

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KOPRIVEC

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITENI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KOPRIVEC

**MERJENJE 18 β -GLICIRETINSKE KISLINE S HPLC V
URINU LJUDI PO ZAUŽITJU NAPITKA, SLAJENEGA Z
GLICIRIZINOM (E-958)**

**HPLC DETERMINATION OF 18 β -GLYCYRRHETIC ACID
IN HUMAN URIN, AFTER ORALLY ADMINISTERED
GLYCYRRHIZIN PREPARATION**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, in somentorstvom dr. Nine Kočever Glavač.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, in somentorici dr. Nini Kočever Glavač.

Zahvaljujem se tudi vsem prostovoljcem, brez katerih ne bi mogla izpeljati eksperimentalnega dela moje diplomske naloge.

Hvala moji družini, ker ste mi stali ob strani in me vzpodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta in somentorstvom dr. Nine Kočever Glavač.

Komisija za oceno in zagovor diplomske naloge:

Predsednik: prof. dr. Danijel Kikelj

Mentor: prof. dr. Samo Kreft

Somentorica: dr. Nina Kočever Glavač

Član: doc. dr. Robert Roškar

Ljubljana, 2010

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	I
KAZALO PREGLEDNIC	II
KAZALO GRAFOV.....	IV
POVZETEK.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1. glycyrrhiza glabra L. – golostebelni sladki koren	1
1.1.1. FARMAKOLOŠKO DELOVANJE	3
1.1.2. UPORABA GLICIRIZINA V PREHRANI IN REGULATIVA.....	4
1.1.3. FARMAKOKINETIKA GLICIRIZINA	7
1.1.4. TOKSIKOLOGIJA.....	8
1.1.5. KONTRAINDIKACIJE.....	9
1.1.6. INTERAKCIJE.....	9
1.2. METODE ZA DOLOČANJE 18β-GLICIRETINSKE KISLINE V URINU.....	9
1.2.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA – MASNA SPEKTROMetriJA (GC-MS).....	10
1.2.2. MICELARNA ELEKTROKINETIČNA KROMATOGRAFIJA (MEKC)	11
1.2.3. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)	11
2. NAMEN DELA.....	13
3. MATERIALI IN METODE DELA.....	14
3.1. STANDARDI	14
3.2. REAGENTI.....	14
3.2.1. REAGENTI ZA RP-HPLC.....	14
3.2.2. REAGENTI ZA PRIPRAVO STANDARDA.....	14
3.2.3. REAGENTI ZA PRIPRAVO URINSKIH VZORCEV.....	14
3.3. OPREMA IN APARATURE.....	14
3.3.1. OPREMA IN APARATURE ZA RP-HPLC	14
3.3.2. OSTALO.....	15
3.4. METODE DELA	15
3.4.1. POSTOPEK ZBIRANJA URINSKIH VZORCEV	15
3.4.2. PRIPRAVA STANDARDNEGA VZORCA.....	15
3.4.3. PRIPRAVA URINSKEGA STANDARDA	16
3.4.4. OPTIMIZACIJA METODE	16
3.4.4.1. OPTIMIZACIJA VALOVNE DOLŽINE.....	16
3.4.4.2. OPTIMIZACIJA VOLUMNA INJICIRANJA	16
3.4.4.3. OPTIMIZACIJA HITROSTI PRETOKA MOBILNE FAZE.....	16
3.4.5. OPTIMIZACIJA PRIPRAVE URINSKEGA VZORCA	16

3.4.6. PRIPRAVA URINSKIH VZORCEV PROSTOVOLJCEV	17
3.4.7. PONOVLJIVOST METODE NA STANDARDNEM VZORCU	18
3.4.8. PONOVLJIVOST METODE NA URINSKIH VZORCIH	18
3.4.9. IZRAČUN KONCENTRACIJE IN KOLIČINE METABOLITA TER HITROSTI IZLOČANJA V URIN PROSTOVOLJCEV	19
3.4.9.1. IZRAČUN KONCENTRACIJE METABOLITA (MG-GA) V URINU	19
3.4.9.2. IZRAČUN KOLIČINE METABOLITa (MG-GA) V URINU	19
3.4.9.3. IZRAČUN HITROSTI IZLOČANJA METABIOLITA (mg-ga) V URIN	19
4. REZULTATI IN DISKUSIJA	20
4.1. OPTIMIZACIJA METODE	20
4.1.1. OPTIMIZACIJA VALOVNE DOLŽINE	20
4.1.2. OPTIMIZACIJA VOLUMNA INJICIRANJA	21
4.1.3. OPTIMIZACIJA HITROSTI PRETOKA	21
4.2. OPTIMIRANA METODA	22
4.3. OPTIMIZACIJA PRIPRAVE URINSKEGA VZORCA	23
4.4. PONOVLJIVOST METODE NA STANDARDNEM VZORCU	23
4.5. PONOVLJIVOST METODE NA URINSKEM VZORCU	26
4.6. IZRAČUN KONCENTRACIJE IN KOLIČINE TER HITROSTI IZLOČANJA METABOLITA V URIN PROSTOVOLJCEV	27
4.6.1. IZBIRA USTREZNE KONCENTRACIJE IN POVRŠINE POD KRIVULJO STANDARDNEGA VZORCA	27
4.6.2. PRIMER IZRAČUNA KONCENTRACIJE IN KOLIČINE METABOLITA TER HITROST NJEGOVEGA IZLOČANJA V URIN NA VZORCU C, VZETEGA PRI PROSTOVOLCU 1 PO ZAUŽITJU ODMERKA GLICIRIZINA V DOPOLDANSKIH URAH	28
4.6.3. OBDELAVA MANJKAJOČIH VZORCEV	29
4.6.4. PRIMERJAVA REZULTATOV MED PROSTOVOLJCI	29
5. ZAKLJUČEK	37
6. LITERATURA	39
PRILOGE	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Golostebelni sladki koren.....	1
Slika 2: Predstavniki flavonoidov	2
Slika 3: Glicirizinska kislina in njena metabolita (8).....	8
Slika 4: Odzivi standardnega vzorca ($c = 2\mu\text{L}/\text{ml H}_2\text{O}$) pri različnih valovnih dolžinah (rumena = 235 nm, zelena = 240 nm, rdeča = 245 nm, modra = 250 nm, vijolična = 260 nm)	20
Slika 5: Odzivi urinskega standarda pri različnih volumnih injiciranja (vijolična = 500 μL , zelena = 200 μL , rdeča = 100 μL , modra = 50 μL). Pretok: 2 ml/min, valovna dolžina: 250 nm.	21

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Meje uporabe izvlečka sladkega korena in njegovih derivatov v hrani, določene s strani ameriške FDA (27).....	6
Preglednica 2: Priprava urinskega vzorca: različni časi inkubacije in različni volumni dodane raztopine encima.....	17
Preglednica 3: Površine pod krivuljami pri različnih hitrostih pretoka mobilne faze. Valovna dolžina je bila 250 nm.	22
Preglednica 4: Primerjava pogojev med prvotno in optimirano metodo.....	22
Preglednica 5: Površine pod krivuljami pri različnih časih inkubacije in različnih volumnih dodane raztopine encima.	23
Preglednica 6: RSD površin pod krivuljo in višine vrhov za standardni vzorec s koncentracijo 2 µg/mL. Analize so potekale znotraj enega dneva v treh ponovitvah več dni zaporedoma. Odebeljeno so označeni rezultati, ki ustrezajo zahtevam.....	24
Preglednica 7: RSD površin pod krivuljo in višin vrhov za standardni vzorec pri določeni koncentraciji. Analize so potekale v treh različnih dneh, vsaka v treh ponovitvah. Odebeljeno so označeni rezultati, ki ustrezajo zahtevam.	25
Preglednica 8: RSD površin pod krivuljo in višin za urinski vzorec. Analize so potekale znotraj enega dneva v šestih ponovitvah. Odebeljeno so označeni rezultati, ki ustrezajo zahtevam.	26
Preglednica 9: RSD površin pod krivuljo in višin vrhov za urinski vzorec. Analize so potekale v štirih različnih dneh, vsaka v dveh ponovitvah. Odebeljeno so označeni rezultati, ki ustrezajo zahtevam.....	26
Preglednica 10: RSD dnevnih in meddnevnih meritev površin pod krivuljo standardnega vzorca pri določeni koncentraciji. Odebeljeno so označeni podatki, ki smo jih uporabili pri nadaljnjem preračunavanju.....	27
Preglednica 11: Seznam manjkajočih vzorcev ter izračunane vrednosti za količino izločenega metabolita in njegovo hitrost izločanja.....	29
Preglednica 12: Celotna količina in odstotek metabolita izločenega v urin v času zbiranja urinskih vzorcev po zaužitju glicirizinskega napitka v dopoldanskih ali popoldanskih urah pri posameznem prostovoljcu.	30
Preglednica 13: Čas od zaužitja glicirizina do uriniranja, pri katerem se je v urin pričel izločati metabolit ter njegova koncentracija.	31

Preglednica 14: Čas od zaužitja glicirizina do uriniranja, pri katerem se je v urin izločila največja količina metabolita. 32

Preglednica 15: Čas od zaužitja glicirizina do uriniranja, pri katerem se je metabolit v urin izločil z največjo hitrostjo izločanja ter povprečna hitrost izločanja metabolita..... 34

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Količina izločenega metabolita v odvisnosti od preteklega časa od aplikacije glicirizina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljci so glicirizin zaužili v dopoldanskih urah.	32
Graf 2: Količina izločenega metabolita v odvisnosti od preteklega časa od aplikacije glicirizina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljci so glicirizin zaužili v popoldanskih urah.	33
Graf 3: Hitrost izločanja metabolita v odvisnosti od preteklega časa od aplikacije glicirizina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljci so glicirizin zaužili v dopoldanskih urah.	35
Graf 4: Hitrost izločanja metabolita v odvisnosti od preteklega časa od aplikacije glicirizina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljci so glicirizin zaužili v popoldanskih urah.	35

POVZETEK

V praksi je težko ugotoviti, kdaj je vzrok povišanega krvnega pritiska prekomerna uporaba izvlečkov sladkega korena. Hipokalemična hipertenzija se lahko pojavi tudi pri drugih bolezenskih stanjih. Glicirizin se namreč dodaja sladkarijam, pijačam, žvečilnim gumijem, tobaku in nekaterim zdravilom. Tako se ljudje pogosto ne zavedamo, da uživamo glicirizin, ki lahko v večjih količinah povzroči neželene učinke.

Potreba po razvoju hitre, enostavne in zanesljive metode za merjenje 3 β -monoglukuronil-18 β -gliciretinske kisline (MG-GA) v urinu, glavnega metabolita glicirizina ter krivca večine stranskih učinkov glicirizina, je tako še večja.

V diplomski nalogi smo poskušali razviti optimalno RP-HPLC metodo za merjenje 18 β -gliciretinske kisline (GA), kar bi s primerno pripravo vzorca (hidroliza MG-GA do GA) omogočilo, da bi ugotavljali vsebnost MG-GA v urinu. Spreminjali smo hitrost pretoka, valovno dolžino in volumen injiciranja. Pri optimizaciji priprave urinskih vzorcev pa smo spreminjali čas inkubacije in volumen dodanega encima β -glukuronidaza.

Optimirano metodo smo nato uporabili za spremljanje kinetičnega profila metabolita v urinu preko določitve količine izločenega metabolita in hitrosti njegovega izločanja. Analizirali smo urin šestih prostovoljcev po zaužitju napitka, slajenega s 600 mg glicirizina. V času zbiranja urinskih vzorcev se je pri posameznem prostovoljcu izločilo le od 0,22 % do 0,49 % metabolita od teoretične količine, če bi se celoten zaužiti glicirizin metaboliziral in izločil z urinom. To je relativno malo, je pa v skladu z literaturnimi podatki. Odstotek izločenega metabolita bi lahko bil nekoliko višji, če bi urinske vzorce zbirali dalj časa, saj smo pri nekaterih prostovoljcih zaznali metabolit v urinu še po štirih dneh. Razlog temu je, da metabolit zapade v enterohepatičen cikel, kar podaljša zadrževanje metabolita v organizmu.

Rezultati se med seboj bistveno ne razlikujejo, če so prostovoljci vzeli napitek, slajen z glicirizinom, v dopoldanskem ali popoldanskem času.

RP-HPLC se je izkazala za hitro in enostavno metodo, izboljšati bi bilo potrebno le dnevno in meddnevno ponovljivost na standardnem vzorcu ter linearnost metode. To bi lahko dosegli s termostatiranjem kolone, s čemer bi okrog kolone zagotovili konstantno

temperaturo. Zanesljivost pridobljenih rezultatov je tako omejena s slabo linearnostjo metode.

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC	površina pod krivuljo
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
RSD	relativna standardna deviacija
RP-HPLC	reverznofazna tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
TFA	trifluoroacetna kislina
MeCN	acetonitril
GA	18 β -gliciretinska kislina
MG-GA	3 β -monoglukuronil-18 β -gliciretinske kisline
FDA	ameriška Agencija za hrano in zdravila
FEMA	ameriška Zvezna agencija za posredovanje v nesrečah (Federal Emergency Management Agency)

1. UVOD

1.1. GLYCYRRHIZA GLABRA L. – GOLOSTEBELNI SLADKI KOREN



Slika 1: Golostebelni sladki koren

Golostebelni sladki koren so poznali že Rimljani, ki so ga uporabljali za zdravljenje težav pri želodčnih, jetrnih in ledvičnih obolenjih ter astmi. Kitajska medicina ga še danes uporablja kot sredstvo za podaljšanje življenja, za celjenje ran ter zdravljenje oteklin (1,2).

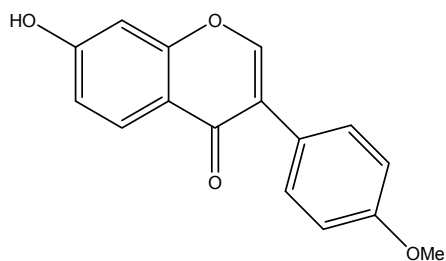
Po ljudskem izročilu pa lajša izkašljevanje, blaži kašelj, odpravlja krče gladkih mišic, učinkuje protivnetno, lahko odvaja in žene na vodo ter deluje na nadledvično žlezo. Rabi se proti vnetju želodčne sluznice in želodčni razjedi, prebavnim

krčem in ob nezadostnem delovanju nadledvičnice. Pomaga proti hripavosti, zato njegove pripravke radi jemljejo pevci in govorniki.

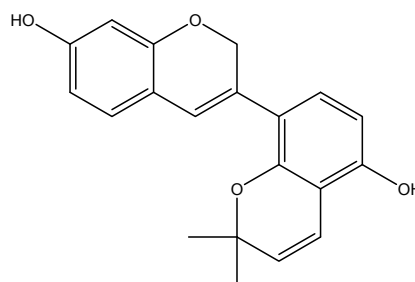
Pri pripravi drog iz golostebelnega sladkega korena se vedno uporabi korenina, iz katere lahko pripravimo dve vrsti drog. *Glycyrrhizae radix* predstavlja posušene, olupljene ali neolupljene korenine in podzemne stranske poganjke. *Liquiritiae succus* pa je vodni izvleček korenin, iz katerega s sušenjem pridobimo črnorjave paličaste kose (lakrico ali črni sladkor) (1). Obe drogi imata sladek okus.

Iz korenine golostebelnega sladkega korena so izolirali mnogo kemijskih spojin: **kumarine** (glicirin, heniarin), **flavonoide** (flavonoli in izoflavoni vključno z glabrinom, glabrolom, glizarinom, glabridinom, formononetinom, kumatakeninom, likviritigeninom, izolikviritigeninom), **terpenoidi** (glicirizinska kislina (aglikon glicirizina)), **hlapljive spojine** (anetol, benzaldehid, eugenol, heksanol, indol, linalool), aminokisljine, smole, lignin, škrob, sterole, ogljikove hidrate in vosek (4). Farmakološko aktivni pa so predvsem flavonoidi in terpenoidi (slika 2).

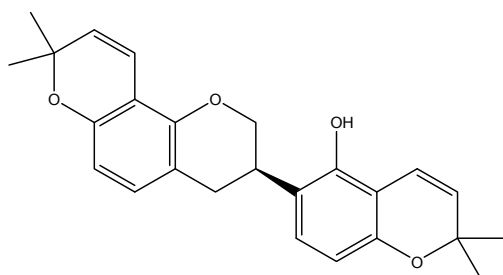
Glavna farmakološko aktivna spojina sladkega korena je glicirizin ali glicirizinska kislina, ki je v korenini prisotna v obliki kalcijeve, kalijeve ali magnezijeve soli, in sicer od 2 do 15 % (w/w) odvisno od vrste, geografskih in klimatskih pogojev ter od obstojnosti glikozidne vezi z dvema molekulama glukuronske kisline (7, 29). Najbolj znana organoleptična lastnost glicirizina je njegov sladek okus, je namreč 33-200 krat slajši od saharoze (29).



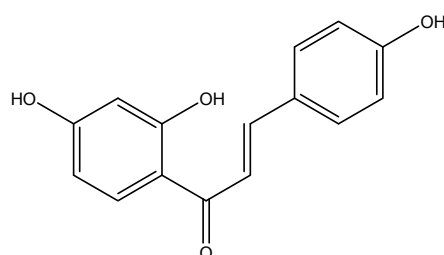
formononetin



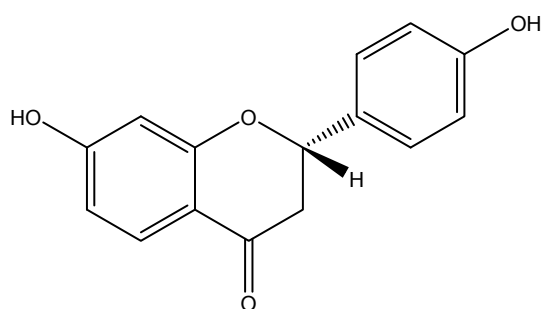
glabren



glabridin



izolikviritigenin



likviritigenin

Slika 2: Predstavniki flavonoidov

1.1.1. FARMAKOLOŠKO DELOVANJE

Na Japonskem se glicirizin že dalj časa uporablja za zdravljenje kroničnega hepatitisa B. Študije so pokazale, da glicirizin normalizira zvišan nivo serumskih transaminaz (ALT in AST) in izboljša delovanje jeter pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B (9). Daljše uživanje glicirizina prepreči razvoj s hepatitis C povzročene jetrne raka.

Glicirizin in glicirizinska kislina naj bi delovala protivirusno z aktivacijo biosinteze interferonov, znotrajcelične razgradnje virusnih delcev ter s preprečevanjem slačenja in aktivacije virusov (10). Pompei in sodelavci so ugotovili, da oba inaktivirata delce herpes simplex virusa. Glicirizin inhibira tudi norice-pasasti izpuščaj virusno infekcijo, HIV infekcijo in hepatitis A virusno infekcijo (9).

Formononetin, glabridin, glabren, gliciretinska kislina in likviritigenin izolirani iz sladkega korena imajo protimikrobno delovanje proti bakterijam *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* ter proti glivi *Candida albicans* (8).

Preko protimikrobnega delovanja spojine iz prejšnjega odstavka proti bakteriji *Helicobacter pylori* pa lahko sladkemu korenu pripisujemo tudi protiulkusno delovanje. Ta bakterija je namreč ključni dejavnik pri nastanku ulkusne bolezni. Okužba z njo je potreben, ne pa tudi zadosten pogoj za razvoj ulkusa – le pri 15-20 odstotkih okuženih ljudi se razvije ulkusna bolezen (11, 12).

Flavonoidi in gliciretinska kislina pa imata še dodatno protiulkusno delovanje. Flavonoidi namreč inhibirajo PAF-acetiltransferazo in s tem zmanjšajo nastanek trombocite aktivirajočega dejavnika (PAF), ki je najmočnejša ulcerogena spojina. Gliciretinska kislina pa inhibira encima 15-hidroksiprostaglandin-dehidrogenazo in 13-prostaglandin-reduktazo, ki razgrajujeta prostaglandine. Povečane količine prostaglandinov pa delujejo citoprotektivno preko inhibicije izločanja želodčne kisline in povečanja izločanja mukusa (13).

Sladki koren deluje tudi kot sekretomotorni in sekretolizni ekspektorant, kar pomeni da pospešuje izločanje sluzi pri vnetju sluznice zgornjih dihal. Saponini (predvsem glicirizin) preko aktivacije gastropulmonalnega refleksa lokalno vzdražijo sluznico želodca in

vzburijo center za bruhanje do stopnje, ki se kaže kot kašelj, rahlo se poveča slinjenje zaradi intenzivnejšega delovanja žlez slinavk, žleze v dihalih pa začnejo izločati redkejšo sluz, zaradi česar se gosta razredči (14).

Protivnetni učinki sladkega korena izhajajo iz zmožnosti znižanja aktivnosti encimov ciklooksigenaze-2 (COX-2) in 5-lipooksigenaze (5-LO). S tem se zmanjša sinteza eikozanoidov (prostaglandinov, tromboksana in prostaciklina) in levkotrienov, ki so pomembni vnetni mediatorji.

Antikoagulantno delovanje glicirizina – gliciretinska kislina in diglukuronidna enota nimata tega učinka – izhaja iz njegove neposredne in specifične inhibicije trombina. Glicirizin se namreč veže na anionsko vezavno mesto 1 na trombinu in prepreči zlepljanje trombocitov (16). Antikoagulantni učinek pa ne traja dolgo, kar bi lahko izkoristili v primeru, ko bi potrebovali le začasno inhibicijo strjevanja krvi (8).

Glabridin (glavna sestavina hidrofobne frakcije izvlečka sladkega korena) in glicirizin (glavna sestavina hidrofilne frakcije) pa imata lahko tudi popolnoma nasprotna učinka, in sicer na melanogenezo. Melanin je temnorjav endogeni pigment, katerega glavna vloga v organizmu je zaščita pred ultravijoličnimi žarki. Sintetizirajo ga melanociti v koži, laseh in očeh. Ključno vlogo pri nastanku melanina pa imajo encim tirozinaza ter proteina TRP-1 in TRP-2 (*tyrosinase-related protein*) (18). Glabridin deluje inhibitorno na melanogenezo preko inaktivacije tirozinaze, glicirizin pa melanogenezo zelo učinkovito stimulira, zato bi ga lahko v prihodnosti uporabili pri zdravljenju hipopigmentacijskih motenj. Študije so pokazale, da glicirizin močno poveča koncentracijo mRNK, ki je odgovorna za nastanek tirozinaze in TRP-2.

Nemška komisija E priporoča zaužiti 5-15 g rastlinske snovi oziroma 200-300 mg glicirizina dnevno, pri katarjih dihalnih poti pa 0,5-1 g lakrice ter 1,5-3 g pri ulkusni bolezni. Zdravljenje brez zdravniškega nadzora ne sme trajati več kot 4-6 tednov (3).

1.1.2. UPORABA GLICIRIZINA V PREHRANI IN REGULATIVA

V prehrani, farmacevtskih izdelkih in drugje se glicirizin pojavlja kot čista snov ali v obliki amonijeve soli. Slednjo pridobijo z nakisanjem vodnega izvlečka korenin sladkega korena, kateremu sledi nevtralizacija oborjenega dela z razredčenim amoniakom.

Monoamonijevo sol glicirizina se v nadaljevanju očisti z ekstrakcijo s topili in drugimi separacijskimi metodami (29).

Sladki koren se veliko rabi kot začimba in sladilo. Svet Evrope ga razvršča v skupino naravnih začimb N2, kar pomeni, da se lahko doda živilom v majhni količini. Po slovenski odredbi o razvrstitvi zdravilnih rastlin spada v kategorijo H, ki ima enak pravni položaj kot hrana.

Čeprav je glicirizin veliko bolj sladek kot saharoza, pa je njegova uporaba v prehranski industriji in industriji pijač omejena. Glicirizin namreč hrano obarva rjavo, poleg tega pa v kisljih raztopinah izgubi svoj sladek okus. Izvleček sladkega korena in glicirizin se tako največkrat uporabljata za sladkanje tobaka in sladkarij (27). Po mnenju Fenwick in sodelavcev se v ZDA porabi 90 % proizvedenega sladkega korena v tobačni industriji, ostalih 10 % pa se v enakih delih porabi v prehranski in farmacevtski industriji (28).

Izvleček sladkega korena in glicirizin se uporabljata tudi v pivu, kjer se izkorišča njune dobre surfaktantne lastnosti ter za zmanjšanje grenkega okusa. Grenak okus pa zmanjšata tudi grenkim saharinskim in farmacevtskim izdelkom. Glicirizin se lahko uporablja v kakavu za izboljšanje okusa, kjer lahko nadomesti tudi do 25 % kakava (27). Tudi različne zobne paste ga vsebujejo (29).

Kot adheziv se uporablja v insekticidih in kot vlažilno sredstvo v mnogih industrijskih procesih. Izrabljeni trdi deli korenine sladkega korena se uporabljajo v sredstvih za gašenje ognja, v kompostu za gojenje gob in v krmi za živino, konje in kokoši (27).

Izvleček sladkega korena in njegovi derivati so s strani ameriške Agencije za hrano in zdravila (FDA) in FEMA-e potrjeni kot GRAS, kar pomeni, da so v splošnem smislu varni. FDA je določila tudi opis, specifikacijo in maksimalne dovoljene količine glicirizina v hrani (27).

Preglednica 1: Meje uporabe izvlečka sladkega korena in njegovih derivatov v hrani, določene s strani ameriške FDA (27).

Vrsta hrane	Maksimalna dovoljena količina glicirizina v hrani (%)	Namen uporabe
Pečene slaščice	0,05	1, 2
Alkoholne pijače	0,1	1, 2, 3
Brezalkoholne pijače	0,15	1, 2, 3
Žvečilni gumi	1,1	1, 2
Trdi bonboni	16,0	1, 2
Mehki bonboni	3,1	1, 2
Vitaminska in mineralna prehranska dopolnila	0,5	1, 2
Zelišča in začimbe	0,15	1, 2
Ostala hrana razen sladkornih nadomestkov	0,1	1, 2

1. ojačevalec okusa; 2. aroma; 3. surfaktant

FDA meni, da glicirizin ne ogroža zdravja, če se ga jemlje v zmernih količinah in ga ne uživajo ljudje, ki so občutljivi že na majhne količine glicirizina. Uporaba izvlečka sladkega korena in njegovih derivatov je prav tako dovoljena v nekaterih zdravilih brez recepta (27).

Uraden sprejemljiv dnevni vnos glicirizina in njegove amonijeve soli s strani FAO/WHO Skupnega strokovnega odbora za prehranske aditive (JECFA) in evropskega Znanstvenega odbora za prehrano (ZOP) sicer še ni bil določen, oba odbora pa menita, da vnos 100 mg glicirizina na dan pri večini odraslih ne bi povzročilo neugodnih učinkov. 100 mg je enako 50 g sladkega korena z 0,2 % glicirizina (w/w) (27, 30). Obstaja pa nekaj skupin ljudi, pri katerih bi se lahko ob zaužitju nižjih količin glicirizina od 100 mg že pojavili stranski učinki. Te skupine predstavljajo ljudje z zmanjšano aktivnostjo 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaze, ljudje s podaljšanim prehodom skozi gastrointestinalni trakt, ljudje s hipertenzijo ter ljudje z bolezenskimi stanji, ki so povezane z elektrolitskim neravnovesjem ali homeostazo vode (27, 29).

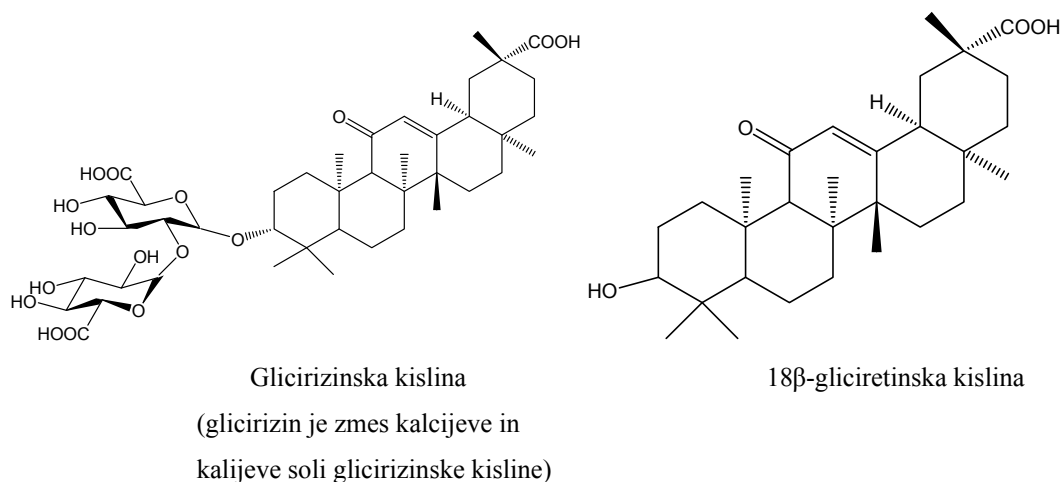
Svet Evrope in Odbor za prehranske aditive in kontaminante v Veliki Britaniji sta določila mejno dopustno vsebnost glicirizina v hrani, ki je 50 ppm. Nemška Informacijska pisarna za prehrano priporoča dnevni vnos glicirizina manjšega od 200 mg, kar je enako 150 g sladkarij z izvlečki sladkega korena. Vedeti pa moramo, da se slaščice v količini vsebovanega izvlečka lahko med seboj razlikujejo tudi do 30 % (27).

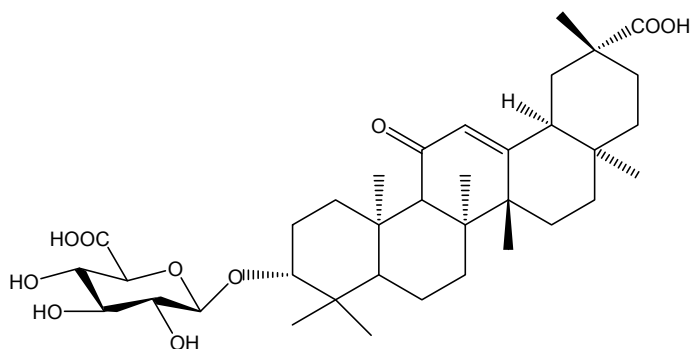
1.1.3. FARMAKOKINETIKA GLICIRIZINA

Zaužit glicirizin intestinalne bakterije hidrolizirajo v njegov glavni metabolit 18 β -gliciretinsko kislino (GA) (5). Po absorpciji iz črevesa se v jetrih metabolizira v 18 β -monoglukuronid, ki se preko žolča izloči v dvanajstnik. V tankem črevesu pa se ponovno reabsorbira in zapade v enterohepatični cikel. 18 β -monoglukuronid se pretežno izloči s fecesom. V urin naj bi se ga izločilo manj kot 1 % od celotne zaužite količine glicirizina (4, 6).

Enterohepatična cirkulacija gliciretinske kisline je dobro vidna v naslednji raziskavi. Žolč podgane, kateri so aplicirali gliciretinsko kislino, so vstavili v duodenum druge podgane. V 6 urah se je v žolč te podgane izločilo 14 %, v 24 oziroma 48 urah pa 29 % oziroma 31 % gliciretinske kisline. V analiziranem žolču so našli 3 oblike gliciretinske kisline: 18 β -gliciretil-30-glukuronid, 18 β -gliciretil-3-O-glukuronid in 18 β -gliciretil-3-O-sulfat, kar kaže, da pride do konjugacije gliciretinske kisline še preden se izloči v žolč (27).

Prav zaradi vstopa glicirizina v enterohepatični cikel pa se lahko, zlasti pri ljudeh s počasnim gastrointestinalnim prehodom, ta dalj časa zadrži v telesu, previsoki odmerki droge pa so toliko bolj nevarni.



18 β -glicirinska kislina 3-O-monoglukuronid

Slika 3: Glicirizinska kislina in njena metabolita (8)

1.1.4. TOKSIKOLOGIJA

Zaradi pogoste uporabe pripravkov iz golostebelnega sladkega korena, predvsem glicirizina, tako v prehrani kot za terapevtske namene, se lahko pri nenadzorovani in dolgotrajni uporabi hitro pojavijo neželeni učinki.

Eden najbolj pogostih poznanih neželenih učinkov, ki se pojavi ob dolgotrajni uporabi prevelikih količin pripravkov iz sladkega korena, je povišan krvni pritisk. Za to naj bi bila odgovorna glicirizin oziroma glicirizinska kislina, ki vplivata na delovanje renin-angiotenzin-aldosteron sistema. Sprva so domnevali, da povečata delovanje aldosterona preko vezave na mineralokortikoidne receptorje v ledvicah. Pojav se imenuje psevdaldosteronizem, simptomi pa so podobni simptomom hiperaldosteronizma: poleg hipertenzije še povečano izločanje kalijevih ionov in hipokaliemija, motnje mišične kontraktilnosti in srčnega ritma, večanja telesne mase ter retencija natrijevih in kloridnih ionov ter vode, kar vodi do edemov (19, 20).

Kasneje so ugotovili, da glicirizin oziroma glicirizinska kislina ne delujeta neposredno preko vezave na mineralokortikoidne receptorje, ampak vplivata na metabolizem kortizola. Preko inhibicije ledvičnega encima 11 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze namreč preprečita pretvorbo aktivnega kortizola do njegove neaktivne oblike, kortizona (ta nima več afinitete do aldosteronskih receptorjev). Povečane koncentracije kortizola povzročijo močne mineralokortikoidne učinke oz. psevdaldosteronizem (21). Novejše študije kažejo celo, da za psevdaldosteronske učinke nista odgovorna glicirizin oziroma glicirizinska kislina, ampak metabolit glicirizinske kisline, 3 β -D-monoglukuronil-18 β -glicirinska

kislina (22). Pojav simptomov psevdaldosteronizma in kako obsežni bodo pa je močno odvisno od odmerka in dobe uživanja sladkega korena ter od vsakega posameznika. Simptomi so se pri nekaterih ljudeh pojavili že ob 1,5 g dnevno zaužitega izvlečka sladkega korena, pri drugih pa šele ob 250 g (19).

Dolgotrajna hipokaliemija lahko privede do nastanka rabdomiolize. Gre za razpad, razkroj skeletne mišičnine, ki se kaže s slabostjo prizadetih mišic ter oslabljenimi mišičnimi refleksi. Pojavi se mioglobinurija kot posledica povečane koncentracije mioglobina v krvi, pri tem pa pogosto pride tudi do poškodb ledvičnih tubulov in glomerulov (23).

Pri dolgotrajni uporabi sladkega korena lahko pride tudi do amenoreje. Menstruacija pa se ponovno pojavi, ko ga prenehamo uživati (4).

1.1.5. KONTRAINDIKACIJE

Po priporočilih komisije E pripravkov iz sladkega korena ne bi smeli uživati bolniki s holestatskimi jetrnimi boleznimi in cirozo, hipertonijo, hipokaliemijo in kronično ledvično insuficienco. V času nosečnosti in dojenja uporaba prav tako ni priporočljiva (3, 4)

1.1.6. INTERAKCIJE

Znana je interakcija pripravkov iz golostebelnega sladkega korena s prednizolonom. Glicirizin namreč zmanjša očistek prednizolona in tako poviša njegovo plazemsko koncentracijo. Gliciretinska kislina poveča vazokonstrikcijo pri jemanju hidrokortizona. Pri hkratnem jemanju pripravkov iz sladkega korena in oralnih kontraceptivov pa lahko pride do pojava hipertenzije, edemov in hipokaliemije (24).

Zaradi povečanega izločanja kalijevih ionov pri uživanju sladkega korena je mogoča interakcija s kardiotoničnimi glikozidi, pri čemer lahko pride do pojava aritmij, palpitacij, slabosti in bolečin v trebuhu. Prav tako lahko zaradi dodatne izgube kalija pride do interakcije s tiazidnimi diuretiki (25, 26).

1.2. METODE ZA DOLOČANJE 18 β -GLICIRETINSKE KISLINE V URINU

Zaradi pogoste uporabe glicirizina tako v prehrani kot tudi v farmacevtski industriji, lahko pride zaradi vnosa prevelikih količin do resnih neželenih učinkov. Včasih se ljudje sploh

ne zavedajo, da uživajo glicirizin, kaj šele njegove količine. Zato so vedno večje potrebe po klinično uporabnih kvantitativnih metodah, s katerimi bi hitro potrdili sum na prekomerno uživanje glicirizina oziroma izvlečka sladkega korena (30).

Tako je bilo razvitih že nekaj metod za določanje 18β -gliciretinske kisline, ponavadi po encimski hidrolizi 3β -monoglukuronil- 18β -gliciretinske kisline, in sicer plinska kromatografija-masna spektrometrija (GC-MS), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), kapilarna elektroforeza, EIA-test (encimsko-immunski test), RIA test (30, 31, 33). Te metode merijo GA v plazmi, žolču ali urinu prostovoljcev ali testnih živali, katerim so intravensko ali peroralno aplicirali terapevtsko dozo čistega glicirizina (30). Čeprav se v urin izloči manj kot 1 % zaužitega glicirizina, pa ima urinska analiza nekaj prednosti pred analizo plazemskih vzorcev. Z zbiranjem urinskih vzorcev se izognemo intravenskim posegom, poleg tega so enostavni za zbiranje in ne potrebujemo medicinskega osebja (31).

V nadaljevanju bom predstavila nekaj v preteklosti razvitih metod za kvantitativno določanje GA v urinu, in sicer za vsako metodo po eno raziskavo.

1.2.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA – MASNA SPEKTROMETRIJA (GC-MS)

Meja detekcije GA v urinu je bila 3 $\mu\text{g/L}$.

3 zdrave prostovoljke so vsak dan 5 dni zaporedoma zaužile isto količino izvlečka sladkega korena, in sicer prva 50, druga 100 in tretja 200 g. GA so merili v urinskih vzorcih zbranih tekom teh 5 dni in v dodatnih urinskih vzorcih, zbranih še med 5. in 10. dnevom. 22-letni prostovoljec pa je zaužil enkratno količino izvlečka sladkega korena, in sicer 500 g. Urinske vzorce so zbirali naslednjih 5 dni. V vseh primerih je zaužit izveček vseboval 0,23 ut% glicirizina.

MG-GA je bil v urinu zaznan kmalu po zaužitju. Najvišja koncentracija je bila izmerjena v urinu prostovoljke, ki je vsak dan jemala 200 g izvlečka, in sicer 80 ur po 1. zaužitju, najnižja pa pri jemanju 50 g na dan. MG-GA so v urinu zaznali še 5 dni po zaužitju zadnjega odmerka izvlečka. Po enkratnem zaužitju 500 g izvlečka, kar je enako 1150 mg glicirizina, so MG-GA zadnje zaznali po 51 urah po zaužitju. V tem času se je v urin izločilo skupaj 406 μg MG-GA, kar pomeni da se je izločilo le 0,04 % zaužitega glicirizina (32).

1.2.2. MICELARNA ELEKTROKINETIČNA KROMATOGRAFIJA (MEKC)

MEKC so izvedli na sistemu z UV detektorjem. Valovna dolžina je bila 254 nm. Za separacijo so uporabili neprevlečeno kapilaro. Za čiščenje in koncentriranje vzorcev so uporabili ekstrakcijo na trdni fazi (SPE-C₁₈). Raztopina pufra je vsebovala natrijev dihidrogenfosfat, natrijev tetraborat, tetrabutilamonijev bromid in natrijev dodecilsulfat. Meja detekcije 18 β -gliciretinske kisline je bila 2 μ g/ml, torej približno 1000x slabša kot pri GC-MS.

MEKC se je izkazala za natančno in točno metodo, poleg tega pa je enostavna, hitra in cenejša od drugih metod (33).

1.2.3. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je ena izmed najpogosteje uporabljenih analiznih tehnik, ki temelji na ločevanju in detekciji komponent v tekoči fazi.

Pri normalnofazni tekočinski kromatografiji je stacionarna faza polarna, mobilna pa nepolarna. Pri reverznofazni tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (RP-HPLC) pa je polarnost zamenjana. Tako nepolarno stacionarno fazo ponavadi predstavlja organosiloksanska porozna površina, to je nosilec iz silikagela s kovalentno vezanimi alkilnimi skupinami (C₄-butil, C₈-oktil, C₁₈-oktadecil). Kot polarno mobilno fazo pa najpogosteje uporabljamo vodne raztopine acetonitrila, metanola ali tetrahidrofurana. Ločevanje poteka s porazdeljevanjem komponent vzorca med stacionarno in mobilno fazo. Molekule potujejo s tokom mobilne faze skozi stacionarno fazo, pri čemer se začnejo ločevati. Bolj polarne molekule se iz kolone eluirajo prej, manj polarne pa se v stacionarni fazi bolj intenzivno porazdeljujejo, zato je njihov retencijski čas daljši (35, 36).

M.A.Raggi in sodelavci so razvili HPLC metodo, ki jo bom opisala natančneje, saj sem tudi sama v eksperimentalnem delu diplomske naloge uporabila to metodo.

Osnovno raztopino glicirizina (G) in gliciretinske kisline (GA) so pripravili z raztapljanjem 50 mg G ali GA v 50 ml etanola. Osnovno raztopino propil-4-

hidroksibenzoata (PPB) pa so pripravili z raztapljanjem 72 mg PPB v 20 ml metanola. Standardne raztopine so bile pripravljene z redčenjem osnovnih raztopin z metanolom.

Uporabljena kolona je bila reverzno-fazna kolona (250 mm x 4 mm I.D., 4,5 μ m, RP-18, Merck) opremljena s filtrom. Mobilna faza za določanje glicirizina je bila sestavljena iz CH₃CN/H₂O/CH₃COOH ter za določanje gliciretinske kisline CH₃OH/H₂O/CH₃COOH. Pretok mobilne faze za G je bil 1 ml/min, za GA pa 0,85 ml/min, uporabljena valovna dolžina pa je bila 251 nm.

Pred analizo so vsak vzorec 20 minut močno tresli v 2,5 ml metanola in nato centrifugirali 30 minut pri 3000 obratih. Supernatant so vakumsko posušili, ostanek pa raztopili v 400 μ L metanola, nato pa filtrirali skozi membranski filter Millipore (0,45 μ m). 50 μ L alikvota so injicirali na HPLC kolono.

Standardni vzorci človeškega urina so bili pripravljene z dodajanjem različnih količin G ali GA v 400 μ L neobdelanih urinskih vzorcev. Meja detekcije za G je bila 0.2 μ g/mL, za GA pa celo 0.1 μ g/mL (34), kar je približno 10 x boljše kot pri kapilarni elektroforezi.

2. NAMEN DELA

Glavni namen diplomske naloge je ugotoviti kinetični profil 3β -monoglukuronil- 18β -gliciretinske kisline, glavnega metabolita glicirizina, v urinu prostovoljcev. Metabolit bomo ugotavljali po zaužitju napitka, slajenega z 600 mg glicirizina.

Za določitev smo izbrali reverznofazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (RP-HPLC), ki jo bomo najprej optimizirali. Spreminjali bomo pretok, valovno dolžino in volumen injiciranja.

Validacija metode je bila že predhodno izvedena v okviru druge raziskovalne naloge (31). Še enkrat pa bomo v okviru validacije preverili natančnost metode.

Optimizirali bomo tudi pripravo urinskih vzorcev za meritve. Spreminjali bomo čas inkubacije, ki je potreben, da encim β -glukuronidaza hidrolizira 3β -monoglukuronil- 18β -gliciretinsko kislino (MG-GA) v 18β -gliciretinsko kislino (GA). Nato bomo določili še optimalno količino dodanega encima.

Z optimirano RP-HPLC metodo bomo nato izvedli meritve na urinskih vzorcih 6 prostovoljcev, izmerili količino izločene 3β -monoglukuronil- 18β -gliciretinske kisline v urin in njeno hitrost izločanja pri posameznem prostovoljcu ter primerjali rezultate med seboj.

3. MATERIALI IN METODE DE LA

3.1. STANDARDI

- 18 β -gliciretinska kislina, čistota: ≥ 97 %, Fluka, Sigma-Aldrich, France;
- Prostovoljci so vzeli glicirizin, čistota: ≥ 99 %, Carl Roth GmbH + Co.KG.

3.2. REAGENTI

3.2.1. REAGENTI ZA RP-HPLC

- acetonitril za HPLC, elektroforezne čistote, Chromasolv®, Sigma - Aldrich, St. Louis, ZDA;
- trifluorocetna kislina (CF₃COOH), Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA.

3.2.2. REAGENTI ZA PRIPRAVO STANDARDA

- 18 β -gliciretinske kisline
- prečiščena voda
- metanol (MeOH) Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA;

3.2.3. REAGENTI ZA PRIPRAVO URINSKIH VZORCEV

- klorovodikova kislina (HCl) Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA;
- trifluorocetna kislina (CF₃COOH), Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA;
- prečiščena voda;
- encim β -glukuronidaza, tip HP-2, iz *Helix pomatia*, Sigma-Aldrich St. Louis, ZDA.
 β -glukuronidaza tipa HP-2 se uporablja za predhodno encimsko hidrolizo glukuronidov v urinu, krvi in serumu za analize z masno spektrometrijo in HPLC ter za druge namene. Encim izolirajo iz polža *Helix pomatia* in je surova raztopina encimov iz velikega vrtnega polža. Pri tem encimu je bila ugotovljena tudi sulfatazna aktivnost. Ali bo imel encim glukuronidazno ali sulfatazno aktivnost je zelo odvisno od pH-ja. Zato sem morala biti pri nakisanju vzorcev previdna, saj je optimalen pH za glukuronidazno aktivnost od 4.5 do 5.0, za sulfatazno pa približno 6.2 (15, 17, 37).

3.3. OPREMA IN APARATURE

3.3.1. OPREMA IN APARATURE ZA RP-HPLC

- Injektor Spark Midas;
- Črpalka Well Chrom K-501, Knauer, Berlin, Nemčija;
- detektor Well Chrom K-2500, Knauer, Berlin, Nemčija;

- računalniški program EuroChrom[®] 2000 Basic Edition, verzija 2.05;
- kolona Chromolith[®] Performance RP-18, 150 x 4.6 mm I.D., Merck, Darmstadt, Nemčija.

Chromolith[®] HPLC kolone niso več polnjene s kroglicami silicijevega gela, tako kot so silikagelske, ampak je silicijev gel v enem kosu. Te monolitske kolone so narejene iz silicija z bimodalno strukturo por, ki omogoča kombinacijo makropor in mezopor. Makropore omogočajo večjo hitrost pretoka pri nižjem tlaku. Njihova povprečna velikost je 2 μm . Mezopore tvorijo fino porozno strukturo in s tem veliko površino za adsorpcijo. Njihova povprečna velikost je 13 nm. Chromolith[®] HPLC kolona ima tako kar nekaj prednosti: omogoča uporabo večjih hitrosti pretoka pri enakih tlakih in s tem krajše retencijske čase ter krajši analizni čas, kolona je mehansko zelo odporna kar ji daje dolgo življenjsko dobo ter omogoča uporabo večino znanih mobilnih faz.

3.3.2. OSTALO

- Tehnica KERN ALS 120-4, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija;
- pipete Biohit, Helsinki, Finska;
- centrifugirka Sanyo, Hawk 15/05;

3.4. METODE DELA

3.4.1 POSTOPEK ZBIRANJA URINSKIH VZORCEV

6 prostovoljcev, starih od 24 do 40 let, je popilo napitek, ki je bila voda, slajena s 600 mg glicirizina v prašku. Prvič so ga vzeli v dopoldanskih urah (~10.00h), drugič (čez 14 dni) pa v popoldanskih urah (~19.00h). Nato so prostovoljci od 2,5 do 4 dni zbirali in s plastično merilno posodo izmerili celoten volumen urina ob vsakem uriniranju in del shranili v plastične epruvete z navojnim zamaškom. Vzorce smo ves čas hranili v hladilniku. Prostovoljci so lahko med poizkusom jedli in pili vse razen produktov, ki bi vsebovali glicirizin. Ker nismo želeli vplivati na volumen dnevnega urina, niso imeli omejitev niti pri količini zaužite dnevne tekočine, dobili pa so navodilo, naj pijejo enake količine pijač kot običajno.

3.4.2. PRIPRAVA STANDARDNEGA VZORCA

Pripravili smo osnovno raztopino standarda 18 β -gliciretinske kisline (GK): 1mg/ml MeOH, iz nje pa standardni vzorec s koncentracijo 2 $\mu\text{L}/1000 \mu\text{L}$ H₂O oziroma 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Standardni vzorec smo pripravili z petstokratno redčitvijo, in sicer najprej 20 $\mu\text{L}/1000\mu\text{L}$ H₂O, nato pa sem to raztopino redčila še 100 $\mu\text{L}/1000\mu\text{L}$ H₂O.

3.4.3. PRIPRAVA URINSKEGA STANDARDA

998 μL čistega urina (brez $18\beta\text{-GK}$) + $2\mu\text{L}$ osnovne raztopine standarda, torej $2\mu\text{L}/1000\mu\text{L}$ urina.

3.4.4. OPTIMIZACIJA METODE

Reverznofazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za določanje monoglukuronil- 18β -gliciretinske kisline.

Poskušali smo najti optimalne pogoje za detekcijo 18β -gliciretinske kisline, tako da smo spreminjali hitrost pretoka, valovno dolžino in volumen injiciranja.

Parametri analize, ki so bili ves čas analize nespremenjeni:

- Mobilna faza A (MFA): destilirana voda z 0,1% trifluoroocetno kislino (TFA);
- Mobilna faza B (MFB): 100% acetonitril (MeCN) z 0,1% TFA;
- elucijski gradient (0-1 minute: 100 % MFA, 1-2 minut: 100-40 % MFA, 2-4 minut: 40 % MFA, 4-4,5 minut: 40-30 % MFA, 4,5-6 minut: 30 % MFA, 6-6,5 minut: 30-100 % MFA, 6,5-10 minut: 10 % MFA).

3.4.4.1. OPTIMIZACIJA VALOVNE DOLŽINE

Posneli smo standardni vzorec pri valovnih dolžinah 220 nm, 225 nm, 230 nm, 235 nm, 240 nm, 245 nm, 250 nm, 254 nm (prvotna valovna dolžina) ter pri 260 nm.

3.4.4.2. OPTIMIZACIJA VOLUMNA INJICIRANJA

Optimizacijo volumna injiciranja smo izvedli z urinskim standardom pri ugotovljeni optimalni valovni dolžini 250 nm. Injicirali smo $50\mu\text{L}$ (prvotni volumen injiciranja), $100\mu\text{L}$, $200\mu\text{L}$ ter $500\mu\text{L}$ urinskega vzorca.

3.4.4.3. OPTIMIZACIJA HITROSTI PRETOKA MOBILNE FAZE

Injicirali smo optimalen volumen injiciranja, in sicer $500\mu\text{L}$ urinskega standarda in ga posneli pri 250 nm, pri tem pa uporabili različne hitrosti pretoka mobilne faze, in sicer 2 ml/min (prvotna hitrost pretoka) ter 3 ml/min.

3.4.5. OPTIMIZACIJA PRIPRAVE URINSKEGA VZORCA

Najprej smo optimizirali čas inkubacije, ki je potreben, da encim β -glukuronidaza hidrolizira 3β -monoglukuronil- 18β -gliciretinsko kislino v 18β -gliciretinsko kislino. Ko smo dobili optimalen čas inkubacije, smo določili še optimalen volumen dodane raztopine encima.

Optimizacijo smo izvedli na vzorcu prostovoljca št. 3, ki je bil vzet 16.10.2008 ob 7.50h.

Preglednica 2: Priprava urinskega vzorca: različni časi inkubacije in različni volumni dodane raztopine encima.

Čas inkubacije (h)	Volumen urina (μL)	Volumen HCl (μL)	Volumen raztopine encima (μL)	Volumen H ₂ O (μL)	Temperatura inkubacije ($^{\circ}\text{C}$)
1	940	10	5	45	37
2	940	10	5	45	
3	940	10	5	45	
4	940	10	5	45	
			2,5	47,5	
			10	40	
			20	30	

3.4.6. PRIPRAVA URINSKIH VZORCEV PROSTOVOLJCEV

Po optimizaciji priprave urinskega vzorca smo tako vse vzorce prostovoljcev pripravili po enakem postopku. V plastično centrifugirko smo pripravili 1 ml urinskega vzorca, in sicer 950 μL (urina + 1M HCl) + 5 μL (optimalen volumen) raztopine encima β -glukuronidaza + 45 μL H₂O. Volumen raztopine encima in volumen vode sta bila v vseh vzorcih enaka. Volumen urina oziroma volumen HCl pa je bil odvisen od izmerjenega pH urina. Optimalno glukuronidazno delovanje encima je pri pH 4,5-5, pH urina pa je bil običajno višji od te vrednosti. Zato smo ga še pred dodatkom raztopine encima znižali z dodatkom 1M HCl. Tako smo pri pripravi posameznih vzorcev glede na pH urina dodali od 870 μL -950 μL urina + 80 μL -0 μL 1M HCl.

Tako pripravljen vzorec smo dobro premešali in ga dali za 4h (optimalen čas inkubacije) inkubirati pri 37 $^{\circ}\text{C}$.

Po inkubaciji smo vzorec nakisali s 0,1% trifluorocetno kislino (TFA) do pH 1-2. Vzorec smo dobro premešali in počakali nekaj minut, da se je pojavila oborina. Nato smo ga centrifugirali 3 minute pri 10.000 obratih. Bister vzorec smo odpipetirali v vialo in posneli HPLC kromatogram.

3.4.7. PONOVLJIVOST METODE NA STANDARDNEM VZORCU

➤ DNEVNA PONOVLJIVOST

Pripravili smo standardni vzorec 18 β -GA s koncentracijo 2 μ g/mL. V istem dnevu smo ga analizirali trikrat, še pred analizo urinskih vzorcev. S pomočjo računalniškega programa smo določili AUC in višine vrhov za 18 β -GA. Izračunali smo relativno standardno deviacijo (RSD) površin pod krivuljo in višin vrhov.

➤ MEDDNEVNA PONOVLJIVOST

Pripravili smo standardna vzorca 18 β -GA v koncentraciji 1 μ g/mL in 2 μ g/mL. Vsak vzorec smo analizirali trikrat v enem dnevu. Analizo smo ponovili v treh različnih dneh. S pomočjo računalniškega programa smo določili AUC in višine vrhov za 18 β -GA. Izračunali smo relativno standardno deviacijo (RSD) površin pod krivuljo in višin vrhov.

3.4.8. PONOVLJIVOST METODE NA URINSKIH VZORCIH

Ponovljivost metode na urinskih vzorcih smo preverili na vzorcu prostovoljca št. 3, ki je bil vzet 16.10. ob 11.45h.

Vse urinske vzorce smo pripravili na enak način, in sicer 940 μ L urina + 10 μ L HCl + 5 μ L encima + 45 μ L H₂O. Nadaljnji postopek priprave je bil enak kot je opisan v poglavju 3.4.6.

➤ DNEVNA PONOVLJIVOST

Urinski vzorec smo pripravili 6x in vse analizirali v istem dnevu. S pomočjo računalniškega programa smo določili AUC in višine vrhov za 18 β -GA. Izračunali smo relativno standardno deviacijo (RSD) površin pod krivuljo in višin vrhov.

➤ MEDDNEVNA PONOVLJIVOST

Urinski vzorec smo pripravili 2x in oba analizirali v istem dnevu. Analizo smo ponovili v štirih različnih dneh. S pomočjo računalniškega programa smo določili AUC in višine vrhov za 18 β -GA. Izračunali smo relativno standardno deviacijo (RSD) površin pod krivuljo in višin vrhov.

3.4.9. IZRAČUN KONCENTRACIJE IN KOLIČINE METABOLITA TER HITROSTI IZLOČANJA V URIN PROSTOVOLJCEV

3.4.9.1. IZRAČUN KONCENTRACIJE METABOLITA (MG-GA) V URINU

$$C_{uv} = C_{st} \cdot AUC_{uv} \cdot V_{st} / (AUC_{st} \cdot V_{uv})$$

C_{uv} ... koncentracija metabolita v urinu ($\mu\text{g/mL}$)

V_{uv} ... volumen urinskega vzorca (mL) v končnem vzorcu, ki je variral $870\mu\text{L}$ - $950\mu\text{L}$

C_{st} ... koncentracija standardnega vzorca ($\mu\text{g/mL}$)

V_{st} ... volumen standardnega vzorca (ml), ki je bil konstanten 1 ml

AUC_{uv} ... površina pod krivuljo urinskega vzorca ($\text{mAU} \cdot \text{min}$)

AUC_{st} ... površina pod krivuljo standardnega vzorca ($\text{mAU} \cdot \text{min}$)

3.4.9.2. IZRAČUN KOLIČINE METABOLITA (MG-GA) V URINU

$$\text{Količina metabolita} = C_{uv} \cdot V_u \quad (\mu\text{g})$$

V_u ... volumen urina (mL), ki ga je posamezen prostovoljec izločil pri posameznem uriniranju.

3.4.9.3. IZRAČUN HITROSTI IZLOČANJA METABOLITA (MG-GA) V URIN

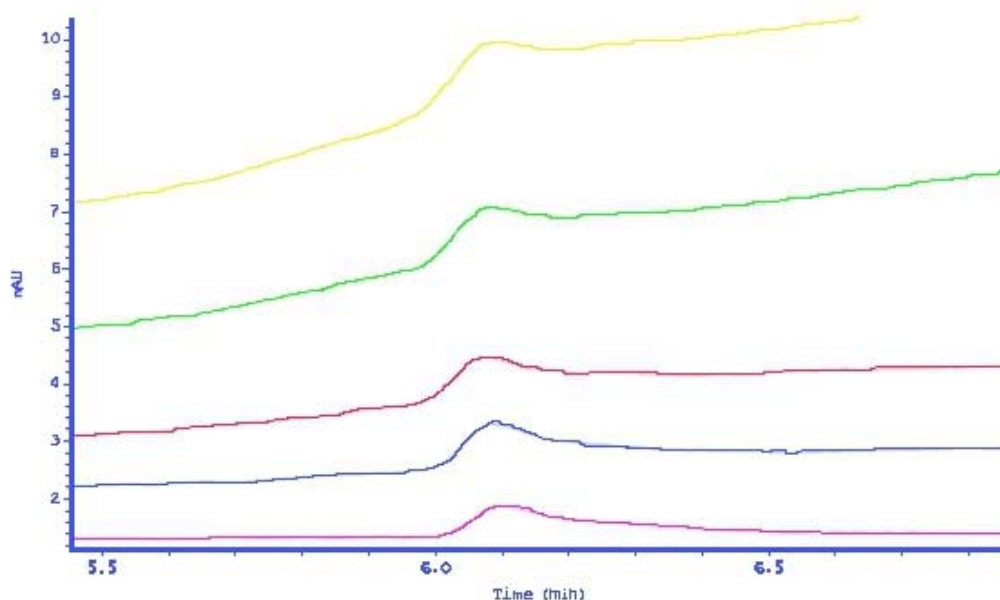
$$v = \text{količina metabolita} / \text{interval med dvema zaporednima odvzemoma/uriniranjema (ura)} \\ (\mu\text{g/uro})$$

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1. OPTIMIZACIJA METODE

S spreminjanjem valovne dolžine, volumna injiciranja in hitrosti pretoka smo želeli dobiti optimalne pogoje za čim boljši odziv 18 β -gliciretinske kisline na kromatogramu ter najti čim krajši čas analize.

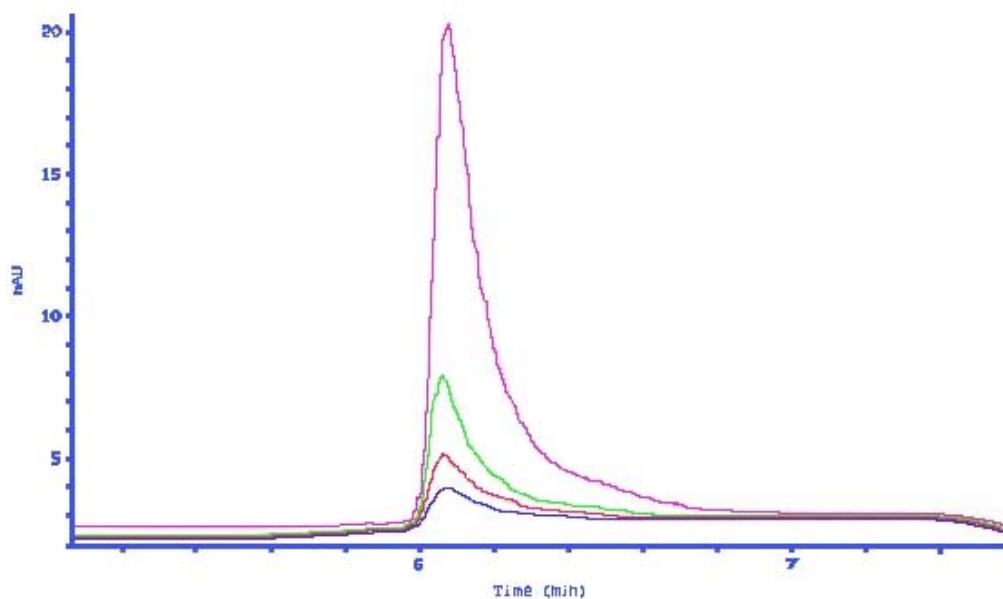
4.1.1. OPTIMIZACIJA VALOVNE DOLŽINE



Slika 4: Odzivi standardnega vzorca ($c = 2\mu\text{L/ml H}_2\text{O}$) pri različnih valovnih dolžinah (rumena = 235 nm, zelena = 240 nm, rdeča = 245 nm, modra = 250 nm, vijolična = 260 nm)

Najboljši odziv standardnega vzorca (kompromis med čim višjim vrhom in stabilno bazno linijo) je viden pri valovni dolžini 250 nm.

4.1.2. OPTIMIZACIJA VOLUMNA INJICIRANJA



Slika 5: Odzivi urinskega standarda pri različnih volumnih injiciranja (vijolična = 500 μ L, zelena = 200 μ L, rdeča = 100 μ L, modra = 50 μ L). Pretok: 2 ml/min, valovna dolžina: 250 nm.

Iz grafa je razvidno, da je najboljši odziv pri volumnu injiciranja 500 μ L, zato smo se odločili zanj. Po večkratnem injiciranju tako velikega volumna pa se je izkazalo, da je prevelik, saj sta se po številnih analizah pik neznane sestavine urina, ki se na kromatogramu pojavi pred pikom GA (Na zgornjem kromatogramu pika neznane sestavine urina ni videti, saj smo povečali le del kromatograma, kjer so vidni piki 18 β -gliciretinske kisline. Neznani pik pa ima retencijski čas manjši kot 5 minut.) ter pik GA močno razpotegnila. Tudi ločljivost se je poslabšala, saj se je piku neznane sestavine urina, ki je imel pri prvotnem volumnu injiciranja 50 μ L retencijski čas 4,5 minut, ta pri injiciranju 500 μ L povečal na 5,5 minut in se tako praktično združil s pikom 18 β -gliciretinske kisline, ki ima retencijski čas 6,13 minut

Da smo ohranili dobro ločljivost in ozek pik, smo se odločili za volumen injiciranja 200 μ L, ki daje še vedno boljše rezultate kot prvotni volumen injiciranja 50 μ L.

4.1.3. OPTIMIZACIJA HITROSTI PRETOKA

Hitrost pretoka je zelo pomembna, saj vpliva tako na dobro separacijo komponent v vzorcu kot tudi na dobro ločljivost pikov.

Preglednica 3: Površine pod krivuljami pri različnih hitrostih pretoka mobilne faze. Valovna dolžina je bila 250 nm.

Hitrost pretoka (ml/min)	Volumen injiciranja (μl)	AUC (mAU*min)
3	500	1,737
2	500	2,68

Najboljši odziv je bil pri hitrosti pretoka 2 ml/min. To, da je AUC večji pri nižjih pretokih, je splošna zakonitost in je posledica tega, da se spojine zaradi počasnejšega pretoka dalj časa zadržujejo v detektorju, tako da ista količina snovi povzroči večji AUC. Pomembnejše dejstvo pri izbiri optimalne hitrosti pretoka je dobra separacija komponent v vzorcu, ki pa je bila boljša pri hitrosti pretoka 2 ml/min, zato smo jo uporabili pri nadaljnjih analizah.

4.2. OPTIMIRANA METODA

Preglednica 4: Primerjava pogojev med prvotno in optimirano metodo.

	HPLC metoda		Nova optimirana HPLC metoda	
Volumen injiciranja (μL)	50		200	
Pretok (mL/min)	2		2	
MFA	destilirana voda z 0,1% trifluoroocetno kislino (TFA)		destilirana voda z 0,1% trifluoroocetno kislino (TFA)	
MFB	100% acetonitril (MeCN) z 0,1% TFA		100% acetonitril (MeCN) z 0,1% TFA	
Elucijski gradient	% mobilne faze A	Čas (min)	% mobilne faze A	Čas (min)
	100	0-1	100	0-1
	100-40	1-2	100-40	1-2
	40	2-4	40	2-4
	40-30	4-4.5	40-30	4-4.5
	30	4.5-6	30	4.5-6
	30-100	6-6.5	30-100	6-6.5
	100	6.5-10	100	6.5-10
Valovna dolžina (nm)	254		250	

4.3. OPTIMIZACIJA PRIPRAVE URINSKEGA VZORCA

S spreminjanjem časa inkubacije in volumna dodane raztopine encima smo želeli encimu β -glukuronidaza omogočiti čim večjo pretvorbo 3β -monoglukuronil- 18β -gliciretinske kisline v 18β -gliciretinsko kislino.

S pomočjo računalniškega programa smo določili AUC (površina pod krivuljo) pri vseh meritvah.

Preglednica 5: Površine pod krivuljami pri različnih časih inkubacije in različnih volumnih dodane raztopine encima.

Čas inkubacije (h)	Volumen raztopine encima (μ L)	AUC (mAU*min)
1	5	0,127
2	5	0,219
3	5	0,246
4	5	0,266
	2,5	0,205
	10	0,249
	20	0,240

Kot je razvidno iz preglednice, dobimo najboljši odziv po štirih urah inkubacije z dodatkom 5 μ L raztopine encima. Z dodatkom 2,5 μ L raztopine encima se odziv kar močno zmanjša, z dodatkom 10 μ L in 20 μ L raztopine encima pa se odziv bistveno ne poveča. Za potrditev, da je najboljši odziv res po štirih urah inkubacije, pa bi morali preveriti še odziv 18β -gliciretinske kisline po petih, šestih urah inkubacije.

4.4. PONOVLJIVOST METODE NA STANDARDNEM VZORCU

Ponovljivost metode nam pove, kako skladni so posamezni rezultati serije več injiciranj standarda. Rezultat podamo kot relativno standardno deviacijo (RSD) meritev več zaporednih injiciranj istega vzorca (38).

➤ DNEVNA PONOVLJIVOST

Dnevna ponovljivost metode označuje natančnost metode znotraj kratkega časovnega obdobja (v našem primeru znotraj enega dneva). Rezultat podamo kot RSD pridobljenih podatkov (38).

S pomočjo računalniškega programa smo določili AUC in višine vrhov pri vseh meritvah, nato pa izračunali RSD teh podatkov (preglednica 6).

Preglednica 6: RSD površin pod krivuljo in višine vrhov za standardni vzorec s koncentracijo 2 µg/mL. Analize so potekale znotraj enega dneva v treh ponovitvah več dni zaporedoma. Odebeljeno so označeni rezultati, ki ustrezajo zahtevam.

Koncentracija standarda (µg/mL)	Dan meritve	AUC(mAU*min)	RSD (%) površine pod krivuljo	Višina	RSD (%) višine
2	1.	0,696	2,683	5,367	2,781
		0,674		5,131	
		0,711		5,402	
	2.	0,624	4,191	4,811	3,090
		0,678		5,027	
		0,659		5,109	
	3.	0,963	3,465	7,581	2,602
		0,955		7,578	
		0,903		7,243	
	4.	1,068	3,899	8,504	4,138
		1,018		8,062	
		0,989		7,843	
	5.	0,913	2,645	7,01	2,388
		0,888		6,922	
		0,866		6,692	
	6.	0,891	2,848	6,819	1,453
		0,842		6,646	
		0,862		6,813	
	7.	0,804	3,778	6,149	5,185
		0,748		5,546	
		0,762		5,806	
	8.	0,674	16,503	5,014	18,582
		0,913		7,102	
		0,911		7,033	
	9.	0,919	0,878	7,114	3,321
		0,911		6,853	
		0,903		6,659	

Zaželeno je, da je RSD podatkov, pridobljenih v enem dnevu, manjši od 1 odstotka. Metoda daje slabo ponovljive AUC vrednosti kot tudi višine vrhov, saj smo v devetih dneh dobili dobro ponovljivost AUC le v enem dnevu.

➤ MEDDNEVNA PONOVLJIVOST

Meddnevna ponovljivost je podana kot dolgoročna natančnost izmerjenih podatkov. Ugotoviti želimo ali bo metoda zagotavljala enake in ponovljive rezultate znotraj istega laboratorija tudi po končanem razvoju metode. Ponovljivost metode moramo preizkusiti v več zaporednih dneh (39). Rezultat podamo kot RSD pridobljenih podatkov.

S pomočjo računalniškega programa smo določili AUC in višine vrhov pri vseh meritvah, nato pa izračunali RSD teh podatkov (preglednica 7).

Preglednica 7: RSD površin pod krivuljo in višin vrhov za standardni vzorec pri določeni koncentraciji. Analize so potekale v treh različnih dneh, vsaka v treh ponovitvah. Odebeljeno so označeni rezultati, ki ustrezajo zahtevam.

Koncentracija standarda ($\mu\text{g/mL}$)	Dan meritve	AUC_{povp} (mAU*min)	RSD (%) površine pod krivuljo	Višina _{povp}	RSD (%) višine
1	1.	0,229	3,068	1,775	3,354
	2.	0,220		1,666	
	3.	0,234		1,754	
2	1.	0,833	5,861	6,383	4,947
	2.	0,911		6,875	
	3.	0,844		6,270	

AUC_{povp} = povprečje treh meritev AUC v istem dnevu

Višina_{povp} = povprečje treh meritev višine vrhov v istem dnevu

Zaželeno je, da je RSD podatkov, pridobljenih v treh različnih dneh, manjši od 2 odstotkov. Metoda daje neponovljive rezultate med dnevi, tako za AUC kot za višine vrhov, saj noben rezultat ne ustreza predpisanim zahtevam.

4.5. PONOVLJIVOST METODE NA URINSKEM VZORCU

➤ DNEVNA PONOVLJIVOST

Preglednica 8: RSD površin pod krivuljo in višin za urinski vzorec. Analize so potekale znotraj enega dneva v šestih ponovitvah. Odebeljeno so označeni rezultati, ki ustrezajo zahtevam.

AUC (mAU*min)	RSD %	Višina	RSD %
0,377	2,617	2,123	4,877
0,368		2,293	
0,38		2,324	
0,378		2,279	
0,375		2,308	
0,354		2,067	

Meje RSD podatkov za biološke vzorce, pridobljeni znotraj dneva, niso določene. Lahko nihajo tudi od 5 do 20 %. Metoda torej zagotavlja dobro ponovljive AUC in višine urinskega vzorca, saj so vsi rezultati znotraj zahtevane meje.

➤ MEDDNEVNA PONOVLJIVOST

Preglednica 9: RSD površin pod krivuljo in višin vrhov za urinski vzorec. Analize so potekale v štirih različnih dneh, vsaka v dveh ponovitvah. Odebeljeno so označeni rezultati, ki ustrezajo zahtevam.

Dan meritve	AUC _{povp} (mAU*min)	RSD %	Višina _{povp}	RSD%
1	0,363	6,212	2,488	7,214
2	0,309		2,087	
3	0,337		2,087	
4	0,334		2,253	

AUC_{povp} = povprečje dveh meritev AUC v istem dnevu

Višina_{povp} = povprečje dveh meritev višine vrhov v istem dnevu

Meje RSD podatkov za biološke vzorce, pridobljeni v različnih dneh, niso določene. Lahko nihajo tudi od 5 do 20 %. Metoda torej zagotavlja dobro ponovljive AUC in višine urinskega vzorca, saj so vsi rezultati znotraj zahtevane meje.

4.6. IZRAČUN KONCENTRACIJE IN KOLIČINE TER HITROSTI IZLOČANJA METABOLITA V URIN PROSTOVOLJCEV

4.6.1. IZBIRA USTREZNE KONCENTRACIJE IN POVRŠINE POD KRIVULJO STANDARDNEGA VZORCA

Podatki, pridobljeni pri oceni ponovljivosti metode na standardnem vzorcu, so nam služili tudi pri izbiri optimalne koncentracije in površine pod krivuljo standardnega vzorca, ki smo ju v nadaljevanju uporabili pri preračunavanju.

Preglednica 10: RSD dnevnih in meddnevni meritev površin pod krivuljo standardnega vzorca pri določeni koncentraciji. Odebeljeno so označeni podatki, ki smo jih uporabili pri nadaljnjem preračunavanju.

Koncentracija standarda ($\mu\text{g/ml}$)	Dan meritve	AUC _{povp} (mAU*min)
2	1	0,833
	2	0,911
	3	0,844
Povprečje AUC _{povp} (mAU*min)		0,862
1	1	0,229
	2	0,220
	3	0,234
Povprečje AUC _{povp} (mAU*min)		0,228

Odločili smo se za koncentracijo standardnega vzorca **1 $\mu\text{g/ml}$** , saj so pri tej koncentraciji vrednosti AUC standardnega vzorca najbližje vrednostim AUC urinskih vzorcev. Za AUC standardnega vzorca nismo vzeli povprečja meritev posameznega dne, ampak povprečje vrednosti večdnevni meritev, vzeli smo torej **0,228 mAU*min**.

Iz zgornje tabele je razvidno, da so rezultati meritev standardnega vzorca, ki jih daje metoda, nelinearni. Sorazmerno z naraščanjem koncentracije bi morala naraščati tudi vrednost površine pod krivuljo. V našem primeru pa se pri enkrat večji koncentraciji (2 $\mu\text{g/ml}$) AUC poveča za kar štirikrat. Tako je tudi zanesljivost vrednosti koncentracije, količine metabolita v urinu ter hitrosti izločanja metabolita, ki smo jih v nadaljevanju dobili s preračunavanjem, omejena s slabo linearnostjo metode.

4.6.2. PRIMER IZRAČUNA KONCENTRACIJE IN KOLIČINE METABOLITA TER HITROST NJEGOVEGA IZLOČANJA V URIN NA VZORCU C, VZETEGA PRI PROSTOVOLLCU 1 PO ZAUŽITJU ODMERKA GLICIRIZINA V DOPOLDANSKIH URAH

Z optimirano metodo in optimirano pripravo urinskih vzorcev za analizo smo lahko spremljali kinetični profil metabolita v urinu prostovoljcev, ki smo ga s hidrolizo pretvorili v 18 β -gliceritinsko kislino. Iz dobljenih rezultatov (glej Priloge 1-11) smo izračunali koncentracijo in količino v urin izločenega metabolita ter njegovo hitrost izločanja.

$$C_{st} = 1 \mu\text{g/ml}$$

$$V_{st} = 1 \text{ ml}$$

$$AUC_{st} = 0,228 \text{ mAU}\cdot\text{min}$$

$$AUC_{uv} = 0,0837 \text{ mAU}\cdot\text{min}$$

$$V_{uv} = 0,93 \text{ ml}$$

$$V_u = 170 \text{ ml}$$

$$\text{interval med dvema zaporednima odvzemoma} = 3,38 \text{ ur}$$

$$C_{uv} = C_{st} \cdot AUC_{uv} \cdot V_{st} / (AUC_{st} \cdot V_{uv}) = 0,395 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Količina metabolita} = C_{uv} \cdot V_u = 67,105 \mu\text{g}$$

$$v = \text{količina metabolita} / \text{interval med dvema zaporednima odvzemoma} = 19,85 \mu\text{g/uro}$$

Za vrednosti izračunov pri posameznih prostovoljcih glej priloge 1-11.

4.6.3. OBDELAVA MANJKAJOČIH VZORCEV

6 prostovoljcev je moralo po zaužitju 600 mg glicirizina, raztopljenega v vodi, zbirati vzorce urina vsakega uriniranja posebej. Zaradi nekompliance nekaterih prostovoljcev pa nam je nekaj teh vzorcev manjkalo. V tem primeru sem hitrost izločanja izračunala iz povprečja predhodne in naslednje vrednosti hitrosti izločanja. Iz te izračunane vrednosti sem nato izračunala še količino izločenega metabolita.

Preglednica 11: Seznam manjkajočih vzorcev ter izračunane vrednosti za količino izločenega metabolita in njegovo hitrost izločanja.

Prostovoljec in čas aplikacije glicirizina	Vzorec	Količina metabolita v urinu (µg)	Hitrost izločanja (µg/uro)
2 dopoldne	C	9,263	5,052
3 dopoldne	K	63,5001	19,05003
4 dopoldne	B	0	0
	J	253,985	52,18869
	N	33,023	7,338403

4.6.4. PRIMERJAVA REZULTATOV MED PROSTOVOLJCI

Namen moje diplomske naloge je torej spremljati kinetični profil monoglukuronil-18β-gliceritinske kisline v urinu. Poleg tega pa nas je zanimalo tudi, kakšne so razlike le-tega med posamezniki in ali se rezultati močno razlikujejo, če glicirizin zaužijemo v dopoldanskih ali v popoldanskih urah.

Preden so prostovoljci zaužili napitek, slajzen z glicirizinom, smo vsakemu odvzeli urinski vzorec in izmerili vrednost metabolita. V nobenem slepem vzorcu prostovoljcev nismo našli sledi metabolita, MG-GA.

Prostovoljci so zaužili 600 mg glicirizina. Če bi se ves metaboliziran glicirizin izločil le preko urina, bi se v urin moralo teoretično izločiti 461,96 mg MG-GA.

$$M_{\text{MG-GA}} = 600 \text{ mg} / M_{\text{glicirizina}} * M_{\text{MG-GA}} = 600 / 839,95 * 646,7 = 461,96 \text{ mg}$$

Preglednica 12: Celotna količina in odstotek metabolita izločenega v urin v času zbiranja urinskih vzorcev po zaužitju glicirizinskega napitka v dopoldanskih ali popoldanskih urah pri posameznem prostovoljcu.

Prostovoljec	Glicirizin zaužit v dopoldanskih (DOP) ali popoldanskih urah (POP)	Čas zbiranja urinskih vzorcev (dan)	Celoten volumen urina zbran v času zbiranja (ml)	Dnevni volumen urina (ml)	Celotna količina v urin izločenega metabolita (μg)	% izločenega metabolita	V zadnje vzetem urinskem vzorcu še zaznan metabolit
1	DOP	4,25	4550,0	1069,7	1787,152	0,39	DA
	POP	4,17	5155,0	1236,17	2263,487	0,49	DA
2	DOP	3,21	3478,0	1084,1	1037,842	0,22	DA
3	DOP	2,94	3440,0	1168,3	1495,222	0,32	DA
	POP	4,02	6350,0	1577,91	2046,45	0,44	DA
4	DOP	2,69	3820,0	1421,40	1256,383	0,27	NE
	POP	3,5	8960,0	2560,0	1084,900	0,23	NE
5	DOP	3,17	3445,0	1087,90	1465,980	0,32	DA
	POP	3,44	3010,0	873,9	1419,278	0,31	DA
6	DOP	3,48	4550,0	1307,8	1634,764	0,35	DA
	POP	4,63	4130,0	892,97	2291,130	0,49	NE

Dnevni volumen urina = celoten volumen urina/čas zbiranja urinskih vzorcev

% izločenega metabolita = celotna količina izločenega metabolita (mg)*100/461,96 mg

Kot vidimo iz preglednice se je pri vseh prostovoljcih izločila pričakovana količina metabolita, torej do 1 % od zaužite količine. Količine izločenega metabolita so se gibale od 1,038 mg do 2,291 mg oziroma od 0,22 % do 0,49 % od zaužite količine. Vidimo pa tudi, da je skoraj pri vseh prostovoljcih v zadnjem urinskem vzorcu še zaznati metabolit. Kar pomeni, da bi bile količine izločenega metabolita lahko še višje, če bi zbirali urinske vzorce dalj časa. Zanimivo je, da pri prostovoljcu št. 4, ki je izločal največje količine urina, metabolita v njegovem urinu ne zaznamo več že po 2,69 oziroma po 3,5 dneh, medtem ko pri drugih prostovoljcih zaznamo metabolit v urinu še po štirih dneh.

Iz dobljenih rezultatov nisem našla povezave med količino izločenega metabolita in samim trajanjem zbiranja urinskih vzorcev ter količine celokupnega volumna urina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljec št. 4 je tako z 2560,0 ml dnevnega urina izločil le 1,085 mg metabolita, prostovoljec št. 5 pa le z 873,9 ml kar 1,419 mg.

Na količino izločenega metabolita ne vpliva ali so prostovoljci vzeli glicirizinski napitek dopoldne ali popoldne, saj iz dobljenih rezultatov ni vidna povezava.

Razlog tako različnim količinam izločenega metabolita med prostovoljci je lahko različna hitrost posameznikovega metabolizma. Poleg tega metabolit zapade v enterohepatičen cikel, kar je vzrok temu, da se pri nekaterih prostovoljcih izloča tudi še po štirih dnevih.

Preglednica 13: Čas od zaužitja glicirizina do uriniranja, pri katerem se je v urin pričel izločati metabolit ter njegova koncentracija.

Prostovoljec	Glicirizin zaužit v dopoldanskih (DOP) ali popoldanskih urah (POP)	t (ura:min)	Količina izločenega metabolita, v prvem od vzorcev, v katerem smo metabolit detektirali (μg)
1	DOP	7:43	67,11
	POP	6:30	8,39
2	DOP	3:40	8,65
3	DOP	8:30	184,40
	POP	14:00	63,35
4	DOP	13:00	27,58
	POP	10:30	25,62
5	DOP	1:30	139,64
	POP	3:30	19,10
6	DOP	1:45	16,00
	POP	12:30	232,85

t... čas od zaužitja glicirizina, ko se je v urin pričel izločati metabolit

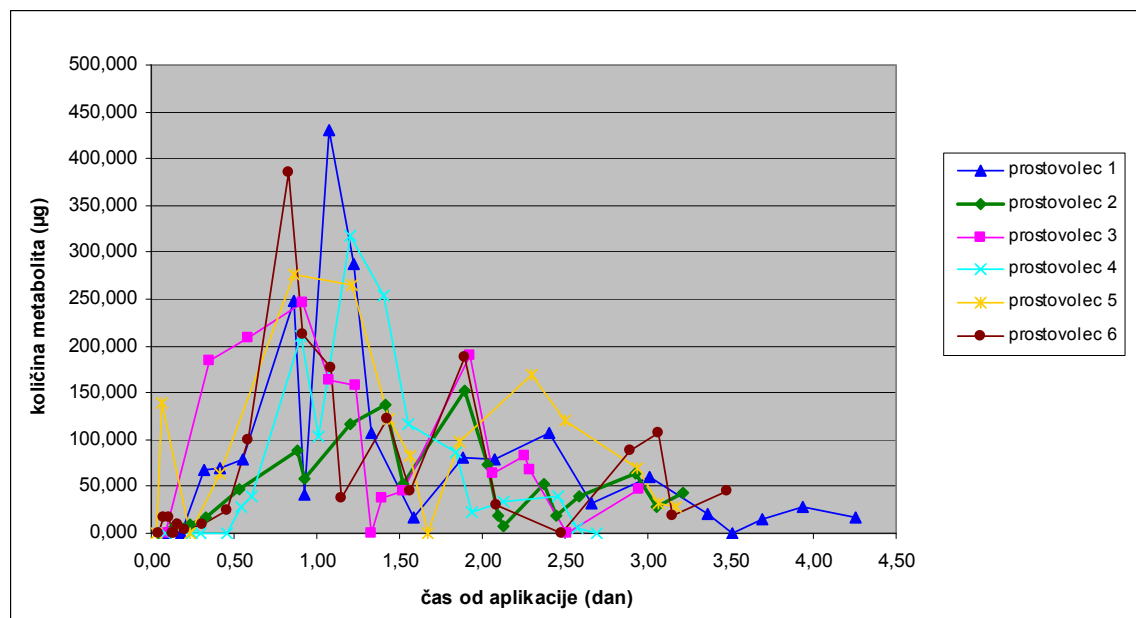
Iz rezultatov, navedenih v tabeli, lahko vidimo, da ni nekega pravila, kdaj in v kakšni količini se bo metabolit pričel izločati v urin. Pri prostovoljcu št. 5 (glicirizin vzela dopoldne) smo tako metabolit v urinu prvič zaznali že po eni uri in pol in to v kar veliki količini (139,64 μg), medtem ko smo ga pri prostovoljcu št. 4 (glicirizin vzela dopoldne) prvič zaznali šele po 13 urah in v mnogo manjših količinah (27,58 μg). V primeru, ko so prostovoljci vzeli glicirizin v popoldanskih urah, se je metabolit v nekaterih primerih pričel izločati prej kot, če so ga vzeli dopoldne, v drugih primerih pa kasneje. Tudi tukaj je torej odvisno od vsakega posameznika.

Preglednica 14: Čas od zaužitja glicirizina do uriniranja, pri katerem se je v urin izločila največja količina metabolita.

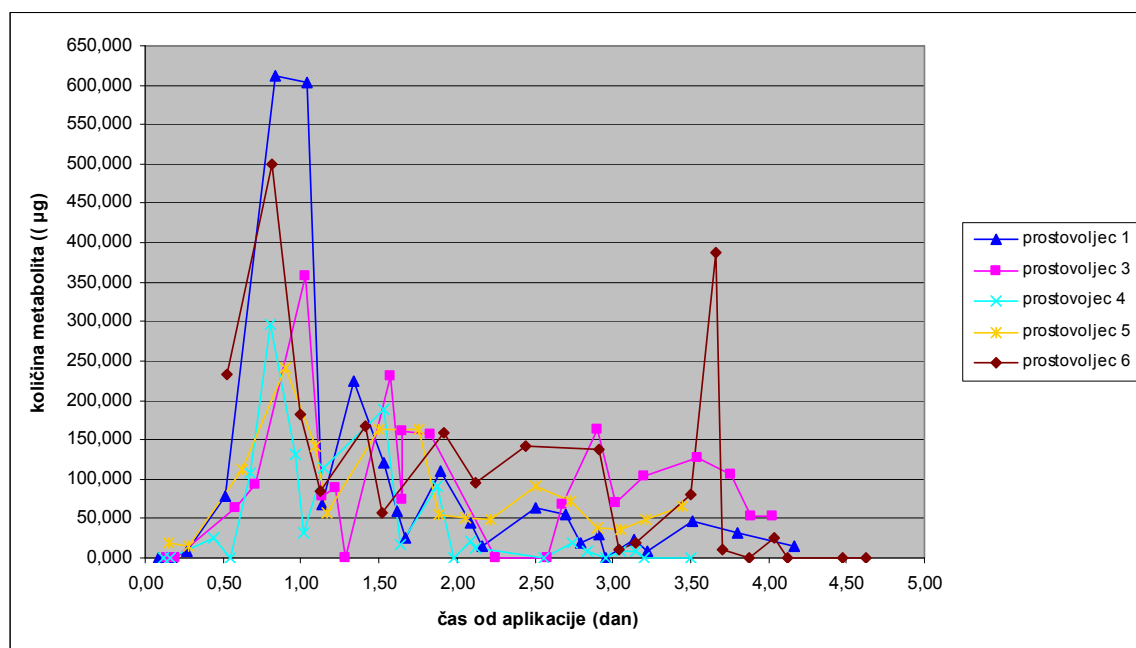
Prostovoljec	Glicirizin zaužit v dopoldanskih (DOP) ali popoldanskih urah (POP)	t_{max} (ur)	Maksimalna količina v urin izločenega metabolita (μg)
1	DOP	25,92	429,83
	POP	19,92	612,94
2	DOP	45,36	152,66
3	DOP	21,84	245,75
	POP	24,72	357,78
4	DOP	28,80	318,30
	POP	19,2	297,19
5	DOP	20,64	276,25
	POP	21,60	241,67
6	DOP	19,92	385,22
	POP	19,44	500,14

t_{max} ... čas od zaužitja glicirizina, ko se je v urin izločilo največ metabolita

Graf 1: Količina izločenega metabolita v odvisnosti od preteklega časa od aplikacije glicirizina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljci so glicirizin zaužili v dopoldanskih urah.



Graf 2: Količina izločenega metabolita v odvisnosti od preteklega časa od aplikacije glicirizina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljci so glicirizin zaužili v popoldanskih urah.



Analize urinskih vzorcev, katerih rezultati so prikazani v preglednici in grafih 1 ter 2, so pokazale, da se pri večini prostovoljcev največja količina metabolita v urin izloči po približno 20-ih urah, ne glede na to ali je bil glicirizin zaužit v dopoldanskih ali popoldanskih urah. Odstopa le prostovoljec št. 2, saj se je pri njemu največja količina metabolita izločila šele po 45-ih urah. Kakšna pa je največja količina izločenega metabolita, je odvisno od vsakega posameznika. Vrednosti se gibljejo od 152,66 µg pa tudi do 612,94 µg.

Pri večini prostovoljcev so po dosegu maksimalne količine izločenega metabolita vse nadaljnje vrednosti precej manjše. Izstopa le vrh pri prostovoljcu št. 6 na grafu 2, v primeru, ko je glicirizin zaužil v popoldanskih urah.

Količina metabolita v posameznem vzorcu je močno odvisna od časa, ko je ta vzorec nastajal v ledvicah. Prvi jutranji vzorci ponavadi vsebujejo večje količine metabolita. Pri prostovoljcu št. 2, je njegov vzorec z največjo količino metabolita nastajal kar 8,75 ure (tolikšen je bil interval med zadnjim večernim in prvim jutranjim uriniranjem), kar je največji čas pri tem prostovoljcu.

Da bi se izognili vplivu časa nastajanja vzorca v ledvicah, smo izračunali še hitrosti izločanja. Te so prikazane v nadaljevanju.

Preglednica 15: Čas od zaužitja glicirizina do uriniranja, pri katerem se je metabolit v urin izločil z največjo hitrostjo izločanja ter povprečna hitrost izločanja metabolita.

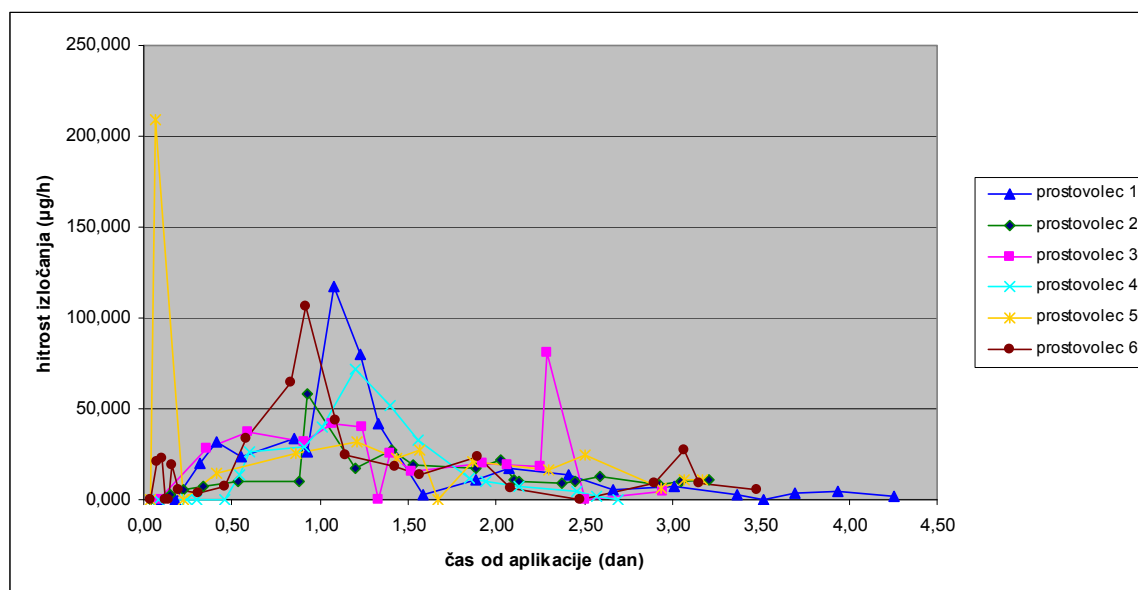
Prostovoljec	Glicirizin zaužit v dopoldanskih (DOP) ali popoldanskih urah (POP)	t_{\max} (h)	Maksimalna hitrost izločanja ($\mu\text{g/h}$)	Povprečna hitrost izločanja ($\mu\text{g/h}$)
1	DOP	25,92	117,23	21,17
	POP	24,96	120,83	19,63
2	DOP	22,08	58,63	13,97
3	DOP	54,72 (2,28 dni)	80,96	24,15
	POP	39,60	122,37	25,90
4	DOP	28,80	72,07	17,77
	POP	19,20	99,06	13,52
5	DOP	1,44	209,47	28,11
	POP	28,08	31,52	17,03
6	DOP	22,08	106,31	20,14
	POP	88,08 (3,67 dni)	96,72	20,40

t_{\max} ... čas od zaužitja glicirizina, ko se je metabolit v urin izločil z največjo hitrostjo

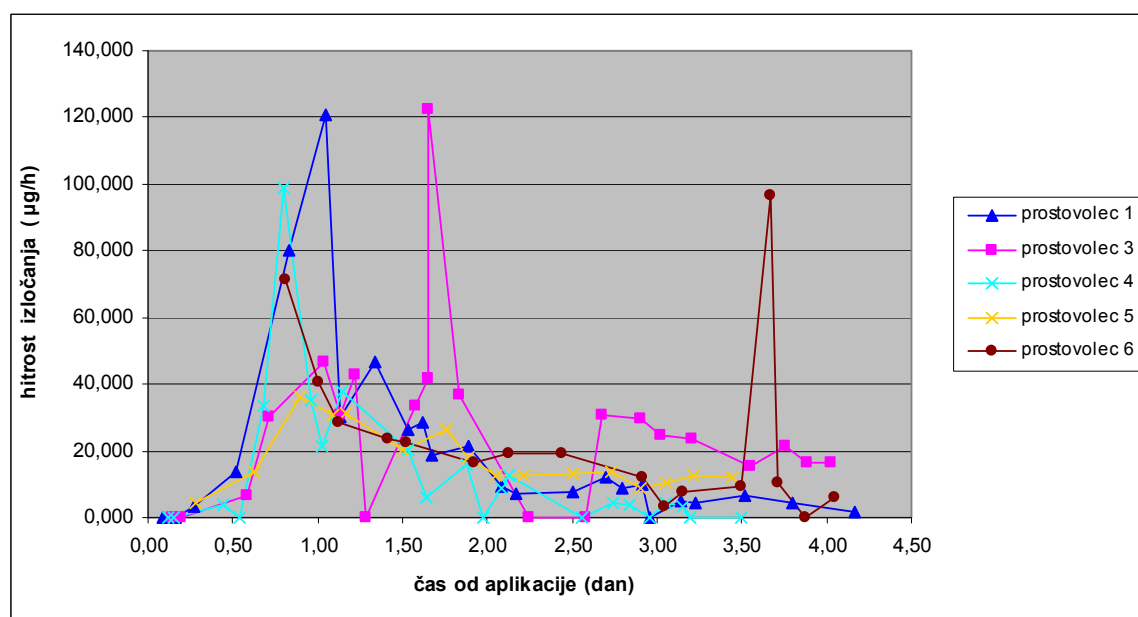
Hitrost izločanja metabolita pri večini prostovoljcev doseže svoj maksimum po približno enem dnevu po zaužitju glicirizina (od 22 do 28 ur). Močno odstopajo štiri podatki. Pri prostovoljcu št. 3 je najvišja hitrost izločanja po 2,28 dneh oziroma po 1,65 dneh, pri prostovoljcu št. 6 pa šele po 3,67 dneh. Zanimivo pa je, da je pri prostovoljcu št. 5 najvišja hitrost izločanja metabolita dosežena že po eni uri. Vrednosti maksimalnih hitrosti izločanja se med posamezniki zelo razlikujejo, od 31,52 $\mu\text{g/h}$ pa do 209,47 $\mu\text{g/h}$. Hitrost izločanja metabolita je namreč odvisna od količine v urin izločenega metabolita in intervala med dvema zaporednima uriniranjema. Oboje pa se od posameznika do posameznika močno razlikuje.

Večina povprečnih vrednosti hitrosti izločanja se gibljejo med 13 $\mu\text{g/h}$ in 20 $\mu\text{g/h}$.

Graf 3: Hitrost izločanja metabolita v odvisnosti od preteklega časa od aplikacije glicirizina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljci so glicirizin zaužili v dopoldanskih urah.



Graf 4: Hitrost izločanja metabolita v odvisnosti od preteklega časa od aplikacije glicirizina pri posameznem prostovoljcu. Prostovoljci so glicirizin zaužili v popoldanskih urah.



Iz grafov 3 in 4 je razvidno, da je večina vrednosti maksimalnih hitrosti izločanja metabolita med 22 in 40 uro po zaužitju glicirizina, nato so vrednosti nižje. Posamezen visok vrh pri kasnejših časih pri prostovoljcu št. 3 je posledica kratkega in zaradi zaokroževanja nenatančno izmerjenega časa med uriniranjema. Prostovoljci so uro odvzema zaokroževali na 10 ali 15 minut, kar je pri intervalih krajših od ene ure povzročilo precejšnjo nenatančnost.

Rezultati so pokazali, da se v primeru, ko so prostovoljci vzeli glicirizin v popoldanskih urah, metabolit nič hitreje ne izloča oziroma je odvisno od vsakega posameznika.

5. ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo spremljali kinetični profil 3 β -monoglukuronil-18 β -gliciretinske kisline, glavnega metabolita glicirizina, v urinu prostovoljcev.

Za merjenje metabolita smo uporabili RP-HPLC metodo, ki smo jo najprej optimizirali. Spreminjali smo valovno dolžino, volumen injiciranja in hitrost pretoka. Optimalna valovna dolžina je tako 250 nm, volumen injiciranja 200 μ l in hitrost pretoka 2 minuti.

Optimizirali smo tudi samo pripravo urinskega vzorca. Spreminjali smo čas inkubacije in volumen dodanega encima β -glukuronidazo, ki hidrolizira 3 β -monoglukuronil-18 β -gliciretinsko kislino v 18 β -gliciretinsko kislino. Optimalen čas inkubacije je tako štiri ure, volumen dodane raztopine encima pa 5 μ l.

V okviru validacije smo na metodi z optimalnimi pogoji preverili natančnost. Ugotovili smo, da metoda na standardnem vzorcu ne daje ponovljivih rezultatov, niti znotraj dneva niti med dnevi. Razlog temu je lahko veliko nihanje temperature v laboratoriju, kar vpliva na separacijske zmožnosti kolone. Pri meritvah AUC standardnega vzorca smo ugotovili, da metoda ni linearna. Zato je zanesljivost rezultatov, pridobljenih s preračunavanjem, omejena s slabo linearnostjo metode.

Rezultati ponovljivosti metode na urinskih vzorcih so tudi pokazali odstopanja, vendar gre za biološke vzorce, zato so lahko ta odstopanja večja kot pri standardnem vzorcu. Tako lahko rečemo, da je metoda na urinskih vzorcih pokazala dobro ponovljivost, tako znotraj dneva kot tudi med dnevi.

Z optimirano in validirano metodo smo nato analizirali urinske vzorce šestih prostovoljcev in iz rezultatov izračunali količino izločenega metabolita ter njegovo hitrost izločanja. Zanimalo nas je tudi ali se rezultati močno razlikujejo, če so prostovoljci napitek, slajen z glicirizinom, zaužili v dopoldanskih ali popoldanskih urah. Ugotovili smo, da ni bistvenih razlik.

Pri večini prostovoljcev se največja količina metabolita izloči po približno dvajsetih urah. Največja hitrost izločanja metabolita pa je pri večini prostovoljcev dosežena med

dvaindvajseto in osemindvajseto uro po zaužitju napitka. Večina povprečnih vrednosti hitrosti izločanja se gibljejo med 13 $\mu\text{g/h}$ in 20 $\mu\text{g/h}$. V času zbiranja urinskih vzorcev se je pri posameznem prostovoljcu izločilo le od 0,22 % do 0,49 % metabolita od zaužite količine, kar je relativno malo. Lahko pa bi bil odstotek izločenega metabolita višji, če bi urinske vzorce zbirali dalj časa, saj smo pri nekaterih prostovoljcih zaznali metabolit v urinu še po štirih dnevih. Razlog temu je, da metabolit zapade v enterohepatičen cikel, poleg tega je metabolizem posameznika različen.

RP-HPLC ima kar nekaj prednosti pred ostalimi metodami. Te so v enostavni pripravi vzorcev in v hitrosti analize le-teh, potrebujemo manj kot 1 ml vzorca. Nudi tudi nizko mejo detekcije 18 β -gliciretinske kisline v urinu (0,03 $\mu\text{g/mL}$) in mejo kvantifikacije (0,1 $\mu\text{g/mL}$) (31). To smo dosegli predvsem z zelo velikim volumnom injiciranja (200 μL), in z zelo majhnim razredčenjem urina med postopkom priprave vzorca.

Negativna stran je le cena in občutljivost kolone, predvsem na temperaturo okolja. Občutljivost kolone bi lahko bil razlog slabe ponovljivosti in linearnosti naše metode. To bi lahko popravili, če bi kolono termostatirali in s tem v njeni okolici ohranjali konstantno temperaturo.

Merjenje 18 β -GA v urinu, namesto v plazmi ali žolču, ima nekaj prednosti. Izognemo se intravenskim posegom, so enostavni za zbiranje in ne potrebujemo medicinskega osebja. Tako se izognemo dodatnim stroškom, bolnik se izogne čakalnim vrstam za odvzem vzorca, saj lahko vzorce urina zbira doma sam. Težava pa se lahko pokaže v nekomplianci bolnika, če ne bi redno zbiral vzorcev urina in če jih ne bi primerno hranil na hladnem.

6. LITERATURA

1. Krausse R, Bielenberg J. Neue Aspekte: Süßholzwurzel bei Magengeschwüren. Österreichische Apotheker-Zeitung 12/2003. <http://www.oeaz.at/zeitung/> (datum dostopa december 2009).
2. Fukai T, Satoh K, Nomura T et al. Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from *Glycyrrhiza glabra*. *Fitoterapia* 2003; 74 (7-8): 624-629.
3. Kommission E. *Liquiritiae radix*. <http://www.heilpflanzen-welt.de/buecher/BGA-Kommission-E-Monographien/liquiritiae-radix-suessholzwurzel.htm> (datum dostopa december 2009).
4. Barnes J, Anderson LA., Phillipson JD. *Herbal Medicines* 3th; 2007: 411-415.
5. Takeda S, Ishikara K, Wakui Y, Amagaya S, Maruno M, Akao T, Kobashi K. *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 902.
6. Krahenbühl S, Hasler F, Frey B M, Frey F J, Brenneisen R, Krapf R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (1994) 581.
7. Sabbioni C, Mandrioli R, Ferranti A et al. Separation and analysis of glycyrrhizin, 18 β -glycyrrhetic acid and 18 α -glycyrrhetic acid in liquorice roots by means of capillary zone electrophoresis. *J Chromatography A*, 1081 (2005) 65-71
8. Kočevar N: *Glycyrrhiza Glabra*, *Farm. Vestnik* 2008; 59: 179-182.
9. Hitoshi S, Wakana Goto, Jun-ichi Yamamura et al. Therapeutic basis of glycyrrhizin on chronic hepatitis B. *Antiviral Research* 1996; 30, 171-177.
10. Auterhoff H, Knabe J, Höltje HD. Zytokine. In: *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1994:822.
11. Bresjanac M. Ulkusna bolezen – peptična razjeda. In: Ribarič S. *Izbrana poglavja iz patološke fiziologije*; Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, 2001: 171-178
12. Fukai T, Marumo A, Kaitou K et al. Anti-helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life Sci* 2002; 71 (12): 1449-1263.
13. Smyth EM, Burke A, FitzGerald GA. Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet-activating factor. In: Goodman Gilman A, Hardman JG, Limbird LL. *Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*; McGraw-Hill, 2001: 669-694.

14. Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. Herbal expectorans. In: Rational Phytoteraphy: a Physicians' Guide to Herbal Medicine; Springer-Verlag, 200: 185, 194-195.
15. Van Bocxlaer, JF et al., Clin Chem., 43, 62-634 (1997).
16. Mendes-Silva W, Assafim M, Ruta B et al. Antithrombotic effect of glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. Thromb Res 2003; 112 (1-2): 93-98.
17. Pizarro N et al. J. Anal. Toxicol., 26, 157-165 (2002).
18. Jung GD, Yang JY, Song ES et al. Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. Exp Mol Med 2001; 33 (3): 131-135.
19. Monograph Glycyrrhiza Glabra, Alternative Medicine Review; 10, 3/2005. <http://www.thorne.com/altmedrev/.fulltext/10/3/230.pdf> (datum dostopa februar 2010)
20. Bruneton J. In: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants; Lavoisier Publishing, 1999: 688-694.
21. Kato H, Kanaoka M, Yano S, Kobayashi M. 3-monoglucuronyl-glycyrrhetic acid is a major metabolite that causes licorice induced pseudoaldosteronism. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80 (6): 1929-1933.
22. Heidemann HT, Kreuzfelder E. Hypokalemic rhabdomyolysis with myoglobinuria due to licorice ingestion and diuretic treatment. Klin Wochenschr 1983; 61 (6): 303-305.
23. Shintani S, Murase H, Tsukagoshi H, Shiigai T. Glycyrrhizin (licorice) induced hypokalemic myopathy. Report of 2 cases and review of the literature. Eur Neurol 1992; 32 (1): 44-51.
24. Fugh-Berman A. Herb-drug interactions. Lancet 2000; 355: 134-8.
25. Štrukelj B. Gastrointestinalni sistem. In: Doljak B, Štrukelj B, Mlinarič A. Zdravila naravnega izbora in sodobna fitoterapija. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2003: 120-34.
26. Elvin-Lewis M. Should we be concerned about herbal remedies. J Ethnopharmacol 2001; 75: 141-64.
27. Isbrucker RA, Burdock GA.: Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (Glycyrrhiza sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2006; 46, 167-192.
28. Fenwick, GR, Lutomski J, Nieman C. Liquorice, Glycyrrhiza glabra L.- Composition, uses and analysis. Food chemistry 1990; 38, 119-143.

29. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out186_en.pdf (datum dostopa januar 2010)
30. Guillaume CPF, JC van der Molen, Kerstens MN, Dullaart RPF, Wolthers BG. Determination of urinary 18 β -glycyrrhetic acid by gas chromatography and its clinical application in man. *J of Chromatography B* 1990; 731, 323-334.
31. Kočevar N, Injac R, Kreft S. Determination of 18 β -glycyrrhetic acid by high-performance liquid chromatography in human urine after ingestion of glycyrrhizin. Fakulteta za farmacijo, 2008.
32. Kerstens MN, Guillaume CPF, Wolthers BG, Dullaart RPF. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary glycyrrhetic acid: an aid in diagnosing liquorice abuse. *J of Internal Medicine* 1999; 246: 539-547.
33. Wang P, Li SFY, Lee HK. Determination of glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid in biological fluids by micellar electrokinetic chromatography. *J of Chromatography A* 1998; 811, 219-224.
34. Raggi MA, Bugamelli F, Nobile L, Schiavone P, Cantelli-Forti G. HPLC determination of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in biological fluids, after licorice extract administration to human and rats. *Boll. Chim. Farmaceutico* 1994; 133, 704-708.
35. Kočevar N, Kreft S, Obermajer N: Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev, V *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. izd., Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007, str.136-183
36. www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk4130/skriptastrukturaproteinov.doc (datum dostopa januar 2010).
37. Yang, C-Y, et al., *J.Food and Drug Analysis* 2002; 10, 143-148.
38. ICH Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, November 2005
39. Huber L: Validation of Analytical Methods: Review and Strategy, LabCompliance, 2001

PRILOGE

PRILOGA 1: Rezultati za *prostovoljca št. 1*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *dopoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
	slepi vzorec		6	0,945	okt23 028	0,000	0				0,000		
A	21.10.2008 12:00	255,0	5	0,945	okt23 029	0,000	0			0,083	0,000	0,000	0,000
B	21.10.2008 14:20	240,0	6	0,945	okt23 030	0,000	0	2:20	2,33	0,181	0,000	0,000	0,000
C	21.10.2008 17:43	170,0	7	0,93	okt23 031	0,084	0,371	3:23	3,38	0,322	0,395	67,105	19,834
D	21.10.2008 19:52	200,0	7	0,93	okt24 011	0,073	0,368	2:09	2,15	0,411	0,344	68,855	32,026
E	21.10.2008 23:17	100,0	6	0,94	okt24 012	0,170	0,872	3:25	3,42	0,553	0,793	79,321	23,216
F	22.10.2008 6:35	300,0	5	0,945	okt24 013	0,178	0,914	7:18	7,30	0,858	0,826	247,842	33,951
G	22.10.2008 8:10	200,0	7	0,93	okt24 014	0,044	0,262	1:35	1,58	0,924	0,208	41,690	26,331
H	22.10.2008 11:50	280,0	6	0,94	okt24 015	0,329	1,653	3:40	3,67	1,076	1,535	429,825	117,225
I	22.10.2008 15:26	150,0	7	0,92	okt24 016	0,403	1,971	3:36	3,60	1,226	1,921	288,186	80,052
J	22.10.2008 18:00	190,0	6	0,94	okt24 017	0,121	0,67	2:34	2,57	1,333	0,565	107,270	41,793
K	22.10.2008 23:55	210,0	6	0,945	okt24 018	0,017	0,0911	5:55	5,92	1,580	0,078	16,277	2,751
L	23.10.2008 7:15	265,0	5	0,945	okt24 019	0,065	0,405	7:20	7,33	1,885	0,304	80,437	10,969
M	23.10.2008 11:46	160,0	7	0,92	okt24 020	0,104	0,543	4:31	4,52	2,074	0,496	79,329	17,564
N	23.10.2008 19:48	240,0	7	0,92	okt27 001	0,094	0,47	8:02	8,03	2,408	0,448	107,437	13,374
O	24.10.2008 1:53	300,0	5	0,945	okt27 002	0,023	0,116	6:05	6,08	2,662	0,107	32,025	5,264
P	24.10.2008 10:20	200,0	6	0,94	okt27 003	0,065	0,348	8:27	8,45	3,014	0,304	60,844	7,200
R	24.10.2008 18:40	110,0	6	0,94	okt27 004	0,041	0,269	8:20	8,33	3,361	0,193	21,249	2,550
s	24.10.2008 22:20	270,0	5	0,94	okt28 014	0,000	0	3:40	3,67	3,514	0,000	0,000	0,000
Š	25.10.2008 2:37	140,0	5	0,94	okt28 015	0,024	0,161	4:17	4,28	3,692	0,110	15,416	3,599
T	25.10.2008 8:25	330,0	5	0,94	okt28 016	0,018	0,116	5:48	5,80	3,934	0,083	27,408	4,725
U	25.10.2008 16:05	240,0	7	0,93	okt28 017	0,015	0,131	7:40	7,67	4,253	0,069	16,638	2,170

PRILOGA 2: Rezultati za *prostovoljca št. 1*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *popoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
slepi vzorec	26.10.2008 17:00		7	0,93	okt29 002	0,000					0		
A	26.10.2008 20:00	190	6	0,945	okt29 003	0,000	0,000			0,083	0,000	0,000	0,000
B	26.10.2008 22:00	230	6	0,93	okt29 004	0,000	0,000	2:00	2,00	0,167	0,000	0,000	0,000
C	27.10.2008 0:30	165	6	0,94	okt29 005	0,011	0,036	2:30	2,50	0,271	0,051	8,392	3,357
D	27.10.2008 6:20	220	6	0,94	okt29 006	0,077	0,386	5:50	5,83	0,514	0,360	79,246	13,585
E	27.10.2008 14:00	230	7	0,92	okt29 007	0,559	3,267	7:40	7,67	0,833	2,665	612,939	79,949
F	27.10.2008 19:00	190	7	0,92	okt29 008	0,667	3,938	5:00	5,00	1,042	3,180	604,167	120,833
G	27.10.2008 21:15	200	5	0,945	okt29 009	0,074	0,525	2:15	2,25	1,135	0,342	68,412	30,405
H	28.10.2008 2:05	190	6	0,94	okt29 010	0,253	1,684	4:50	4,83	1,337	1,180	224,291	46,405
I	28.10.2008 6:40	170	7	0,91	okt29 011	0,147	0,907	4:35	4,58	1,528	0,709	120,445	26,279
J	28.10.2008 8:45	240	7	0,94	okt29 012	0,053	0,311	2:05	2,08	1,615	0,248	59,462	28,542
K	28.10.2008 10:10	440	7	0,94	okt29 013	0,013	0,016	1:25	1,42	1,674	0,060	26,278	18,550
L	28.10.2008 15:23	350	7	0,92	okt29 014	0,066	0,331	5:13	5,22	1,891	0,315	110,293	21,142
M	28.10.2008 20:00	120	6	0,93	okt29 015	0,078	0,440	4:37	4,62	2,083	0,366	43,916	9,513
N	28.10.2008 22:00	135	5	0,945	okt29 016	0,023	0,116	2:00	2,00	2,167	0,104	14,098	7,049
O	29.10.2008 6:10	200	5	0,945	okt29 017	0,068	0,310	8:10	8,17	2,507	0,315	62,935	7,706
P	29.10.2008 10:46	240	7	0,94	okt29 018	0,049	0,249	4:36	4,60	2,699	0,230	55,319	12,026
R	29.10.2008 13:03	260	7	0,93	okt29 019	0,016	0,014	2:17	2,28	2,794	0,077	20,109	8,807
s	29.10.2008 16:00	260	7	0,93	nov03 001	0,024	0,119	2:57	2,95	2,917	0,113	29,306	9,934
Š	29.10.2008 16:55	310	6	0,945	nov03 002	0,000	0,000	0:55	0,92	2,955	0,000	0,000	0,000
T	29.10.2008 21:20	190	7	0,92	nov03 003	0,025	0,158	4:25	4,42	3,139	0,118	22,464	5,086
U	29.10.2008 23:25	140	6	0,94	nov03 007	0,014	0,014	2:05	2,08	3,226	0,063	8,884	4,264
V	30.10.2008 6:20	200	6	0,945	nov03 008	0,050	0,359	6:55	6,92	3,514	0,231	46,134	6,670
Z	30.10.2008 13:10	230	6	0,94	nov03 009	0,030	0,207	6:50	6,83	3,799	0,139	31,873	4,664
Ž	30.10.2008 22:05	55	5	0,945	nov04 006	0,057	0,359	8:55	8,92	4,170	0,264	14,525	1,629

PRILOGA 3: Rezultati za *prostovoljca št. 2*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *dopoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
slepi vzorec	3.10.2008 10:00		6	0,945	nov05 011	0,000	0,000				0,000		
A	3.10.2008 11:24	395,0	6	0,945	nov05 012	0,000	0,000			0,037	0,000	0,000	0,000
B	3.10.2008 14:10	170,0	6	0,94	nov05 013	0,011	0,003	2:46	2,77	0,153	0,051	8,646	3,125
C	3.10.2008 16:00	vzorec manjka						1:50	1,83	0,229		9,263	5,052
D	3.10.2008 18:30	100,0	7	0,93	nov05 014	0,037	0,236	2:30	2,50	0,333	0,174	17,450	6,980
E	3.10.2008 23:15	140,0	6	0,94	nov05 015	0,073	0,498	4:45	4,75	0,531	0,342	47,816	10,067
F	4.10.2008 7:40	140,0	5	0,94	nov05 016	0,134	0,907	8:25	8,42	0,882	0,625	87,533	10,400
G	4.10.2008 8:40	28,0	6	0,93	nov06 001	0,444	3,068	1:00	1,00	0,924	2,094	58,630	58,630
H	4.10.2008 15:20	130,0	7	0,88	nov06 002	0,181	1,347	6:40	6,67	1,201	0,902	117,275	17,591
I	4.10.2008 20:20	275,0	7	0,88	nov06 003	0,100	0,725	5:00	5,00	1,410	0,498	137,061	27,412
J	4.10.2008 23:05	150,0	7	0,85	nov06 004	0,068	0,509	2:45	2,75	1,524	0,353	52,941	19,251
K	5.10.2008 7:50	410,0	7	0,92	nov06 005	0,078	0,547	8:45	8,75	1,889	0,372	152,655	17,446
L	5.10.2008 11:10	90,0	6	0,93	nov06 006	0,174	1,199	3:20	3,33	2,028	0,821	73,854	22,156
M	5.10.2008 12:50	235,0	6	0,94	nov06 010	0,017	0,123	1:40	1,67	2,097	0,079	18,640	11,184
N	5.10.2008 13:40	160,0	6	0,94	nov06 011	0,011	0,074	0:50	0,83	2,132	0,050	8,063	9,675
O	5.10.2008 19:20	170,0	7	0,92	nov06 012	0,066	0,437	5:40	5,67	2,368	0,313	53,166	9,382
P	5.10.2008 21:20	80,0	8	0,87	nov06 013	0,048	0,299	2:00	2,00	2,451	0,241	19,318	9,659
R	6.10.2008 0:30	90,0	7	0,92	nov06 014	0,094	0,623	3:10	3,17	2,583	0,448	40,332	12,736
s	6.10.2008 8:40	280,0	5	0,945	nov06 015	0,049	0,303	8:10	8,17	2,924	0,227	63,548	7,781
Š	6.10.2008 11:40	90,0	6	0,94	nov07 004	0,068	0,431	3:00	3,00	3,049	0,319	28,723	9,574
T	6.10.2008 15:30	345,0	7	0,92	nov07 005	0,026	0,158	3:50	3,83	3,208	0,124	42,928	11,199

PRILOGA 4: Rezultati za *prostovoljca št. 3*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *dopoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
	slepi vzorec			0,92	okt27 005	0,000	0,000				0,000		
A	15.10.2008 12:00	160,0	6	0,94	okt20 003	0,000	0,000			0,083	0,000	0,000	0,000
B	15.10.2008 18:30	190,0	5	0,94	okt20 004	0,208	1,046	6:30	6,50	0,354	0,971	184,397	28,369
C	16.10.2008 0:10	240,0	6	0,94	okt20 005	0,187	0,921	5:40	5,67	0,590	0,873	209,406	36,954
D	16.10.2008 7:50	230,0	5	0,94	okt20 006	0,229	1,140	7:40	7,67	0,910	1,068	245,754	32,055
E	16.10.2008 11:45	100,0	6	0,93	okt20 007	0,346	1,840	3:55	3,92	1,073	1,632	163,177	41,662
F	16.10.2008 15:40	140,0	6	0,93	okt20 008	0,238	1,365	3:55	3,92	1,236	1,122	157,140	40,121
G	16.10.2008 18:00	480,0	6	0,945	okt20 009	0,000	0,000	2:20	2,33	1,333	0,000	0,000	0,000
H	16.10.2008 19:30	490,0	6	0,95	okt20 010	0,017	0,124	1:30	1,50	1,396	0,078	38,006	25,337
I	16.10.2008 22:30	210,0	5	0,945	okt20 011	0,047	0,315	3:00	3,00	1,521	0,216	45,322	15,107
J	17.10.2008 8:10	200,0	6	0,945	okt20 012	0,205	1,123	9:40	9,67	1,924	0,951	190,291	19,685
K	17.10.2008 11:30				vzorec manjka			3:20	3,33	2,063		63,500	19,050
L	17.10.2008 16:00	160,0	6	0,94	okt20 013	0,111	0,717	4:30	4,50	2,250	0,518	82,867	18,415
M	17.10.2008 16:50	230,0	5	0,945	okt20 014	0,063	0,432	0:50	0,83	2,285	0,293	67,465	80,958
N	17.10.2008 22:10	450,0	5	0,945	okt20 015	0,000	0,000	5:20	5,33	2,507	0,000	0,000	0,000
O	18.10.2008 8:40	160,0	5	0,945	okt20 016	0,065	0,384	10:30	10,50	2,944	0,299	47,898	4,562

PRILOGA 5: Rezultati za *prostovoljca št. 3*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *popoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
slepi vzorec	6.11.2008 11:20	160	5	0,94	nov07 007	0,000	0,000				0,000	0,000	
A	6.11.2008 22:15	400	6	0,94	nov10 004	0,000	0,000			0,135	0,000	0,000	0,000
B	6.11.2008 23:40	420	5	0,945	nov10 005	0,000	0,000	1:25	1,42	0,194	0,000	0,000	0,000
C	7.11.2008 9:00	500	5	0,945	nov10 006	0,027	0,014	9:20	9,33	0,583	0,127	63,353	6,788
D	7.11.2008 12:05	200	7	0,93	nov10 007	0,100	0,673	3:05	3,08	0,712	0,470	93,945	30,468
E	7.11.2008 19:45	360	6	0,94	nov10 008	0,213	1,487	7:40	7,67	1,031	0,994	357,783	46,667
F	7.11.2008 22:15	130	7	0,92	nov10 009	0,125	0,857	2:30	2,50	1,135	0,596	77,469	30,988
G	8.11.2008 0:20	100	7	0,92	nov10 010	0,187	1,299	2:05	2,08	1,222	0,891	89,150	42,792
H	8.11.2008 1:50	500	6	0,945	nov10 015	0,000	0,000	1:30	1,50	1,285	0,000	0,000	0,000
I	8.11.2008 8:45	210	6	0,94	nov10 011	0,235	1,666	6:55	6,92	1,573	1,096	230,263	33,291
J	8.11.2008 10:30	60	7	0,9	nov10 016	0,250	1,783	1:45	1,75	1,646	1,218	73,099	41,771
K	8.11.2008 10:40	200	6	0,94	nov10 017	0,173	1,099	0:10	0,17	1,653	0,807	161,441	122,369
L	8.11.2008 14:55	230	7	0,93	nov10 018	0,144	0,980	4:15	4,25	1,830	0,679	156,197	36,752
M	9.11.2008 0:55	500	6	0,94	nov10 019	0,000	0,000	10:00	10,00	2,247	0,000	0,000	0,000
N	9.11.2008 8:55	600	6	0,94	nov11 004	0,000	0,000	8:00	8,00	2,580	0,000	0,000	0,000
O	9.11.2008 11:10	310	7	0,92	nov11 005	0,047	0,231	2:15	2,25	2,674	0,222	68,721	30,543
P	9.11.2008 16:40	450	7	0,93	nov11 006	0,077	0,449	5:30	5,50	2,903	0,364	163,625	29,750
R	9.11.2008 19:30	150	6	0,94	nov11 007	0,100	0,589	2:50	2,83	3,021	0,465	69,779	24,628
s	9.11.2008 23:55	240	6	0,93	nov11 008	0,092	0,503	4:25	4,42	3,205	0,435	104,471	23,654
Š	10.11.2008 8:10	310	6	0,94	nov11 009	0,087	0,428	8:15	8,25	3,549	0,406	125,985	15,271
T	10.11.2008 13:05	250	6	0,93	nov11 010	0,089	0,461	4:55	4,92	3,753	0,420	104,933	21,342
U	10.11.2008 16:20	110	6	0,94	nov11 011	0,104	0,556	3:15	3,25	3,889	0,485	53,378	16,424
V	10.11.2008 19:35	120	5	0,945	nov11 012	0,095	0,477	3:15	3,25	4,024	0,440	52,854	16,263

PRILOGA 6: Rezultati za *prostovoljca št. 4*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *dopoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
slepi vzorec	27.10.2008 9:00		5	0,95	okt30 002	0	0				0		
A	15.10.2008 12:00	430,0	7	0,93	okt21 010	0	0			0,08	0	0,000	0
B	15.10.2008 15:46	ni vzorca						3:46	3,77	0,24		0,000	0
C	15.10.2008 17:07	350,0	7	0,92	okt21 011	0	0	1:21	1,35	0,30	0	0,000	0
D	15.10.2008 21:00	530,0	6	0,945	okt21 012	0	0	3:53	3,88	0,46	0	0,000	0
E	15.10.2008 23:00	260,0	6	0,947	okt21 013	0,0229	0,169	2:00	2,00	0,54	0,10606	27,576	13,78777
F	16.10.2008 0:30	60,0	5	0,945	okt21 014	0,142	0,904	1:30	1,50	0,60	0,659055	39,543	26,3622
G	16.10.2008 7:45	210,0	5	0,945	okt21 015	0,216	1,424	7:15	7,25	0,91	1,002506	210,526	29,03811
H	16.10.2008 10:20	370,0	5	0,947	okt21 016	0,0604	0,395	2:35	2,58	1,01	0,279738	103,503	40,06576
I	16.10.2008 14:45	270,0	5	0,945	okt21 017	0,254	1,594	4:25	4,42	1,20	1,178873	318,296	72,06696
J	16.10.2008 19:37	ni vzorca						4:52	4,87	1,40		253,985	52,18869
K	16.10.2008 23:15	170,0	6	0,94	okt21 18	0,148	0,949	3:38	3,63	1,55	0,690556	117,395	32,31043
L	17.10.2008 6:15	180,0	5	0,947	okt21 19	0,103	0,709	7:00	7,00	1,84	0,477037	85,867	12,26668
M	17.10.2008 8:30	270,0	5	0,947	okt21 20	0,0176	0,138	2:15	2,25	1,94	0,081513	22,009	9,781582
N	17.10.2008 13:00	ni vzorca						4:30	4,50	2,13		33,023	7,338403
O	17.10.2008 21:00	410,0	7	0,9	okt23 002	0,0196	0,152	8:00	8,00	2,46	0,095517	39,162	4,895224
P	17.10.2008 23:45	150,0	7	0,92	okt23 003	0,00769	0,063	2:45	2,75	2,57	0,036661	5,499	1,999688

PRILOGA 7: Rezultati za *prostovoljca št. 4*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *popoldanskih urah*.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
slepi vzorec	27.10.2008 9:00		5	0,95	okt30 002	0,000	0,000				0,000		
A	27.10.2008 21:50	25	5	0,95	okt30 003	0,000	0,000			0,118	0,000	0,000	0,000
B	27.10.2008 22:45	45	5	0,945	okt30 004	0,000	0,000	0:55	0,92	0,156	0,000	0,000	0,000
C	28.10.2008 5:30	300	5	0,95	okt30 005	0,019	0,109	6:45	6,75	0,438	0,085	25,623	3,796
D	28.10.2008 8:00	500	5	0,945	okt30 006	0,000	0,000	2:30	2,50	0,542	0,000	0,000	0,000
E	28.10.2008 11:15	680	6	0,94	okt30 007	0,034	0,254	3:15	3,25	0,677	0,160	108,511	33,388
F	28.10.2008 14:15	770	5	0,945	okt30 008	0,083	0,244	3:00	3,00	0,802	0,386	297,193	99,064
G	28.10.2008 18:00	700	7	0,93	okt30 009	0,040	0,249	3:45	3,75	0,958	0,188	131,720	35,125
H	28.10.2008 19:30	670	6	0,94	okt30 010	0,010	0,100	1:30	1,50	1,021	0,049	32,512	21,675
I	28.10.2008 22:30	200	7	0,93	okt30 011	0,120	0,809	3:00	3,00	1,146	0,567	113,469	37,823
J	29.10.2008 7:40	380	6	0,94	okt30 012	0,106	0,713	9:10	9,17	1,530	0,495	187,943	20,503
K	29.10.2008 10:15	670	6	0,945	nov03 010	0,005	0,019	2:35	2,58	1,635	0,024	16,201	6,271
L	29.10.2008 16:00	580	6	0,945	nov03 011	0,034	0,200	5:45	5,75	1,875	0,156	90,448	15,730
M	29.10.2008 18:30	450	6	0,94	nov04 007	0,000	0,000	2:30	2,50	1,979	0,000	0,000	0,000
N	29.10.2008 21:00	130	7	0,92	nov04 008	0,036	0,293	2:30	2,50	2,083	0,170	22,063	8,825
O	29.10.2008 22:00	60	7	0,91	nov04 009	0,044	0,305	1:00	1,00	2,125	0,210	12,580	12,580
P	30.10.2008 8:20	540	6	0,94	nov03 012	0,000	0,000	10:20	10,33	2,556	0,000	0,000	0,000
R	30.10.2008 12:40	700	7	0,93	nov03 013	0,006	0,000	4:20	4,33	2,736	0,028	19,808	4,571
s	30.10.2008 15:00	300	6	0,94	nov03 014	0,007	0,068	2:20	2,33	2,833	0,032	9,462	4,055
Š	30.10.2008 18:00	500	7	0,93	nov04 010	0,006	0,068	3:00	3,00	2,958	0,028	0,000	0,000
T	30.10.2008 20:15	200	7	0,93	nov04 011	0,010	0,073	2:15	2,25	3,052	0,046	9,272	4,121
U	30.10.2008 22:40	200	5	0,945	nov04 012	0,009	0,062	2:25	2,42	3,153	0,040	8,094	3,349
V	30.10.2008 23:45	60	6	0,94	nov04 013	0,000	0,000	1:05	1,08	3,198	0,000	0,000	0,000
Z	31.10.2008 7:00	300	5	0,945	nov04 014	0,000	0,000	7:15	7,25	3,500	0,000	0,000	0,000

PRILOGA 8: Rezultati za *prostovoljca št. 5*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *dopoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
slepi vzorec	24.10.2008 11:30		6	0,94	okt27 006	0,000	0,000				0,000		
A	15.10.2008 10:50	190,0	7	0,93	okt27 013	0,000	0,000			0,035	0,000	0,000	0,000
B	15.10.2008 11:30	105,0	6	0,93	okt28 013	0,282	1,668	0:40	0,67	0,063	1,330	139,643	209,465
C	15.10.2008 15:30	255,0	6	0,93	okt27 015	0,000	0,000	4:00	4,00	0,229	0,000	0,000	0,000
D	15.10.2008 20:00	130,0	6	0,93	okt27 016	0,104	0,548	4:30	4,50	0,417	0,490	63,762	14,169
E	16.10.2008 6:45	275,0	6	0,93	okt28 001	0,213	1,406	10:45	10,75	0,865	1,005	276,245	25,697
F	16.10.2008 15:05	200,0	7	0,9	okt28 003	0,271	1,746	8:20	8,33	1,212	1,321	264,133	31,696
G	16.10.2008 20:30	220,0	6	0,93	okt28 004	0,117	0,773	5:25	5,42	1,438	0,552	121,392	22,411
H	16.10.2008 23:30	290,0	6	0,93	okt28 005	0,061	0,414	3:00	3,00	1,563	0,287	83,154	27,718
I	17.10.2008 2:00	680,0	6	0,945	okt28 006	0,000	0,000	2:30	2,50	1,667	0,000	0,000	0,000
J	17.10.2008 6:45	235,0	5	0,945	okt28 007	0,090	0,569	4:45	4,75	1,865	0,419	98,380	20,712
L	17.10.2008 17:10	190,0	6	0,93	okt28 008	0,188	1,194	10:25	10,42	2,299	0,887	168,459	16,172
M	17.10.2008 22:00	100,0	6	0,93	okt28 009	0,256	1,597	4:50	4,83	2,500	1,207	120,732	24,979
N	18.10.2008 8:30	300,0	6	0,93	okt28 010	0,049	0,339	10:30	10,50	2,938	0,232	69,468	6,616
O	18.10.2008 11:30	140,0	7	0,89	okt28 011	0,047	0,351	3:00	3,00	3,063	0,233	32,634	10,878
P	18.10.2008 14:00	135,0	7	0,91	okt28 012	0,043	0,303	2:30	2,50	3,167	0,207	27,979	11,191

PRILOGA 9: Rezultati za *prostovoljca št. 5*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *popoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
slepi vzorec	1.11.2008 18:30		5	0,94	nov04 015	0,000	0,000				0,000		
A	1.11.2008 22:05	120,0	5	0,945	nov04 016	0,034	0,145			0,146	0,159	19,103	
B	2.11.2008 1:20	115,0	6	0,94	nov04 017	0,026	0,121	3:15	3,25	0,281	0,121	13,897	4,276
C	2.11.2008 9:30	250,0	6	0,93	nov04 018	0,096	0,546	8:10	8,17	0,622	0,452	113,068	13,845
D	2.11.2008 16:10	290,0	7	0,9	nov04 019	0,171	1,131	6:40	6,67	0,899	0,833	241,667	36,250
E	2.11.2008 20:50	240,0	6	0,93	nov04 020	0,126	0,871	4:40	4,67	1,094	0,594	142,615	30,560
F	2.11.2008 22:40	95,0	6	0,93	nov04 021	0,129	0,904	1:50	1,83	1,170	0,608	57,796	31,525
G	3.11.2008 6:40	260,0	5	0,94	nov04 022	0,134	0,954	8:00	8,00	1,503	0,625	162,561	20,320
H	3.11.2008 12:50	210,0	7	0,93	nov05 004	0,164	1,164	6:10	6,17	1,760	0,773	162,422	26,339
I	3.11.2008 15:50	80,0	5	0,945	nov05 005	0,146	0,986	3:00	3,00	1,885	0,678	54,210	18,070
J	3.11.2008 19:50	140,0	6	0,94	nov05 006	0,077	0,472	4:00	4,00	2,052	0,358	50,168	12,542
K	3.11.2008 23:40	150,0	6	0,94	nov05 007	0,069	0,420	3:50	3,83	2,212	0,321	48,082	12,543
L	4.11.2008 6:40	190,0	6	0,94	nov05 008	0,102	0,677	7:00	7,00	2,503	0,476	90,426	12,918
M	4.11.2008 12:00	200,0	7	0,92	nov05 009	0,076	0,477	5:20	5,33	2,726	0,361	72,178	13,533
N	4.11.2008 16:15	105,0	6	0,94	nov05 010	0,078	0,458	4:15	4,25	2,903	0,365	38,361	9,026
O	4.11.2008 19:50	105,0	7	0,89	nov10 012	0,071	0,409	3:35	3,58	3,052	0,351	36,842	10,282
P	4.11.2008 23:40	180,0	6	0,94	nov10 013	0,059	0,337	3:50	3,83	3,212	0,274	49,384	12,883
R	5.11.2008 5:15	280,0	6	0,94	nov10 014	0,051	0,264	5:35	5,58	3,444	0,237	66,499	11,910

PRILOGA 10: Rezultati za *prostovoljca št. 6*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *dopoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
	slepi vzorec		8	0,93	okt23 015	0,000	0,000				0,000		
A	21.10.2008 10:00	280,0	7	0,94	okt23 016	0,000	0,000			0,042	0,000	0,000	0,000
B	21.10.2008 10:45	270,0	7	0,94	okt23 017	0,013	0,035	0:45	0,75	0,073	0,059	15,999	21,333
C	21.10.2008 11:30	290,0	7	0,945	okt23 018	0,013	0,095	0:45	0,75	0,104	0,059	17,094	22,792
D	21.10.2008 12:00	290,0	7	0,945	okt23 019	0,000	0,000	0:30	0,50	0,125	0,000	0,000	0,000
E	21.10.2008 12:20	300,0	7	0,945	okt23 020	0,000	0,000	0:20	0,33	0,139	0,000	0,000	0,000
F	21.10.2008 12:50	130,0	7	0,935	okt23 021	0,015	0,078	0:30	0,50	0,160	0,072	9,391	18,782
G	21.10.2008 13:45	50,0	8	0,9	okt23 022	0,019	0,092	0:55	0,92	0,198	0,094	4,678	5,104
H	21.10.2008 16:30	90,0	7	0,92	okt23 023	0,022	0,127	2:45	2,75	0,313	0,106	9,568	3,479
I	21.10.2008 20:00	150,0	5	0,945	okt23 024	0,035	0,193	3:30	3,50	0,458	0,162	24,227	6,922
J	21.10.2008 23:00	120,0	5	0,945	okt23 025	0,179	0,964	3:00	3,00	0,583	0,831	99,694	33,231
K	22.10.2008 5:00	200,0	5	0,945	okt23 026	0,415	2,146	6:00	6,00	0,833	1,926	385,222	64,204
L	22.10.2008 7:00	90,0	5	0,945	okt23 027	0,509	2,585	2:00	2,00	0,917	2,362	212,615	106,307
M	22.10.2008 11:00	230,0	6	0,945	okt24 021	0,165	0,922	4:00	4,00	1,083	0,766	176,135	44,034
N	22.10.2008 12:30	60,0	7	0,93	okt24 022	0,130	0,744	1:30	1,50	1,146	0,613	36,786	24,524
O	22.10.2008 19:15	210,0	6	0,945	okt24 023	0,125	0,662	6:45	6,75	1,427	0,580	121,832	18,049
P	22.10.2008 22:30	110,0	6	0,945	okt24 024	0,089	0,487	3:15	3,25	1,563	0,414	45,489	13,997
R	23.10.2008 6:30	270,0	6	0,94	okt24 025	0,149	0,789	8:00	8,00	1,896	0,695	187,710	23,464
s	23.10.2008 11:00	150,0	8	0,91	okt27 007	0,042	0,216	4:30	4,50	2,083	0,202	30,292	6,732
Š	23.10.2008 20:30	320,0	7	0,92	okt27 008	0,096	0,475	9:30	9,50	2,479	0,457	0,000	0,000
T	24.10.2008 6:30	300,0	6	0,93	okt27 009	0,062	0,314	10:00	10,00	2,896	0,292	87,719	8,772
U	24.10.2008 10:30	300,0	7	0,93	okt27 010	0,076	0,376	4:00	4,00	3,063	0,358	107,385	26,846
V	24.10.2008 12:30	120,0	7	0,92	okt27 011	0,032	0,146	2:00	2,00	3,146	0,153	18,307	9,153
Z	24.10.2008 20:30	220,0	5	0,945	okt27 012	0,044	0,209	8:00	8,00	3,479	0,203	44,621	5,578

PRILOGA 11: Rezultati za *prostovoljca št. 6*. Napitek, slajen z glicirizinom, je zaužil v *popoldanskih* urah.

Vzorec urina	Dan in ura odvzema urina	Volumen urina (ml)	pH	Volumen vzorca (ml)	Oznaka vzorca v HPLC rač.	AUC (mAU*min)	h	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura:min)	interval med dvema zaporednima odvzemoma (ura)	čas od aplikacije (dan)	c (µg/ml)	količina metabolita v urinu (µg)	hitrost izločanja (µg/uro)
600 mg vzel	4.11.2008 20:00												
slipi vzorec	9.11.2008 11:00	200	7	0,94	nov11 023	0,000	0,000				0,000		
A	5.11.2008 8:30	290,0	5	0,945	nov06 016	0,173	1,191			0,521	0,803	232,851	
B	5.11.2008 15:30	270,0	5	0,94	nov06 017	0,397	2,493	7:00	7,00	0,813	1,852	500,140	71,449
C	5.11.2008 20:00	170,0	6	0,94	nov06 018	0,230	1,639	4:30	4,50	1,000	1,073	182,437	40,542
D	5.11.2008 23:00	120,0	6	0,94	nov06 019	0,153	1,077	3:00	3,00	1,125	0,714	85,666	28,555
E	6.11.2008 6:00	190,0	6	0,94	nov06 020	0,188	1,366	7:00	7,00	1,417	0,877	166,667	23,810
F	6.11.2008 8:30	70,0	6	0,94	nov07 008	0,172	1,232	2:30	2,50	1,521	0,803	56,178	22,471
G	6.11.2008 18:00	270,0	6	0,94	nov07 009	0,126	0,763	9:30	9,50	1,917	0,588	158,735	16,709
H	6.11.2008 23:00	180,0	5	0,94	nov07 010	0,114	0,669	5:00	5,00	2,125	0,532	95,745	19,149
I	7.11.2008 6:30	190,0	6	0,94	nov07 011	0,161	0,865	7:30	7,50	2,438	0,751	142,730	19,031
J	7.11.2008 18:00	420,0	7	0,93	nov11 013	0,070	0,291	11:30	11,50	2,917	0,330	138,455	12,040
K	7.11.2008 21:00	210,0	7	0,92	nov11 014	0,010	0,076	3:00	3,00	3,042	0,049	10,212	3,404
L	7.11.2008 23:30	120,0	7	0,91	nov11 015	0,033	0,158	2:30	2,50	3,146	0,159	19,028	7,611
M	8.11.2008 8:00	200,0	6	0,93	nov11 016	0,085	0,310	8:30	8,50	3,500	0,401	80,268	9,443
N	8.11.2008 12:00	230,0	8	0,91	nov11 017	0,349	0,125	4:00	4,00	3,667	1,682	386,881	96,720
O	8.11.2008 13:00	90,0	8	0,9	nov11 018	0,024	0,064	1:00	1,00	3,708	0,118	10,614	10,614
P	8.11.2008 17:00	200,0	7	0,91	nov11 019	0,000	0,000	4:00	4,00	3,875	0,000	0,000	0,000
R	8.11.2008 21:00	200,0	7	0,93	nov11 020	0,026	0,011	4:00	4,00	4,042	0,123	24,524	6,131
s	8.11.2008 23:00	80,0	6	0,93	nov11 021	0,000	0,000	2:00	2,00	4,125	0,000	0,000	0,000
Š	9.11.2008 7:30	230,0	6	0,94	nov11 022	0,040	0,168	8:30	8,50	4,479	0,184	0,000	0,000
T	9.11.2008 11:00	200	7	0,94	nov11 023	0,000	0,000	3:30	3,50	4,625	0,000	0,000	0,000