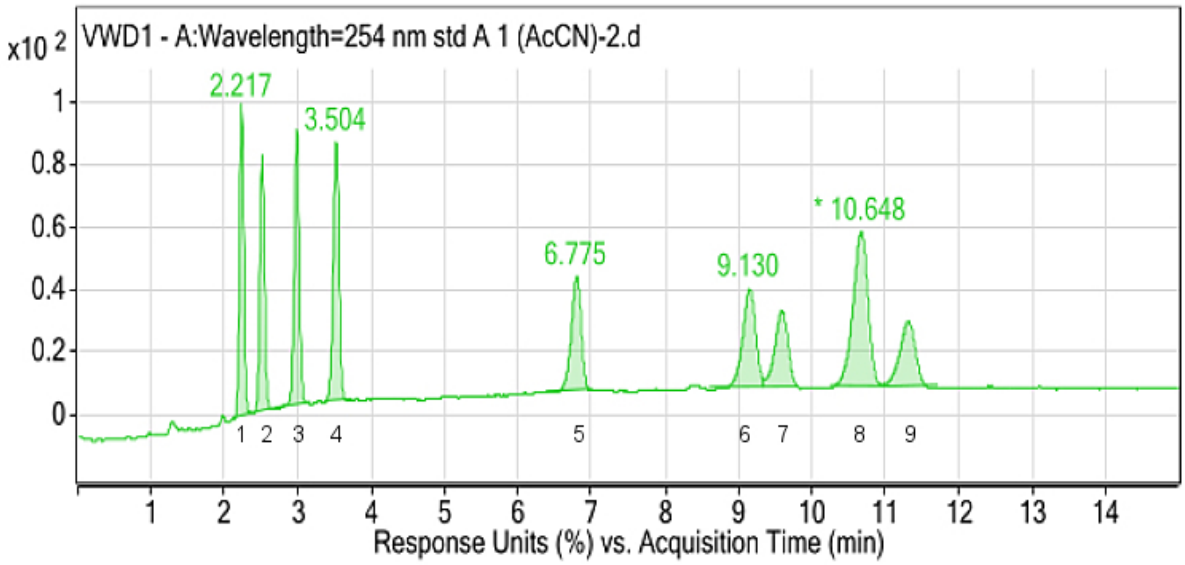


Mometazon furoat



Triamcinolon acetonid

Slika 4. Strukturne formule ispitivanih kortikosteroida (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

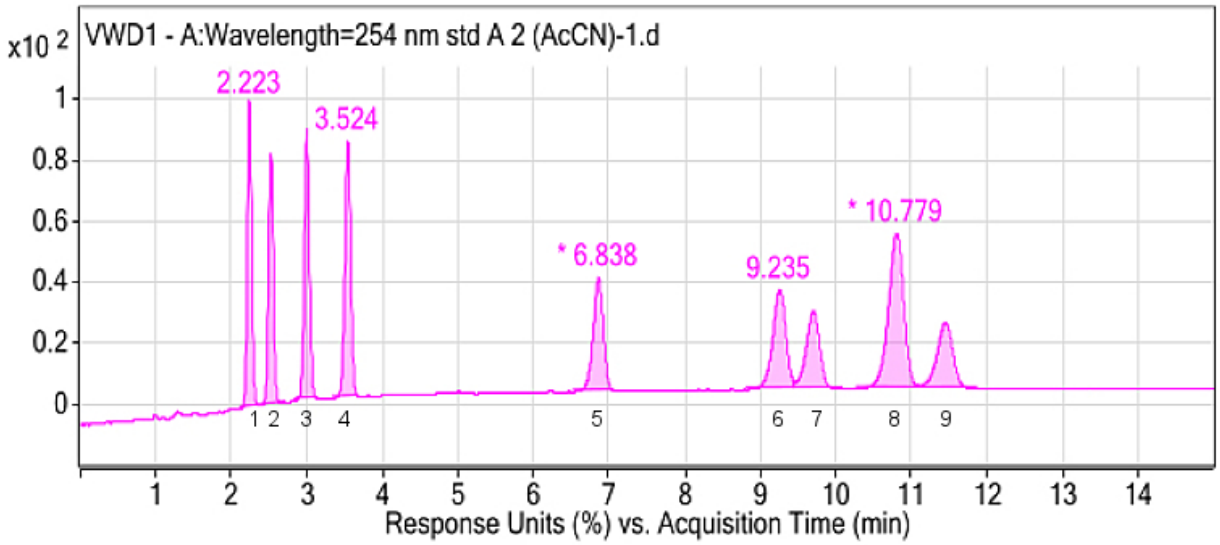


Slika 5. Primjer kromatograma za otopinu standarda koncentracije 0,5 mg/L.

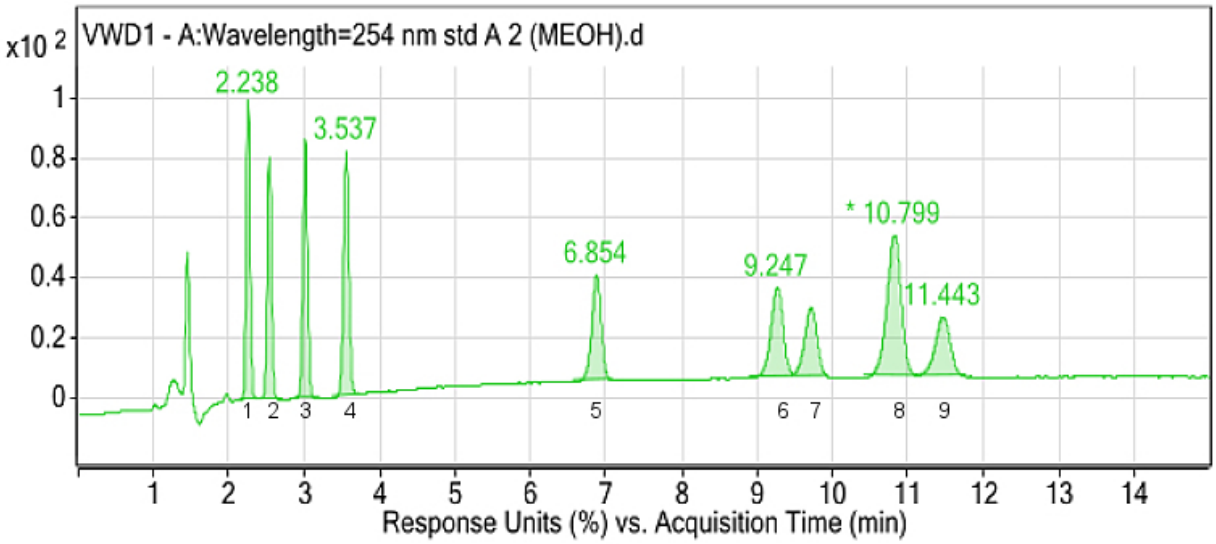
4.2. Utjecaj otapala na ekstrakciju kortikosteroida iz uzorka

Nakon injektiranja otopine standarda, uzorka i slijepe probe u HPLC kolonu, dobili smo kromatograme kao rezultat HPLC analize.

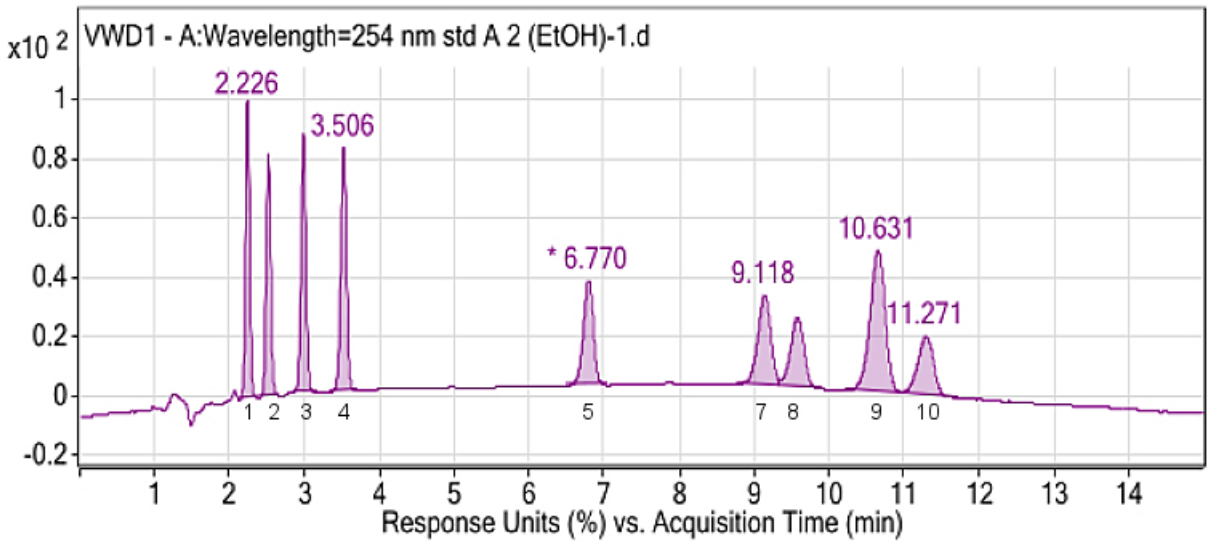
Na Slici 6 prikazani su kromatogrami otopine standarda u četiri različita otapala.



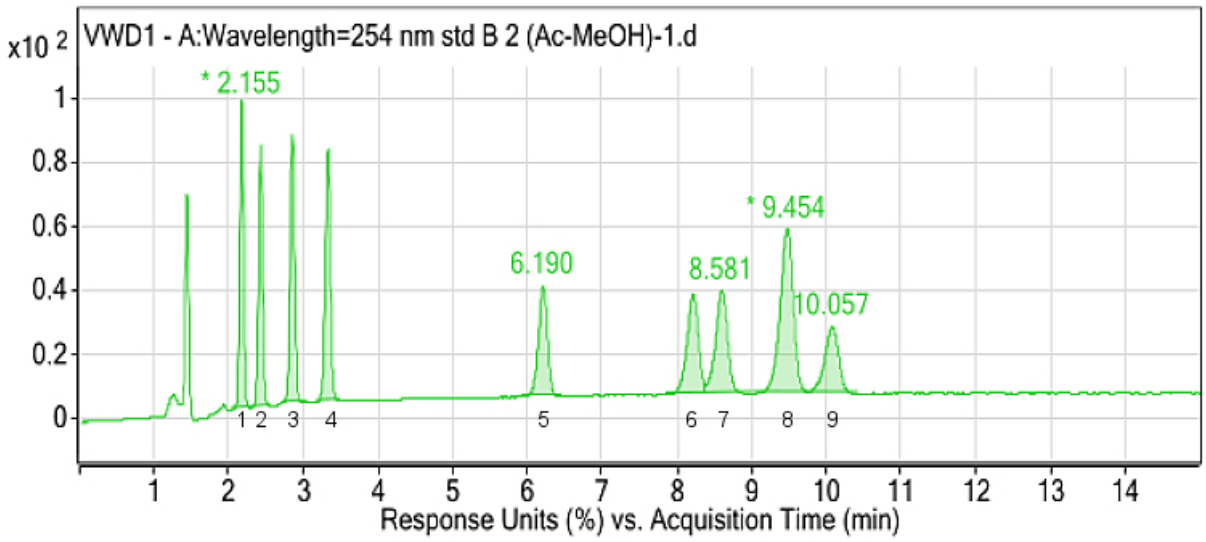
a)



b)



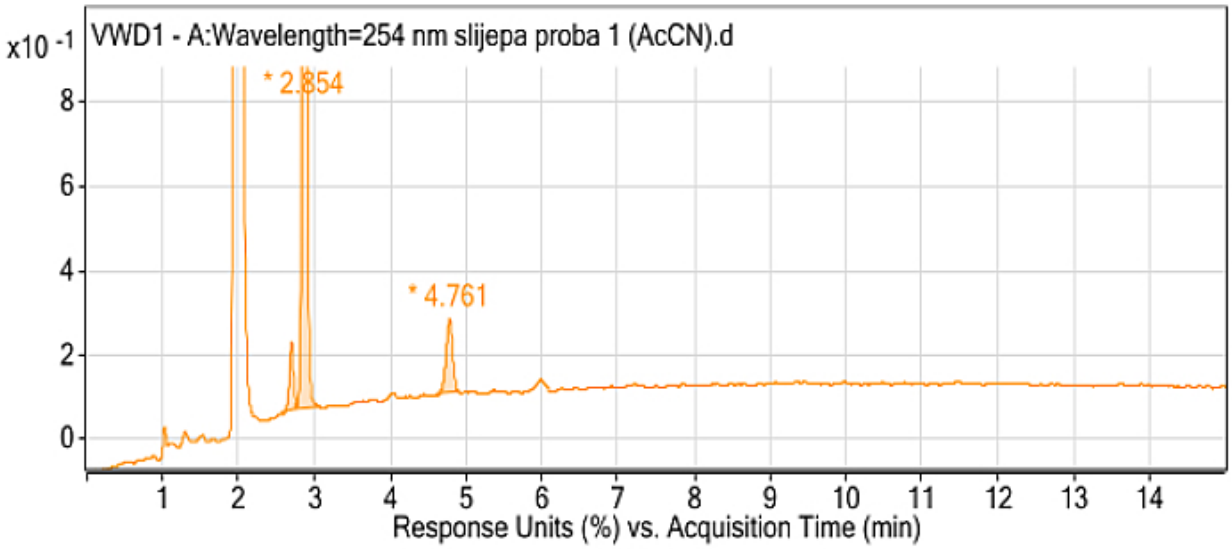
c)



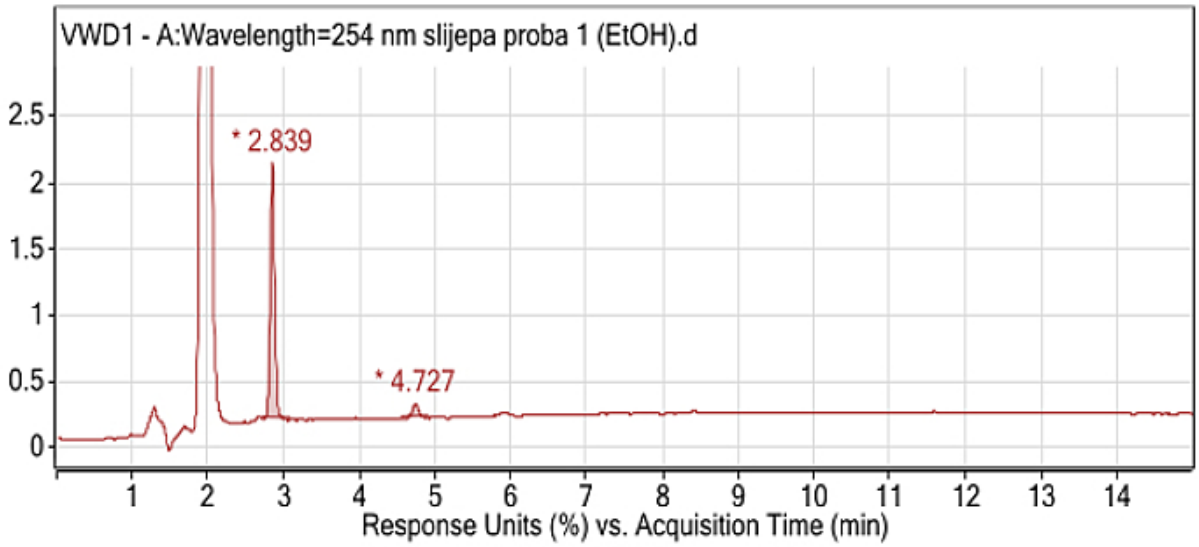
d)

Slika 6. Kromatogrami otopine standarda u a) acetonitrilu, b) etanolu, c) metanolu, d) 0,1% octenoj kiselini u metanolu (koncentracija standarda 1 mg/L). Pikovi: deksametazon (1), triamcinolon acetonid (2), hidrokortizon acetat (3), metilprednizolon (4), betametazon valerat (5), alklometazon dipropionat (6), klobetazol propionat (7), mometazon furoat (8), betametazon dipropionat (9)

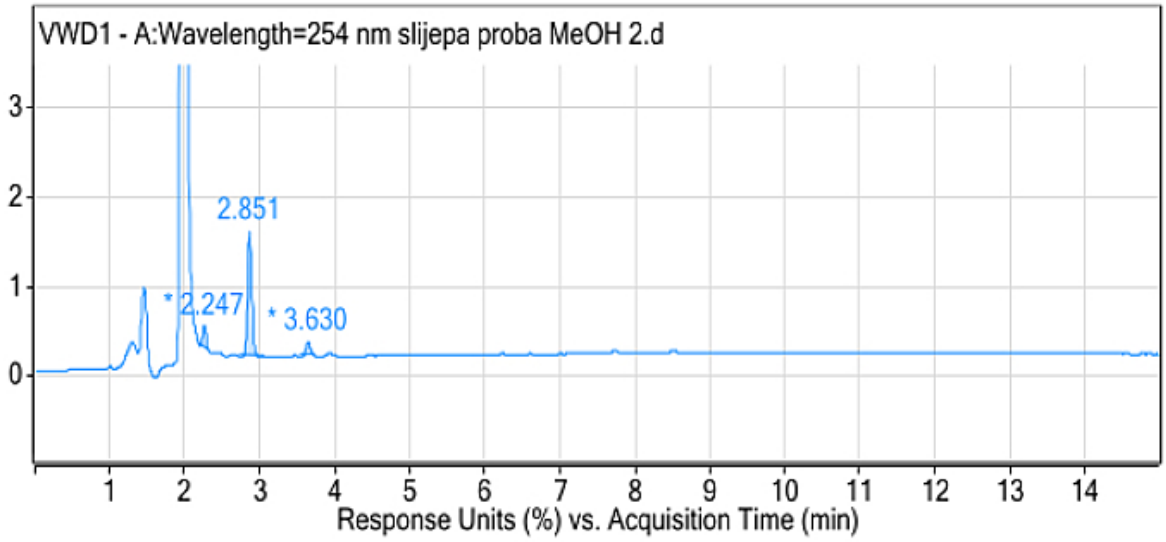
Na Slici 7 prikazani su kromatogrami slijepe probe u četiri otapala.



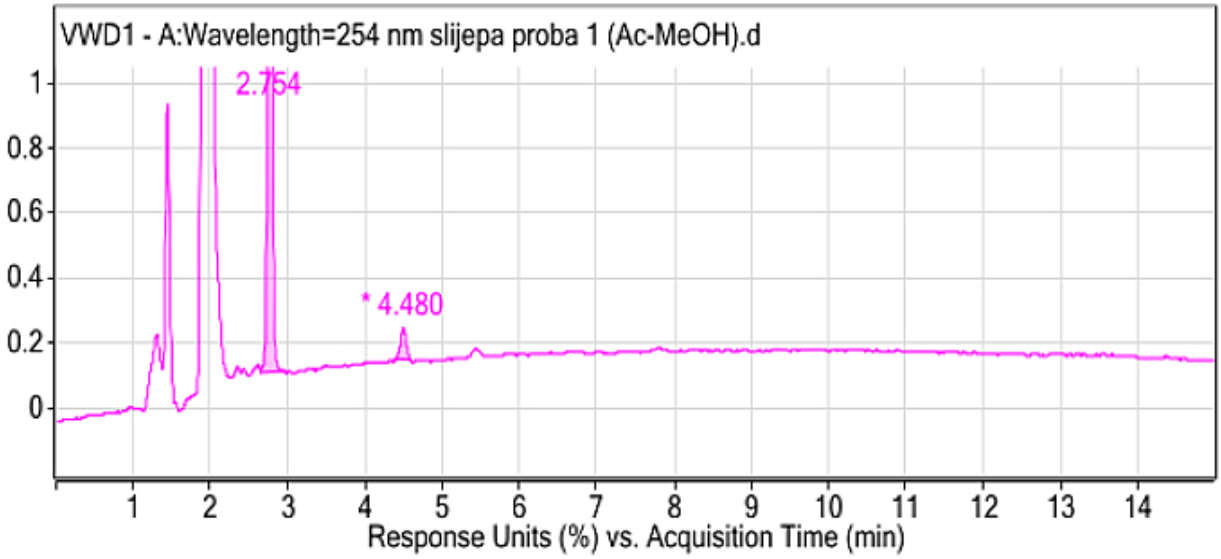
a)



b)



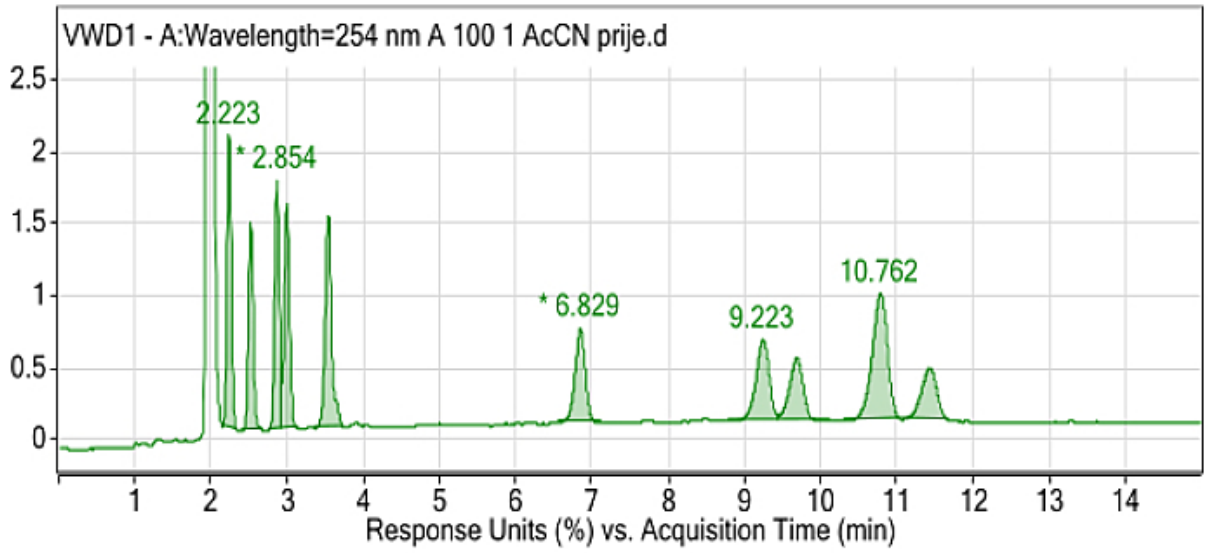
c)



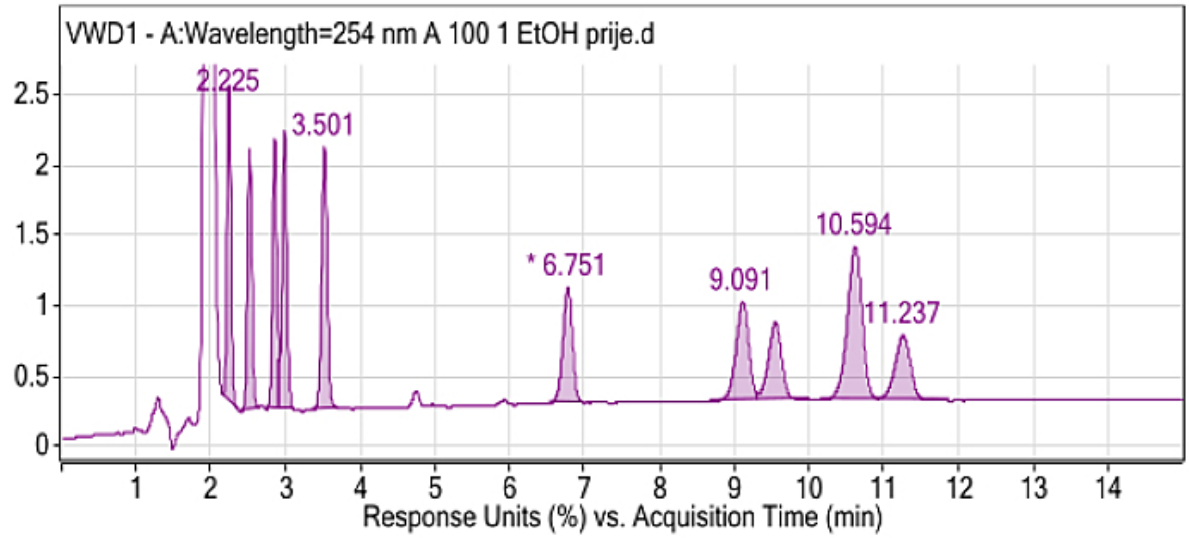
d)

Slika 7. Kromatogrami slijepe probe u a) acetonitrilu, b) etanolu, c) metanolu d) 0,1% octenoj kiselini u metanolu

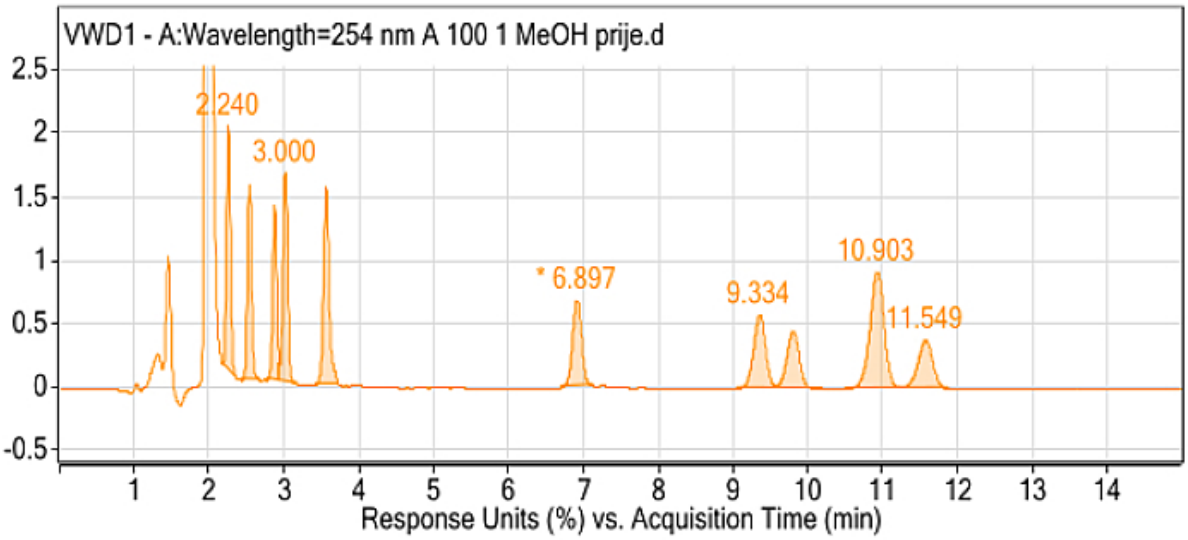
Na Slici 8 prikazani su kromatogrami otopine uzorka u četiri otapala.



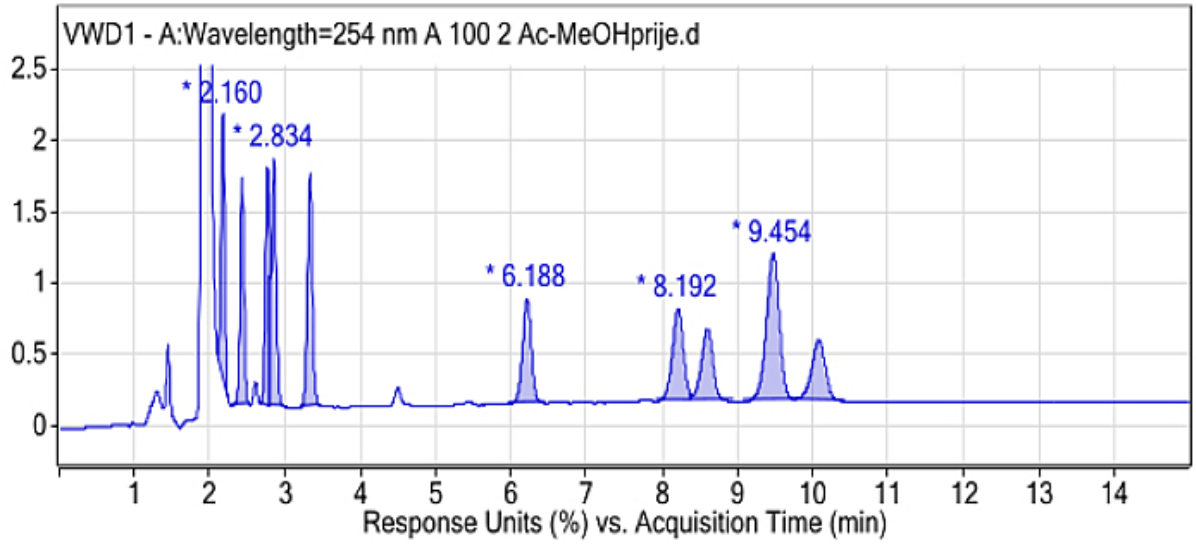
a)



b)



c)



d)

Slika 8. Kromatogrami otopine uzorka u a) acetonitrilu, b) etanolu, c) metanolu, d) 0,1% octenoj kiselini u metanolu (koncentracija standarda 1 mg/L)

Na temelju kromatografskih prikaza, vidimo da i sama slijepa proba daje odaziv detektora na sličnim retencijskim vremenima kao i neki kortikosteroidi iz otopine standarda. To moramo

uzeti u obzir pri računanju površine pikova kortikosteroida iz kromatograma otopine uzorka. Ako dođe do interferencije, odnosno ako kromatografski pikovi slijepe probe imaju odaziv detektora na istim retencijskim vremenima kao i kromatografski pikovi kortikosteroida u otopini uzorka, moramo oduzeti površinu pika slijepe probe od površine pika kortikosteroida iz otopine uzorka kako bismo iz te razlike dobili točan podatak o površini pika kortikosteroida i posljedično o njihovoj koncentraciji.

4.2.1. Rezultati analitičkog prinosa

Na temelju dobivenih rezultata HPLC analize, usporedbom površine pikova standarda u uzorku i površine standarda u otopini standarda možemo izračunati analitički prinos za svako otapalo.

Na temelju površine pika određenog koritkosteroida u otopini standarda i njegove koncentracije u toj otopini izračunamo faktora odaziva detektora (RF). Uz pomoć RF vrijednosti, iz površine pika kortikosteroida u otopini uzorka dobijemo stvarnu koncentraciju kortikosteroida u otopini uzorka. Iz omjera teorijske koncentracije kortikosteroida i eksperimentalne koncentracije kortikosteroida, dobivene na temelju kromatograma otopine uzorka, izračunamo analitički prinos za svih devet kortikosteroida u svakom od četiri otapala.

Formule za izračun analitičkog prinosa su sljedeće:

$$c_{(teorijska)} = \frac{m_{st} * w_{st} * 2 * V_{st}}{(10 * 20 * 10)}$$

$$RF = \frac{c_{(teorijska)}}{A_{st}}$$

$$c_{(eksperimentalna)} = A_{uz} * RF$$

$$AP = \frac{c_{(eksperimentalna)}}{c_{(teorijska)}} * 100$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}{(n-1)}}$$

$$RSD = \frac{100SD}{\acute{x}}$$

gdje je

$\overline{x}$ =srednja vrijednost mjerenja
x_i = pojedinačno mjerenje
n = broj mjerenja
SD = standardna devijacija
RSD = relativna standardna devijacija
AP = analitički prinos
RF= faktor odaziva detektora

mst= masa standarda

wst = maseni udio standarda

V_{st}= volumen dodane stock otopine

Auz = apsorbancija standarda u uzorku

Ast = apsorbancija pojedinog standarda

c (teorijska) = teorijska koncentracija standarda u uzorku

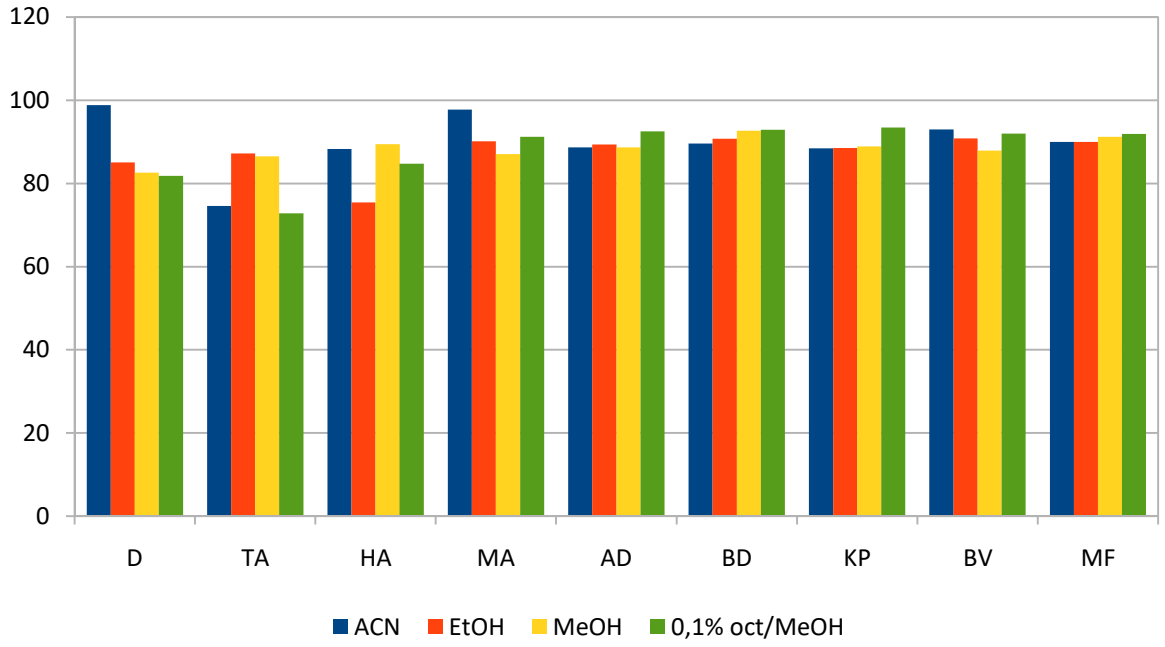
c(eksperimentalna) = eksperimentalna koncentracija standarda u uzorku

Koristeći navedene izraze dobivene su vrijednosti analitičkog prinosa i relativne standardne devijacije, prikazane u Tablici 5.

Tablica 5. Analitički prinos pojedinih kortikosteroida (AP) za otapala: acetonitiril (ACN), etanol (EtOH), metanol (MeOH) i 0,1% octenu kiselinu u metanolu (0,1% oct/MeOH). Kortikosteroidi i otapala su poredani po polarnosti (opada od deksametazona prema mometazon furoatu, raste od ACN prema 0,1% oct/MeOH)

		ACN		EtOH		MeOH		0,1% oct/MeOH	
Kortikosteroid	Koncentracija standarda u uzorku mg/L	**AP %**	RSD %	**AP %**	RSD %	**AP %**	RSD %	**AP %**	RSD %
Deksametazon	0.5	107,73	2,26	85,31	4,55	83,05	1,91	80,4	2,05
	1	96,01	2,69	84,27	3,87	79,89	9,01	81,45	2,97
	1.5	92,84	1,51	85,68	0,89	84,88	2,5	83,53	2
	Srednja vrijednost	**98,86**	7,06	**85,07**	3,23	**82,6**	5,5	**81,79**	2,7
Triamcinolon acetonid	0.5	67,28	4,33	87,93	1,51	85,79	1,12	63,66	2,82
	1	76,47	0,72	87,46	2,19	86,71	1,35	75,39	2,35
	1.5	80	0,46	86,42	0,68	86,94	1,48	79,51	1,02
	Srednja vrijednost	**74,59**	7,79	**87,23**	1,63	**86,48**	1,34	**72,85**	9,81
Hidrokortizon acetat	0.5	89,02	6,22	68,02	27,32	87,42	6,24	86,01	7,83
	1	86,84	3,15	79,08	14,98	89,85	8,3	85,11	3,49
	1.5	88,89	3,11	79,17	8,01	90,98	6,2	83,2	6,15
	Srednja vrijednost	**88,25**	4,17	**75,42**	17,46	**89,42**	6,55	**84,78**	5,71
Metilprednizolon acetat	0.5	104,63	1,96	91,56	3,16	87,51	1,93	91,5	1,3
	1	95,77	1,61	89,89	1,59	86,91	0,59	91,29	1,15
	1.5	92,76	0,63	89,05	0,46	86,89	1,9	90,9	1,01
	Srednja vrijednost	**97,72**	5,58	**90,16**	2,24	**87,09**	1,49	**91,23**	1,09
Alklometazon dipropionat	0.5	90,15	2,02	90,16	1,52	92,16	11,19	95,17	1,04
	1	87,92	0,59	89,16	1,39	86,36	1	91,51	2,07
	1.5	88,07	1,07	88,88	1,37	87,6	1,22	90,26	0,92
	Srednja vrijednost	**88,71**	1,73	**89,4**	1,39	**88,71**	6,79	**92,53**	2,47
Betametazon dipropionat	0.5	91,76	2,21	93,65	6,85	94,83	2,08	95,99	1,81
	1	87,71	5,31	89,57	2,18	92,4	1,85	91,01	5,54
	1.5	89,21	1,24	89,07	1,74	90,67	1,01	91,64	1,42
	Srednja vrijednost	**89,56**	3,61	**90,77**	4,61	**92,64**	2,48	**92,88**	3,96
Klobetazol propionat	0.5	90,49	1,12	89,56	1,72	88,89	7,03	96,05	2,36
	1	87,39	1,68	88,52	3,45	88,95	4,65	92,66	0,79
	1.5	87,37	1,33	87,35	2,06	88,91	2,29	91,64	2,03
	Srednja vrijednost	**88,42**	2,14	**88,48**	2,52	**88,92**	4,56	**93,45**	2,7
Betametazon valerat	0.5	94,35	0,73	92,15	2,51	89,34	2,71	92,95	1,47
	1	91,93	0,85	90,05	1,14	86,95	0,65	92,4	1,44
	1.5	92,65	1,77	90,25	0,99	87,4	2,38	90,51	0,94
	Srednja vrijednost	**92,98**	1,58	**90,82**	1,89	**87,89**	2,28	**91,95**	1,68
Mometazon furoat	0.5	92,55	1,03	91,17	2,14	92,95	0,98	93,05	2,03
	1	88,29	1,99	89,43	1	90,64	0,56	91,69	2,31
	1.5	89,04	1,14	89,24	1,28	90,14	0,48	90,96	1,21
	Srednja vrijednost	**89,96**	2,52	**89,95**	1,74	**91,24**	1,54	**91,9**	1,99

Grafički prikaz dobivenih vrijednosti analitičkog prinosa prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Grafički prikaz analitičkog prinosa pojedinih koritikosteroida: deksametazon (D), triamcinolon acetonid (TA), hidrokortizon acetat (HA), metilprednizolon acetat (MA), alklometazon dipropionat (AD), betametazon dipropionat (BD), klobetazol propionat (KP), betametazon valerat (BV), mometazon furoat (MF),za četiri otapala- acetonitril (ACN), etanol (EtOH), metanol (MeOH) i 0,1% octena kiselina u metanolu (0,1% oct/MeOH). Kortikosteroidi i otapala su poredani po polarnosti (opada od deksametazona prema mometazon furoatu, raste od ACN prema 0,1% oct/MeOH)

Na temelju dobivenih rezultata vidimo da je acetonitril najprikladniji za ekstrakciju deksametazona, metilprednizolon acetata i betametazon valerata. Etanol je najbolje ekstrakcijsko sredstvo samo za triamcinolon acetonid, a metanol za hidrokortizon acetat. 0,1% octena kiselina u metanolu daje najbolje ekstrakcijske uvjete za alklometazon dipropionat, betametazon dipropionat, klobetazol propionat i mometazon furoat.

Uspoređujući dobivene rezultate, vidimo da ne postoji jedno otapalo s kojim bi postigli najbolje ekstrakcijske uvjete za svih devet ispitivanih kortikosteroida.

Primjećujemo da analitički prinos kortikosteroida u određenom otapalu nije posljedica samo odnosa polarnosti kortikosteroid-otapalo, odnosno najpolarniji kortikosteroid nema najbolji analitički prinos u najpolarnijem otapalu i obrnuto. To vidimo na primjeru deksametazona

koji je najpolarniji kortikosteroid od ispitivanih, a najbolji analitički prinos ima u acetonitrilu koje je najmanje polarno otapalo od korištenih. Također, mometazon furoat koji je najmanje polaran kortikosteroid od ispitivanih nema najbolji analitički prinos u najmanje polarnom otapalu, već u najpolarnijem- 0,1% octenoj kiselini u metanolu. Općenito, primjećujemo kako manje polarni kortikosteroidi (alklometazon dipropionat, betametazon dipropionat, klobetazol propionat, betametazon valerat i mometazon furoat) imaju veoma dobre analitičke prinose u 0,1% octenoj kiselini u metanolu koja je najpolarnije otapalo od korištenih. Takvi rezultati upućuju na to da dodatak octene kiseline mijenja vrstu komponente koja se ekstrahira, komponenta se ionizira te se na taj način povećava i uspješnost ekstrakcijskog postupka u polarnom otapalu.

5. ZAKLJUČCI

Četiri različita ekstrakcijska otapala su korištena za određivanje devet kortikosteroida: alklometazon dipropionat, betametazon valerat, deksametazon, hidrokortizon acetat, klobetazol propionat, metilprednizolon acetat, klobetazol propionat, metilprednizolon acetat, mometazon furoat i triamcinolon acetonid. U tu svrhu, u HALMED-u je ranije razvijana i validirana analitička kromatografska metoda za određivanje devet kortikosteroida.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti kakva je ekstrakcija standarda iz uzorka kreme pomoću primijenjena četiri različita otapala:

- deksametazon ima najbolji analitički prinos u acetonitirilu (98,86%)
- triamcinolon acetonid ima dobar analitički prinos u etanolu i metanolu (87,23% i 86,48%)
- hidrokortizon acetat ima dobar analitički prinos u acetonitirilu i metanolu (88,25% i 89,42%)
- metilprednizolon acetat ima najbolji analitički prinos u acetonitrilu (97,72%), ali i u etanolu i 0,1% octenoj kiselini u metanolu (90,16% i 91,23%)
- alklometazon dipropionat ima najbolji analitički prinos u 0,1% octenoj kiselini u metanolu (92,53%)
- betametazon dipropionat ima dobre analitičke prinose u metanolu i 0,1% octenoj kiselini u metanolu (92,64% i 92,88%)
- klobetazol propionat ima najbolji analitički prinos u 0,1% octenoj kiselini u metanolu (93,45%)
- betametazon valerat ima dobre analitičke prinose u acetonitrilu i 0,1% octenoj kiselini u metanolu (92,98% i 91,95%)
- mometazon furoat ima podjednako dobre analitičke prinose u sva četiri otapala, ali najbolje u metanolu i 0,1% octenoj kiselini u metanolu (91,24% i 91,9%)

Kada bismo htjeli s jednim otapalom ekstrahirati što više kortikosteroida iz jednog uzorka:

- acetonitril je najbolji za ekstrakciju deksametazona, metilprednizolon acetata i betametazon valerata
- etanol je najbolje ekstrakcijsko sredstvo samo za triamcinolon acetonid
- metanol je dobro ekstrakcijsko sredstvo za hidrokortizon acetat, betametazon

dipropionat i mometazon furoat

- 0,1% octena kiselina u metanolu je dobro ekstrakcijsko sredstvo za alklometazon dipropionat, betametazon dipropionat, klobetazol propionat i mometazon furoat

6. LITERATURA

1. Ahluwalia A. Topical glucocorticoids and the skin-mechanisms of action: an update. *Mediators Inflamm*, 1998, 7(3), 183-193.
2. Ahuja S, Scypinski S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. San Diego, Academic press, 2001, str. 349.- 366.
3. Barclay L. Use of Topical Corticosteroids for Dermatologic Conditions Reviewed. *Am Fam Physician*, 2009, 79, 135-140.
4. Boyaci E, Rodriguez-Lafuente A, Gorynski K, Mirnaghi F, Souza-Silva EA, Hein D, Pawliszyn J. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases, *Anal Chim Acta,* 2015, 873, 14-30.
5. DIRECTIVE 2011/62/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 8 June 2011 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use, as regards the prevention of the entry into the legal supply chain of falsified medicinal products, 2011., https://es.europa.eu, pristupljeno 15. 8. 2017.
6. Gaudiano MC, Lucete D, Antoniella E, Bertocchi P, Muleri N, Manna N, Bartolomei M, Alimonti S, Valvo L, Rodomonte AL. "For export only" medicines come back to Europe: A RP-LC method for the screening of six glucocorticoids in illegal and counterfeit anti-inflammatory and lightening creams. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53, 158-164.
7. Giaccone V, Polizzotto G, Macaluso A, Cammilleri G, Ferrantelli V. Determination of Ten Corticosteroids in Illegal Cosmetic Products by a Simple, Rapid, and High-Performance LC-MS/MS Method. *Int J Anal Chem*, 2017, 2017, 1-12.
8. Guyton AC. Hormoni kore nadbubrežne žlijezde. U: Fiziologija čovjeka i mehanizmi bolesti. Andreis A, Andreis I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 1995, str. 545-553.
9. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 1047, 1060.
10. Kragballe K. Topical corticosteroids: mechanisms of action. *Acta Derm Venereol Suppl*, 1989, 151, 7-10.
11. Krivotvoreni lijekovi, htttp://www.halmed.hr, pristupljeno 15. 8. 2017.
12. Lipophilicity, http://www.cambridgemedchemconsulting.com, pristupljeno 15. 8.

2017.

13. Makin HLJ, Gower DB. General Methods for the Extraction, Purification, and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry. U: Steroid analysis. Makin HLJ, Honour JW, Shackleton CHL, Griffiths WJ, urednici, London, Springer, 1995, str 163-282.
14. Nam Y, Kwon IK, Lee KB. Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea. *Forensic Sci Int*, 2011, 210, 144-148.
15. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - praktikum. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2014. str. 128.-133.
16. Orsi D, Pellegrini M, Pichini S, Mattioli D, Marchei E, Gagliardi L. High-performance liquid chromatography–diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of non-allowed substances in cosmetic products for preventing hair loss and other hormone-dependent skin diseases. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48, 641-648.
17. PubChem, http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, pristupljeno 15. 8. 2017.
18. Sample preparation fundamentals for chromatography, 2013., http://www.agilent.com, pristupljeno 15. 8. 2017.
19. Substandard, spurious, falsely labelled, falsified and counterfeit (SSFFC) medical products, 2016., http://www.who.int, pristupljeno 14. 8. 2017.
20. Virtual Computational Chemistry Laboratory, 2016., http://www.vcclab.org, pristupljeno 15. 8. 2017.
21. Watson DG. Pharmaceutical analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 239.-163.
22. WHO Model Prescribing Information: Drugs used in Skin Diseases. Geneva, World Health Organisation, 1997, str 117-118.
23. Zakon o lijekovima, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 76, NN 76/2013

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Danas se sve više koriste prirodni proizvodi kao alternativa tradicionalno korištenim medicinskim preparatima uz pogrešnu pretpostavku da zato što su prirodni su i sigurni. Mnogi takozvani prirodni proizvodi mogu biti krivotvorine u koje su dodane aktivne farmaceutske supstance. Cilj našeg istraživanja je pronaći najprikladnije ekstrakcijsko otapalo koje daje najbolji analitički prinos za dodane sintetske koritkosteroide u topičke pripravke prije određivanja sadržaja kromatografskom metodom.

Četiri različita ekstrakcijska otapala su korištena za određivanje devet odabranih kortikosteroida. U tu svrhu, u HALMED-u je ranije razvijana i validirana analitička kromatografska metoda za određivanje devet kortikosteroida. Rezultati pokazuju da je 0,1% *V/V* octena kiselina u metanolu najprikladnija ekstrakcijska otopina za četiri komponente: alklometazon dipropionat, klobetazol propionat, mometazon furoat i betametazon dipropionat. Metanol je dao najbolji analitički prinos za betametazon dipropionat, mometazon furoat i hidrokortizon acetat. Acetonitril je najbolje ekstrakcijsko sredstvo za metilprednizolon acetat, betametazon valerat i deksametazon, dok je etanol najprikladniji samo za triamcinolon acetonid. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da ako bi se odjednom htjelo ekstrahirati što više kortikosteroida analiziranih u ovom radu, najbolji ekstrakcijski uvjeti bi bili postignuti korištenjem acetonitrila kao ekstrakcijskog sredstva. Iza acetonitrila, drugi izbor za ekstrakciju više od pola spomenutih kortikosteroida bio bi metanol ili 0,1% *V/V* octena kiselina u metanolu. Rezultati upućuju na to da dodatak octene kiseline mijenja vrstu komponente koja se ekstrahira te s time i efikasnost ekstrakcijskog postupka..

7.2. Summary

Natural herbal products are being used more and more today instead of traditional pharmaceutical products. Unfortunately many so-called natural products can be counterfeit by the addition of the active pharmaceutical ingredient. The aim of the study was to find the most appropriate extraction solution for the best recovery of added synthetic corticosteroids in topical preparations before assay determination by chromatographic method.

Four different extraction solutions were used and nine corticosteroids were determined. For that purpose a validated analytical chromatographic method was used, previously developed and validated for assay determination of above mentioned compounds.

Results show that 0.1 % *V/V* acetic acid in methanol is the most appropriate extraction solution for 4 compounds namely, alclometazon dipropionate, clobetason propionate, mometason fuorate and bethametazon dipropionate. Methanol gave the best recovery for bethametazon dipropionate, mometason fuorate and hydrocortison acetate. Acetonitrile was the best choice for methylprednisolon acetate, bethametazon valerate and dexamethason., while ethanol was the best extraction solution for only triamcinolon acetinide. It can be seen from all of the obtained results that the best extraction conditions, if one would like to extract most of the above mentioned corticosteroids, would be accomplished by using acetonitrile as the extraction solution. Following acetonitrile, second choice for good extraction of more than half of mentioned corticosteroids would be both methanol or 0,1 % *V/V* acetic acid in methanol. The results suggest that addition of acetic acid changes the type of compounds that are extracted and the efficiency of the extraction procedure.

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

Utjecaj ekstrakcijskog otapala na određivanje odabranih kortikosteroida u prirodnim dermatološkim proizvodima

Martina Matičević

SAŽETAK

Danas se sve više koriste prirodni proizvodi kao alternativa tradicionalno korištenim medicinskim preparatima uz pogrešnu pretpostavku da zato što su prirodni su i sigurni. Mnogi takozvani prirodni proizvodi mogu biti krivotvorine u koje su dodane aktivne farmaceutske supstance. Cilj našeg istraživanja je pronaći najprikladnije ekstrakcijsko otapalo koje daje najbolji analitički prinos za dodane sintetske koritkosteroide u topičke pripravke prije određivanja sadržaja kromatografskom metodom.

Četiri različita ekstrakcijska otapala su korištena za određivanje devet odabranih kortikosteroida. U tu svrhu, u HALMED-u je ranije razvijana i validirana analitička kromatografska metoda za određivanje devet kortikosteroida. Rezultati pokazuju da je 0,1% *V/V* octena kiselina u metanolu najprikladnija ekstrakcijska otopina za četiri komponente: alklometazon dipropionat, klobetazol propionat, mometazon furoat i betametazon dipropionat. Metanol je dao najbolji analitički prinos za betametazon dipropionat, mometazon furoat i hidrokortizon acetat. Acetonitril je najbolje ekstrakcijsko sredstvo za metilprednizolon acetat, betametazon valerat i deksametazon, dok je etanol najprikladniji samo za triamcinolon acetonid. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da ako bi se odjednom htjelo ekstrahirati što više kortikosteroida analiziranih u ovom radu, najbolji ekstrakcijski uvjeti bi bili postignuti korištenjem acetonitrila kao ekstrakcijskog sredstva. Iza acetonitrila, drugi izbor za ekstrakciju više od pola spomenutih kortikosteroida bio bi metanol ili 0,1% *V/V* octena kiselina u metanolu. Rezultati upućuju na to da dodatak octene kiseline mijenja vrstu komponente koja se ekstrahira te s time i efikasnost ekstrakcijskog postupka.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 9 grafičkih prikaza, 5 tablica i 23 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kortikosteroidi, otapalo, ekstrakcija, dermatološki proizvodi

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Mr. sc. Snježana Zubčić, *viša stručna savjetnica – specijalistica u OMCL-u HALMED*

Dr. sc. Ana-Mornar Turk, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Influence of extraction solvent in determination of selected corticosteroids in herbal dermatological products

Martina Matičević

SUMMARY

Natural herbal products are being used more and more today instead of traditional pharmaceutical products. Unfortunately many so-called natural products can be counterfeit by the addition of the active pharmaceutical ingredient. The aim of the study was to find the most appropriate extraction solution for the best recovery of added synthetic corticosteroids in topical preparations before assay determination by chromatographic method.

Four different extraction solutions were used and nine corticosteroids were determined. For that purpose a validated analytical chromatographic method was used, previously developed and validated for assay determination of above mentioned compounds.

Results show that 0.1 % *V/V* acetic acid in methanol is the most appropriate extraction solution for 4 compounds namely, alclometazon dipropionate, clobetason propionate, mometason fuorate and bethametazon dipropionate. Methanol gave the best recovery for bethametazon dipropionate, mometason fuorate and hydrocortison acetate. Acetonitrile was the best choice for methylprednisolon acetate, bethametazon valerate and dexamethason., while ethanol was the best extraction solution for only triamcinolon acetinide. It can be seen from all of the obtained results that the best extraction conditions, if one would like to extract most of the above mentioned corticosteroids, would be accomplished by using acetonitrile as the extraction solution. Following acetonitrile, second choice for good extraction of more than half of mentioned corticosteroids would be both methanol or 0,1 % *V/V* acetic acid in methanol. The results suggest that addition of acetic acid changes the type of compounds that are extracted and the efficiency of the extraction procedure.

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

Thesis includes: 40 pages, 9 figures, 5 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: corticosteroids, solvents, extraction, dermatological products

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

Reviewers: **Miranda Sertić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Snježana Zubčić, **M.Sc.** *Senior advisor-Specialist in OMCL,* HALMED
Ana Mornar-Turk, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2017.