

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA ŠKVARČ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA ŠKVARČ

**UGOTAVLJANJE PRIMESI KORTIKOSTEROIDOV Z METODO
TANKOPLASTNE KROMATOGRAFIJE V MAZILIH Z NARAVNIMI IZVLEČKI**

**SCREENING FOR CORTICOSTEROID ADDITIONS IN OINTMENTS
CONTAINING NATURAL EXTRACTS BY APPLYING THE METHOD OF THIN
LAYER CHROMATOGRAPHY**

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Samu Kreftu za ideje, nasvete ter pomoč pri izvedbi diplomske naloge. Hvala delovni mentorici Katji Stojilkovski za tehnično pomoč pri izvedbi diplomske naloge, dobro voljo in popestritev dni, preživetih v laboratoriju.

Posebej se zahvaljujem prim. Vlasti Dragoš ter njenim pacientom, ki so prijazno odstopili vzorce Melema Dr. Vasića ter omogočili izvedbo eksperimentalnega dela diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Alešu Obrezi ter doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar za temeljit pregled diplome.

Nenazadnje se zahvaljujem moji družini ter fantu za spodbudo, podporo in optimizem. Hvala vsem prijateljem za nepozabne dogodivščine, smeh ter skupno preživeta študentska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Sama Krefta.

Nina Škvarč

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD.....	1
1.1 Primeri primesi sinteznih zdravilnih učinkovin v zdravilnih pripravkih naravnega izvora	1
1.2 Primeri odkritij primesi kortikosteroidov v topikalnih pripravkih domnevno naravnega izvora	2
1.3 Melem dr. vasića	4
1.4 Kortikosteroidi	7
1.4.1 Topikalni kortikosteroidi	7
1.4.1.1 Mehanizem delovanja topikalnih kortikosteroidov.....	7
1.4.1.2 Kemijska zgradba topikalnih kortikosteroidov.....	8
1.4.1.3 Jakost topikalnih kortikosteroidov.....	9
1.4.1.4 Neželeni učinki topikalnih kortikosteroidov	10
1.5 Metode za določevanje kortikosteroidov v farmacevtskih oblikah za topikalno uporabo	11
1.5.1 Tankoplastna kromatografija.....	12
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali.....	17
3.1.1 Kemikalije	17
3.1.2 Laboratorijske aparature.....	17
3.1.3 Laboratorijski pribor	18
3.2 Metode	19
3.2.1 Priprava standardov ter vzorcev	19
3.2.1.1 Priprava standardov.....	19
3.2.1.2 Ekstrakcija kortikosteroidov iz vzorcev ter priprava ekstraktov za nanos na TLC ploščo.....	19

3.2.2 Optimizacija metode tankoplastne kromatografije za ugotavljanje primesi kortikosteroidov v mazilih z naravnimi izvlečki	22
3.2.2.1 Določitev volumna ekstrakta za nanos na TLC ploščo.....	22
3.2.2.2 Izbor orositvenega reagenta za detekcijo lis na kromatogramu	22
3.2.2.3 Izbor mobilne faze	23
3.2.3 Ugotavljanje primesi kortikosteroidov v Melemu Dr. Vasića z metodo tankoplastne kromatografije	24
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1 Ekstrakcija kortikosteroidov iz vzorcev ter priprava ekstraktov za nanos na tlc ploščo	27
4.2 Optimizacija metode tlc za ugotavljanje primesi kortikosteroidov v naravnih mazilih	30
4.2.1 Volumen ekstrakta za nanos na TLC ploščo.....	30
4.2.2 Izbor orositvenega reagenta za detekcijo lis na kromatogramu	31
4.2.3 Izbor mobilne faze	34
4.3 Določanje primesi kortikosteroidov v melemu dr. vasića z metodo tankoplastne kromatografije.....	39
4.3.1 Opis vzorcev	39
4.3.2 Rezultati analize Melema Dr. Vasića z metodo tankoplastne kromatografije	40
4.3.2.1 Kromatogram ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 ter ekstraktov krem s kortikosteroidi iz lekarn	41
4.3.2.2 Kromatogram ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića, ekstrakta kreme Diprosone ter standarda betametazondipropionata	43
4.3.2.3 Kromatogram vseh vzorcev Melema Dr. Vasića ter standarda betametazondipropionata	46
4.3.2.4 Kromatogram vseh ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter standarda betametazondipropionata z zamenjavo mesta na TLC plošči	50
4.3.3 Betametazondipropionat.....	52
4.3.4 Ponovljivost rezultatov.....	53
4.3.5 Možnosti uporabe drugih metod za ugotavljanje primesi kortikosteroidov v mazilih z naravnimi izvlečki	54
5 SKLEP	57
6 LITERATURA	59

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Embalaza Melema Dr. Vasića.</i>	5
Slika 2 : <i>Molekula hidrokortizona</i>	8
Slika 3: <i>Razvoj kromatograma pri ascendentni kromatografiji</i>	12
Slika 4: <i>Izračun retencijskega faktorja (Rf)</i>	15
Slika 5: <i>Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone</i>	29
Slika 6: <i>Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, V ekstrakta = 20 µL</i>	31
Slika 7: <i>Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, V ekstrakta = 5µL</i>	31
Slika 8: <i>Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone po orositvi z OR1</i>	33
Slika 9: <i>Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone po orositvi z OR2</i>	33
Slika 10: <i>Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, razvoj v MF1</i>	36
Slika 11: <i>Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, razvoj v MF2</i>	36
Slika 12: <i>Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, razvoj v MF3</i>	36
Slika 13: <i>Kromatogram ekstraktov kreme Diprosone, Melema Dr. Vasića št. 1 ter raztopin standardov kortikosteroidov, razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR2</i>	38
Slika 14: <i>Kromatogram ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 ter ekstraktov krem s kortikosteroidi iz lekarn, razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR2</i>	41
Slika 15: <i>Kromatogram ekstraktov kreme Diprosone, vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 ter raztopine standarda betametazondipropionata, razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR2</i>	44
Slika 16: <i>Kromatogram ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR1</i>	46
Slika 17: <i>Kromatogram ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR2</i>	46
Slika 18: <i>Kromatogram ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata z zamenjanimi mesti na TLC plošči, razvit v MF3 ter orošen z OR1</i>	51
Slika 19: <i>Molekula betametazondipropionata</i>	52

KAZALO TABEL

Tabela I: <i>Jakost topikalnih kortikosteroidov po ATC klasifikaciji, povzeto po [46, 47]</i>	10
Tabela II: <i>Kreme s kortikosteroidnimi učinkovinami iz lekarne, zdravilne učinkovine ki jih vsebujejo ter njihova koncentracija v kremah</i>	20
Tabela III: <i>Barve lis nekaterih kortikosteroidov po orositvi z OR1 [52].</i>	32
Tabela IV: <i>Primerjava retencijskih faktorjev (Rf) lis št. 1 ter 2 pri razvoju kromatogramov v mobilnih fazah različne sestave</i>	36
Tabela V: <i>Barva vzorcev Melema Dr. Vasića</i>	40
Tabela VI: <i>Retencijski faktorji (Rf) lis ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića ter Rf, ki pripadajo kortikosteroidom iz krem iz lekarne</i>	42
Tabela VII: <i>Retencijski faktorji (Rf) lis ekstrakta kreme Diprosone, ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića št 1 ter raztopine standarda betametazondipropionata</i>	44
Tabela VIII: <i>Retencijski faktorji lis ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata na kromatogramu orošenem z OR1 (Slika 16)</i>	49
Tabela IX: <i>Retencijski faktorji (Rf) ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata na kromatogramu orošenem z OR2 (Slika 17).</i>	49
Tabela X: <i>Retencijski faktorji (Rf) lis ki pripadajo betametazondipropionatu v ekstraktih vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopini standarda betametazondipropionata</i>	51

POVZETEK

Z naraščanjem priljubljenosti naravnih zdravilnih pripravkov v zahodnih državah sta se pojavila problem dodajanja konvencionalnih sinteznih zdravilnih učinkovin v tovrstne pripravke ter njihova nelegalna prodaja. Med take pripravke spadajo tudi naravne kreme in mazila namenjena zdravljenju kožnih obolenj, ki vsebujejo primesi kortikosteroidov. Melem Dr. Vasića je deklariran kot naravno mazilo, ki ga izdeluje srbski kiropraktik in fitoterapevt Dr. Hadži Miroslav Vasić in je namenjeno zdravljenju kožnih bolezni. Njegova uporaba je razširjena tudi med pacienti v Sloveniji, ki so želeli poiskati alternativo zdravljenju s kortikosteroidnimi dermalnimi pripravki. Zaradi dobrih terapevtskih rezultatov je večje število dermatologov in tudi pacientov izrazilo dvom o naravnem izvoru mazila ter posumilo na vsebnost kortikosteroidov. V sklopu diplomske naloge smo z metodo tankoplastne kromatografije ugotavljali prisotnost primesi kortikosteroidov v šestih vzorcih Melema Dr. Vasića. V prvem delu eksperimentalnega dela diplomske naloge smo pripravili ekstrakte kortikosteroidov iz vzorcev. Metodo tankoplastne kromatografije smo optimizirali tako, da smo izbrali primeren volumen ekstrakta za nanos na kromatografsko ploščo ter primerna orositvena reagenta in mobilno fazo. Z optimizacijo metode smo dosegli ustrezno ločljivost med komponentami vzorca ter različnimi kortikosteroidnimi učinkovinami. V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo primerjali vzorec Melema Dr. Vasića z vzorci kortikosteroidnih krem iz lekarne in ugotovili, da vsebuje kortikosteroid betametazondipropionat. Za potrditev naših ugotovitev smo vse vzorce Melema Dr. Vasića primerjali še s standardom betametazondipropionata. Ugotovili smo, da so se vzorci po sestavi razlikovali, so pa vsi vsebovali betametazondipropionat, ki se uvršča med topikalne kortikosteroide z visoko jakostjo. Z uporabo drugih metod, kot je na primer tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, bi lahko vsebnost betametazondipropionata v vzorcih tudi kvantitativno opredelili.

Ključne besede: mazila z naravnimi izvlečki, topikalni kortikosteroidi, tankoplastna kromatografija, betametazondipropionat

ABSTRACT

Increasing popularity of herbal medicinal preparations in western countries generated the problem of adding conventional synthesized active ingredients to this kind of products and their illegal sale. Amongst those are also natural skin creams and ointments for the treatment of skin illnesses, containing corticosteroid additions. The product referred to as »Dr. Vasić Melem« is declared as a natural ointment manufactured by the Serbian chiropractor and phytotherapist Dr. Hadži Miroslav Vasić, and is intended for the treatment of skin illnesses. Its use is spread also among patients in Slovenia, who wanted to find an alternative to the treatment with dermal preparations containing corticosteroids. Due to good therapeutic effects, a considerable number of dermatologists as well as patients have expressed a doubt as to the natural origin of the ointment, already suspecting an eventual presence of corticosteroids. In the framework of this degree thesis we tried to determine the presence of corticosteroids in six samples of the »Dr. Vasić Melem« by applying the method of thin layer chromatography. In the first section of the experimental part of the degree thesis we prepared corticosteroid extracts from ointment samples. We optimised the thin layer chromatography method by selecting the extract volume suitable for application onto a chromatographic plate, two suitable spraying reagents, and a mobile phase. By optimising the method we achieved the best possible resolution between sample components and different corticosteroids. In the development of the experiment we compared a »Dr. Vasić Melem« sample with samples of corticosteroid skin creams available in pharmacies and established that »Dr. Vasić Melem« actually contained the corticosteroid betamethasone dipropionate. To confirm our findings, we compared »Dr. Vasić Melem« samples with the betamethasone dipropionate standard. We determined that the samples actually differed in contents, but they all contained the betamethasone dipropionate, which is classified as a high potency topical corticosteroid. By applying other methods, such as, for example, high performance liquid chromatography, we would also be able to quantify the betamethasone dipropionate content in samples.

Key words: ointments with herbal extracts, topical corticosteroids, thin layer chromatography, betamethasone dipropionate

SEZNAM OKRAJŠAV

TLC	tankoplastna kromatografija
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
GC	plinska kromatografija
UV	ultravijolična
IRS	infrardeča spektroskopija
MS	masna spektrometrija
NMR	jedrska magnetna resonanca
R _f	retencijski faktor
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MF1	mobilna faza 1
MF2	mobilna faza 2
MF3	mobilna faza 3
OR	orositveni reagent
OR1	orositveni reagent 1
OR2	orositveni reagent 2

1 UVOD

1.1 PRIMERI PRIMESI SINTEZNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN V ZDRAVILNIH PRIPRAVKIH NARAVNEGA IZVORA

V zahodnih državah narašča priljubljenost naravnih zdravilnih pripravkov kot del komplementarne ter alternativne medicine [1]. Razlogi za to vključujejo skrb pacientov zaradi neželenih učinkov sintetičnih zdravil, splošno razočaranje nad klasično medicino in naraščanje števila pacientov s kroničnimi boleznimi ter boleznimi, za katere se konvencionalna terapija ne izkaže za uspešno [2].

Z naraščanjem priljubljenosti naravnih zeliščnih pripravkov ter prodajo tovrstnih neregistriranih izdelkov na črnem trgu, se je pojavil tudi problem dodajanja konvencionalnih sinteznih zdravilnih učinkovin v te pripravke. Taki pripravki se prodajajo izven lekarn ter specializiranih prodajaln, največkrat preko interneta, tiskanih medijev ter v privatnih ambulantah alternativne medicine [3]. Preko sporočil o nenavadnih neželenih učinkih s strani pacientov, ki so tovrstne pripravke uporabljali, so agencije, ki skrbijo za nadzor nad zdravili, že večkrat z analizami ugotovile prisotnost različnih zdravilnih učinkovin v teh izdelkih, čeprav le-te na njihovi embalaži niso bile navedene med sestavinami.

V javnost tako prihajajo obvestila s strani agencij za nadzor zdravil, ki opozarjajo o vsebnosti konvencionalnih zdravilnih učinkovin v zdravilnih pripravkih domnevno naravnega izvora. Posebej številna so opozorila o različnih pripravkih za pomoč pri izgubi telesne teže ter za zdravljenje motenj erekcije.

V več zdravilnih pripravkih za pomoč pri zniževanju telesne teže, ki se oglašujejo kot naravnega izvora so z analizami odkrili zdravilno učinkovino sibutramin. Zdravila s sibutraminom so bila sprva registrirana kot zdravila za podporno zdravljenje bolnikov s prekomerno telesno maso in bolnikov z drugimi, z debelostjo povezanimi dejavniki tveganja, kot je npr. sladkorna bolezen tipa 2. Leta 2010 so zdravilom s sibutraminom odvzeli dovoljenje za promet, po tem ko je klinična študija razkrila povečano tveganje za razvoj resnih srčno-žilnih dogodkov kot sta možganska ali srčna kap pri pacientih, ki jemljejo zdravila s sibutraminom [4, 5]. Od leta 2008 naprej pa do danes so pristojni

organi za zdravila oziroma agencije za nadzor nad zdravili, med njimi ameriška FDA (Food and drug administration), britanska MHRA (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency), avstralska TGA (Therapeutic Goods Administration) ter irska IMB (Irish Medicines Board) izdali v javnost več opozoril o prisotnosti sibutramina v prehranskih dopolnilih ter zeliščnih pripravkih za zniževanje prekomerne telesne teže. Večina teh pripravkov so neregistrirana prehranska dopolnila azijskega porekla, ki so se večinoma prodajala preko spletnih trgovin. V vseh primerih sibutramin ni bil naveden kot sestavina pripravka, ampak so bili vsi ti izdelki domnevno izdelani zgolj iz naravnih sestavin [6, 7, 8, 9, 10, 11].

Problematici so tudi naravni zdravilni pripravki za lajšanje erektilnih motenj. Ti pripravki se oglašujejo kot prehranska dopolnila z naravnimi sestavinami ter se prav tako pretežno prodajajo preko interneta. Raziskave opravljene na vzorcih različnih izdelkov s strani več vladnih organov so pokazale, da številni izmed njih vsebujejo sicer registrirane zdravilne učinkovine za zdravljenje impotence kot so sildenafil, vardenafil ter tadalafil, nekatere izmed njih pa tudi neregistrirane derivate teh zdravilnih učinkovin. Ameriška FDA ter MHRA javnost redno opozarjata o vprašljivi varnosti teh izdelkov ter redno posodabljata seznam domnevno naravnih (zeliščnih), ki vsebujejo sintetične zdravilne učinkovine [12, 13, 14].

1.2 PRIMERI ODKRITIJ PRIMESI KORTIKOSTEROIDOV V TOPIKALNIH PRIPRAVKIH DOMNEVNO NARAVNEGA IZVORA

Poleg omenjenih ponarejenih zdravilnih pripravkov, ki se uporabljajo kot prehranska dopolnila, so konvencionalne zdravilne učinkovine našli tudi v naravnih izdelkih za nego kože. V večini primerov so bile te zdravilne učinkovine lokalni kortikosteroidi, ki se uporabljajo za zdravljenje kožnih vnetnih bolezni. Od leta 2005 je Britanska komisija za nadzor nad zdravili (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency – MHRA) preiskala 140 sumov na nedovoljeno vsebnost kortikosteroidov v izdelkih za uporabo na koži, med katerimi naj bi jih bilo veliko naravnega izvora oz. izdelanih iz zeliščnih ekstraktov. Izmed 140 primerov so v tridesetih kremah našli kortikosteroide [15]. Leta 2008 so tako odkrili, da so vzorci losjona za telo z aloe vero OSAS vsebovali tako kortikosteroid betametazondipropionat kot tudi antimikotik klotrimazol. Losjon naj bi

zdravil luskavico ter ekceme, tržili so pa ga preko interneta ter v različnih afriških ter azijskih drogerijah [16]. Poleg omenjenega losjona je MHRA odkrila še več primerov topikalnih pripravkov naravnega izvora za zdravljenje luskavice ter dermatitsov, ki so vsebovali kortikosteroide. Večinoma so to bili neregistrirani ter neoznačeni izdelki, ki so prihajali iz azijskih ali afriških držav in so se prodajali nelegalno (»pod pultom«) v neodvisnih supermarketih, drogerijah ter privatnih ambulantah alternativne medicine. Imena označenih izdelkov so se glasila: »Abido krema«, »AA krema«, »Xiao Yan«, »Yibishu mazilo«, »Wujigao krema«, »999 krema«, »Mujjiza krema« ter »Wau Wa krema« [15, 17, 18]. V literaturi [18] so opisani rezultati analize štiriindvajsetih vzorcev krem pridobljenih od devetnajstih pacientov otroške bolnišnice v Birminghamu v Veliki Britaniji. Vseh pet vzorcev krem z imenom Wau Wa ter dva vzorca kreme z imenom Mujjiza krema so vsebovali klobetazolpropionat. Trinajst krem izmed preostalih sedemnajstih neoznačenih krem je prav tako vsebovalo kortikosteroidne učinkovine: štiri izmed njih so vsebovale klobetazolpropionat, ena je vsebovala klobetazolpropionat ter hidrokortizon, dve kremi sta vsebovali betametazonvalerat, tri kreme klobetazolbutirat, v dveh kremah pa so našli hidrokortizon. Starši otrok, ki so kreme uporabljali za zdravljenje atopijskega dermatitisa niso vedeli, da kreme vsebujejo kortikosteroide [18].

Leta 2011 je MHRA na svoji spletni strani objavila varnostno opozorilo o kremi Soraderm. Krema namenjena zdravljenju kožnih težav je bila v Veliko Britanijo uvožena iz Pakistana, vsebovala pa naj bi samo naravne sestavine. Ugotovili so, da je vsebovala visoko koncentracijo kortikosteroidov [19]. Istega leta je podobno opozorilo izdala tudi Irish Medicines Board – IMB in sicer za kremo Magicream neznanega proizvajalca, ki naj bi prav tako bila izdelana iz naravnih sestavin. Analize so potrdile vsebnost kortikosteroida klobetazolpropionata ter antimikotika ketokonazola [20]. Februarja 2014 je ponovno izdala opozorilo za kremo Magicream, saj so ponovne analize potrdile, da vsebuje kortikosteroida betametazon-17-valerat ter betametazon-21-valerat in antimikotik ketokonazol [21]. Obvestilo o neustrezni kakovosti kreme Magicream je izdala tudi Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke [22].

Zaradi dobrih terapevtskih rezultatov so bile velikokrat pod drobnogledom tudi tradicionalne kitajske kreme in mazila [18, 23, 24]. V literaturi [23] so opisani rezultati analize enajstih kitajskih zeliščnih krem, ki so jih pacienti, tako otroci kot odrasli, uporabljali za zdravljenje kožnih obolenj. V osmih izmed enajstih krem so z analizo

dokazali vsebnost deksametazona. Vsi pacienti so kreme nanašali na obraz ter kožo v pregibih sklepov, kjer je koža že naravno tanjša. Nobeden izmed pacientov ni poznal sestavin krem ter se ni zavedal, da vsebujejo kortikosteroidne učinkovine [23]. V literaturi [24] so opisani tudi primeri odkritja različnih zdravilnih učinkovin v več kitajskih zdravilnih pripravkih domnevno naravnega izvora, med katerim so tudi kreme za zdravljenje kožnih obolenj. V članku so omenjeni trije primeri vsebnosti kortikosteroidov v kitajskih kremah oz. mazilih [24].

Leta 2012 je hrvaško Ministrstvo za zdravje izdalo obvestilo o umiku kreme za nego obraza ter kože Euten s tržišča, saj so analize pokazale, da je le ta vsebovala 0,09 mg/g betametazondipropionata, poleg tega pa tudi 32,4 mg/g salicilne kisline. Ministrstvo za zdravje je zato odredilo umik serije iz tržišča, dokler z nadaljnjimi analizami ne potrdijo odsotnosti omenjenih sestavin v kremi [25]. Kasneje je proizvajalec kreme Euten Bioeliksir Europa na svojo spletno stran objavil negativne rezultate analiz kreme na kortikosteroide iz sredine leta 2012 ter 2013 [26, 27].

1.3 MELEM DR. VASIĆA

Melem za kožne bolesi oz. Melem Dr. Vasića je mazilo, ki ga izdeluje Dr. Hadži Miroslav Vasić - kiropraktik, fizioterapevt in fitoterapevt iz Srbije. V Beogradu vodi ambulanto alternativne medicine Vasić, kjer svoje paciente zdravi predvsem z izvajanjem fizioterapije in kiropraktike. Poleg tega jim nudi tudi nasvete glede zdravljenja s pomočjo zdravilnih rastlin, iz katerih izdeluje številne pripravke, med katerimi so čaji, tinkture, kreme in mazila. Pacientom s kožnimi obolenji, kot so luskavica, dermatitisi, lupus, rosacea, herpes simpleks in herpes zoster ter akne priporoča uporabo mazila, t.i. Melem za kožne bolesi oz. Melem Dr. Vasića. Tudi slednjega pripravlja Vasić sam po lastni recepturi [28, 29, 30]. Priljubljenost Melema je v Srbiji narasla, ko je znana srbska manekenka javno spregovorila o njegovih blagodejnih učinkih [28]. Po porastu priljubljenosti Melema Dr. Vasića v Srbiji, so se govorice o učinkovitem delovanju Melema pri različnih kožnih obolenjih razširile tudi v Slovenijo.

»Melem za kožne bolesi« je mazilo bele barve. Embalaža v kateri se mazilo nahaja, je 40 oz. 50 mililitrski (mL) lonček bele ali vijoličaste barve (*Slika 1*). Na embalaži je nalepka, napisana v cirilici ali pa v latinici. Na nalepki je navedeno ime izdelka, sestava mazila ter

navodila za uporabo. Za imenom (»Melem za kožne boleti«) so navedene indikacije pri katerih naj bi se mazilo uporabljalo. To so ekcemi, luskavica, lišaji, nevrodermatitis, rosacea ter atopijski dermatitis. Kot sestavine so navedeni čebelji proizvodi ter zdravilne rastline. Priporočena uporaba mazila je mazanje obolenih predelov kože v tankem sloju dvakrat na dan, zjutraj in zvečer [31]. Podrobnejša sestava mazila ni znana, je pa Dr. Vasić vsem uporabnikom, ki so se nanj obrnili z vprašanjem o sestavi Melema zatrdil, da je le-ta popolnoma naraven.



Slika 1: Embalaža Melema Dr. Vasića [32].

Prav naravna sestava mazila je k uporabi Melema pritegnila paciente ter starše otrok s kožnimi boleznimi. Sodeč po objavah na forumih, so bolniki z različnimi kožnimi obolenji ter starši otrok s tovrstnimi težavami želeli prenehati z uporabo lekarniških krem s kortikosteroidi, ki so sicer predpisane za zdravljenje teh bolezni. Od njihove uporabe so jih odvrnili neželeni učinki, ki se pojavljajo predvsem ob dolgotrajni uporabi ter slabi rezultati zdravljenja z njimi. Alternativno so želeli poiskati v kremah in mazilih, ki ne vsebujejo kortikosteroidov in katerih sestavine so naravnega izvora. Zaradi dobrih priporočil o učinkovitosti so začeli uporabljati Melem Dr. Vasića. Večina pričevanj na forumih o mazilu je pozitivnih. Bolniki z atopijskim dermatitisom, predvsem pa starši otrok, ki trpijo za to boleznijo, so opisovali zelo hitro izboljšanje stanja kože že po eni ali pa po nekajkratni aplikaciji mazila. Razpoke v prizadetih predelih kože so se jim zacelile, srbečica je prenehala, suha in pordela koža pa je postala gladka ter pridobila nazaj zdrav videz. O podobnih učinkih so poročali tudi bolniki z luskavico, saj se jim je koža na

obolelih predelih zacelila in je ponovno postala zdravega videza [31, 33, 34, 35, 36, 37]. Vse osebe, ki so uporabljale Melem za nego prizadetih predelov kože, so opisovale hiter nastop blagodejnih učinkov, kot so celjenje kože in ublažitev srbečice ter pordele kože [31-38]. Nekaj oseb je tudi primerjalo terapijo z Melemom s terapijo s kortikosteroidnimi kremami ali mazili. Omenili so, da jim Melem ne povzroča težav kot kreme ali mazila s kortikosteroidi. Občutek pri zdravljenju ter po zdravljenju z Melemom se jim je zdel drugačen od tistega pri zdravljenju s kremami in mazili s kortikosteroidi [36]. Kar se tiče poročanj o obnašanju kože po prenehanju uporabe Melema je na spletu mogoče najti nasprotujoča si mnenja. Nekateri pacienti poročajo o skoraj popolni ozdravitvi obolelih predelov z atopijskim dermatitisom ali luskavico [33]. Nekaj bolnikov ter staršev obolelih otrok omenja zgolj občasno aplikacijo (nekajkrat na leto in predvsem pozimi) Melema na obolele predele kože. Ti poročajo tudi o velikem izboljšanju simptomov in na sploh stabilizaciji bolezni [34, 36]. Na spletu pa lahko preberemo tudi nekaj negativnih zapisov povezanih s stanjem kože po prenehanju uporabe Melema. Te osebe poročajo o vrnitvi vseh simptomov bolezni in to celo v večji meri kot pred začetkom uporabe Melema. Težave, ki jih opisujejo, so razširitev področij obolele kože, otekline, občutek pekoče kože, srbenje ter rdečica [34, 39]. Če povzamemo komentarje o uporabi Melema in njegovem delovanju, lahko zaključimo, da so bolniki s kožnimi težavami po večini navdušeni nad njegovo učinkovitostjo. Kar nekaj oseb pa je zaradi njegovih učinkov postalo zaskrbljenih. Zaradi dobrih rezultatov zdravljenja ter hitrega delovanja na obolele predele kože so se začeli spraševati o učinkovinah v Melemu. Podvomili so o njegovi domnevno naravni sestavi ter začeli ugibati o morebitni prisotnosti kortikosteroidov v njemu. Učinke Melema so nekateri starši obolelih otrok opisali tudi svojim dermatologom. Večina dermatologov je glede na hitre ter dobre rezultate zdravljenja z Melemom izrazila dvom o njegovi sestavi, saj so bili rezultati nege kože z Melemom Dr. Vasića podobni kot po terapiji s kortikosteroidnimi kremami in mazili. Nekaj jih je svojim pacientom tudi odsvetovalo nadaljnjo uporabo oziroma svetovalo previdnost pri uporabi Melema [31, 38]. Kar nekaj staršev se je o sestavi mazila želelo pozanimati tudi pri Vasiću. Poklicali so ga v ambulanto in Vasić oziroma Vasićev asistent jim je zatrdil, da Melem ne vsebuje kortikosteroidov. Tudi osebam, ki so ga obiskali v ambulanti v Beogradu ter ga povprašali o sestavinah, je Vasić zatrdil, da kortikosteroidov mazilo ne vsebuje [31, 37].

1.4 KORTIKOSTEROIDI

Endogeni kortikosteroidi so steroidni hormoni, ki nastajajo in se izločajo iz skorje nadledvične žleze, kjer nastajajo iz prekursorja holesterola. Glede na njihove fiziološke funkcije se delijo na mineralokortikoide ter na glukokortikoide. Glavni predstavnik mineralokortikoidov je aldosteron. Njegova naloga je vzdrževanje volumna ter koncentracije natrijevih in kalijevih ionov v zunajcelični tekočini. Glukokortikoidi čigar glavni predstavnik je kortizol pa pomagajo uravnati metabolizem ogljikovih hidratov, maščob in proteinov ter delujejo protivnetno in imunosupresivno.

Sintezni glukokortikoidi se uporabljajo za zdravljenje številnih bolezenskih stanj. Uporabljajo se lahko kot nadomestna terapija pri zdravljenju primarne ter sekundarne insuficience skorje nadledvične žleze, večina sinteznih glukokortikoidov pa se zaradi protivnetnega ter imunosupresivnega delovanja uporablja predvsem za zdravljenje različnih vnetnih stanj [40, 41, 42].

1.4.1 Topikalni kortikosteroidi

Topikalni kortikosteroidi so namenjeni za aplikacijo na koži ter delujejo protivnetno, imunosupresijsko ter antiproliferativno. Uporabljajo se za zdravljenje alergijskih ter vnetnih bolezni kože kot so na primer atopični, kontaktni ter drugi dermatitisi, ekcemi, eritemi ter luskavica [44, 45].

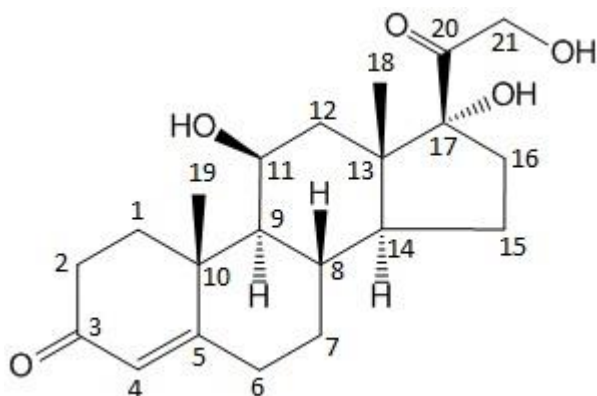
1.4.1.1 Mehanizem delovanja topikalnih kortikosteroidov

Terapevtska učinkovitost topikalnih kortikosteroidov je rezultat različnih procesov, ki nastopijo po aplikaciji zdravila na kožo. Topikalni kortikosteroidi se najprej sprostijo iz mazilne podlage, nato pa penetrirajo skozi kožo s pasivno difuzijo do njihovega vezavnega mesta [45]. Tako sistemski kot tudi topikalni kortikosteroidi na mestu aplikacije povzročajo protivnetne, imunosupresijske ter antiproliferativne učinke. Kortikosteroidi zmanjšajo produkcijo kemičnih mediatorjev vnetja prostaglandinov, citokinov in interleukinov ter zmanjšajo proliferacijo in migracijo eozinofilcev ter limfocitov na mesto vnetja. Terapevtsko najpomembnejši učinek je zaviranje kopičenja nevtrofilcev ter

monocitov na mestu vnetja ter zmanjšanje njihovih fagocitnih, baktericidnih ter »antigen-procesirajočih« funkcij. Kortikosteroidi tudi zmanjšujejo vazodilatacijo ter permeabilnost žil na mestu vnetja ter na ta način zmanjšujejo ekstravazacijo plazme ter nastajanje oteklina. [41, 44]. Vsi mehanizmi preko katerih glukokortikoidi zavirajo vnetne procese še niso pojasnjeni [41].

1.4.1.2 Kemijska zgradba topikalnih kortikosteroidov

Prvi sintezni glukokortikoid, ki so ga začeli uporabljati za lokalno zdravljenje bolezni kože, je hidrokortizon (*Slika 2*). Kemijska struktura hidrokortizona predstavlja tudi osnovo za nadaljnje kemijske modifikacije, s katerimi so spreminjali lastnosti novejših topikalnih kortikosteroidov.



Slika 2 : Molekula hidrokortizona

Osnovno kemijsko strukturo oz. steroidni skelet, ki je skupen vsem kortikosteroidom predstavlja ciklopentanoperhidrofenantren, ki ga sestavljajo trije šestčlenski ter en petčlenski obroč. Keto skupina na C3 mestu, karbonylna skupina na C20 mestu, dvojna vez med C4 ter C5 atomoma so nujne tako za glukokortikoidno kot mineralokortikoidno aktivnost. Na C17 vezana α -hidroksi skupina ter na C11 vezana β -hidroksi skupina vplivata na glukokortikoidno aktivnost posameznih spojin.

S kemijskimi modifikacijami hidrokortizona so ustvarili nove kortikosteroidne učinkovine z večjim protivnetnim delovanjem ter izboljšanimi farmakokinetičnimi lastnostmi, ki so omogočale aplikacijo teh učinkovin na koži. Za povečano protivnetno delovanje učinkovin

so odgovorne kemijske modifikacije, kot so sprememba enojne vezi med C1 ter C2 atomoma v dvojno, uvedba metilne skupine na C6 mesto, halogenizacija s fluorom ali klorom na C9 mesto, uvedba metilne ali hidroksi skupine na C16 mesto ter uvedba klora na C7 mesto. Specifične kombinacije zgoraj navedenih modifikacij lahko ali pa tudi ne vplivajo na jakost posamezne učinkovine. Za topikalne kortikosteroide so pomembne modifikacije kemijske strukture, ki vplivajo na farmakokinetiko. Z esterifikacijo OH skupin se lipofilnost poveča, bolj lipofilne učinkovine pa imajo večjo zmožnost absorpcije skozi kožo ter so tako primernejše za lokalno uporabo na koži. Primer take modifikacije je esterifikacija s propionsko kislino na mestih C17 ter C 21 v dipropionat (npr. betametazondipropionat) [41].

1.4.1.3 Jakost topikalnih kortikosteroidov

Kortikosteroidi za aplikacijo na koži so v razrede razvrščeni po jakosti glede na njihovo zmožnost kapilarne vazokonstrikcije [41]. Glede na anatomsko-terapevtsko-kemično (ATC) klasifikacijo zdravil so kortikosteroidi za topikalno aplikacijo razvrščeni v štiri razrede (*Tabela I*).

Topikalni kortikosteroidi z nizko jakostjo imajo zmerno protivnetno delovanje ter so najprimernejši za zdravljenje kroničnih bolnikov. Ti kortikosteroidi so tudi najvarnejši za uporabo na tanki koži obraza ter za zdravljenje kožnih obolenj pri dojenčkih ter majhnih otrocih. Pripravki kortikosteroidov s srednjo jakostjo se uporabljajo za zdravljenje zmernih vnetnih dermatoz ter se lahko uporabljajo tudi na obrazu ter ostalih predelih telesa, kjer je koža tanka (kjer se koža stika-npr med stegni, pod prsmi, med komolcem itd.), vendar samo za omejen čas trajanja terapije. Pripravki z visoko jakostjo se uporabljajo za zdravljenje hujših oblik dermatitisov ter luskavice. Njihova uporaba je prav tako omejena na krajši čas, razen na obolelih delih telesa, kjer je koža debelejša. Tam se lahko uporabljajo tudi za dolgotrajno terapijo. Kortikosteroidi z zelo visoko jakostjo se uporabljajo za zdravljenje hujših oblik kronične luskavice ter diskoidnega lupusa eritematozusa. Njihova uporaba je omejena zgolj na krajši čas ter na manjše površine kože [41].

Tabela I: Jakost topikalnih kortikosteroidov po ATC klasifikaciji, povzeto po [46, 47]

Razred I: Šibka jakost	Razred II: Srednja jakost	Razred III: Visoka jakost	Razred IV: Zelo visoka jakost
Metilprednizolon Hidrokortizon Prednizolon	Klobetazon Hidrokortizonbutirat Flumetazon Fluokortin Fluperolon Fluorometolon Flupredniden Dezonid Triamcinolon Alklometazon Hidrokortizonbutepirat Deksametazon Klokortolon Kombinacije kortikosteroidov	Betametazon Fluklorolon Dezoksimetazon Fluokinolonacetamid Fluokortolon Diflukortolon Fludroksikortid Fluokinonid Budezonid Diflorazon Amcinonid Halometazon Mometazon Metilprednizolonaceponat Beklometazon Hidrokortizonaceponat Flutikazon Prednikarbat Difluprednat Ulobetazol	Klobetazol Halcinonid

1.4.1.4 Neželeni učinki topikalnih kortikosteroidov

Neželeni učinki, ki lahko nastopijo pri uporabi topikalnih kortikosteroidov, so lahko lokalni ali pa sistemski. Tveganje za pojav neželenih učinkov je odvisno od jakosti topikalnega kortikosteroida, pogostosti aplikacije, trajanja terapije, mesta aplikacije ter individualnih, od posameznega pacienta odvisnih faktorjev [45]. Lokalna aplikacija topikalnih kortikosteroidov na obolelo področje kože lahko zmanjša vsebnost kolagena v podkožju in tako vodi k tanjšanju kože ter pojavu modric, strij in razširjenih kapilar.

Dolgotrajna uporaba lahko povzroči tudi lokalno hipopigmentacijo ali hiperpigmentacijo kože, povečano poraščenost, depigmentacijo las ter neprijetne občutke na koži, kot so srbenje ter pekoči izpuščaji. Ker kortikosteroidi zavirajo delovanje imunskega sistema lahko pride tudi do pojava sekundarnih infekcij kože. Večina neželenih učinkov izgine v nekaj mesecih po prenehanju aplikacije topikalnih kortikosteroidov, medtem ko so nekatere spremembe kože, kot so strije ter razširjene kapilare nepovratne. Predvsem tanka koža obraza je dovzetna za pojav neželenih učinkov kortikosteroidov. Po dolgotrajni aplikaciji (nekaj tednov do mesecev) lahko pride do pojava aken ter perioralnega dermatitisa na območjih aplikacije kortikosteroidnih pripravkov.

Le redko lahko dolgotrajna (večtedenska do večmesečna) uporaba topikalnih kortikosteroidov visoke jakosti na večjih površinah poškodovane kože ter predvsem v kombinaciji z okluzivnim povojem vodi k sistemski absorpciji kortikosteroidov ter posledično sistemskim neželenim učinkom. Ti učinki so predvsem zaviranje osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza, ki uravnava izločanje hormonov iz skorje nadledvične žleze, Cushingov sindrom ter zmanjšana toleranca na ogljikove hidrate. Sistemski neželeni učinki izginejo po prekinitvi zdravljenja [44, 45].

1.5 METODE ZA DOLOČEVANJE KORTIKOSTEROIDOV V FARMACEVTSKIH OBLIKAH ZA TOPIKALNO UPORABO

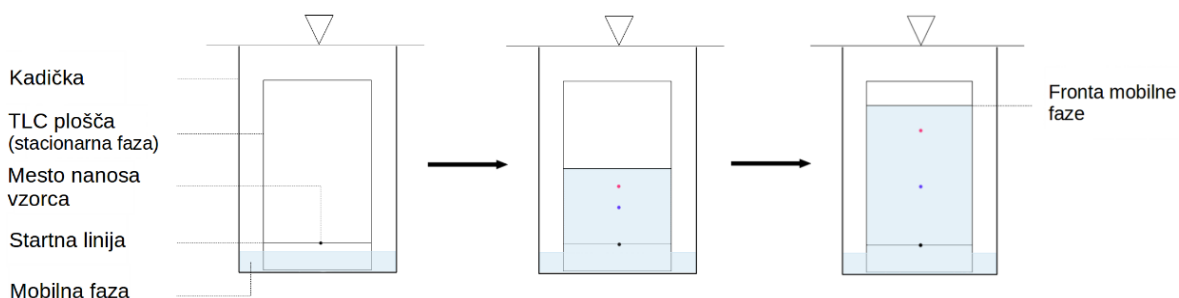
Za določevanje kortikosteroidov v farmacevtskih oblikah za topikalno uporabo se uporabljajo različne metode. Največkrat se za določevanje uporabljajo kombinacije kromatografskih ter spektrofotometričnih metod. Kromatografske metode, kot so tankoplastna kromatografija (TLC), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) ter plinska kromatografija (GC), se uporabljajo za ločitev kortikosteroidov od ostalih sestavin vzorca. Najbolj uporabljana izmed teh metod je HPLC, saj omogoča tudi kvantifikacijo kortikosteroidov iz vzorca. Kvalitativno določanje kortikosteroidov v vzorcih s kromatografskimi metodami se izvrši s primerjavo signalov vzorca s signali standardov posameznih kortikosteroidnih učinkovin. Če se signal vzorca ujema s signalom standarda, potem vzorec najverjetneje vsebuje isto spojino. Za potrditev identifikacije kortikosteroidov v vzorcu ter za identifikacijo kortikosteroidov za katere standardi niso na voljo, se uporabljajo spektroskopske metode kot so UV spektroskopija, infrardeča

spektroskopija (IRS), masna spektrometrija (MS) ter jedrska magnetna resonanca (NMR) [48, 49].

1.5.1 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastna kromatografija (TLC) je metoda za ločevanje ter kvalitativno in semi-kvantitativno določevanje komponent bolj ali manj kompleksnih zmesi. Metoda TLC je preprosta, hitra ter poceni, poleg tega pa je zaradi možnosti uporabe različnih stacionarnih in mobilnih faz ter reagentov za detekcijo lis tudi izjemno fleksibilna [50].

Ločevanje s TLC temelji na pojavu razporeditve analitov (topljenec) med stacionarno in mobilno fazo. Najpogosteje se mobilna faza premika v smeri navzgor po stacionarni fazi (ascendentna kromatografija), poznamo pa tudi metode pri katerih poteka razvijanje kromatograma v druge smeri (npr. vodoravno ter navzdol) [49]. Analiti se skupaj z mobilno fazo premikajo po stacionarni fazi navzgor s kapilarnim dvigom, pri čemer je razdalja, ki jo prepotuje posamezen analit, odvisna od njegove relativne afinitete do stacionarne oziroma mobilne faze (*Slika 3*) [50,51].



Slika 3: Razvoj kromatograma pri ascendentni kromatografiji

Stacionarno fazo najpogosteje predstavljajo večinoma anorganski materiali s porozno strukturo in relativno veliko specifično površino. Najpogosteje se kot stacionarna faza uporabljajo silikageli. Velikokrat je v stacionarno fazo dodan fluorescenčni indikator, ki po razvoju kromatograma omogoča detekcijo lis z UV svetlobo. Stacionarna faza je s pomočjo različnih anorganskih in organskih spojin pritrjena na podlago iz stekla, aluminija

ali plastike in vsi ti materiali skupaj sestavljajo t.i. TLC ploščo [49, 50, 51]. Učinkovitost stacionarne faze je odvisna od njene specifične površine in volumna por, povprečnega premera por, porazdelitve velikosti por, velikosti delcev ter porazdelitve velikosti delcev [50]. Posamezne stacionarne faze se med seboj ločijo tudi po polarnosti. Izbor posamezne stacionarne faze je odvisen od analita, kljub temu pa je v večini primerov stacionarna faza silikagel.

Izbor primernih topil ki sestavljajo mobilno fazo, je odvisen od kemijskih lastnosti analitov, ki jih z metodo TLC želimo ločiti ter uporabljene stacionarne faze [49]. Topila z nizkim vreliščem ter majhno viskoznostjo in toksičnostjo so najprimernejša kot mobilne faze. Nizko vrelišče omogoča lažje izhlapevanje mobilne faze s TLC plošče pred detekcijo, majhna viskoznost pa vpliva na krajši čas razvoja kromatograma [50].

Uspešnost metode TLC za določanje neznanih spojin v vzorcu, je v veliki meri odvisna od izbora primerne mobilne faze, ki zagotovi ustrezno ločljivost med posameznimi komponentami vzorca ter standardi s katerimi vzorec primerjamo [50]. Kako se bodo spojine premikale po TLC plošči, ki jo bomo pri tankoplastni kromatografiji uporabili, je odvisno od kapacitete elucije oz. moči mobilne faze. Kapaciteta elucije topila je definirana s sposobnostjo topila, da premakne določen analit ali skupino analitov po stacionarni fazi in je odvisna od polarnosti topila. Bolj polarno kot je topilo, višje se bodo nahajale spojine na polarni stacionarni fazi kot je npr. plošča iz silikagela in obratno [51]. Bolj polaren kot je analit, ki ga želimo z metodo TLC določiti, bolje bo interagiral s stacionarno fazo in se bo zato nahajal nižje na TLC plošči. Najpomembnejši faktor pri izboru primerne topila za mobilno fazo, je zagotavljanje velike ločljivosti med različnimi komponentami vzorca. V praksi izbor enega samega topila za mobilno fazo običajno ne zagotavlja zadostne ločljivosti med komponentami vzorca. Običajno zato mobilno fazo sestavlja več različnih topil z različno kapaciteto elucije. Z izborom primerne mešanice topil lahko dosežemo dobro ločljivost med posameznimi komponentami vzorca [49].

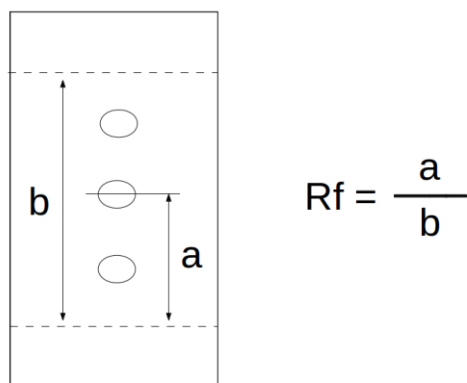
Po razvoju kromatograma je ločene spojine na TLC plošči potrebno detektirati. Po razvoju kromatograma je TLC ploščo najprej potrebno odstraniti iz kadičke, jo postaviti v digestorij ter počakati da mobilna faza izhlapi. Obarvane spojine lahko zatem vidimo na kromatogramu s prostim očesom, vendar pa večina spojin ne absorbira vidne svetlobe zato jih je potrebno detektirati na drugačen način [50].

Metode za detekcijo lis na TLC ploščah se delijo na fizikalne ter kemijske. Fizikalne metode se delijo na UV detekcijo, radiokemijsko detekcijo ter denziometrijo, ki se uporablja za kvantitativno vrednotenje kromatogramov. H kemijskim metodam spada oroševanje ali pomakanje kromatogramov v kemijske reagenti [49].

Veliko organskih spojin vsebuje enega ali več konjugiranih elektronskih sistemov, ki absorbirajo ultravijolično svetlobo. K tem sodijo npr. aromatske spojine ali spojine s konjugiranimi dvojnimi vezmi. Ta lastnost se izkorišča za detekcijo spojin na TLC ploščah, ki vsebujejo enega ali več različnih fluorescenčnih indikatorjev. Ti indikatorji so z UV svetlobo vzbujeni v višje energetske stanje, pri vračanju v osnovno stanje pa emitirajo vidno svetlobo. Spojine, ki UV svetlobo absorbirajo, so tako na zelenem ali modrem ozadju vidne kot temne lise [50].

Spojine, ki niso obarvane ali pa ne absorbirajo UV svetlobe, so po razvoju kromatograma detektirane z reagenti, ki so na TLC ploščo lahko naneseni na dva načina – z orositvijo ali pomakanjem [49]. Ena izmed prednosti metode TLC je širok izbor orositvenih reagentov, ki olajšajo identifikacijo neznane spojine. Barva produkta, ki nastane pri reakciji med spojino ter orositvenim reagentom, lahko namreč razkrije kemijsko strukturo neznane spojine [50]. Iz tega razloga so za identifikacijo posameznih skupin kemijskih spojin predpisani točno določeni orositveni reagenti, ki omogočajo lažjo detekcijo ter identifikacijo neznanih spojin na TLC plošči. Nekaj univerzalnih reagentov, ki se lahko uporabljajo za detekcijo večine organskih spojih, so raztopine žveplove kisline, raztopine žveplove kisline in acetanhidrida v različnih razmerjih ter raztopina žveplove in dušikove kisline [49]. Za pospešitev reakcije med orositvenim reagentom ter spojino, ki jo želimo detektirati, je velikokrat potrebno segrevanje. Za segrevanje se uporabljajo električne plošče. Najpogosteje se orošene TLC plošče segreva na temperaturi 100-120°C za 5-10min [50].

Mesto spojine, ki jo določamo na TLC plošči, je kvantitativno opredeljeno z retencijskim faktorjem (R_f). Retencijski faktor je enak razmerju med razdaljo od mesta nanosa vzorca na startni liniji do središča lise (a) ter razdaljo od startne linije do fronte mobilne faze (b) (*Slika 4*).



Slika 4: Izračun retencijskega faktorja (Rf)

Rf zavzema vrednost med 0, ko topljenec ostane na startni liniji ter 1, ko se topljenec premika s fronto mobilne faze. Rf za določeno spojino je vedno odvisen od kromatografskega sistema, torej stacionarne ter mobilne faze, ki jo pri analizi uporabimo. Zaželeno je, da se Rf za analit nahaja nekje med vrednostma 0,3 ter 0,7. Za ohranitev enake vrednosti Rf za določeno spojino v različnih eksperimentih, je potrebno zagotoviti enake kromatografske razmere, kot so stacionarna faza, sestava mobilne faze, temperatura ter volumen vzorca.

Večja kot je vrednost Rf, večjo razdaljo je spojina prepotovala na TLC plošči. Na podlagi vrednosti Rf lahko okvirno določimo kemijske karakteristike spojine. Pri primerjavi dveh spojin z različnima Rf, je tista spojina z večjim Rf manj polarna, saj manj interagira s polarno stacionarno fazo. Rf faktor se lahko uporablja kot orodje za določevanje neznanih komponent v vzorcu, pri čemer primerjamo standard spojine, ki jo želimo identificirati v vzorcu z vzorcem z neznano sestavo. Če se na TLC plošči nahajata dve lisi z enakim Rf, sta najverjetneje to isti spojini.

Z opazovanjem velikosti ter intenzitete lise, ki označuje določen analit v vzorcu, lahko semi-kvantitativno opredelimo njegovo količino v vzorcu. Za semi-kvantitativno določitev količine analita v vzorcu, je na TLC ploščo potrebno izmenjujoče nanesti raztopine standarda analita v različnih koncentracijah ter vzorec v kateremu želimo določiti koncentracijo analita. S primerjavo lise vzorca, ki pripada analitu z lisami standardnih raztopin, lahko izurjeno osebje na hiter način oceni koncentracijo analita v vzorcu [50].

2 NAMEN DELA

Cilj diplomske naloge je ugotoviti, ali mazilo Melem Dr. Vasića vsebuje primesi topikalnih kortikosteroidov, ki se sicer uporabljajo za zdravljenje kožnih bolezni kot so atopijski dermatitis ter luskavica. Melem Dr. Vasića je sodeč po napisu na embalaži mazilo naravnega izvora, pripravljeno iz rastlinskih izvlečkov ter čebeljih proizvodov. Namenjeno je zdravljenju kožnih obolenj. Sodeč po opisih učinkovitosti mazila s strani pacientov, ki so mazilo uporabljali sklepamo, da bi to lahko vsebovalo topikalne kortikosteroide.

Za določanje kortikosteroidov v Melemu Dr. Vasića bomo uporabili metodo tankoplastne kromatografije. Pred analizo Melema Dr. Vasića bomo na podlagi že preizkušenih metod iz literature poskušali optimizirati metodo tankoplastne kromatografije, tako da bo primerna za določitev primesi kortikosteroidov v poltrdnih farmacevtskih oblikah, kot so naravna mazila. Z optimizacijo bomo poskušali pridobiti metodo, ki bo zagotovila zadostno ločljivost med komponentami vzorca ter med različnimi kortikosteroidnimi učinkovinami. Optimizacijo metode tankoplastne kromatografije bomo opravili na vzorcih kreme Diprosone, ki je na recept na voljo v slovenskih lekarnah in vsebuje kortikosteroid betametazondipropionat.

Z optimizirano metodo tankoplastne kromatografije bomo nato določevali primesi kortikosteroidov v šestih vzorcih mazil Melem Dr. Vasića. Vzorce mazil so prijazno odstopili pacienti, ki so mazilo uporabljali. Vzorce mazil Melema Dr. Vasića bomo primerjali z vzorci krem iz lekarn, ki vsebujejo topikalne kortikosteroide. V kolikor bodo R_f lis kortikosteroidov v vzorcih krem iz lekarne enaki R_f katere izmed lis v vzorcih Melema Dr. Vasića, bomo analizo opravili tudi s standardom tega kortikosteroida. Rezultate analize bomo predstavili slikovno s fotografijami razvitih kromatogramov ter z izračunom retencijskih faktorjev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Pri delu v laboratoriju smo uporabili našteje kemikalije:

- Metanol (CH_3OH)
- Voda
- Diklorometan (CH_2Cl_2)
- Metilacetat ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$)
- Etilmetilketon ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$)
- Toluen (C_7H_8)
- Žveplova kislina (H_2SO_4)
- Ledocetna kislina – brezvodna očetna kislina ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)
- Anizaldehid ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$)
- 96% Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

3.1.2 Laboratorijske aparature

Laboratorijske aparature, ki smo jih pri delu uporabili so:

- Precizna tehtnica
- Analitska tehtnica
- Topla kopel BUCHI Heating Bath B-490 ter BUCHI Heating Bath B-491
- Stresalnik Tehtnica Vibromix 40
- Centrifuga Tehtnica Centric 400R
- Zamrzovalnik
- Rotavapor , vakuumska črpalka ter hladilni sistem: BUCHI Rotavapor R-200 oz. R- 210, BUCHI Vacuum Pump V-710 BUCHI Vacuum Controller V-850 ter Julabo F250
- Rezalnik TLC plošč OM Laboratory Chigasaki

- Plošča za segrevanje TLC plošč Camag TLC Plate Heater III
- TLC skener Camag Reprostar 3 ter programska oprema winCATS – Planar Chromatography Manager
- Digestorij

3.1.3 Laboratorijski pribor

Laboratorijski material, ki smo ga uporabili pri delu v laboratoriju:

- Steklovina: čaše 250 ml in 100 ml, erlenmajerice 250ml, 100 ml ter 50 ml, merilne pipete 50 ml, 10 ml, bučke 5 ml, zamaški
- Polnilna pipeta, BIOHIT m5000
- Mikrocentrifugirke 2 ml
- Centrifugirke 15 ml
- Mikropipete 1 – 5 μ l, Blaubrand intraMARK
- TLC plošče: TLC Silica gel 60 F₂₅₄, 20X20 cm, Merck
- Viale 2 ml, SUPELCO
- Membranski filtri 0,45 μ m, FRISENETTE ApS
- Injekcijske brizge 5 ml
- Nitrilne rokavice, Kimberley Clark
- Filter papir
- škarje
- Laboratorijska halja

3.2 METODE

Eksperimentalni del diplomske naloge je zajemal dva dela – optimizacijo metode za ugotavljanje primesi kortikosteroidov v mazilih z naravnimi izvlečki ter ugotavljanje primesi kortikosteroidov v Melemu Dr. Vasića. V obeh delih eksperimenta smo uporabili spodaj navedene metode.

3.2.1 Priprava standardov ter vzorcev

3.2.1.1 Priprava standardov

Standardi, ki smo jih uporabili pri delu v laboratoriju so bili:

- Standard betametazondipropionat
- Standard kortikosteron
- Standard kortikosteronacetat
- Standard prednizon

Standarde smo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici natehtali po 1 mg vsakega izmed standardov v mikrocentrifugirko. Standarde smo nato raztopili v metanolu (MeOH), tako da smo v mikrocentrifugirko z merilno pipeto odmerili 2 mL MeOH. Na ta način smo pripravili raztopine standardov v koncentraciji $c = 0,5 \text{ mg/mL}$.

3.2.1.2 Ekstrakcija kortikosteroidov iz vzorcev ter priprava ekstraktov za nanos na TLC ploščo

S spodaj opisano metodo ekstrakcije kortikosteroidov iz poltrdnih farmacevtskih izdelkov smo pripravili ekstrakte šestih različnih vzorcev Melema Dr. Vasića. Vzorce mazil nam je posredovala specialistka dermatovenerologije prim. Vlasta Dragoš, dr. med., iz otroškega oddelka na dermatovenerološki kliniki v Ljubljani. Vzorce krem so ji prijazno odstopili pacienti, ki so kremo uporabljali.

Z isto metodo smo pripravili tudi ekstrakte krem s kortikosteroidnimi učinkovinami, ki jih je z receptom mogoče dobiti v lekarnah v Sloveniji.

Kreme s kortikosteroidi, ki smo jih uporabili za pripravo vzorcev so navedene v tabeli (Tabela II) :

Tabela II: Kreme s kortikosteroidnimi učinkovinami iz lekarne, zdravilne učinkovine ki jih vsebujejo ter njihova koncentracija v kremah

Ime kreme	Zdravilna učinkovina	Koncentracija zdravilne učinkovine v kremi
Diprosone krema	Betametazondipropionat	0,64 mg/g
Advantan krema	Metilprednizolonaceponat	1 mg/g
Elocom krema	Mometazonfuroat	1 mg/g
Afloderm krema	Alklometazondipropionat	0,5 mg/g
Locoidon lipokrema	Hidrokortizonbutirat	1 mg/g

Ekstrakte smo pripravili po naslednjem postopku:

V 15 mL centrifugirke smo natehtali po 1 g oziroma 0,5 g vzorca, iz katerega smo želeli ekstrahirati kortikosteroidne zdravilne učinkovine. Natehtali smo po 1 g vsakega izmed vzorcev Melema Dr. Vasića ter krem Diprosone in Afloderm. Po 0,5 g smo natehtali kreme Advantan, Elocom ter Locoidon. Za različno zatehto smo se odločili zaradi razlike v koncentraciji kortikosteroidov v posameznih kremah. Koncentracije kortikosteroidov v kremah iz lekarne so navedene v tabeli (Tabela II). V centrifugirke smo z merilno pipeto odmerili 4 ml metanola (MeOH). Centrifugirke smo na vodni kopeli ($T=40^{\circ}\text{C}$) segrevali 10 min, nato pa jih na »mešalniku« stresali 5 min pri 250 rpm. Centrifugirke smo postavili v centrifugo ter jih 10 min centrifugirali pri 3500 rpm. Zatem smo jih položili v zamrzovalnik za 10 min, ter jih zaradi motnega supernatanta ponovno 10 min centrifugirali pri 3500 rpm. Bister supernatant smo s pipeto odpipetirali v bučke za rotavapiranje ter vsebino rotavapirali, dokler ni topilo izparelo. Med rotavapiranjem smo nastavili temperaturo vodne kopeli na 40°C , tlak pa smo postopoma zniževali iz 950 mbar na 5 mbar. Postopek rotavapiranja je potekal približno 50 min.

Po zaključku rotavapiranja smo v bučke, kjer se je nahajal suhi ostanek po rotavapiranju, odpipetirali 1 mL MeOH ter vsebino dobro premešali, dokler se suhi ostanek v bučkah ni popolnoma raztopil. Raztopine smo s pomočjo injekcijske brizge prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 μm v 2 mL vialah. Raztopine v vialah so predstavljale ekstrakte vzorcev, ki smo jih nanašali na TLC plošče.

Pri izvedbi ekstrakcije kortikosteroidov iz poltrdnih farmacevtskih pripravkov oz. pri pripravi ekstraktov vzorcev krem smo izhajali iz postopka opisanega v literaturi [52]. Optimizacijo postopka ekstrakcije smo najprej opravili na vzorcu kreme Diprosone ter vzorcu Melema Dr. Vasića št. 1. Ker je bil postopek ekstrakcije kortikosteroidov iz vzorcev opisan v literaturi [52] pomanjkljiv, smo najprej morali sami določiti nekaj parametrov, ki smo se jih kasneje med postopkom priprave vzorcev držali. Določili smo sledeče parametre:

- Temperatura vodne kopeli: $T = 40^{\circ}\text{C}$
- Število obratov mešalnika: $v = 350 \text{ rpm}$
- Število obratov centrifuge: $v = 3500 \text{ rpm}$

Optimizirali smo tudi zatehto vzorcev, ki smo jih uporabili za pripravo ekstraktov ter tudi volumen MeOH. Tako smo v centrifugirko namesto opisane zatehte $m=5 \text{ g}$ vzorca natehtali 1 g oz. 0,5 g vzorca. Za zmanjšanje mase vzorcev smo se odločili, ker smo za nadaljnjo analizo imeli le omejene količine vzorcev mazil Melema Dr. Vasića. V centrifugirko smo zaradi manjše mase vzorcev kreme dodali tudi manjši volumen MeOH. Volumen, ki smo ga dodali v centrifugirko je bil $V = 4 \text{ mL}$, namesto 20 mL MeOH opisanih v postopku.

Postopek za ekstrakcijo kortikosteroidov iz literature smo dodatno optimizirali tako, da smo v postopek vstavili dodaten korak. Po odstranitvi centrifugirk z vzorcem ter MeOH iz zamrzovalnika, smo jih še enkrat postavili v centrifugo ter centrifugirali 10 min pri 3500 rpm. Ta korak ni bil opisan v postopku iz literature.

Po rotavapiranju supernatanta nam je v bučki za rotavapiranje ostal ostanek bele barve ter »voskastega« videza. Ta ostanek smo nato raztopili v 1 mL MeOH in ne v 5 mL, kot je bilo opisano v postopku iz literature. Volumen MeOH smo zmanjšali za petkratno vrednost oz. za isti faktor, kot smo zmanjšali tudi zatehto kreme Diprosone ter volumen MeOH, ki

smo ga vzorcu kreme dodali. Raztopino vzorca smo filtrirali skozi membranski filter ter tako dobili ekstrakt vzorca, ki smo ga nanegli na TLC ploščo.

Da smo preverili kako je ekstrakcija iz kreme Diprosone potekla, smo ekstrakt nanegli na TLC ploščo ter jo razvili v mobilni fazi 1 (MF1). Po razvoju smo kromatogram orosili z orositvenim reagentom 1 (OR1) ter na ta način detektirali lise na kromatogramu.

3.2.2 Optimizacija metode tankoplastne kromatografije za ugotavljanje primesi kortikosteroidov v mazilih z naravnimi izvlečki

Pri razvoju metode TLC za določanje primesi kortikosteroidov v Melemu Dr. Vasića smo izhajali iz dveh postopkov opisanih v literaturi [52, 53]. Med postopkom optimizacije metode TLC smo izbrali primeren volumen za nanos ekstraktov vzorcev na stacionarno fazo, primerno sestavo mobilne faze in primerna orositvena reagentna za detekcijo lis na kromatogramu.

3.2.2.1 Določitev volumna ekstrakta za nanos na TLC ploščo

Tudi pri določanju volumna ekstrakta smo sledili navodilom za delo iz literature [52]. Za določitev primerne volumna smo uporabili ekstrakt kreme Diprosone. Na dve TLC plošči smo nanegli dva različna volumna ekstrakta – na prvo TLC ploščo 20 μL , na drugo TLC ploščo pa 5 μL . Obe TLC plošči smo razvili v mobilni fazi 1 (MF1) ter po osušitvi orosili z OR1. Kromatograma smo med seboj primerjali ter se na podlagi rezultatov odločili kakšen volumen ekstraktov bomo nanašali na TLC ploščo.

3.2.2.2 Izbor orositvenega reagenta za detekcijo lis na kromatogramu

Med optimizacijo metode TLC smo primerjali rezultate po orositvi kromatogramov z dvema različnima orositvenima reagentoma, ki so ju uporabili pri postopkih opisanih v literaturi [52, 53]. Najprej smo pripravili oba orositvena reagentna (OR) po spodaj opisanih postopkih.

Priprava orositvenega reagenta 1 (OR1): V digestoriju smo v 100 ml erlenmajerico nalili 50 ml ledocetne kisline ter ji dodali 0,5 ml anizaldehida. Rahlo smo jo pretresli ter v raztopino dodali še 11 ml žveplove kisline [52].

Priprava orositvenega reagenta 2 (OR2): V digestoriju smo v 100 ml erlenmajerico natočili 12 ml žveplove kisline ter 48 ml etanola. Tako smo dobili 20 % (V/V) raztopino žveplove kisline v etanolu [53].

Po pripravi smo oba OR prelili v erlenmajerici z nastavkom za pršenje, ki sta nam omogočali, da smo lahko OR enakomerno razpršili po TLC plošči.

Primerjavo obeh OR smo izvedli tako, da smo na dve TLC plošči nanесли 5 μ L ekstrakta kreme Diprosone ter kromatograma razvili v MF1. Po razvoju vsakega izmed kromatogramov smo počakali, da se je TLC plošča posušila. Zatem smo kromatograma enakomerno orosili z OR v za to namenjenem prostoru v digestoriju, ki je bil pripravljen iz kartonaste škatle in je onemogočal, da bi se kapljice OR pršile po celotnem digestoriju. Po orositvi smo počakali 15 minut, da sta se kromatograma posušila. Nato smo segreli električno ploščo za segrevanje kromatogramov. Kromatogram orošen z OR1 smo na njej segrevali 10 min pri temperaturi $T = 120^{\circ}\text{C}$. Drugi kromatogram, orošen z OR2 smo segrevali 5 min pri temperaturi $T = 110^{\circ}\text{C}$.

Po segrevanju smo počakali, da sta se kromatograma ohladila ter nato med seboj primerjali barve ter intenziteto lis na kromatogramih.

3.2.2.3 Izbor mobilne faze

V fazi optimizacije smo primerjali kromatograme pri uporabi treh različnih sestav mobilnih faz. Pri izbiri mobilnih faz (MF) smo izhajali iz postopkov opisanih v literaturi [52, 53].

Mobilne faze smo pripravili po naslednjih postopkih:

Priprava mobilne faze 1 (MF1): V digestoriju smo pripravili mešanico topil v razmerju: **diklorometan: metilacetat: voda = 100 : 50 : 50**. Fazi smo ločili s pomočjo lija ločnika ter spodnjo fazo shranili v erlenmajerici z obrusom. Uporabili smo jo kot MF1. MF1 je predstavljal diklorometan nasičen z vodo [52].

Priprava mobilne faze 2 (MF2): V digestoriju smo pripravili MF2 in sicer smo v erlenmajerici z obrusom topili zmešali med seboj v razmerju: **etilmetilketon : toluen = 40 : 60** [53].

Priprava mobilne faze 3 (MF3): MF3 smo pripravili tako, da smo razmerje topil iz MF2 spremenili v prid toluena. V digestoriju smo v erlenmajerici z obrusom pripravili mešanico v razmerju **etilmetilketon : toluen = 15 : 75**.

Med optimizacijo metode TLC smo želeli izbrati MF, pri kateri bi bila ločljivost med komponentami vzorca največja. MF smo med seboj primerjali tako, da smo na tri TLC plošče nanegli 5 µL ekstrakta kreme Diprosone ter vsako izmed njih razvili v eni izmed mobilnih faz. Po razvoju kromatogramov smo jih posušili na zraku ter orosili z OR2. Ko se je OR2 na kromatogramih posušil, smo kromatograme postavili na električno ploščo ter jih segrevali 5 min pri $T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lise na kromatogramih smo primerjali med seboj ter izbrali tistega, pri kateremu je bila ločljivost med komponentami vzorca največja.

Na novo TLC ploščo smo ponovno nanegli 5 µL ekstrakta kreme Diprosone, poleg tega pa tudi 5 µL ekstrakta Melema Dr. Vasića št. 1 ter 5 µL raztopin standardov betametazondipropionata, kortikosterona, kortikosteronacetata ter prednizona v koncentraciji $c = 0,5\text{ mg/mL}$. Kromatogram smo razvili v MF3, ga posušili ter orosili z OR2. Počakali smo da se je OR2 na kromatogramu posušil, ter ga 5 min segrevali na električni plošči pri $T = 110^{\circ}\text{C}$. S primerjavo lis standardov kortikosteroidnih učinkovin, ki smo jih v laboratoriju imeli na voljo ter ekstraktov kreme Diprosone in Melema Dr. Vasića št. 1 smo se želeli prepričati, če je razvoj kromatograma v MF3 zagotovil zadovoljivo ločljivost tudi med različnimi kortikosteroidnimi učinkovinami.

3.2.3 Ugotavljanje primesi kortikosteroidov v Melemu Dr. Vasića z metodo tankoplastne kromatografije

Za določanje kortikosteroidov v vzorcih smo uporabili optimizirano metodo tankoplastne kromatografije.

V nadaljevanju so navedeni materiali in postopki, ki opisujejo metodo TLC, s katero smo določevali prisotnost primesi kortikosteroidov v vzorcih Melema Dr. Vasića:

- Stacionarna faza: TLC Silica gel 60 F₂₅₄
- Kadička: steklena kadička
- Volumen nanesenih ekstraktov: 5 µL
- Aplikacija nanesenih ekstraktov: z mikropipeto, točkasta aplikacija
- Mobilna faza: etilmetilketon : toluen = 15 : 75 (V/V)
- Nasičenje kadičke: nasičenje kadičke s filter papirjem
- Dolžina razvoja kromatograma: l = 15 cm
- Približen čas razvoja kromatograma: t = 60 min
- Čas sušenja kromatograma po razvoju ter pred orositvijo: t = 15 min
- Detekcija z OR : za detekcijo lis na kromatogramih smo uporabili OR1 ter OR2
- Čas sušenja kromatograma po orositvi z OR: t = 15 min
- Segrevanje na električni plošči po orositvi z OR: T = 120 °C, t = 10 min za OR1,
T = 110°C, t = 5 min za OR2

Z opisano TLC metodo smo v digestoriju razvili več kromatogramov.

Najprej smo na TLC ploščo nanesli ekstrakt vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 in ekstrakte vseh krem iz lekarne, ki so vsebovale topikalne kortikosteroide. Po razvoju kromatograma smo ga orosili z OR2 ter primerjali lise, ki so pripadale Melemu Dr. Vasića št. 1 z lisami, ki so pripadale kortikosteroidom v kremah iz lekarn. Izračunali smo tudi retencijske faktorje za vse lise, ki so pripadale vzorcu Melema Dr. Vasića št. 1 ter kortikosteroidom iz krem iz lekarne.

Na naslednjo TLC ploščo smo nanesli ekstrakt kreme Diprosone, ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 1 ter raztopino standarda betametazondipropionata. Primerjali smo R_f lise standarda betametazondipropionata in R_f lise, ki je pripadala betametazondipropionatu iz kreme Diprosone z lisami vzorca Melema Dr. Vasića št.1.

Nato smo na dve TLC plošči nanesli vseh šest ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopino standarda betametazondipropionata. Po razvoju v MF3 smo lise na obeh kromatogramih detektirali z OR, tako da smo en kromatogram orosili z OR1, drugega pa z OR2. Lise ki so pripadale sestavinam v ekstraktih vzorcev Melema Dr. Vasića smo primerjali z liso standarda betametazondipropionata. Za oba kromatograma smo izračunali

Rf nekaterih lis, ki so pripadale vzorcem Melema Dr. Vasića ter standardu betametazondipropionata. Primerjali smo Rf lis na vsakemu izmed kromatogramov posebej, ter Rf lis na enem kromatogramu z Rf lis na drugem kromatogramu.

Nazadnje smo na TLC ploščo nanесли ekstrakte vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopino standarda betametazondipropionata tako, da smo zamenjali mesta vzorcev na TLC plošči. Po razvoju kromatograma v MF3 smo TLC ploščo orosili z OR1. Ponovno smo primerjali Rf lis, ki so pripadale vzorcem Melema Dr. Vasića, z Rf lis standarda betametazondipropionata.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 EKSTRAKCIJA KORTIKOSTEROIDOV IZ VZORCEV TER PRIPRAVA EKSTRAKTOV ZA NANOS NA TLC PLOŠČO

Pri izvedbi metode ekstrakcije kortikosteroidov iz poltrdnih farmacevtskih izdelkov smo se opirali na navodila opisana v literaturi [52].

Po postopku opisanem v literaturi so kortikosteroidi iz poltrdnih farmacevtskih izdelkov ekstrahirani z MeOH. Topila v raztopini so nato z rotavapiranjem odstranjena do suhega ostanka. Ekstrakt za nanos na TLC ploščo je pripravljen tako, da je suhi ostanek po evaporaciji topil ponovno raztopljen v MeOH.

V literaturi opisan postopek ekstrakcije kortikosteroidov je bil sledeč: Natehtajte 5 gramov vzorca poltrdnega farmacevtskega izdelka v centrifugirko ter mu dodajte 20 mL MeOH. Segrevajte v topli kopeli 10 minut ter nato na mešalniku mešajte 5 minut. Centrifugirajte 10 minut pri obratih med 3000 – 4000 rpm ter nato centrifugirko z vzorcem shranite v zamrzovalnik za 10 minut. Z rotavaporjem posušite bistri supernatant do suhega ostanka. Suhemu ostanku dodajte 5 mL MeOH ter filtrirajte raztopino skozi membranski filter [52].

Zaradi omejenih količin vzorcev Melema Dr. Vasića smo prilagodili maso zatehte vzorcev krem iz lekarne ter vzorcev Melema Dr. Vasića. Tako smo natehtali po 1 g vsakega izmed vzorcev Melema Dr. Vasića, kreme Diprosone in kreme Afloderm ter po 0,5 g krem Advantan, Elocom ter Locoidon. Vzorcem smo dodali 4 mL, suhemu ostanku po evaporaciji z rotavaporjem smo pa 1 mL MeOH. Zatehte krem iz lekarne, ki so vsebovale različne kortikosteroidne učinkovine, smo prilagodili tako, da bi bile koncentracije kortikosteroidov v vzorcih, ki smo jih nanašali na TLC ploščo v primeru 100 % izkoristka vseh ekstrakcij sledeče: koncentracije metilprednizolonaceponata, mometazonfuroata, alklometazondipropionata ter hidrokortizonbutirata bi bile 0,5 mg/mL, koncentracija betametazondipropionata pa 0,64 mg/mL.

Določili smo tudi nekaj ostalih parametrov, ki v postopku niso bili opisani. Tako smo določili temperaturo vodne kopeli ter število obratov mešalnika. Temperaturo vodne kopeli smo nastavili na 40 °C, število obratov mešalnika pa na 250 rpm. Za centrifugiranje smo določili število obratov 3500 rpm.

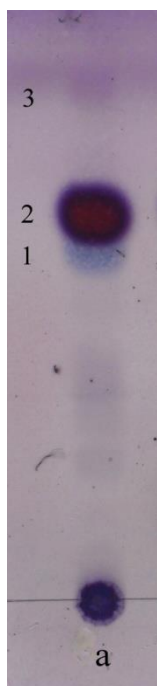
V opisan postopek smo uvedli tudi dodaten korak. Ko smo vzeli centrifugirko z vzorcem ter MeOH iz zamrzovalnika, smo jo ponovno 10 min centrifugirali pri 3500 obratih. Za ta korak smo se odločili, ker je bil supernatant, ko smo centrifugirko vzeli iz zamrzovalnika, moten. Po dodatnem centrifugiranju je supernatant postal bister. S centrifugiranjem smo dosegli ločitev supernatanta od vzorca kreme kar je omogočilo, da smo lahko odpipetirali supernatant iz centrifugirke v bučko za rotavapiranje.

Z rotavapiranjem smo iz supernatanta odstranjevali MeOH. Ta faza metode ekstrakcije je bila najbolj problematična, saj smo se pri delu večkrat srečali s težavami, predvsem pri pripravi vzorcev krem iz lekarne. Pri rotavapiranju je največ težav povzročalo občasno penjenje raztopine v bučki proti vratu bučke ter nastavku nameščenem med bučko ter rotavaporjem. Pri rotavapiranju supernatanta po ekstrakciji krem Elocom ter Afloderm smo imeli težave z odstranjevanjem topila iz bučke, saj ga nismo uspeli v celoti odstraniti iz nje. Pri pripravi ekstrakta kreme Afloderm smo imeli probleme tudi s kondenzacijo par topila že v steklenem nastavku, ki je povezoval bučko ter rotavapor. Pri rotavapiranju supernatanta po ekstrakciji kreme Locoidon se je med vretjem vsebina bučke penila ter uhajala v vrat bučke ter v steklen nastavek. Predvidevamo, da je pri tem vzorcu prišlo do izgub. Pri pripravi ekstrakta kreme Advantan ter ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića težav pri rotavapiranju nismo imeli.

Penjenje smo poskušali preprečiti z enakomernejšim in počasnejšim zniževanjem tlaka ter reguliranjem hitrosti vrtenja bučke, kar je težavo nekoliko omililo, vendar je ni povsem odpravilo. Uhajanje vsebine bučke proti rotavaporju je bila posledica prehitrega izhlapevanja topila iz bučke. Po opravljenem eksperimentalnem delu smo našli morebitno razlago za te težave. Eden izmed razlogov bi lahko bila temperatura vodne kopeli. Med rotavapiranjem smo le-to imeli nastavljeno na 40°C ter je med postopkom nismo spreminjali. V literaturi smo kasneje našli podatek, da je priporočljivo, da vodna kopel ne presega temperature 30°C, razen če želimo odstraniti manj hlapljiva topila [54]. Sklepali smo, da kljub penjenju vsebine iz bučke proti rotavaporju, pri večini vzorcev ni prišlo do večjih izgub trdih komponent vzorca, saj so se le-te »naložile« na stene vratu bučke in niso ostale v steklenem nastavku, ki je povezoval bučko ter rotavapor.

Ostanki v bučki po rotavapiranju so bili bele barve ter »voskastega« videza, zato smo sklepali, da so se iz vzorcev ekstrahirale tudi nekatere komponente mazilne podlage. Naša domneva se je potrdila po pregledu kromatograma vzorca kreme Diprosone, ki smo ga

razvili v MF1 ter orosili z OR1. Na kromatogramu smo opazili več lis, kar je pomenilo da se je iz vzorca kreme ekstrahiralo več sestavin. Na kromatogramu (*Slika 5*) smo opazili izrazitejše lise označene s št. od 1-3. Pod liso št. 1 smo opazili več lis, za katere pa nismo bili prepričani ali pripadajo kateri izmed drugih sestavin v vzorcu ali pa je bila le zaostanek zgornjih lis.



Slika 5: Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone (a)

Poleg zdravilne učinkovine betametazondipropionata je krema Diprosone vsebovala tudi naslednje pomožne snovi: klorokrezol, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, fosforjeva(V) kislina, natrijev hidroksid, tekoči parafin, beli vazelin, makrogol cetil stearil eter ter prečiščeno vodo [55] .

V tej fazi laboratorijskega dela nismo posvečali velike pozornosti identifikaciji lis, ki so pripadale ekstrahiranim sestavinam kreme in se tudi nismo obremenjevali z dejstvom, da se je iz kreme ekstrahiralo več sestavin. Pri nadaljnjem delu smo se osredotočili na izboljšanje ločljivosti med lisami na TLC plošči, ki so pripadali ekstrahiranim sestavinam. Doseg dobre ločljivosti med komponentami vzorca je namreč predpogoj za kvalitativno določanje posameznih sestavin v nadaljevanju dela.

4.2 OPTIMIZACIJA METODE TLC ZA UGOTAVLJANJE PRIMESI KORTIKOSTEROIDOV V NARAVNIH MAZILIH

4.2.1 Volumen ekstrakta za nanos na TLC ploščo

Pri izvedbi analize s tankoplastno kromatografijo smo sledili navodilom iz literature [52], zato smo na TLC ploščico najprej nanесли 20 μL ekstrakta kreme Diprosone. Pri analizi smo kot mobilno fazo uporabili MF1, kot orositveni reagent pa OR1. S številko 1 je označena največja ter najbolj intenzivno obarvana lisa na TLC plošči, pod njo pa se je razvrstilo več drugih, slabše vidnih lis (*Slika 6*). Zaradi velikosti, razpotegnjenosti ter nepravilne oblike lise št. 1 in zaradi večjega števila manjših lis pod njo smo sklepali, da smo na TLC ploščo nanесли preveliko količino ekstrakta. Metodo TLC smo ponovno izvedli tako, da smo na TLC ploščico nanесли štirikrat manjšo količino ekstrakta kreme Diprosone, torej 5 μL , ter jo razvili v MF1 ter orosili z orositvenim reagentom OR1. Na kromatogramu smo lahko opazili dve izrazitejši lisi, ki sta na kromatogramu označeni s št. 1 in 2 ter več manj izrazitih lis (*Slika 7*). Lisa št. 1 je bila modre barve ter slabše vidna. Tik nad njo se je nahajala večja lisa vijoličaste barve, ki smo jo označili s št. 2. Glede na njeno barvo smo sklepali, da bi lahko lisa št. 1 pripadala kortikosteroidni učinkovini. Z manjšo količino ekstrakta nanesenega na TLC ploščo smo dosegli večjo ločljivost med posameznimi komponentami vzorca. S tem smo tudi potrdili domnevo, da je na prvem kromatogramu (*Slika 6*) zaradi prevelike količine vzorca prišlo do prekrivanja lis. Na podlagi rezultatov smo se odločili, da bomo pri nadaljnji analizi za volumen nanosa posameznega ekstrakta uporabljali volumen 5 μL .



Slika 6: Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, V ekstrakta = 20 μ L (a)



Slika 7: Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, V ekstrakta = 5 μ L (b)

Podobne rezultate bi lahko dosegli tudi z zmanjšanjem koncentracije ekstrakta, kar bi lahko dosegli z raztapljanjem suhega ostanka po rotavapiranju v večjem volumnu MeOH. Da bi dobili enake rezultate, bi pri nanosu 20 μ L vzorca na TLC ploščo morali suhi ostanek po rotavapiranju raztopiti v štirikratnem volumnu metanola – v 4 mL. Ker pa je bil postopek nanašanja predvsem večjega volumna ekstrakta na TLC ploščo relativno dolgotrajen, smo se odločili, da bomo na kromatografsko ploščico nanašali manjši volumen ekstrakta, pri čemer le-tega ne bomo dodatno redčili.

4.2.2 Izbor orositvenega reagenta za detekcijo lis na kromatogramu

Za detekcijo lis na TLC ploščah smo uporabili dva različna orositvena reagenta. Kot OR1 smo uporabili mešanico ledocetne kisline, anizaldehida ter žveplove kisline, kot OR2 pa 20% raztopino žveplove kisline v etanolu.

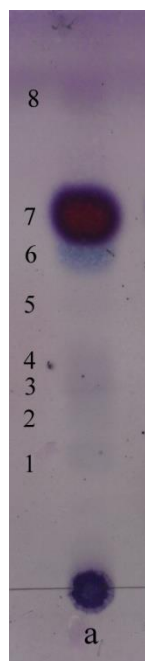
Najprej smo kot orositveni reagent uporabili OR1. Enak OR je bil uporabljen tudi pri postopku opisanem v literaturi [52]. OR1 je bil sestavljen iz ledocetne kisline, anizaldehida

ter žveplove kisline. V postopku iz literature so opisane predvidene barve lis, ki pripadajo posameznim kortikosteroidom. Sodeč po literaturi OR1 ne obarva vseh kortikosteroidov v eno barvo, temveč je barvno specifičen do posameznih kortikosteroidnih učinkovin. Obarvanje lis, ki pripadajo posameznim kortikosteroidom, je opisano v spodnji tabeli (*Tabela III*).

Tabela III: Barve lis nekaterih kortikosteroidov po orositvi z OR1 [52].

Kortikosteroid	Barva lise
Hidrokortizonacetat	Temno rjava
Deksametazon	Siva
Betametazon	Sivo-modra
Triamcinolonacetonid	Rumeno-zelena
Betametazon 17-valerat	Temno vijoličasta

Po orositvi z OR1 ter segrevanjem na vroči plošči smo posneli fotografijo kromatograma (*Slika 8*). Ozadje kromatograma se je po orositvi z OR1 obarvalo v roza barvo. S številčkama 6 ter 7 sta označeni dve dobro vidni lisi. Lista št. 6 je modre barve in zanjo smo sklepali da bi lahko pripadala kateri izmed kortikosteroidnih učinkovin. Pod lisama št. 6 ter 7 smo opazili lise, ki jih označujejo številke od 1 do 5. To so slabše vidne lise vijoličaste barve, glede katerih se nismo popolnoma opredelili ali vsaka lisa posebej označuje določeno spojino ali pa vse lise skupaj od št. 1-5 predstavljajo zaostanek zgornjih lis na kromatogramu. Na kromatogramu smo opazili še eno liso na območju fronte mobilne faze, ki smo jo označili s št. 8. Po orositvi z OR1 smo torej na kromatogramu opazili poleg dveh izrazitejših lis še večje število bledih, slabše vidnih lis (*Slika 8*). Odločili smo se da bomo TLC analizo ponovili ter detekcijo lis izvedli z orositvenim reagentom OR2.



Slika 8: Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone po orositvi z OR1 (a)



Slika 9: Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone po orositvi z OR2 (b)

Kot OR 2 smo uporabili 20% raztopino žveplove kisline v etanolu. Po orositvi z OR2 ter segrevanju smo kromatogram fotografirali (*Slika 9*). Ozadje kromatograma po orositvi z OR2 ni bilo obarvano. Na kromatogramu smo opazili dve lisi. Lisa št. 1 se je po segrevanju kromatograma obarvala v modro barvo, lisa št. 2, ki se je nahajala tik nad njo pa v rumeno barvo. Ostale lise, ki smo jih pred tem opazili na kromatogramu po orositvi z OR1 (*Slika 8*) niso bile vidne. Opazili smo le slabše vidno liso svetlo sive barve, ki se je raztezala pod liso označeno s številko 1.

Lise po orositvi z OR1 so bile intenzivneje obarvane, medtem ko so bile barve lis po orositvi z OR2 manj intenzivne. Med kromatogramoma so bile tudi opazne razlike v barvah pri močnejše obarvanih, »glavnih« lisah. Pri prvem kromatogramu (*Slika 8*) sta si bili lisi označeni s št. 6 ter 7 barvno bolj sorodni (temno modra ter temno vijoličasta barva), medtem ko sta se na drugem kromatogramu (*Slika 9*) lisi, ki sta pripadali istim komponentam vzorca ter bili označeni s št. 1 ter 2 barvno jasno razlikovali (temno modra ter rumena barva). Na prvem kromatogramu (*Slika 8*) smo opazili več slabše vidnih svetlo vijoličastih lis, zato smo sklepali, da je OR1 mogoče manj specifičen reagent do

kortikosteroidnih učinkovin kot OR2. Zaradi prednosti ter slabosti obeh orositvenih reagentov smo se odločili, da bomo pri analizi vzorcev Melema Dr. Vasića uporabili oba.

Orositvena reagentna, ki smo ju uporabili za določanje lis, spadata k univerzalnim OR za določevanje organskih spojin. Raztopina anizaldehida, ledocetne kisline ter žveplove kisline je namenjena za detekcijo steroidov, sterolov, fenolov, sladkorjev ter terpenov, raztopina žveplove kisline v etanolu pa za splošno detekcijo organskih spojin [49, 56]. V postopku, ki nam je predstavljal vodilo pri izvedbi optimizacije metode TLC, je bil kot drugi OR, ki so ga pri delu uporabili, navedena bazična raztopina tetrazolnega modrega. Ta orositveni reagent je specifičen za kortikosteroide. Pripravljen je iz 0,2% raztopine tetrazolnega modrega v metanolu ter 12% raztopine natrijevega hidroksida (NaOH) v MeOH, zmešanima v razmerju 1:3. Po orositvi ter segrevanju obarva lise, ki pripadajo kortikosteroidom v modro barvo. Zaradi specifičnosti smo pri delu želeli uporabiti ta priporočeni OR, vendar tetrazolnega modrega v laboratoriju nismo imeli na voljo.

Tudi pri nekaterih drugih eksperimentih opisanih v literaturi, npr. pri določanju kortikosteroidov v kozmetičnih izdelkih so za detekcijo lis, ki pripadajo kortikosteroidom, uporabili dva različna orositvena reagentna in sicer 20% raztopino žveplove kisline v etanolu ter raztopino tetrazolnega modrega [57]. V drugem eksperimentu so za določanje različnih steroidov, med njimi tudi kortikosteroidov, kot orositveni reagent uporabili 5% raztopino amonijevega molibdata ter žveplove kisline v vodi [58]. Pri TLC analizi krem tradicionalne kitajske medicine na vsebnost kortikosteroidov so uporabili kot OR prav tako raztopino žveplove kisline v etanolu, le da je bila raztopina 50% [59].

Zaradi lažjega določanja lis, ki bi lahko pripadale kortikosteroidom, smo se odločili, da bomo pri analizi uporabili oba orositvena reagentna, ki smo ju primerjali med optimizacijo metode.

4.2.3 Izbor mobilne faze

Z izborom primerne mobilne faze smo želeli doseči čim boljše ločljivost med posameznimi komponentami vzorca ter med različnimi kortikosteroidnimi učinkovinami. Dobra ločljivost med posameznimi komponentami vzorca ter kortikosteroidnimi učinkovinami je bistvenega pomena za zanesljivo določevanje neznanih spojin v vzorcih, ki smo jih

preiskovali v nadaljevanju eksperimentalnega dela. Med seboj smo primerjali tri različne mobilne faze ter se na podlagi rezultatov odločili, katero izmed njih bomo uporabili pri analizi vzorcev. Na tri TLC plošče smo nanесли ekstrakt kreme Diprosone ter jih razvili v treh mobilnih fazah. Kromatograme smo po razvoju orosili z orositvenim reagentom OR2.

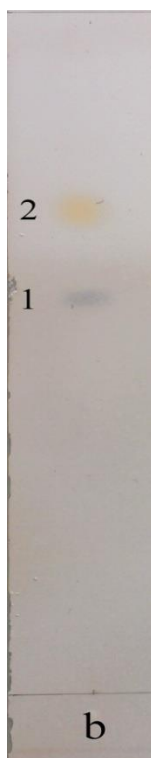
Najprej smo kromatogram razvili v MF1, ki so jo uporabili tudi v postopku iz literature [52]. Po orositvi z OR2 smo posneli fotografijo kromatograma (*Slika 10*). Na kromatogramu smo opazili dve lisi označeni s št. 1 ter 2. Kljub temu, da smo lisi lahko razločili zaradi razlike v njunih barvah, nismo bili zadovoljni z ločljivostjo med lisama in smo se zato odločili za ponoven razvoj kromatograma v drugi mobilni fazi.

Za MF2 smo uporabili mobilno fazo, ki je bila opisana v postopku za določanje kortikosteroidov v drugi literaturi [53]. MF2 sta sestavljali topili etilmetilketon ter toluen v razmerju 40 : 60 (V/V). Po orositvi z OR2 smo posneli fotografijo kromatograma (*Slika 11*). Lisi št. 1 ter 2 sta se tudi pri razvoju kromatograma v MF2 zdržali na približno isti višini na TLC plošči kot pri razvoju v MF1, vendar pa je se je ločljivost med lisama povečala. Izboljšala se je tudi oblika obeh lis, predvsem lise št. 1, zato smo sklenili, da je MF2 v primerjavi z MF1 ustrežnejša za ločbo.

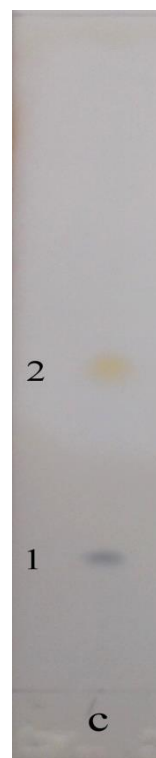
Zanimalo nas je, kako bi se spremenila R_f ter ločljivost med lisama, če bi spremenili razmerje med komponentama MF2. Pripravili smo MF3, tako da smo razmerje med etilmetilketonom ter toluenom obrnili v prid toluena. MF3 je bila sestavljena iz etilmetilketona ter toluena v razmerju 15 : 75 (V/V). Ker je toluen manj polaren od etilmetilketona, se je s spremenjenim razmerjem topil polarnost mobilne faze zmanjšala in zato smo pričakovali, da se bodo lise nahajale nižje na TLC plošči. Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, ki smo ga razvili v MF3 je prikazan na tretji fotografiji (*Slika 12*). Ločljivost med lisama št. 1 in 3 se je še povečala, obenem pa se je R_f zmanjšal.



Slika 10: Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, razvoj v MF1 (a)



Slika 11: Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, razvoj v MF2 (b)



Slika 12: Kromatogram ekstrakta kreme Diprosone, razvoj v MF3 (c)

Izračunali smo Rf za obe lisi v vseh treh mobilnih fazah. Primerjava med Rf lis označenih s št. 1 ter 2 na kromatogramih razvitih v različnih mobilnih fazah je prikazana v spodnji tabeli (*Tabela IV*).

Tabela IV: Primerjava retencijskih faktorjev (Rf) lis št. 1 ter 2 pri razvoju kromatogramov v mobilnih fazah različne sestave

Mobilna faza	Rf lise št. 1	Rf lise št 2
MF1	0,60	0,65
MF2	0,57	0,70
MF3	0,19	0,47

Zaradi največje ločljivost med lisama št. 1 in 2 (največja razlika med R_f) ter manjšega R_f smo se odločili, da bomo pri nadaljnji analizi kot razvijalno raztopino uporabili MF3.

Mobilne faze, ki smo jih uporabili pri optimizaciji TLC, so sestavljala naslednja topila: diklorometan nasičen z vodo (MF1) ter etilmetilketon in toluen (MF2). Polarnost navedenih topil narašča v vrstnem redu od najmanj polarnega do najbolj polarnega topila: toluen < diklorometan < etilmetilketon < voda [60, 61]. MF 1 je sestavljal diklorometan nasičen z vodo. Tako R_f kot ločljivost nista ustrezala za ločbo komponent vzorca. MF2 sta sestavljala etilmetilketon ter toluen v razmerju 40 : 60, MF3 pa v razmerju 15 : 75. Zaradi večjega razmerja toluena v MF3, ki je manj polarno izmed obeh topil, se je R_f obeh znižal. Prav tako se je zaradi spremembe razmerja med obema topiloma povečala tudi ločljivost med obema lisama. Pri zmanjševanju polarnosti mobilne faze s spreminjanjem razmerja med topili, ki jo sestavljajo, je potrebna pazljivost. Manj polarne mešanice namreč zmanjšajo R_f spojinam, ki jih določamo, obenem pa lahko tudi zmanjšajo ločljivost med spojinami v vzorcu [49]. Sestavo mobilne faze je potrebno prilagoditi tako, da je ločljivost med komponentami vzorca največja.

Kako se bodo analiti obnašali v določenem kromatografskem sistemu je vnaprej težko predvideti. S spreminjanjem razmerja med bolj polarnimi ter manj polarnimi topili v mobilni fazi lahko predvidimo kako se bo spreminjal R_f , vendar pa je vsako novo sestavo mobilne faze potrebno preizkusiti v praksi. Med postopkom optimizacije metode smo izbrali tisto mobilno fazo v kateri je bila ločljivost med komponentami vzorca največja.

Da bi preverili ločljivost različnih kortikosteroidov v uporabljenem kromatografskem sistemu smo v MF3 razvili še en kromatogram, na katerega smo nanesti nekaj standardov kortikosteroidov, ki so bili na voljo v laboratoriju ter ekstrakta kreme Diprosone ter vzorca Melema Dr. Vasića št. 1. Kot orositveni reagent smo uporabili OR2. Kromatogram je prikazan na spodnji fotografiji (*Slika 13*). Standardi, ki smo jih uporabili, so se na TLC plošči med seboj dobro ločili, kar je potrdilo ustrezen izbor mobilne faze.



Slika 13: Kromatogram ekstraktov kreme Diprosone, Melema Dr. Vasića št. 1 ter raztopin standardov kortikosteroidov, razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR2. Oznake vzorcev: krema Diprosone (a), Melem Dr. Vasića št. 1 (b), raztopina standarda betametazondipropionata (c), raztopina standarda kortikosterona (č), raztopina standarda kortikosteronacetata (d) ter raztopina standarda prednizona (e).

Pri MF2 ter MF3 smo na kromatogramih opazili pojav dodatne fronte, ki se je nahajala med obema lisama (*Slika 11*, *Slika 12*). Sklepali smo, da spodnja fronta pripada bolj polarnemu izmed obeh topil, etilmetilketonu, saj se polarna topila močneje vežejo na polarno stacionarno fazo kot je silikagel. Ozadje TLC plošče pod prvo fronto se je po orositvi obarvalo v rahlo temnejšo barvo. Pri pripravi MF2 ter MF3 smo opazili, da je etilmetilketon rahle, blede-rumene barve. Pri opisu lastnosti je etilmetilketon označen kot brezbarvna tekočina [62]. Glede na opis smo sklepali, da bi lahko obarvanost etilmetilketona, ki smo ga uporabili pri pripravi MF2 ter MF3, kazala na spremembe v kvaliteti uporabljenega topila.

Fried in Sherma omenjata, da je za pojav več front topila lahko krivo razmešanje topil v mobilni fazi. Vpliv pojava več front na rezultate TLC analize je zanemarljiv, razen v primeru, ko se lise nahajajo med dvema frontama topila. V tem primeru so rezultati za te lise izkrivljeni [50]. V našem primeru se je pri MF2 in MF3 med obema frontama nahajala lisa št. 2 (*Slika 11*, *Slika 12*). Ker smo sklepali, da lisa označena s št. 2 pripada

komponentam mazilne podlage kreme, se nam ni zdelo problematično, da se nahaja med frontama. TLC analiza, ki smo jo optimizirali, se je namreč osredotočala na kortikosteroidne učinkovine, ki so se nahajale pod prvo fronto topila (*Slika 13*). Pojav dveh front naj ne bi vplival na lise, ki se ne nahajajo med njima, in zato smo se odločili, da bomo kljub temu MF3 uporabili pri analizi vzorcev Melema Dr. Vasića.

Za mobilno fazo bi lahko izbrali tudi druga topila oz. kombinacij topil. Touchstone omenja benzen oz. mešanico benzena ter etilacetata v razmerjih 9:1 ali 2:1 kot primerne mobilne faze za ločitev steroidov [49]. V strokovnih člankih ter ostali literaturi smo dobili še več informacij o mobilnih fazah, ki so jih pri TLC analizah uporabili za določanje kortikosteroidov. Nekaj primerov sestave mobilnih faz, s katerimi bi lahko določili vsebnost kortikosteroidov v vzorcih Melema Dr. Vasića: diklorometan ter aceton v razmerju 3 : 1 (V/V) [63], etilacetat ter n-heksan v razmerjih 40 : 60 (V/V), 60 : 40 (V/V) ter 80 : 20 (V/V) [57] ter diklorometan : metanol : voda v razmerju 95 : 5 : 0,2 [59].

4.3 DOLOČANJE PRIMESI KORTIKOSTEROIDOV V MELEMU DR. VASIĆA Z METODO TANKOPLASTNE KROMATOGRFIJE

4.3.1 Opis vzorcev

Z metodo tankoplastne kromatografije smo želeli določiti ali vzorci Melema Dr. Vasića vsebujejo topikalne kortikosteroide.

Z optimizirano metodo smo analizirali šest vzorcev Melema Dr. Vasića, ki smo jih dobili od pacientov, ki so mazilo uporabljali. Vzorce smo prejeli bodisi v originalnem pakiranju ali pa v plastičnih posodicah z žličko namenjenih za zbiranje vzorcev. Vsi vzorci so imeli značilen vonj, ki je spominjal na mazilno podlago belobaza. Vzorci Melema Dr. Vasića so se med seboj razlikovali po barvi ter konsistenci. Vzorci so bili bele barve ali pa »prosojni«, njihova konsistenca pa podobna na kremi ali pa mazilu. Barva posameznega vzorca je opisana v spodnji tabeli (*Tabela V*).

Tabela V: Barva vzorcev Melema Dr. Vasića

Številka vzorca	Barva
Vzorec št. 1	Bela
Vzorec št. 2	Bela
Vzorec št. 3	Prosojna
Vzorec št. 4	Bela
Vzorec št. 5	Bela
Vzorec št. 6	Prosojna

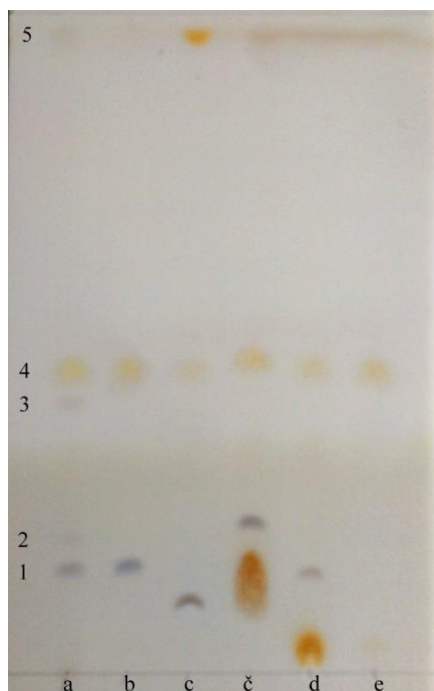
Na podlagi vizualnih ugotovitev smo predvidevali, da se sestava posameznih vzorcev Melema Dr. Vasića med seboj razlikuje. Sklepali smo, da je mazilna podlaga v vzorcih št. 3 ter 6 drugačna od preostalih vzorcev, saj je konsistenca teh dveh vzorcev spominjala na mazilo, medtem ko so ostali spominjali na kremo.

4.3.2 Rezultati analize Melema Dr. Vasića z metodo tankoplastne kromatografije

Z optimizirano metodo tankoplastne kromatografije smo analizirali ekstrakte vzorcev Melema Dr. Vasića ter jih primerjali z ekstrakti lekarniških krem s kortikosteroidi ter s standardi kortikosteroidov. Po razvoju smo kromatograme orosili z orositvenim reagentom, kar nam je omogočilo detekcijo lis. Pri interpretaciji rezultatov smo si pomagali s fotografijami kromatogramov, ki smo jih posneli po obarvanju z orositvenima reagentoma. Izračunali smo tudi retencijske faktorje bolj vidnih lis ter jih primerjali med seboj.

4.3.2.1 Kromatogram ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 ter ekstraktov krem s kortikosteroidi iz lekarn

Kromatogram, ki smo ga razvili, je prikazan na fotografiji (*Slika 14*). Ekstrakti si na kromatografski ploščici sledijo v naslednjem vrstnem redu: ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 1, ekstrakt kreme Diprosone (betametazondipropionat), ekstrakt kreme Advantan (metilprednizolonaceponat), ekstrakt kreme Elocom (mometazonfuroat), ekstrakt kreme Afloderm (alklometazondipropionat) ter ekstrakt lipokreme Locoidon (hidrokortizonbutirat). V oklepajih so napisane kortikosteroidne učinkovine, ki jih vsebujejo kreme iz lekarne. S številkami od 1 do 5 so na kromatogramu označene lise, ki pripadajo ekstraktu vzorca Melema Dr. Vasića št. 1.



Slika 14: Kromatogram ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 ter ekstraktov krem s kortikosteroidi iz lekarn, razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR2. Oznake ekstraktov: Melem Dr. Vasića št. 1 (a), krema Diprosone (b), krema Advantan (c), krema Elocom (č), krema Afloderm (d), lipokrema Locoidon (e).

Po detekciji lis ekstraktov smo njihov položaj opredelili tudi z izračunom Rf. Retencijski faktorji ki pripadajo posameznim ekstraktom so navedeni v tabeli (*Tabela VI*). Za ekstrakt vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 smo izračunali vse Rf, ki pripadajo lisam označenim s številkami od 1-5, medtem ko smo za ekstrakte lekarniških krem izračunali le Rf, za katere

smo predpostavili, da pripadajo kortikosteroidom. Za ekstrakt lipokreme Locoidon nismo na TLC plošči detektirali nobene lise, ki bi jo lahko pripisali kortikosteroidni učinkovini hidrokortizonbutirat (*Slika 14, Tabela VI*). Vzrok za to bi lahko bile težave, ki smo jih imeli pri pripravi ekstrakta, predvsem pri rotavapiranju topila iz supernatanta. Zaradi vrenja vsebine bučke za rotavapiranje, se je vsebina nabirala v vratu bučke ter steklenemu nastavku med bučko in rotavaporjem. Zaradi tega je mogoče prišlo do večje izgube hidrokortizonbutirata iz vzorca.

Tabela VI: Retencijski faktorji (Rf) lis ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića ter Rf, ki pripadajo kortikosteroidom iz krem iz lekarne

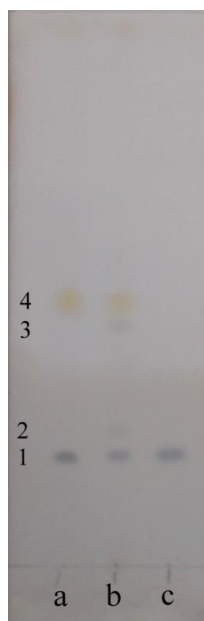
Ekstrakt	Oznaka ekstrakta	Oznaka lise	Rf
Melem Dr. Vasića št. 1	a	1	0,15
		2	0,19
		3	0,40
		4	0,50
		5	0,96
Diprosone krema (betametazondipropionat)	b		0,15
Advantan krema (metilprednizolonaceponat)	c		0,11
Elocom krema (mometazonfuroat)	č		0,22
Afloderm krema (alklometazondipropionat)	d		0,14
Locoidon lipokrema (hidrokortizonbutirat)	e		-

Za lise, ki pripadata komponentam ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 in sta označeni s števkama 4 ter 5 smo sklepali, da predstavljata dele mazilne podlage. Podobne lise z istim Rf ter iste barve smo namreč opazili tudi pri ostalih ekstraktih lekarniških krem.

Preostale lise, ki so označene s števkami 1, 2 ter 3 smo primerjali z lisami, ki označujejo kortikosteroidne učinkovine iz lekarniških krem. Lis označenih s št. 2 ter 3 nismo povezali z nobeno kortikosteroidno učinkovino iz lekarniških krem. Iz slike (*Slika 14*) ter preglednice (*Tabela VI*) je razvidno, da se lisa št. 1 po barvi ter Rf najbolj ujema z liso, ki ustreza učinkovini betametazondipropionat, ki je zdravilna učinkovina v kremi Diprosone. Na podlagi te ugotovitve smo se odločili, da ekstrakt vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 primerjamo s standardom betametazondipropionata.

4.3.2.2 Kromatogram ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića, ekstrakta kreme Diprosone ter standarda betametazondipropionata

Po primerjavi ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića z ekstrakti krem iz lekarne, smo se odločili, da ekstrakt vzorca Melema Dr. Vasića poleg ekstrakta kreme Diprosone primerjamo tudi s standardom betametazondipropionata. Na TLC ploščo smo nanegli po 5 μL vsakega izmed ekstraktov, jo razvili v MF3 ter orosili z OR2. Kromatogram ki smo ga dobili po orositvi z OR2 je prikazan na spodnji fotografiji (*Slika 15*). Na kromatografsko ploščico smo nanegli vzorce v sledečem zaporedju: ekstrakt kreme Diprosone , ekstrakt vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 ter raztopino standarda betametazondipropionata. Številke od 1 do 4 označujejo lise ki pripadajo komponentam vzorca Melema Dr. Vasića.



Slika 15: Kromatogram ekstraktov kreme Diprosone, vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 ter raztopine standarda betametazondipropionata, razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR2. Oznake vzorcev: krema Diprosone (a), Melem Dr. Vasića št. 1 (b), raztopina standarda betametazondipropionata (c).

V tabeli so predstavljeni Rf, ki pripadajo lisam vzorcev na kromatogramu (*Tabela VII*). Za ekstrakt vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 smo izračunali Rf za vse lise, medtem ko smo za ekstrakt kreme Diprosone izračunali samo za liso označeno s št. 1, ki je pripadala betametazondipropionatu.

Tabela VII: Retencijski faktorji (Rf) lis ekstrakta kreme Diprosone, ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića št 1 ter raztopine standarda betametazondipropionata.

Vzorec	Oznaka vzorca	Oznaka lise	Rf
Ekstrakt kreme Diprosone (betametazondipropionat)	a		0,19
Ekstrakt vzorca Melema Dr. Vasića št. 1	b	1	0,19
		2	0,25
		3	0,43
		4	0,47
Standard betametazondipropionat (c = 0,5 mg/mL)	c		0,19

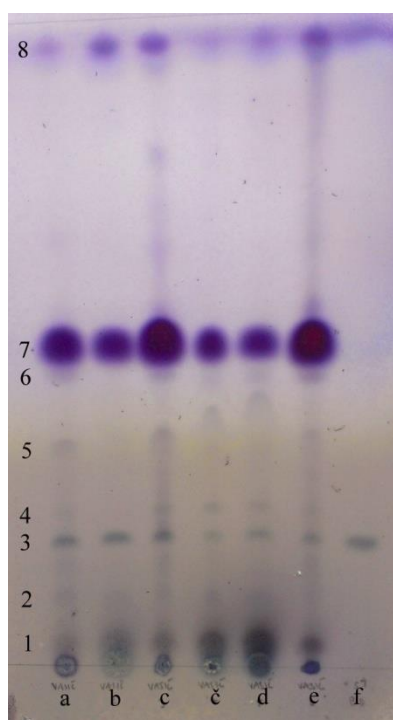
Kot pri prejšnjem kromatogramu smo sklepali, da lisa označena s številko 4 pripada komponentam mazilne podlage. Lisa označena s št. 1 se po barvi, obliki (*Slika 15*) ter po R_f (*Tabela VII*) ujema z liso, ki predstavlja standard betametazondipropionata. Prav tako se ujema tudi z liso, ki označuje kortikosteroid betametazondipropionat iz kreme Diprosone. Zato smo sklepali, da vzorec Melema Dr. Vasića št. 1 vsebuje kortikosteroid betametazondipropionat.

Lisi, ki označujeta betametazondipropionat pri vzorcih označenih z **a** ter **c** sta podobne jakosti. Lisa št. 1, ki pripada betametazondipropionatu iz vzorca Melema Dr. Vasića, je po jakosti šibkejša od lis, ki pripadata standardu betametazondipropionata ter betametazondipropionatu iz kreme Diprosone. Predvidevamo, da je vsebnost betametazondipropionata v Melemu Dr. Vasića manjša kot v kremi Diprosone, vendar pa semi-kvantitativne ocene vsebnosti betametazondipropionata v vzorcu Melema Dr. Vasića nismo uspeli podati zaradi več razlogov. Semi-kvantitativnega določanja nismo izvedli, saj med seboj nismo primerjali lis, ki bi pripadale raztopinam standarda betametazondipropionata v različnih koncentracijah. Če bi na TLC ploščo nanegli raztopine standarda v različnih koncentracijah, bi lahko primerjali velikost ter intenziteto barve lis v odvisnosti od koncentracije. Ker tega nismo naredili, nismo vedeli, kako se lise na kromatogramu spreminjajo v odvisnosti od koncentracije betametazondipropionata. Prav tako primerjava med lisama za betametazondipropionat v vzorcih Melema Dr. Vasića št. 1 ter v kremi Diprosone ni najbolj ustrezna, saj ne vemo kakšen je bil izkoristek ekstrakcije kortikosteroidov iz kreme Diprosone. Prav tako ne vemo, če so se kortikosteroidi v enaki meri ekstrahirali iz mazilne podlage kreme Diprosone ter iz Melema Dr. Vasića. Zaradi teh razlogov vsebnosti betametazondipropionata v vzorcu Melema Dr. Vasića št. 1 nismo opredelili semi-kvantitativno. Za ugotavljanje vsebnosti kortikosteroida v vzorcu bi bila primernejša metoda, ki omogoča zanesljivo kvantitativno določitev kot je npr. metoda HPLC.

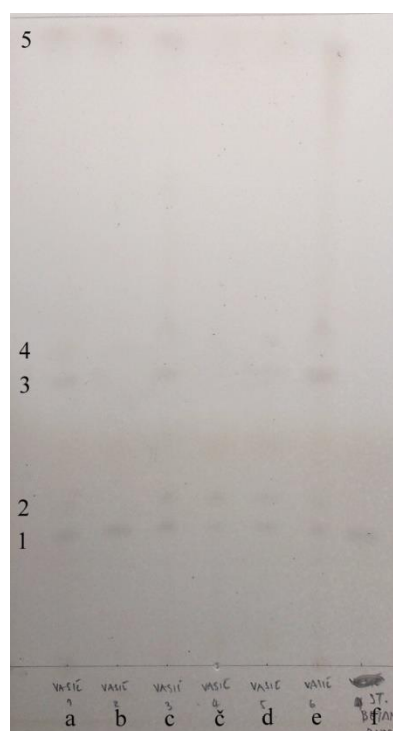
4.3.2.3 Kromatogram vseh vzorcev Melema Dr. Vasića ter standarda betametazondipropionata

Vseh šest vzorcev Melema Dr. Vasića ter standard betametazondipropionata s koncentracijo $c = 0,5 \text{ mg/mL}$ smo nanegli na dve kromatografski ploščici. Kromatograma smo razvili v mobilni fazi MF3.

Ko se je TLC plošča posušila smo enega izmed kromatogramov orosili z OR1 (Slika 16), drugega pa z OR2 (Slika 17).



Slika 16: Kromatogram ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR1



Slika 17: Kromatogram ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata razvit v mobilni fazi MF3 ter orošen z OR2

Oznake vzorcev: Ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 1 (a), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 2 (b), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 3 (c), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 4 (č), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 5 (d), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 6 (e), raztopina standarda betametazondipropionata (f).

Tako kot med optimizacijo metode TLC smo tudi pri analizi ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića po orositvi z OR opazili da se OR med seboj razlikujeta v specifičnosti. Na

prvem kromatogramu prikazanem na sliki (*Slika 16*) smo opazili več različnih lis, ki smo jih označili s št. od 1 – 8. Pri nekaterih vzorcih (predvsem pri vzorcih **a**, **c** ter **e**) smo opazili »obarvane linije«, ki so po TLC plošči potovale od mesta nanosa vzorca do fronte mobilne faze. Vse lise so bile močnejše obarvane v primerjavi s kromatogramom orošenim z OR2. Na slednjem smo po orositvi opazili manjše število lis, ki smo jih označili s števkami od 1-5 (*Slika 17*). Vse lise so bile bolj blede oz. slabše obarvane. Vsem ekstraktom vzorcev Melema Dr. Vasića so bile skupne lise označene s števkama 7 ter 8 (*Slika 16*) oz. 4 ter 5 (*Slika 17*). Na podlagi primerjave ekstrakta vzorca Melema Dr. Vasića št. 1 z ekstraktom kreme Diprosone ter ekstrakti ostalih krem iz lekarne sklepamo, da obe lisi pripadata komponentam podlage mazila (*Slika 14*).

Za liso označeno s št. 8 (*Slika 16*) oz. št. 5 (*Slika 17*) smo, glede na to, da je potovala skupaj z mobilno fazo, sklepali da pripada lipofilnim komponentam mazila.

Lisi št. 1 ter 2 na prvem kromatogramu (*Slika 16*) sta bili vidni po orositvi z OR1, po orositvi z OR2 pa ne (*Slika 17*). Lahko bi pripadale komponentam mazilne podlage vzorcev Melema Dr. Vasića.

Na mestu označenem s št. 3 (*Slika 16*) oz. s št. 1 (*Slika 17*) se je nahajala lisa, ki je pripadala raztopini standarda betametazondipropionata s koncentracijo $c=0,5$ mg/mL (vzorec f). Na istem mestu smo opazili lise pri vseh ekstraktih vzorcev Melema Dr. Vasića, zato smo sklepali, da vsi vzorci vsebujejo kortikosteroid betametazondipropionat. Jakost obarvanosti lis, ki so pripadale betametazondipropionatu, se je pri ekstraktih vzorcev razlikovala. Pri vzorcih označenih s črkami a, b ter c so bile lise obarvane močnejše, medtem ko so bile pri vzorcih č, d ter e obarvane šibkeje. Kljub manjšim razlikam v jakosti obarvanja lis med posameznimi ekstrakti vzorcev Melema Dr. Vasića, so bile lise po jakosti podobne tisti, ki je pripadala raztopini standarda betametazondipropionata.

Na mestu označeni s št. 4 (*Slika 16*) oz. s št. 3 (*Slika 17*) smo opazili blede lise modre oz. svetlo sive barve pri vseh ekstraktih vzorcev Melema Dr. Vasića razen pri ekstraktu vzorca št. 2, ki je na kromatogramih označenem s črko b. Lise nismo povezali z nobeno kortikosteroidno učinkovino, ki smo jo analizirali iz preostalih lekarniških krem (*Slika 14*). Glede na R_f ter barvo bi lahko pripadala kateri drugi kortikosteroidni učinkovini, ki je nismo analizirali. Mogoče je, da pripada kakšni naravni spojini, saj naj bi bil Melem Dr. Vasića izdelan iz izvlečkov zdravilnih rastlin ter čebeljih proizvodov.

Modre lise na mestu št. 5 so bile vidne samo po orositvi z OR1 in so bile prisotne pri vzorcih **a**, **c** ter **e** (*Slika 16*). Pri vzorcih **č** ter **d** smo opazili lisi, ki sta se na TLC plošči ustavili nekje med mestoma 5 ter 6. Za nobeno izmed lis ne vemo katerim spojinam bi lahko pripadale.

Na prvem kromatogramu (*Slika 16*) so bile tik pod najmočnejše obarvanimi lisami na mestu 7 opazne manjše lise blede vijoličaste barve, ki smo jih označili s št. 6. Opazili smo jih lahko pri vzorcih **a**, **c** ter **e**, kjer so bile malo izrazitejše kot pa pri vzorcih **č** ter **d**. Pri vzorcu **b** lise nismo opazili. Podobne lise sive barve označene s št. 3 smo opazili tudi na kromatogramu po orositvi z OR2 (*Slika 17*) in sicer pri vzorcih **a**, **c** ter **e**.

Izmed vseh ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića je najbolj izstopal ekstrakt vzorca št. 2 (označen s črko **b**), saj v ekstraktu ni bilo prisotnih komponent označenih s št. 4, 5 ter 6 na prvem kromatogramu (*Slika 16*), oz. št. 2 ter 3 na drugem kromatogramu (*Slika 17*). V ekstraktih vzorcev št. 4 ter 5 (označenih s **č** ter **d**) ni bilo komponente označene s št. 5, se je pa na TLC plošči pri teh dveh ekstraktih nahajala dodatna lisa, nekje med mestom št. 5 ter 6. Ekstrakti vzorcev št. 1, 3 ter 6 (označeni s črkami **a**, **c** ter **e** na kromatogramih) so imeli skupne vse zgoraj opisane lise.

Glede na razlike v rezultatih pri posameznih ekstraktih vzorcev smo sklepali, da so se posamezni vzorci Melema Dr. Vasića razlikovali v sestavi. O različni sestavi vzorcev smo domnevali že pred analizo, pri vizualnem primerjanju izgleda ter konsistence posameznih vzorcev. Pri primerjavi videza vzorcev Melema Dr. Vasića z rezultati TLC analize nismo potegnili nobene vzporednice. Sklepali smo, da je bil videz vzorcev odvisen od komponent ki se med postopkom ekstrakcije niso izločile v MeOH.

Za oba kromatograma smo izračunali Rf lis. Izračunani Rf so predstavljeni v tabelah (*Tabela VIII*, *Tabela IX*). Lise iz prve tabele označene s št. 3, 4 ter 6 (*Tabela VIII*) ter lise iz druge tabele označene s št. 1, 2 ter 3 (*Tabela IX*) pripadajo istim komponentam ekstraktov vzorcev. Lisa označena s št. 5 iz prve tabele na kromatogramu orošenem z OR2 ni bila vidna.

Tabela VIII: Retencijski faktorji lis ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata na kromatogramu orošenem z OR1 (Slika 16)

Vzorec	Oznaka vzorca	Oznaka lise ter pripadajoči Rf			
		3	4	5	6
Melem Dr. Vasić št. 1	a	0,19	0,23	0,34	0,45
Melem Dr. Vasić št. 2	b	0,20	-	-	-
Melem Dr. Vasić št. 3	c	0,20	0,25	0,35	0,45
Melem Dr. Vasić št. 4	č	0,20	0,25	-	0,45
Melem Dr. Vasić št. 5	d	0,20	0,25	-	0,45
Melem Dr. Vasić št. 6	e	0,20	0,25	0,35	0,45
St. betametazondipropionat	f	0,19	-	-	-

Tabela IX: Retencijski faktorji (Rf) ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata na kromatogramu orošenem z OR2 (Slika 17).

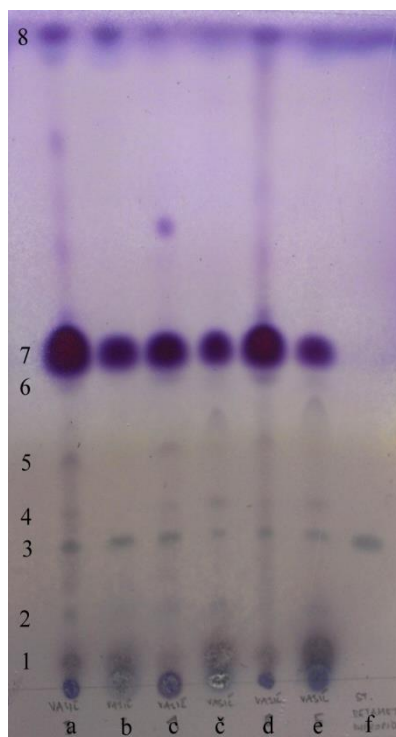
Vzorec	Oznaka vzorca	Oznaka lise ter pripadajoči Rf		
		1	2	3
Melem Dr. Vasić št. 1	a	0,21	0,25	0,41
Melem Dr. Vasić št. 2	b	0,21	-	-
Melem Dr. Vasić št. 3	c	0,21	0,26	0,42
Melem Dr. Vasić št. 4	č	0,21	0,26	-
Melem Dr. Vasić št. 5	d	0,21	0,25	0,41
Melem Dr. Vasić št. 6	e	0,21	0,25	0,41
St. betametazondipropionat	f	0,21	-	-

Z izračunom Rf posameznih lis v ekstraktih smo potrdili naše sklepanje o identiteti lise št. 3 (Tabela VIII) oz. lise št. 1 (Tabela IX). V drugi tabeli se Rf standarda betametazondipropionata ujema z Rf lise št. 1 v ekstraktih Melema Dr. Vasića. V prvi tabeli so med vrednostmi Rf za st. betametazondipropionata ter lise št. 3 manjše razlike vendar pripadajo isti spojini – betametazondipropionatu.

Primerjali smo Rf vrednosti za st. betametazondipropionata ter Rf lis ekstraktov Melema Dr. Vasića ki so pripadale betametazondipropionatu med obema kromatogramoma. Opazili smo razlike v vrednostih Rf pri kromatogramih. Do razlike bi lahko prišlo zaradi nekonstantnih kromatografskih razmer. Sklepali smo, da je največji vpliv pri razliki v Rf imela nasičenost kadičke s hlapi mobilne faze oz. spremenjena sestava mobilne faze v kadički. Za razvoj obeh kromatogramov smo uporabili isto mešanico mobilne faze, ki smo jo v kadičko nalili pred razvojem prvega kromatograma. Vrednosti Rf bi lahko popravili tako, da bi pred vsakim razvojem kromatogramov nalili svežo mobilno fazo ter počakali enako število minut preden bi vanjo potopili TLC ploščo. Tako bi zagotovili enako sestavo mobilne faze ter enako nasičenost kadičke s hlapi mobilne faze.

4.3.2.4 Kromatogram vseh ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter standarda betametazondipropionata z zamenjavo mesta na TLC plošči

Še enkrat smo ponovil TLC analizo tako da smo na TLC ploščo nanegli ekstrakte Melema Dr. Vasića ter st. betametazondipropionata v drugačnem zaporedju. S spremembo vrstnega reda vzorcev smo želeli izključiti vpliv mesta vzorca na TLC plošči na Rf posameznih komponent vzorcev. Kromatogram smo razvili v MF3, lise pa detektirali z orositvijo z OR1. Kromatogram po orositvi je prikazan spodnji fotografiji (*Slika 18*).



Slika 18: Kromatogram ekstraktov vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopine standarda betametazondipropionata z zamenjanimi mesti na TLC plošči, razvit v MF3 ter orošen z OR1. Oznake vzorcev: ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 3 (a), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 2 (b), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 1 (c), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 4 (č), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 6 (d), ekstrakt Melema Dr. Vasića št. 5 (e), raztopina standarda betametazondipropionata (f).

Za liso označeno s št. 3 ki pripada betametazondipropionatu smo tudi izračunali Rf. Rezultati so prikazani v spodnji tabeli (*Tabela X*)

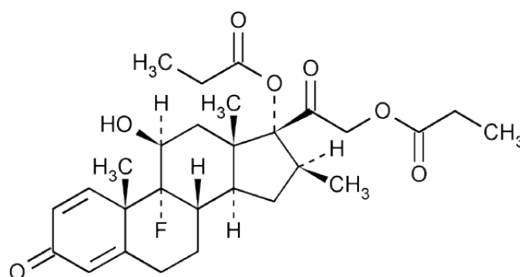
Tabela X: Retencijski faktorji (Rf) lis ki pripadajo betametazondipropionatu v ekstraktih vzorcev Melema Dr. Vasića ter raztopini standarda betametazondipropionata.

Vzorec	Oznaka vzorca	Rf lise št. 3
Melem Dr. Vasić št. 3	a	0,21
Melem Dr. Vasić št. 2	b	0,21
Melem Dr. Vasić št. 1	c	0,21
Melem Dr. Vasić št. 4	č	0,21
Melem Dr. Vasić št. 6	d	0,21
Melem Dr. Vasić št. 5	e	0,21
St. betametazondipropionat	f	0,20

Na kromatogramih iz prejšnjega poglavja (*Slika 16, Slika 17*) kot tudi na kromatogramu iz tega poglavja (*Slika 18*) so R_f pri vzorcih, ki se nahajajo na sredini TLC plošče rahlo višji od R_f vzorcev, ki se nahajajo na robovih TLC plošče. Še posebej se to opazi pri lisah, ki pripadajo betametazondipropionatu. Pri primerjavi prvih dveh kromatogramov s kromatogramom kjer smo mesta vzorcev na TLC plošči zamenjali smo ugotovili, da je ta pojav neodvisen od razporeditve vzorcev na TLC plošči in razlike v R_f niso posledica različne sestave posameznih vzorcev Melema Dr. Vasića.

4.3.3 Betametazondipropionat

S TLC metodo smo v vseh vzorcih Melema Dr. Vasića določili učinkovino betametazondipropionat. Betametazondipropionat je ester betametazona s propionsko kislino na mestih C-17 ter C-21. Zaradi zaestrenih OH skupin je betametazondipropionat bolj lipofilen in zaradi povečane absorpcije skozi kožo tako primeren za topikalno aplikacijo (*Slika 19*).



Slika 19: Molekula betametazondipropionata

Deluje protivnetno, imunosupresijsko ter antiproliferativno in je namenjen zdravljenju vnetnih kožnih bolezni. ATC klasifikacija ga uvršča med topikalne kortikosteroide z visoko jakostjo (*Tabela I*). Čeprav je njegova absorpcija skozi kožo omejena lahko njegova dolgotrajna aplikacija na večje površine obolele kože (predvsem pri otrocih ter ostarelih) privede do sistemskih učinkov kot je supresija osi hipotalamus – hipofiza – nadledvična žleza. Ta vodi k zmanjšanju izločanja kortizola iz nadledvične žleze ter adrenokortikotropnih hormonov iz hipofize. Ostali neželeni učinki ki se lahko pojavijo pri dolgotrajni topikalni uporabi betametazondipropionata so lokalni in vključujejo tanjšanje

kože, akne, povečano poraščenost, spremembe v pigmentaciji kože ter razširjene kapilare [41, 55].

4.3.4 Ponovljivost rezultatov

Pri metodi TLC predstavljajo velik problem dejavniki, ki vplivajo na ponovljivost rezultatov. To smo lahko opazili tudi med analizo, ko smo v isti MF zaporedno razvili dva kromatograma z vzorci Melema Dr. Vasića in kot rezultate dobili različne vrednosti R_f (*Slika 16*, *Slika 17*). Za doseganje čim bolj natančnih rezultatov je zato pomembno vzdrževanje konstantnih kromatografskih razmer. Eden izmed pomembnejših faktorjev, ki vplivajo na ponovljivost metode, je nasičenost kadičke s hlapi mobilne faze. Če kadička ni nasičena s hlapi mobilne faze, topilo izhlapeva s stacionarne faze in izhlapevanje narašča, ko se mobilna faza vzpenja po TLC plošči. Izhlapevanje topila s stacionarne faze vpliva na R_f spojin, ki jih z metodo TLC določamo. Nasičenost kadičke je posebej pomembna, če se za razvoj več kromatogramov uporabi ista mobilna faza. Po vsakem razvoju kromatograma se nasičenost kadičke spremeni, prav tako pa sestava mobilne faze, saj stacionarna faza vedno absorbira eno komponento MF v večji meri kot ostale. Poleg tega se nasičenost kadičke spremeni vsakokrat, ko se kromatografska kadička odpre. Nasičenost kadičke je pri TLC analizi težko nadzorovati in zato pomembno vpliva na ponovljivost TLC metode [49]. S pripravo sveže MF za vsak kromatogram, ki smo ga razvili ter s konstantnim časom, ki bi ga namenili nasičenju kadičke s hlapi topila, bi lahko izboljšali ponovljivost metode, ki smo jo uporabili za določanje primesi kortikosteroidov v Melemu Dr. Vasića. Na zagotavljanje konstantnih kromatografskih razmer ter posledično ponovljivost TLC metode vplivajo še drugi faktorji kot so: debelina adsorbenta (stacionarne faze) na TLC plošči, odstotek vode vezan na adsorbent (stacionarno fazo), temperatura pri kateri se TLC analiza izvaja, globina mobilne faze v kadički, velikost delcev v stacionarni fazi (uporaba stacionarnih faz različnih proizvajalcev), pH stacionarne faze, volumen vzorca ter sestava mobilne faze (sveže pripravljena MF za vsak kromatogram posebej). Pri analizi smo uporabljali TLC plošče istega proizvajalca, zato menimo, da velikost delcev v stacionarni fazi ter debelina premaza nista vplivala na ponovljivost rezultatov analize Melema Dr. Vasića, bi pa lahko imela vpliv v kolikor bi pri enaki metodi uporabili TLC plošče drugega proizvajalca oz. različne serije istega proizvajalca. Na ponovljivost rezultatov TLC metode, ki smo jo uporabili pri analizi vzorcev, je najverjetneje vplival tudi odstotek vode

vezane na stacionarno fazo. Odstotek vezane vode je odvisen od relativne vlažnosti zraka v prostoru kjer se TLC analiza izvaja, pa tudi v prostoru kjer se shranjuje TLC plošče. Večja kot je relativna vlažnost, manjša je sposobnost stacionarne faze za adsorpcijo komponent vzorca in posledično lahko pride do višjih R_f vrednosti [49]. Ker nismo pred vsakim razvojem kromatograma preverjali relativne vlažnosti zraka v laboratoriju, je mogoče vplivala na vrednosti R_f . Povečanje temperature okolice lahko povzroči povečanje vrednosti R_f zaradi povečanega izhlapevanja mobilne faze s TLC plošče. Višja temperatura lahko vpliva tudi na topnost topljenca v mobilni fazi ter interakcije med mobilno ter stacionarno fazo [49]. Manjše spremembe v temperaturi okolice naj ne bi bistveno vplivale na rezultate analize [49], zato smo sklepali, da morebitne spremembe temperature v laboratoriju niso vplivale na rezultate analize. Na ponovljivost rezultatov lahko vpliva tudi sestava mobilne faze. Večkratna uporaba mobilne faze sestavljene iz več različnih topil lahko vpliva na vrednost R_f , saj se z uporabo mobilne faze v njej zmanjšuje delež bolj hlapnega izmed topil. Če mobilno fazo sestavlja samo eno topilo je R_f neodvisen od razdalje, ki jo prepotuje mobilna faza. Pri uporabi sestavljenih mobilnih faz pa je pomembno, da se tekom analize pri različnih kromatogramih ohranja razdalja med nanosom vzorca ter fronto mobilne faze. Pri sestavljenih topilih lahko pride do gradienta topil na TLC plošči in zato R_f ni več neodvisen od razdalje, ki jo je mobilna faza prepotovala [49]. Zaradi vpliva tega faktorja na ponovljivost metode, smo tekom analize obdržali konstantno razdaljo med mestom nanosa vzorca ter razdaljo, ki jo je prepotovala mobilna faza. Za doseganje pravih ter ponovljivih vrednosti R_f , je za mobilno fazo potrebno uporabiti topila visoke čistosti. Prisotnost manjše nečistote z drugačno polarnostjo v topilu lahko bistveno vpliva na vrednosti R_f [49]. Pri analizi se nam je izmed topil, ki smo jih uporabili pri pripravi MF zdel problematičen videz etilmetilketona, ki je bil blede rumenkaste barve, čeprav naj bi bil brez barve. V topilu bi bile lahko prisotne nečistote ali pa produkti avtooksidacije ki so vplivali na vrednosti R_f .

4.3.5 Možnosti uporabe drugih metod za ugotavljanje primesi kortikosteroidov v mazilih z naravnimi izvlečki

Metoda TLC omogoča ločitev komponent vzorca na TLC plošči in primerjava R_f vrednosti teh komponent z R_f vrednosti standardov nanosenih na isto TLC ploščo predstavlja pomembno orodje za identifikacijo neznanih spojin v vzorcu [49]. S TLC

metodo, ki smo jo uporabili za analizo vzorcev Melema Dr. Vasića, smo z uporabo standarda betametazondipropionata lahko določili vsebnost betametazondipropionata v vzorcih. Primesi kortikosteroidov v vzorcih ne bi mogli določiti, če ne bi imeli na voljo standarda betametazondipropionata ali pa da bi vzorci vsebovali druge kortikosteroidne učinkovine, ki jih ne bi mogli primerjati s kortikosteroidi iz lekarniških krem ter standardi kortikosteroidov, ki so nam pri delu v laboratoriju bili na voljo. Vzorci bi lahko vsebovali manj pogoste derivate kortikosteroidnih učinkovin, ki se sicer ne uporabljajo v terapiji in za katere bi bila primerjava s standardi neizvedljiva. Ne nazadnje so tudi vzorci Melema Dr. Vasića vsebovali neznane spojine, ki jih s primerjavo z znanimi spojinami nismo uspeli identificirati, saj TLC metoda sama ne omogoča identifikacije neznanih spojin brez primerjave s standardom. S kombinacijo metode TLC z ostalimi kromatografskimi ter spektrofotometričnimi analiznimi metodami lahko pridobimo informacije o neznanih spojinah, s katerimi lahko spojine tudi identificiramo. TLC, kolonska kromatografija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) ter plinska kromatografija (GC) so najpogosteje uporabljane kromatografske metode. Vse te metode so dobre za ločevanje posameznih komponent v vzorcu, ampak imajo same le malo vrednosti pri identifikaciji kemijske strukture ločenih spojin. Spektrofotometrične metode kot so npr. infrardeča spektroskopija (IR), fluorescenčna spektroskopija, masna spektrometrija (MS), jedrska magnetna resonanca (NMR) se uporabljajo za identifikacijo neznanih spojin v vzorcih, vendar pa te metode zahtevajo relativno čiste vzorce posameznih spojin. Kromatografske ter spektrofotometrične metode so tako uporabna kombinacija za analizo neznanih vzorcev – kromatografske metode omogočajo ločitev spojin v vzorcih, spektrofotometrične metode pa njihovo identifikacijo [49]. Za potrditev vsebnosti betametazondipropionata v vzorcih Melema Dr. Vasića ter za identifikacijo ostalih spojin v vzorcih, ki smo jih z metodo TLC ločili, bi tako morali uporabiti metodo TLC v kombinaciji z drugo analizno metodo.

Danes večina kombiniranih metod za analizo kortikosteroidov vključuje HPLC kot metodo za ločitev komponent vzorca ter detekcijo z UV spektroskopijo, fluorescenčno spektroskopijo ter MS. Pogosto uporabljana je tudi metoda GC skupaj z MS [57].

Sodeč po literaturi se TLC metoda pri določevanju kortikosteroidov uporablja za izhodiščno metodo za določevanje kortikosteroidov. Z njo so v vzorcih kozmetičnih krem, pri katerih je obstajal sum na vsebnost kortikosteroidov, najprej potrdili vsebnost s primerjavo s standardi. Za vzorce pri katerih se določeni signali na TLC plošči sicer niso

ujemali z Rf standardov, so zaradi uporabe specifičnih OR kljub temu sklepali, da pripadajo kortikosteroidnim učinkovinam, ki bi lahko bile derivati kortikosteroidov, ki se v terapiji sicer ne uporabljajo. Za vzorce krem, ki so kortikosteroide vsebovali, so kasneje uporabili HPLC metodo ali kombinacijo metod NMR ter HPLC s katerimi so neznane kortikosteroide identificirali ter vsebnost kortikosteroidov v vzorcih tudi kvantitativno opredelili [57, 64]. Metoda TLC je v teh eksperimentih torej predstavljala predvsem »rešeto« za ločitev tistih vzorcev, ki so vsebovali kortikosteroidne učinkovine od tistih, ki jih niso.

V literaturi so poleg metode TLC opisane različne analizne metode ter kombinacije analiznih metod za določanje kortikosteroidov v izdelkih za nego kože. Te analizne metode so npr.: metoda HPLC [65], metoda HPLC z UV detekcijo za določanje primesi kortikosteroidov v vzorcu s primerjavo s standardi v kombinaciji z MS za potrditev prisotnosti kortikosteroidov v vzorcih [66, 67] ter metoda GC v kombinaciji z MS [68].

Glede na rezultate analize vzorcev Melema Dr. Vasića z metodo TLC bi lahko metodo TLC kombinirali z metodo HPLC še za dodatno kvantitativno opredelitev vsebnosti betametazondipropionata v vzorcih. Za identifikacijo ostalih neznanih spojin, ki so jim pripadale ostale lise na kromatogramu bi lahko uporabili druge metode kot so MS, IRS ter NMR.

5 SKLEP

V sklopu eksperimentalnega dela diplomske naloge smo na podlagi metod iz literature najprej razvili optimizirano metodo TLC za določanje primesi kortikosteroidov v mazilih naravnega izvora. Vzorce za analizo smo pripravili tako, da smo kortikosteroidne učinkovine iz mazila ekstrahirali iz mazilne podlage s topilom metanolom. Po ločitvi od mazilne podlage smo metanolno raztopino rotavapirali ter suh preostanek raztopili v metanolu. Raztopina suhega ostanka v metanolu je predstavljala vzorec, ki smo ga nanašali na TLC ploščo. Pri TLC metodi smo za stacionarno fazo uporabili silikagel, za mobilno fazo pa smo tekom optimizacije metode izbrali mešanico topil, pri kateri je bila ločljivost med komponentami vzorca največja. Mobilno fazo sta sestavljala etilmetilketon ter toluen v razmerju 15 : 75 (V/V). Volumen vzorcev, ki smo jih nanašali na TLC ploščo je bil 5 μ L. Za detekcijo lis na kromatogramu smo uporabili dva orositvena reagenta. OR1 je bil sestavljen iz ledocetne kisline, anizaldehida ter žveplove kisline v razmerju 50 : 0,5 : 11 (V/V), OR2 pa je predstavljal 20% žveplovo kislino v etanolu (V/V).

Z optimizirano metodo TLC smo nato določevali vsebnost primesi v šestih vzorcih Melema Dr. Vasića. Vzorce smo najprej primerjali z vzorci lekarniških krem, ki so vsebovale različne topikalne kortikosteroide ter na podlagi rezultatov domnevali, da vsi vzorci vsebujejo kortikosteroid betametazondipropionat. Primerjava vzorcev s standardom betametazondipropionata je naše domneve potrdila. Primerjali smo intenzivnost lis v vzorcih, ki so pripadale betametazondipropionatu z intenzivnostjo lise standarda znane koncentracije ter ocenili, da je bila koncentracija betametazondipropionata v vzorcih Melema Dr. Vasića podobna koncentraciji kortikosteroidov v lekarniških kremah. Na kromatogramih smo detektirali še nekaj drugih komponent vzorca, ki jih nismo identificirali. Za eno izmed teh spojin smo posumili, da bi tudi lahko pripadala kateri izmed kortikosteroidnih učinkovin. S TLC analizo smo ugotovili, da niso vsi vzorci Melema Dr. Vasića po sestavi enaki, kar smo domnevali že pred samo TLC analizo, saj vzorci med seboj niso bili podobni po videzu.

Pri delu smo imeli težave s ponovljivostjo metode, saj smo opazili razlike v R_f pri različnih kromatogramih. Tem težavam bi se lahko izognili z ohranjanjem konstantnih kromatografskih razmer kot sta na primer nasičenost kadičke s hlapci mobilne faze, ter uporaba sveže mobilne faze za razvoj vsakega izmed kromatogramov. Težave smo imeli

tudi z mobilno fazo in sicer s pojavom druge fronte topila na kromatogramu. Vzrok temu pojavu bi lahko bila kvaliteta topil, ki smo jih uporabili za optimizacijo mobilne faze.

Določevanje primesi kortikosteroidov v naravnih mazilih ter kremah omogoča še kar nekaj možnosti za nadaljnje delo. V sklopu TLC metode bi lahko dodatno optimizirali metodo ekstrakcije kortikosteroidov iz mazilne podlage, tako da bi zmanjšali ekstrakcijo preostalih komponent mazila v topilo. Predmet nadaljnjih raziskav bi lahko bilo tudi kombiniranje TLC metode z metodo HPLC za dodatno identifikacijo ter kvantifikacijo kortikosteroidov v vzorcih. Za identifikacijo neznanih spojin iz vzorca bi lahko uporabili analizne metode kot so masna spektrometrija, infrardeča spektroskopija ter jedrska magnetna resonanca v kombinaciji z metodo HPLC, s katero bi komponente vzorca predčasno ločili.

S TLC analizo smo v mazilu domnevno naravnega izvora, namenjenemu prodaji v privatni ambulanti, določili lokalni kortikosteroid visoke jakosti. S prikrivanjem sestavin ter zagotavljanjem naravnega izvora mazila proizvajalec ne le zavaja potrošnike, ki so se nanj obrnili z namenom iskanja alternative zdravljenju s topikalnimi kortikosteroidi, temveč zaradi neželenih učinkov vsebovanega kortikosteroida predstavlja tudi grožnjo javnemu zdravju. Zaradi tega menim, da bi bilo potrebno vsak sum na vsebnost zdravilnih učinkovin oz. derivatov zdravilnih učinkovin tako v mazilih naravnega izvora, kot tudi v kozmetičnih izdelkih ter naravnih pripravkih v drugih farmacevtskih oblikah, obravnavati resno. Menim, da bi morali regulatorni organi, ki skrbijo za javno zdravje ter promet z zdravili, naravne pripravke ter kozmetične izdelke za katere obstaja sum na vsebnost nedeklariranih zdravilnih učinkovin, analizirati ter obveščati tako strokovno javnost kot tudi paciente oz. potrošnike o morebitni vsebnosti zdravilnih učinkovin v teh izdelkih.

6 LITERATURA

1. Ritchie M. R., Use of herbal supplements and nutritional supplements in the UK: what do we know about their pattern of usage?. Proceeding of the Nutrition Society 2007, 66: 479-482
2. Chan K., Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. Chemosphere 2003, 52: 1361-1372
3. Fijalek Z., Sarna K., Blažewicz A., Maurin J., Baran P., Waclawek K., Counterfeit medicinal products, medical devices and dietary supplements – growing safety risks for public health. Military Pharmacy and Medicine 2011, 4: 29-38
4. Sporočilo za javnost, Evropska agencija za zdravila predlaga začasni odvzem dovoljenja za promet z zdravili, ki vsebujejo sibutramin. http://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/Arhiv_starejsih_objav/Sibutramin_Objava2010-01-25.pdf, (dostop: 10. 4. 2014)
5. Early Communication about an Ongoing Safety Review of Meridia (sibutramine hydrochloride). <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientandProviders/DrugSafetyInformationforHealthcareProfessionals/ucm191650.htm>, (dostop: 10. 4. 2014)
6. Tainted Weight Loss Products. <http://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/MedicationHealthFraud/ucm234592.htm>, (dostop: 11. 4. 2014)
7. PRock Marketing, LLC Issues a Voluntary Nationwide Recall of All weight loss formulas and variation of formulas of Reduce Weight Fruta Planta/Reduce Weight Dietary Supplement. <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm238495.htm>, (dostop: 11. 4. 2014)
8. Press release: Warning over unlicensed herbal Payouji tea and Pai You Guo Slim Capsules. <http://www.mhra.gov.uk/NewsCentre/Pressreleases/CON096957>, (dostop: 11. 4. 2014)
9. Majestic slimming capsules, Safety advisory. <http://www.tga.gov.au/safety/alerts-medicine-majestic-slimming-capsules-121109.htm#.Uz0ujKITmt8>, (dostop: 12. 4. 2014)
10. Notice Information: - Advisory – 04/01/2012. <http://www.imb.ie/EN/Safety--Quality/Advisory-Warning--Recall-Notices/Human-Medicines/Precautionary-notice-for-consumers-on-the-health-dangers-of-illegal-medicines-containing-Sibutramine-.aspx>, (Dostop: 11. 4. 2014)
11. Müller D., Weinmann W., Hermanns-Clausen M., Chinese Slimming Capsules Containing Sibutramine Sold Over the Internet, A Case Series. Deutsches Ärzteblatt Int 2009, 106(13): 218-222

12. Tainted Sexual Enhancement Products.
<http://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/MedicationHealthFraud/ucm234539.htm>, (Dostop: 14. 4. 2014)
13. Herbal sexual dysfunction products warnings and alerts.
<http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/Generalsafetyinformationandadvice/Herbalmedicines/Herbalsafetyupdates/Herbalerectilesexualdysfunctionproductswarningsandalerts/index.htm>, (Dostop: 14. 4. 2014)
14. Dangerous potency products obtained over the Internet.
<https://www.swissmedic.ch/aktuell/00673/00688/01543/index.html?lang=en>, (Dostop: 14. 4. 2014)
15. Unlicensed eczema creams found to contain steroids.
<http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/Generalsafetyinformationandadvice/Herbalmedicines/Herbalsafetyupdates/Allherbalsafetyupdates/CON041331>, (Dostop: 26. 3. 2014)
16. OSAS (Intensive Body Lotion with Aloe Vera) found to contain steroids.
<http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/Generalsafetyinformationandadvice/Herbalmedicines/Herbalsafetyupdates/Allherbalsafetyupdates/CON2033349>, (Dostop: 26. 3. 2014)
17. Topical creams containing steroids, January 2005.
<http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/Generalsafetyinformationandadvice/Herbalmedicines/Herbalsafetyupdates/Allherbalsafetyupdates/CON1004373>, (Dostop: 26. 3. 2014)
18. Ramsay H. M., Goddard W., Gill S., Moss C., Herbal creams used for atopic eczema in Birmingham, UK illegally contain potent corticosteroids. Archives of Disease in Childhood 2003, 88(12):1056 – 1067
19. Soraderm Skin Cream.
<http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/Generalsafetyinformationandadvice/Herbalmedicines/Herbalsafetyupdates/Allherbalsafetyupdates/CON111512>, (Dostop: 26. 3. 2014)
20. Notice Information: - Warning – 25/ 01/2011. <http://www.imb.ie/EN/Safety--Quality/Advisory-Warning--Recall-Notices/Human-Medicines/Warning-Statement-Magicream-Cream.aspx>, (Dostop: 26. 3. 2014)
21. Notice Information: - Warning – 28/02/2014. <http://www.imb.ie/EN/Safety--Quality/Advisory-Warning--Recall-Notices/Human-Medicines/Magicream.aspx?page=1¬icetypeid=-1&year=-1>, (Dostop: 26. 3. 2014)
22. Sporočilo za javnost, Obvestilo o neustrezni kakovosti izdelka Magicream krema, spletna prodaja.
http://www.jazmp.si/fileadmin/datoteki/dokumenti/SFN/Magicream_krema.pdf, (Dostop: 26. 3. 2014)

23. Keane F. M., Munn S. E., Du Vivier A. W. P., Taylor N. F. Higgins E. M.,
Analysis of Chinese herbal creams prescribed for dermatological conditions. *BMJ-
British Medical Journal* 1999, 318:563 – 564,
24. Ernst E., Adulteration of Chinese herbal medicines with syntetic drugs: a
systematic review. *Journal of Internal Medicine* 2002, 252(2):107 – 113!
25. Ministarstvo zdravlja povuklo s tržišta kremu za njegu kože Euten.
http://www.zdravlje.hr/novosti/ostale_vijesti/ministarstvo_zdravlja_povuklo_s_trzista_kremu_za_njegu_koze_euten, (Dostop: 27. 3. 2014)
26. Analiza HALMEDA, Nalaz o redovitoj provjeri kakvoće gotov lijeka.
http://www.bioeliksireuropa.hr/assets/files/HALMED_AA1008.pdf, (Dostop: 27. 3. 2014)
27. Euten, testiranje na kortikosteroidne, Analysis report corticoid screening.
<http://www.bioeliksireuropa.hr/assets/files/analiticki-izvjestaji/Bioeliksir-Europa-2012-07-11-steroids.pdf>, (Dostop: 27. 3. 2014)
28. Hadži Miroslav Vasić, fitoterapeut i kiropraktičar.
<http://www.magicnobilje.com/travar/hadzi-vasic.html>, (Dostop: 2. 2. 2014)
29. Travar: Miroslav Vasić. <http://www.travarisrbije.com/travar.php?id=39>, (Dostop: 2. 2. 2014)
30. Fizioterapeutska ambulanta Vasić. <http://www.infostar.rs/delatnost/zdravlje-i-medicina/fizioterapeutske-ordinacije/fizioterapeutska-ambulanta-vasic>, (Dostop: 2. 2. 2014)
31. Tema: krema – »melem«,.
http://www.ringaraja.net/forum/m_5643421/mpage_1/key_/tm.htm, (Dostop: 3. 2. 2014)
32. Melem za kožne bolesti dr. Vasić. <https://www.facebook.com/pages/Melem-za-ko%C5%BEna-bolesti-drVasi%C4%87/423678054380541?fref=ts>, (Dostop: 2. 5. 2014)
33. Tema: Krema za atopični dermatitis iz Srbije.
<http://med.over.net/forum5/read.php?151,6903131>, (Dostop: 3. 2. 2014)
34. Tema: Melem krema iz Srbije. <http://med.over.net/forum5/read.php?151,8485801>,
(Dostop: 3. 2. 2014)
35. Tema: Krema MELEM. <http://med.over.net/forum5/read.php?151,8667202>,
(Dostop: 3. 2. 2014)
36. Tema: Krema MELEM iz Beograda.
<http://med.over.net/forum5/read.php?151,7842009>, (Dostop: 3. 2. 2014)
37. Tema: POZOR – melem dr. vasića. http://www.ringaraja.net/forum/POZOR_-_melem_dr%25vasi%C4%87a/m_5994842/tm.htm, (Dostop: 3. 2. 2014)
38. Tema: Dr. Vasić-malem...preverjena krema??.
http://www.ringaraja.net/forum/Dr%25Va%C5%A1i%C4%8D-malem%25%25%25preverjena_krema%3F%3F/m_5947538/tm.htm, (Dostop: 5. 2. 2014)

39. Melem – »čudežna« kremica iz Srbije – vsebuje kortikosteroide.
<http://odvisnostodkortikosteroidnihmazil.blogspot.com/2013/01/melem-cudezna-kremica-iz-srbije-vsebuje.html>, (Dostop: 3. 2. 2014)
40. Minneman K.P., Wecker L., Brody's Human Pharmacology: Molecular to Clinical, 4. izdaja. Elsevier Mosby 2005:409-420
41. Lemke T. L., Williams D. A., Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, 2008:877-908
42. Medrol - navodilo za uporabo.
<http://www.zdravila.net/navodilo.php?dir=pdf&navodilo=a-003341.pdf>, (Dostop: 24. 2. 2014)
43. Lisjak M., Uporabna dermatologija, Kožne bolezni in tumorji v vsakdanji praksi, Založba Chiara, Ljubljana, 2013
44. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Beloderm.
http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/011479_smpc.pdf (Dostop: 24. 2. 2014)
45. Koda – Kimble M. A., L. Y. Young, B. K. Alldredge, R. L. Corelli, B. J. Guglielmo, Wayne A. Kradjan, B. R., Applied Therapeutics, The Clinical Use of Drugs, 9. Izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, 2009 : MANJKAJO STRANI!
46. ATC drevo. <http://www.registerzdravil.si/atc/D07A>, (Dostop, 10. 5. 2014)
47. D Dermatologicals. http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=D07A, (Dostop, 10. 5. 2014)
48. Makin H. L. J., Gower D. B., Steroid Analysis, 2. Izdaja, Springer Science+Business Media 2010:329-424,1097-1139
49. Touchstone C. J., Practice of Thin Layer Chromatography, 3. Izdaja, John Wiley and Sons, Inc., ZDA, 1992 : 1-30, 86-206, 256-262 ,338-354
50. Fried B., Sherma J., Practical Thin-Layer Chromatography: A Multidisciplinary Approach, CRC Press, Inc., Boca Ranton, 1996 : 1-16
51. Watson G. D., Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, 2. Izdaja, Elsevier Limited, 2005 : 315-316
52. Identification of hydrocortisone acetate, dexamethasone, betamethasone, betamethasone-17-valerate and triamcinolone acetonide in cosmetic products by TLC and HPLC. <http://www.asean.org/archive/MRA-Cosmetic/Doc-8.pdf>, (Dostop: 18. 5. 2014)
53. Pachaly P., DC-Atlas: Dünnschicht-Chromatographie in der Apotheke, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1995 : Bethamethason 1-3
54. Operating the rotary evaporator (rotavap).
<http://sbrs.cm.utexas.edu/WS/Rotovap.pdf>, (Dostop: 5. 5. 2014)
55. Dodatek 1, Povzetek glavnih značilnosti zdravila Diprosone.
http://si.draagle.com/#!/greader/?file=http%3A%2F%2Fskrito.draagle.com%2Fmedia%2Fd%2Fsmc%2F039845_smc.pdf, (Dostop: 4. 5. 2014)
56. Preparation of chromatography spray reagents.
http://delloyd.50megs.com/spray_reagents.html, (Dostop: 7. 5. 2014)

57. Gagliardi L., De Orsi D., Del Giudice M. R., Gatta F., Porrà R., Chimenti P., Tonelli D., Development of a tandem thin-layer chromatography – high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products. *Analytica Chimica Acta* 2002, 457:187-198
58. Jantschi L., Hodisan S., Cimpoi C., Ceteras I., Analysis of Some Steroids by TLC Using optimum Mobile Phases. *Acta Universitatis Cibiniensis, Seria F Chemia* 2005, 8:67-76
59. Hon, K.-L.E., Lee V. WY, Leung T.-F., Lee. K. KC, Chan A. KW, Fok T.-F., Leung P.-C., Corticosteroids are not Present in a Traditional Chinese Medicine Formulation for Atopic Dermatitis in Children. *Annals Academy of Medicine* 2006, 35(11):759-763
60. Solvent Miscibility and Polarity Chart. <http://www.perfinity.com/downloads/Solvent%20Miscibility%20and%20Polarity%20Chart.pdf>, (Dostop: 8. 5. 2014)
61. Polarity Index. <http://macro.lsu.edu/howto/solvents/polarity%20index.htm>, (Dostop: 8. 5. 2014)
62. Butanone. http://en.wikipedia.org/wiki/Butanone#cite_ref-1, (Dostop: 9. 5. 2014)
63. Caprez S., Development of methods for analysis of synthetic adulterants in herbal medicines by HPTLC, Diploma Thesis, 2005:30
64. Lee J. P., Park S. H., Yang S. J., Kim S. M., Son K. H., Yun M. O., Choi S. S., Detection of Undeclared Betamethasone Derivates in Cosmetic Products Labeled to Contain Zinc Pyrithione as the Active Ingredient. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* 2009, 35:11-17
65. Gaudiano M. C., Lucente D., Antoniella E., Bertocchi P., Muleri N., Manna L., Bartolomei M., Alimonti S., Valvo L., Rodomonte A. L., »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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 53:158-164
66. Nam Y. S., Kwon I. K., Lee K.-B., Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea. *Forensic Science International* 2011, 210:144-148
67. Nam Y. S., Kwon I. K., Lee Y., Lee K.-B., Quantitative monitoring of corticosteroids in cosmetic products manufactured in Korea using LC-MS/MS. *Forensic Science International* 2012, 220:e23-e28
68. Keane F. M., Munn S. E., du Vivier A. W. P., Taylor N. F., Higgins E. M., Analysis of Chinese herbal creams prescribed for dermatological conditions. *British Medical Journal* 1999, 318:563-4