

Razvoj i validacija HSS-GC-FID metode za određivanje sadržaja lakohlapljivih sastavnica sirupa za iskašljavanje za djecu

ANA MORNAR¹, MIRANDA SERTIĆ¹, BILJANA NIGOVIĆ¹, BILJANA LEPAN¹,
MARIJANA ZOVKO KONČIĆ²

¹Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

²Zavod za farmakognoziiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Development and validation of an HSS-GC-FID method for determining volatile compounds in children's cough syrup

A b s t r a c t – A cough syrup is a medicinal product used in an attempt to treat coughing and related conditions. Traditional herbs are used for preparation of cough syrup. There are two main categories of herbs that are used in preparation of cough remedies: expectorants and antitussives. For productive coughs, treatment with expectorants may be attempted to loosen mucus from the respiratory tract. For dry coughs anti-tussives are used to suppress the body's urge to cough.

Herbal medicinal products may contain significant levels of ethanol arising from its use as an extraction solvent in liquid extracts and tinctures. Although the use of ethanol is necessary for extraction of pharmacologically active compounds, it was found that some herbal medicinal products contain large amounts (up to 60 %) of ethanol with even less clinical need or benefit. In young children ingestion of even modest amounts of ethanol may lead to permanent neurological damage as result of hypoglycemia. Therefore, special attention should be given to the ethanol content of herbal medicinal products for pediatric use. At the moment the safety evaluation of the ethanol content of herbal medicinal products for pediatric use is not harmonized between different European Union Member States. Moreover, the lack of guidelines relating to safe limits of ethanol as part of herbal medicinal products for pediatric use has also led to different national labeling practices.

Therefore, the aim of our work was to develop and validate a new HSS-GC-FID method for quantification of ethanol and its main impurity, methanol, present in children's cough syrup.

(Department of Analytics and Control of medicines, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb)

UVOD

Kašalj je refleksni odgovor na lokalnu iritaciju sluznice dišnih organa i simptom mnogih bolesti dišnog sustava. Zbog učestalosti kašlja biljni preparati namijenjeni njegovom ublažavanju ili/i olakšavanju spadaju među najčešće upotrebljavane biljne pripravke. Tipični preparati protiv kašlja su sirupi s iscrpinama ljekovitih droga (1,2). Većina droga u sirupima za kašalj nemaju ograničenja za primjenu u djece. Izuzetak su preparati s podbijelom (*Tusilago farfara*) koji se zbog prisutnosti potencijalno toksičnih pirolizidinskih alkaloida ne preporučuju djeci, a sve manje ih koriste i odrasli (1,3).

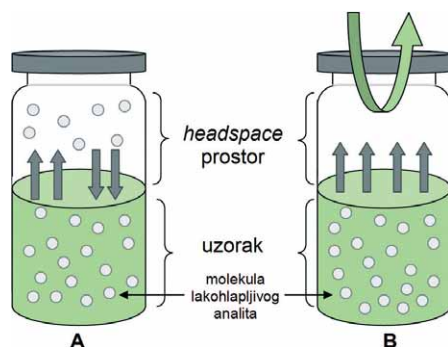
Biljni sastojci u sirupima za kašalj prema djelovanju se mogu podijeliti u tri glavne skupine. U prvu skupinu spadaju droge sa sluzima. Te droge se koriste pri akutnim upalama dišnih organa jer sluzi oblažu nadraženu sluznicu i tako ublažavaju simptome upale. Tipična droga iz te skupine je korijen bijelog sljeza (*Althaeae radix*). U skupinu droga sa sluzima spadaju i islandski lišaj (*Lichen islandicus*), koji uz sluzi sadržava i gorke tvari, te zelen (uskolisnog) trpuca (*Plantaginis lanceolatae herba*) (1,4). Drugu skupinu droga u sirupima za kašalj čine biljni ekspektoransi. Oni razrijeđuju sputum i smanjuju njegovu viskoznost. Do tog učinka dolazi zbog stimulacije bronhijalnih žlijezda, ali i zbog povećanog unosa tekućine, primjerice u vidu biljnog čaja. Smanjenjem viskoznosti sputuma cilijarni transport postaje učinkovitiji, a iskašljavanje olakšano (3). U biljne ekspektoranse u prvom redu spadaju droge sa saponinima poput korijena jaglaca (*Primulae radix*) i lista bršljana (*Hederae folium*) te neke droge s eteričnim uljem (1,3). Saponinske droge se koriste kod subakutnog kašlja, a glavnu primjenu nalaze kod kroničnog bronhitisa. No treba napomenuti da i u kroničnom bronhitisu ima stadija s povećanom nadraženošću sluznica kod kojih se preporuča primjena droga sa sluzima. Treću skupinu čine spazmolitici, a njihov glavni predstavnik je zelen timijana (*Thymi herba*) i njegovo eterično ulje (*Thymi aetheroleum*). Prednost preparata s timijanom je njihovo višestruko djelovanje. Tako uz spazmolitičko pokazuju i sekretolitičko, sekretomotoričko te blago dezinficirajuće djelovanje. Sastavnice eteričnog ulja timijana se eliminiraju putem pluća i na taj način dolaze na mjesto djelovanja. Preparati s timijanom se mogu koristiti i kod kroničnih i akutnih napadaja kašlja, a primjenjuju se i u terapiji hripavca. Spazmolitičko djelovanje pokazuje i list bršljana (1,4). Osim (fito)terapijskim mjerama simptomi kašlja mogu se olakšati i fizikalnim mjerama poput ovlaživanja zraka, povećanim unosom tekućine te inhalacijama i kupeljima (3).

Budući da se etanol učestalo koristi kao ekstrakcijsko otapalo u pripremi biljnih ekstrakata i tinktura može ga se naći u brojnim tekućim biljnim preparatima (5). Premda se danas njegova upotreba sve više pokušava smanjiti ili u potpunosti izbjeći,

etanol je nezamjenjivo ekstrakcijsko otapalo za većinu biološki aktivnih tvari. Ipak, često se zaboravlja da njegova koncentracija u pojedinim preparatima prelazi čak i 60 % (6). Poznato je da se koncentracija etanola u plazmi može direktno povezati s njegovim depresivnim utjecajem na centralni živčani sustav. Učestala konzumacija etanola često dovodi do veće tolerancije odnosno lakšeg podnošenja većih doza alkohola, no pojedina stanja, poput oštećenja jetre, mogu uzrokovati sporiju eliminaciju etanola zbog smanjene aktivnosti jetrene alkohol dehidrogenaze, enzima odgovornog za eliminaciju etanola iz sistemske cirkulacije (7–9). Aktivnost jetrene alkohol dehidrogenaze značajno je smanjena i u djece, stoga posebnu pažnju treba obratiti kod primjene biljnih ekstrakata i tinktura za pedijatrijsku upotrebu (6). Sasvim male koncentracije etanola u plazmi mogu dovesti do ozbiljne intoksikacije u djece. Posebno treba istaknuti da kod gastrointestinalnih i respiratornih infekcija često dolazi do smanjenog unosa hrane, pa tada i male doze etanola mogu uzrokovati trajna neurološka oštećenja te čak i hipoglikemiju. Uz biljne ekstrakte i tinkture koje se koriste za liječenje akutnih oboljenja poput kašlja, poseban oprez potreban je kod preparata koji se svakodnevno koriste primjerice za jačanje imuniteta ili pri alergijama. Ne smije se zaboraviti da se često uzima i nekoliko preparata istodobno čime se povećava količina unesenog etanola. Nažalost trenutačno članice Europske unije nemaju usklađenu regulativu s obzirom na sadržaj etanola u biljnim preparatima. Štoviše, često na biljnim preparatima koji se koriste i za pedijatrijsku populaciju nema naznačene koncentracije etanola u konačnom proizvodu. Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) ističe da bi upotrebu biljnih preparata koji sadrže etanol trebalo izbjegavati u novorođenčadi i djece mlađe od dvije godine. Bez obzira da li se preparat koristi samo za liječenje djece ili odraslih, točan sadržaj etanola u konačnom produktu mora biti jasno naznačen na deklaraciji proizvoda. Nadalje, EMA naglašava da istodobnu upotrebu dva ili više biljnih preparata koji sadrže etanol treba izbjegavati (10). Konačno, ne smije se zaboraviti da etanol utječe na farmakološku aktivnost lijekova poput paracetamola, eritromicina i antihistaminika. Nadalje, simptomi »antabusne reakcije« poput crvenila lica, mučnine, povraćanja, profuznog znojenja, glavobolje, dezorijentacije te bolova u prsima mogu nastati istodobnom primjenom etanola i nekih lijekova poput cefalosporinskih antibiotika, sulfonamida, metronidazola i nitrofurantoina (11).

Europska farmakopeja kao onečišćenja u etanolu navodi hlapljive tvari poput metanola, acetona, aldehida, cikloheksana, propanola, butanola, benzena itd. (12). Metanol je, ipak, najčešće prisutno onečišćenje s obzirom da etanol i metanol imaju bliske točke vrelišta te ih je teško odvojiti. Metanol sam nije jako toksičan, ali se metabolizira u toksične metabolite formaldehid i mravlju kiselinu (13). Uzimanje 10 mL čistog metanola može uzrokovati mučninu, povraćanje, depresiju središnjeg živčanog sustava i trajnu sljepoću, dok uzimanje svega 30 mL može uzrokovati smrt (14). Stoga je potrebno provjeravati udio metanola kako u etanolu, kao ekstrakcijskom sredstvu, tako i u gotovim biljnim proizvodima koji sadrže etanol (15–17).

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je tehnika odjeljivanja koja je našla svoju primjenu u analizi lakohlapljivih analita prisutnih u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima, dodacima prehrani, biološkim uzorcima, prehrambenim proizvodima, naftnim derivatima te okolišu. Međutim, navedeni uzorci često sadrže veliki broj sastavnica, lakohlapljivih i teškohlapljivih. S obzirom da se slabohlapljivi analiti teško ispiru s kolone, a mogu se i zadržati unutar GC sustava i ometati rad uređaja, poželjno je prije kromatografske analize odvojiti lakohlapljive sastavnice od teškohlapljivih. *Headspace* uzorkovanje (engl. *Headspace Sampling*, HSS) omogućava brzu i jednostavnu ekstrakciju lakohlapljivih organskih spojeva iz složenih krutih i tekućih uzoraka. *Headspace* označava prostor u kojem se analit nalazi u plinovitoj fazi iznad uzorka u bočici za uzorkovanje. Dakle, *headspace* uzorkovanje se provodi na način da se uzorak unosi u prikladnu bočicu za uzorkovanje te zagrijava pri čemu lakohlapljivi analiti prelaze u plinovito stanje, odnosno ekstrahiraju se iz uzorka i ukoncentriraju u *headspace* prostoru. Konačno, zadani volumen plina iz *headspace* prostora dostavlja se plinskom kromatografu te se provodi analiza samo ekstrahiranih lakohlapljivih sastavnica uzorka. Kad se govori o *headspace* tehnici uzorkovanja potrebno je naglasiti da li se radi o statičkoj ili dinamičkoj tehnici uzorkovanja (slika 1.). Kod statičke *headspace* tehnike lakohlapljivi analiti se tijekom pripreme uzorka ukoncentriraju u zatvorenom prostoru iznad samog uzorka te se nakon postizanja stanja ravnoteže zadani dio plinovite faze prenosi u plinski kromatograf. Nasuprot tome, kod dinamičke *headspace* tehnike određeni dio plinovite faze se neprekidno tijekom pripreme uzorka izvlači iz bočice i skuplja u adsorpcijskoj zamci. Nakon što se dovoljna količina analita adsorbira u zamci, zagrijava se da bi došlo do desorpcije uhvaćenog analita te njegovog unošenja u plinski kromatograf. U ovom radu korištena je statička *headspace* tehnika uzorkovanja, stoga će se poseban osvrt dati upravo na tu tehniku uzorkovanja.



Slika 1. Prikaz statičkog (A) i dinamičkog (B) uzorkovanja *headspace* tehnikom

Afinitet analita za prelazak iz krutog ili tekućeg uzorka u *headspace* prostor opisuje se koeficijentom razdjeljenja (K):

$$K = \frac{c_s}{c_g} \quad (1)$$

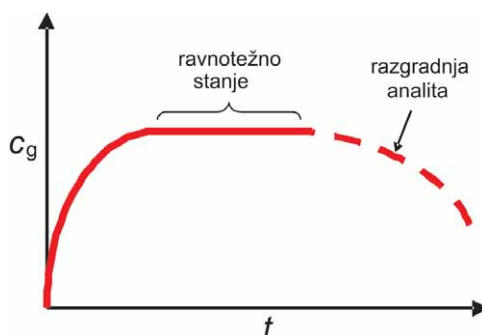
gdje je c_s koncentracija analita u uzorku, a c_g koncentracija analita u plinovitoj fazi. Dakle, analiti koji imaju mali koeficijent razdjeljenja lakše prelaze u headspace prostor i stoga imaju niže granice dokazivanja (engl. *Limit Of Detection*, LOD) i određivanja (engl. *Limit Of Quantification*, LOQ), tj. postiže se bolja osjetljivost metode. Nadalje, uz koeficijent razdjeljenja i omjer faza (β) utječe na koncentraciju analita u *headspace* prostoru:

$$\beta = \frac{V_G}{V_S} \quad (2)$$

gdje je V_G volumen plinovite faze, a V_S volumen uzorka. Iz gornjeg izraza moguće je zaključiti kako se povećanjem volumena uzorka dobiva niža vrijednost β , odnosno veća koncentracija analita u *headspace* prostoru. Uz koeficijent razdjeljenja i volumen uzorka, osjetljivost HSS metode uzorkovanja ovisi i o temperaturi, vremenu zagrijavanja te sastavu uzorka iz kojeg se analit ekstrahira. Kako bi se poboljšala osjetljivost metode, koeficijent razdjeljenja (K) je moguće smanjiti povećanjem temperature (T) uzorkovanja:

$$\frac{dK}{dT} = \frac{1}{T^2} \quad (3)$$

Koncentracija analita u *headspace* prostoru povećava se produženjem vremena zagrijavanja uzorka sve dok se ne postigne ravnotežno stanje. Kod pojedinih analita moguće je očekivati i njihovo raspadanje nakon određenog vremena zagrijavanja (slika 2.). Da bi se postigla dobra osjetljivost metode kao i ponovljivost pripreme uzorka, poželjno je prijenos uzorka u plinski kromatograf provoditi tek nakon što je postignuto ravnotežno stanje. Kao što je već navedeno, sastav uzorka iz kojeg se analit ekstrahira može značajno utjecati na osjetljivost metode. Naime, bolju osjetljivost metode moguće je postići smanjenjem topljivosti analita ukoliko se radi o tekućem uzorku. Na taj način povećava se afinitet analita za prelazak u *headspace* prostor.



Slika 2. Graf ovisnosti koncentracije analita u *headspace* prostoru (c_g) o vremenu zagrijavanja uzorka (t)

Primjerice, dodatak anorganskih soli poput amonijeva klorida i natrijeva klorida smanjuje topljivost organskih spojeva u vodenim uzorcima. Nadalje, kod nevedenih uzoraka topljivost većine organskih molekula moguće je smanjiti dodatkom vode u uzorak. Ako analit ima ionizirajuće funkcionalne skupine, topljivost u uzorku moguće mu je smanjiti promjenom pH. Uz već navedene načine poboljšanja osjetljivosti HSS-GC metode na kraju je potrebno spomenuti i derivatizaciju analita kojom se analit prevodi u hlapljiviji produkt (18,19).

Zbog iznimne toksičnosti etanola i metanola, posebice u djece, cilj ovog rada bio je predložiti novu HSS-GC-FID metodu za određivanje njihova sadržaja u sirupu za iskašljavanje za djecu.

Metode

Priprema standardnih otopina i uzorka

Standardne otopine etanola i metanola (1%, v/v) pripremljene su razrjeđivanjem etanola i metanola čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka) s vodom pročišćenom Milipore sustavom (Milipore, Bedford, MA, SAD).

Radne otopine za izradu baždarnog pravca pripremljene su razrjeđivanjem s pročišćenom vodom te su koncentracije radnih otopina etanola iznosile 0,003 % (v/v), 0,01 % (v/v), 0,05 % (v/v), 0,1 % (v/v) i 0,2 % (v/v), dok su koncentracije radnih otopina metanola iznosile 0,0003 % (v/v), 0,001 % (v/v), 0,01 % (v/v), 0,1 % (v/v) i 0,2 % (v/v).

Kao unutarnji standard upotrijebljen je 4-metil-2-pentanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka).

Uzorak biljnog sirupa za iskašljavanje analiziran je bez prethodne obrade.

Uzorkovanje

2,00 mL uzorka prenese se u bočicu za uzorkovanje *headspace* tehnikom neposredno prije analize te se zatvori aluminijskim čepom. Uzorak se zagrijava u Headspace Sampler-u (G1888, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) 30 minuta pri 80 °C. Nakon zagrijavanja uzorak se unosi u plinski kromatograf tijekom 1 minute pri temperaturi od 100 °C.

Kromatografska analiza

Plinska kromatografija provedena je na uređaju Agilent 6850 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Za razdvajanje analita korištena je kolona HP-1, dimenzija 30 m x 0,32 mm, debljine filma 0,25 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) te dušik (generator NG250A, PEAK Scientific, Renfrewshire, UK), kao plin nositelj, brzine protoka 1 mL/min. Temperatura injektora iznosila je 230 °C te je korišten »splitless« način injektiranja uzoraka. Da bi se postiglo optimalno razdvajanje analita korišten je sljedeći temperaturni program: temperatura kolone iznosila je

50 °C te se povećavala brzinom 10 °C/min do 5. minute. Plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID), čija je temperatura iznosila 250 °C, korišten je za detekciju analita. Dobiveni kromatogrami obrađeni su računalnim programom ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD).

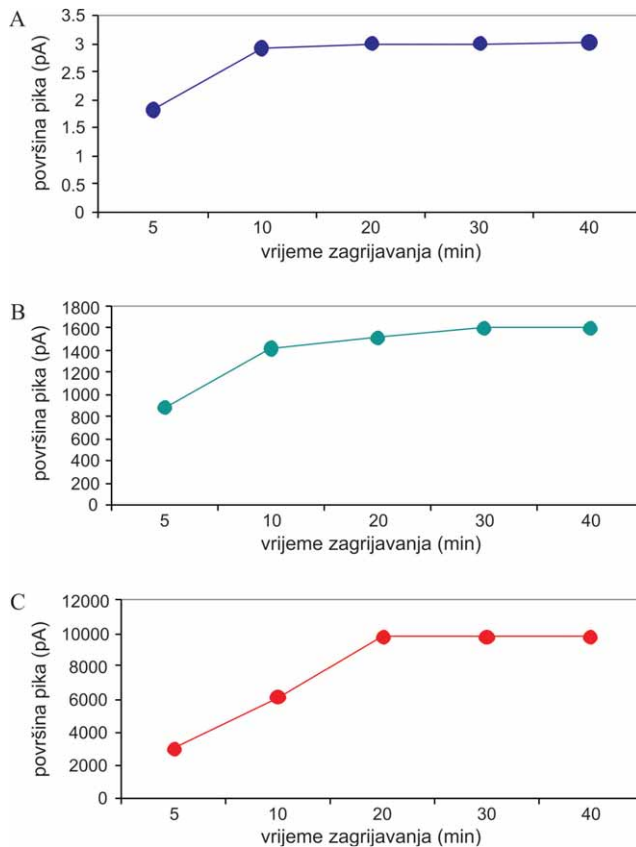
Validacija

Validacija predložene HSS-GC-FID metode provedena je prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonisation*, ICH) te su ispitani sljedeći parametri: selektivnost, linearnost, LOD, LOQ, preciznost i točnost (20).

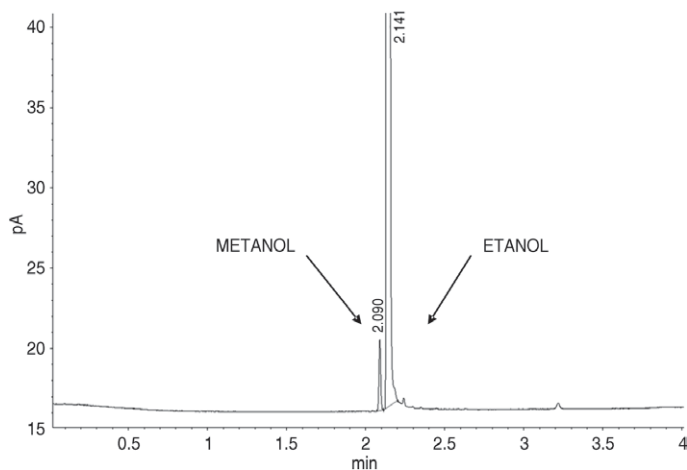
Rezultati i rasprava

Analiza sastava lakohlapljivih sastavnica biljnog sirupa za iskašljavanje provedena je primjenom plinske kromatografije. Uzevši u obzir složenost sastava ispitivanog uzorka, za njegovu pripremu odabrana je *headspace* tehnika uzorkovanja. Dakle, uz optimizaciju uvjeta kromatografske analize bilo je potrebno optimizirati i uvjete uzorkovanja.

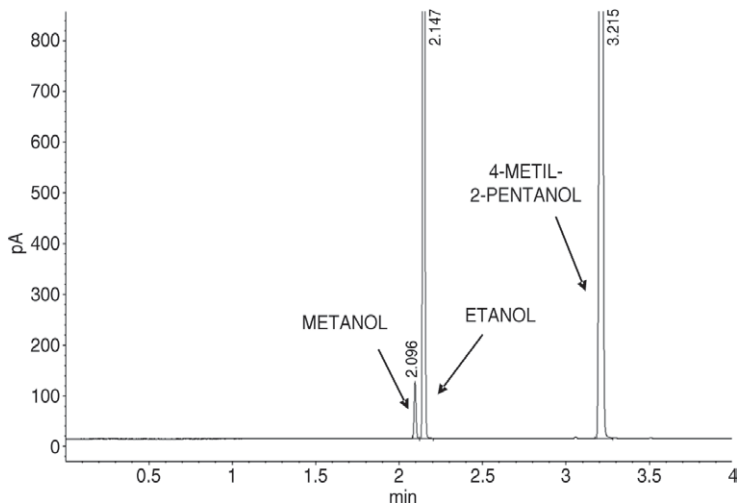
Da bi se postigla maksimalna ekstrakcija lakohlapljivih sastavnica sirupa za iskašljavanje, etanola, metanola i unutarnjeg standarda 4-metil-2-pentanola, ispitan je utjecaj temperature (70–90 °C) i vremena zagrijavanja (5–40 min) na ekstrakcijsku učinkovitost. Rezultati istraživanja su pokazali da temperatura zagrijavanja nije značajnije utjecala na udio ekstrahiranih analita, dok se produžavanjem vremena zagrijavanja udio ekstrahiranih analita značajno povećavao. Iz slike 3. može se uočiti da se produženjem vremena zagrijavanja do 30. minute udio ekstrahiranih analita povećavao nakon čega je postignuto stanje ravnoteže. S obzirom da se daljnjim produženjem vremena zagrijavanja ekstrakcijska učinkovitost nije povećavala, vrijeme zagrijavanja od 30 minuta je odabrano za daljnja ispitivanja. Nadalje, cilj istraživanja bio je razviti plinsko kromatografsku metodu kojom bi se odredio udio etanola i metanola u sirupu za iskašljavanje. Na slici 4. prikazan je kromatogram ispitanog uzorka, dok je na slici 5. prikazan kromatogram ispitanog uzorka u koji su dodane standardne otopine metanola (0,1 %, v/v), etanola (0,1 %, v/v) i 4-metil-2-pentanola (0,1 %, v/v). Iz kromatograma je vidljivo da su primjenom *headspace* tehnike uzorkovanja ekstrahirane samo lakohlapljive sastavnice sirupa za iskašljavanje. Metanol i etanol prisutni u ispitivanom uzorku identificirani su usporedbom njihova vremena zadržavanja u uzorku i u standardnim otopinama (0,1 %, v/v) u pročišćenoj vodi. Vrijeme zadržavanja metanola iznosilo je $2,09 \pm 0,01$ min ($n=6$), dok je vrijeme zadržavanja etanola iznosilo $2,15 \pm 0,01$ min ($n=6$). Posljednji se s kolone eluirao unutarnji standard, 4-metil-2-pentanol, čije je vrijeme zadržavanja iznosilo $3,22 \pm 0,02$ min ($n=6$). Dakle, predloženom metodom uspješno je postignuta ekstrakcija metanola, etanola i 4-metil-pentanola iz sirupa za iskašljavanje za djecu te prikladno vrijeme analize kao i razdvajanje navedenih analita plinskom kromatografijom.



Slika 3. Grafovi ovisnosti ekstrakcije metanola (A), etanola (B) i 4-metil-2-pentanol (C), izražene kao površina kromatografskog pika, o vremenu zagrijavanja



Slika 4. Kromatogram ispitnog uzorka biljnog sirupa za iskašljavanje za djecu



Slika 5. Kromatogram ispitano uzorka biljnog sirupa za iskašljavanje za djecu u koji su dodane standardne otopine metanola (0,1 %, v/v), etanola (0,1 %, v/v) i 4-metil-2-pentanola (0,1 %, v/v)

Da bi se ispitala prikladnost analitičkih svojstava predložene metode za navedenu primjenu, provedena je validacija metode. U skladu s ICH smjernicama ispitani su sljedeći parametri: selektivnost, linearnost, LOD, LOQ, preciznost i točnost. Selektivnost je definirana kao mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih sastavnica uzorka. Razlučivanje metanola od etanola iznosilo je 2,62, dok je razlučivanje etanola od 4-metil-2-pentanola iznosilo 40,19 što ukazuje da je metoda selektivna. Linearnost analitičke metode predstavlja njezinu sposobnost da odziv detektora bude linearno proporcionalan količini analita u uzorku. Sirup za iskašljavanje za djecu složeni je uzorak, pa da bi se smanjio utjecaj ostalih sastavnica sirupa na ekstrakciju analita, linearnost metode ispitana je metodom standardnog dodatka. Da bi se utvrdila linearnost metode, korišteno je pet otopina za izradu baždarnog pravca u rasponu od 0,0003 do 0,2 % (v/v) za metanol, odnosno od 0,003 do 0,2 % (v/v) za etanol. Udio unutarnjeg standarda u svim uzorcima iznosio je 0,1 % (v/v). S obzirom da je dobiveni koeficijent korelacije i za metanol i etanol veći od 0,999 može se zaključiti da je metoda linearna za ispitano područje za oba analita (tablica 1.). Nadalje, da bi se ispitala osjetljivost metode, određene su LOD i LOQ vrijednosti. LOD predstavlja najnižu količinu analita u uzorku koju je moguće sa sigurnošću dokazati, ali ne i odrediti, dok LOQ predstavlja najnižu količinu analita koju je moguće odrediti u uzorku s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima analize. LOD i LOQ vrijednosti određene su razrjeđivanjem ispitivanog uzorka, a čine omjer signala i šuma 3:1, odnosno 10:1. U tablici 1. prikazane su dobivene LOD i LOQ vrijednosti te je moguće zaključiti da je metoda osjetljiva za ispitivanje i metanola i etanola s obzirom na dobivene niske vrijednosti za oba parametra. Preciznost analitičke

metode izražava podudaranje između niza ponovljenih mjerenja dobivenog višestrukim uzorkovanjem i analizom istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Preciznost predložene HSS-GC-FID metode ispitana je na dva nivoa, kao ponovljivost i srednja preciznost. Ponovljivost iskazuje odstupanje rezultata dobivenih pod istim uvjetima u istom laboratoriju u kratkom vremenskom intervalu, dok srednja preciznost iskazuje varijabilnost metode unutar laboratorijskih uvjeta (poput mjerenja tijekom više dana, različitih analitičara ili uređaja kojima se provodi analiza). Ponovljivost i srednja preciznost metode ispitane su primjenom uzorka sirupa za iskašljavanje u koji su dodane standardne otopine metanola (0,1 %, v/v), etanola (0,1 %, v/v) i 4-metil-2-pentanola (0,1 %, v/v). Priprema uzorka, uzorkovanje i analiza ponovljeni su šest puta unutar istog dana da bi se odredila ponovljivost unutar istoga dana. Nadalje, priprema uzorka, uzorkovanje i analiza ponovljeni su tri put tijekom tri uzastopna dana da bi se odredila srednja preciznost. Ponovljivost i srednja preciznost izražene su kao relativno standardno odstupanje (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD, %). S obzirom na niske dobivene RSD vrijednosti, moguće je zaključiti da je metoda precizna (tablica 1.). Točnost analitičke metode izražava podudaranje srednje vrijednosti dobivenih rezultata sa stvarnim ili prihvaćenim referentnim vrijednostima. Utvrđivanje točnosti provedeno je na tri koncentracijske razine uz tri ponovljena mjerenja svake razine. Dakle točnost predložene HSS-GC-FID metode ispitana je primjenom uzorka sirupa za iskašljavanje u koji su dodane standardne otopine metanola (0,001 %, 0,01 %, 0,2 %, v/v), etanola (0,01 %, 0,05 %, 0,2 %, v/v) i 4-metil-2-pentanola (0,1 %, v/v). U tablici 1. točnost metode iskazana je kao analitički prinos (engl. *recovery*). S obzirom da je analitički prinos za oba analita na sve tri koncentracijske razine bio u rasponu od 97,43 do 103,79 % može se zaključiti da je predložena HSS-GC-FID metoda točna.

Tablica 1. Validacijski parametri predložene HSS-GC-FID metode za određivanje udjela metanola i etanola u biljnom sirupu za iskašljavanje za djecu

Validacijski parametar	metanol	etanol
Nagib pravca	0,1638	0,4208
Odsječak na osi y	0,0006	0,2236
Koeficijent korelacije	0,999	0,999
LOD (%)	0,0001	0,001
LOQ (%)	0,0003	0,003
Ponovljivost (RSD, %)	2,16	0,81
Srednja preciznost (RSD, %)	3,56	0,88
Točnost (analitički prinos, %)*		
	visoka koncentracija	99,21
	srednja koncentracija	97,68
	niska koncentracija	103,79
		99,93
		103,07
		97,43

* točnost metode ispitana je primjenom uzorka sirupa za iskašljavanje u koji su dodane standardne otopine metanola (0,001 %, 0,01 %, 0,2 %, v/v) i etanola (0,01 %, 0,05 %, 0,2 %, v/v)

Kao što je već navedeno, sirup za iskašljavanje složen je uzorak te da bi se smanjio utjecaj ostalih sastavnica sirupa na ekstrakciju analita, udio metanola i etanola u ispitanom uzorku ispitan je metodom standardnog dodatka. Udio etanola nađenog u uzorku iznosio je 0,53 %, što je u skladu s deklariranom vrijednošću na proizvodu (0,5 %). Dakle, u jednoj pojedinačnoj dozi sirupa za iskašljavanje unese se 0,03 mL etanola, dok u maksimalnoj dnevnoj dozi 0,11 mL. Nadalje potrebno je istaknuti da je nađen iznimno mali udio metanola u ispitanom uzorku 0,004 %.

ZAKLJUČAK

Budući da se etanol učestalo koristi kao ekstrakcijsko otapalo u pripremi biljnih ekstrakata i tinktura moguće ga je naći u brojnim tekućim biljnim preparatima koja se koriste u prevenciji i liječenju bolesti u djece. S obzirom da je u djece značajno manja aktivnost enzima jetrene alkohol dehidrogenaze nego u odraslih, iznimno je važno kontrolirati udio etanola u navedenim proizvodima. Stoga je cilj ovog rada bio razviti i validirati novu HSS-GC-FID metodu za određivanje sadržaja etanola i njegovog najčešćeg onečišćenja, metanola, u sirupu za iskašljavanje za djecu. Provedena ispitivanja su pokazala da je predložena metoda selektivna, linearna, osjetljiva, precizna i točna. Nadalje, u ispitanom uzorku sirupa za iskašljavanje nađeni udio etanola iznosio je 0,53 %, što je u skladu s vrijednošću deklariranom na proizvodu. Udio metanola u ispitanom uzorku bio je iznimno malen, 0,004 %.

Zahvala – Autorice se zahvaljuju Ministarstvu znanosti, obrazovanja i sporta na financijskoj potpori u okviru projekta Istraživanje novih metoda u analitici ljekovitih i bioaktivnih tvari (no. 006-0061117-1240).

1. Weiss RF. Lehrbuch der Phytotherapie. Stuttgart: Hippokrates-Verlag, 1985.
2. Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb: Školska knjiga, 1994.
3. Schulz V, Hänsel R, Tyler, VE. Rational Phytotherapy: A Physician's Guide to Herbal Medicine. Heidelberg: Springer, 2001.
4. Blumenthal M. Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. Boston: Integrative Medicine Communications, 2000.
5. Vale A. Ethanol. Medicine. 2007; 35:615–616.
6. Fiocchi A, Riva E, Giovannini M. Ethanol in medicines and other products intended for children: Commentary on a medical paradox. Nutr. Res. 1999; 19:373–379.
7. Klotz U, Ammon E. Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1998; 54:7–12.
8. Lieber C.S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. Clin. Chim. Acta. 1997; 257:59–84.
9. Haseba T, Ohno Y. A new view of alcohol metabolism and alcoholism – role of the high-Km class III alcohol dehydrogenase (ADH3). Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2010; 7:1076–1092.

10. European Medicines Agency, Reflection paper on ethanol content in herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products used in children, EMA/HMPC/85114/2008, <http://www.ema.europa.eu/>, datum pristupa: 29. 10. 2012.
11. Weathermon R, Crabb D.W. Alcohol and medication interactions. Alcohol. Res. Health. 1999; 23:40–54.
12. European Pharmacopoeia. 6. ed. Strasburg: Council of Europe, 2007.
13. Vale A. Methanol. Medicine. 2007; 35:60–61.
14. Becker C.E. Methanol poisoning. J. Emerg. Med. 1983; 1:51–58.
15. Mornar A, Amidžić Klarić D, Nigović B. Kontrola kvalitete kupinovih vina primjenom HSS-GC-FID tehnike. Farm. Glas. 2011; 67:741–746.
16. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Quality assessment of liquid pharmaceutical preparations by HSS-GC-FID. J. Anal. Chem. 2012; in press
17. Apers S, Van Meenen E, Pieters L, Vlietinck A. Quality control of liquid herbal drug preparations: ethanol content and test on methanol and 2-propanol. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2003; 33:529–537.
18. Kolb B. Headspace sampling with capillary columns. J. Chromatogr. A. 1999; 842:163–205.
19. Snow N.H., Bullock G.P. Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography. J. Chromatogr. A. 2010; 1217:2726–2735.
20. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1995. Topic Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, <http://www.ema.europa.eu/>, datum pristupa: 29. 10. 2012.

Primljeno 20. studenoga 2012.