

# Oslobađanje biološki aktivnih sastavnica iz oralnih dozirnih oblika biljnih pripravaka za liječenje upalnih bolesti crijeva u biorelevantnim medijima

---

Zubčić, Snježana

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:523984>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Snježana Zubčić

**OSLOBAĐANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH SASTAVNICA  
IZ ORALNIH DOZIRNIH OBLIKA BILJNIH  
PRIPRAVAKA ZA LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI  
CRIJEVA U BIORELEVANTNIM MEDIJIMA**

**DOKTORSKI RAD**

Mentor rada: doc. dr. sc. Daniela Amidžić Klarić

Zagreb, 2024. godina.





University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Snježana Zubčić

**BIORELEVANT DISSOLUTION OF BIOLOGICALLY  
ACTIVE COMPONENTS FROM HERBAL ORAL  
DOSAGE FORMS USED IN THE TREATMENT OF  
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

**DOCTORAL DISSERTATION**

Supervisor: Asst. Prof. Daniela Amidžić Klarić, PhD

Zagreb, 2024.



Ova doktorska disertacija izrađena je u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode, HALMED, u suradnji sa Zavodom za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Daniele Amidžić Klarić.



# ZAHVALE

*„... with a little help from my friends...“ -The Beatles*

Kraj puta...

Put koji je bio kao svaki pravi put kojim putnici hode: pun uspona i padova, pun krivina , ponekad monotonije, sa povremenim ali zahtjevnim preprekama. Cilj je često izmicao sa pogleda...

Srećom, na tom putu nisam bila sama. Hvala svima koji ste bili sa mnom na najzahtjevnijim dionicama....

Posebice zahvaljujem:

- svojoj mentorici doc. dr. sc. Danieli Amidžić Klarić koja me je primila pod svoje i svojim vodstvom me dovela do cilja.
- svi svojim OMCLovicima na beskonačnom razumjevanju i strpljenju, posebice mojoj HPLC ekipi
- HALMEDU na stručnoj i financijskoj potpori.
- svim svojim prijateljima koji su me čitavo vrijeme bodrili.
- svima koji su pomogli da ovaj rad ugleda svjetlo dana

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji – sestri Maji, nećaku Žarku, Tomislavu na beskrajnoj potpori, i svojim roditeljima kojima posvećujem ovaj rad.





## Sadržaj

<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Cilj, svrha i opseg rada .....	3
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>4</b>
2.1. Upalne bolesti crijeva.....	4
2.2. Liječenje upalnih bolesti crijeva .....	4
2.3. Dodatci prehrani.....	5
2.4. Biljne vrste u dodacima prehrani.....	6
2.4.1. Kurkuma .....	7
2.4.2. Indijski tamjanovac .....	8
2.4.3. Justicija .....	10
2.4.4. Crni papar .....	11
2.5. Biorelevantni mediji.....	12
2.6. Metali u dodacima prehrani.....	17
2.7. Analitičke metode u ispitivanju kvalitete dodataka prehrani.....	18
2.7.1. Tekućinska kromatografija.....	18
2.7.2. Atomska apsorpcijska spektrometrija.....	21
2.7.3. In vitro oslobađanje lijeka.....	22
2.7.4. Tehnike za ispitivanje kakvoće dozirnih oblika .....	25

<b>§ Sadržaj</b>	<b>x</b>
2.7.5. Validacija analitičkih metoda .....	25
<b>2.8. Pregled dosadašnjih istraživanja biološki aktivnih sastavnica .....</b>	<b>27</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>30</b>
3.1.1. Kemikalije.....	30
3.1.1.1. Kemikalije korištene za određivanje metala u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva .....	30
3.1.1.2. Kemikalije korištene za ispitivanje profila <i>in vitro</i> oslobađanja djelatnih tvari u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva HPLC metodom .....	30
3.1.2. Radni standardi .....	31
3.1.2.1. Standardne supstance korištene za određivanje metala u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva.....	31
3.1.2.2. Standardne supstance korištene za ispitivanje profila <i>in vitro</i> oslobađanja djelatnih tvari u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva HPLC metodom .....	31
3.1.3. Uzorci.....	32
3.1.4. Računalni programi .....	32
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Metode za određivanje kakvoće dozirnih oblika .....	37
3.2.1.1. Test variranja mase dozirnih oblika .....	37
3.2.1.2. Rastrošljivost tableta .....	37
3.2.1.3. Raspadljivost dodataka prehrani .....	37
3.2.1.4. Test pucanja mekih kapsula .....	38

3.2.1.5. Gubitak sušenjem .....	38
3.2.2. <i>Atomska apsorpcijska spektrometrija</i> .....	39
3.2.2.1. Spaljivanje uzorka mikrovalnom digestijom.....	39
3.2.2.2. Atomska apsorpcijska spektrometrija .....	39
3.2.2.2.1. Analize metala u dodacima prehrani tehnikom ETAAS.....	39
3.2.2.2.2. Analize metala u dodacima prehrani plamenom tehnikom.....	40
3.2.2.2.3. Analiza žive u dodacima prehrani primjenom analizatora žive .....	43
3.2.3. <i>Određivanje udjela biološki aktivnih sastavnica u dodacima prehrani</i> .....	43
3.2.3.1. Postupak ekstrakcije djelatnih tvari.....	43
3.2.4. <i>Određivanje profila in vitro oslobađanja djelatnih tvari u dodacima prehrani HPLC metodom</i> .....	44
3.2.4.1. <i>In vitro</i> oslobađanje djelatnih tvari.....	44
3.2.4.2. Analiza biološki aktivnih sastavnica tekućinskom kromatografijom .....	44
<b>3.3. Priprema otopina.....</b>	<b>45</b>
3.3.1. <i>Priprema vodenih otopina i pufera</i> .....	45
3.3.1.1. Pripreme pokretnih faza .....	45
3.3.1.2. Pripreme medija za oslobađanje biološki aktivnih sastavnica .....	45
3.3.2. <i>Priprema otopina standardnih supstanci</i> .....	46
3.3.2.1. Priprema otopina standardnih supstanci za određivanje metala.....	46
3.3.2.2. Priprema otopina standardnih supstanci za ispitivanje profila <i>in vitro</i> oslobađanja djelatnih tvari .....	47
3.3.2.2.1. Osnovna otopina standardnih supstanci (S <sub>1</sub> ).....	47
3.3.2.2.2. Standardna otopina (S <sub>2</sub> ) .....	47

3.3.3. Priprema otopina uzoraka.....	47
3.3.3.1. Priprema otopina uzoraka za određivanje metala .....	47
3.3.3.2. Priprema otopina uzoraka ekstrakta .....	47
3.3.3.3. Otopina uzorka za ispitivanje profila <i>in vitro</i> oslobađanja djelatnih tvari .....	47
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1. Ispitivanje kvalitete čvrstih dozirnih oblika .....</b>	<b>48</b>
4.1.1. Variranje mase kapsula i tableta.....	48
4.1.2. Raspadljivost kapsula i tableta.....	49
4.1.3. Lomljivost tableta.....	49
4.1.4. Rastrošljivost tableta.....	50
4.1.5. Pucanje mekih kapsula.....	50
4.1.6. Gubitak sušenjem kapsula i tableta.....	52
<b>4.2. Određivanje udjela metala u uzorcima .....</b>	<b>55</b>
4.2.1. Validacije metoda za određivanje prisutnosti i koncentracije metala .....	55
4.2.2. Udio metala u dodatcima prehrani .....	57
4.2.2.1. Korelacija .....	65
<b>4.3. <i>In vitro</i> oslobađanje biološki aktivnih sastavnica u biorelevantnim medijima.....</b>	<b>66</b>
4.3.1. Validacija metode za određivanje oslobađanja biološki aktivnih sastavnica u biorelevantnim medijima.....	66
4.3.2. Udio biološki aktivnih sastavnica u dodatcima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva.....	70
4.3.3. <i>In vitro</i> profil oslobađanja biološki aktivnih sastavnica u dodatcima prehrani .....	71
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>81</b>


**§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA ..... 83**

**§ 7. LITERATURNI IZVORI ..... 86**

**§ 8. DODATAK ..... XVI**

**§ 9. ŽIVOTOPIS.....XXXII**



	Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet Kemijski odsjek	Doktorska disertacija
---	--	-----------------------

## SAŽETAK

### OSLOBAĐANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH SASTAVNICA IZ ORALNIH DOZIRNIH OBLIKA BILJNIH PRIPRAVAKA ZA LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA U BIORELEVANTNIM MEDIJIMA

Snježana Zubčić

Agencija za lijekove i medicinske proizvode – HALMED, Ksaverska cesta 4, 10000 Zagreb

Kurkuminoidi, bosvelične kiseline, andrografolidi i piperin najzastupljenije su biološki aktivne sastavnice u biljnim pripravcima za liječenje upalnih bolesti crijeva. Budući da je danas primjena dodataka prehrani široko rasprostranjena i u stalnom porastu, cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj biorelevantnih medija na *in vitro* profil oslobađanja biološki aktivnih sastavnica iz biljnih preparata formuliranih u čvrste oralne oblike. Osim toga, s regulatornog gledišta, cilj je bio provesti kontrolu kvalitete dozirnih oblika i teških metala u tržišno dostupnim proizvodima. Kontrola kvalitete dozirnih oblika provedena je na temelju testiranja za čvrste oblike (tablete i kapsule), a analiza metala primjenom atomske apsorpcijske spektrometrije nakon spaljivanja mikrovalnom digestijom. Živa je određena u analizatoru žive, bez prethodne obrade uzorka. Analiza biološki aktivnih sastavnica provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti nakon oslobađanja u ispitivanim biorelevantnim medijima koji simuliraju stanje sitosti i natašte. Na temelju dobivenih rezultata svi ispitivani uzorci zadovoljili su propisane kriterije i sadržavali količinu metala ispod vrijednosti dopuštene dnevne izloženosti. Rezultati analize biološki aktivnih sastavnica odabranih biljnih vrsta pokazali su da profil *in vitro* oslobađanja biološki aktivne sastavnice iz oralnih biljnih pripravaka ovisi o sastavu biorelevantnog medija.

(90 stranica, 25 slika, 13 tablica, 79 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: biorelevantni medij, metali, dodatci prehrani, kurkuminoidi, andrografolidi, bosvelične kiseline

Mentor: doc. dr. sc. Daniela Amidžić Klarić


Rad prihvaćen:

Ocjenitelji:

1. prof. dr.sc. Nives Galić, PMF, Zagreb
2. prof. dr.sc. Sanda Rončević, PMF, Zagreb
3. prof. dr.sc. Tomislav Bolanča, FKIT, Zagreb





	University of Zagreb Faculty of Science Department of Chemistry	Doctoral Thesis
---	---	-----------------

## ABSTRACT

### BIORELEVANT DISSOLUTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS FROM HERBAL ORAL DOSAGE FORMS USED IN THE TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Snježana Zubčić

Agency for Medicinal Products and Medical Devices of Croatia, Ksaverska cesta 4, HR-10000 Zagreb

Curcuminoids, boswellic acids, andrographolides and piperine are the most abundant biologically active substances in herbal dietary supplements for the treatment of inflammatory bowel diseases. Since the use of dietary supplements is widespread and constantly increasing, this work aimed to investigate the influence of biorelevant media on the *in vitro* release profile of biologically active substances from oral herbal preparations. In addition, from a regulatory point of view, the goal was to analyze the quality control of solid dosage forms and heavy metals in commercially available products. The quality control of the dosage forms was carried out on the quality control tests for solid forms (tablets and capsules), and the metals were measured using atomic absorption spectrometry after incineration by microwave digestion. Mercury was determined using a mercury analyzer without pretreatment of the sample. The biologically active components were analyzed using high-performance liquid chromatography after release in tested biorelevant media that simulated feeding and fasting states. Based on the obtained results, all tested samples met the prescribed criteria and contained the amount of metal below the permissible daily exposure value. The analysis of biologically active components of selected plant species showed that the *in vitro* release profile of biologically active substances from oral herbal preparations depends on the composition of the biorelevant.

(90 pages, 25 figures, 13 tables, 79 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Key words: biorelevant medium, metals, dietary supplements, curcuminoids, andrographolides, boswellic acids

Supervisor: Asst. Prof. Daniela Amidžić Klarić, PhD

Thesis accepted:

Reviewers:

1. Full Professor Nives Galić, Faculty of Science, Zagreb
2. Full Professor Sanda Rončević, Faculty of Science, Zagreb
3. Full Professor Tomislav Bolanča, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Zagreb



## § 1. UVOD

Dodatcima prehrani smatraju se pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja. Prvenstveno se takvim tvarima smatraju vitamini i minerali, a mogu biti i aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, organi i ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom. Procjenjuje se da, na globalnoj razini, tržište dodatcima prehrani vrijedi preko 191 milijardi dolara u 2020. godini, a očekuje se da će do 2028. godine vrijediti preko 307 milijardi.<sup>1</sup> Povećanje upotrebe dodataka prehrani ne iznenađuje i ono je zajedničko pacijentima koji boluju od kroničnih bolesti, poput upalnih bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD). To su bolesti koje bitno narušavaju kvalitetu života pacijenta, a povezane su sa kroničnim upalama gastrointestinalnog trakta. Tri su stanja koja su prisutna: Crohnova bolest (CB), ulcerozni kolitis (UC) i ostala stanja. Za upalne bolesti crijeva karakteristično je da pacijent prolazi stanja pogoršanja (relapsa) i poboljšanja (remisije) te je prvenstveni cilj liječenja održati pacijenta što duže u stanju remisije.

Pacijenti sa upalnim bolestima crijeva često koriste dodatke prehrani uz terapiju lijekovima propisanu od strane liječnika u cilju uklanjanja simptoma poput jakih bolova, proljeva, krvave stolice te gubitka tjelesne težine. Biljne vrste koje pacijenti uzimaju kao dodatke prehrani su kurkuma (*Curcuma longa L., Zingiberaceae*) bogata kurkuminoidima, indijski tamjanovac (*Boswellia serrata Roxb. ex Colebr., Burseraceae*) izvor bosveličnih kiselina, justicija (*Andrographis paniculata (Burm. f.) Wall. ex Nees, Acanthacea*) zbog prisustva andrografolida te crni papar (*Piper nigrum L., Piperaceae*), kao izvor piperina.

Dodatci prehrani ne podliježu strogim standardima kontrole kvalitete i upravo zbog toga postoji zabrinutost za dobrobit pacijenata. U takvim proizvodima ne provjerava se prisutnost i količina biološki aktivnih sastavnica, prisustvo različitih onečišćenja poput organskih otapala, pesticida, fungicida i teških metala te cijeli niz drugih ispitivanja kakvoće dozirnih oblika. Kako bi osigurali da dodatci prehrani zadovoljavaju svojom kvalitetom i sigurnošću, Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) propisala je pravilnike za dobru proizvođačku praksu u proizvodnji, pakiranju i označavanju dodataka prehrani (engl. *Current Good Manufacturing Practices in*

*Manufacturing, Packaging, Labelling, or Holding Operations for Dietary Supplements*)<sup>2</sup> te ih uvrstila i u Američku farmakopeju (engl. *United States Pharmacopeia and the National Formulary*, USP-NF).<sup>3</sup> U Republici Hrvatskoj, kontrola dodataka prehrani podliježe Pravilniku o prehrani.

## 1.1. Cilj, svrha i opseg rada

Cilj ovog rada bio je ispitati *in vitro* profil oslobađanja biološki aktivnih sastavnica iz biljnih preparata različitih oralnih dozirnih oblika u biorelevantnim medijima. U tu svrhu razvila se, optimirala i validirala simultana analitička metoda za određivanje kurkuminoida, piperina, bosveličnih kiselina i andrografolida u referentnom mediju prema Američkoj farmakopeji i medijima koji simuliraju stanje natašte i sitosti. Osim toga, utvrđivao se utjecaj pojedinog biorelevantnog medija na profil oslobađanja pojedine biološki aktivne sastavnice.

U prvom djelu izrade ovog rada ispitana je kvaliteta dozirnih oblika prema Američkoj farmakopeji (čvrstoća, raspadljivost, rastrošljivost, ujednačenost sadržaja i vlaga čvrstih dozirnih oblika) te prisustvo teških metala. Za ispitivanje prisustva metala optimirane su i validirane metode atomske apsorpcijske spektrometrije (engl. *atomic absorption spectroscopy*, AAS). Nadalje, određen je udio pojedinih biološki aktivnih sastavnica u dozirnom obliku primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high resolution chromatography technique*, HPLC). *In vitro* profil oslobađanja biološki aktivnih sastavnica proveden je iz formuliranih dodataka prehrani zadovoljavajuće kvalitete.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva naziv je za kronične bolesti kod kojih se izmjenjuju stanja remisije i relapsa, a uzrokuje ih imunološki poremećaj nepoznatog porijekla, usmjeren na gastrointestinalni trakt, većinom na područje crijeva.<sup>4</sup> Dva su dominantna oblika ove bolesti: Crohnova bolest, koja zahvaća tanko i debelo crijevo, i ulcerozni kolitis, koji zahvaća samo debelo crijevo. Na razvoj bolesti mogu utjecati razni faktori poput pušenja, korištenje oralnih kontraceptiva, infekcije, primjene antibiotika, no najznačajniji faktor je prehrana.<sup>4-9</sup> Simptomi upalnih bolesti crijeva su najčešće proljev, bol u abdomenu te gubitak težine; simptomi ulceroznog kolitisa su krvava stolica, bol i rastezanje u abdomenu, dok su simptomi Crohnove bolesti česti proljevi i opći osjećaj slabosti.<sup>5,10</sup>

Upalne bolesti crijeva zahvaćaju sve više ljudi u čitavom svijetu te razvoj bolesti bitno utječe na njihov rad i kvalitetu njihovih života.<sup>4,11</sup>

### 2.2. Liječenje upalnih bolesti crijeva

Za liječenje upalnih bolesti crijeva u ranoj fazi s ciljem postizanja remisije i sprečavanja relapsa, koristi se konvencionalna terapija koja ubraja 5-aminosalicilate (mesalazin, i njegova tri prolijeka: sulfasalazin, balsalazin i olsalazin)<sup>12,13</sup>, glukokortikoide (prednizon, prednizolon, hidrokortizon, budesonid), analoge purina (azatioprin i 6-merkaptopurin) te metotreksat.<sup>5,13</sup> Glavni nedostatak mesalazina je njegova izražena apsorpcija u gornjem djelu gastrointestinalnog trakta, te time ne dolazi do potpune njegove apsorpcije u crijevima tj. na mjestu upale. Za razliku od mesalazina, njegovi prolijekovi imaju dobru apsorpciju na mjestu upale u crijevima.<sup>10,12</sup>

Kod težih oblika bolesti primjenjuje se biološka terapija. Biološki lijekovi dijele se na anti-faktor tumorske nekroze- $\alpha$  (eng. *anti-tumor necrosis factor- $\alpha$* , anti-TNF- $\alpha$ ) (blokatori faktora tumorske nekroze- $\alpha$ : infliksimab, adalizumab, certolizumab, golimumab, i solubilni receptori za faktor tumorske nekroze: etanercept i onercept), anti-integrinske (natalizumab i

vedolizumab), anti-interleukin-12/23 lijekove (ustekinumab) i inhibitor Janus kinaze (tofacitinib).

Obzirom da se radi o kroničnim bolestima, cilj je ulazak pacijenta u fazu remisije u kojoj će što duže ostati. Istraživanja su pokazala kako manje od 50 % pacijenata, uz korištenje konvencionalne terapije, ulazi u fazu remisije, ali svaki sljedeći tretman ne daje dovoljan odgovor na zadanu terapiju.<sup>6</sup> Budući da se radi o dugotrajnim terapijama, uz korištenje konvencionalnih lijekova pacijenti se sve češće (više od 50 % pacijenata), koriste i dodatcima prehrani kao jednim od načina preventive relapsa bolesti, jer se dodatci prehrani smatraju sigurniji i manje toksični od konvencionalnih lijekova.<sup>14</sup> Dodatci prehrani koji sadrže biljne vrste kurkume, indijskog tamjanovca i justicije dokazani su kao dobar odabir kod liječenja upalnih bolesti crijeva.<sup>5,9,15</sup>

### 2.3. Dodatci prehrani

Od davnina se neke biljne vrste koriste za ublažavanje simptoma bolesti i liječenje bolesti. Razvojem moderne medicine očekivalo se da će vremenom doći do opadanja upotrebe komplementarne i alternativne medicine koje koriste biljne vrste u svom liječenju. Nasuprot tome, u Europskoj uniji je došlo do porasta korištenja biljnih vrsta kao dodataka prehrani jer ih pacijenti smatraju zdravijim, sigurnim i prirodnim načinom liječenja, bez nuspojava za razliku od konvencionalnih lijekova.<sup>16</sup> Dodatci prehrani često se nađu pod pojmovima „dodatak prehrani“, „dijetetski proizvod“ i „prirodni proizvod“ u obliku tableta, kapsula, tekućina, pastila i gelova, a sadrže vitamine, biljne dijelove i biljne ekstrakte te materijale životinjskog i mineralnog porijekla.<sup>17</sup> Prema Pravilniku o prehrani<sup>18</sup> dodatcima prehrani smatraju se pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja. Hranjivim tvarima smatraju se vitamini i minerali, a drugim tvarima smatraju se: aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, organi i ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom.<sup>18</sup>

Zakonom o lijekovima<sup>19</sup> lijek je definiran kao svaka tvar ili kombinacija tvari prikazana sa svojstvima liječenja ili sprečavanja bolesti kod ljudi ili svaka tvar ili kombinacija tvari koja se može upotrijebiti ili primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili za



postavljanje medicinske dijagnoze, a tvar između ostalog može biti i biljnog podrijetla, npr. mikroorganizmi, biljke, dijelovi biljaka, izlučine biljaka, biljni ekstrakti. Stoga u ovom zakonu stoje posebne kategorije lijekova: (i) biljni lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više biljnih tvari ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka, (ii) tradicionalni biljni lijek čiju je sigurnost primjene i djelotvornost moguće prepoznati na temelju njegove tradicionalne uporabe i koji ispunjava uvjete određene ovim Zakonom, (iii) biljne tvari koje su cijele ili narezane biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi, gljive, u osušenom ili svježem obliku te neobrađene izlučine biljaka; biljne tvari označavaju se korištenim dijelom biljke i botaničkim nazivom biljke u skladu s binomnim sustavom (rod, vrsta, podvrsta i autor), te (iv) biljni pripravci koji su pripravci dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (usitnjavanje, ekstrakcija, fermentacija, destilacija, pročišćavanje, koncentriranje, tiještenje) te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka.<sup>20</sup>

Biljni lijekovi podliježu regulativi propisanima u Europskoj farmakopeji (Ph. Eur.) i Američkoj farmakopeji (USP) koje provjeravaju aktivne sastavnice u tim preparatima te njihova količina mora biti unutar dozvoljenih granica. No, parametar *in vitro* oslobađanja aktivne sastavnice nije uključen u provjeru biljnih lijekova.<sup>20</sup> Za razliku od njih, biljni dodatci prehrani ne podliježu strogim regulativama te se u njihovom slučaju regulativa odnosi na sigurnost preparata i na medicinske tvrdnje, a i same regulatorne agencije imaju mali utjecaj na kontrolu takvih proizvoda.<sup>20</sup> Pojam „sigurnog preparata“ odnosi se na prisutnost kemijskih kontaminanata (biljni toksini, pesticidi, mikotoksini, teški metali), alergijskih reakcija ili interakcija biljne vrste iz biljnog proizvoda sa djelatnom tvari iz lijeka.<sup>16,18,21</sup> Kod dodataka prehrani nailazi se i na odstupanja u sastavu u odnosu na deklarirani sadržaj. Problem postaje još više zabrinjavajući kada se radi o biljnim dodacima prehrani koji su dostupni preko internetske kupovine<sup>17</sup> jer su u njima često dodani sintetski dodatci (npr. farmaceutski aktivne sastavnice) u terapijskim dozama.<sup>18,21</sup>

## 2.4. Biljne vrste u dodacima prehrani

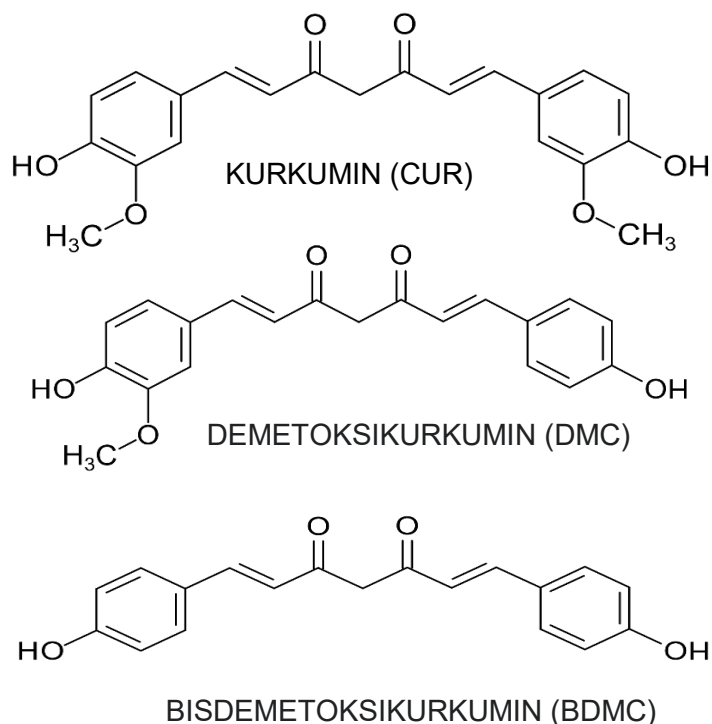
Za liječenje simptoma upalnih bolesti crijeva koriste se biljne vrste kurkuma, indijski tamjanovac, justicija i crni papar. One su od prije već poznate u tradicionalnoj i ajuverdskoj medicini za liječenje različitih bolesti.

### 2.4.1. Kurkuma

Kurkuma se od davnina koristi kao začin, ali i kao ljekovita biljka, naročito u azijskim zemljama.<sup>22</sup> Korijen kurkume (lat. *Curcuma longa* L., *Zingiberaceae*) (slika 2.1.) sadrži kurkuminoide: kurkumin (CUR), demetoksikurkumin (DMC) i bisdemetoksikurkumin (BDMC) (slika 2.2.). Ovi spojevi su se pokazali kao modifikatori aktiviteta glutationske peroksidaze, superoksid dismutaze i katalaze te kao blokatori aktiviteta nuklearnog faktora (NF)- $\kappa$ B, ciklooksigenaze-2 i lipoksigenaze i time pokazuju na svoja protuupalna i antioksidativna svojstva te preveniraju kardiovaskularne bolesti, infekcije, tumore i pretilost.<sup>6,14,17,22,23</sup> Kurkumin se u tradicionalnoj medicini primjenjivao oralno i topijski kao lijek za širok spektar bolesti poput bolesti jetre, prehlade, pulmoloških problema, pankreatitisa i reumatoidnog artritisa.<sup>5</sup>



Slika 2.1. *Curcuma longa* L., *Zingiberaceae* biljka<sup>24</sup>

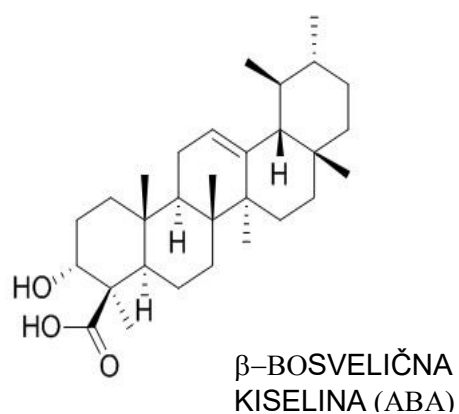
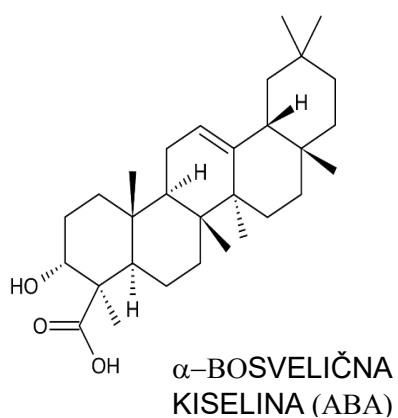
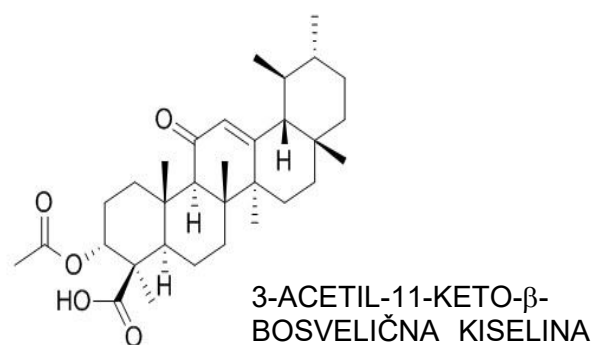


Slika 2.2. Strukturne formule kurkumina

Kurkumin, kao i demetoksikurkumin i bisdemetoksikurkumin spadaju u grupu polifenolnih flavanoida te, iako imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi, njihova primjena je ograničena zbog slabe topljivosti u vodenim otopinama i slabe bioraspoloživosti budući da se radi o lipofilnim molekulama.<sup>23,25</sup> Kako bi se povećala njegova bioraspoloživost često se nalazi u kombinaciji sa crnim paprom koji mu povećava bioraspoloživost za oko 2000 puta, jer piperin iz crnog papra sa kurkuminom radi kurkumin kompleks.<sup>22</sup>

#### 2.4.2. Indijski tamjanovac

Indijski tamjanovac (lat. *Boswellia serrata* Roxb. Ex Colebr., Burseraceae) (slika 2.3.) u svojoj smoli sadrži bosvelične kiseline čiji su predstavnici  $\alpha$ - i  $\beta$ -bosvelična kiselina (ABA i BBA), 3-O-acetil- $\alpha$ - i  $\beta$ -bosvelična kiselina (AABA i ABBA), 11-keto- $\beta$ -bosvelična kiselina (KBA) i 3-O-acetil-11-keto- $\beta$ -bosvelična kiselina (AKBA) (slika 2.4.). One su zaslužne za imunološki odgovor i protuupalna svojstva zbog djelovanja na 5-lipoksigenazu, leukocitnu elastazu te djelovanje na puteve aktiviteta mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) i nuklearnog faktora NF- $\kappa$ B.<sup>6,10,17,28</sup>

Slika 2.3. *Boswellia serrata* Roxb. Ex Colebr., Burseraceae biljka<sup>27</sup>

Slika 2.4. Strukturne formule bosveličnih kiselina

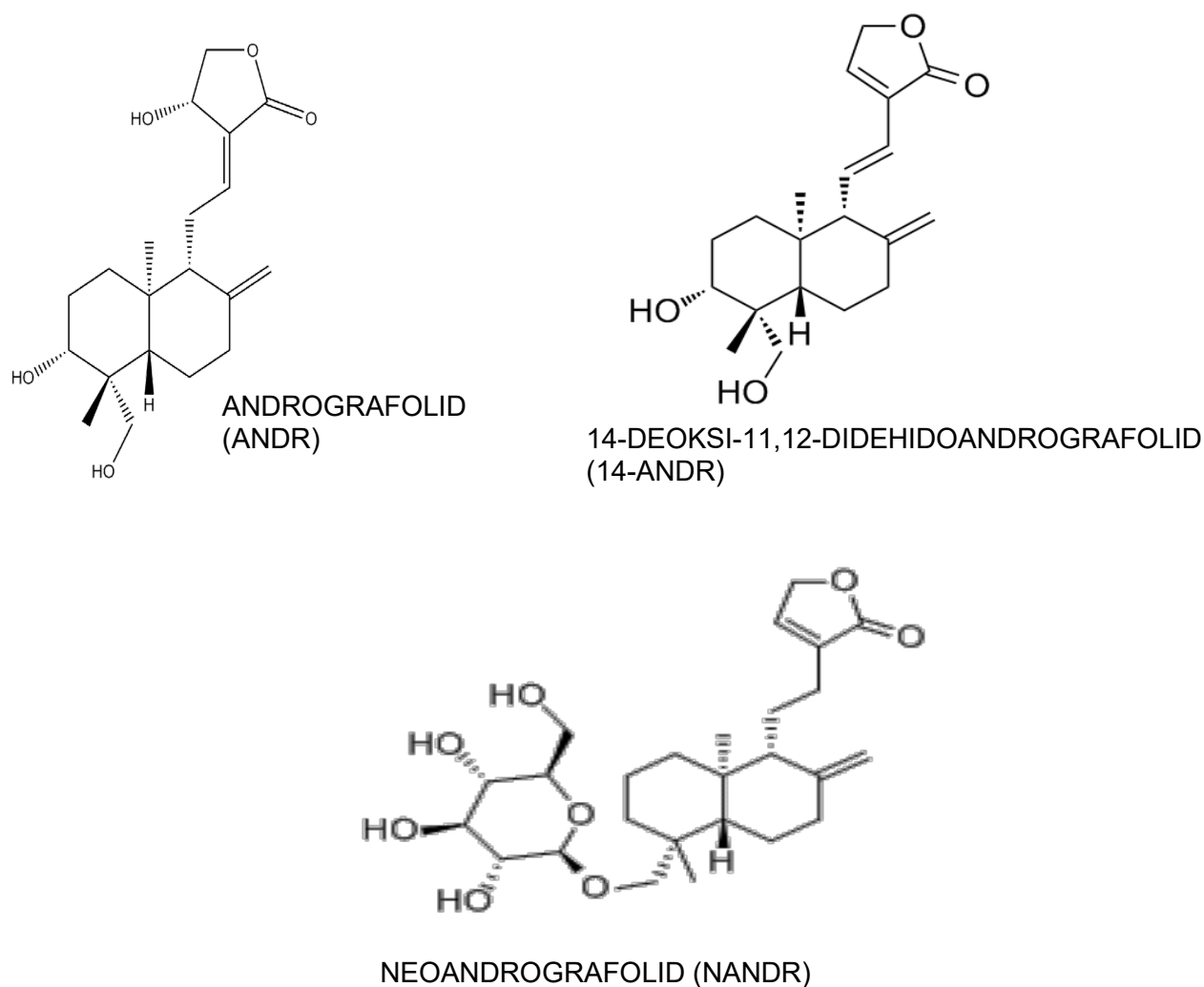
Indijski tamjanovac je biljna vrsta koja je sveprisutna u Indijskoj ajurvedskoj medicini te se nanosi na kožu za bolesti zglobova i raznih kroničnih upalnih oboljenja.<sup>26</sup>

### 2.4.3. *Justicija*

Justicija (lat. *Andrographis paniculata* (Burm. f.)Wall. Ex Nees, *Acenthaceae*) (slika 2.5.) je biljka koja uspijeva na području tropske i sutropske Azije.<sup>28</sup> Ekstrakt justicije bogat je diterpenskim laktonima andrografolida (ANDR), neoandrografolida (NANDR) i 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolida (14-DANDR) (slika 2.6.) kojima su dokazana antidiabetička, antibakterijska, antimalarijska, antikancerogena i protuupalna svojstva, djelovanja na imunološki odgovor te djelovanja na smanjenje interleukina, supresiju metaloproteinaze i hormona rasta i na aktivitet nuklearnog faktora (NF)- $\kappa$ B i Janus tirozin kinetaze. Uz ova svojstva dokazano je i da imaju antioksidativna svojstva.<sup>6,9,10,11,17,28,29</sup>



Slika 2.5. *Andrographis paniculata* (Burm. f.)Wall. Ex Nees, *Acenthaceae* biljka<sup>30</sup>

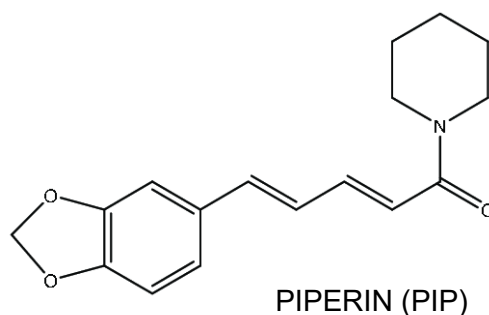


Slika 2.6. Strukturne formule andrografolida

Andrografolidi su slabotopljivi u vodi, ali su dobro topljivi u organskim otapalima poput acetona, kloroforma, etera i toplog etanola.<sup>28</sup>

#### 2.4.4. Crni papar

Jedan od sastojaka crnog papra (*lat. Piper nigrum L., Piperaceae*) (slika 2.7.) je piperin (PIP) (slika 2.8.). Budući da on pojačava bioraspodivnost kurkuminoida, često se crni papar nalazi u kombinacijama sa kurkumom.<sup>17</sup> Kombinacija kurkumina i piperina dodatno pojačava antioksidativna i protuupalna svojstva.<sup>22</sup>

Slika 2.7. *Piper nigrum L.*, *Piperaceae* biljka<sup>31</sup>

Slika 2.8. Strukturna formula piperina

## 2.5. Biorelevantni mediji

Većina djelatnih komponenti apsorbira se u ljudskom organizmu u gornjem djelu gastrointestinalnog trakta, odnosno manjim dijelom želucu i većim dijelom u gornjem djelu tankog crijeva, a apsorpcija ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima same aktivne sastavnice poput veličine molekule, lipofilnosti i stupanju ionizacije.<sup>13</sup> Tekućine u gastrointestinalnom traktu sadržavaju žučne soli, lecitin, razne produkte probave i elektrolite koji utječu na pH-vrijednost i ostale parametre poput osmolalnosti i površinske napetosti, a time utječu na

topljivost aktivne sastavnice.<sup>32,33,34</sup> Prema svojim fizičko-kemijskim svojstvima, u ljudskom organizmu, nalazimo tri tipa tekućina u gastrointestinalnom traktu koji se značajno razlikuju. Prvi tip tekućine na ovom putu je želučana tekućina u stanju natašte, a potom crijevna tekućina (engl. *human intestinal fluid*, HIF) skupljena prije (natašte) i nakon jela (stanje sitosti).

Sastav želučane tekućine u stanju natašte sastoji se većinom od natrijevih ( $\text{Na}^+$ ) i kloridnih ( $\text{Cl}^-$ ) iona, dok su pepsin i žučne kiseline prisutni u niskim koncentracijama. Površinska napetost kreće se oko  $(30 - 50) \text{ mN m}^{-1}$ , osmolalnost oko  $(155-227) \text{ mOsm kg}^{-1}$  i pH između  $1,4 - 2,9$ .<sup>33,35,36</sup>

Vrijednosti pH crijevne tekućine u stanju natašte su oko vrijednosti  $6,0 - 7,1$ <sup>33,34,37</sup>, osmolalnost od  $196 \text{ mOsm kg}^{-1}$ <sup>33,36</sup> do  $270 \text{ mOsm kg}^{-1}$ <sup>32</sup>, dok je površinska napetost između  $(30 - 45) \text{ mN m}^{-1}$ .<sup>33,34,37</sup> Sastav crijevnog medija još uvijek dominantno čine  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  ioni, a koncentracija žučnih kiselina raste i najčešće se kreću oko  $(0,3 - 9,6) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,<sup>33,34,37</sup> iako se u literaturi mogu naći i u širim granicama od  $(0,03 - 36,18) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .<sup>32</sup> Koncentracija fosfolipida se kreće oko  $0,32 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,003 - 2,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).<sup>34</sup>

Unosom hrane dolazi do pada pH-vrijednosti. pH crijevne tekućine u stanju sitosti se kreće od  $4,9 - 6,6$ , ovisno o vremenu konzumiranja hrane<sup>33,37</sup>, osmolalnost oko  $(300 - 453) \text{ mOsm kg}^{-1}$ <sup>33,37</sup>, koncentracija žučnih soli  $(3,72 - 20) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ <sup>33,37</sup> iako se mogu kretati i u širim granicama  $(0,74 - 86,14) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ <sup>32</sup>, dok se fosfolipidi kreću u koncentracijama  $(2,99 - 5,74) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a površinska napetost oko  $28 \text{ mN m}^{-1}$ .<sup>37</sup>

Kada se radi o oralnim farmaceutskim oblicima, dva su fizičko-kemijska svojstva o kojima ovisi njihova apsorpcija u ljudskom organizmu: topljivost u vodenim otopinama i propusnost (permeabilnost).<sup>38</sup> Obzirom na ova dva parametra aktivne sastavnice mogu se svrstati u četiri grupe prema stupnjevima topljivosti i propusnosti (engl. *The Biopharmaceutics Classification System*, BCS). Prema navedenoj klasifikaciji u grupi 1 su aktivne sastavnice koje su jako topljive u vodenim otopinama i jako propusne, u grupi 2 su slabo topljive, ali jako propusne, u grupi 3 su dobro topljive i slabo propusne, i zadnja grupa 4 u kojoj su klasificirane aktivne sastavnice koje su slabo topljive i slabo propusne.<sup>39,40</sup> Na oslobađanje aktivnih sastavnica u mediju utječe puno faktora poput pH medija, puferskog kapaciteta, ionske jakosti te otapanje uz prisustvo sufraktanata.<sup>41</sup> Kada se radi o aktivnim sastavnicama koje su u BCS grupi 1 i grupi 3 tj. topljivima u vodenim medijima, oslobađanje aktivne sastavnice je jednostavno. Problem nastaje kada se radi o otapanju lipofilnih molekula u biološkim medijima koji su vodeni.<sup>41,42</sup>



Slabo topljive neionske aktivne sastavnice slabo će se otapati u želučanoj tekućini, ali će se bolje otapati u crijevnoj tekućini. Slično ponašanje će biti uočljivo i za slabo topljive aktivne sastavnice koje su po svom kemijskom sastavu slabe kiseline, dok će se slabe baze brže otapati u želučanim tekućinama natašte nego u crijevnim tekućinama. U stanju sitosti dolazi do promjene fizičko-kemijskih svojstava koji se mijenjaju tijekom vremena od trenutka konzumiranja hrane.<sup>41</sup> Jedan od načina poboljšanja apsorpcije lipofilnih aktivnih sastavnica je razvoj farmaceutskih formulacija koje se baziraju na lipidima, popratnim otapalima, amorfnim čvrstim disperzijama i ostalim sličnim oblicima.<sup>38</sup>

Praćenje oslobađanja aktivne sastavnice u živom organizmu, *in vivo*, radi se tijekom kliničkih studija na dobrovoljcima, gdje je uzorkovanje izrazito zahtjevno. Stoga se radi predikcija *in vivo* oslobađanja, a to je upravo *in vitro* oslobađanje djelatnih tvari. Mediji koji su propisani za provođenje *in vitro* oslobađanja aktivne sastavnice ponekad ne reflektiraju *in vivo* situaciju jer ne odgovaraju stvarnim fizičko-kemijskim svojstvima *in vivo* medija, npr. ne sadrže pepsin, žučne kiseline, ne odgovaraju po parametrima površinske napetosti itd. Posljednjih dvadeset godina sve se više pažnje daje *in vitro* oslobađanju aktivnih sastavnica koji se provodi u medijima koji su po svom sastavu slični *in vivo* medijima, naročito u fazama razvoja proizvoda, kako bi što bolje reflektirali stvarno stanje uz prihvatljivu cijenu.<sup>32,41-45,47,48</sup> Metoda oslobađanja aktivne sastavnice u biorelevantnom mediju definira se prema dozirnom obliku u stanjima prije jela (natašte) i nakon jela (sitost).<sup>45,47</sup> Ovisno o koncentraciji i kombinaciji žučnih kiselina i fosfolipida na koje se gleda kao na prirodne sufraktante koji stvaranjem micela oko molekula aktivne sastavnice pospješuju topljivost tvari kao i površinska napetost koja također igra veliku ulogu u otapanju, ovisi stupanj oslobađanja aktivne sastavnice.<sup>34,43,49</sup> Tri su žučne kiseline koje su najzastupljenije u crijevnoj tekućini (70 – 75 %): taurikolat, glikokolat i glikogenodeoksikolat. Najzastupljeniji fosfolipidi su lecitin i njegov produkt hidrolize lisolecitin koji, za razliku od lecitina, ima veću površinsku aktivnost te potiče na stvaranje micela pri nižim koncentracijama.<sup>34</sup> Kada se radi o jako topljivim sastavnicama, svojstva i sastav medija ne igra veliku ulogu. Slično je i sa aktivnim komponentama koje su po sastavu lipofilne sa karakteristikama slabe kiseline ( $pK_a \sim 3,5 - 5,5$ ) ili neutralne komponente za koje se očekuje da se oslobađaju u želučanoj tekućini. Kod aktivnih sastavnica koje su lipofilne, a po karakteristikama slabe baze upravo važnost svojstva medija dolazi do izražaja jer je njihovo oslobađanje u crijevnoj tekućini u stanju natašte znatno bolje nego u želučanoj tekućini u stanju natašte<sup>35</sup>, kao i za aktivne komponente slabo topljive ali imaju veliku permeabilnost.<sup>34</sup> Vertzoni

i suradnici predlažu svoj model želučanog medija u stanju natašte (engl. *fasted state simulating gastric fluid*, FaSSGF) koji sadrži pepsin u koncentraciji  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $20 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  lecitina i  $80 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  natrijevog taurokalata kao žučnih kiselina, čime se postiže površinska napetost, osmolalnost i pH sličan onima koji su u *in vivo* mediju.<sup>35</sup> Dobiveni rezultati za aktivne sastavnice koje su slabe baze pokazali su bolje oslobađanje u mediju FaSSGF nego u propisanim medijima koji su sadržavali natrijev dodecilsulfat (anionski sufraktant) ili Triton X-100 (ne-ionski sufraktant).<sup>35</sup>

Nasuprot želučanoj tekućini, u ljudskom organizmu se apsorpcija aktivnih sastavnica odvija većim dijelom u crijevnoj tekućini, a kolika će apsorpcija biti ovisi o tome radi li se o stanju natašte ili u stanju sitosti. Unos hrane u organizam rezultira promjenu pH crijevne tekućine koji može znatno utjecati na topljivost aktivne sastavnice a time i na njenu apsorpciju. Slabo topljive, lipofilne aktivne sastavnice će imati veću topljivost u crijevnoj tekućini u stanju sitosti.<sup>49,51</sup> Prvobitno se koristio simulirani crijevni medij (SIF) koji je imao pH 7,5, no ubrzo je promijenjen na 6,8 jer je taj pH više odgovarao stvarnom pH crijevne tekućine.<sup>52</sup> Stoga se u posljednje vrijeme ispituje utjecaj crijevnog medija u stanju natašte (engl. *fasted state simulating intestinal*, FaSSIF) i crijevnog medija u stanju sitosti (engl. *fed state simulating intestinal*, FeSSIF) jer osim topljivosti u crijevnom mediju, važnost na apsorpciju aktivne sastavnice ima i propusnost (permeabilnost) te prisustvo žučnih kiselina kao i produkti lipolize u FeSSIF koji mogu pospješiti apsorpciju slabo topljivih aktivnih sastavnica jer u biorelativnim medijima imaju ulogu sufraktanta.<sup>50,52,53</sup> Ovu teoriju potvrdili su Stappaerts i suradnici uspoređujući apsorpcije u FaSSIF i FeSSIF sa ljudskom crijevnom tekućinom (engl. *human intestinal fluid*, HIF) skupljenom prije i nakon jela.<sup>50</sup> Zaključili su da unos hrane znatno utječe na apsorpciju lipofilnih aktivnih sastavnica, dok će hidrofilne aktivne sastavnice pospješiti svoju topljivost i propusnost zahvaljujući stvaranju micela u medijima stanja sitosti za koje su zaslužne žučne soli i lecitin.<sup>32,50,52</sup> Koncentracije žučnih soli i lecitina u FaSSIF su bile  $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  i  $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a pH 6,5, dok je u FeSSIF koncentracija žučnih soli bila  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , lecitina  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , masnih kiselina  $0,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  i monoglicerida  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a pH 5,8.<sup>32</sup> Važnost unosa hrane za apsorpciju lipofilnih komponenata u vodenom mediju te da je ovakav model prihvatljiviji za *in vitro* oslobađanje aktivne sastavnice nego same vodene otopine, opisao je Singh.<sup>42</sup> Fuchs i suradnici proveli su niz ispitivanja sa različitim FaSSIF medijima u kojima su varirali različite kombinacije i koncentracije pojedinih žučnih kiselina (teurokolat, glikokolat, tauroursodeoksikolat, taurokenodeoksikolat, i

glikokenodeoksikolat) i fosfolipida (lecitin i lisolecitin).<sup>43</sup> Iako su farmakopejom propisani mediji za oslobađanje slabo topljivih aktivnih sastavnica u vodi, 0,5 % SDS i jednostavni puferi u svrhu kontrole kvalitete samog proizvoda, rezultati oslobađanja aktivnih sastavnica često nisu u skladu sa oslobađanjima aktivnih sastavnica u biorelevantnim medijima. Rezultati dobiveni u biorelevantnim medijima su približno slični rezultatima dobivenima u crijevnom mediju, rezultati u 0,5 % SDS često viši, dok su oni dobiveni u jednostavnim puferima često niži od stvarnih rezultata.<sup>43,52</sup> Zoeller je uspoređivao fizičko-kemijska svojstva (pH, osmolalnost i kapaciteta pufera) medija FaSSIF i FeSSIF ovisno o prisustvu surfaktanta koji imaju značajan utjecaj na površinsku napetost a time i na otapanje i propusnost aktivne sastavnice.<sup>44</sup> Uočili su da korištenjem medija SDS preporučenog farmakopejom, površinska se napetost previše smanjuje čime se bitno utječe na kritičnu koncentraciju stvaranja micela. Proučavali su i utjecaj na otapanje same aktivne sastavnice i iste aktivne sastavnice koja je u tableti. Obzirom na samu formulaciju gotovog oblika (u njihovom slučaju tableta) uočeno je da je profil oslobađanja aktivne sastavnice bolji ako se radi o formulacijama nego ako se radi o čistoj aktivnoj sastavnici upravo zbog utjecaja samih ekscipijensa na otapanje aktivne sastavnice jer su oni često surfaktanti, punila koja su topljiva u vodi te ostale pomoćne komponente kojima se ubrzava oslobađanje aktivne sastavnice.<sup>44,45</sup> Wuyst i suradnici su napravili predikciju medija FaSSIF i FeSSIF sa crijevnim tekućinama u stanju natašte (FaHIF) i stanju sitosti (FeHIF).<sup>51</sup> Došli su do zaključka da je predikcija bila puno bolja za FaSSIF u odnosu na crijevnu tekućinu u stanju natašte, dok je u slučaju FeSSIF došlo do povećanih rezultata u odnosu na crijevnu tekućinu u stanju sitosti vjerojatno zbog izostanka lipolitičkih produkata te nekih vrsta žučnih soli i fosfolipida u FeSSIF te su ujedno time rezultirale većom propusnošću nego u crijevnoj tekućini u stanju sitosti. Fotaki i suradnici uspoređuju stvarne tekućine u ljudskom organizmu sa biorelevantnim medijima i medijima koji su uobičajeni za oslobađanje aktivnih sastavnica.<sup>40</sup> Želučane medije u stanju natašte uspoređuju sa jednostavnim želučanim medijima koji su po sastavu otopine klorovodične kiseline (HCl) sa dodatkom pepsina, pH 1,2, kojima su dodani sintetski surfaktanti (SDS ili Triton-X) i biorelevantnim medijima u čijem sastavu su natrijev klorid (NaCl), pH je 1,6 a ulogu surfaktanta čine natrijev teurokolat i lecitin. Veći je izazov prilagoditi sastav medija sastavu želučanim medijima u stanju sitosti jer se njegov sastav mijenja vremenom od trenutka unosa hrane. Simulacija crijevnog medija, koji se često primjenjuje u *in vitro* oslobađanjima aktivne sastavnice, ima pH 6,8 i ponekad sadrži pepsin, no često ne pokazuje dobru korelaciju sa oslobađanjima aktivne sastavnice u stvarnim crijevnim

medijima. Puno bolju usporedbu rezultata su dobili kada su primijenili FaSSIF čiji je pH bio 6,5 i sadržavao je natrijev teurokolat, lecitin i FeSSIF čiji je pH bio 5,0 te je, uz natrijev teurokolat i lecitin, sadržavao i masne kiseline koje su imale ulogu produkata lipolize. Korištenjem aparature 3 i 4 za oslobađanje djelatne tvari (umjesto aparatura 1 i 2 koje su uobičajene za čvrste oralne oblike) postigli su i hidrodinamiku sličnu onoj koja se odvija u ljudskom organizmu. Zaključili su kako se uz kombinaciju *in vitro* uvjeta (odabrani biorelevantni medij i aparatura) mogu dobro predvidjeti *in vivo* rezultati. Značaj korištenja biorelevantnih medija je izrazito važan, naročito u predkliničkim i kliničkim ispitivanjima farmaceutskih formulacija<sup>45</sup>, jer se rezultati oslobađanja aktivnih sastavnica u njima puno bolje podudaraju sa stvarnim *in vivo* oslobađanjima aktivnih sastavnica. Usprkos tome, njihova primjena još uvijek nije istisnula upotrebu uobičajenih medija koje propisuju američka i europska farmakopeja jer ih regulatorna tijela ne dozvoljavaju za provjeru kakvoće proizvoda.<sup>54</sup>

## 2.6. Metali u dodatcima prehrani

Prirodni proizvodi uključujući hranu i biljne dodatke prehrani mogu sadržavati povišene razine teških metala. Neka tla mogu sadržavati veće koncentracije metala koji potječu od prirodnih komponenti ili geoloških izvora kao i od ljudskih aktivnosti. Stoga teški metali mogu dospjeti u hranu i biljne dodatke prehrani od biljaka uzgojenih na tlima s povišenim koncentracijama metala. S druge strane, metali mogu također dospjeti u biljke putem suhog i mokrog taloženja (zrak i kišnica). Do kontaminacije može doći i tijekom proizvodnih procesa kao što su proizvodnja, rukovanje, skladištenje, obrada ili distribucija. To se pokazalo još većim problemom budući da se dodatci prehrani obično uzimaju kronično, a izloženost metalnim onečišćenjima može biti tijekom dužeg vremena. Zbog toga je dodatke prehrani preporučljivo uzimati samo uz strogu liječničku ili ljekarničku preporuku te kupovati ih u kontroliranim tržištima.

Implementacija smjernica ICH Q3D<sup>55</sup> s pristupom procjene rizika kvalitete važna je prekretnica za usklađivanje kontrole elementarnih onečišćenja u dodatcima prehrani diljem svijeta. Prema toj smjernici, elementi su podijeljeni u četiri grupe. U prvoj grupi su elementi izrazite toksičnosti za zdravlje ljudi (arsen, kadmij, živa i olovo) te se obavezno moraju kontrolirati. Druga grupa dijeli elemente u dvije podgrupe, 2A (kobalt, nikal i vandamij) i 2B (srebro, zlato, iridij, osmonij, paladij, platina, rodij, rutenij, kositar i tantal) ovisno o toksičnosti i o njihovoj prisutnosti u farmaceutskim dozirnima oblicima. Prisutnost elemenata grupe 2A je

malo vjerojatna u farmaceutskim dozirnim oblicima, dok elementi grupe 2B u farmaceutski dozirni oblik ulaze tijekom proizvodnje te se oni obavezno moraju kontrolirati. Elementi grupe 3 (barij, krom, bakar, litij, molibden, antimon i kositar) su relativno niske toksičnosti i kontroliraju se ako su namjerno dodani u farmaceutski dozirni oblik, dok u grupu ostalih elemenata ulaze elementi čija je toksičnost za ljudsko zdravlje niska (aluminij, brom, kalcij, kalij, željezo, magnezij, mangan, natrij, volfram i cink) te ih nije potrebno kontrolirati. Elemente grupe 1 nazivamo teškim metalima čija je prisutnost, čak i u tragovima, vrlo je štetna za ljudska bića. Stoga je njihovo analitičko određivanje vrlo kritična i važna tema, koja je privukla značajnu pozornost relevantnih regulatornih agencija. Jedna od najčešćih tehnika koja se koristi za analizu elemenata u hrani i dodacima prehrani je atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS).

Praćenje elementarnih onečišćenja u farmaceutskim tvarima često nije dovoljno primjereno, iako je to vrlo važna tema jer direktiva ICH Q3D zahtijeva praćenje širokog raspona elemenata, često u niskim koncentracijama. S druge strane, postoje i potencijalni izvori elementarnih onečišćenja poput onečišćenja kroz interakcije s opremom za obradu ili sustavima spremnika/zatvaranja i sastojcima farmaceutskog proizvoda/lijeka. Posljednji izvor je ključan kada se razmatraju biljni lijekovi, zbog sposobnosti biljaka da apsorbiraju elementarna onečišćenja različitim putevima.

Elementi u tragovima i teški metali u dodacima prehrani predstavljaju ozbiljan potencijalni rizik za zdravlje. Nadalje, metali u tragovima igraju značajnu ulogu u reakcijama s biološki aktivnim sastavnicama porijeklom iz biljke i odgovorni su za njihova ljekovita i toksična svojstva. Zbog svega navedenog, značajno je pratiti sadržaj metalnih onečišćenja u dodacima prehrani koji sadrži jednu ili više biljnih vrsta poput onih koji se koriste za ublažavanje simptoma upalnih bolesti crijeva: indijski tamjanovac, justicija, papar i kurkuma.

## **2.7. Analitičke metode u ispitivanju kvalitete dodataka prehrani**

### *2.7.1. Tekućinska kromatografija*

Metoda koja je danas postavljena kao standard u svakom analitičkom laboratoriju je kromatografija. Odjeljivanje sastavnica iz smjese na temelju razlike u njihovoj adsorpciji između pokretne i nepokretne faze, danas ima niz inačica no i dalje je glavna klasifikacija prema odabiru pokretne faze i nepokretne faze: plinska kromatografija, tekućinska kromatografija i

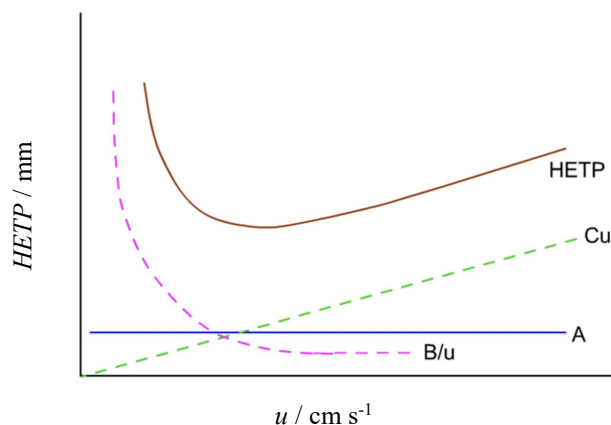
tankoslojana kromatografija. Tehnološkim razvojem, danas se sve više govori inačicama tekućinske kromatografije poput kromatografije superkričnim fluidom, afinitetne kromatografije i dvodimnezionalne kromatografije, no principi kromatografije su isti kod svih.

Tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC), u kojoj se komponente u smjesi razdvajaju po principu razlike u zadržavanju između pokretne, tekuće, faze i nepokretne, krute, faze, danas je najzastupljenija tehnika u kontrolama kvalitete lijekova. Tijekom 60-tih godina prošlog stoljeća došlo je do razvoja instrumenata i nepokretnih faza što je omogućilo da se LC dokaže kao brza, osjetljiva i jako separativna tehnika. To se ujedno smatra početkom moderne kromatografije, a metoda postaje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Posljednjih godina, razvojem nepokretnih faza sa manjim česticama kojima se postiže bolje i brže razdvajanje komponenata, tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) polako istiskuje HPLC. No, i HPLC i UHPLC su danas nezamjenjive metode u većini analitičkih laboratorija.

Tekućinska kromatografija se zasniva na principu razdvajanja analita iz smjese na temelju različitog afiniteta prema pokretnoj i nepokretnoj fazi. Brzina kretanja (eluiranja) analita ovisi o duljini kolone, ali i o koncentraciji analita u pokretnoj fazi. No, u kromatografiji, brzinu kretanja opisujemo vremenom zadržavanja (engl. *retention time*, RT) analita. Faktor koji nam opisuje ovisnost vremena zadržavanja analita i koeficijenta raspodjele analita je faktor kapaciteta  $k'$ .

Faktor kapaciteta je eksperimentalno određen faktor i karakterističan je za svaki analit u određenim kromatografskim uvjetima. Uspoređivanjem dva faktora kapaciteta od različitih analita, govorimo o separacijskom faktoru  $\alpha$  koji daje informaciju o odvajanju dva analita. Na samu učinkovitost kromatografije utječu i drugi čimbenici koji su opisani van Deemterovom jednadžbom (jednadžba 2.1.), a kako izgleda grafički prikaz vidi se na slici 2.9.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \times u \quad (2.1.)$$



Slika 2.9. Kromatografska učinkovitost opisana van Deemterovom jednačom <sup>56</sup>

Čimbenik  $A$  opisuje gibanje molekula analita na različit način kroz kolonu i odstupanje od jedinstvenog kretanja svih molekula jednog analita. Što su kolone kvalitetnije s ujednačenijim punilima to je ovaj čimbenik manji, a učinkovitost kolone bolja.  $B$  opisuje longitudinalnu difuziju zone analita. Čimbenik  $C$  predstavlja otpor prijenosu mase između dviju faza, dok je  $u$  brzina pokretne faze kroz kolonu. Doprinos je značajniji kod visokih protoka i velikih čestica punila kolone. Cilj su što niže vrijednosti svakog od tih čimbenika. Dakle, na samu učinkovitost kromatografije značajno doprinosi nepokretna faza koja se nalazi u koloni. Učinkovitost kromatografije opisuje se i sa drugim značajnim faktorima. Broj teoretskih tavana (engl. *number of theoretical plates*,  $N$ ) i visina teoretskih tavana (engl. *height of theoretical plates*,  $HETP$ ) ukazuju na efikasnost kolone, te su one međusobno obrnuto proporcionalne, tj. efikasnost je bolja što je veći  $N$  a  $HETP$  manji. Drugi parametar koji opisuje efikasnost razdvajanja dva analita je razlučivanje. Razlučivanje ovisi o vremenu zadržavanju analita, ali i o širini pika na način što je širina pika uža, razlučivanje je bolje. Na razlučivanje, osim odabira nepokretne faze, značajno utječe odabir pokretne faze. U idealnom slučaju pik analita ima oblik Gaussove krivulje. Dva su parametra kojima se opisuje oblik pika: faktor asimetrije (engl. *asymmetry factor*,  $A_s$ ) i faktor razvlačenja (engl. *tailing factor*,  $T_f$ ). Oba opisuju odstupanje od idealnog oblika Gaussove krivulje.

Tekućinski kromatograf sastoji se od pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje (injektora), nepokretne faze i detektora. Pumpa tjera pokretnu fazu kroz otplinjač te nakon otklanjanja otopljenih plinova, dalje u kromatografski sustav. Injektor ubrizgava tekući uzorak kojeg pokretna faza nosi preko nepokretne faze gdje se odvija razdvajanje analita.

Nakon razdvajanja, analiti nošeni pokretnom fazom dolaze do detektora te se bilježi signal za svaki od sastojaka smjese.<sup>57</sup> S obzirom na način razdvajanja analita razlikuje se normalno fazna (engl. *normal phase*, NP), obrnuto fazna (engl. *reverse phase*, RP), tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC), ionska (engl. *ion chromatography*, IC) i kromatografija isključenjem (engl. *size exclusion chromatography*, SEC). Kod RP-LC nepokretna faza je nepolarnija u odnosu na pokretnu pa se analiti koji su polarni slabije vežu i ranije eluiraju, dok se nepolarni analiti jače vežu za kromatografsku kolonu te tako i dulje zadržavaju. Kod NP-LC princip je obrnut te je pokretna faza nepolarnija u odnosu na nepokretnu fazu.

### 2.7.2. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Elektroni u vanjskim ljuskama atoma mogu apsorbirati elektromagnetsko zračenje točno određene valne duljine, pri čemu prelaze u pobuđeno stanje. Apsorbacija zračenja proporcionalna je broju atoma u osnovnom stanju, odnosno koncentraciji pojedine atomske vrste. Ovo je kratki opis principa atomske apsorpcijske spektrometrije (engl. *atomic absorption spectrometry*, AAS). Ova metoda je pogodna za kvalitativno i kvantitativno određivanje 70 elemenata zbog svoje velike osjetljivosti, visoke selektivnosti i brzine. U cilju pobuđivanja atoma, atome je potrebno atomizirati. Atomizacija je proces u kojem se analit prevede u plinovito stanje gdje su atomi/ioni međusobno odijeljeni, te dolazi do stvaranja atomskih para u kojima dolazi do pobude atoma pomoću vanjskog izvora zračenja. Korak atomizacije je ujedno i najkritičniji korak jer o njemu ovisi stupanj učinkovitosti i reproducibilnosti određivanja metode.

Uređaj se sastoji od izvora zračenja (npr. žarulje sa šupljom katodom pogodne za određivanje više elemenata, bezelektrodne žarulje za izbijanje koriste energiju radiofrekvencijskog ili mikrovalnog zračenja), sustava za automatsko uzorkovanje, sustav za atomizaciju uzorka, monokromatora i/ili polikromatora i detektora. Ovisno o traženoj koncentraciji, tri su tipa tehnika kojima se provodi ispitivanje. Plamena AAS je najjednostavnija tehnika. Plameni atomizator se sastoji od plamenika u koji se uvodi uzorak u obliku raspršenih kapljica poput aerosola. Ovisno o željenoj temperaturi plamena, plamen najnižih temperatura od 1750-1850 °C sastoji od smjese propana kao goriva i zraka kao oksidansa. Plamen koji se sastoji od vodika kao goriva i zraka, postiže temperaturu od 2100 °C, dok se smjesom acetilena i zraka postižu temperature od 2200-2400 °C te se ova smjesa koristi za određivanje većine



elemenata. Plamen najveće temperature, 2700 °C, postiže se smjesom vodika i kisika. Elektrotermalna AAS uključuje proces atomizacije u grafitnoj ćeliji, često se naziva i grafitnom tehnikom (engl. *electrothermal or graphite furnace atomic absorption spectrometry*, ETAAS or GF-AAS). Uzorak se uvodi u grafitnu ćeliju koja se postepeno grije do temperatura pirolize te se tim procesom uklanja i matrica, a time se pospješuje osjetljivost određivanja. Nakon spaljivanja, struja se naglo pojačava što uzrokuje povišenje temperature od 2000-3000 °C te dolazi do atomizacije. Ova tehnika je pogodna kada je analit prisutan u niskim koncentracijama. Tehnika određivanja hladnih para i hidrida je pogodna za hlapive elemente poput žive, arsena, antimona, seleno i olova jer se atomizacija odvija u zatvorenom sustavu u kojem dolazi do reakcija koje omogućuju stvaranje para koje se atomiziraju.<sup>57</sup>

### 2.7.3. *In vitro* oslobađanje lijeka

Oralno uzimanje lijekova je najčešći način konzumiranja lijekova: oko 84 % pedeset najprodavanijih lijekova na tržištu Europske unije i SAD su lijekovi koji se primjenjuju oralnim putem.<sup>41,58</sup> Kada se radi o čvrstim oralnim oblicima, potrebno je poznavati puteve apsorpcije aktivne sastavnice jer apsorpcija aktivne sastavnice u ljudskom organizmu ovisi o dobi pacijenta, gastrointestinalnoj funkciji i o unosu hrane.<sup>46</sup> Praćenje oslobađanja aktivne sastavnice u živom organizmu, *in vivo*, radi se tijekom kliničkih studija na dobrovoljcima, gdje je uzorkovanje izrazito zahtjevno te se radi predikcija *in vivo* oslobađanja, a to je upravo *in vitro* oslobađanje aktivnih sastavnica. Stoga je ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijeka važan parametar u razvoju formulacije i kasnije u kontroli kvalitete farmaceutskog proizvoda.<sup>3,12,40,41,48</sup> Profil oslobađanja aktivnih sastavnica može se definirati kao postotak oslobođenog sadržaj *in vitro* u vremenu oslobađanja, a faktori koji utječu na oslobađanje aktivne sastavnice povezani su sa svojstvima same aktivne sastavnice (topljivost, propusnost i vrijeme oslobađanja), dozirnim oblikom (karakteristike oslobađanja, proces proizvodnje) te metodom oslobađanja aktivne sastavnice (aparatura, metoda, medij za oslobađanje djelatne tvari).<sup>45,46,48,49</sup> Mediji koji se koriste za oslobađanje aktivne sastavnice su propisani u metodama u američkoj farmakopeji, a često znaju sadržavati surfaktante radi bolje topljivosti aktivne sastavnice te sprečavanja rekristalizacije iste u mediju.<sup>23</sup> Korištenje medija sa surfaktantima će pospješiti oslobađanje aktivne sastavnice no istovremeno neće dati dobru korelaciju biološke raspoloživosti jer ovakvi mediji nisu prisutni u ljudskom organizmu.<sup>25</sup>

Posljednjih godina sve veći naglasak stavlja se na usporedbu profila oslobađanja biološki aktivnih sastavnica u različitim medijima. Tako se profili oslobađanja tvari iz čvrstih dozirnih oblika mogu uspoređivati na temelju računanja faktora različitosti ( $f_1$ ) i faktora sličnosti ( $f_2$ ) pri čemu su jednadžbe za izračun sljedeće<sup>59</sup>:

$$f_1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100 \quad (2.2.)$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n |R_t - T_t|^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (2.3.)$$

ili drugačije napisano<sup>60</sup>:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \times 100\% \quad (2.4.)$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n w_t (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (2.5.)$$

pri čemu je  $n$  je ukupni broj uzorkovanja, odnosno vremenskih točaka, a  $R_t$  i  $T_t$  predstavljaju udio sastavnice, odnosno kumulativni postotak u svakoj od odabranih  $n$  vremenskih točaka u referentnom i biorelevantnom mediju.

Treba istaknuti kako je faktor  $f_1$  proporcionalan prosječnoj razlici između dva profila, dok je faktor  $f_2$  obrnuto proporcionalan prosječnoj kvadratnoj razlici između dva profila, s naglaskom na veću razliku među svim vremenskim točkama. Faktor  $f_2$  mjeri bliskost između dva profila. Zbog prirode mjerenja,  $f_1$  opisan je kao faktor različitosti, a  $f_2$  kao faktor sličnosti.<sup>61</sup>

Za dvije identične krivulje odnosno profila oslobađanja faktor sličnosti iznosi 100 %. Prosječna razlika od 10 % u svim izmjerenim vremenskim točkama rezultira  $f_2$  vrijednošću od 50 %. Zbog toga je Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) postavila kriterij da  $f_2$  vrijednosti između 50 - 100 upućuje na sličnost između dva profila oslobađanja.<sup>62</sup>

Četiri su vrste aparatura koje se danas koriste u ispitivanjima čvrstih oralnih farmaceutskih oblika, opisane u trenutno važećim verzijama Američke i Europske farmakopeje (slika 2.10.).<sup>3,45,63</sup>

#### 1) Aparatura tipa 1 (aparatura s košaricom)

Aparatura tipa 1 je prva aparatura koja je bila konstruirana. Staklene posude su uronjene u vodenu kupelj koja održava temperaturu medija u posudi stalnom na  $37 \pm 0,5$  °C. Uzorak se stavlja u košaricu od nehrđajućeg čelika. Košarica se montira na mješač te se uranja u staklenu

posudu sa temperiranim medijem. Analiza započinje trenutkom kada započinje rotacija košarica. Nakon zadanog vremena, uzorak sa oslobođenom aktivnom sastavnicom uzorkuje se iz posuda.

#### 2) Aparatura tipa 2 (aparatura s lopaticom)

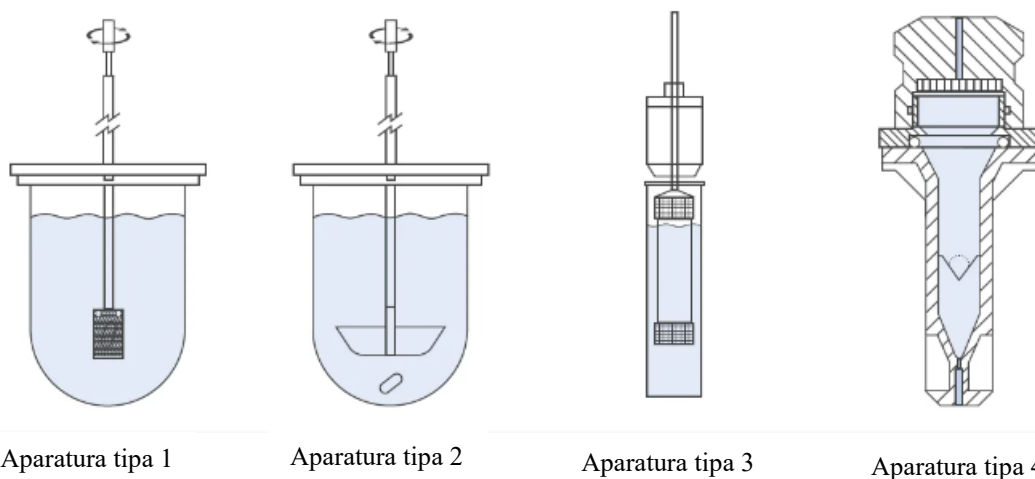
Za razliku od aparature tipa 1, aparatura tipa 2, umjesto košarica, na krajevima mješača ima lopatice. Uzorak se direktno ubacuje u posudu sa medijem.

#### 3) Aparatura tipa 3 (aparatura s uranjajućim cilindrom)

Aparatura 3 ima karakteristične cilindrične staklene posude. Uzorak se unosi u stakleni cilindar koji ima mogućnost pomicanja po vertikalnoj osi i uranjanja u posude s medijem. Pomicanjem cilindra, dolazi do miješanja medija.

#### 4) Aparatura tipa 4 (protočna ćelija)

Kod aparature tipa 4 uzorak se unosi u protočnu ćeliju od inertnog i prozirnog materijala. Pumpanjem medija odozdo prema gore, dolazi do miješanja medija te se time omogućava oslobađanje djelatne tvari.



Slika 2.10. Shematski prikazi aparatura za oslobađanje djelatnih tvari <sup>64</sup>

Aparature tipa 1 i 2 se najčešće koriste zbog svoje jednostavne i robusne izvedbe te su ujedno to i aparature koje su prvi izbor za metodu oslobađanja djelatne tvari. Aparature tipa 3 i

4 su pogodnije za oslobađanje aktivnih sastavnica kada se mijenja sastav ili pH medija za oslobađanje. Prilikom razvoja metode za oslobađanje aktivnih sastavnica mora se uzeti u obzir fizikalno-kemijske karakteristike aktivnih sastavnica (neutralna forma ili u obliku soli bazne djelatne tvari) kao i o samoj veličini čestica. Soli i smanjenje veličine čestica će pospješiti oslobađanje aktivnih sastavnica i njenu bioraspoloživost. Soli baznih sastavnica će imati bolju topljivost u medijima čiji je pH sličan želučanim medijima dok će se neutralni oblik iste aktivne sastavnice bolje oslobađati u medijima čiji je pH sličan crijevnim medijima. Obrnuta situacija se događa za soli slabih kiselina.<sup>45,49</sup>

#### 2.7.4. Tehnike za ispitivanje kakvoće dozirnih oblika

Osim provjere kvalitativnog i kvantitativnog sastava farmaceutskog proizvoda, potrebno je ispitati i fizikalne parametre koji imaju utjecaj sa kvalitetu dozirnog oblika. Ispitivani parametri kakvoće čvrstih dozirnih oblika usko su povezani sa procesom proizvodnje istih, a to posljedično utječe na apsorpciju aktivne sastavnice u ljudskom organizmu. U tu svrhu ispituju se variranja mase dozirnih oblika, gubitak sušenjem, rastrošljivost, raspadljivost, tvrdoća tableta i pucanje mekih kapsula. Svi ovi testovi opisani su u poglavljima važećih verzija Američke i Europske farmakopeje.

#### 2.7.5. Validacija analitičkih metoda

Svaka analitička metoda kojom se kvalitativno i/ili kvantitativno određuju aktivne sastavnice u uzorku zahtjeva potvrdu njene valjanosti odnosno točnosti i pouzdanosti rezultata. Proces nazivamo validacijom analitičke metode, a ona uključuje niz eksperimenata kojima se potvrđuje prikladnost metode za ciljanu namjenu. U ICH (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) smjernicama, kao i u trenutno važećim verzijama Američke i Europske farmakopeje validacije analitičkih metoda su detaljno opisane: od definicija i kriterija do načina izvođenja svakog pojedinog parametra. Validacije metode ispituju sljedeće parametre: specifičnost / selektivnost, linearnost, radno područje, točnost, preciznost, stabilnost otopina i robusnost. Za metode u kojima očekujemo niske koncentracije analita nužno je odrediti granicu određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ) za kvantitativno određivanje, te granicu dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) kod limit test metoda.<sup>65</sup>

**Specifičnost / Selektivnost.** Prvi korak analiziranja aktivne sastavnice je dokazivanje potječe li dobiveni signal uistinu od tražene aktivne sastavnice. Specifičnost je pojam koji opisuje potvrdu analita, dok selektivnost opisuje svojstvo metode da selektivno određuje ciljani analit. Analiziraju se otopine uzoraka, standarda, placebo/matrica, otapala te drugih tvari koje bi mogle utjecati na određivanje analita. Ukoliko se analizaju onečišćenja, analiziraju se sva dostupna onečišćenja i prati njihovo međusobno razdvajanje kao i razdvajanje od aktivnih sastavnica.<sup>65</sup>

**Linearnost / Radno područje.** Metoda kojom se kvantitativno određuje analit mora biti linearna tj. odziv signala mora linearno pratiti koncentraciju analita u otopini standarda. Linearnost metode ispituje se mjerenjem različitih koncentracija otopina analita (najmanje na pet različitih koncentracijskih razina). Ispitivanje se provodi u očekivanom rasponu koncentracija za analit te se ujedno time određuje i radno područje koje mora biti unutar granica linearnosti. Kada je očekivana koncentracija analita niska, radno područje se mora definirati od najniže točke, a to je koncentracija granice određivanja.<sup>65</sup>

**Točnost.** Točnost analitičke metode je sposobnost davanja ispravnih rezultata sa visokom sigurnošću. Prikazuje se kao analitički prinos između izmjerenih rezultata i stvarnih vrijednosti. Obično se provodi na minimalno tri koncentracijska nivoa, a otopine se pripremaju u triplikatu. Na prinos metode veliki utjecaj mogu imati i ostale sastavnice uzorka (pomoćne tvari, matrica) jer mogu djelovati da signal analita bude pojačan ili smanjen u odnosu na stvaran signal. Stoga se ovaj parametar ispituje odvagivanjem analita u placebo / matricu ili dodavanjem poznate koncentracije u uzorak kako bi se što točnije odredio prinos metode.<sup>65</sup>

**Preciznost.** Preciznost je mogućnost metode da ponovljeno generira istovjetne rezultate za isti uzorak neovisno o analitičaru, instrumentu ili laboratoriju. Predstavlja raspršenost mjerenja oko srednje vrijednosti, a ispituje se na tri načina: ponovljivost, intermedijska preciznost i reproducibilnost ili obnovljivost. Ponovljivost se procjenjuje na jednom sustavu, od strane jednog analitičara, u jednom danu ponavljanjem analize uzorka šest puta. Intermedijska preciznost podrazumijeva ponavljanje istog postupka od strane drugog analitičara, na drugom sustavu, drugi dan. Ovom analizom mjeri se utjecaj slučajnih promjena na rezultate, slično kako i kod obnovljivosti koja dodatno podrazumijeva i promjenu laboratorija.<sup>65</sup>

**Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ).** Granica dokazivanja, LOD je koncentracija analita na kojoj se analit može detektirati. Da bi se moglo detektirati

analit, omjer visine njegovog pika i visine bazne linije mora biti veći od 3. Za razliku od LOD, granica određivanja, LOQ je najniža koncentracija analita koju je moguće sa sigurnošću odrediti. Obično se određuje mjerenjem visine pika analita koja mora biti deset puta veća od suma bazne linije (engl. *signal to noise ratio*,  $s/n \geq 10$ ).<sup>65</sup>

**Robusnost.** Robusnost je sposobnost produciranja pouzdanih rezultata obzirom na male, slučajne promjene parametara metode. Parametri koji se ispituju unutar robusnosti ovise o metodi koja se validira, a to su najčešće omjeri vodenog i organskog dijela u pokretnoj otopini, promjene koncentracije soli i pH vodenog dijela u pokretnoj otopini, te temperatura. Rezultati prikupljeni uz promjenu nekog od parametara metode uspoređuju se s rezultatima analize koja nije uključivala promjenu. Često će robusnost sadržavati i informaciju o stabilnost mjernih otopina koja opisuje procjenu dozvoljenog vremena između pripreme uzorka / standardne otopine i vremena ispitivanja. Mjeri se ponovljenom analizom otopina kroz vrijeme i praćenjem razlike odgovora za pojedine analite.

Ponekad se u robusnosti ispituju pojedini segmenti pripreme uzorka koja može utjecati na pouzdanost rezultata. Filter studija ima za cilj pokazati da filteri koji se koriste u metodi ne utječu na rezultate analize. Provodi se filtriranjem uzoraka kroz filter pri čemu se skupljaju frakcije filtrata. Rezultati frakcija se uspoređuju s centrifugiranim dijelom uzorka te izražavaju kao analitički povrat u odnosu na centrifugiranu frakciju. Na sličan način se provode i studije utjecaja vrste miješanja (mućkanje, korištenje ultrazvučne kupelji ili magnetnog miješanja) te vremena otapanja.<sup>65</sup>

## 2.8. Pregled dosadašnjih istraživanja biološki aktivnih sastavnica

Često se u biljnim preparatima nalaze kombinacije više biljnih vrsta zbog njihovog sinergističkog učinka tj. povećanja njihove bioraspoloživosti ili pojačanog farmakodinamskog učinka<sup>16</sup>. Sa aspekta određivanja količine aktivnih komponenti velik značaj imaju metode koje simultano mogu određivati istovremeno različite aktivne sastavnice porijeklom iz više biljnih vrsta. Analitičke metode kojima se određuju aktivne sastavnice mogu se odvojiti na dva dijela – pripremu uzoraka i analitičku metodu za određivanje.

**Priprema uzoraka.** Brusač i suradnici navode da su se uzorci (tableta i kapsula) usitnjeni i homogenizirani, a 25 mg tako pripremljenog uzorka ekstrahirano u 25 mL 81,5% etanolu (v/v). Za pripremu otopine korištena je ultrazvučna kupelj 30 minuta koja se zagrijavana na 60 °C, a pripremljen uzorak potom centrifugiran.<sup>17</sup>

Song i suradnici određivali su oslobađanje kurkumina u različitim biorelevantnim medijima (FaSSIF i FeSSIF). Profil oslobađanja aktivnih sastavnica je uspoređivan za samu aktivnu sastavnicu i za farmaceutsku formulaciju koja je uključivala tehnologiju *lipid/clay-based solid* disperzije tj. otapanje lipofilne aktivne sastavnice u ulju koja se potom miješa sa glinenim česticama. Njihovi rezultati su pokazali da se kurkumin bolje oslobađanja u FeSSIF nego u FaSSIF zbog većeg utjecaja žučnih soli i fosfolipida na stvaranje micela oko lipofilnih čestica čime se pospješuje topljivost. Za razliku od oslobađanja kurkumina kao sastavnice, kurkumin u farmaceutskoj formulaciji bio je u potpunosti oslobođen u FeSSIF i FaSSIF mediju.<sup>23</sup>

Rahman i suradnici uspoređivali su oslobađanje kurkumina u vodi i medijima koji su sadržavali SDS različitih koncentracija. Dobiveni rezultati su pokazali da je dodavanjem SDS kao surfaktatna znatno povećalo topljivost kurkumina. Razlog za povećanje topljivosti kurkumina sa povećanjem koncentracije SDS smanjenje površinske napetosti koja pada sa porastom stvaranja micela.<sup>25</sup>

**Analitičke metode za određivanje biološki aktivnih sastavnica.** Brusač i suradnici su razvili HPLC metodu za simultano određivanje tri kurkuminoida, šest bosveličnih kiselina, tri andrografolida i piperina. Analiza je provedena korištenjem HSS Cyano kolone  $150 \times 3,0$  mm,  $5 \mu\text{m}$  koja je termostatorirana na  $40^\circ\text{C}$ . Pokretne faze po sastavu su  $0,1\%$  v/v mravlja kiselina u vodi i  $0,1\%$  v/v mravlja kiselina u acetonitrilu, a provedeno je samo gradijetna elucija. Detekcija je bila podešena na više valnih duljina i to  $206$  nm (za ABA, BBA, AABA, ABBA i NANADR),  $230$  nm (za ANDR),  $256$  nm (za 14-DANDR, KBA i AKBA),  $340$  nm (za PIP) i  $422$  nm (za BDMC, DMC i CUR). Zbog male osjetljivosti AABA i ABBA na  $206$  nm, za identifikaciju se dodatno koristila detekcija QTOF-om.<sup>17</sup>

Određivanje oslobađanja kurkumina iz farmaceutске formulacije Song i suradnici proveli su UHPLC metodom za koju su koristili Kinetex C18 kolonu, dimenzija  $100 \times 2,1$  mm,  $1,7 \mu\text{m}$  termostatoriranu na  $35^\circ\text{C}$ . Sastav pokretne faze bio je  $0,1\%$  propionska kiselina u acetonitrilu:  $0,1\%$  propionska kiselina u vodi ( $65:35$  v/v), dok je protok bio  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ . Detekcija je bila na valnoj duljini  $425\text{nm}$ , a za određivanje je korištena metoda internog standarda.<sup>23</sup>

Rafi i suradnici proveli su analizu andrografolida u ekstraktima justicije HPLC metodom korištenjem kolone Shimpack VP ODS C18,  $150 \text{ mm} \times 4,6\text{mm}$ . Sastav pokretne faze A bio je smjesa  $0,1\%$  mravlje kiseline u acetonitrilu, a faza B smjesa  $0,2\%$  mravlje kiseline u vodi, pri

tome je provedena gradijentna elucija. Brzina protoka pokretne faze bila je  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , a detekcija je bila na valnoj duljini  $254\text{nm}$ .<sup>29</sup>



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

##### 3.1.1.1. Kemikalije korištene za određivanje metala u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Modifikatori matriksa:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  i  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)

Nitratna kiselina,  $\text{HNO}_3$ , TraceSELECT® Ultra, za analizu elemenata u tragovima, 65 - 71 %, (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska)

Vodikov peroksid,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , TraceSELECT® Ultra, za analizu elemenata u tragovima,  $\geq 30$  %, (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska)

Ultračista voda otpornosti 18,2 M $\Omega$  cm (25 °C) dobivena korištenjem Milipore sustava za pročišćavanje (Bedford, MA, SAD)

##### 3.1.1.2. Kemikalije korištene za ispitivanje profila *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva HPLC metodom

Natrijev dodecilsulfat, SDS,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$ , p.a. čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Mravlja kiselina 98 - 100 %,  $\text{HCOOH}$ , suprapur čistoće, Supelco (Darmstadt, Njemačka)

Acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , HPLC-čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Natrijev klorid,  $\text{NaCl}$ , p.a. čistoće, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , HPLC-čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Klorovodična kiselina 36,5 %,  $\text{HCl}$ , p.a. čistoće, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev hidroksid,  $\text{NaOH}$ , p.a. čistoće, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev dihidrogen fosfat bezvodni,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , p.a. čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , p.a. čistoće, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF – Biorelevant, FFF-0122-B (London, Velika Britanija)

Ultračista voda, dobivena uređajem za ultračistu vodu Sartorius Arium Comfort (Göttingen, Njemačka)

### 3.1.2. Radni standardi

#### 3.1.2.1. Standardne supstance korištene za određivanje metala u dodatcima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Standardna otopina bakra, cinka, kalcija, kalija, magnezija, mangana, natrija i željeza (koncentracija:  $1000 \pm 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Panreac, Barcelona, Španjolska)

GF-AAS smjesa standarda: arsen, antimon, barij, kadmij, kobalt, kositar, krom, molibden, nikal, olovo, selenij i srebro (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)

Standardna otopina žive (koncentracija:  $1000 \pm 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ ) Carlo Erba Reagent S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)

#### 3.1.2.2. Standardne supstance korištene za ispitivanje profila *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari u dodatcima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva HPLC metodom

Kurkumin, skraćeno CUR, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

Demetoksikurkumin, skraćeno DMC, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

Bisdemetoksikurkumin, skraćeno BDMC, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

11-keto- $\beta$ -bosvelična kiselina, skraćeno KBA, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

3-acetil-11-keto- $\beta$ -bosvelična kiselina, skraćeno AKBA, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

$\alpha$ -Bosvelična kiselina, skraćeno ABA, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

$\beta$ -Bosvelična kiselina, skraćeno BBA, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

Andrografolid, skraćeno ANDR, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

Neoandrografolid, skraćeno NAND, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

14-deoksi-11,12-didehidoandrografolid, skraćeno 14-DAND, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

Piperin, skraćeno PIP, (Sigma-Aldrich, Merck St. Louis, MO, SAD)

Od plinova u radu su korišteni:

acetilen, 5.0, Messer (Zaprešić, Hrvatska)

argon, 5.0, Messer (Zaprešić, Hrvatska)

kisik, 5.0, Messer (Zaprešić, Hrvatska)

zrak, 5.0, Messer (Zaprešić, Hrvatska)

Za čišćenje kemijskog posuđa i instrumenata korišteni su:

Nitratna kiselina,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , p.a. čistoće, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev dodecilsulfat, SDS,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$ , p.a. čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Etanol,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , p.a. čistoće, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

### 3.1.3. Uzorci

U ovom radu analizirani su dodatci prehrani (DP) za liječenje upalnih bolesti crijeva formulirani kao gotovi čvrsti oralni dozirni oblici koji sadrže biljne vrste: crni papar, indijski tamjanovac, justiciju i/ili kurkumu. Uzorci su prikupljeni u lokalnim ljekarnama, trgovinama zdravom hranom ili putem internet trgovine. Cilj plana uzorkovanja bio je prikupiti reprezentativnost dostupnih i široko korištenih dodataka prehrani u Republici Hrvatskoj. Ukupno je prikupljeno i analizirano devetnaest uzoraka (DP 1 – DP 19). Prikupljeni uzorci klasificirani su kao monopreparati i multipreparati. Prema toj podjeli monopreparati sadržavali su jednu od navedenih biljnih vrsta, dok su multipreparati sadržavali dvije ili više biljnih vrsta u pojedinačnom dozirnom obliku.

U svrhu obrade prikupljenih rezultata uzorci su razvrstani prema postupcima pripreme biljnih sirovina kao suhi odnosno meki ekstrakt i usitnjena biljna droga. Nadalje, na temelju vrste čvrstog dozirnog oblika podijeljeni su na tablete, tvrde i meke kapsule. Svi prikupljeni uzorci skladišteni su sukladno preporukama proizvođača, označeni i otvoreni neposredno prije analize. Detaljan opis uzoraka prikazan je u tablici 3.1., a izgled uzoraka je prikazan na slici 3.1.

### 3.1.4. Računalni programi

Kromatografski sustav pokretan je računalnim programom LabSolution (Shimadzu, Japan).

Računalni program korišten za provedbu analize atomskom apsorpcijskom spektrometrijom bio je AA WinLab Version 32 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD).

Računalni program korišten za postupak spaljivanja uzoraka mikrovalnom digestijom bio je EasyControl software (Milestone, Sorisole, Italija).

Korišteno je sučelje Windows 10 (Microsoft, Seattle, WA, SAD), a za obradu podataka korišteni su Statistica ver. 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD) i Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD).

Tablica 3.1. Popis uzoraka

Oznaka uzorka	Dozirni oblik	Vrsta uzorka	Djelatne tvari	Pomoćne tvari	Doza	Odvaga deklarirana	Način nabave	Proizvođač	Zemlja porijekla
DP 1	tvrdna kapsula	suhi ekstrakt	ekstrakt kurkume (350 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoida), ekstrakt crnog papra (5 mg, standardiziran na 95 % piperina)	celuloza, magnezijeva sol masnih kiselina	2 kapsule dnevno uz jelo	60 kapsula po 400 mg ukupno 24 g	ljekarna	Hug Your Life	Hrvatska
DP 2	tvrdna kapsula	suhi ekstrakt	smjesa suhog ekstrakta kurkume i ulja korijena kurkume (standardizirano na 95 % kurkuminoida)	biljna celuloza	2 kapsule dnevno	60 kapsula po 500 mg ukupno 30 g	trgovina zdravom hranom	SanGreen	Hrvatska
DP 3	tvrdna kapsula	suhi ekstrakt	ekstrakt kurkume (standardiziran na 95 % kurkuminoida)	celuloza, magnezijev stearat	2 kapsule dnevno	600 mg	ljekarna	LongLife	Italija
DP 4	tvrdna kapsula	suhi ekstrakt	ekstrakt kurkume (528 mg, od kojih 500 mg kurkuminoida), ekstrakt ploda crnog papra (5,3 mg, od kojih 5 mg piperina)	hidroksipropil metil celuloza	1 kapsula dnevno uz jelo	30 kapsula 19 g	ljekarna	NICApur	Austrija
DP 5	tvrdna kapsula	suhi ekstrakt	suhi ekstrakt podanka kurkume (450 mg, standardiziran na min. 95 % kurkuminoida), suhi ekstrakt ploda crnog papra (10 mg, standardiziran na min. 95 % piperina), vitamin B6 (0,7 mg), vitamin B12 (1,25 µg), vitamin D3 (2,5 µg), selen (27,5 µg)	maltodekstrin, celuloza, magnezijeve soli	2 kapsule dnevno uz jelo	60 kapsula 35,22 g	ljekarna	Hug Your Life	Hrvatska
DP 6	tvrdna kapsula	suhi ekstrakt i usitnjena biljna droga	podanak kurkume (500 mg), ekstrakt podanka kurkume (50 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoida)	celuloza, magnezijev stearat, silica	1 kapsula dnevno	66 kapsula 77 g	ljekarna	Jamieson	Kanada
DP 7	tvrdna kapsula	suhi ekstrakt	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (500 mg, standardiziran na min. 65 % bosveličnih kiselina)	celuloza	2 kapsule dnevno	30 kapsula 500 mg	internetska trgovina	Maple Lifesciences	Indija

§ 3. Eksperimentalni dio

34

DP 8	tvrd kapsula	suhi ekstrakt	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (140 mg), ekstrakt balzamovca (140 mg), goveđi kolostrum	celuloza, kolostrum, maltodekstrin, talk, magnezijeve soli	1 kapsula uz obrok	60 kapsula	trgovina zdravom hranom	Farmavita	Hrvatska
DP 9	tvrd kapsula	suhi ekstrakt	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (80 mg, min. 25 % bosveličnih kiselina), glukozamin, hondroitin, vitamin C, hijaluronska kiselina	želatina, talk, magnezijev stearat	2 kapsule dnevno uz obrok	40 kapsula	ljekarna	Hamapharm	Hrvatska
DP 10	tvrd kapsula	suhi ekstrakt	kurkuma (standardizirana na min. 90 % kurkuminoida), indijski tamjanovac (standardiziran na min. 65 % bosveličnih kiselina), plod crnog papra (standardiziran na min. 95 % piperina)	celuloza	1 kapsula dnevno ne na prazni želudac	nije navedeno	internetska trgovina	NutraRoots	Indija
DP 11	tvrd kapsula	suhi ekstrakt	smjesa suhog ekstrakta kurkume i ulja korijena kurkume (250 mg, standardizirano na 95 % kurkuminoida), ekstrakt indijskog tamjanovca (250 mg, standardiziran na 10 % AKBA i 75 % bosveličnih kiselina)	biljna celuloza	2 kapsule dnevno nakon jela	60 kapsula po 500 mg ukupno 30 g	ljekarna	SanGreen	Hrvatska
DP 12	tvrd kapsula	suhi ekstrakt	suhi ekstrakt podanka kurkume (50 mg, standardiziran na min. 95 % kurkuminoida), vitamin C (50 mg), suhi ekstrakt smole indijskog tamjanovca (40 mg, standardiziran na min. 75 % bosveličnih kiselina, od kojih min. 30 % AKBA), hijaluronska kiselina (15 mg), mangan (1 mg), suhi ekstrakt crnog papra (3 mg, standardiziran na min. 95 % piperina), vitamin D3 (2,5 µg)	celuloza, magnezijeve soli, manganove soli, titan dioksid	2 kapsule dnevno za vrijeme obroka	60 kapsula ukupno 58,8 g	ljekarna	Hug Your Life	Hrvatska
DP 13	tvrd kapsula	suhi ekstrakt	ekstrakt kurkume (250 mg, standardiziran na 40 % kurkuminoida), PARACTIN® (150	celuloza, biljni stearat, silica	2 kapsule dnevno	nije navedeno	internetska trgovina	Life Extention	SAD

			mg, patentirana mješavina andrografolida)						
DP 14	tvrda kapsula	suhi ekstrakt	zeleni kurkum (25 mg), ekstrakt korijena kurkume (42 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoida), vitamini C i D, magnezij, selen, cink, ekstrakt ploda bazge, ekstrakt lista masline, prah korijena kudzu biljke, N-acetilcistein, usitnjena lukovica bijelog luka, kvercetin, usitnjeni list origana	celuloza, riža, magnezijev stearat	6 kapsula dnevno uz obrok	nije navedeno	internetska trgovina	Havatsu Nutrition	SAD
DP 15	tvrda kapsula	suhi ekstrakt	mješavina ekstrakata kurkume, justicije i indijskog tamjanovca, piperin, glukozamin, kolagen, hijaluronska kiselina	celuloza, magnezijev stearat	3 kapsule dnevno	nije navedeno	internetska trgovina	Spectra vitamins	SAD
DP 16	meka kapsula	meki ekstrakt	bio-optimizirani ekstrakt kurkume (standardiziran na 42 mg kurkumina)	emulgator, želatina, glicerol, titanov dioksid	8 kapsula dnevno	60 kapsula ukupno 55 g	ljekarna	Flexofytol	Belgija
DP 17	tableta	usitnjena biljna droga	korijen kurkume, plod crnog papra	riža, silicijev dioksid	10 tableta dnevno	300 tableta od 300 mg ukupno 90 g	trgovina zdravom hranom	Bio Primo	Njemačka
DP 18	tableta	suhi ekstrakt	5-LOXIN® AKBA (50 mg), glukozamin, vitamin C, mangan, bor, hijaluronska kiselina	želatina, mangan, bor	2 tablete dnevno uz obrok	40 tableta po 1,68 g ukupno 67,2 g	ljekarna	Rexall Sundown	SAD
DP 19	tableta	suhi ekstrakt	ekstrakt smole indijskog tamjanovca, ekstrakt korijena kurkume, glukozamin, hondroitin, metilsulfonilmetan, fenilalanin, bromelain, kalcij, cink, mangan, bor	hrskavica	2 tablete dnevno na prazni želudac	1584,5 mg	internetska trgovina	Nutraceutical Corp.	SAD



Slika 3.1. Izgled analiziranih uzoraka

### 3.2. Metode

Metode korištene u ovom radu mogu se podijeliti u tri tematske cjeline. Prvu cjelinu čine metode za određivanje kakvoće dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva formuliranih u čvrste dozirne oblike. Kontrola kvalitete dozirnih oblika provedena je temeljem testiranja za čvrste oblike (tablete i kapsule): test variranja mase dozirnog oblika, rastrošljivosti i raspadljivosti tableta, test pucanja mekih tableta i gubitak sušenjem.

Druga cjelina vezana je uz određivanja količine 21 metala u prikupljenim uzorcima primjenom plamene i elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije nakon spaljivanja mikrovalnom digestijom. Udio žive određen je u analizatoru žive, bez prethodne obrade uzorka.

Treću cjelinu čine metode za ispitivanje oslobađanja biološki aktivnih sastavnica iz oralnih dozirnih oblika prikupljenih biljnih pripravaka u različitim biorelevantnim medijima poput medija koji simuliraju stanje sitosti i natašte. Prije postupka oslobađanja navedenih sastavnica određen je njihov udio prethodno razvijenom i validiranom HPLC metodom.

### 3.2.1. Metode za određivanje kakvoće dozirnih oblika

#### 3.2.1.1. Test variranja mase dozirnih oblika

Prvi parametar koji je određen dodatcima prehrani u obliku kapsula (tvrdih i mekih) i tableta je test variranja mase opisan u smjernici Američke farmakopeje USP 43-NF 38, poglavlje „Variranje mase dodataka prehrani”<sup>3</sup>. Ispitivanje je provedeno pomoću analitičke vage s čitljivošću od 0,001 mg (MX5, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska). Dvadeset netaknutih kapsula izvagano je i izračunata je prosječna masa. Uzorak kod kojeg je masa pojedine dozirne jedinice unutar granica od 90 % do 110 % od prosječne mase kapsule zadovoljava zahtjeve Američke farmakopeje. U protokolu za meke kapsule uključeno je pojedinačno vaganje i označavanje intaktnih kapsula. Potom je svaka kapsula otvorena, a sadržaj uklonjen ispiranjem ultra-čistom vodom. Zaostalo otapalo uklonjeno je isparavanjem na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Svaka pojedinačna kapsula izvagana je te izračunat neto sadržaj. Zahtjevi farmakopeje jednaki su onima za tvrde kapsule. Dvadeset cijelih tableta pojedinačno su vagane te izračunata prosječna masa. Zahtjevi farmakopeje za tablete bili su ispunjeni ako se masa ne više od 2 tablete razlikuju od prosječne mase tablete za više od 5 %, 7,5 % odnosno 10 % za tablete prosječne mase manje od 130 mg, od 130 mg do 324 mg, odnosno više od 324 mg. Nijedna tableta nije se razlikovala u masi više nego dvostruko od navedenog postotka.

#### 3.2.1.2. Rastrošljivost tableta

Ispitivanje rastrošljivosti tableta provedeno je prema Američke farmakopeje USP 43-NF 38 smjernicama; poglavlje „Rastrošljivost tableta”<sup>3</sup> korištenjem uređaja PTF 100 (Pharma Test, Hainburg, Njemačka). Za tablete s jediničnom masom jednakom ili manjom od 650 mg, uzet je uzorak cijelih tableta koji je odgovarao masi približno 6,5 g, dok je za tablete s jediničnom masom većom od 650 mg uzeto 10 cijelih tableta. Nakon vaganja uzorak tableta postavljen je u uređaj te su rotirane 100 puta. Nakon toga tablete su izvađene, uklonjena je eventualno zaostala prašina te izvagane. Test je proveden u duplikatu. Zahtjev farmakopeje bio je zadovoljen ukoliko je razlika u masi tableta prije i nakon rotacije manja od 1 %.

#### 3.2.1.3. Raspadljivost dodataka prehrani

Ispitivanje raspadljivosti tableta, tvrdih i mekih kapsula provedeno je korištenjem uređaja raspadljivosti PTZ-S (Pharma Test, Hainburg, Njemačka) i protokola koji je opisan u smjernicama Američke farmakopeje USP 43-NF 38; poglavlje „Raspadljivost i oslobađanje



dodataka prehrani”.<sup>3</sup> Šest tableta / kapsula svakog uzorka stavljeno je u staklene cilindre smještene u košari te su uzorci prekriveni diskom. Ultra-čista voda korištena je kao medij za ispitivanje raspadljivosti tableta odnosno 0,05 mol L<sup>-1</sup> acetatni pufer za tvrde i meke kapsule. Ispitivanje je provedeno na temperaturi od 37 ± 2 °C. Nakon 30 minuta košara je podignuta, a uzorci vizualno ispitani. Prema smjernicama farmakopeje uzorci kod kojih je nastupilo raspadanje svih 6 dozirnih jedinica unutar zadanog vremena odgovaraju propisima.

#### *3.2.1.4. Test pucanja mekih kapsula*

Ispitivanje pucanja mekih kapsula provedeno je sukladno smjernicama poglavlja u farmakopeji, primjenom USP 2 uređaja za ispitivanje oslobađanja LDLT-A10 (Labtron Equipment Ltd., Fleet, UK). Brzina rotacije lopatica iznosila je 50 okretaja u minuti, a kao medij korištena je ultra-čista voda (500 mL) pri temperaturi od 37,0 °C. Prema kriterijima prihvatljivosti, sve testirane mekane kapsule trebale bi puknuti unutar 15 minuta ili ne više od 2 od ukupno 18 testiranih kapsula u više od 15 minuta, ali ne više od 30 minuta.

#### *3.2.1.5. Gubitak sušenjem*

Gubitak sušenjem ispitan je na uzorku tableta i čvrstih kapsula primjenom analizatora vlage DBS-60-3 (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) te protokola opisanog u smjernicama Američke farmakopeje USP 43- NF 38, poglavlje „Gubitak sušenjem”.<sup>3</sup> U cilju osiguravanja homogenosti uzorka, prije određivanja gubitka sušenjem, spojen je sadržaj više pojedinačnih dozirnih oblika jednog uzorka dodatka prehrani. Tako je 20 tvrdih kapsula otvoreno te njihov sadržaj objedinjen i homogeniziran. Dvadeset tableta je usitnjeno u porculanskom tarioniku. Ukratko, usitnjen i homogeniziran uzorak ravnomjerno je raspoređen po aluminijskoj posudici (90 mm) u što tanjem sloju (do debljine od oko 5 mm) te odvagan oko 1,000 g na vagi u sklopu analizatora vlage. Nakon toga, zatvoren je poklopac kako bi analizator vlage automatski počeo sa zagrijavanjem. Halogeni grijač zagrijava i suši uzorak dok integrirana vaga stalno bilježi masu uzorka. Pri temperaturi zagrijavanja od 105 °C provodi se mjerenje do konstantne mase, odnosno dok razlika između dvije izmjerene mase bude manja od 0,5 mg. Nakon toga je zabilježen gubitak mase koji odgovara udjelu hlapljivih tvari. Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

### 3.2.2. Atomska apsorpcijska spektrometrija

#### 3.2.2.1. Spaljivanje uzorka mikrovalnom digestijom

Budući da uzorci dodataka prehrani predstavljaju složenu matricu (aktivne i pomoćne tvari) za određivanje metala, u cilju dobivanja homogene otopine prikladne za određivanje metala plamenom i elektotermičkom tehnikom svi analizirani uzorci prethodno su spaljeni mikrovalnom digestijom u pećnici za mikrovalno spaljivanje uzoraka ETHOS UP (Milestone, Sorisole, Italija).

U teflonsku (PTFE) posudu za mikrovalno spaljivanje odvagano je 0,3 – 0,4 g uzorka na analitičkoj vagi AG245 (Mettler Toledo, Švicarska) te dodano 9 mL HNO<sub>3</sub> (65 - 71 %) TraceSELECT® Ultra (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska) i 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (≥ 30 %) TraceSELECT® Ultra (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska) za analizu elemenata u tragovima. Teflonske posude su zatvorene te proveden program mikrovalne digestije (tablica 3.2.). Nakon spaljivanja i hlađenja, uzorak je kvantitativno prenesen u plastičnu odmjernu tikvicu, nakon čega je slijedio postupak određivanja metala plamenom i elektotermičkom tehnikom.

Tablica 3.2. Program mikrovalne digestije

Korak	Vrijeme	Temperatura (°C)	Snaga (W)
1	00:20:00	200	1800
2	00:10:00	200	1800

#### 3.2.2.2. Atomska apsorpcijska spektrometrija

##### 3.2.2.2.1. Analize metala u dodatcima prehrani tehnikom ETAAS

Elektrotermičkom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (ETAAS), određene su koncentracije arsena, antimona, bakra, barija, kadmija, kobalta, kositara, kroma, molibdena, nikala, olova, selenija i srebra. Kao inertni plin nositelj u svim ETAAS analizama korišten je argon. Kao izvor zračenja za sve metode atomske apsorpcije korištene su pojedinačne lampe za određeni element poput lampe sa šupljom katodom HCL (engl. *Hollow Cathode Lamp*) (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD) i EDL (engl. *Electrodeless Discharge Lamp*) lampe (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD). Za potrebe provedbe analize korišteno je plastično (PVC)

laboratorijsko posuđe. Prikladni laboratorijski pribor i posuđe držani su 24 sata prije upotrebe u 5 % HNO<sub>3</sub>, zatim isprani ultračistom vodom te korišteni u provedbi analize. Ispitivanje je provedeno atomskim apsorpcijskim spektrometrom PinAAcle 900T (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD) uz korištenje THGA (engl. *End-Capped Thga Graphite Tubes*) grafitne kivete (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD). Analitički parametri korišteni za određivanje metala elektrotermičkom tehnikom u dodatcima prehrani koji se koriste kod upalnih bolesti crijeva prikazani su u tablici 3.3.

#### 3.2.2.2.2. Analize metala u dodatcima prehrani plamenom tehnikom

Metodama plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (FAAS), određene su koncentracije: cinka, kalcija, kalija, magnezija, mangana, natrija i željeza. Kao plinovi nositelji u svim analizama plamene tehnike korišteni su acetilen i zrak, a kao izvor zračenja za sve metode atomske apsorpcije korištene su pojedinačne HCL lampe za određeni element. Za potrebe provedbe analize korišteno je borosilikatno stakleno laboratorijsko posuđe. Prikladni laboratorijski pribor i posuđe držani su 24 sata prije upotrebe u 5 % HNO<sub>3</sub>, zatim isprani ultračistom vodom te korišteni u provedbi analize. Ispitivanje je provedeno atomskim apsorpcijskim spektrometrom PinAAcle 900T (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD). U tablici 3.4. prikazani su analitički parametri za određivanje metala plamenom tehnikom u analiziranim uzorcima.

Kalibracija već postojećih metoda provedena je u okviru analize metala plamenom i elektrotermičkom tehnikom<sup>66,67</sup>, te su ispitane validacijske značajke (radno područje, linearnost, granica dokazivanja i određivanja, ponovljivost standarda i uzorka) prema važećim smjernicama<sup>64</sup> koji potvrđuju prikladnost metoda za kvantitativno određivanje 21 metala u uzorcima dodataka prehrani. Koncentracija metala prisutna u ispitivanom uzorku određena je iz kalibracijske krivulje. Za pripremu ovih uzoraka bilo je potrebno spaljivati uzorke mikrovalnom digestijom prema prethodnoj opisanoj proceduri (poglavlje 3.2.2.1.).

Tablica 3.3. Analitički parametri za određivanje metala elektotermičkom tehnikom u dodatcima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Element	Ag	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Sn
Valna duljina / nm	328,07	193,7	553,55	228,80	242,49	357,87	324,75	313,26	232,00	283,31	217,58	196,03	286,33
Otvor pukotine monokromatora / nm	0,7	0,7	0,2	0,7	0,2	0,7	0,7	0,7	0,2	0,7	0,7	2,0	0,7
Lampa	HCL	EDL	HCL	HCL	HCL	HCL	HCL	HCL	HCL	EDL	EDL	EDL	HCL
Struja lampe / mA	10	380	25	4	30	25	15	30	30	440	410	290	20
Tip signala	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG	AA-BG
Način mjerenja	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika	površina pika
Vrijeme mjerenja / s	5	5	5	5	5	5	5	7	5	5	5	5	3
Standard / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0; 1,5; 3,5; 5,0	10; 20; 30; 40	10; 20; 30; 50	0,5; 1,0; 1,5; 2,0	5; 10; 15; 20	2,5; 5,0; 7,5; 10,0	5; 10; 15; 20	5; 10; 15; 20	10; 20; 30; 40	10; 20; 30; 40	10; 20; 30; 40	10; 20; 30; 40	25; 50; 75; 100
Injektirani volumen uzorka / $\mu\text{L}$	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Modifikator matriksa	0,005 mg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> i 0,003 mg MgNO <sub>3</sub>	0,005 mg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> i 0,003 mg MgNO <sub>3</sub>	-	0,05 mg NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> i 0,003 mg MgNO <sub>3</sub>	0,015 mg MgNO <sub>3</sub>	0,015 mg MgNO <sub>3</sub>	0,005 mg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> i 0,003 mg MgNO <sub>3</sub>	-	-	0,05 mg NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> i 0,003 mg MgNO <sub>3</sub>	0,005 mg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> i 0,003 mg MgNO <sub>3</sub>	0,005 mg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> i 0,003 mg MgNO <sub>3</sub>	0,005 mg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> i 0,003 mg MgNO <sub>3</sub>
Volumen modifikatora matriksa / $\mu\text{L}$	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

AA - atomska apsorpcija; BG - pozadinska korekcija

Tablica 3.4. Analitički parametri za određivanje metala plamenom tehnikom u dodatcima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Element	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
Valna duljina / nm	422,67	248,33	404,41	285,21	279,48	589	213,86
Tip plamena	Zrak/ acetilen	Zrak/ acetilen	Zrak/ acetilen	Zrak/ acetilen	Zrak/ acetilen	Zrak/ acetilen	Zrak/ acetilen
Otvor pukotine monokromatora / nm	0,7	0,2	0,7	0,7	0,2	0,2	0,7
Lampa	HCL	HCL	HCL	HCL	HCL	HCL	HCL
Struja lampe / mA	10	30	12	6	20	8	15
Tip signala	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
Način mjerenja	srednje vrijeme	srednje vrijeme	srednje vrijeme	srednje vrijeme	srednje vrijeme	srednje vrijeme	srednje vrijeme
Vrijeme mjerenja / s	5	5	5	5	5	5	5
Standard / mg L <sup>-1</sup>	1,25; 2,5; 5,0	0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0	0; 25; 50; 100	0,063; 0,125; 0,250	0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6	0,125; 0,25; 0,50	0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8

AA - atomska apsorpcija

### 3.2.2.2.3. Analiza žive u dodatcima prehrani primjenom analizatora žive

Ukupni sadržaj žive u dodatcima prehrani određen je korištenjem analizatora žive AMA-254 (Advanced Mercury Analyzer, Leco, Tychy, Češka Republika) bez prethodne pripreme samog uzorka. Napredni analizator žive AMA-254 jednonamjenski je atomski apsorpcijski spektrometar za određivanje tragova žive u različitim čvrstim i tekućim uzorcima bez predobrade uzorka ili ukoncentriravanja. Uzorak izgara u atmosferi bogatoj kisikom (99,5 %), a razvijeni plinovi se zatim transportiraju preko plina nosača kisika kroz specifične katalitičke spojeve koji uklanjaju ometajuće nečistoće poput vlage, pepela, minerala i halogena. Zatim dolaze na keramiku obloženu Au, odnosno amalgamator, koji skuplja živu u paru. Amalgamator se zatim zagrijava do  $\sim 700$  °C tako da dolazi do otpuštanja žive u sustav detekcije, koji sadrži lampu specifična za ovaj element, a emitira svjetlost na valnoj duljini od 253,7 nm. Za kvantifikaciju žive koristi se silikonski UV diodni detektor. Oko 100 mg uzorka odvagano je na analitičkoj vagi AG245 s mogućnošću očitavanja 0,01 mg (Mettler Toledo, Švicarska) te preneseno u posudicu od nikla u analizator žive. Nakon toga je proveden postupak sušenja na 120 °C 60 s te spaljivanja u atmosferi kisika na 650 °C tijekom 150 s. Prije uvođenja sljedećeg uzoraka provedeno je čišćenje sustava u vremenu od 45 s.

Radne otopine za izradu kalibracijskog pravca dobivene su prikladnim razrjeđivanjem standardne otopine žive (koncentracija:  $1000 \pm 0,002$  mg L<sup>-1</sup>) (Carlo Erba Reagent S.A.S., Val de Reuil, Francuska). Radno područje je podijeljeno na dva područja: nisko radno područje od 0,01 – 8 ng sa HS kivetom i visoko radno područje od 8- 200 ng sa HS kivetom.

### 3.2.3. Određivanje udjela biološki aktivnih sastavnica u dodatcima prehrani

#### 3.2.3.1. Postupak ekstrakcije djelatnih tvari

U Falcon epruvetu od 15 mL odvagana je prikladna masa uzorka ( $25 \pm 2$  mg) na analitičkoj vagi XPR226DR (Mettler Toledo, Švicarska) te dodano 10 mL smjese metanol: ultračista voda (80:20, v/v). Potom su uzorci postavljeni u ultrazvučnu kupelj (Elmasonic XtraTT, Elma Schmidbauer, Singen, Njemačka) 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, centrifugiranjem na 3000 g 10 minuta pri 25 °C dobivena je bistra otopina. Prije same analize, supernatant je filtriran kroz Chromafil membranski filter veličine pora 0,45 µm.

### 3.2.4. Određivanje profila *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari u dodatcima prehrani HPLC metodom

#### 3.2.4.1. *In vitro* oslobađanje djelatnih tvari

Studije *in vitro* oslobađanja provedene su prema monografiji za kapsule (1094) (engl. *Capsules—Dissolution Testing and Related Quality Attributes*) iz Američke farmakopeje<sup>3</sup> na aparaturi tipa 2. Oslobađanje aktivne sastavnice provedeno je na aparatu za oslobađanje djelatne tvari 708-DS (Agilent, Santa Clara, CA, SAD). Oslobađanje je provedeno u 900 mL medija za oslobađanje, na  $37 \pm 0,5$  °C uz vrtnju lopatica od 100 okreta po minuti. U svrhu analiziranja profila oslobađanja aktivne sastavnice, otopina je uzorkovana u vremenskim razmacima od 15 minuta i to od 15, 30, 45, 60, 75, 90 i 120 minuta uz nadoknađivanje uzorkovanog volumena. Nakon toga otopina je centrifugirana 10 minuta na 4600 rpm korištenjem centrifuge Rotina 38R (Hettich, Beverly MA, SAD). Bistra otopina prenesena je u tamnu vijalu a količina oslobođenih aktivnih sastavnica određena je HPLC metodom.

#### 3.2.4.2. Analiza biološki aktivnih sastavnica tekućinskom kromatografijom

Za validaciju i analizu uzoraka HPLC metodom korišten je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti HPLC Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan), koji se sastoji od dvije pumpe tip Nexera LC-30AD, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 50 µL tip Nexera SIL-30AC, odjeljka za kolonu tip Prominence CTP-20AC te UV/Vis detektora s nizom dioda (PDA, DAD) tip Prominence SPD-M20A.

Analize su provedene gradijentnim načinom eluiranja koristeći otopinu 0,1 % mravlje kiseline u vodi, kao pokretnu fazu A (M.O. A), i 0,1 % mravlju kiselinu u acetonitrilu, kao pokretnu fazu B (M.O. B), kroz pet segmenta opisanih u tablici 3.5. Protok pokretne faze bio je  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  na nepokretnoj fazi XSelect HSS Cyano (Waters, Milford, MA, SAD),  $150 \times 3,0$  mm, veličine čestica 3,5 µm, termostatiranoj na 40 °C. Volumen injektiranja bio je 5,0 µL termostatiran na 15 °C. Kromatogrami su snimani istovremeno na više valnih duljina: 206 nm, 230 nm, 256 nm, 340 nm i 422 nm. Metoda je validirana prema ICH smjernicama.<sup>65</sup>

Tablica 3.5. Gradijentni program elucije HPLC metode za analizu biološki aktivnih sastavnica

$t / \text{min}$	% M.O. A	% M.O. B
0	70	30
6	60	40
21	30	100
21,5	0	30
30	0	30

### 3.3. Priprema otopina

Za pripremu otopina korištene su analitičke vage Mettler Toledo XP205DR/A i Mettler Toledo XPR2002S (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD) te pH meter Mettler Toledo S220 (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD).

#### 3.3.1. Priprema vodenih otopina i pufera

##### 3.3.1.1. Pripreme pokretnih faza

Pokretne faze A i B pripremljene su za eluiranje biološki aktivnih sastavnica sa nepokretne faze. Sastav pokretne faze A bio je 0,1 % mravlja kiselina otopljena u vodi, a pokretne faze B 0,1 % mravlja kiselina otopljena u acetonitrilu. U svrhu pripreme 1,0 mL mravlje kiseline odpipetirano je u odmjernu tikvicu od 1000 mL koja je potom nadopunjena do oznake ultračistom vodom (za pokretnu fazu A) ili acetonitrilom (za pokretnu fazu B).

##### 3.3.1.2. Pripreme medija za oslobađanje biološki aktivnih sastavnica

Referentni medij za oslobađanje biološki aktivnih sastavnica iz čvrstog dozirnog oblika pripremljen je otapanjem 10 g natrijevog dodecilsulfata (SDS) u odmjernoj tikvici od 1000 mL.

Biorelevantni medij koji simulira sastav želučane tekućine natašte (*engl. Fasted State Stimulated Gastric Fluid, FaSSGF*) pripremljen je otapanjem 1,799 g NaCl i 26,19 g HCl koncentracije  $1 \text{ mol L}^{-1}$  u 810 mL vode. Vrijednosti pH ove otopine iznosila je 1,6 tako da je provjerena i podešena na traženu vrijednost korištenjem  $1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl ili  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH.



Otopina, kojoj je provjeren pH, nadopunjena je vodom do volumena 900 mL. Izvagano je 0,054 g FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF praha koji je otopljen u 900 mL prethodno pripremljene otopine.

Biorelevantni medij koji simulira sastav crijevne tekućine natašte (*engl. Fasted State Stimulated Intestinal Fluid*, FaSSIF) pripremljen je otapanjem 0,378 g NaOH, 3,094 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 5,567 g NaCl. Vrijednosti pH ove otopine iznosila je 6,5 tako da je provjerena i podešena na traženu vrijednost korištenjem 1 mol L<sup>-1</sup> HCl ili 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH. Otopina, kojoj je provjeren pH, nadopunjena je vodom do volumena 900 mL. Izvagano je 2,016 g FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF praha koji je otopljen u 900 mL prethodno napravljane otopine. Gotova otopina pripremljena je najmanje 2 sata prije korištenja.

Biorelevantni medij koji simulira sadržaj crijevne tekućine u stanju sitosti (*engl. Fed State Stimulated Intestinal Fluid*, FaSSIF) pripremljen je otapanjem 3,636 g NaOH, 10,69 g NaCl i 7,785 g octene kiseline. Vrijednost pH ove otopine iznosila je 5,0 te je provjerena i podešena na traženu vrijednost korištenjem 1 mol L<sup>-1</sup> HCl ili 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH. Otopina, kojoj je provjeren pH, nadopunjena je vodom do volumena 900 mL. Izvagano je 10,08 g FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF praha koji je otopljen u 900 mL prethodno napravljane otopine.

### 3.3.2. Priprema otopina standardnih supstanci

#### 3.3.2.1. Priprema otopina standardnih supstanci za određivanje metala

Radne otopine standarda 7 ispitivanih metala plamenom tehnikom pripremljene su razrjeđivanjem standardnih otopina metala (koncentracije 1000 ± 0.002 mg L<sup>-1</sup>) deioniziranom vodom.

Radne otopine standarda 13 ispitivanih metala pripremljene su razrjeđivanjem smjese standarda (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD) deioniziranom vodom.

Modifikatori matriksa pripremljeni su prema propisima u važećoj literaturi proizvođača.<sup>59</sup>

### *3.3.2.2. Priprema otopina standardnih supstanci za ispitivanje profila in vitro oslobađanja djelatnih tvari*

#### *3.3.2.2.1. Osnovna otopina standardnih supstanci (S<sub>1</sub>)*

U prikladnoj količini svaka standardna supstanca pojedinačno je vagana u tamnu bočicu (vijalu) na analitičkoj vagi XPR226DR (Mettler Toledo, Švicarska) i otopljena u 1,0 mL CH<sub>3</sub>OH. Dobivena koncentracija svakog standarda iznosila je 20 µg mL<sup>-1</sup>.

#### *3.3.2.2.2. Standardna otopina (S<sub>2</sub>)*

Od svake osnovne otopine S<sub>1</sub> odpipetiran je određeni volumen u istu odmjernu tikvicu klase A od 10 mL i nadopunjena do oznake 50 % CH<sub>3</sub>OH. Dobivene koncentracije svakog standarda bila su u rasponu 4 - 12 µg mL<sup>-1</sup>.

### *3.3.3. Priprema otopina uzoraka*

#### *3.3.3.1. Priprema otopina uzoraka za određivanje metala*

Uzorci su prije analize razgrađeni predloženom procedurom mikrovalne digestije (poglavlje 3.2.2.1.) te za potrebe analize razrijeđeni u odgovarajućem omjeru deioniziranom vodom. Prilikom određivanja kalcija i magnezija umjesto deionizirane vode korištena je otopina lantanova klorida kako bi se uklonile interferencije.

#### *3.3.3.2. Priprema otopina uzoraka ekstrakta*

Ekstrakti uzoraka pripremljeni su predloženom procedurom ekstrakcije (poglavlje 3.2.3.1.) te za potrebe analize razrijeđeni u odgovarajućem omjeru 80 % MeOH.

#### *3.3.3.3. Otopina uzorka za ispitivanje profila in vitro oslobađanja djelatnih tvari*

Jedinični dozirni oblik tablete/kapsule uronjen je u aparatu za oslobađanje djelatne tvari. Prema prethodno navedenom protokolu, pipetirano je 2,0 mL te otopina i centrifugirano u centrifugi Rotina 38R (Hettich, Beverly MA, SAD) na 4600 rpm 10 minuta. Nakon toga, bistri supernatant prebačen je u tamnu vijalu.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Ispitivanje kvalitete čvrstih dozirnih oblika

Provođenje ispitivanja kvalitete čvrstih dozirnih oblika uključivalo je ispitivanja fizikalnih parametara poput variranje mase, gubitka sušenjem, rastrošljivost, raspadljivost, tvrdoću tableta i pucanja mekih kapsula. Ovisno o vrsti dozirnog oblika provedeno je pojedino ispitivanje u skladu sa zahtjevima Američke farmakopeje.<sup>3</sup> Rezultati ispitivanja tvrdih kapsula, meke kapsule i tableta prikazani su u tablicama 4.1-4.3.

#### 4.1.1. Variranje mase kapsula i tableta

Kako bi se osigurala konzistencija i homogenost dozirnih jedinica, ujednačenost mase važan je korak u kontroli kvalitete dodataka prehrani. Stoga, svi ispitivani čvrsti dozirni oblici (DP 1 – DP 19) karakterizirani su širokim vrijednostima neto mase u rasponu od 400,7 mg (DP 7) – 1191,9 mg (DP 9) za tvrde kapsule, 959,6 mg (DP 16) za meku kapsulu i 294,0 mg (DP 17) – 1958,7 mg (DP 19) za tablete (tablice 4.1. – 4.2.). Smjernice Američke agencije za hranu i lijekove o izradi čvrstih dozirnih oblika<sup>68</sup> navode da veličina tableta i kapsula utječe na suradljivost bolesnika i prihvatljivost režima uzimanja lijekova zbog poteškoća s gutanjem i produljenog vremena prolaza kroz jednjak. Međutim, prosječna neto težina uzoraka dodataka prehrani u obliku jedne tvrde kapsule (DP 9) i dvije tablete (DP 18 i DP 19) prelazi 1000 mg, što može izravno utjecati na sposobnost gutanja pacijenta ovih dodatak prehrani. Neto težina koju je proizvođač označio na deklaraciji gotovog proizvoda istaknuta je u više od polovice ispitivanih uzoraka (68,4 %). Prosječna neto težina uspoređena je s deklariranim vrijednostima, a bila je u širokom rasponu od 71,1 % (DP 6) do 124,2 % (DP1). Štoviše, četiri uzoraka u obliku tvrdih kapsula (DP 1, DP 2, DP 6 i DP 7) i jedan u obliku tablete (DP 19) pokazali su zamjetnu razliku mase od deklariranih vrijednosti (više od 10 %), što ukazuje na upitnu ponovljivost procesa njihove proizvodnje. Ipak, slijedeći zahtjeve studije variranje mase prema farmakopeji, svi ispitani proizvodi bili su unutar navedenog raspona, tako da zadovoljavaju navedene zahtjeve za pojedine dozirne oblike. Osim toga, raspon odstupanja pojedinih dozirnih jedinica od prosječne odvage u pet uzoraka tvrdih kapsula (DP 2, DP 3, DP 4, DP 7, DP 10 i DP 13) iznosio je preko 10 % što upućuje na potrebu za kontrolom kvalitete dodataka prehrani.

Zahtjevi Europske farmakopeje za ujednačenost mase<sup>69</sup> dozvoljavaju odstupanje  $\pm 7,5$  % od srednje mase kapsula (ako je masa punila kapsula veća od 300 mg, odnosno  $\pm 5$  % od srednje vrijednosti mase punila kapsule).

#### *4.1.2. Raspadljivost kapsula i tableta*

Raspadljivost čvrstih dozirnih oblika predstavlja mjeru dezintegracije dozirne jedinice na granule ili mnoštvo sitnih djelića, a da pri tome ne uključuje potpuno otapanje čvrstog oblika i oslobađanje djelatne tvari.

Provedeno je ispitivanje raspadljivosti kako bi se ocijenila sposobnost ispitivanih tableta (DP 17 – DP 19) za razgradnju na manje čestice prekidom međučestičnih veza nastalih tijekom komprimiranja. U slučaju tvrdih i mekih kapsula (DP 1 – DP 16), dezintegracija želatinske i polisaharidne ovojnice kapsule ključni je preduvjet za oslobađanje biljnog materijala iz ovih dozirnih oblika. Kod ispitivanja tvrdih i mekih kapsula svih 6 dozirnih jedinica raspalo se unutar propisanog vremena te su analizirani dodatci prehrani zadovoljili farmakopejski zahtjev za raspadljivost kapsula (tablica 4.1.). Štoviše, za većinu svih ispitivanih uzoraka tableta i kapsula (78,95 %) uočeno je da su se sve ispitivane dozirne jedinice potpuno raspale unutar 15 minuta, a 10,53 % ih se raspalo unutar 30 minuta. Samo jedan uzorak (DP 19, oblik tablete) nije se raspao unutar 30 minuta. Štoviše, nijedna od njegovih analiziranih dozirnih jedinica nije se raspala, čak ni nakon nastavka eksperimenta dodatnih 15 minuta (ukupno vrijeme eksperimenta od 45 minuta). Visoka prosječna masa (1958,7 mg) ovog multipreparatnog proizvoda s visokom vrijednošću sile pri kojoj dolazi do loma tablete (138,2 N) može objasniti opažene negativne rezultate testa raspadljivosti.

#### *4.1.3. Lomljivost tableta*

Ispitivanja tvrdoće i lomljivosti provedena su na tabletama (DP 17 – DP 19) kako bi se procijenio strukturni integritet, mehanička čvrstoća i osjetljivost na lomljenje ispitanih dodatka prehrani, koji su ključni čimbenici tijekom proizvodnje čvrstih oblika, zatim pakiranja, transporta, rukovanja i skladištenja gotovog proizvoda (tablica 4.2.). Prekidna sila bila je u rasponu od 27,7 N do 241,0 N. Očito je da multipreparatni proizvodi (DP 18 i DP 19) s velikim brojem sastavnica (i biljnih ekstrakata i pomoćnih tvari) imaju veću prosječnu neto masu (preko 1617,5 mg), te imaju veliku prekidnu silu (iznad 138,2 N), što implicira da su navedenim proizvodima vjerojatno bili potrebni visoki tlakovi kompresije tijekom procesa tabletiranja.

Dobra kvaliteta konačnog proizvoda dodatka prehrani treba biti definirana ponovljivim vrijednostima prekidne sile. Nažalost, dobiveni rezultati pokazali su raspršene vrijednosti prekidne sile. Razlika između najniže i najviše vrijednosti sile loma iznosila je do 67 N (DP 18), s relativnim standardnim odstupanjima (RSD) do 10,2 %.

#### *4.1.4. Rastrošljivost tableta*

Rastrošljivost tableta smatra se mjerom njihova integriteta. Naime, trenje i udarci kao posljedica njihova pakiranja te transporta najčešći su uzroci lomljenja. Ispitivanje rastrošljivosti provedeno je na način da su tablete podvrgnute rotaciji pri čemu je došlo do udaranja tableta u stijenku bubnja te dodatno međusobnog udaranja tableta. Rezultati ispitivanja izraženi su kao postotak gubitka mase tableta, a sva tri ispitivana uzorka odgovaraju farmakopejskom zahtjevu (tablica 4.2.). Naime, gubitak mase bio je manji od 0,38 %, a potrebno je istaknuti kako tijekom ispitivanja nije došlo do loma dijela ili čitave tablete.

#### *4.1.5. Pucanje mekih kapsula*

Testom pucanja mekih kapsula provjerava se umrežavanje želatine meke kapsule što može biti posljedica dugog stajanja materijala ili neprikladnog skladištenja. Tijekom vremena ovojnica mekih kapsula može gubiti na svojoj kvaliteti što može uzrokovati izlijevanje punila. S druge strane, kako bi došlo do oslobađanja sadržaja kapsule ovojnica ne smije biti prečvrsta. Pucanje mekih kapsula uzorka DP 16 bilo je manje od 45 s tako da je zadovoljen propisani farmakopejski zahtjev (unutar 1 minute).

Tablica 4.1. Ispitivanje fizikalnih parametara dodataka prehrani u obliku tvrdih i mekih kapsula

Uzorak	variranje mase					raspadljivost		
	neto količina / mg	srednja vrijednost mjerenja / mg (n=20)	odstupanje od neto količine / %	raspon odstupanja od srednje vrijednosti / % (n=20)	USP limit / %	USP kriterij	raspadljivost (n=6)	USP kriterij
DP 1	400	496,8	124,2	95,6 – 104,4	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 2	500	601,1	120,2	93,6 – 105,4	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 3	600	600,3	100,1	94,7 – 106,9	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 4	633	649,8	102,6	93,3 – 106,5	90 – 110	zadovoljava	unutar 30 minuta	zadovoljava
DP 5	587	597,8	101,8	95,5 – 104,4	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 6	1167	830,2	71,1	98,6 – 101,6	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 7	500	400,7	80,1	91,1 – 105,5	90 – 110	zadovoljava	unutar 30 minuta	zadovoljava
DP 8	N/D	486,5	N/P	98,3 – 101,7	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 9	N/D	1191,9	N/P	94,6 – 102,9	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 10	N/D	542,7	N/P	94,4 – 107,8	90 – 110	zadovoljava	unutar 30 minuta	zadovoljava
DP 11	500	597,7	95,6	95,6 – 105,2	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 12	980	985,8	96,7	96,7 – 105,2	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 13	N/D	606,0	N/P	94,8 – 105,9	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 14	N/D	995,0	N/P	97,4 – 101,8	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 15	N/D	814,6	N/P	97,5 – 101,6	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava
DP 16	916,7	959,6	104,7	95,4 – 102,7	90 – 110	zadovoljava	unutar 15 minuta	zadovoljava

N/D nije navedena deklarirana masa na pakiranju; N/P nije primjenjivo; n – broj mjerenja

Tablica 4.2. Ispitivanje fizikalnih parametara dodataka prehrani u obliku tableta

Fizikalni parametar	DP 17	DP 18	DP 19
<i>variranje mase</i>			
neto količina / mg	300	1680	1584,5
srednja vrijednost mjerenja / mg (n=20)	294,0	1617,5	1958,7
odstupanje od neto količine / %	98,0	96,3	123,6
raspon odstupanja od srednje vrijednosti / % (n=20)	95,0 – 107,7	97,9 – 103,8	98,8 – 101,0
RSD / %	< 7,70	< 2,10	< 1,19
USP limit / %	7,5	5	5
USP kriterij	zadovoljava (1 tableta odstupa > 7,5 %, dozvoljeno 2 tablete)	zadovoljava	zadovoljava
<i>raspadljivost</i> (n=6)	unutar 5 minuta	unutar 25 minuta	nijedna unutar 30 minuta
USP kriterij	zadovoljava	zadovoljava	nezadovoljava
<i>rastrušljivost</i> / % (n=3)	0,14 – 0,38	≤ 0,01	0,10 – 0,28
USP kriterij	zadovoljava	zadovoljava	zadovoljava
<i>lomljivost tableta</i> / N (n=10)	27,7	241,0	138,2
RSD / %	6,5	10,2	7,2

RSD – relativna standardna devijacija; SD – standardna devijacija; n – broj mjerenja

#### 4.1.6. Gubitak sušenjem kapsula i tableta

Gubitak sušenjem, jedan je od parametara koji može ukazati na prisustvo neženjenih sastavnica u dodacima prehrani, izražava se kao maseni udio,  $w$  ( $m/m$ ) u %. U farmakopejskim predloženim monografijama pojedinih biljnih vrsta definiran je limit (%) za biljne droge i suhe ekstrakte. Također je potrebno istaknuti da se maksimalni dopušteni gubitak sušenjem razlikuje ukoliko se radi o usitnjenoj biljnoj drogi ili suhom ekstraktu droge. Prema farmakopeji suhi ekstrakti dobivaju se iz usitnjene droge ekstrakcijom s prikladnim otapalom (isopropanol, etanol, metanol, heksan, aceton i drugi). Nakon ekstrakcije korištena otapala se uklanjaju te stoga i dopuštene vrijednosti gubitka sušenjem trebaju biti niže u odnosu na usitnjene biljne

droge. Ukoliko dodatak prehrani sadrži dijelove više biljnih vrsta ili su istovremeno prisutni suhi ekstrakt i biljna droga tada se u ispitivanju primjenjuje stroži kriterij.

Udio hlapljivih tvari u čvrstim dozirnim oblicima koji sadrže indijski tamjanovac, justiciju, kurkumu i crni papar određen je prema farmakopejskom propisu <731> (engl. *Loss on Drying*).<sup>3</sup> Gubitak sušenjem određen je za dozirne oblike tablete i tvrde kapsule, dok se kod uzoraka mekih kapsula navedeni parametar ne ispituje. U monografijama za ekstrakte i biljne droge ovih biljnih vrsta naveden je maksimalno dopušteni gubitak sušenjem, limit (%) za suhi ekstrakt (kurkuma 7 %, indijski tamjanovac 5 %, crni papar 2 %) i biljne droge (kurkuma i justicija 10 %, indijski tamjanovac 12 %). S druge strane, u monografijama za tablete i kapsule koje sadrže ove biljne vrste nema navedenog maksimalnog dopuštenog gubitka sušenjem.

Tablica 4.3. sadrži popis uzoraka koji su razvrstani prema vrsti pripravka (suhi ekstrakt ili biljna droga), eksperimentalno utvrđeni gubitak sušenjem, maksimalno dopušteni gubitak sušenjem za pojedinu biljnu vrstu odnosno njen pripravak (biljna droga ili suhi ekstrakt) prema farmakopejskim monografijama. Utvrđen je gubitak sušenjem do 34,67 % (DP 12) za dodatke prehrani u obliku tvrdih kapsula, odnosno do 12,04 % (DP 18) za tablete (tablica 4.3.). Zanimljivo je istaknuti kako visoke vrijednosti gubitka sušenjem uzoraka DP 12 i DP 18 mogu biti povezane s velikim količinama hijaluronske kiseline u tim uzorcima. Ispitivani dodatci prehrani pokazali su značajno variranje u količini vlage u trostrukom uzorkovanju i analizi tri uzorka (RSD vrijednosti su bile do 15,25 %). Iz dobivenih rezultata vidljiv je gubitak sušenjem u više od 20 % svih uzoraka (ukupno 4 uzorka), dva uzorka tvrdih kapsula (DP 12 i DP 15) i tableta (DP 18 i DP 19), koji nije bio unutar navedenih granica propisanih farmakopejom.

Svi ispitivani uzorci zadovoljili su zadane kriterije za parametre variranja mase, rastrošljivosti i test pucanja mekih kapsula. Jedan uzorak tableta nije zadovoljio zahtjeve za raspadljivost čvrstog dozirnog oblika. Testom tvrdoće uočeno je da multipreparantni uzorci ispitivanih dodataka prehrani imaju veću tvrdoću od monopreparatnih.



Tablica 4.3. Gubitak sušenjem ( $w$ , %) u čvrstim dozirnim oblicima i usporedba dobivenog prema USP propisu s limitima definiranim u monografijama pojedinog biljnog pripravka.

Uzorak	Vrsta uzorka	Biljna vrsta	$w_1$ / %	$w_2$ / %	Srednja vrijednost	SD	RSD / %	USP limit / % <sup>1</sup>	Odstupanje <sup>2</sup>
tvrde kapsule									
DP 1 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, crni papar	1,30	1,39	1,35	0,06	4,73	2	-0,66
DP 2	suhi ekstrakt	kurkuma	1,49	1,20	1,35	0,21	15,25	7	-5,66
DP 3	suhi ekstrakt	kurkuma	2,00	1,80	1,90	0,14	7,44	7	-5,10
DP 4 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, crni papar	1,09	1,00	1,05	0,06	6,09	2	-0,96
DP 5 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, crni papar	1,49	1,39	1,44	0,07	4,91	2	-0,56
DP 6	suhi ekstrakt	kurkuma	5,71	5,08	5,40	0,45	8,26	7	-1,61
DP 7	suhi ekstrakt	indijski tamjanovac	3,58	3,48	3,53	0,07	2,00	5	-1,47
DP 8	suhi ekstrakt	indijski tamjanovac	3,87	3,87	3,87	0,00	0,00	5	-1,13
DP 9	suhi ekstrakt	indijski tamjanovac	2,69	2,29	2,49	0,28	11,36	5	-2,51
DP 10 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, indijski tamjanovac, crni papar	3,98	3,98	3,98	0,00	0,00	5	-1,02
DP 11 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, indijski tamjanovac, crni papar	1,49	1,39	1,44	0,07	4,91	2	-0,56
DP 12 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, indijski tamjanovac, crni papar	34,73	34,60	<b>34,67</b>	0,09	0,27	5	<b>29,67</b>
DP 13 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, justicija	3,60	3,08	3,34	0,37	11,01	7	-3,66
DP 14 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, justicija	4,00	3,60	3,80	0,28	7,44	7	-3,20
DP 15 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, indijski tamjanovac, justicija, crni papar	4,98	5,23	5,11	0,18	3,46	5	<b>0,11</b>
meke kapsule									
DP 16	meki ekstrakt	kurkuma	N/A						
tablete									
DP 17 <sup>3</sup>	biljna droga	kurkuma, crni papar	6,53	5,87	6,20	0,47	7,53	10	-3,80
DP 18	suhi ekstrakt	indijski tamjanovac	12,06	12,01	<b>12,04</b>	0,04	0,29	5	<b>7,04</b>
DP 19 <sup>3</sup>	suhi ekstrakt	kurkuma, indijski tamjanovac	7,16	7,08	7,12	0,06	0,79	5	<b>2,12</b>

<sup>1</sup> USP limit je naveden sukladno monografiji pojedine biljne vrste odnosno njegovog pripravka (suhi ekstrakt ili biljna droga). <sup>2</sup> Odstupanje je iskazano kao razlika između limita definiranog USP propisom te eksperimentalno dobivene vrijednosti. <sup>3</sup> Uzorak sadrži više biljnih vrsta te je gubitak sušenjem uspoređen s dozvoljenim gubitkom sušenjem navedenim u propisu odnosno monografiji s najstrožim kriterijem. <sup>4</sup> Podebljano su označena ona odstupanja koja ne zadovoljavaju USP propis.

## 4.2. Određivanje udjela metala u uzorcima

### 4.2.1. Validacije metoda za određivanje prisutnosti i koncentracije metala

Udjeli metala u dodatcima prehrani određen je primjenom plamene (FAAS) i elektrotermičke (ETAAS) tehnike dok je udio ukupne živa određen na analizatoru žive. Plamenom tehnikom određeni su metali čija je očekivana koncentracija bila u visokom koncentracijskom radnom području (izražena u  $\text{mg L}^{-1}$ ), dok se ETAAS tehnika koristila za određivanje metala u niskom koncentracijskom radnom području (izražena u  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Provedena je revalidacija već postojećih metoda<sup>66</sup> te su ispitane validacijske značajke (radno područje, linearnost, granica dokazivanja i određivanja, ponovljivost standarda i uzorka) koji potvrđuju prikladnost metoda za kvantitativno određivanje 21 metala u uzorcima dodataka prehrani (tablice 4.4. i 4.5.). Pri tome je granica dokazivanja (LOD) i određivanja (LOQ) za svaki analit određena uzastopnim mjerenjem ( $n=20$ ) slijepe probe te izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija mjerenja. Trostruka vrijednost standardne devijacije uzeta je kao LOD, a deseterostruka vrijednost standardne devijacije kao LOQ.

Prije provedbe analize, u uzorcima je provedena mineralizacija procedurom mikrovalne digestije (poglavlje 3.2.2.1.). Koncentracija metala prisutna u uzorku dodatka prehrani određena je iz kalibracijske krivulje.

Određivanje žive provedeno je na analizatoru žive, atomskom apsorpcijskom spektrometaru dizajniranom za određivanje sadržaja ukupne žive, bez obzira na oblik u kojem se živa pojavljuje. Živa se lako oslobađa iz svojih spojeva (organskih i anorganskih) pretvaranjem u atomski oblik. Ovo određivanje živu čini jednostavnim i brzim te nije potrebno koristiti atomski apsorpcijski spektrometar s priključkom za generator hidrida. Još jedna prednost je što se proces pirolitičke mineralizacije odvija unutar uređaja i nije potrebno koristiti mineralizator za označavanje živom.

Udio Hg određen je zasebnim uređajem za analizu Hg kojem je radno područje definirao proizvođač, te svojim kvalifikacijskim testovima potvrđuje linearnost. Radno područje se dijelilo na nisko radno područje (0,01 – 8 ng sa HS kivetom) i visoko radno područje (8 – 200 ng sa HS kivetom). Granice dokazivanja (LOD) i granice određivanja (LOQ) eksperimentalno su određene uzastopnim analiziranjem slijepe probe te su vrijednosti LOD i LOQ određene kao

trostruka standardna devijacija slijepe probe, odnosno 10 puta standardna devijacija slijepe probe.

Tablica 4.4. Značajke validacije za određivanje metala u dodatcima prehrani tehnikom ETAAS

Metal	Radno područje / $\mu\text{g L}^{-1}$	Kalibracijska krivulja (n=5)	Koeficijent korelacije	LOD / $\mu\text{g L}^{-1}$ a (n=10)	LOQ / $\mu\text{g L}^{-1}$ a (n=10)	LOD / $\mu\text{g kg}^{-1}$ b (n=10)	LOQ / $\mu\text{g kg}^{-1}$ b (n=10)
Ag	0 – 5	$y = 0,04948 * x - 0,00182$	0,9992	0,060	0,200	0,75	2,50
As	0 – 40	$y = 0,00527 * x - 0,00029$	0,9999	0,500	1,660	12,50	41,50
Ba	0 – 50	$y = 0,0026 * x - 0,00076$	0,9997	2,000	6,000	50,00	150,00
Cd	0 – 2	$y = 0,09304 * x - 0,00084$	0,9993	0,024	0,080	0,60	2,00
Co	0 – 20	$y = 0,00741 * x - 0,00033$	0,9991	0,190	0,620	4,75	15,50
Cr	0 – 10	$y = 0,02878 * x - 0,00503$	0,9993	0,015	0,050	0,38	1,25
Cu	0 – 20	$y = 0,00781 * x - 0,00066$	0,9998	0,300	1,000	7,50	25,00
Mo	0 – 20	$y = 0,00447 * x + 0,00033$	0,9997	0,300	1,000	7,50	25,00
Ni	0 – 40	$y = 0,00580 * x - 0,00096$	0,9996	0,300	1,000	7,50	25,00
Pb	0 – 40	$y = 0,00410 * x - 0,00074$	0,9996	0,086	0,280	2,10	7,00
Sb	0 – 40	$y = 0,00185 * x - 0,00012$	0,9996	0,300	1,000	7,50	25,00
Se	0 – 40	$y = 0,00386 * x + 0,00108$	0,9999	0,300	1,000	7,50	25,00
Sn	0 – 100	$y = 0,00098 * x + 0,00112$	0,9995	0,900	3,000	22,50	75,00

<sup>a</sup> na temelju odgovarajuće slijepe probe (n = 20)

<sup>b</sup> na temelju odvage 0,400 g uzorka (n = 20)

Tablica 4.5. Značajke validacije za određivanje metala u dodatcima prehrani FAAS tehnikom

Metal	Radno područje / mg L <sup>-1</sup>	Kalibracijska krivulja (n=5)	Koeficijent korelacije	LOD / mg L <sup>-1</sup> <sup>a</sup> (n=10)	LOQ / mg L <sup>-1</sup> <sup>a</sup> (n=10)	LOD / mg L <sup>-1</sup> <sup>b</sup> (n=10)	LOQ / mg L <sup>-1</sup> <sup>b</sup> (n=10)
Ca	1,25 – 5,0	$y = 0,07484 * x - 0,00063$	0,9998	0,005	0,015	0,375	0,125
Fe	0,1 – 1,0	$y = 0,09841 * x - 0,00159$	0,9990	0,250	0,075	0,003	0,010
K	25 – 100	$y = 0,00435 * x + 0,00148$	0,9997	0,200	1,000	5,00	25,00
Mg	0,063 – 0,250	$y = 2,40998 * x + 0,01415$	0,9990	0,003	0,010	0,250	0,075
Mn	0,05 – 0,60	$y = 0,25404 * x - 0,00219$	0,9998	0,250	0,075	0,003	0,010
Na	0,125 – 0,5	$y = 12024,187 * x + 95,109$	0,9990	0,005	0,015	0,375	0,125
Zn	0,05 – 0,80	$y = 0,82304 * x - 0,00118$	0,9991	0,150	0,050	0,002	0,006

<sup>a</sup> na temelju odgovarajuće slijepe probe (n = 20)

<sup>b</sup> na temelju odvage 0,400 g uzorka (n = 20)

#### 4.2.2. Udio metala u dodatcima prehrani

Rezultati mjerenih koncentracija metala u analiziranim uzorcima dodataka prehrani prikazani su u tablici 4.6. Udio metala Ba, Cu, Cr, K, Na, Ca, Mg, Mn, Fe i Zn određen je u svim analiziranim uzorcima tako da je njihova učestalost u dodatcima prehrani 100 %.

Makroelementi, K, Na, Ca i Mg, potrebni su u većim količinama svim živim bićima za normalan rast, razvoj, odnosno fiziološke procese. Dobiveni rezultati ova četiri makroelementa bili su u širokom rasponu, pri čemu je K najzastupljeniji mineral, a zatim Ca, Na i Mg. Osim porijeklom iz biljke, navedeni metali, u obliku soli, često su zastupljeni u formuliranim dodatcima prehrani kao pomoćne tvari odnosno mješavina kalcijevog / magnezijevog oksida s masnim kiselinama kao što su stearinska i palmitinska kiselina poput magnezijeva stearata i kalcijeva stearata. Ove soli se koriste u formulacijama oralnih lijekova kao ekscipijensi. Na temelju dostupne literature dokazana je njihova iznimno niska toksičnost, a još jedna od velikih prednosti je da se radi o tvari koja ne nadražuje. Magnezijev stearat općenito je siguran za konzumaciju, ali u visokim dozama može imati laksativni učinak. Američka agencija za hranu i lijekove odobrila je magnezijev stearat kao siguran proizvod i dopušta njegovu upotrebu kao aditiva u hrani i dodatcima. Prema uputama Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*) siguran je za upotrebu u malim

količinama, odnosno preporučuje se manje od 2500 mg kg<sup>-1</sup> dnevno. Sve vrijednosti u analiziranim uzorcima su ispod navedene vrijednosti.

Kad se promatra podjelu uzoraka prema dozirnom obliku zanimljivo je za istaknuti kako je sadržaj K, Na, Ca, Mg značajno manji u mekim kapsulama, farmaceutskom obliku izrađenom od mekog ekstrakta. Treba istaknuti kako je najveća prednost ove vrste kapsula, zbog čega su i postale popularne u proizvodnji biljnih pripravaka, potreba za manjim količinama ekscipijensa nego u tabletama. Osim toga, meke želatinske kapsule danas se uglavnom koriste za tvari topljive u mastima. Zanimljivo je istaknuti da je sadržaj Ag, Co, Cd, Hg, Ni, Sb, Se i Sn u ispitivanoj mekoj kapsuli bio ispod vrijednosti LOQ (tablica 4.4.).

Elementi u tragovima, minerali potrebni organizmu u niskim količinama, važni su za njegov rast i razvoj (željezo, cink, bakar, itd.). Tako željezo ima važnu ulogu u proizvodnji eritrocita i odgovorno je za reverzibilno vezanje kisika u hemoglobinu. Učestalost anemije uzrokovane nedostatkom željeza (IDA, engl. *Iron Deficiency Anemia*) i povezanog umora visoka je u bolesnika s upalnim bolestima crijeva, a prevalencija je zabilježena u 36 % do 76 % bolesnika.<sup>70</sup> Etiološki čimbenici anemije kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva uključuju neadekvatan unos, kronični gubitak krvi uzrokovan ulceracijama sluznice i anemija kronične upale koja je posljedica oštećenja transepitelne apsorpcije željeza u crijevima. Potonje je povezano s povećanjem jetrenog hepcidina izazvanog interleukinom-6, koji se veže na ferroportin na enterocitima (također monocitima i makrofagima) i dovodi do njegove internalizacije i lizosomalne degradacije, što rezultira intracelularnom sekvestracijom željeza. Oralna nadoknada željeza primarni je način prevencije deficijencije željeza, sekundarnog gubitka krvi ili neadekvatnog unosa, s dostupnim višestrukim i jednako učinkovitim oblicima željeza. Najčešće korišteni oblici su željezo fumarat, željezo sulfat i željezo glukonat, koji sadrže 33 %, 20 %, odnosno 12 % elementarnog željeza, a često se kombiniraju s vitaminom C radi poboljšanja apsorpcije. Za pacijente s upalnim bolestima crijeva, Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*) preporučuje 30 mg po danu elementarnog željeza za profilaksu anemije i 50 do 60 mg po danu za liječenje. Međutim, oralna suplementacija kod upalnih bolesti crijeva može biti neučinkovita u uvjetima kronične upale normocitne anemije. Koncentracija željeza u ispitivanim uzorcima kretala se u dosta širokom rasponu (5,33 mg kg<sup>-1</sup> (DP 1) – 1303,79 mg kg<sup>-1</sup> (DP 9)), a u dva uzorka tvrdih kapsula vrijednost je iznosila iznad 1000 mg kg<sup>-1</sup>.

Cink je esencijalni mineral koji igra ključnu ulogu u mnogim aspektima staničnog metabolizma, kao što je katalitička aktivnost približno 100 enzima, modulacija imunološke funkcije, sinteza proteina, zacjeljivanje rana, sinteza DNK, dioba stanica i poboljšanje funkcije crijevne barijere. Procjena statusa cinka u pacijenata nije jednostavna jer nema mehanizme skladištenja i značajno varira s unosom. Imajući to na umu, procijenjeno je da 15 % pacijenata s upalnim bolestima crijeva pati od nedostatka cinka. Nedavna studija<sup>71</sup> pokazala je da je nedostatak cinka u bolesnika s Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom povezan s lošim kliničkim ishodima: povećan rizik od naknadnih hospitalizacija, operacija i komplikacija povezanih s bolešću.<sup>72</sup> Prema dostupnoj stručnoj i znanstvenoj literaturi ovi ishodi poboljšavaju se normalizacijom cinka te se predlože redovito praćenje cinka i prema potrebi njegov nadomjestak u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Trenutačna preporučana dnevna količina je 11 mg/dan i 8 mg/dan elementarnog cinka za pacijente i pacijentice, no veće doze su preporučene ili korištene kod pacijenata sa upalnim bolestima crijeva.<sup>73</sup> Kronični proljev povezan s upalnim bolestima crijeva dodatna je indikacija za nadomjestak cinka. Međutim, visoke doze i dugotrajne dodatke cinka treba koristiti s oprezom. Gornja granica (najveći dnevni unos iznad kojeg se mogu pojaviti nuspojave ili toksičnost) za ovaj mineral je postavljena na 40 mg/dan, a cink može ometati apsorpciju željeza i bakra, pogoršavajući njihove potencijalne nedostatke. Zauzvrat, suplementacija kalcijem ili folatom može smanjiti apsorpciju cinka. Dva najčešća oblika suplementa su cink sulfat (23 % elementarnog cinka) i cink glukonat (13 % elementarnog cinka).

Od svih ispitivanih elemenata u tragovima, najniža incidencija utvrđena je za Se (5,26 %). Ovaj element nalazi se u tlu, a njegovi prirodni izvor su voda i hrana (orasi, žitarice, govedina, perad, riba poput tune, bakalara). Selen u malim količinama ima značajnu ulogu u metabolizmu, a pozornost je posebno privukao zbog antioksidativnog učinka i zaštite stanica od oštećenja. Budući da većina ljudi može unijeti preporučene doze selena hranom (20 – 70 µg/dan), kod zdravih ljudi nedostatak selena nije čest, dok su niske razine selena uočene u nekim stanjima i bolestima poput Crohnove bolesti, intravenozne prehrane bolesnika. Zbog toga se ovim bolesnicima ponekad predlaže korištenje dodatka prehrani selena. Sadržaj selena utvrđen je samo u jednom uzorku kapsule (DP 5: 26,53 µg g<sup>-1</sup>; suhi ekstrakt; multipreparat kurkume, papara i drugi mikronutrijenti). Zanimljivo je napomenuti da je sadržaj selena deklariran kao sastojak dodatka prehrani u uzorku kapsule (u obliku natrijevog selenita;

deklarirani sadržaj 27,5 µg). S druge strane, Se je deklariran u jednoj tvrdoj kapsuli (DP 14), ali je njegov sadržaj bio ispod LOQ (tablica 4.5.).

Tablica 4.7. prikazuje ukupnu količinu metala u jediničnom obliku doziranja. Unos je procijenjen na temelju mase tablete i preporučene dnevne doze za svaki dodatak prehrani. Ove informacije korisne su za procjenu kvalitete formuliranih dodataka prehrani. Analizirani uzorci pokazali su širok raspon sadržaja metala po jedinici formulacije, a posebno se ističu Ba i Cu.

Treba istaknuti kako je koncentracija bakara kvantificirana u svim analiziranim uzorcima (0,46 – 22,16 µg g<sup>-1</sup>). Bakar je esencijalni mineral u tragovima, nalazi se u svim tjelesnim tkivima i igra ulogu u stvaranju crvenih krvnih stanica te održavanju živčanih stanica i imunološkog sustava. Pomaže u održavanju zdravih kostiju, krvnih žila, živaca i funkcioniranju imunološkog sustava te pridonosi apsorpciji željeza. Bakar se nalazi u raznim namirnicama. Dobri izvori uključuju kamenice i druge školjke, cjelovite žitarice, grah, krumpir, crni papar, orašasto voće, poput indijskih oraščića i badema. Većina voća i povrća ima malo bakra, ali on je prisutan u cjelovitim žitaricama i dodaje se nekim žitaricama za doručak i drugoj obogaćenoj hrani. Nedostatak bakra je rijedak osim u specifičnim stanjima, kao što je Menkesova bolest. Dodatci bakra obično nisu potrebni i mogu dovesti do neravnoteže. Neravnoteža bakra povezana je s Alzheimerovom bolešću.<sup>74</sup>

Kobalt je neophodan u ljudskom tijelu jer je sastavni dio vitamina B12 i djeluje kao koenzim za nekoliko enzima ključnih u sintezi hemoglobina i prevenciji perniciozne anemije. Prosječna osoba unosi oko 11 µg Co/dan u prehrani. Preporučeni unos vitamina B12 u prehrani kreće se od 0,7 do 2,4 µg/dan, što odgovara 0,03 do 0,1 µg kobalta.<sup>74</sup> Kobalt, kao sastavnica cijanokobalmina, deklariran je u 11 uzorka. Najveća vrijednost izmjerena je u uzorku DP 9 (0,57 µg g<sup>-1</sup>), na kojem ovaj metal nije deklariran. S druge strane, najveći sadržaj Cr, također, je određen u uzorku kapsule DP 9 (5,22 µg g<sup>-1</sup>). U svim ostalim analiziranim uzorcima sadržaj Cr bio je ispod 5 µg g<sup>-1</sup>.

Prema smjernicama ICH, na temelju toksičnosti, definirane su vrijednosti dopuštenog dnevnog izlaganja (engl. *permitted daily exposure*, PDE) za metale i podijeljene su u 4 skupine. Teški metali kao što su arsen, kadmij, olovo i živa smatraju se neesencijalnim metalima jer nemaju nikakvu vitalnu biološku funkciju u ljudskom organizmu. Teški metali u lijekovima i dodatcima prehrani mogu biti prisutni kao onečišćenja porijeklom iz različitih izvora.

Promatrajući klasu 1, skupinu teških metala, utvrđena je visoka učestalost Pb (89,47 %) i Hg (94,74 %). Koncentracija Pb utvrđena je u svim oblicima doziranja, a samo u dva uzorka

bio je ispod LOQ ( $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Nadalje, manja učestalost (5,26 %) zabilježena je kod As, a koncentracija ovog teškog metala detektiran je u samo jednom uzorku mekih kapsula ( $0,058 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Većina hrane sadrži tragove srebra u rasponu od 10-100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Srebro nutritivno nije esencijalno i nije poznata nikakva metabolička funkcija.<sup>74</sup> Koncentracija srebra je detektirana u četiri uzorka, do maksimalne vrijednosti  $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ , dok je u uzorcima tableta bila ispod LOQ (tablica 4.6.). Primjena preparata srebra u medicini sve je popularnija poput antibakterijski učinak preparata srebra kod oftalmoloških bolesti. Većina pripravaka srebra klinički se koristi za lokalnu primjenu.

Nikal je jedan od minerala koji je potreban ljudskom organizmu u vrlo malim količinama. Nalazi se u nekoliko namirnica uključujući orašaste plodove, sušeni grah i grašak, soju, žitarice i čokoladu. Njegove točne funkcije u tijelu nisu poznate, ali se koristi za povećanje apsorpcije željeza, u sprječavanju razvoja nekih vrsta anemije te liječenje osteoporoze. Dnevni unos nikla kreće se od 100-300  $\mu\text{g/dan}$ .<sup>74</sup> Najviša koncentracija ovog elementa utvrđen je u uzorku kapsule (DP 9:  $3,86 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Kada se promatraju dobiveni rezultati, u pet uzoraka tvrdih kapsula koncentracija ovog elementa u tragovima iznosio je više od  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ , a u svim ostalim uzorcima ispod navedene vrijednosti.

Maksimalna koncentracija svih elementarnih onečišćenja identificiranih u procjeni rizika može se izraziti pomoću PDE.<sup>74</sup> Prema smjernicama ICH Q3D, elementi u grupi 3 imaju relativno nisku toksičnost oralnim putem poput Ba, Mo, Sn i Sb.

Tako netopljivi spojevi barija, kao što je barijev sulfat, ne stvaraju slobodne  $\text{Ba}^{2+}$  ione u gastrointestinalnom traktu i stoga općenito nisu toksični za ljude. Barij nije nutritivno značajan element i nije poznata njegova metabolička funkcija. Koncentracija Ba u jednom uzorku tablete bila je iznad  $100 \mu\text{g g}^{-1}$ , četiri uzorka tvrdih kapsula u rasponu od 10 –  $40 \mu\text{g g}^{-1}$ , a u svim ostalim uzorcima ispod  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Molibden je važan element u tragovima s procijenjenim gornjim rasponom unosa od 100-600  $\mu\text{g/dan}$  za dojenčad odnosno odrasle osobe. Nedostatak molibdena karakterizira noćno sljepilo, mučnina, dezorijentacija, koma, tahikardija i tahipneja i povezan je s raznim biokemijskim abnormalnostima uključujući visoku razinu metionina u plazmi.<sup>74</sup> Sadržaj Mo široko je zastupljen u povrću, mliječnim proizvodima i mesu<sup>73</sup>, dok se u analiziranim dodatcima prehrani kretao u uskom rasponu (svi uzorci ispod  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ).



Incidencija Sb i Sn u analiziranim uzorcima bila je 26,32 % odnosno 31,58 %, a sve detektirane vrijednosti bile su ispod  $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ . Kositar je prisutan u nekim multivitaminskim i mineralnim dodacima prehrani (u razinama do  $10 \mu\text{g Sn}$  u jednoj tableti). Ova se procjena sigurnosti usredotočuje na anorganski kositar s obzirom na to da je češća pojava anorganskog kositra relevantnija u pogledu metalnih onečišćenja u proizvodima lijekova nego organskih spojeva kositra.<sup>74</sup>

Prema smjernicama ICH Q3D, makroelementi, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn i Zn, klasificirani su kao ostala skupina elemenata (Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, W i Zn). U ovoj skupini neka elementarna onečišćenja za koje PDE nisu utvrđene zbog niske toksičnosti i/ili razlika u regionalnim propisima nisu obrađena u ovoj smjernici (tablica 4.7.).

Tablica 4.6. Koncentracija minerala i teških metala u dodatcima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Metal	Incidencija / %	Srednja vrijednost	Median	Kvantificirani raspon	Interkvartilni raspon
Ag/ $\mu\text{g g}^{-1}$	21,05 (4)	0,01	0,01	0,00 – 0,03	0,00 – 0,02
As/ $\mu\text{g g}^{-1}$	5,26 (1)	0,06	–	–	–
Ba/ $\mu\text{g g}^{-1}$	100,00 (19)	16,62	5,05	2,12 – 138,30	2,60 – 15,73
Cd/ $\mu\text{g g}^{-1}$	57,89 (11)	0,04	0,03	0,005 – 0,08	0,02 – 0,05
Co/ $\mu\text{g g}^{-1}$	57,89 (11)	0,15	0,09	0,02 – 0,57	0,04 – 0,25
Cr/ $\mu\text{g g}^{-1}$	100,00 (19)	1,44	0,80	0,05 – 5,22	0,36 – 2,22
Cu/ $\mu\text{g g}^{-1}$	100,00 (19)	3,22	1,53	0,46 – 22,16	0,85 – 3,92
Hg/ $\mu\text{g g}^{-1}$	94,74 (18)	3,991	0,561	0,063 – 64,320	0,204 – 2,394
Mo/ $\mu\text{g g}^{-1}$	89,47 (17)	0,11	0,09	0,02 – 0,34	0,05 – 0,16
Ni/ $\mu\text{g g}^{-1}$	89,47 (17)	0,88	0,60	0,06 – 3,86	0,17 – 1,35
Pb/ $\mu\text{g g}^{-1}$	89,47 (17)	0,53	0,10	0,03 – 1,97	0,05 – 1,01
Sb/ $\mu\text{g g}^{-1}$	26,32 (5)	0,11	0,08	0,03 – 0,29	0,04 – 0,19
Se/ $\mu\text{g g}^{-1}$	5,26 (1)	26,53	–	–	–
Sn/ $\mu\text{g g}^{-1}$	31,58 (6)	0,29	0,22	0,11 – 0,60	0,14 – 0,47
Na/mg $\text{kg}^{-1}$	100,00 (19)	444,05	158,80	35,38 – 2062,88	84,67 – 589,07
K/mg $\text{kg}^{-1}$	100,00 (19)	7998,44	694,57	29,37 – 35175,85	51,16 – 12494,07
Ca/mg $\text{kg}^{-1}$	100,00 (19)	1595,58	191,42	31,24 – 8814,15	123,30 – 1463,18
Mg/mg $\text{kg}^{-1}$	100,00 (19)	461,06	390,68	15,82 – 971,18	264,17 – 784,81
Mn/mg $\text{kg}^{-1}$	100,00 (19)	155,13	7,91	0,43 – 1687,31	1,78 – 40,09
Fe/mg $\text{kg}^{-1}$	100,00 (19)	236,41	94,82	5,33 – 1303,79	10,04 – 183,45
Zn/mg $\text{kg}^{-1}$	100,00 (19)	165,04	44,31	0,08 – 1386,79	15,89 – 207,69

Tablica 4.7. Ukupna koncentracija metala po jediničnom dozirnom obliku i dopuštena dnevna izloženost elementarnim onečišćenjima prema ICH smjernici Q3D (R1).

Metal	Oralna PDE <sup>a</sup> µg/dan	Ukupna količina metala po dozirnoj jedinici / µg		ICH kriterij / (broj uzoraka)
		Srednja vrijednost	Raspon	
Klasa 1				
As	15	0,445		zadovoljava / (19)
Cd	5	0,092	0,003 – 0,321	zadovoljava / (19)
Hg	30	2,460 <sup>c</sup>	0,053 <sup>c</sup> – 15,265 <sup>c</sup>	zadovoljava / (19)
Pb	5	0,881	0,021 – 4,730	zadovoljava / (19)
Klasa 2A				
Co	50	0,299	0,020 – 1,367	zadovoljava / (19)
Ni	200	1,478	0,041 – 9,197	zadovoljava / (19)
Klasa 2B				
Ag	150	0,021	0,002 – 0,068	zadovoljava / (19)
Se	150	31,717		zadovoljava / (19)
Klasa 3				
Ba	1400	40,252	1,598 – 406,476	zadovoljava / (19)
Cr	1100	2,372	0,178 – 12,438	zadovoljava / (19)
Cu	3000	6,738	0,382 – 52,826	zadovoljava / (19)
Mo	3000	0,194	0,020 – 0,531	zadovoljava / (19)
Sb	1200	0,215	0,053 – 0,693	zadovoljava / (19)
Sn	6000	0,446	0,062 – 1,427	zadovoljava / (19)
Ostali elementi				
Ca	N/A <sup>d</sup>			N/A
Fe	N/A			N/A
K	N/A			N/A
Mg	N/A			N/A
Mn	N/A			N/A
Zn	N/A			N/A

<sup>a</sup>PDE = Dopuštena dnevna izloženost (engl. *Permitted Daily Exposure*);

<sup>b</sup>ICH = The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

<sup>c</sup>Hg = vrijednosti izražene u ng;

<sup>d</sup>N/A = nije primjenjivo

## 4.2.2.1. Korelacija

Jedan od ciljeva ovog rada bio je ispitati korelaciju udjela metala u analiziranim uzorcima dodataka prehrani za liječenje upalne bolesti crijeva. Statističke analize pokazale su značajne korelacije između metala, a izdvojne su prikazane u tablici 4.8.

Tablica 4.8. Izdvojena korelacijska tablica koja prikazuje statistički značajne povezanosti ( $p < 0.01$ ) između analiziranih metala u istraživanim dodatcima prehrani za liječenje IBD-a.

Metal	Metal	r	p
Zn	Mn	0,9241	< 0,0001
Cu	Ag	0,9191	< 0,0001
Fe	Co	0,9078	< 0,0001
Ni	Cr	0,9064	< 0,0001
Sb	Ag	0,8904	< 0,0001
Cu	Co	0,8850	< 0,0001
Sn	Fe	0,8428	< 0,0001
Sb	Sn	0,8329	< 0,0001
Sb	Fe	0,8291	< 0,0001
Cu	Sb	0,8268	< 0,0001
Sb	Co	0,8201	< 0,0001
Sb	Ni	0,8065	< 0,0001
Ag	Co	0,8004	< 0,0001
Ag	Ni	0,7975	< 0,0001
Fe	Ag	0,7968	< 0,0001
Ni	Co	0,7887	< 0,0001
Cu	Ni	0,7868	< 0,0001
Cu	Fe	0,7782	< 0,0001
Sn	Ag	0,7750	< 0,0001
Sn	Co	0,7741	0,0001
Sn	Pb	0,7732	0,0001
Fe	Ni	0,7514	0,0002
Cu	Sn	0,7230	0,0005
Co	Cr	0,7190	0,0005
K	Cd	0,7094	0,0007
Cu	Cr	0,6992	0,0009

### 4.3. *In vitro* oslobađanje biološki aktivnih sastavnica u biorelevantnim medijima

#### 4.3.1. Validacija metode za određivanje oslobađanja biološki aktivnih sastavnica u biorelevantnim medijima

Validacija metode za određivanje biološki aktivnih sastavnica oslobođenih u biorelevantnim medijima uključivala je provjeru parametara selektivnosti / specifičnosti (slika 4.1.), granica radnog područja, linearnost (kao kalibracijska krivulja i koeficijent korelacije), LOD i LOQ (tablica 4.9.), preciznosti / ponovljivosti i točnosti (tablica 4.10.).

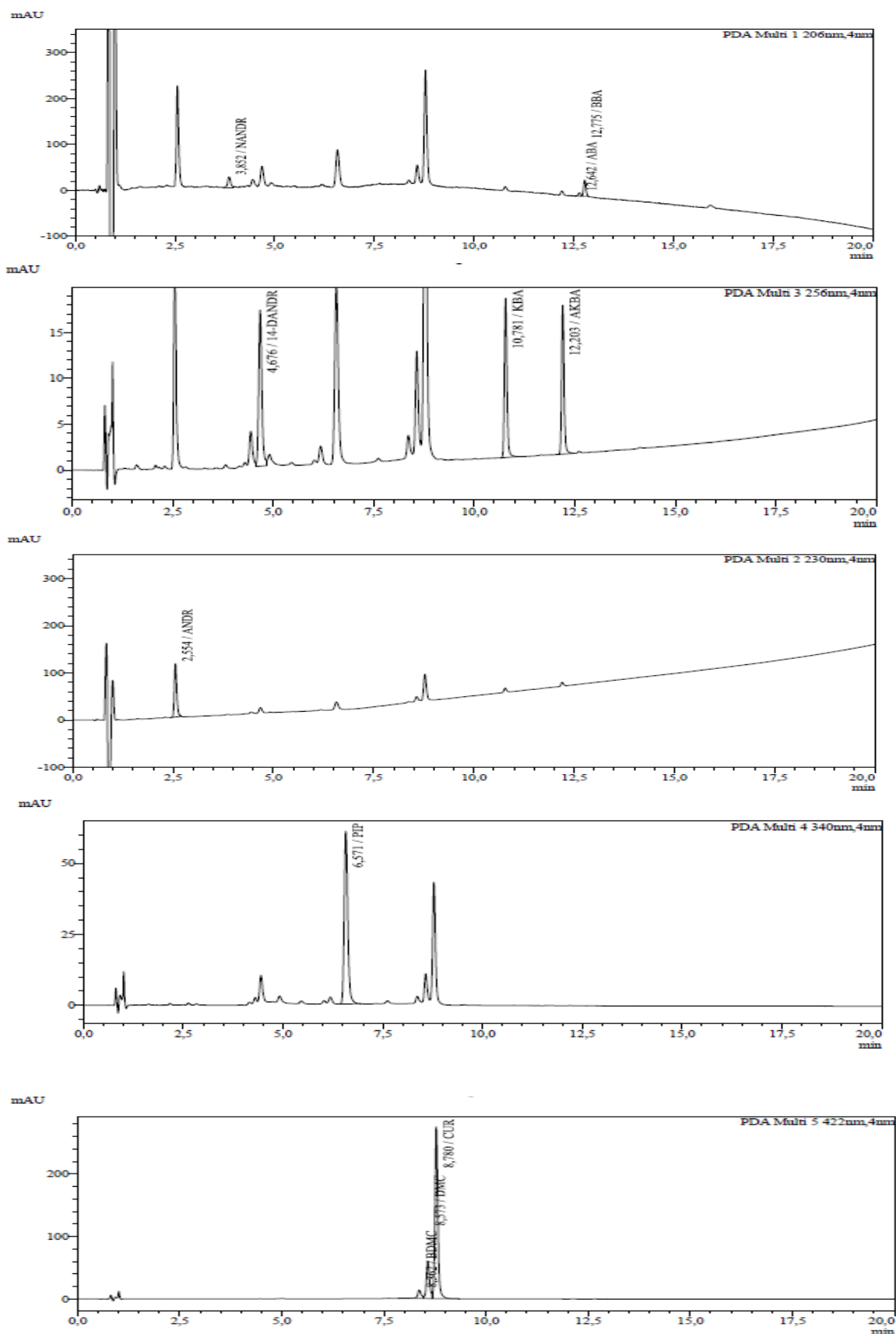
Selektivnost / specifičnost je potvrđena uspoređivanjem retencijskih vremena svake pojedine aktivne sastavnice u standardnoj otopini sa onima standardnim otopinama gdje su bile prisutne samo pojedine aktivne sastavnice. Budući da je metoda uključivala istovremeno snimanje na više valnih duljina, selektivnost / specifičnost je time bila dodatno potvrđena. Pikovi PIP, CUR, BDMC i DMC bili su jasno vidljivi na svim pet valnih duljina (206 nm, 230 nm, 256 nm, 340 nm i 422 nm) i njihov odaziv je bio dovoljno jasan da bi se mogli kvantificirati na svim valnim duljinama. ANDR i 14-DANDR su vidljivi na tri valne duljine (206 nm, 230 nm, 256 nm), dok je NADR samo na jednoj (206 nm). KBA i AKBA su vidljive na tri valne duljine (206 nm, 230 nm, 256 nm) ali je njihov odaziv na 256 nm puno veći nego na ostale dvije. ABA i BBA imaju slab odaziv na 206 nm. Odabir valne duljine nije bio isključivo na temelju intenziteta odgovora pojedine aktivne sastavnice, već i na predikciji o potencijalnim ostalim sastavnicama u biljnim pripravcima koje bi mogle interferirati sa određivanim aktivnim sastavnicama.

Linearnost je ispitana u širokom koncentracijskom području za sve aktivne sastavnice. Za BBA, ANDR, NADR i 14-DANDR dobiven je jedan kalibracijski pravac, dok je za ostale aktivne sastavnice bilo potrebno kreirati dva kalibracijska pravca ovisno o koncentracijskom području. Tako je koncentracija aktivne sastavnice određena iz kalibracijskog pravca nižeg ili višeg radnog područja ovisno o vrijednosti površine ispod pika. Svi dobiveni pravci su zadovoljili kriterij koeficijenta korelacije koji je morao biti veći od 0,99, a ujedno je time definirano i radno područje metode.

Određene koncentracije LOD i LOQ su zadovoljile kriterije odnosa visine signala (pika) i šuma bazne linije (S/N) koji mora biti veći od 3 za LOD i veći od 10 za LOQ.

Tablica 4.9. Značajke validacije za određivanje biološki aktivnih sastavnica oslobođenih u biološki relevantnim medijima (radno područje, linearnost, LOD i LOQ)

Biološka aktivna sastavnica	RT / min	Radno područje / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Kalibracijska krivulja (n=5)	Koeficijent korelacije	LOD / $\mu\text{g mL}^{-1}$	LOQ / $\mu\text{g mL}^{-1}$
CUR	7,876	0,8 – 8,0	$y=19158*x - 1141,4$	0,9985	0,595	1,804
		20,0 – 200,0	$y = 25650*x - 127937$	0,9996		
DMC	7,590	0,5 – 5,0	$y = 46294*x - 2522,4$	0,9996	0,135	0,409
		5,0 – 50,0	$y = 62942*x - 117378$	0,9980		
BDMC	7,295	0,8 – 5,0	$y = 25,569*x - 1,1513$	0,9985	0,257	0,780
		10,0 – 50,0	$y = 33939*x - 64726$	0,9996		
PIP	5,624	0,6 – 5,0	$y = 25680*x - 1158,3$	0,9992	0,191	0,579
		6,0 – 10,0	$y = 27669*x - 17503$	0,9997		
KBA	10,729	0,8 – 2,0	$y = 7337,6*x + 62,05$	0,9995	0,111	0,336
		2,5 – 20,0	$y = 6877,5*x + 245,27$	0,9996		
AKBA	11,752	0,5 – 5,0	$y = 4561,1*x - 349,75$	0,9994	0,157	0,476
		5,0 – 50,0	$y = 5073,7*x - 4906,9$	0,9998		
ABA	12,227	6,0 – 40,0	$y = 3387,8*x - 2969,7$	0,9993	1,966	5,985
		20,0 – 200,0	$y = 4188,5*x - 27502$	0,9999		
BBA	12,368	8,0 – 100,0	$y = 4065*x - 9378,9$	0,9997	2,008	6,086
ANDR	2,200	15,0 – 200,0	$y = 4663,9*x - 11535$	0,9998	4,147	12,567
NANDR	3,225	1,0 – 50,0	$y = 10021*x - 8712,4$	0,9992	1,493	4,526
14-DANDR	4,398	5,0 – 50,0	$y = 7997,3*x + 849,22$	0,9998	1,270	3,848



Slika 4.1. Kromatogrami potvrde selektivnosti / specifičnosti snimljen na pet valnih duljina (206 nm, 230 nm, 256 nm, 340 nm i 422 nm)

Preciznost je potvrđena provjerom ponovljivosti, odnosno višestrukim injektiranjima višestruko pripremljenih standardnih otopina iste koncentracije. Nisu bili dostupni pojedinačni standardi DMC i BDMC već su oni bili prisutni u standardu CUR kao njegove sastavnice. Odstupanje faktora odaziva detektora, koji predstavlja odnos koncentracije aktivne sastavnice i odziva detektora (kao površina ili visina signala) svake aktivne sastavnice bilo je manje od 5,0 % za PIP, KBA, AKBA, BBA, ANDR, NANDR i 14-DANDR, dok je za ostale aktivne sastavnice bio manji od 6,0 %. Provedenom deskriptivnom analizom podataka, dokazalo se da su rezultati svih aktivnih sastavnica unutar pravilne raspodjele.

Tablica 4.10. Značajke validacije za određivanje biološki aktivnih sastavnica oslobođenih u biološki relevantnim medijima (preciznost, točnost)

Biološka aktivna sastavnica	Ponovljivost (preciznost) (n=12)		Točnost (n=12)		
	$c / \mu\text{g mL}^{-1}$	RSD / %	Analitički prinos / %	RSD / %	P (p > 0,05)
CUR	50,25	5,7	106,0	5,7	0,777
DMC	50,25	5,5	106,5	5,8	0,831
BDMC	50,25	5,1	108,7	7,7	0,593
PIP	10,33	2,7	95,7	5,2	0,702
KBA	5,37	3,8	101,0	2,5	0,948
AKBA	11,42	3,6	99,0	3,0	0,979
ABA	50,75	5,8	109,2 <sup>a</sup>	6,8	0,658
BBA	49,6	3,2	96,6 <sup>b</sup>	5,7	0,790
ANDR	52,75	0,7	101,8 <sup>a</sup>	2,8	0,957
NANDR	9,96	1,1	100,3	3,4	0,941
14-DANDR	13,0	3,3	101,4	2,3	0,994

<sup>a</sup>-n=8

<sup>b</sup>-n=10

Analitički prinos određen je kao srednja vrijednost između analitičkog prinosa na tri različite koncentracije, pri čemu su za svaku koncentracijsku razinu pripremljene dvije



standardne otopine koje su višestruko injektirane. Za sve aktivne sastavnice analitički prinos bio je unutar (95 – 110) %, a RSD manji od 10,0 %. Za provjeru istog provedena je ANOVA kojom je dokazano da nema značajne razlike između rezultata.

#### 4.3.2. Udio biološki aktivnih sastavica u dodatcima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Određen je udio glavnih biološki aktivnih sastavnica kurkuminoida, andrografolida i bosveličnih kiselina te piperina u analiziranim dodatcima prehrani.

Na temelju dobivenih rezultata najzastupljenija skupina su kurkuminoidi. Iz skupine kurkuminoida, analizirani su glavni predstavnici i to kurkumin (CUR), demetoksikurkumin (DMC) i bisdemetoksikurkumin (BDMC). Za ove biološki aktivne sastavnice karakteristična je niska topljivost u vodi, u kiselim i neutralnim pH uvjetima te slaba stabilnost<sup>75</sup> tako da su uzorci ekstrahirali 80 % metanolom. Treba istaknuti iako su kurkuminoidi topljivi u alkalnim uvjetima, ovi spojevi brzo prolaze kroz hidrolitičku razgradnju u navedenim uvjetima.<sup>76</sup>

Udio ovih biološki aktivnih tvari varirao je u širokom rasponu (1,99 - 1146,43) mg g<sup>-1</sup> za CUM (srednja vrijednost: 434,98 mg g<sup>-1</sup>), dok su uži rasponi bili za DMC (do 16,98 mg g<sup>-1</sup>) i BDMC (do 11,26 mg g<sup>-1</sup>).

Dostupna stručna i znanstvena literatura sadrži brojne dokaze o širokom spektru izrazite biološke aktivnosti kurkumina, ali i analoga kurkumina. Tako je demetoksikurkumin (DMC) najbolji inhibitor tumorskih stanica MCF-7, dok je bisdemetoksikurkumin (BDMC) aktivan za modulaciju ekspresija gena MDR-1.<sup>77</sup> Zbog toga je procijenjen udio analiziranih biološki aktivnih sastavnica po jediničnom obliku te je redoslijed zastupljenosti ostao isti (srednja vrijednost: 265,25 mg za CUR, 5,47 mg za DMC i 2,84 mg za BDMC) iako je masa jediničnog oblika značajno varirala.

Ekstrakt crnog papra je posebno dodan u cilju povećanja oralne bioraspoloživost kurkuminoida u pojedinim dodatcima prehrani. Koncentracija piperina, glavne sastavnice dodanog ekstrakta, kretala se do 17,72 mg g<sup>-1</sup> uz srednju vrijednost 8,60 mg g<sup>-1</sup>.

Dodatci prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva često sadrže aktivne sastavnice skupine andrografolida. Andrografolid (ANDRO) i 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid (14-DANDR) glavni su diterpenoidi ekstrakta justicije dobivenog iz nadzemnih dijelova ove biljke nakon postupka izolacije 95 % alkoholom.<sup>78,79</sup> U ovom radu koncentracija ANDRO kvantificirana je u rasponu (2,66 – 348,69) mg g<sup>-1</sup> (srednja vrijednost 175,67 mg g<sup>-1</sup>), dok je 14-DANDR određen u samo jednom uzorku 4,61 mg g<sup>-1</sup> (sadržaj u jednoj tableti 2,79 mg).

Značajan doprinos u liječenju upalnih bolesti crijeva imaju bosvelične kiseline, pentacikličke terpenoidne molekule prirodnog ekstrakta smole dobivene iz kore drveta indijskog tamjanovca. Od ovih biološki aktivnih sastavnica, farmakološki je najaktivnija 3-acetil-11-keto-beta-bosvelična kiselina (AKBA). U analiziranim dodatcima prehrani udio AKBA kretao se u rasponu (0,70 – 35,35) mg g<sup>-1</sup> (srednja vrijednost 10,30 mg g<sup>-1</sup>) dok je udio KBA bio nešto niži (0,09 – 12,74) mg g<sup>-1</sup>; srednja vrijednost 3,37 mg g<sup>-1</sup>). Najveća masa AKBA u jednoj kapsuli iznosila je 21,13 mg, dok je kod KBA masa u jednom obliku iznosila 6,20 mg.

#### 4.3.3. *In vitro* profil oslobađanja biološki aktivnih sastavnica u dodatcima prehrani

Ispitivanje *in vitro* oslobađanja biološki aktivnih tvari iz 19 formuliranih biljnih dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva, najprije je provedeno prema farmakopejskoj preporučenoj metodi<sup>3</sup> opisanoj u poglavlju o biljnim lijekovima (eng. *Herbal Medicines Compendium*). Uzimanje uzorka provedeno je uz konstantan interval uzorkovanja u vremenskim točkama 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 i 120 minuta, a dobiveni rezultati prikazani na slikama 4.2.—4.14.

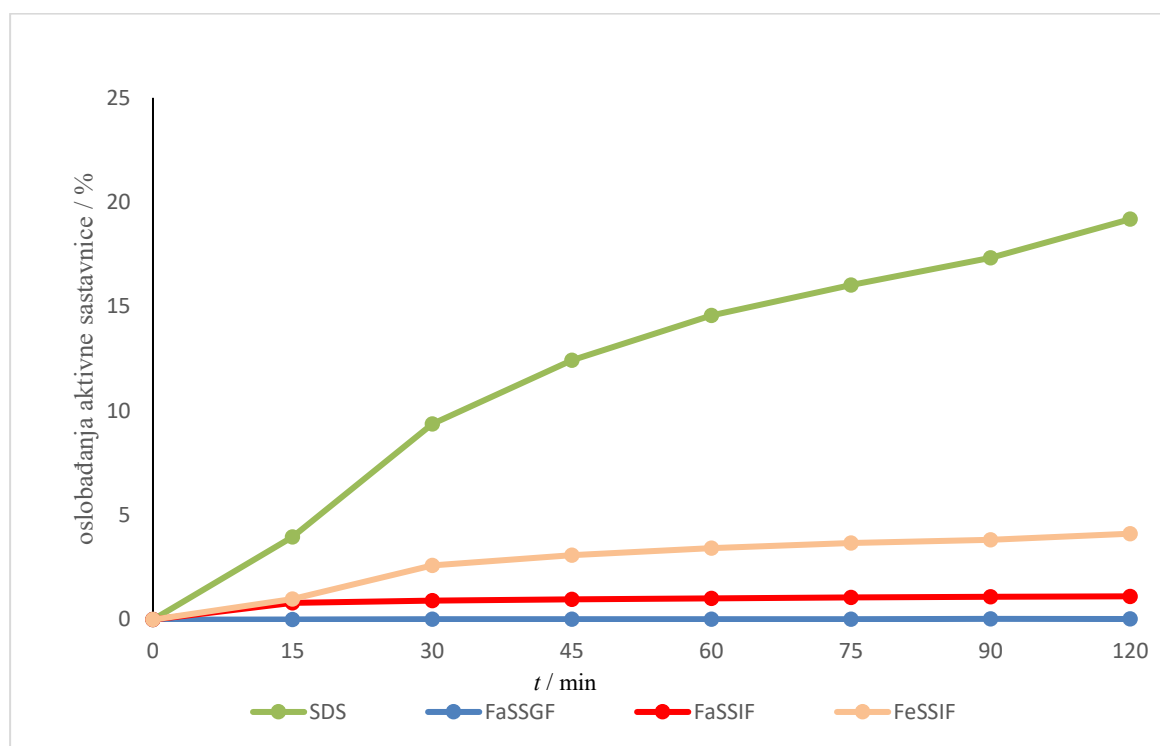
Dobiveni eksperimentalni profili oslobađanja ispitivanih tvari iz tableta i kapsula u referentnom mediju prema preporučenoj metodi opisanoj u farmakopeji, bili su različiti. Brzina oslobađanja biološki aktivnih sastavnica znatno je veća iz analiziranih tableta (preko 85 % tvari oslobođeno unutar 15 minuta) u odnosu na one koje su formulirane u obliku tvrdih i mekih kapsula, gdje je nakon 120 min otopljeno od 46 % inicijalne mase biološki aktivne sastavnice do potpunog oslobađanja unutar 75 minuta.

Nakon toga provedeno je ispitivanje oslobađanja istih aktivnih sastavnica iz oralnih dozirnih oblika biljnih pripravaka u biorelevantnim medijima i to sljedećim redoslijedom: prvo u uvjetima koja simuliraju stanje bez hrane (natašte) u želudcu, FaSSGF, pa crijevima, FaSSIF, te stanje sitosti, FeSSIF.

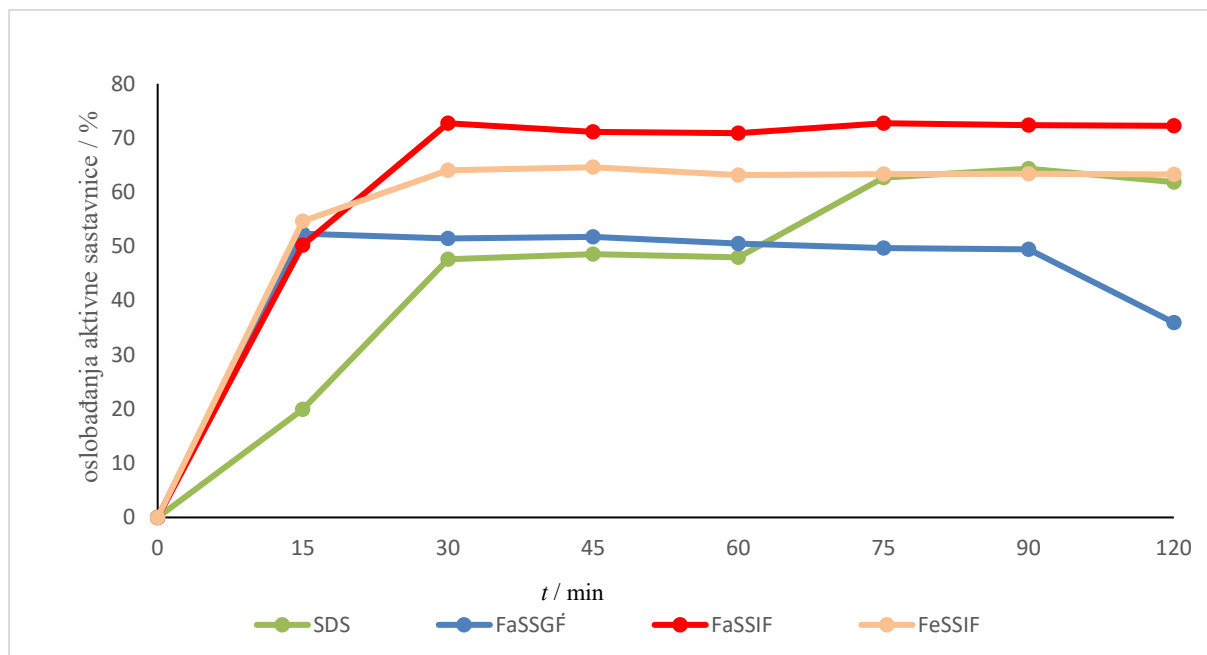
Ispitivanja provedena u simuliranim uvjetima natašte, odnosno FaSSGF i FaSSIF ispitivanja pokazala su dosta niske i međusobno slične profile oslobađanja iz tableta i tvrdih kapsula (1 – 4 % u medijima koji simuliraju uvjete u želudcu, odnosno do 5 % u mediju koji simulira uvjete u tankom crijevu). Eksperimentalno dobiveni profili oslobađanja prikazani na slikama 4.2.—4.14. Dobivene niske vrijednosti oslobađanja u kiselome mediju u skladu su s podacima iz literature.<sup>23,25</sup>

S druge strane, kada se analizira udio oslobođene tvari u tabletama i tvrdim kapsulama značajno veća količina biološki aktivnih sastavnica oslobođena je u FeSSIF mediju koji simulira stanje sitosti nego u uvjetima natašte. No, treba istaknuti kako su dobivene vrijednosti manje nego rezultati za referentni medij.

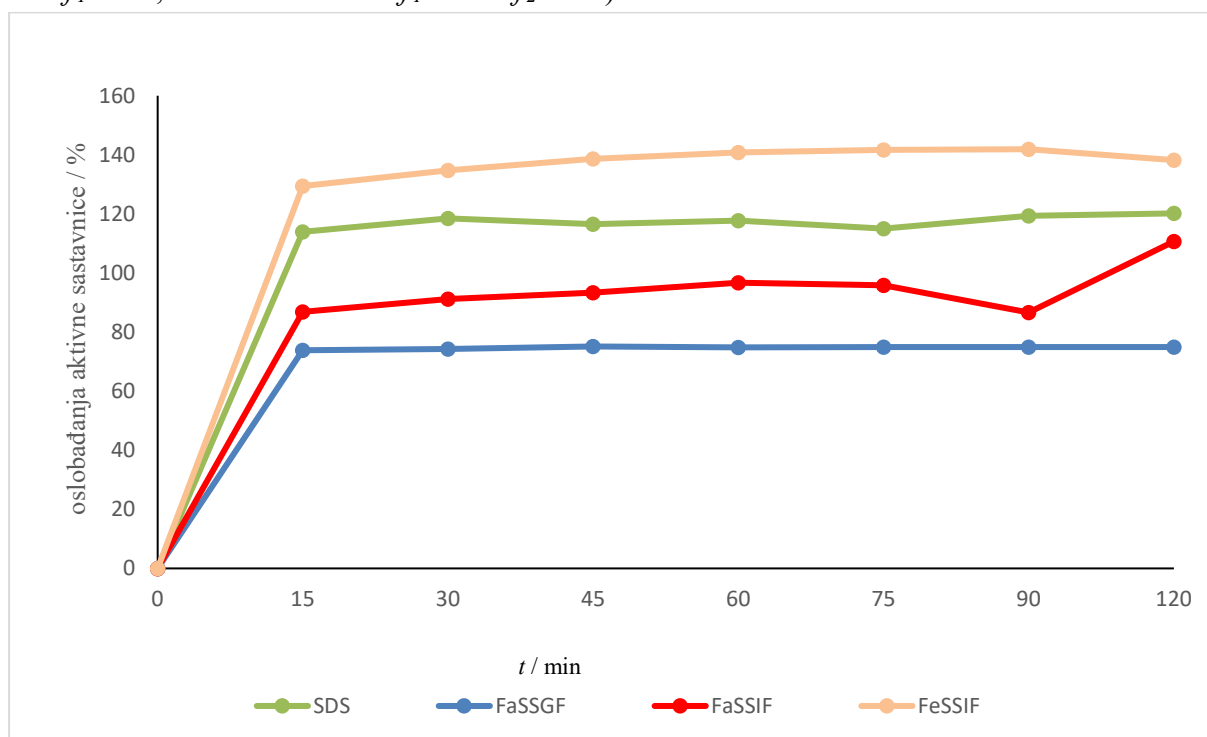
**Kurkuminoidi.** Kada se promatra oslobađanje kurkuminoida u tvrdim kapsulama, količina CUR, DMC i BDMC najviše se oslobodila u referentnom SDS mediju, a zatim FeSSIF te značajno manje u FaSSIF i FaSSGF (DP 10: CUR do 3,34 %). U dostupnoj znanstvenoj literaturi otapanje kurkumina ovisi o pH vrijednostima medija tako da rezultati *in vitro* oslobađanja nisu iznenađujući.<sup>23,25</sup> Osim toga, u SDS mediju najveći dio ovih biološki aktivnih sastavnica oslobođen je nakon 75 min. Kod oslobađanja kurkuminoida u mekim kapsulama najveći dio oslobođen je u medijima koji sastavom odgovaraju crijevnom mediju natašte i stanju sitosti te referentnom SDS mediju, dok je oko 36 % oslobođeno u želučanom mediju natašte. Zanimljivo je istaknuti kako je veći dio aktivnih sastavnica u FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF oslobođen u prvih 15 minuta, dok u SDS mediju nakon 30 minuta. U obliku tablete prati se brže oslobađanje biološki aktivnih sastavnica nego u obliku kapsula.



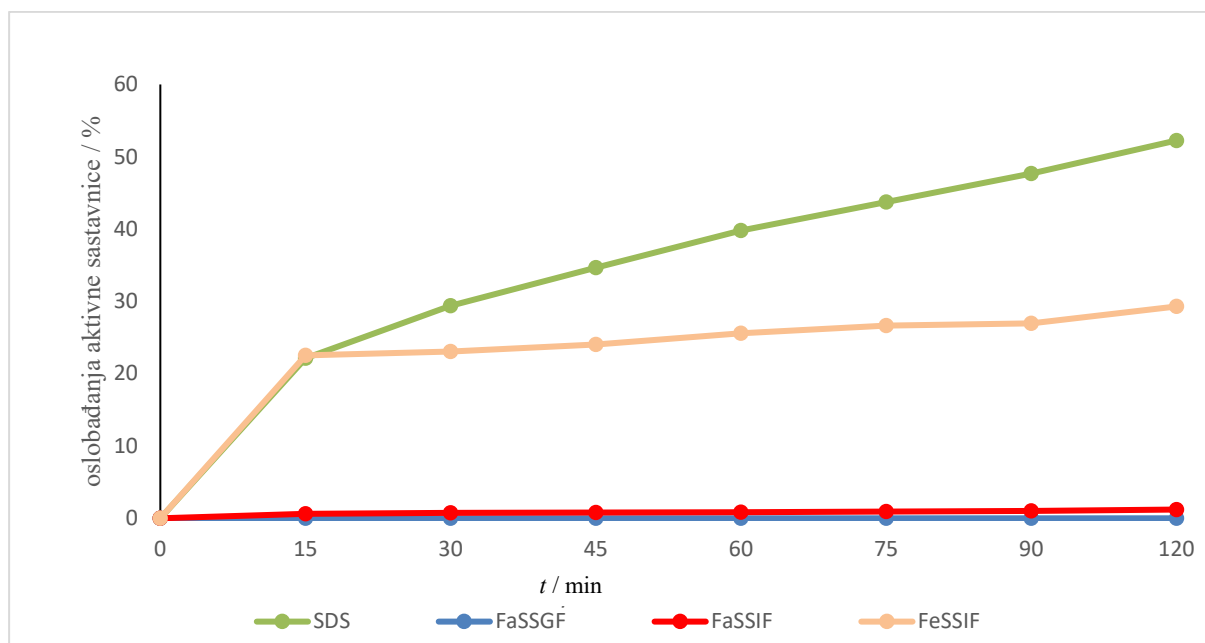
Slika 4.2. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja CUR u kapsulama (DP 1 – DP 15) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)



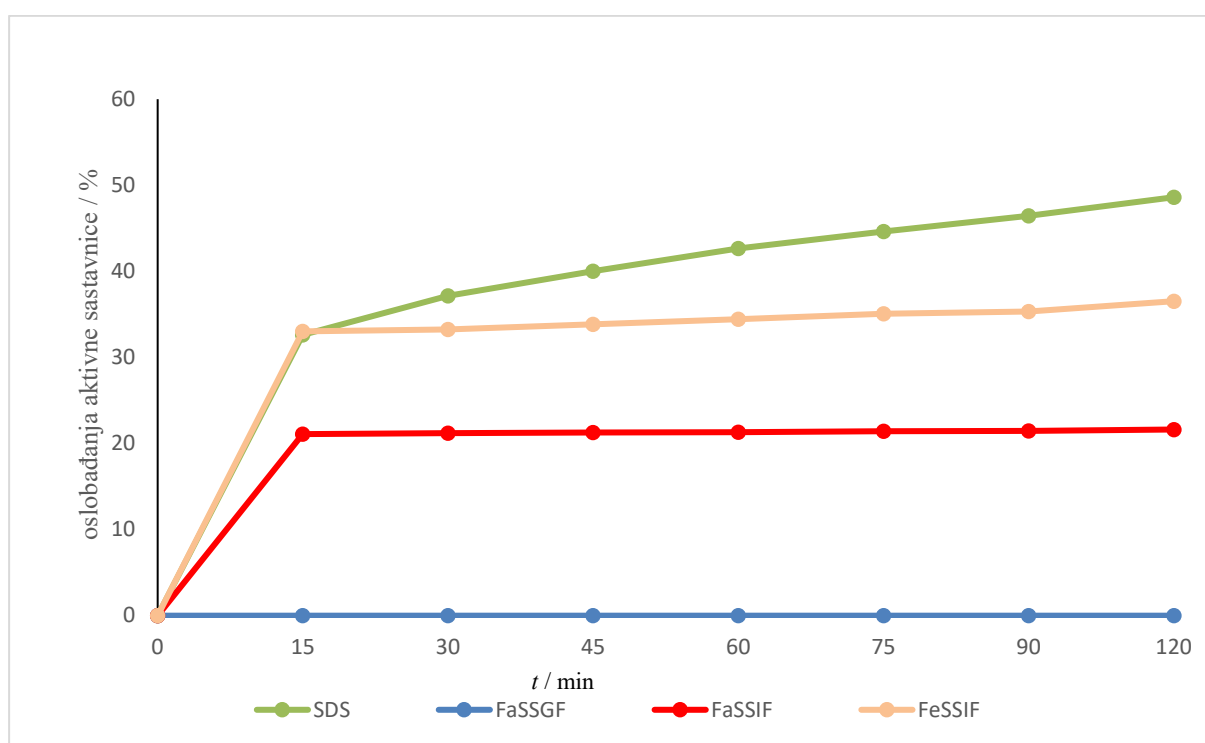
Slika 4.3. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja CUR u mekim kapsulama (DP 16) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF (SDS/FeSSIF:  $f_2 = 40$  i  $f_1 = 25$ ; SDS/FaSSIF:  $f_2 = 36$  i  $f_1 = 38$ ; FaSSGF/FeSSIF:  $f_1 = 57$  i  $f_2 = 12$ ))



Slika 4.4. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja CUR u tabletama (DP 17- DP 19) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)

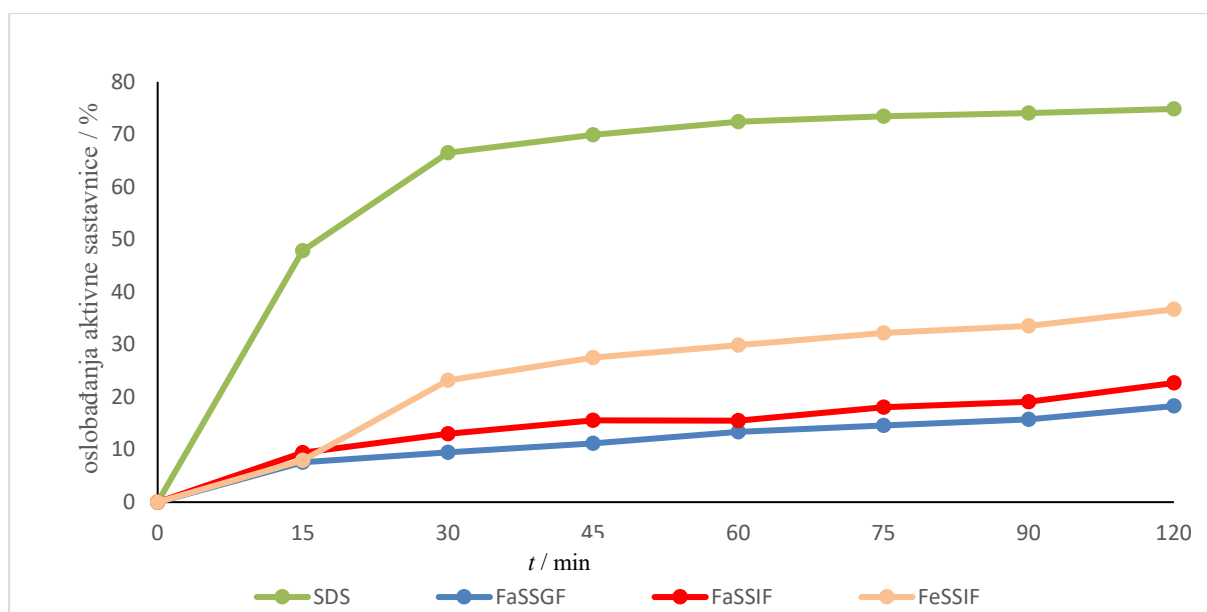


Slika 4.5. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja DMC u kapsulama (DP 1 – DP 15) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)

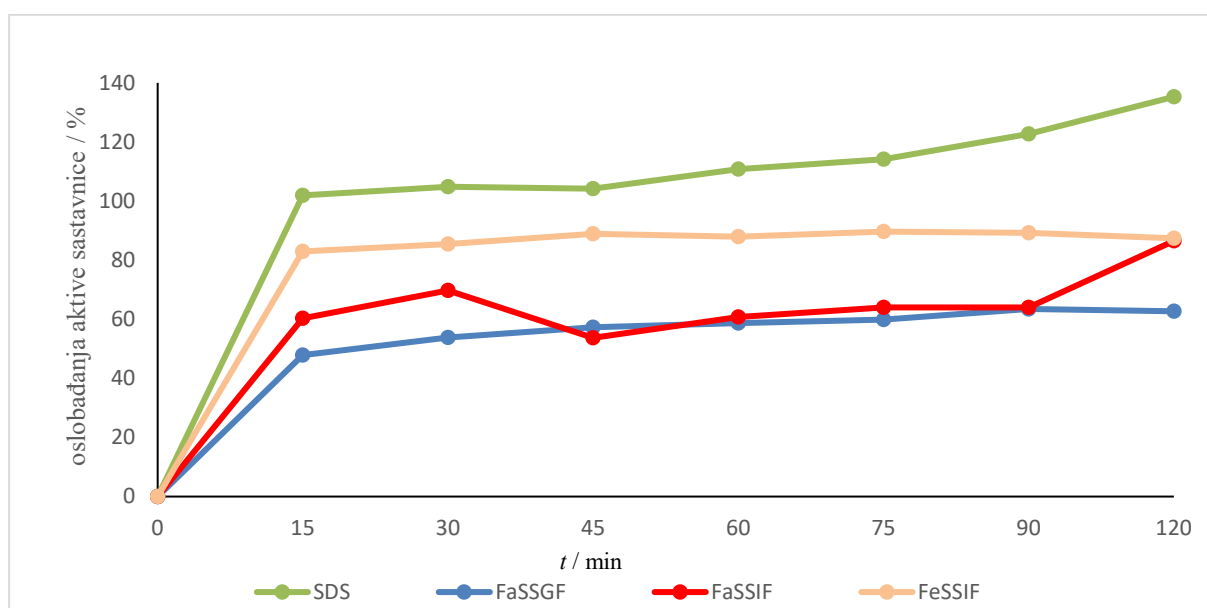


Slika 4.6. Profil *in vitro* oslobađanja BDMC u kapsulama (DP 1 – DP 15) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF) (SDS/FeSSIF:  $f_2 = 55$  i  $f_1 = 19$ ; FaSSIF/FeSSIF:  $f_2 = 51$  i  $f^d > 100$ )

**Piperin.** Količina PIP u tvrdim kapsulama najviše se oslobodila u SDS mediju (71 – 122 % ukupne količine unutar 75 minuta), te značajno manje u FeSSIF (37 – 59 %), FaSSIF (17 – 47 %) i FaSSGF (4 – 58 %). Kada se promatra oslobađanje u tabletama, piperin se počinje značajnije oslobađati unutar 15 minuta, a oko 90 % ukupne količine oslobodi u stanju sitosti, dok se u stanjima natašte oslobodio značajno manji udio ove sastavnice (FaSSIF: do 52 %; FaSSGF oko 4 %).



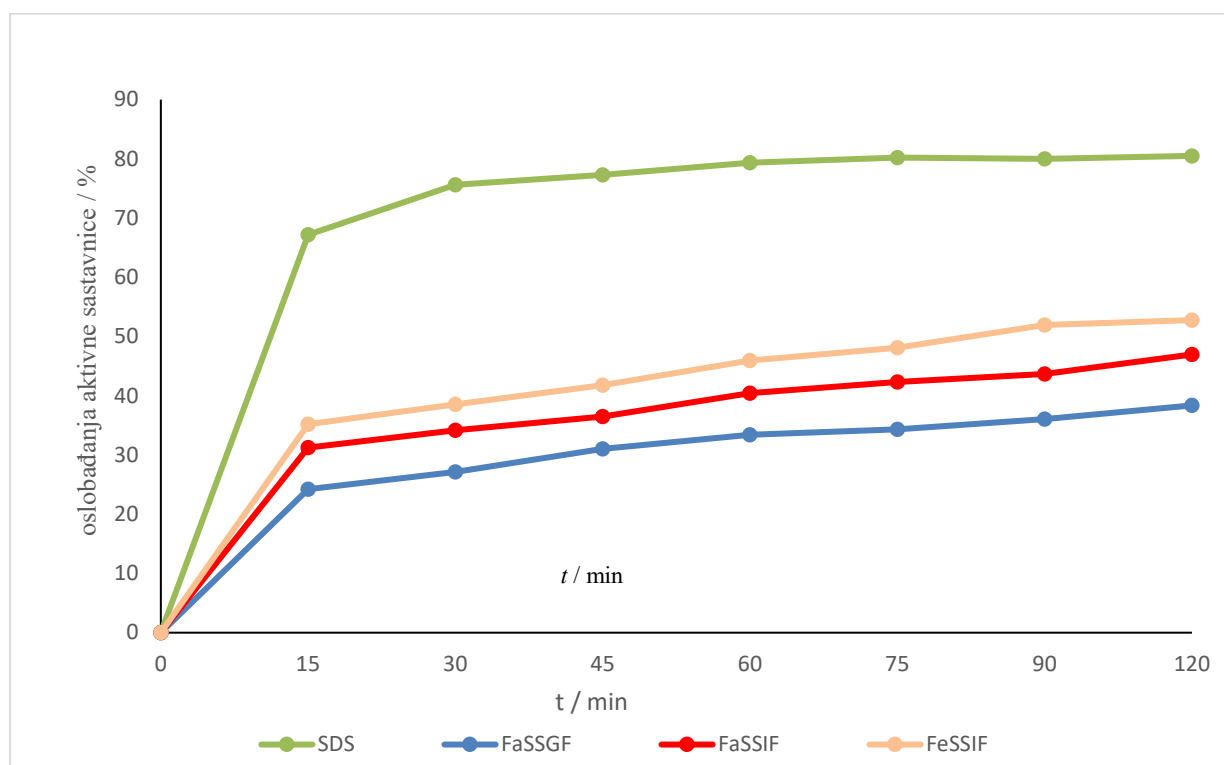
Slika 4.7. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja PIP u kapsulama (DP 1 – DP 15) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)



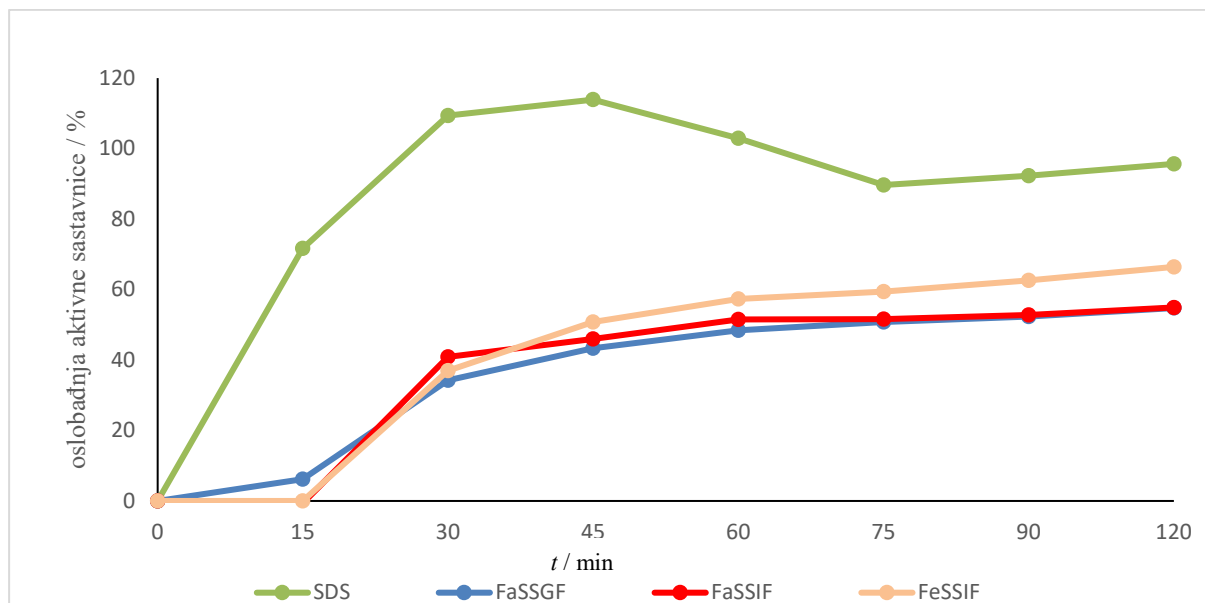
Slika 4.8. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja PIP u tabletama (DP 17- DP 19) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)

**Andrografolidi.** U tri analizirana uzorka tvrdih kapsula (DP 13 – DP15) detektirana je prisutnost andrografolida te je u njima ispitan profil *in vitro* oslobađanja ove biološki aktivne sastavnice. U referentnom mediju (80,5 – 108,4) % tvari oslobodilo se unutar 30 minuta. Ispitivanja provedena u biorelevantnim medijima pokazala su najveći udio oslobođene tvari u stanju sitosti (DP 13: 44,2 %; DP 15: 52,8 % te DP 14: 121,5 %). Najveći udio oslobođen u stanju sitosti u uzorku DP 14 može se obrazložiti malom količinom ove biološki aktivne sastavnice u pojedinačnom obliku (2,64 mg u jednoj kapsuli). Manja količina andrografolida oslobodila se u stanjima natašte FaSSGF (do 38,4 %) i FaSSIF (do 47,0 %).

Koncentracija diterpena 14- DANDRO određena je samo u jednom uzorku DP 13 te je u navedenom uzorku tvrdih kapsula praćeno oslobađanje ove sastavnice justicije. U referentnom mediju unutar 15 minuta oslobodilo se preko 70 %, a maksimalan udio (96 %) u pola sata.



Slika 4.9. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja ANDRO u kapsulama (DP 1 – DP 15) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)



Slika 4.10. Profil *in vitro* oslobađanja 14-DANDRO u kapsuli (DP 13) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)

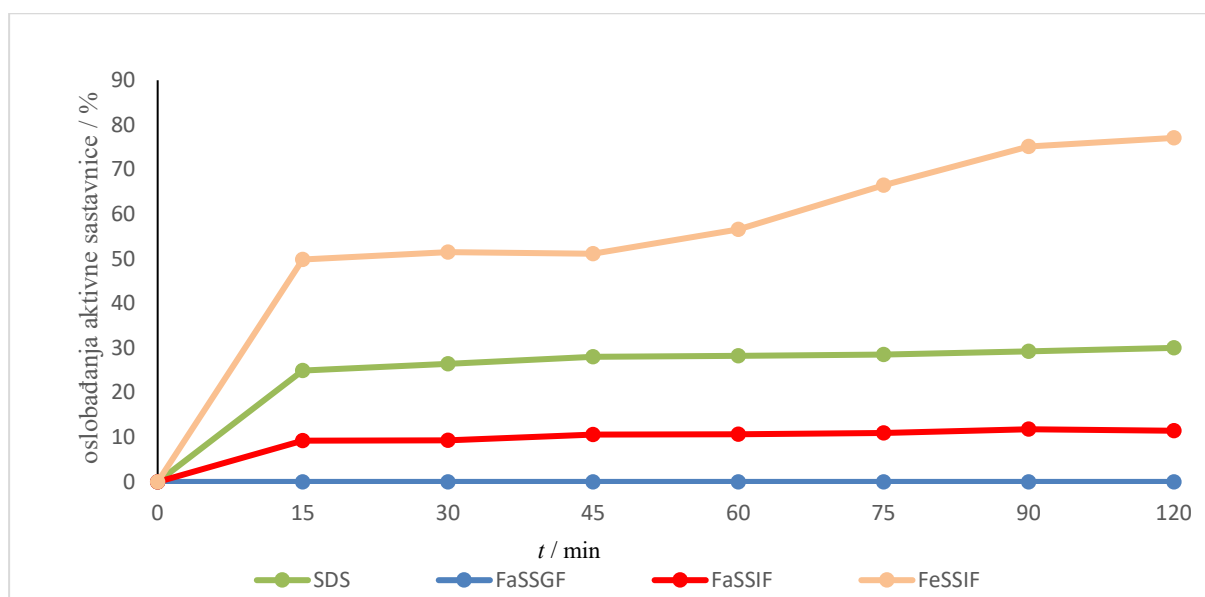
U stanjima natašte, FaSSGF i FaSSIF, oslobodilo se podjednako, 55 %, uz približno istu brzinu oslobađanja (preko 50 % u FaSSGF unutar 75 minuta, a u FaSSIF u 60 minuta) što dokazuju i vrijednosti  $f_2$  (FaSSGF / FaSSIF)= 73 i  $f_1$  (FaSSGF / FaSSIF)= 6. U stanju sitosti oslobodilo se nešto više, oko 66 %, ukupne količine (preko 50 % ukupnog sadržaja u 45 minuta) (FaSSGF / FeSSIF:  $f_2 = 55$  i  $f_1 = 19$ ; FaSSGF / FeSSIF:  $f_2 = 58$  i  $f_1 = 15$ ).

**Bosvelične kiseline.** Kada se promatra profil oslobađanja AKBA i KBA u tvrdim kapsulama (DP 7) može se primjetiti sličnost u SDS i FeSSIF mediju, dok je znatno manji udio oslobođen u FaSSIF. Nadalje treba istaknuti kako je razgradnja ovih biološki aktivnih sastavnica najveća u želučanom mediju natašte (koncentracije ispod LOQ). Značajno oslobađanje ovih sastavnica u SDS i FeSSIF mediju prati se nakon 30 minuta, a najviše oslobođene tvari utvrđeno je nakon 120 minute (nešto više od 50 % za AKBA i oko 40 % za KBA).

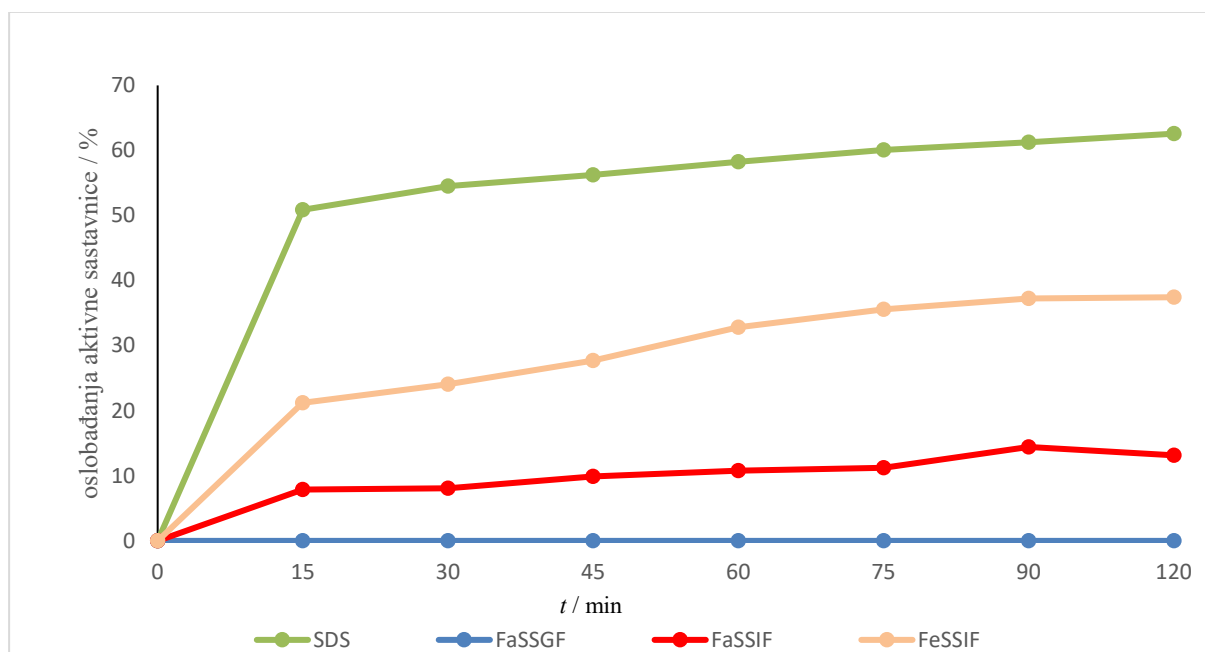
Sličan profil oslobađanja dobiven je analizom uzorka DP 8 (oko 10 % više oslobođene tvari u SDS nego u FeSSIF), dok je u uzorku DP 15 oslobađanje značajno već nakon 15 minuta.

Kod oslobađanja AKBA iz tableta najveći udio oslobođene tvari utvrđen je u FeSSIF mediju što upućuje na ispravnost preporuke za uzimanjem 2 tablete dodatka prehrani uz obrok. Međutim, kod nijednog formuliranog dodatka prehrani nije postignuto oslobađanje 80 % ukupne količine aktivne sastavnice unutar 120 minuta.

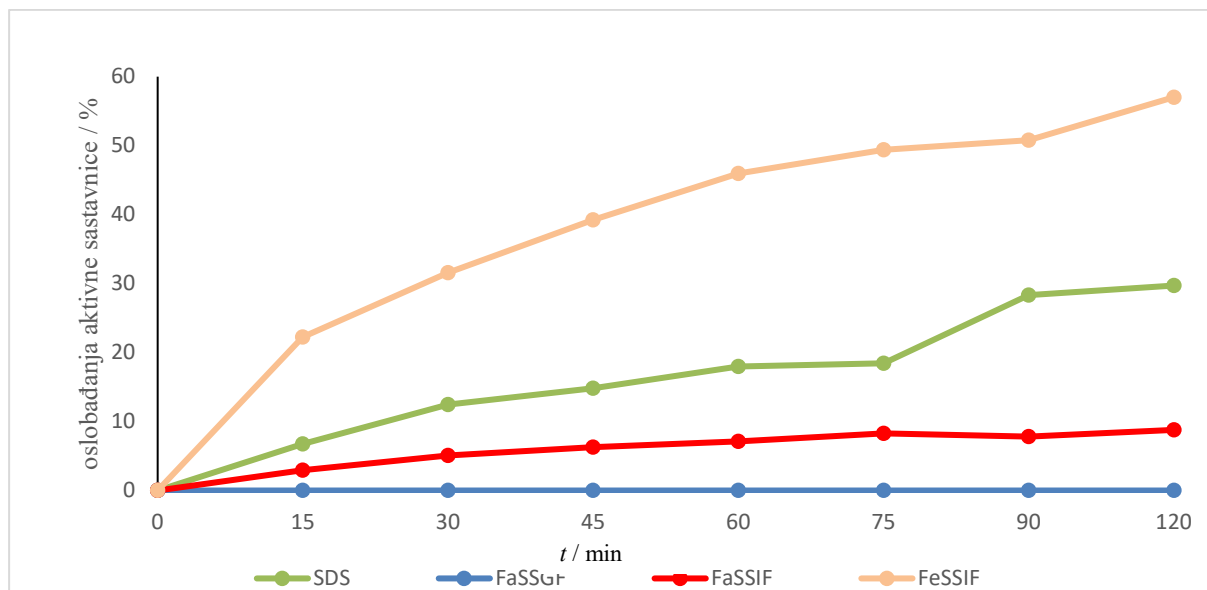




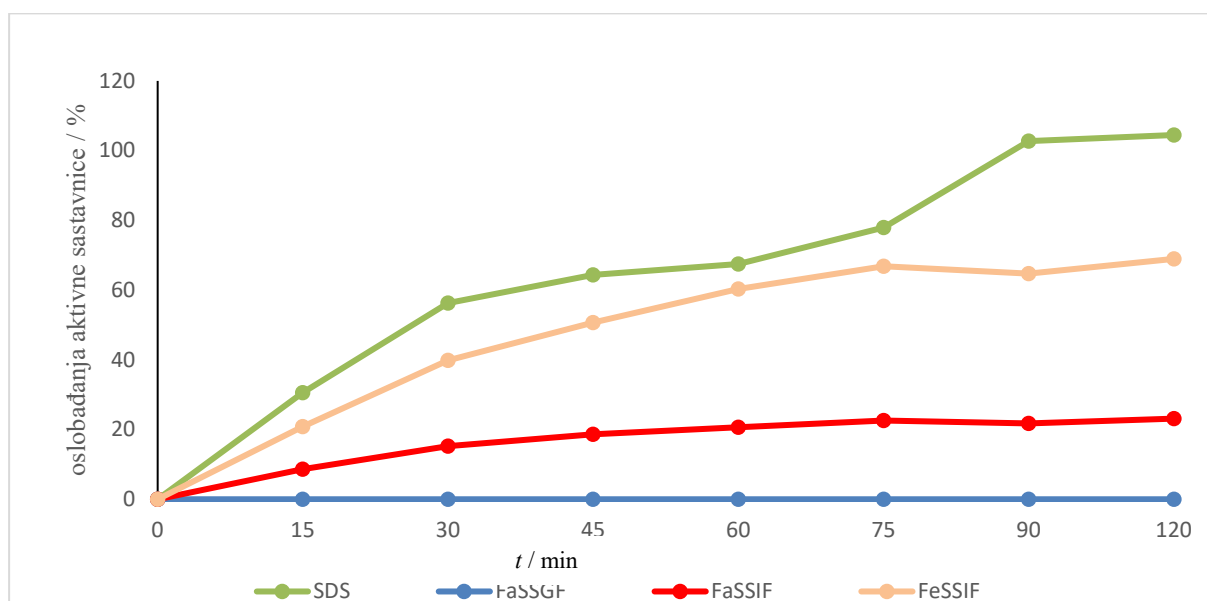
Slika 4.11. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja AKBA u kapsulama (DP 1 – DP-15) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)



Slika 4.12. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja KBA u kapsulama (DP 1 – DP 15) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)



Slika 4.13. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja AKBA u tabletama (DP 17- DP 19) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)



Slika 4.14. Prosječni profil *in vitro* oslobađanja KBA u tabletama (DP 17- DP 19) u ispitivanim medijima (SDS, FaSSGF, FaSSIF i FeSSIF)

Profil oslobađanja biološki aktivnih sastavnica dobiven u SDS mediju postavljen je kao referentan, a onaj u biorelevantnom mediju kao testni. Ukoliko je vrijednost  $f_1$  iznosila između 0 i 15 %, a  $f_2$  između 50 i 100 % eksperimentalno dobiveni profili su zadovoljavajuće sličnosti, odnosno može se govoriti neznatnoj razlici dvaju profila oslobađanja.

Kada se promatraju profili oslobađanja u stanju natašte i referentnom mediju može se uočiti da se vrijednosti razlike točaka u svim vremenskim intervalima značajno razlikuju, odnosno, to znači da je u tom slučaju odstupanje među profilima značajno i ne može se zanemariti te u tim točkama vrijedi hipoteza da profil *in vitro* oslobađanja biološki aktivne sastavnice iz oralnih biljnih pripravaka ovisi o sastavu biorelevantnog medijia.

Visoka različitost, odnosno mala sličnost između krivulja oslobađanja dobivenih u referentnom i ispitivanim biorelevantnim medijima upućuje na utjecaj hrane na apsorpciju biološki aktivnih sastavnica. Ova tvrdnja dodatno naglašava važnost pravilne upute za primjenu dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva. Kada se pogleda deklaracija formuliranih dodataka prehrani preporuka za primjenu dodatka prehrani uz hranu navedena je kod deset uzoraka, na prazni želudac u jednom uzorku, dok za osam uzoraka nema informacija o načinu primjene dodatka prehrani.

Dodatci prehrani koji u preporukama imaju primjenu uz obrok imali su najviši sadržaj oslobođene biološki aktivne sastavnice u mediju koji simulira stanje sitosti, a značajno manje u medijima koji simuliraju stanje natašte. Oslobađanje biološki aktivnih sastavnica iz uzorka koji se preporučuje da pacijent primjenjuje dodatak prehrani natašte pokazao je veći udio biološki aktivnih sastavnica u FeSSIF mediju, dok su koncentracije u FaSSGF bile ispod LOQ. Dobiveni rezultati upućuju na važnost davanje pravilne upute i primjene dodataka prehrani.

Na oslobađanje biološki aktivnih sastavnica iz čvrstog dozirnog oblika, odnosno njihove profile oslobađanja, utječu kvantitativni i kvalitativni sastav biljnog materijala, fizikalna svojstva sastavnica, sastav pomoćnih tvari odnosno neaktivnih komponenti formuliranog biljnog pripravaka te proizvodni proces. Posebno treba istaknuti kako dobiveni rezultati pokazuju da neujednačen biljni materijal kao i formulacijski činitelji utječu na *in vitro* oslobađanje biološki aktivnih sastavnica.

## § 5. ZAKLJUČAK

Doktorskim radom provedeno je ispitivanje oralnih dozirnih oblika biljnih pripravaka za liječenje upalnih bolesti crijeva tako da je utvrđena kakvoća dozirnih oblika, zatim prisustvo metala u oralnim biljnim preparatima i oslobađanje biološki aktivnih sastavnica iz formuliranih dodataka prehrani u različitim biorelevantnim medijima.

Ispitivanje kvalitete čvrstih dozirnih oblika provelo se na uzorcima tvrdih kapsula, mekih kapsula i tableta. Ispitali su se fizikalni parametri variranja mase, gubitak sušenjem, rastrošljivost, tvrdoća tableta i pucanja mekih kapsula. Provjerom variranja mase dobila se informacija o ujednačenost mase između pojedinačnih dozirnih oblika. Svi uzorci su zadovoljili kriterije farmakopeje za ujednačenost mase tj. uzorci svih kapsula su unutar kriterija (90 – 110) % od srednje vrijednosti što upućuje na ujednačenost proizvodnog procesa. Usporedbom srednjih masa uzoraka sa deklariranom neto količinom uočeno je veliko odstupanje za četiri uzoraka tvrdih kapsula i jednog uzorka tableta. Jedan uzorak tvrdih kapsula i dva uzorka tableta imali su mase veće od 1000 mg što nije u skladu sa propisanim smjernicama Američke agencije za hranu i lijekove. Kriterij raspadljivost svih uzoraka kapsula i tableta unutar 15 minuta zadovoljen je za 78,95 % uzoraka, unutar 30 minuta 10,53 %, dok se jedan uzorka tableta nije uopće raspao. Lomljivost tableta je potvrdila je veliku prekidnu silu dva multipreparatna formuliranih u obliku velikih tableta. U skladu s tim dobiveni su rezultati za rastrošljivost tableta. Pucanje mekih kapsula ispitano je na jednom uzorku te je zadovoljen propisani kriterij. Gubitak sušenjem može upućivati na prisutnost neželjenih sastavnica, a definiran je prema biljnoj vrsti, ali i prema njenom pripravku. Uočen je visoki sadržaj vlage u 20 % svih ispitivanih uzoraka, odnosno u dva uzorka kapsula i dva uzorka tableta. U dva uzorka kao jedna od aktivnih sastavnica deklarirana je hijaluronska kiselina koja bi mogla biti uzrok visokom postotku vlage. Ispitivani parametri kakvoće čvrstih dozirnih oblika usko su povezana sa procesom proizvodnje čvrstih dozirnih oblika te su dobiveni rezultati ovih ispitivanja potvrdila nužnost provjere kakvoće dozirnih oblika.

Prisustvo metala u oralnim dozirnim oblicima biljnih pripravaka ispitano je AAS metodama: FAAS tehnikom određivani su metali čija je očekivana koncentracija bila u visokom koncentracijskom radnom području, ETAAS tehnikom su određivani metali u niskom koncentracijskom radnom području, ukupna živa određivala se analizatorom žive. Sve metode su bile validirane prema zahtjevima smjernica ICH. U svim analiziranim uzorcima pronađeni

su metali Ba, Cu, Cr, K, Na, Ca, Mg, Mn, Fe i Zn. Makroelementi K, Na, Ca i Mg su također nađeni u svim uzorcima u visokim koncentracijama što je i očekivano obzirom da se radi o biljnim pripravcima, a oni su sastavni dio biološkog materijala. Metali As i Se su nađeni u jednom uzorku, uz napomenu da je Se nađen u uzorku u kojem je bio deklariran. Uspoređujući dobivene koncentracije metala s ICH kriterijima, svi analizirani metali zadovoljavaju navedenekriterije tj. nađene koncentracije su ispod dozvoljenih granica za pojedini metal.

Nakon utvrđene zadovoljavajuće kakvoće uzoraka, u ovom radu je provedeno *in vitro* oslobađanje aktivnih sastavnica iz čvrstih oralnih oblika biljnih pripravaka. U Američkoj farmakopeji opisana je metoda za oslobađanje aktivnih sastavnica iz biljnih pripravaka u mediju 1% SDS koji je u ovom radu bio referentni medij. Obzirom da referentni medij nije sličan medijima koji su prisutni u ljudskom organizmu, *in vitro* oslobađanje aktivnih sastavnica provedeno je u tri različita biorelevantna medija koji oslikavaju tri različita stanja – želučana tekućina u stanju natašte, crijevna tekućina u stanju natašte i crijevna tekućina u stanju sitosti. *In vitro* oslobađanje aktivnih sastavnica pratilo se u osam vremenskih točaka tijekom 2 sata, a uzorci su se analizirali HPLC metodom koja je bila optimizirana i validirana. Udio oslobođenih aktivnih sastavnica iskazan je kao postotak aktivne sastavnice u samom biljnom pripravku te su se profili oslobađanja svake aktivne sastavnice u uzorku uspoređivali ovisno o mediju. Dobiveni rezultati su pokazali da se sve određivane aktivne sastavnice najslabije oslobađaju u želučanoj tekućini u stanju natašte, dok je profil oslobađanja aktivnih sastavnica u crijevnoj tekućini u stanju sitosti usporediv i/ili čak i bolji nego oslobađanje istih aktivnih sastavnica u referentom mediju. Ovim istraživanjem je dokazano da odabir pravilnog biorelevantnog medija može dati točnu predikciju *in vivo* oslobađanja aktivnih sastavnica u biljnim preparatima, a time upozorava na potrebu naglašavanja pravilne primjene biljnog pripravaka kako bi njegove aktivne sastavnice imale značajan farmakološki učinak u liječenju upalnih bolesti crijeva.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AA – atomska apsorpcija

AAS –atomska apsorpcijska spektrometrija (engl. *atomic absorption spectroscopy*)

As – faktor asimetrije

14-DAND – 14-deoksi-11,12-didehidoandrografolid

ABA –  $\alpha$ -Bosvelična kiselina

AABA – 3-O-acetil- $\alpha$ - bosvelična kiselina

ABBA – 3-O-acetil- $\beta$ - bosvelična kiselina

AKBA – 3-acetil-11-keto- $\beta$ -bosvelična kiselina

ANDR – andrografolid

BBA –  $\beta$ -Bosvelična kiselina

BCS – engl. *The Biopharmaceutics Classification System*

BDMC – bisdemetoksikurkumin

BG – pozadinska korekcija

CB – Chronova bolest

CUR – kurkumin

DMC – demetoksikurkumin

DP – dodatci prehrani

EDL – engl. *electrodeless discharge lamp*

ETAAS – tehnika elektotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije (engl. *electrothermal furnace atomic absorption spectrometry*)

FAAS – tehnika plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (engl. *flame atomic absorption spectroscopy*)

FaSSIF – engl. *fasted state stimulated intestinal fluid*

FaHIF – engl. *fasted human intestinal fluid*

FaSSGF – engl. *fasted state stimulated gastric fluid*

FeSSIF – engl. *fed state stimulated intestinal fluid*

FeHIF – engl. *fed human intestinal fluid*

FDA – Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *U.S. Food and Drug Administration*)

GFAAS – engl. *graphite furnace atomic absorption spectrometry*

GI – gastrointestinalni trakt

IC – ionska kromatografija (engl. *ion chromatography*)

ICH – Međunarodna konferencija za harmonizaciju (engl. *International Conference on Harmonisation*)

HCL – lampa sa šupljom katodom (engl. *hollow cathode lamp*)

HEPT – visina teoretskih tavana (engl. *height of theoretical plates*)

HIF – crijevni ljudski medij (engl. *human intestinal fluid*)

HILIC – tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high resolution chromatography technique*)

IBD – upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*)

IDA – anemija uzorkovana nedostatkom železa (engl. *Iron Deficiency Anemia*)

KBA - 11-keto- $\beta$ -osvelična kiselina

k' – faktor kapaciteta

LC – tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)

LOD – granica dokazivanja (engl. *limit of detection*)

LOQ - granica određivanja (engl. *limit of quantitation*)

MAPK – protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

N – broj teoretskih tavana (engl. *number of theoretical plates*,

NAND - neoandrografolid

NF- $\kappa$ B – nuklearni faktor

NCBI – Nacionalnog centar za biotehnoške informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information*)

NP – normalno fazna (engl. *normal phase*)

PDE – dopušteno dnevno izlaganje (engl. *permitted daily exposure*)

Ph. Eur. – Europska farmakopeje (engl. *European Pharmacopeia*)

PIP – piperin

PTFE – politetrafluoroetilen

PVC – polivinilklorid

RP – obrnuto fazna (engl. *reverse phase*)

RT – retencijsko vrijeme (engl. *retention time*)

SDS – natrijev dodecilsulfat

SEC – kromatografija isključenjem (engl. *size exclusion chromatography*)

SIF – simulirani crijevni medij (engl. *simulating intestinal fluid*)

Tf – faktor razvlačenja (engl. *tailing factor*)

THGA – (engl. *end-capped thga graphite tubes*)

UC – ulcerozni kolitis

USP-NF – Američka farmakopeja (engl. *United State Pharmacopeia and the National Formulary*)

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra high resolution chromatography technique*)



## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. Zion Market Research, <https://www.zionmarketresearch.com/news/dietary-supplements-market> (preuzeto 15. travnja. 2023)
2. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=111> (preuzeto 23.01.2024.)
3. <https://www.uspnf.com/> (preuzeto 23.08.2023.)
4. H. Hanai, K. Sugimoto, *Curr.* **15** (2009) 2087-2094.
5. R.E. Rossi, T. Whyand, C. D. Morray, M. I. Hamilton, D. Conte, M. E. Caplin, *Eur. J. Gastroenterol.* **28** (2016) 1357-1364.
6. A. K. Kiani, G. Bonetti, K. Donato, M. Bertelli, *J Prev Med Hyg* **63(3)** (2022) 214-220
7. M. M. de Castro, L. bitencourt Pascoal, K. M. Steigleder, B. Piatezzi Siqueira, L. Pires Corona, M. de Louders Setsuko Ayrizono, M. Milanski, R. F. eal, *World J. Exp. Med.* **11(1)** (2021) 1-16.
8. W. J. Sandborn, S. R. Targan, V. S. Byers, D. A. Rutty, H. Mu, X. Zhang, T. Tang, *Am. J. Gastroenterol* 108 (2013) 90-98.
9. A. Triantafyllidi, T. Xanthos, A. Papalois, J. K. Triantafillidis, *Ann Gastroenterol.* **28.** (2015) 210-220.
10. T. Tang, S. R. Targan, Z.-S. Li, C. Xu, V.S. Byers, W. J. Sandborn, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33** (2011) 194-202.
11. P. Jadhav, Y. Jiang, K. Jarr, C. layton, J. F. Ashouri, S. R. Sinha, *Nutrients* **12(2156)** (2020) 1-14.
12. M.-L. Jeličić, *Kem. Ind.*, **71(11-12)** (2022) 729-742.
13. H. Hanai, T. Iida, K. Takeuchi, F. Watanabe, Y. MAruyama, A. Andoh, . Tsujikawa, Y. Fujiyama, K. Mitsuyama, M. Sata, M. Yamada, Y. Iwaoka, K. Kanake, H. Hiraishi, K. Hirayama, H. Arai, S. Yoshii, M. Uhijima, T. Nagata, Y. Koide, *Clin. Gastroenterol.* **4** (2006) 1502-1506.
14. S. C. Ng, Y. T. Lam, K. K. F. Tsoi, F. K. L. Chan, J. J. Y. Sung, J. C. Y. Wu, *Aliment. Pharmacol. Ther* **38** (2013) 854-863
15. D. Amidžić Klarić, J. Kovačić, M.-L. Jeličić, S. Zubčić, V. Stankov, M. Gulan Čičak, B. Bučar, I. Klarić, A. Mornar, *Pharamceuticals* **16** (2023) 3-18
16. E. Brusač, M.-L. Jeličić, B. Nigović, D. Amidžić Klarić, A. Mornar, *Food Technol. Biotechnol* **60(4)** (2022) 434-448

17. L. Vaclavik, A. J. Krynitsky, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 6767-6790
18. Pravilnik o dodatcima prehrani NN126/2013
19. Zakon o lijekovima. NN 76/13, 90/14, 100/18
20. K. Westerhoff, A. Kauzinger, M. Wurglics, J. Dressman, M. Shubert-Zsilavec, *J. Pharm. Pharmacol.* **54(12)** (2002) 1615-1621
21. B. J. Gurley, S. F. Gardner, M. A. Hubbard, *Am J Health Syst Pharm* **57** (2015) 963-969
22. S. J. Hewlings, D. S. Kalman, *Foods* **6(92)** (2017) 1-11
23. J. G. Song, H.-M. Noh, S. H.oon Lee, H.-K. Han, *Pharmaceutics* **14(2269)** (2022) 1-13
24. <https://www.rrnursingschool.biz/decocted-water/curcuma-longa-l-or-curcuma-aromatica-salisb-fam-zingiberaceae.html> (preuzeto 22.08.2023.)
25. S. M. H. Rahman, T.C. Telny, T. K. RAVi, S. Kuppusamy, *Indian. J. Pharm. Sci.* **72(2)** (2009) 139-142.
26. D. Poeckel, O. Werz, *Curr. Med. Chem.* **13** (2006), 3359-3369.
27. <https://www.herbco.com/c-160-boswellia-serrata.aspx> (preuzeto 22.08.2023.)
28. T. Jayakumar, C.-Y. Hsieh, J.-J. Lee, J.-R. Sheu, *ECAM Article ID 846740* (2013)
29. M. Rafi, A. F. Devi, U.D. Syafitri, R. Heryanto, I. H. Suparto, M. B. Amran, A. Rohman, B. Prajogo, *BMC Res. Notes* **13(56)** (2020) 1-6
30. <https://duiyaoonline.com/herbs/chuanxinlian.htm> (preuzeto 22.08.2023.)
31. <http://antropocene.it/2018/10/26/piper-nigrum/> (preuzeto 22.08.2023.)
32. S. McPherson, J. Perrier, C. Dunn, I. Khadra, S. Davidson, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **150** (2020) 14-23
33. A. Mullertz, 2007. »Biorelevant Dissolution Media.« U *Solvent System and Their Selection in Pharmaceuticas and Biopharmaceutics*, autor M. E. Brewster P. Augustijns.
34. A. Fuchs, J. B. Dressman, *J. Pharm. Sci.* **103** (2014) 3398-3411
35. M. Vertzoni, J. Dressman, J. Btler, J. Hempenstall, C. Reppas, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60** (2005) 413-417
36. L. Kalantzi, K. Goumas, V. Kalioras, B. Abrahamsson, *Pharm. Res.* **23(1)** (2006) 165-176
37. L. Kalantzi, E. Persson, B. Polentarutti, B. Abrahamsson, K. Goumas, J. B. Dressman, C. Reppas, *Pharm. Res.* **23(6)** (2006) 1373-1381

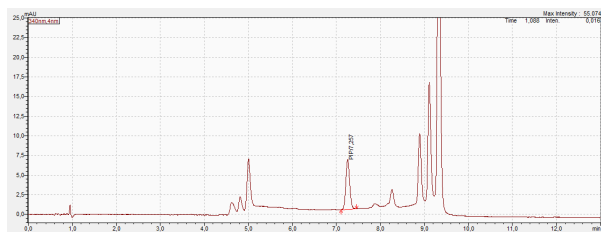
38. J. Lu, J. D. Ormes, M. Lowinger, A. K. P. Mann, W. Xu, S. Patel, J. D. Litster, L. S. Taylor, *CrystEngComm* **19** (2017) 4797-4806
39. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5_en.pdf). (preuzeto 29. srpanj 2023.)
40. D. A. Silva, N. M. Davies, N. Bou-Chacra, H. G. Ferraz, R. Lobenberg, *Dissolution Technol.* May (2022) 62-75
41. N. Fotaki, M. Vertzoni, *Open Drug Deliv. J.* **4** (2010) 2-13
42. B. N. Singh, *Drug Dev. Res.* **65** (2005) 55-75
43. A. Fuchs, M. Leigh, B. Kloefer, J. B. Dressman, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **94** (2015) 229-240
44. T. Zoeller, S. Klein, *Dissolution Technol.* (2007) 8-13
45. Q. Wang, N. Fotaki, Y. Mao, *Dissolution Technol.* (2009) 6-12
46. T. Eason, G. Ramirez, A. J. Clulow, M. Salim, B. J. Boyd, *Pharmaceutics* **14(228)** (2022) 1-11
47. L. J. Henze, N. J. Koehl, R. Jansen, R. Holm, M. Vertzoni, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **154** (2020) 116-126
48. S. Klein, *AAPS PharmSciTech* **12(3)** (2010) 397-406
49. H. de Lemos, L. D. Prado, H. V. A. Rocha, *Braz. J. Pharm. Sci.* **58** (2022) 1-15
50. J. Stappaerts, B. Wuyst, J. Tack, P. Annaert, P. Augustijns, *Eur. J. Pharm. Sci.* **63** (2014) 178-186
51. B. Wuyst, D. Riethorst, J. Brouwers, J. Tack, P. Annaert, *Int. J. Pharm.* **478** (2015) 736-744
52. E. Jantratid, N. Janssen, C. Reppas, J. B. Dressman, *Pharm. Res.* **25(7)** (2008) 1663-1676
53. L. Gruberova, B. Kratochvil, *ADMET & DMPK* **5(1)** (2017) 39-46
54. D. S. Yasin, S. Yilmaz, Z. S. Teksin, *J. Fac. Pharm* **48(3)** (2018) 82-88
55. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich-q3d-elemental-impurities-step-5-revision-2\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich-q3d-elemental-impurities-step-5-revision-2_en.pdf) (preuzeto 08.12.2023.)
56. <https://www.crawfordscientific.com/chromatography-blog/post/van-deemter-equation-the-lockdown-guide> (preuzeto 23.08.2023.)

57. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove Analitičke kemije*; Atomska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivom zračenju, Školska knjiga, Zagreb, 1999
58. C. Markopoulos, C. J. Andreas, M. Vertzoni, J. Dressman, C. Reppas *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93** (2015) 178-182
59. J.W. Moore, H.H. Flanner, *Pharm. Tech.* **20(6)** (1996) 64-74
60. E. Vranić, A. Mehmedagić, S. Hadžović, *Bosnian J. Basic Med.* **2(1-2)** (2002) 49-52
61. V.P. Shah, Y. Tsong, P. Sathe, *Pharm. Res.* **15** (1998) 889-896
62. V.P. Shah, Y. Tsong, P. Sathe, R. L. Williams, *Dissolution Technol.* **15** (1999) 889–896
63. Ph. Eur. 11.0, 2.9.3. Dissolution test for solids dosage forms
64. <https://antech.ie/introduction-to-dissolution-testing/> (prezeto 23.01.2024.)
65. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf) (preuzeto 23.08.2023.)
66. Perkin-Elmer , Analytical methods for atomic absorption spectrometry. Norwalk: Perkin–Elmer, 2000.
67. B. Welz, M. Sperling. Atomabsorptions-spektrometrie, 4., nebearbeitete Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 1997.
68. <https://www.fda.gov/media/87344/download> „Size, Shape, and Other Physical Attributes of Generic Tablets and Capsules“(preuzeto 15. travnja 2023)
69. Ph. Eur. 11.2, 2.9.5. Uniformity of mass of single-dose preparations
70. J. Stein, F. Hartmann, A.U. Dignass, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7(11)** (2010) 599–610
71. K. Vagianos, S. Bector, J. McConnell, et al., *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **31(4)** (2007) 311–319
72. S. Siva, D.T. Rubin, G. Gulotta G et al., *Inflamm. Bowel. Dis.* **23(1)** (2017) 152–157
73. G.C. Sturniolo, V. Di Leo, A. Ferronato A, et al. *Inflamm. Bowel. Dis.* **7(2)** (2001) 94–98
74. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich-q3d-elemental-impurities-step-5-revision-2\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich-q3d-elemental-impurities-step-5-revision-2_en.pdf) (preuzeto 08.12.2023.)
75. R.M. Martins, S.V. Pereira, S. Siqueira, et al., *Food Res. Int.* **50** (2013) 657-663
76. Y. Kaminaga, A. Nagatsu, T. Akiyama, et al., *FEBS Letters* **555** (2003) 311-316

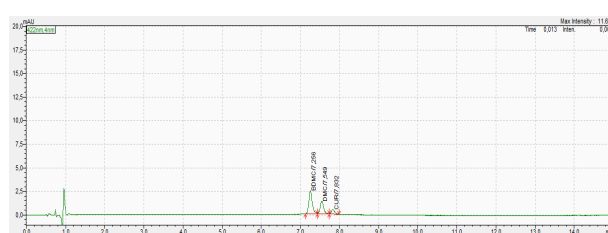
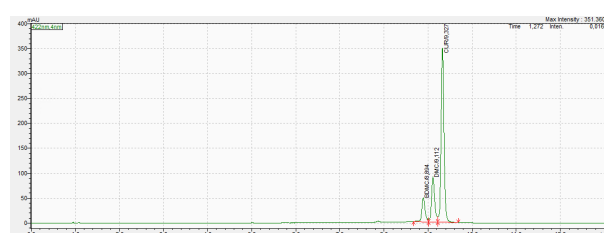
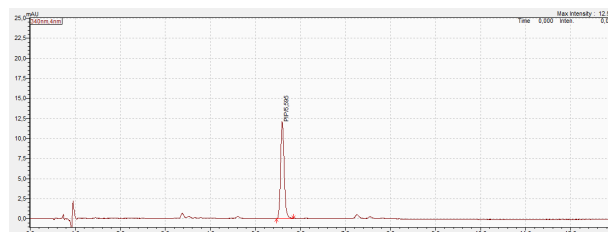
- 
77. S. Revathy, S. Elumalai, M. Benny, A. Benny, *J. Exp. Sci.* **2** (2011) 21-25
78. Y. K. Rao, G. Vimalamma, C. V. Rao, Y. M. Tzeng, *Phytochemistry* **65** (2004) 2317–2321
79. M. Geethangili, Y. K. Rao, S. H. Fang, Y. M. Tzeng, Y.M., *Phytotherapy Research* **22** (2008) 1336–1341

## § 8. DODATAK

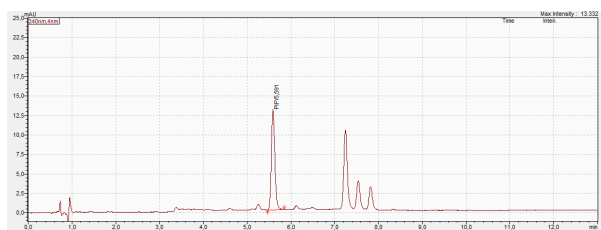
a) SDS



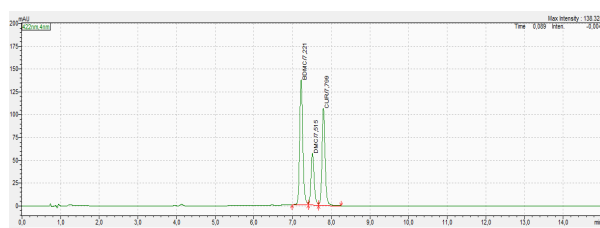
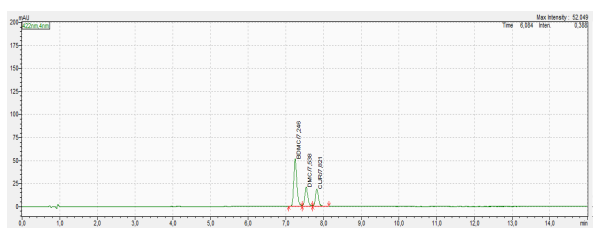
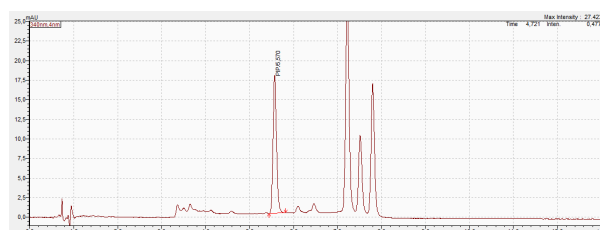
b) FaSSGF



c) FaSSIF

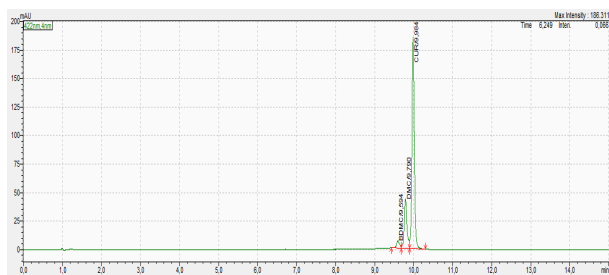


c) FeSSIF

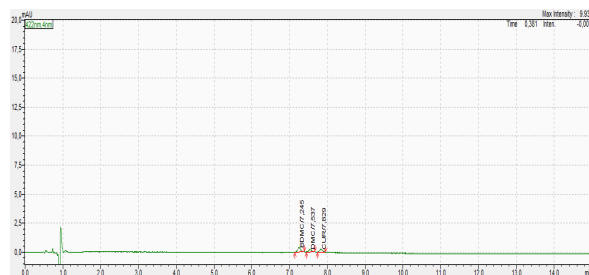


Slika 8.1. Kromatogrami piperina i kurkuminoida u uzorku DP 1 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FaSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

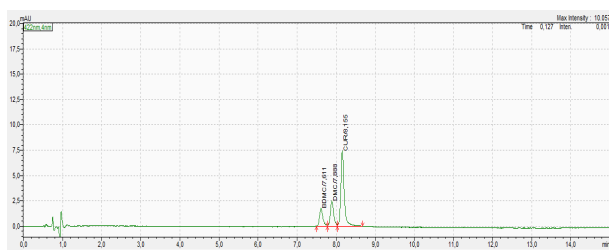
a) SDS



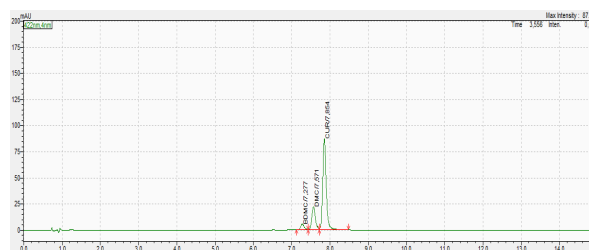
b) FaSSGF



c) FaSSIF

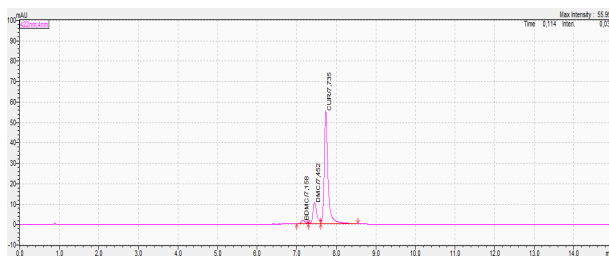


c) FeSSIF

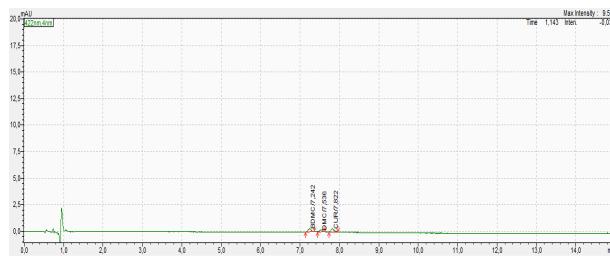


Slika 8.2. Kromatogrami kurkuminoida u uzorku DP 2 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju

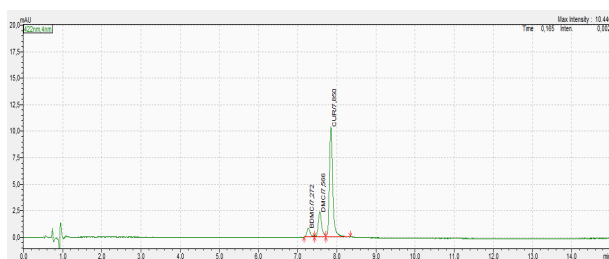
a) SDS



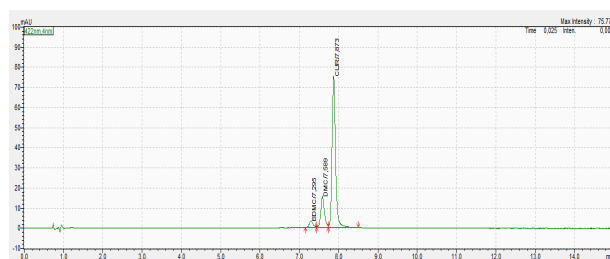
b) FaSSGF



c) FaSSIF

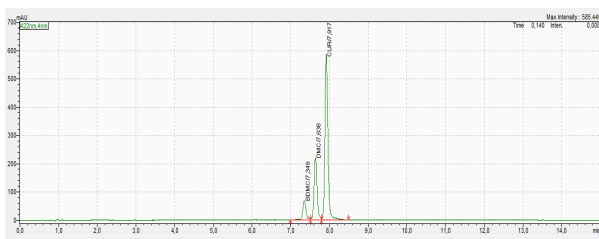
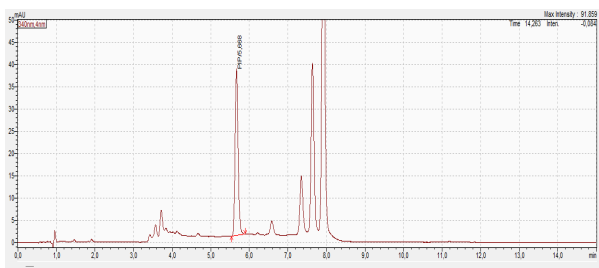


c) FeSSIF

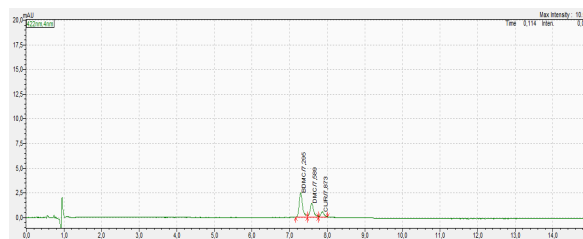
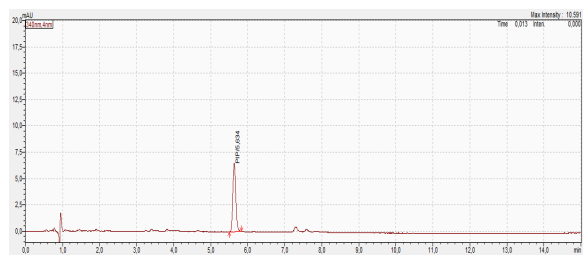


Slika 8.3. Kromatogrami kurkuminoida u uzorku DP 3 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju

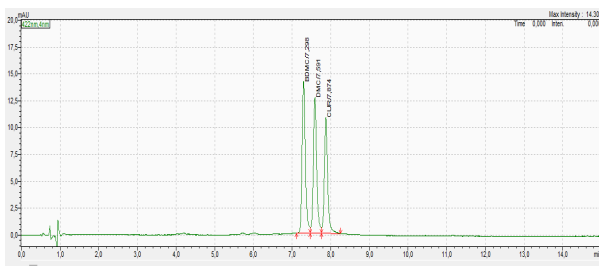
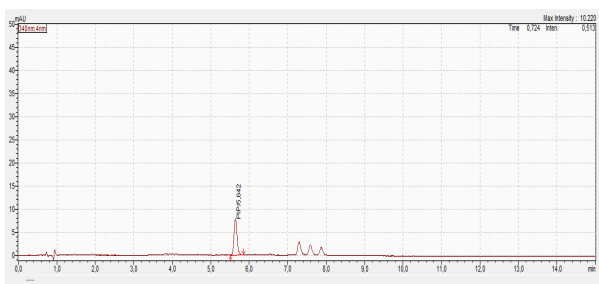
a) SDS



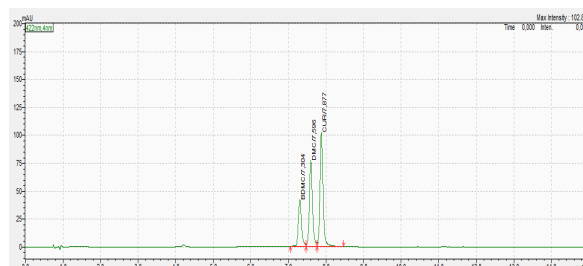
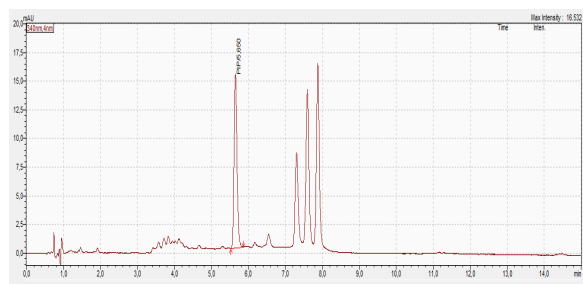
b) FaSSGF



c) FaSSIF



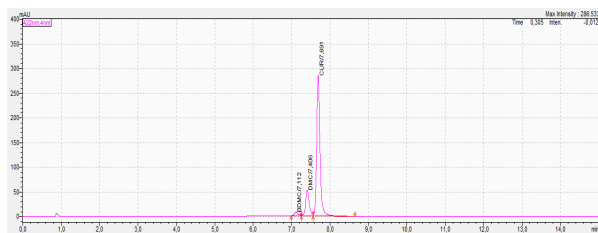
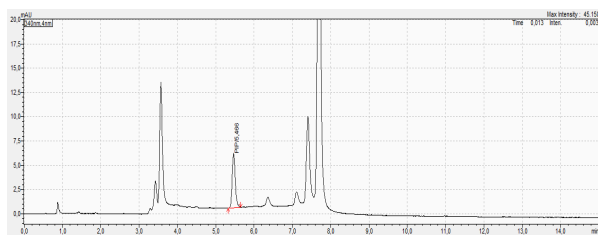
c) FeSSIF



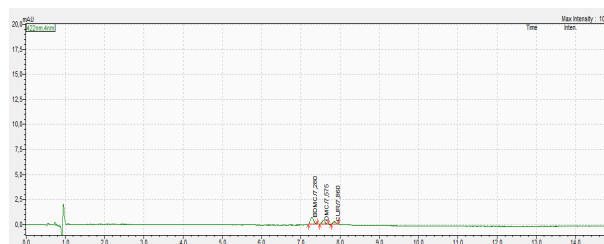
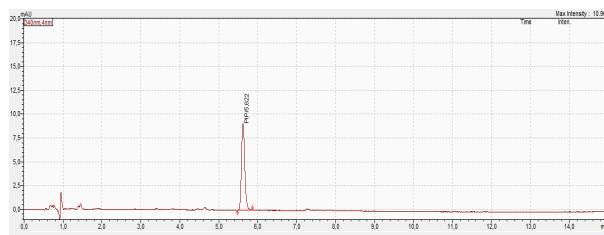
Slika 8.4. Kromatogrami piperina i kurkuminoida u uzorku DP 4 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FaSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.



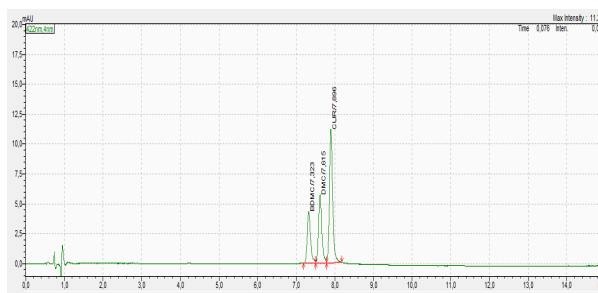
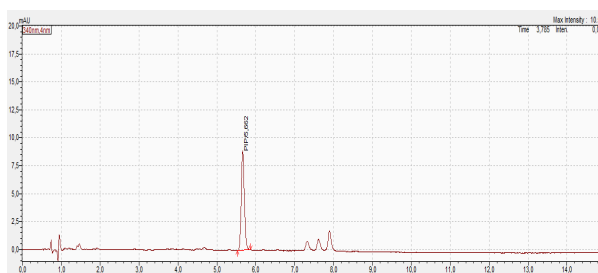
a) SDS



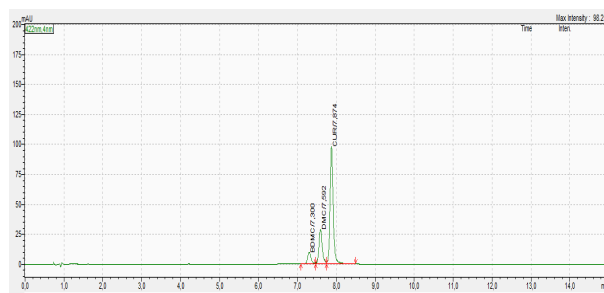
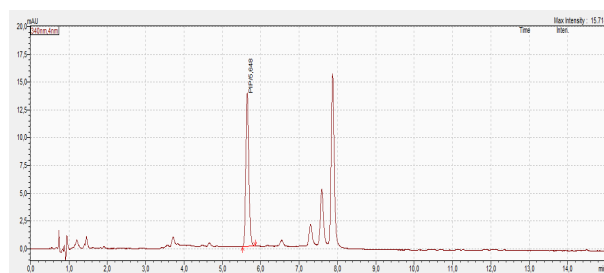
b) FaSSGF



c) FaSSIF

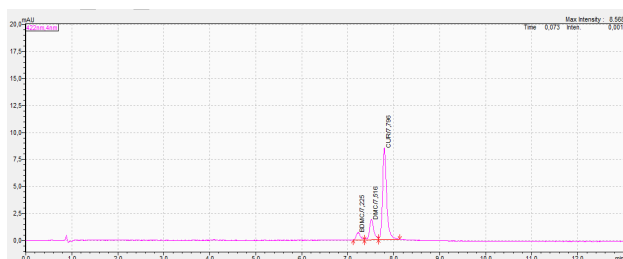


c) FeSSIF

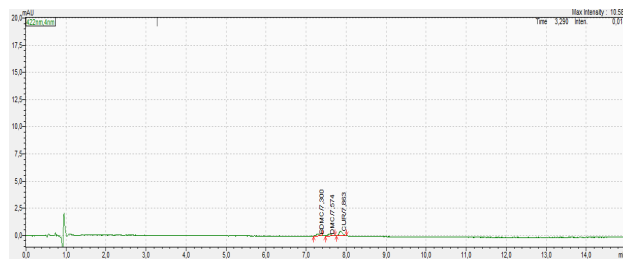


Slika 8.5. Kromatogrami piperina i kurkuminoida u uzorku DP 5 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FaSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

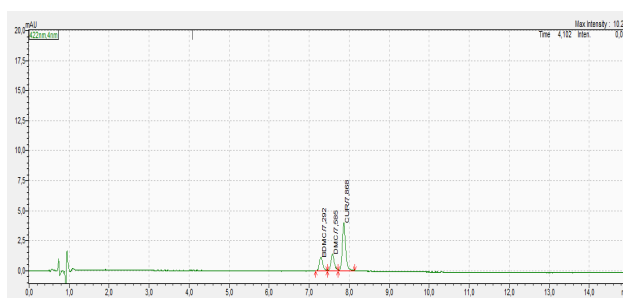
a) SDS



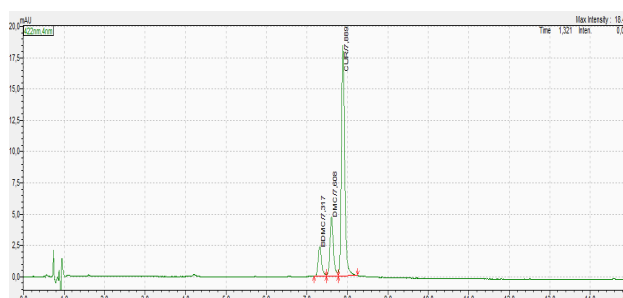
b) FaSSGF



c) FaSSIF

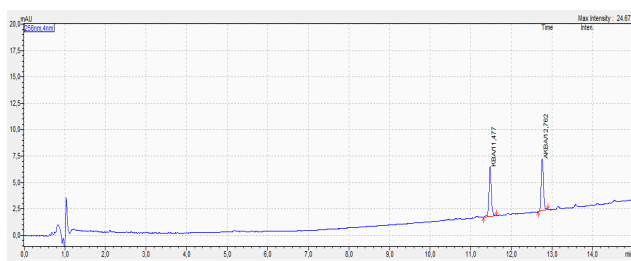


c) FeSSIF

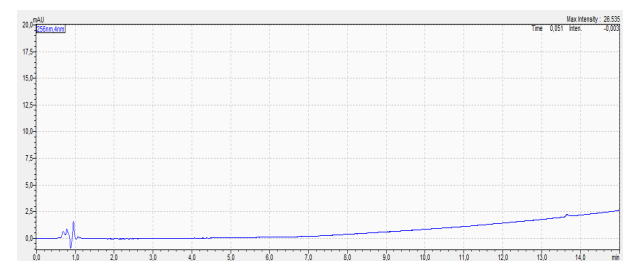


Slika 8.6. Kromatogrami kurkuminoida u uzorku DP 6 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

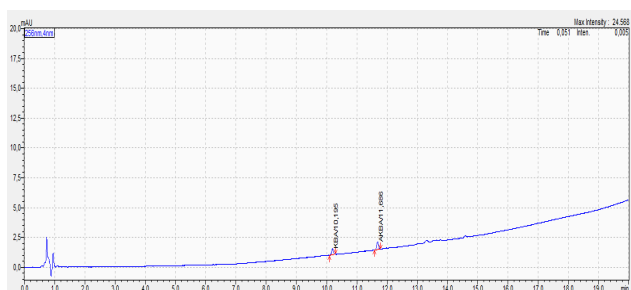
a) SDS



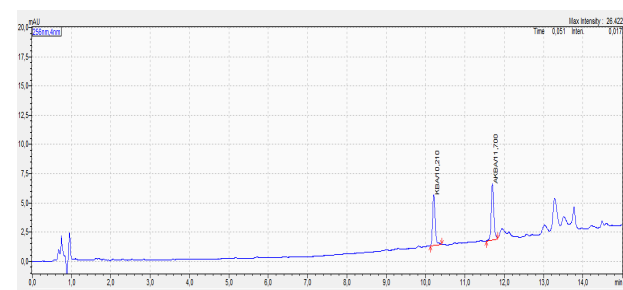
b) FaSSGF



c) FaSSIF

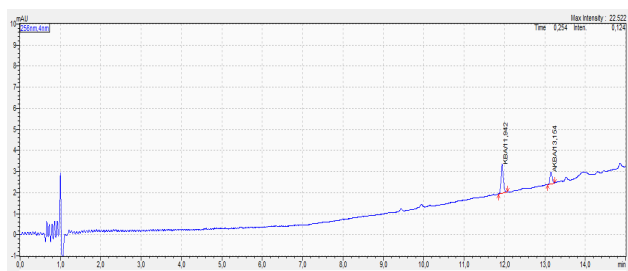


c) FeSSIF

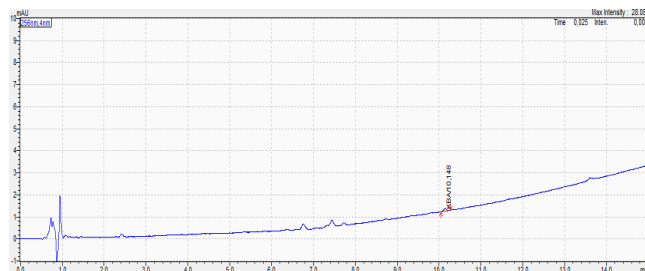


Slika 8.7. Kromatogrami bosveličnih kiselina u uzorku DP 7 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

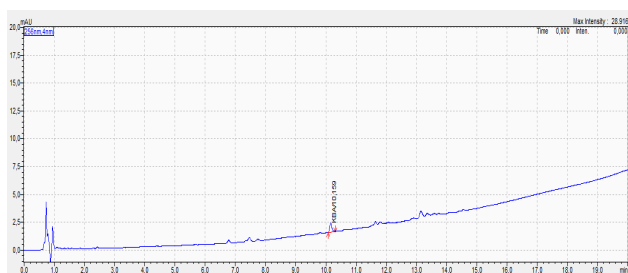
a) SDS



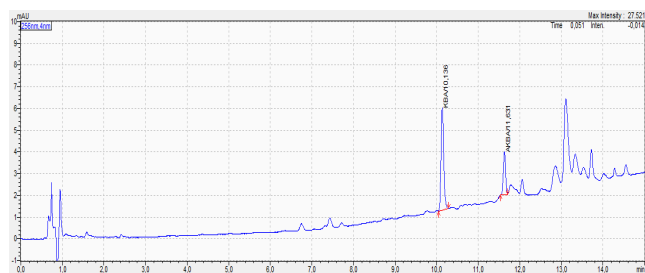
b) FaSSGF



c) FaSSIF

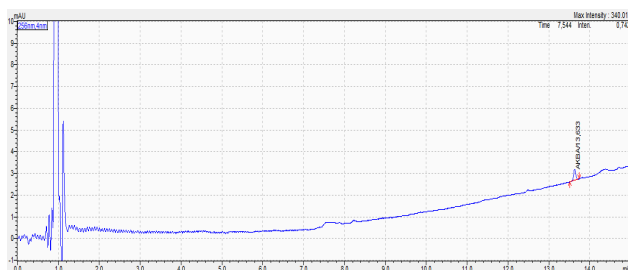


c) FeSSIF

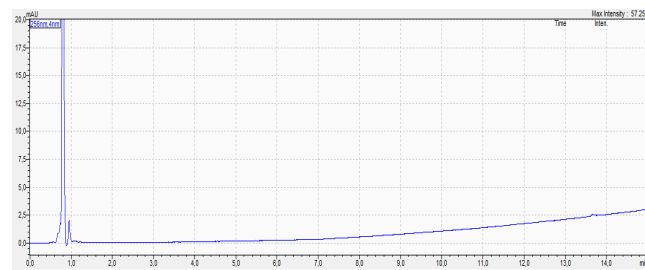


Slika 8.8. Kromatogrami bosveličnih kiselina u uzorku DP 8 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

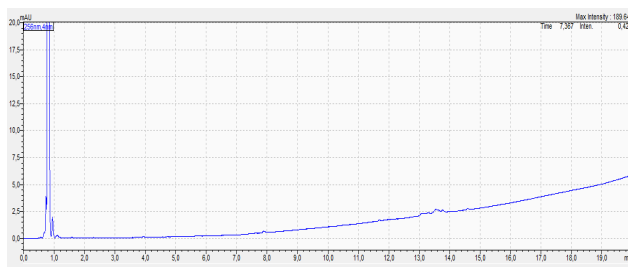
a) SDS



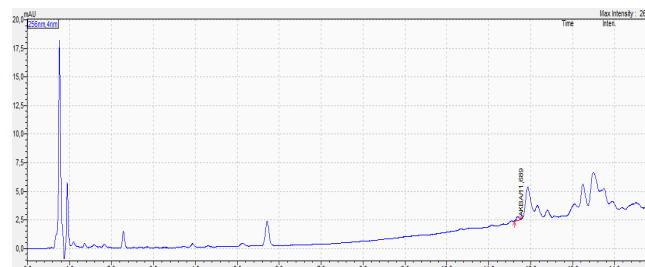
b) FaSSGF



c) FaSSIF

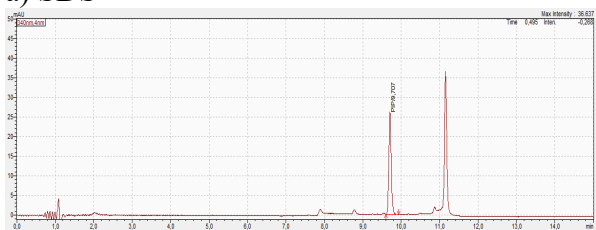


c) FeSSIF

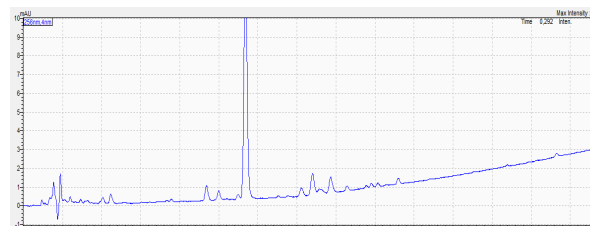
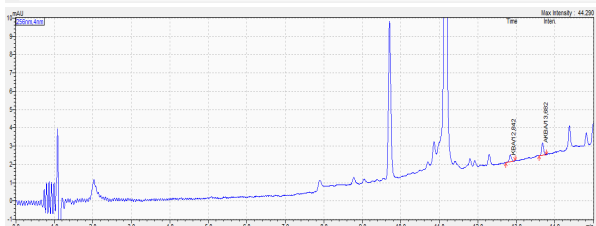
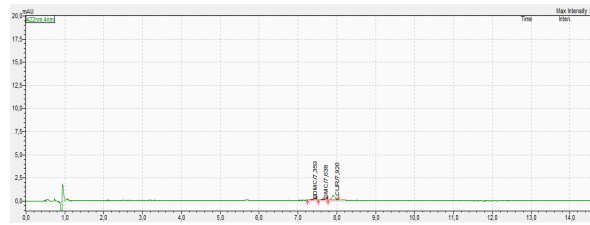
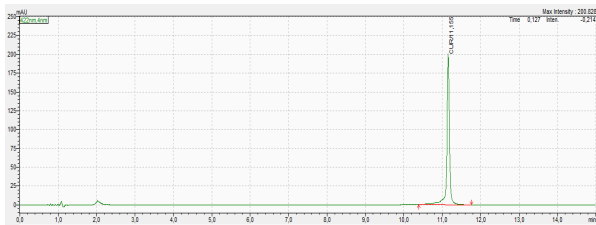
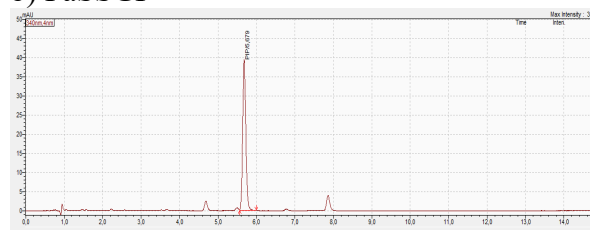


Slika 8.9. Kromatogrami bosveličnih kiselina u uzorku DP 9 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

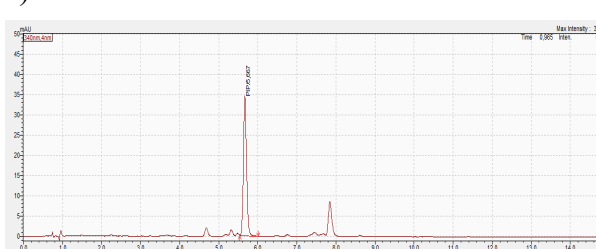
a) SDS



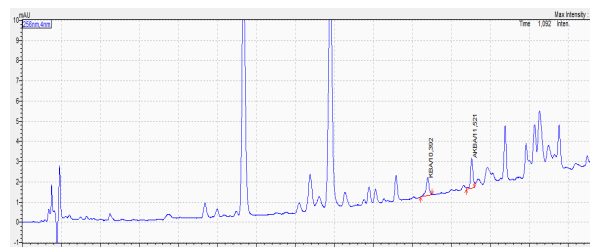
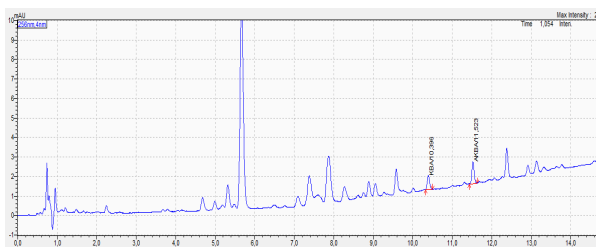
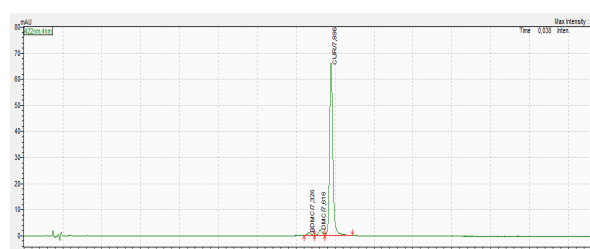
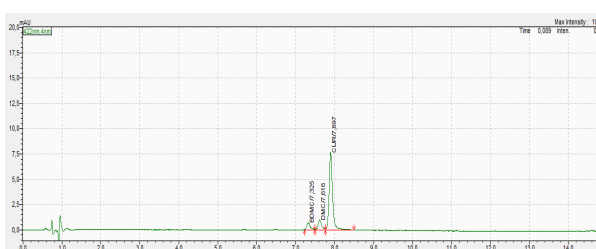
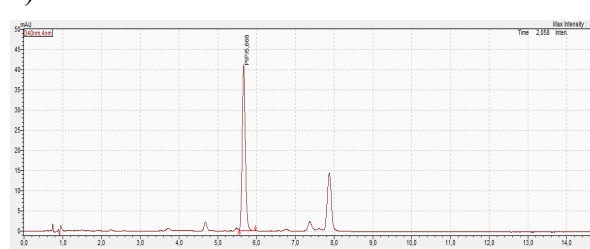
b) FaSSGF



c) FaSSIF

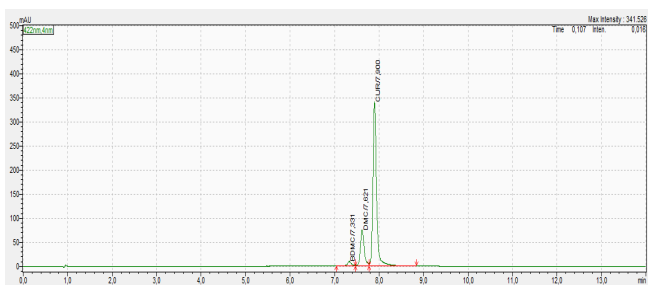


c) FeSSIF

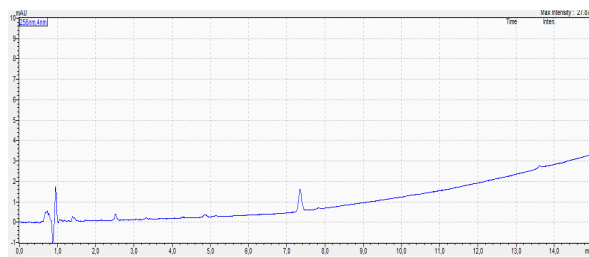
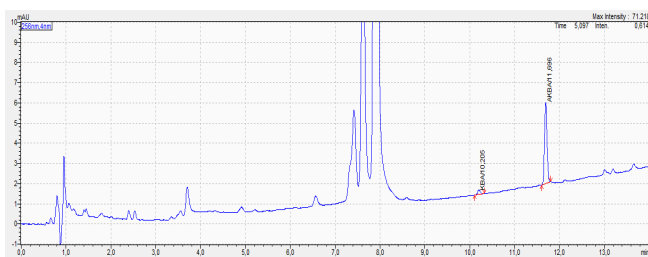
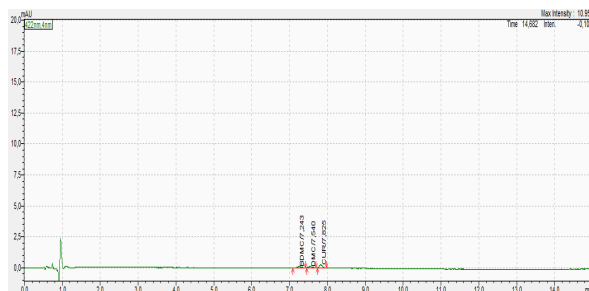


Slika 8.10. Kromatogrami kurkuminoida, bosveličnih kiselina i piperina u uzorku DP 10 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

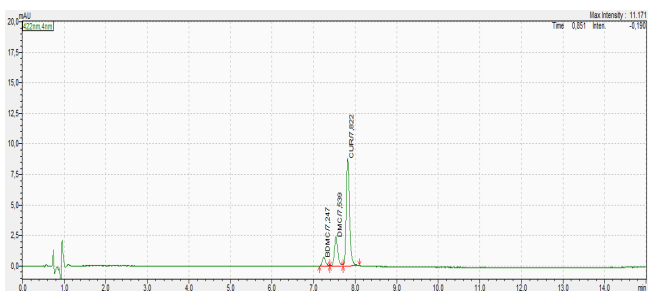
a) SDS



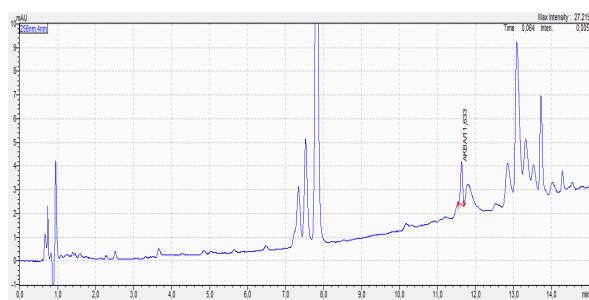
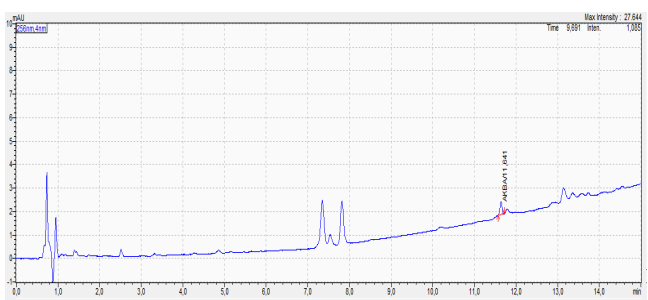
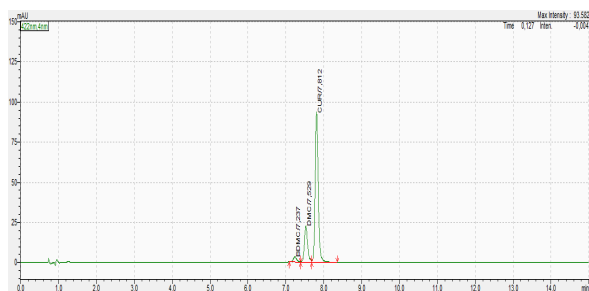
b) FaSSGF



c) FaSSIF

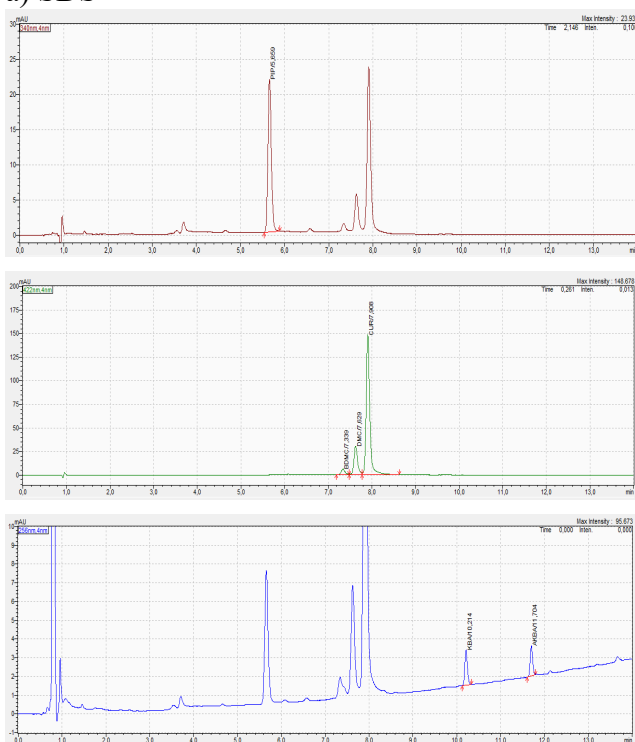


c) FeSSIF

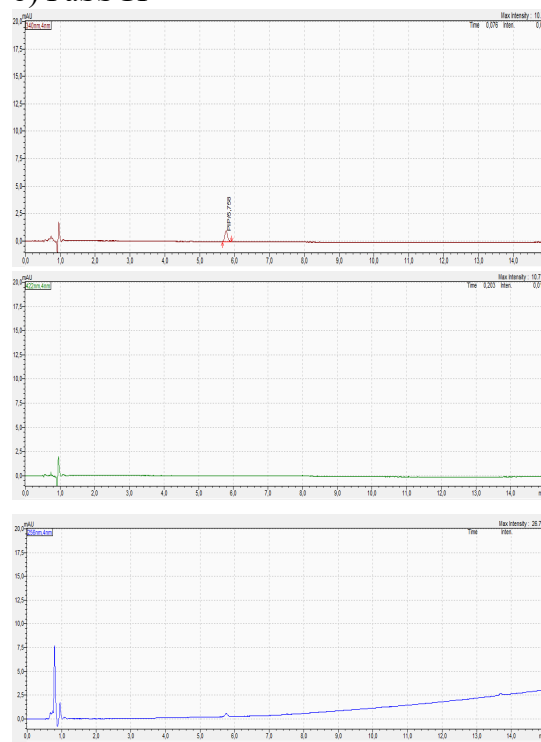


Slika 8.11. Kromatogrami kurkuminoida i bosveličnih kiselina u uzorku DP 11 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

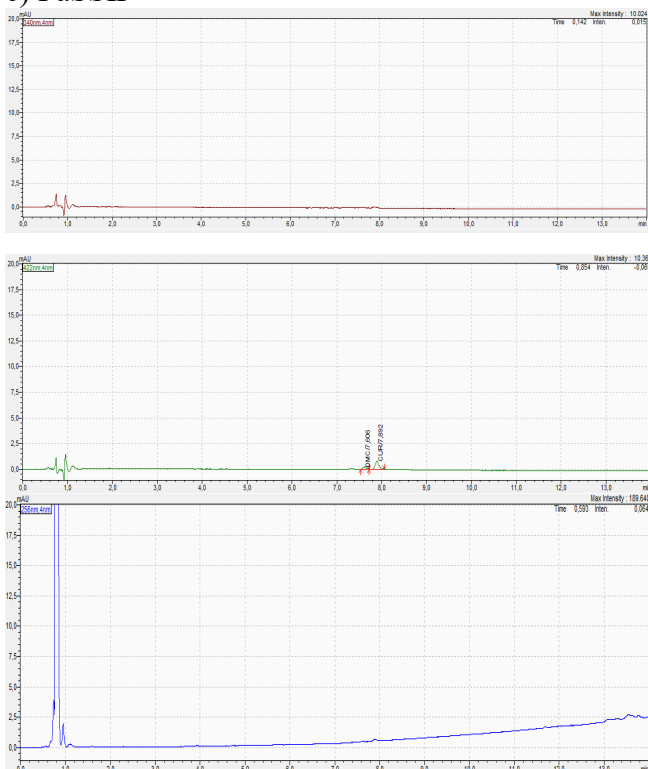
a) SDS



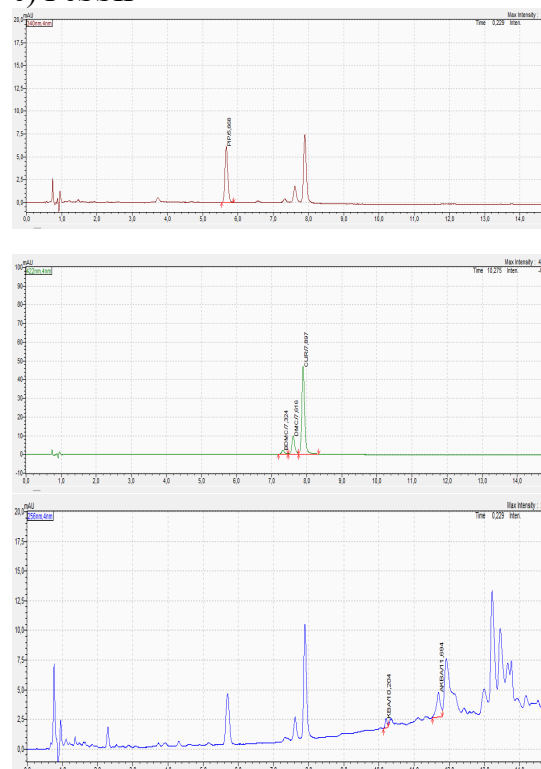
b) FaSSGF



c) FaSSIF

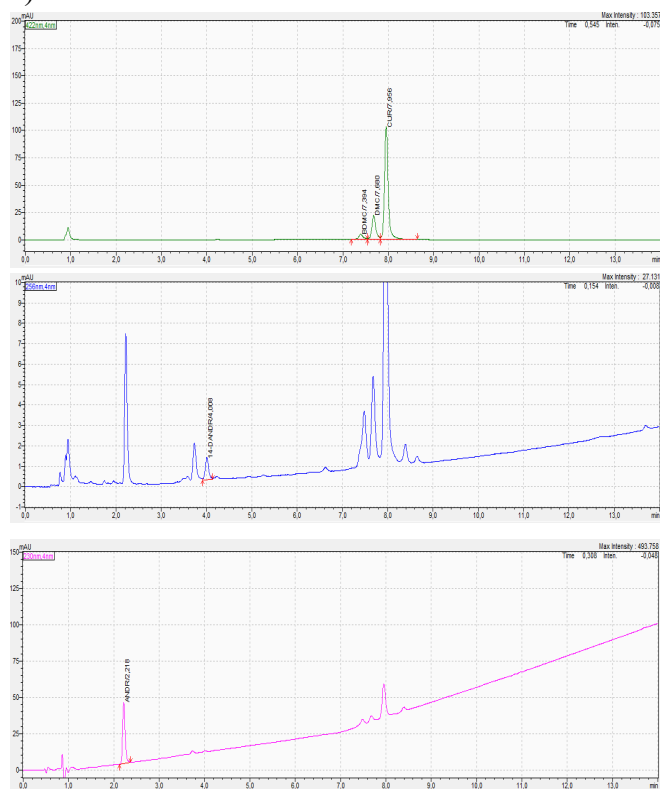


c) FeSSIF

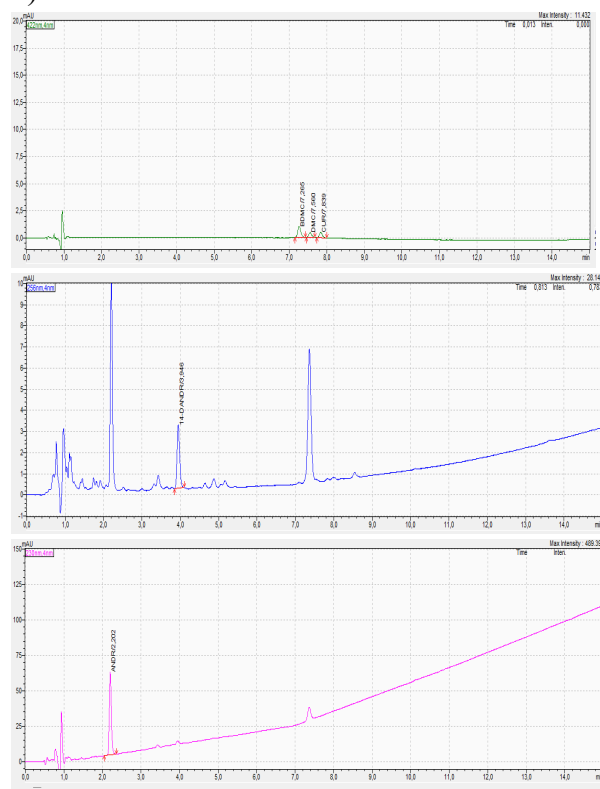


Slika 8.12. Kromatogrami kurkuminoida, bosveličnih kiselina i piperina u uzorku DP 12 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FaSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

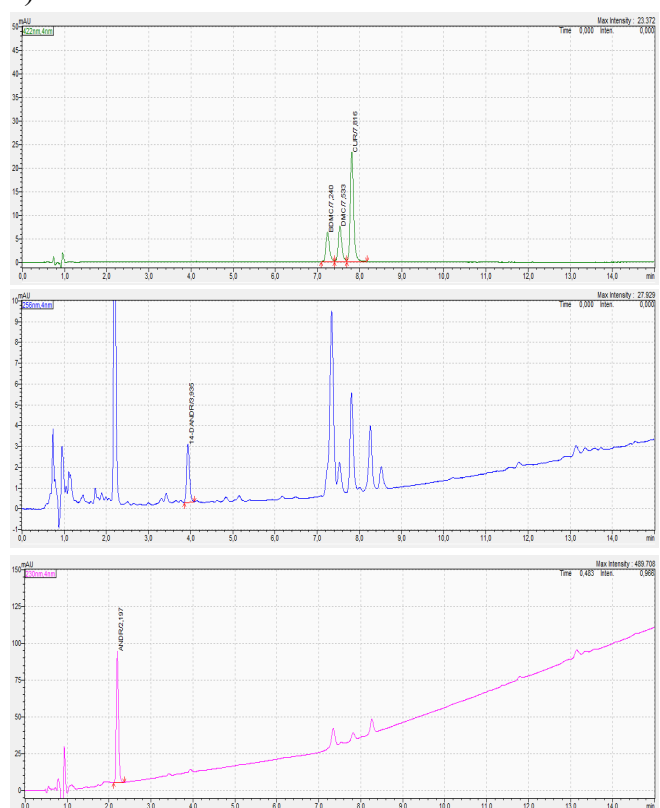
## a) SDS



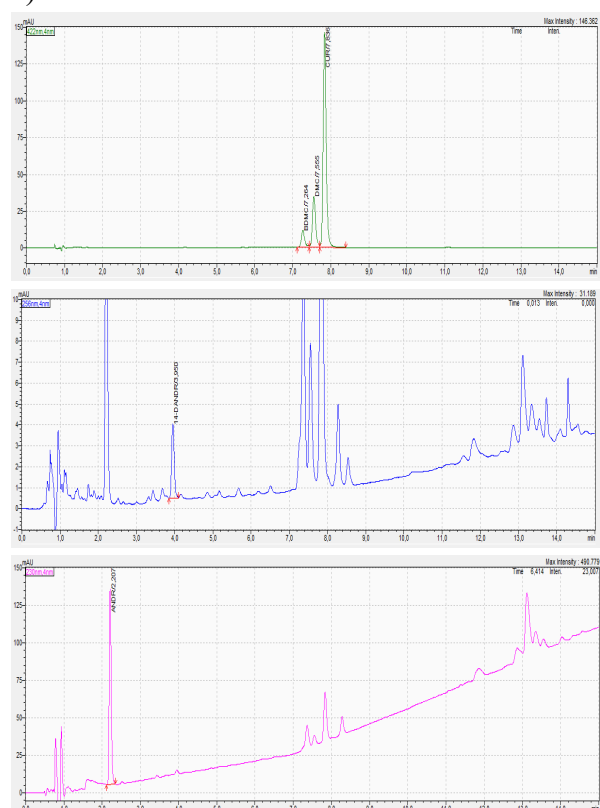
## b) FaSSGF



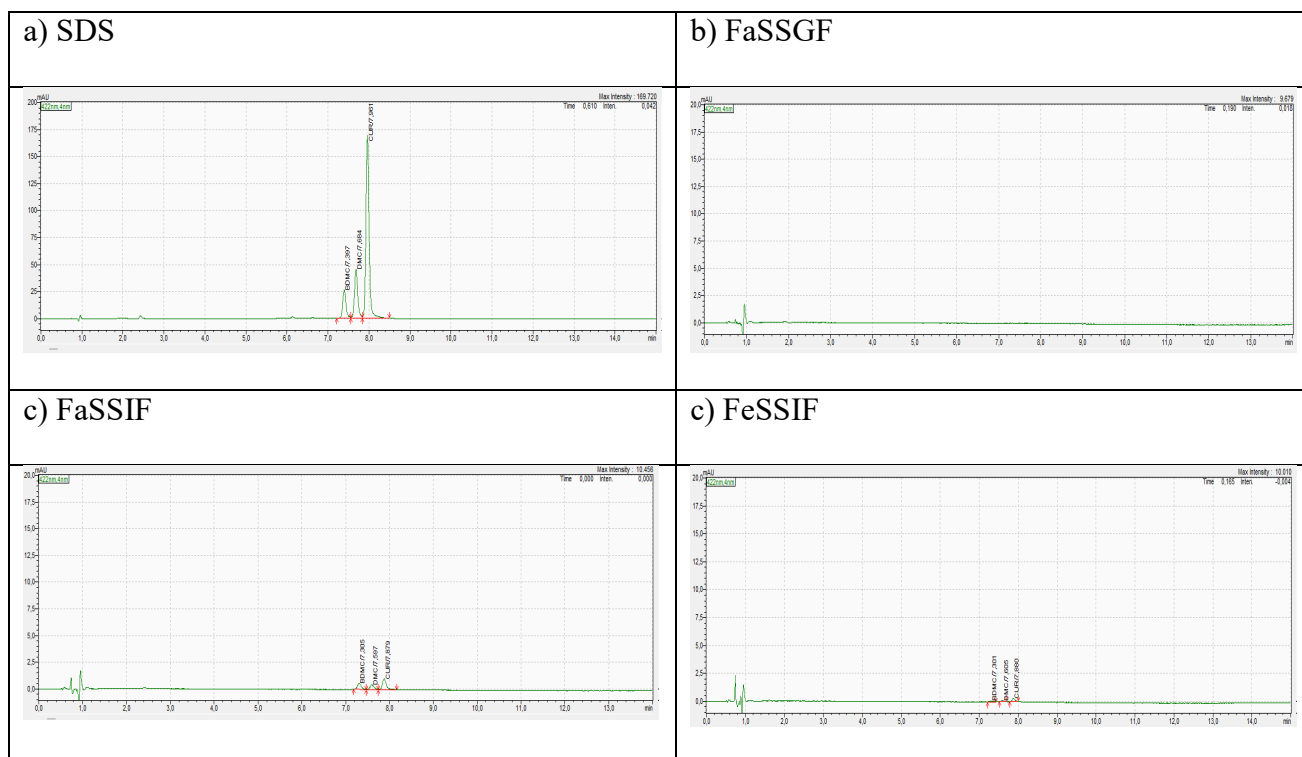
## c) FaSSIF



## c) FeSSIF

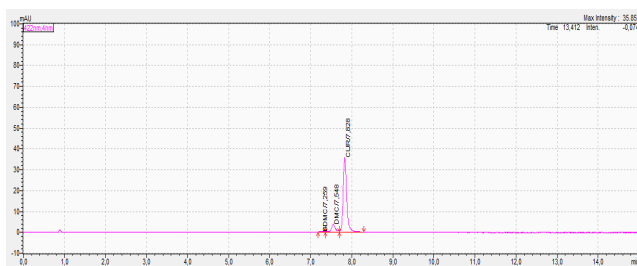


Slika 8.13. Kromatogrami kurkuminoida i andrografolida u uzorku DP 13 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

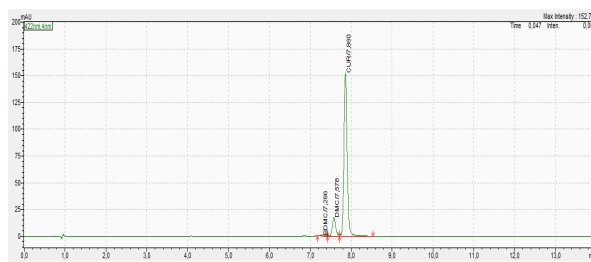


Slika 8.14. Kromatogrami kurkuminoida u uzorku DP 14 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

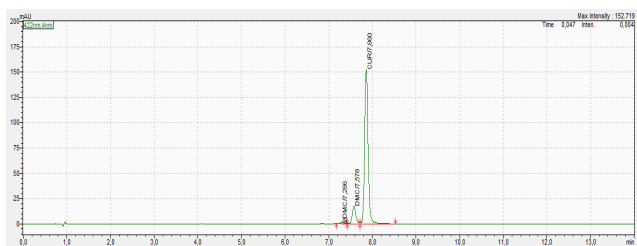
a) SDS



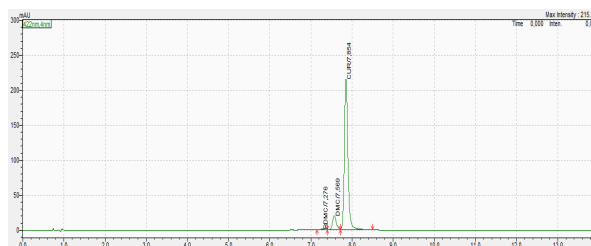
b) FaSSGF



c) FaSSIF

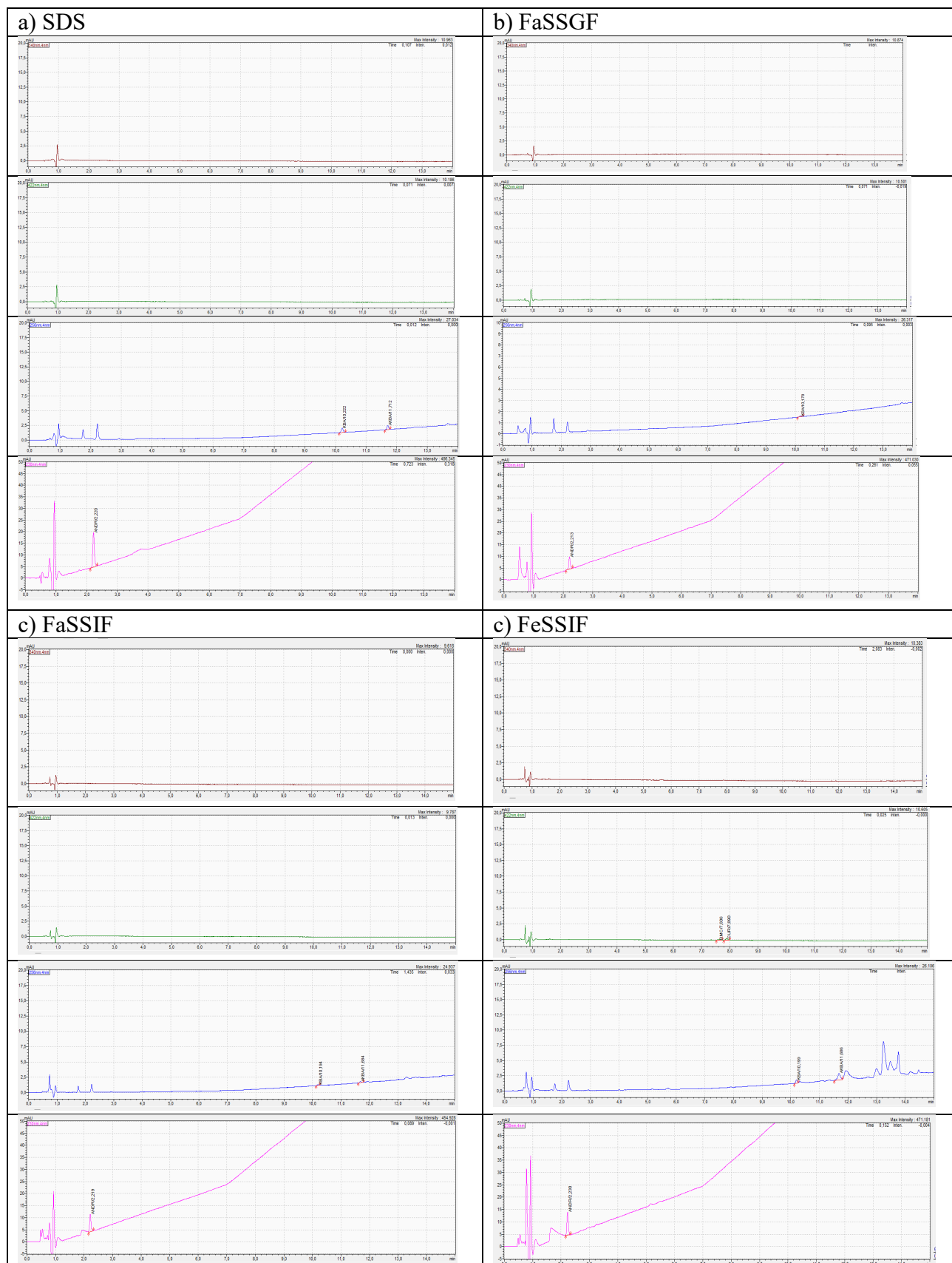


c) FeSSIF



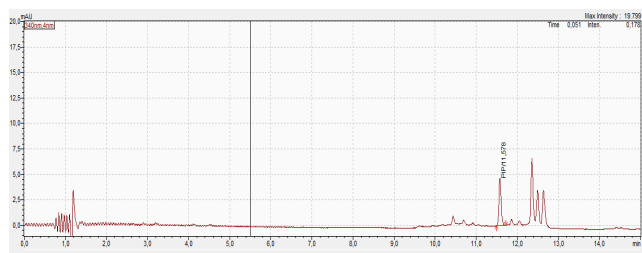
Slika 8.15. Kromatogrami kurkuminoida u uzorku DP 16 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.



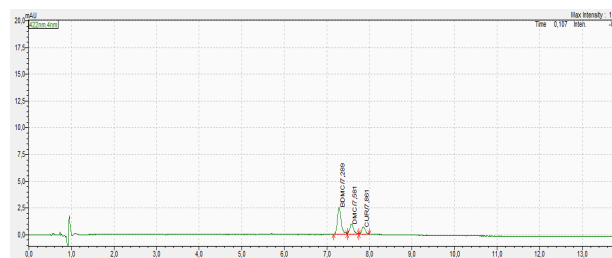
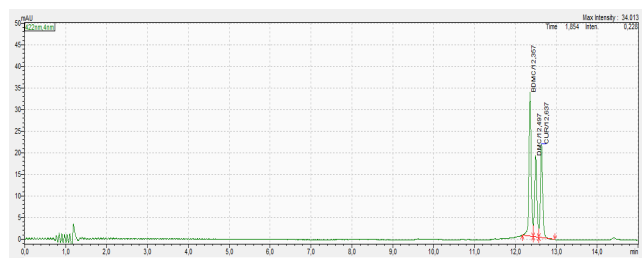
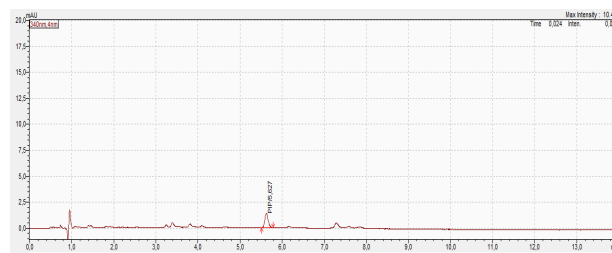


Slika 8.16. Kromatogrami kurkuminoida, bosveličnih kiselina, andrografolida i piperina u uzorku DP 15 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju

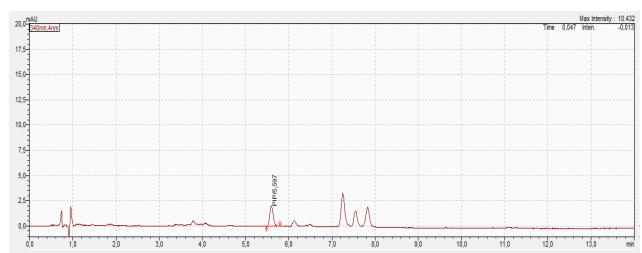
a) SDS



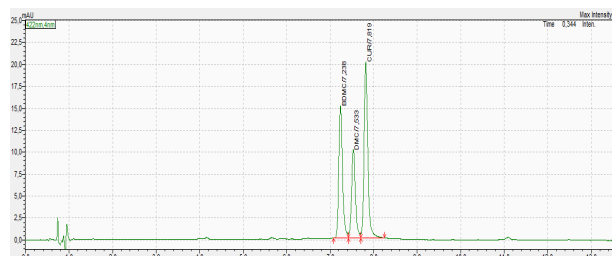
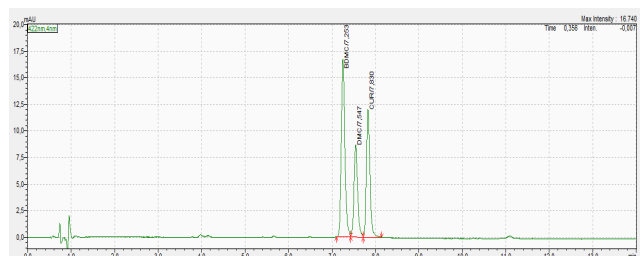
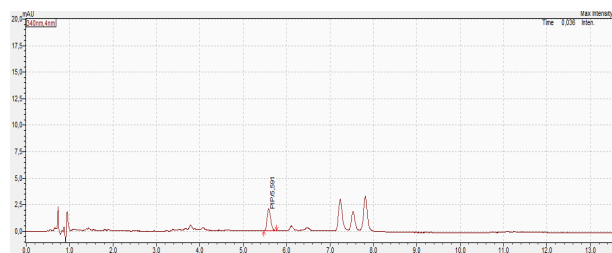
b) FaSSGF



c) FaSSIF

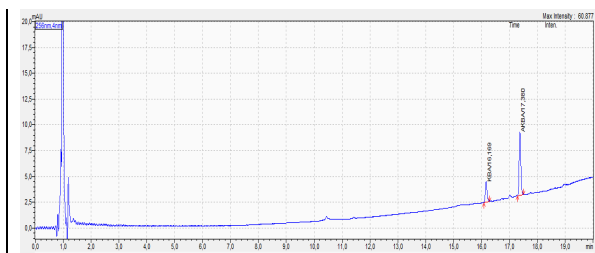


c) FeSSIF

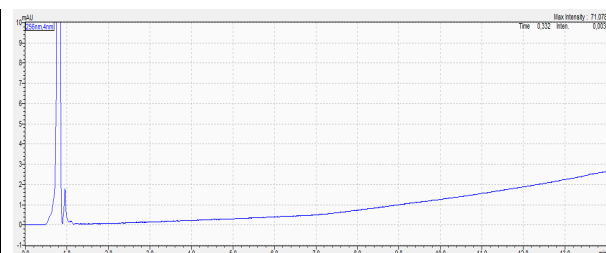


Slika 8.17. Kromatogrami kurkuminoida i piperina u uzorku DP 17 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FaSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju

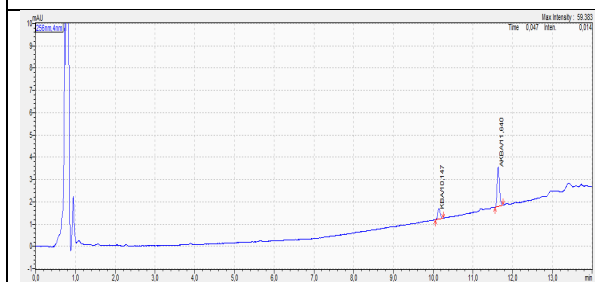
a) SDS



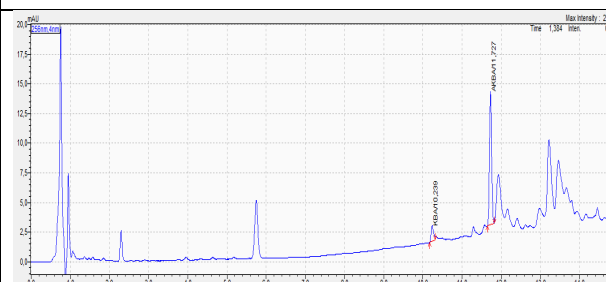
b) FaSSGF



c) FaSSIF

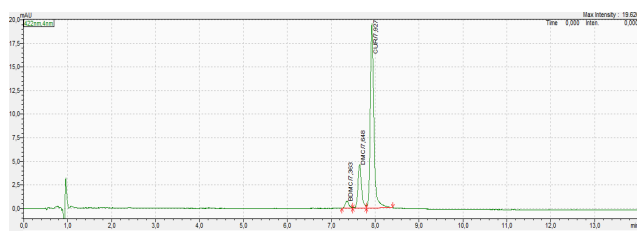


c) FeSSIF

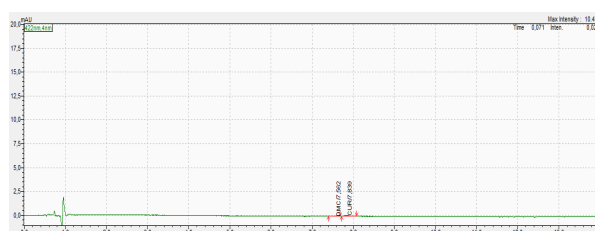


Slika 8.18. Kromatogrami bosveličnih kiselina u uzorku DP 18 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.

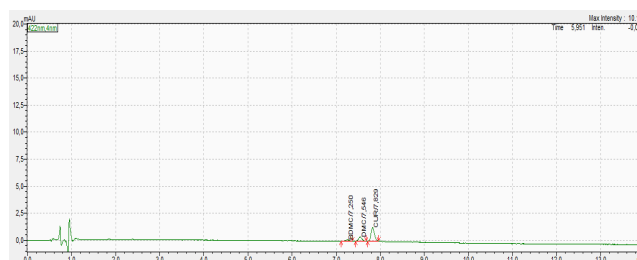
a) SDS



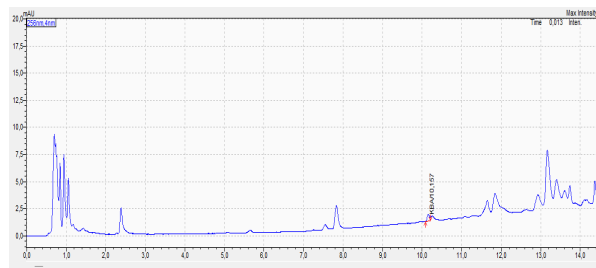
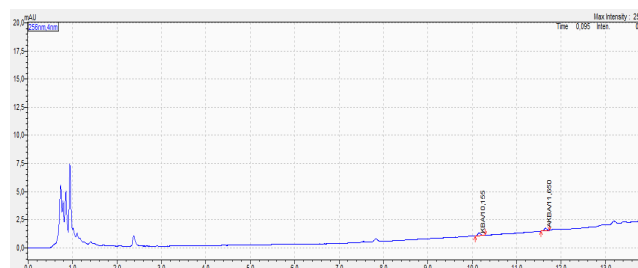
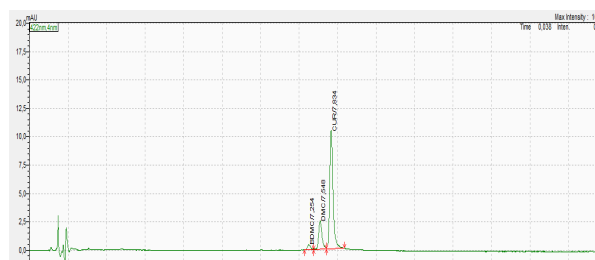
b) FaSSGF



c) FaSSIF



c) FeSSIF



Slika 8.19. Kromatogrami kurkuminoida i bosveličnih kiselina u uzorku DP 19 nakon 120 minuta oslobađanja u (a) SDS, (b) FeSSGF, (c) FeSSIF i (d) FaSSIF mediju.



## § 9. ŽIVOTOPIS

Snježana Zubčić rođena je 17. siječnja 1972. godine u Zagrebu. Završivši Kemijsko-tehnološki obrazovni centar u Zagrebu 1990. godine, upisuje Studij Kemije, smjer diplomirani inženjer kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji završava 1995. godine. Upisuje Magistarski studij kemije 1996. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (smjer: analitička kemija) kojeg završava 2001. stjecanjem zvanja magistra znanosti iz područja kemija. Na istom fakultetu 2013. godine upisala je Doktorski studij kemije (smjer: analitička kemija) koji trenutno završava.

Iste godine kada upisuje Magistarski studij, počinje poslovnu karijeru u Plivi, Istraživanje i razvoj - Razvoj lijekova na radnom mjestu istraživač-analitičar, 2000. godine prelazi u OTC diviziju na radno mjesto koordinatora razvoja novog proizvoda, a 2002.godine u Ured za inovativnost na radno mjesto suradnika za inovativnost. Poslovnu karijeru nastavlja 2004. godine u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode, u Službenom laboratoriju za kontrolu lijekova, gdje je do sada na radnom mjestu viši stručni savjetnik-specijalist II. Tijekom rada u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode bila je uključena u rad kao član radnih grupa u European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) „Revision of OMCL Guideline 'Qualification of LC equipment“ i GL "Handling and Use of Non-Compendial RS" te je trenutno aktivni član radne grupe u EDQM "Falsified Medicines"

U navedenom razdoblju objavila je 4 znanstvena rada i jedan stručni rad te sudjelovala na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima s preko deset kongresnih priopćenja. Osim toga, komentorica je jednog diplomskog rada.

Izvorni znanstveni radovi:

1. D. Amidžić Klarić, J. Kovačić, M.-L. Jeličić, S. Zubčić, V. Stankov, M. Gulan Čičak, B. Bučar, I. Klarić, A. Mornar: „Assesment of Physicochemical Parameters and Contaminants in Herbal Dietary Supplements Used in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease“, *Pharmaceuticals*, 16 (2023), 6; 893, 18 doi:10.3390/ph16060893
2. Ž. Davosir Klarić, A. Hafner, S. Zubčić, M. Dürriegl, J. Filipović-Grčić, Jelena: "Spray-dried Microspheres Based on Chitosan and Lecithin Cyclosporin A Delivery System", *Chemical and biochemical engenering quartely*, 26 (2012), 4; 355-364

3. J. Cvek, M. Medić-Šarić, I. Jasprica, S. Zubčić, D. Vitali, A. Mornar, I. Vedrina-Dragojević, S. Tomić, „Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of Croatian propolis tinctures“, *Phytochem. Anal.*, 18 (2007), 451-459
4. S. Zubčić, B. Krauthacker, „Analysis of PCBs in human milk collected in Zagreb, Croatia“, *FEB*, 13 (2004), 346-352

**Izvorni stručni radovi:**

1. M. Begić, S. Zubčić, R. Truban Žulj, S. Tomić: „Metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu u dodatcima prehrani za erektilnu disfunkciju“, *Farmaceutski glasnik : glasilo Hrvatskog farmaceutskog društva*, 75 (2019), 1-14

**Osobna usmena priopćenja na znanstvenim skupovima:**

1. S. Zubčić: "Development and validation HPLC-UV-MS method for identification and quantification of phosphodiesterase 5 inhibitors in dietary supplements for erectile dysfunction", 19th International Chromatography school, 10-11.06.2019, Zagreb

**Posterska priopćenja na znanstvenim skupovima:**

1. S. Zubčić, J. Kovačić, I. Klarić, A. Mornar, S. Tomić, D. Amidžić Klarić: "Dissolution Of Biologically Active Components From Herbal Capsules Used In The Treatment Of Inflammatory Bowel Diseases Under Standard And Biorelevant Test Conditions", *HPLC2023*, 18-23.06.2023., Düsseldorf, Njemačka
2. S. Zubčić, J. Kovačić, M.-L. Jeličić, I. Klarić, A. Mornar, S. Tomić, D. Amidžić Klarić: "Biorelevant dissolution of biologically active components from herbal tablets used in the treatment of inflammatory bowel diseases", 7th PhD Student Symposium, 21-22.04.2023., Zagreb
3. S. Zubčić, V. Marković, S. Tomić: "Selection of the most appropriate stationary phase for chromatographic determination of components of similar polarity in method development", 48th International Symposium on HPLC separations and related techniques, 16-20th 6.2019, Milano, Italija

4. S. Zubčić, M. Filipec, R. Truban Žulj, Ž. Davoris-Klarić: "OOS: investigation: when analysis has gone wrong", World Congress of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 75th International Congress of FIP, 29.11.-03.10.2015, Düsseldorf, Njemačka
5. S. Zubčić, T. Horvacki Zivalov, R. Truban Žulj: "Determination of Corticosteroids in Herbal Cream", ISC2014, 16.09.-20.09.2014., Salzburg, Austrija
6. S. Zubčić, S. Oštarčević, R. Truban Žulj: "Counterfeits in dietary supplements in Croatian market", World Congress of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 73rd International Congress of FIP, 31.08.-05.09.2013, Dublin, Irska
7. S. Zubčić, S. Tomić: „Validacija metode za određivanje raspodjele veličine molekula u cjepivu protiv meningokoka grupe A i C“, Četvrti hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem, 27. – 30. 5. 2010., Opatija
8. Ž. Davosir Klarić, A. Hafner, S. Tomić, S. Zubčić, J. Filipović-Grčić: „Spray-dried chitosan microspheres with lecithin nanocores as cyclosporin A delivery system“, 7th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Bodelivery Systems, 18.-20.09.2008., Ljubljana, Slovenija
9. M. Medić-Šarić, J. Cvek, I. Jasprica, S. Zubčić, A. Mornar: „Validation of spectrophotometric for determination of flavonoids in propolis“, 53rd Annual meeting of the Society of Medical Plant Research, 21.-25.2008., Firenca, Italija
10. S. Zubčić, B. Krauthacker: „Analysis of PCBs in human milk collected in Zagreb, Croatia“, 2nd PCB Workshop, 07.-11.05.2002., Brno, Češka
11. S. Zubčić, B. Krauthacker, M. Kralj: „Distribution of PCB congeners in human milk“, 1st Croatian Toxicological Congress CROTOX'96 (sa međunarodnim sudjelovanjem), 17.-19.04.1996., Zagreb

Mentorstvo kao neposredni voditelj:

1. M. Matičević, „Utjecaj ekstrakcijskog otapala na određivanje odabranih kortikosteroida u prirodnim dermatološkim proizvodima, 2017., diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb