

Fizikalno-kemijska karakterizacija dodataka prehrani koji se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva

Perko, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:929744>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Matea Perko

**Fizikalno-kemijska karakterizacija dodataka
prehrani koji se koriste u terapiji upalnih bolesti
crijeva**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk.

Izrada diplomskog rada financirana je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost projektom "Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari koje se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva" (HRZZ-UIP-2017-05-3949) voditeljice prof. dr. sc. Ane Mornar Turk te sredstvima projekta KK.01.1.1.02.0021.



SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Upalne bolesti crijeva	1
1.1.1. Definicija i podjela	1
1.1.2. Epidemiološki podaci.....	1
1.1.3. Patofiziologija i etiologija IBD-a	2
1.1.4. Liječenje upalnih bolesti crijeva.....	3
1.1.5. Dodaci prehrani koji se koriste u liječenju IBD-a.....	4
1.2. USP ispitivanja u kontroli kvalitete dodataka prehrani	6
1.2.1. Ispitivanje tečenja prašaka.....	6
1.2.2. Ispitivanje varijacije mase dozirnih oblika.....	8
1.2.3. Ispitivanje raspadljivosti	8
1.2.3. Ispitivanje pucanja mekih kapsula	10
1.2.4. Ispitivanje rastrošljivosti	11
1.2.5. Ispitivanje sile loma tablete.....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Uzorci	15
3.2. Ispitivanje tečenja prašaka – nasipna gustoća i gustoća nakon protresivanja	16
3.3. Ispitivanje varijacije mase dozirnih oblika	17
3.4. Ispitivanje raspadljivosti	17
3.5. Ispitivanje pucanja mekih kapsula	17
3.6. Ispitivanje rastrošljivosti	18
3.7. Ispitivanje sile loma tableta	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA	26
8. SAŽETAK/SUMMARY	31

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic documentation card

1. UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

1.1.1. Definicija i podjela

Idiopatske upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) heterogena su skupina autoimunih bolesti koje karakterizira kronično ili relapsno upalno stanje u gastrointestinalnom traktu. Dijele se u dvije glavne forme, ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC) i Chronovu bolest (engl. *Crohn's disease*, CD). S obzirom na raznolikost manifestacija bolesti u populaciji, može se reći da te dvije bolesti predstavljaju dva kraja spektra upalnih bolesti crijeva (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006). Nerazjašnjenog su entiteta, vrlo raznolike kliničke slike, izazovne u liječenju i rastuće incidencije i prevalencije (Molodecky, 2012). Obično ih karakteriziraju abdominalni bolovi, dijareja, krv u stolici, gubitak tjelesne mase, upala i ulceracije koje nastaju kao posljedica autoimunosti (Guan, 2019).

Razlikuju se po prirodi i lokalizaciji upale. CD može diskontinuirano transmuralnom upalom zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi, dok se UC ograničava na epitelne stanice debelog crijeva (Fakhoury i sur., 2014). Rijetko, može se raditi o vrlo sličnoj kliničkoj slici na rubu spektara CD-a i UC-a po kojoj ih je nemoguće diferencirati. Takvo se stanje naziva neklasificirana IBD koja ne predstavlja zaseban entitet bolesti nego privremenu dijagnozu koja podrazumijeva da će se daljnjom obradom utvrditi kojoj formi IBD-a pripada (Odze, 2015). Iako bolesti iz spektra IBD-a primarno zahvaćaju bilo koji dio probavne cijevi od usne šupljine do anusa, često su vidljive specifične patološke promjene na mnogim drugim organima (koža, oči, zglobovi) koje skupno nazivamo ekstraintestinalne manifestacije (EIM) (Vucelić i Čuković-Čavka, 2006).

1.1.2. Epidemiološki podaci

Otprilike 0,2 % europske populacije boluje od neke IBD. Incidencija UC-a dvostruko je veća od incidencije CD-a, a prevalencija i incidencija obiju u općoj populaciji kontinuirano rastu. Najveća incidencija IBD-a je u populaciji od 20. do 40. godine života. Polovica pacijenata s CD-om i 20-50 % pacijenata s UC-om bude hospitalizirano barem jednom u pet godina. Unutar pet godina, 10-30 % pacijenata s CD-om i 5-10 % pacijenata s UC-om podvrgnu se kirurškom liječenju. Mortalitet osoba s CD-om nešto je viši nego u općoj populaciji, dok UC nije povezan s povišenim mortalitetom. Rizik razvoja kolorektalnog karcinoma kod pacijenata oboljelih od UC-a dvostruko je veći nego u općoj populaciji, dok je kod oboljelih od CD-a usporediv s onim u općoj populaciji. Obje skupine su pod većim rizikom od razvoja hematoloških, plućnih i

kožnih karcinoma (Zhao, 2021). Lönnfors i suradnici (2014) proveli su anketno ispitivanje na uzorku od 4670 pacijenata oboljelih od IBD-a u svrhu prikaza kvalitete života s IBD-om iz perspektive pacijenata. Iz rezultata jasno je vidljiv negativan utjecaj bolesti na kvalitetu privatnog, poslovnog i socijalnog aspekta života. Troškovi zdravstva za liječenje IBD-a u stalnom su porastu na što najveći učinak imaju rastuća incidencija i visoke cijene moderne terapije (Park, 2018).

1.1.3. Patofiziologija i etiologija IBD-a

Slični se čimbenici, poput intrinzične genetske predispozicije, vremenske povezanosti s progresivnim promjenama u okolišu, postojanja bogate crijevne flore i pretjeranog imunskog odgovora, nalaze pozadini UC-a i CD-a. Uočen je značajan okolišni utjecaj na upalne bolesti crijeva putem faktora kao što su prehrana, droge, društveni i socijalni status, geografski smještaj, stres, pušenje i sl. Saznanje da pušenje povećava rizik od CD-a i relapsa bolesti, a djeluje kao zaštitni faktor prema UC-u, ukazuje na različitu patofiziološku pozadinu dvaju stanja. Intrinzična genetska predispozicija pokazala se kao osnovni preduvjet razvoja obaju stanja unatoč djelovanju okolišnih faktora (Danese, 2006).

Razdoblje modernih genetičkih istraživanja IBD-a započelo je 2001. godine otkrićem NOD2 gena, prvog gena čiji se polimorfizam CARD15 povezao s razvojem CD-a. Gen NOD2 kodira protein opisan kao unutarstanični receptor koji prepoznaje muramildipeptid (MDP). Stimulacija MDP-om inducira autofagiju koja kontrolira replikaciju bakterija i prezentaciju antigena te modulira urođeni i stečeni imunski odgovor. NOD2 također sudjeluje i u putevima neovisnim o MDP-u poput regulacije T staničnog odgovora (Zhang, Yu Li, 2014.). Pogrešnim prepoznavanjem crijevne mikroflore u osoba s mutacijama NOD2 nastaje neadekvatan imunski odgovor koji rezultira upalnim promjenama u probavnoj cijevi. Moguće je da zbog mutiranog NOD2 gena dolazi i do promjene u sekreciji antimikrobnih peptida defenzina gena što dovodi do povećane gustoće bakterija u kriptama terminalnog ileuma i time još veće stimulacije imunskog sustava (Thomson, 2012; Vucelić, Čurković-Čavka, 2006).

Identificirani su i potvrđeni i mnogi drugi lokusi koji su povezani s IBD-om poput IBD5, IL23R i ATG16L1. Genske varijante za koje je utvrđeno da povećavaju rizik obolijevanja od CD ukazuju na važnost urođenog imuniteta, autofagije i fagocitoze u njezinoj patogenezi. Osim toga, identificirani su višestruki međugenski segmenti povezani s bolešću koji impliciraju nove gene i puteve koji utječu na fenotip bolesti (Xavier, 2007). Više od 50 % lokusa osjetljivih na IBD povezuju se i s drugim upalnim i autoimunim bolestima (Khor, 2011).

Potkrijepljeno genetskim istraživanjima, upalne bolesti crijeva danas se smatraju posljedicom poremećenog imunskog odgovora na bakterijsku mikrofloru koja prolazi lumenom crijeva susceptibilnih osoba. CD i UC razlikuju se po tipu imunskog odgovora za što su dokaz i patohistološke promjene poput granuloma u CD-u i neutrofilne infiltracije s epitelnom destrukcijom u UC-u. Kod CD-a radi se o Th1 stanično posredovanom tipu imunskog odgovora, a kod UC-a o Th2 tipu imunskog odgovora koji obično generira humoralni imunski odgovor, no uočljiva su i preklapanja (Vucelić, Čurković-Čavka, 2006). Studije impliciraju da u patogenezi IBD-om značajnu ulogu ima neispravna regulacija imunskog odgovora posredovana CD4+ T stanicama koja se povezuje s razornim djelovanjem imunskog sustava na crijevni lumen. Lezije i imunske promjene ukazuju na disfunkcionalnost regulatornih mehanizama koji održavaju toleranciju na komponente mikroflora (Thomson, 2012).

1.1.4. Liječenje upalnih bolesti crijeva

Prije samog medikacijskog liječenja IBD-a potrebno je: postaviti točnu dijagnozu, definirati fenotip bolesti, odrediti proširenost i aktivnost bolesti, utvrditi postojanje EIM-a te ocijeniti djelotvornost ranije korištene terapije. Osnovni cilj terapije godinama je bio kontrola simptoma i uvođenje u remisiju. Koristio se tzv. *step-up* pristup u liječenju što znači da se najsigurnija terapija koristila u ranoj fazi bolesti, a izostankom odgovora ili pojavom toksičnosti prelazilo se na sljedeću terapiju. Pokazalo se da takav pristup rezultira progresijom bolesti i razvojem komplikacija pa je postupak procjene djelotvornosti terapije i prelazak na sljedeću ubrzan (tzv. akcelerirani *step-up* pristup). Započinjanje terapije najdjelotvornijim lijekovima, odnosno *top-down* pristup, zasad nije prihvaćen zbog opasnosti da se pacijenta čija će bolest biti blaga i neprogresivna nepotrebno liječi monoklonskim protutjelima (Vucelić i sur, 2013).

Terapija dostupna u liječenju IBD-a može se podijeliti na konvencionalnu i biološku. U konvencionalnu terapiju ubrajamo aminosalicilate (sulfasalazin, olsalazin, balsalazid, mesalazin), glukokortikoide (prednizon, prednizolon, hidrokortizon i budesonid), analoge purina (azatioprin i 6-merkaptopurin) te metotreksat, dok u biološku terapiju spadaju infliksimab, adalimumab, certolizumab, golimumab, natalizumab, vedolizumab, ustekinumab i tofacitinib (Milaković i Urek, 2020). Europska organizacija za Chronovu bolest i kolitis (engl. *European Crohn's and Colitis Organisation*, ECCO) izdaje i redovito ažurira smjernice za liječenje CD-a i UC-a čija je svrha osigurati informacije temeljene na dokazima svim zdravstvenim djelatnicima koji skrbe o pacijentima oboljelim od IBD-a (ECCO, 2022).

1.1.5. Dodaci prehrani koji se koriste u liječenju IBD-a

Postizanje remisije kao glavni cilj u liječenju IBD-a danas podrazumijeva mukozno i transmuralno cijeljenje, koje se, nažalost, kod određenog broja pacijenata ne uspijeva postići dostupnom terapijom. Konvencionalna i biološka terapija sa sobom nose određene nuspojave, a često je potrebno cjeloživotno liječenje što potiče pacijente da dodatno traže alternativne ili komplementarne medicinske pristupe (De Conno i sur., 2022). Interes za potencijal ljekovitog bilja u liječenju IBD-a potaknuo je razvoj kliničkih istraživanja kojima se pokušava procijeniti njihova učinkovitost i sigurnost. Neki od biljnih dodataka prehrani koji se najčešće koriste su pripravci kurkume (*Curcuma longa*, L.), aloja vere (*Aloe vera*, L.), kineskog andrografisa (*Andrographis paniculata*, L.), indijskog tamjana (*Boswellia serrata*, L.) i indijske konoplje (*Cannabis sativa*, L.) (Algieri i sur., 2015).

Kurkumin je prirodna biljna sastavnica iz biljke *Curcuma longa* koja protuupalno djelovanje ostvaruje djelujući na kaskadu arahidonske kiseline i inhibirajući NF-kB transkripcijski faktor, a ima i imunosupresivne učinke (Parian i sur., 2015). Skupina transkripcijskih faktora iz obitelji NF-kB igra ključnu ulogu u nekoliko staničnih funkcija poput apoptoze, proliferacije, urođene i stečene imunosti, kao i u regulaciji više od 500 različitih gena uključenih u upalne i imunosne odgovore (Vecchi Brumatti i sur., 2014). Kurkumin je pokazao učinkovitost u indukciji remisije kod pacijenata s IBD-om i nižu stopu relapsa UC-a (Larussa i sur., 2017). Dobre je sigurnosti i podnošljivosti i smatra se da bi mogao biti sigurna i učinkovita terapija uz aminosalicilate u održavanju remisije UC-a, međutim potrebna su dodatna istraživanja (Parian i sur., 2015).

Aloe vera tropska je biljka koja se koristi u tradicionalnoj medicini diljem svijeta, unatoč nedostatku istraživanja, prepoznata je u terapiji IBD-a (Larussa i sur., 2017). Sok aloje vere sadrži acetilirane manane, polimanane, antrakinonske C-glikozide, antrone, antrakinone (emodin) i lektine i povezuje se s imunomodulacijskim učincima kroz regulaciju upalnih medijatora. Aloezin, aloin i aloe-emodin sastavnice su za koje se smatra da smanjuju aktivnost mijeloperoksidaze, koja je uključena u aktivnost neutrofila, što se smatra načinom na koji utječu na inhibiciju progresije IBD-a (Algieri i sur., 2015).

Ekstrakti biljke *Andrographis paniculata* sadrže diterpenske laktone od kojih su najvažniji andrografolid i njegovi derivati koji pokazuju protuupalna svojstva putem inhibicije transkripcijskog faktora NF-kB. Andrografolid smanjuje ekspresiju inducibilne dušikov oksid sintaze što rezultira smanjenom proizvodnjom dušikovog oksida. Modulacijom puta protein

kinaze C sprječava proizvodnju reaktivnih kisikovih specija (ROS). Svoja imunomodulirajuća svojstva andrografolid ostvaruje djelovanjem na stanice urođene imunosti smanjujući proizvodnju proupalnih citokina. Zaštićeni ekstrakt naziva HMPL-004 biljke *Andrographis paniculata* istražuje se zbog potencijalnog intestinalnog protuupalnog djelovanja (Algieri i sur, 2015).

Boswellia serrata ili indijski tamjan biljka je iz porodice Burseraceae čija je aromatska smola, tamjan, tradicionalni ayuverdski lijek koji se koristi za liječenje upalnih bolesti. Među različitim spojevima ove smole najzastupljeniji su triterpeni, a bosvelične (tamjanske) kiseline sastavnice su za koje se smatra da najviše doprinose farmakološkom djelovanju smole. Pokazalo se da 11-keto- β -tamjanska kiselina i acetil-11-keto- β -tamjanska kiselina smanjuju peroksidaciju lipida i povećavaju razinu superoksid dismutaze (SOD) što ublažava oksidativni stres povezan s crijevnom upalom. Protuupalni učinak uključuje i inhibiciju aktivacije NF-K κ B transkripcijskog faktora te time i smanjenu ekspresiju proupalnih citokina (Algieri i sur, 2015). Potvrđena je sigurnost i podnošljivost korištenja indijskog tamjana (Larussa i sur, 2017).

Cannabis sativa zadobiva sve veću pozornost u istraživanju aktivnih fitokemijskih spojeva koji djeluju na IBD. Zabilježeno je da sadrži preko 60 endokanabinoidnih spojeva koji su odgovorni za biološku aktivnost pripravaka. (-)-trans- Δ 9-tetrahidrokanabinol (Δ 9-THC) i kanabidiol (CBD) aktivni su farmaceutski kanabinoidi koji svoje primarne učinke ostvaruju interakcijom s endokanabinoidnim sustavom, posebno s kanabinoidnim receptorom 1 (CB1) i kanabinoidnim receptorom 2 (CB2). I CB1 i CB2 nalaze se u crijevnom živčanom sustavu što znači da je endokanabinoidni sustav važan za regulaciju više aspekata gastrointestinalnog sustava. Pretkliničke studije pokazale su terapijski potencijal agonista endokanabinoidnih receptora u liječenju simptoma IBD-a smanjenjem proizvodnje citokina i inhibicijom migracije neutrofila te poticanjem protuupalnog odgovora. CB2 agonisti imaju i imunomodulacijsko djelovanje indukcijom apoptoze. Glavna problematika upotrebe indijske konoplje u medicinske svrhe neselektivno je vezanje kanabinoida na receptore u središnjem živčanom sustavu što može rezultirati ozbiljnim nuspojavama. Očit je medicinski potencijal manipulacije endokanabinoidnim sustavom, međutim potrebno je uložiti dodatne napore u ispitivanje i istraživanje specifičnih kanabinoida (De Conno i sur., 2022; Dalavaye i sur., 2022; Algieri i sur., 2015).

Crni papar (*Piper nigrum*, L) u Kini se tradicionalno, osim kao začim, koristi kao lijek u brojnim indikacijama. Glavna djelatna tvar u crnom papru je piperin za koji studije pokazuju

da ima brojne biološke učinke, uključujući i imunomodulatorno, protuupalno, antikancerogeno, antioksidativno te antibakterijsko djelovanje, zbog kojih primjena piperina globalno raste posljednjih godina. Piperin atenuira upalni odgovor u intestinalnom sustavu supresijom lučenja interleukina 8 (IL-8). Točni signalni putevi kojima piperin ispoljava protuupalno djelovanje ostaju nejasni, a učinci pokazuju ovisnost o izvoru, drugim komponentama, čistoći i obradi piperina (Duan i sur., 2022).

1.2. USP ispitivanja u kontroli kvalitete dodataka prehrani

1.2.1. Ispitivanje tečenja prašaka

Iako se prašci koriste i kao zasebni dozirni oblici, farmaceutska industrija najčešće ih koristi za proizvodnju tableta i kapsula. U razvojnom i proizvodnom procesu od velike su važnosti svojstva tečenja prašaka. Kako bi se u procesu izrade kapsula i tableta mogao uspostaviti jednoličan protok praška te volumnim doziranjem održati uniformna masa tableta ili kapsula, potrebno je moći predvidjeti i ispitati svojstva tečenja. Neravnomjeran protok praška može rezultirati zarobljavanjem zraka pri brzom tabletiranju.

Kod ispitivanja tečenja prašaka važno je koristiti veličine koje mogu kvantitativno opisati svojstvo tečenja i čije se vrijednosti mogu povezati sa utjecajem na proizvodni proces. Poželjno je da metode koje se koriste budu jednostavne, uporabljive, ponovljive i osjetljive (Aulton i Taylor, 2018). U USP-ovom <616> poglavlju „Nasipna gustoća i gustoća nakon protresivanja prašaka“ opisane su četiri metode koje se najčešće koriste u ispitivanjima svojstava tečenja: određivanje nasipnog kuta, indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog omjera, određivanje brzine istjecanja kroz otvor i ispitivanje pomoću reometra za praške. Naglašeno je da nijedna metoda zasebno ne može u potpunosti okarakterizirati tečenje prašaka te se preporuča korištenje više standardiziranih metoda za karakterizaciju različitih aspekata protoka (USP 43-NF 38, 2021).

1.2.2.1. Hausnerov omjer i indeks kompresibilnosti

Hausnerov omjer i indeks kompresibilnosti značajnije se koriste zadnjih godina kao indirektna mjera u opisivanju i predviđanju svojstava tečenja. Određuju se pomoću aparature koja mehanički, protresanjem sabija čestice praška u graduiranom cilindru čime se smanjuje prazan prostor među česticama i čestice se sjedinjuju. Protresa se propisani broj ponavljanja, do konačnog ustaljenja volumena. Iz početnog volumena (V_o) i mase dobiva se vrijednost početne nasipne gustoće (ρ_{bulk}), a iz konačnog volumena (V_f) i mase vrijednost nasipne gustoće nakon protresivanja ρ_{tapped} (Aulton i Taylor, 2018). Nasipna gustoća nakon protresivanja uvijek

je veća od početne i funkcija je oblika čestica, poroznosti i raspodjele veličina čestica (Carson i sur., 1998).

Hausner je dokazao da je omjer $\rho_{\text{tapped}}/\rho_{\text{bulk}}$ u korelaciji s unutrašnjim trenjem među česticama praška. Time je pokazao da se sljedeća jednadžba može koristiti u opisu i predviđanju svojstava tečenja praška:

$$\text{Hausnerov omjer} = \frac{\rho_{\text{tapped}}}{\rho_{\text{bulk}}}$$

Odnosno, koristeći početni i volumen nakon protresivanja:

$$\text{Hausnerov omjer} = \frac{V_f}{V_0}$$

Prašci s manjim unutrašnjim trenjem među česticama imaju Hausnerov omjer niži od 1,2 i dobre su sipkosti, dok oni kohezivni, manje sipki imaju omjer iznad 1,5 (Aulton i Taylor, 2018).

Indeks kompresibilnosti bezdimenzijska je veličina koja se može koristiti kao indirektna mjera nasipne gustoće, veličine i oblika čestica, specifične površine, sadržaja vlage i kohezivnosti jer svako od navedenih svojstava utječe na indeks kompresibilnosti i može se dovesti u korelaciju s njim (USP 43-NF 38, 2019). Računa se prema sljedećem izrazu:

$$\text{Indeks kompresibilnosti (\%)} = \frac{\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{bulk}}}{\rho_{\text{tapped}}} \times 100.$$

Odnosno koristeći početni i volumen nakon protresivanja:

$$\text{Indeks kompresibilnosti (\%)} = \frac{V_0 - V_f}{V_0} \times 100$$

U **Tablici 1** prikazane su Hausnerovog omjera i indeksa kompresibilnosti. Važno je istaknuti da Hausnerov omjer i indeks kompresibilnosti nisu intrinzične veličine te ovise o sljedećim parametrima metode koja se koristi za mjerenje: promjeru cilindra, broju protresivanja, masi analiziranog praška i potencijalnoj primjeni rotacije tijekom protresivanja (USP 43-NF 38, 2019; Aulton i Taylor, 2018).

Tablica 1. Svojstva tečenja i prikladne vrijednosti indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog omjera.

Indeks kompresibilnosti (%)	Tečenje	Hausnerov omjer
≤10	Odlično	1,00–1,11
11–15	Dobro	1,12–1,18
16–20	Solidno	1,19–1,25
21–25	Prihvatljivo	1,26–1,34
26–31	Loše	1,35–1,45
32–37	Vrlo loše	1,46–1,59
>38	Vrlo, vrlo loše	>1,60

1.2.2. Ispitivanje varijacije mase dozirnih oblika

Varijacija u masi proizvedenih čvrstih dozirnih oblika relativno je čest problem. Uzrok navedenog problema je to što ne postoje dovoljno brzi sustavi za vaganje prilikom punjenja kalupa pri proizvodnji dozirnih oblika zbog čega se pune određeni volumeni, a zahtijeva se uniformna masa. Zbog djelomično nepotpunog punjenja kalupa i varijacija u gustoći doziranog praška, očekivane su određene varijacije u masi proizvedenog oblika. Farmakopeje određuju prihvatljivu razinu varijacije mase dozirnog oblika kako bi se osiguralo to da sastav oblika bude u skladu sa specifikacijama. Kako bi mase gotovog oblika bile što uniformnije, tabletiranju često prethodi grauliranje koje omogućava poboljšanje svojstava tečenja sirovine (www.gmp-compliance.org). U USP poglavlju <2091> „Varijacija mase dodataka prehrani“ opisano je kako se provodi test kontrole kvalitete dodataka prehrani kojim se ispituje varijacija u masi zasebnih dozirnih jedinica određenog dodatka prehrani. Zasebno je opisan postupak provođenja ispitivanja za meke i tvrde kapsule, za neobložene tablete, filmom obložene tablete i obložene tablete (ne filmom).

1.2.3. Ispitivanje raspadljivosti

Uspješnost isporuke lijeka, odnosno bioraspoloživost iz dozirnog oblika ponajviše ovisi o procesu raspadanja i otapanja ljekovitog oblika (Markl i Zeitler, 2017). Raspadanje je fizikalni proces mehaničkog usitnjavanja tablete, kapsule i rektalnog ili vaginalnog supozitorija u manje čestice. Kod tableta potrebno je prekinuti međučestične interakcije nastale komprimiranjem praška (poput međumolekulskih sila i međusobnog mehaničkog blokiranja)

kako bi se oblik raspao u granule (Silva i sur., 2018). Raspadanje tablete u granule uzrokuje veliko povećanje specifične površine i znatno povećanje brzine otapanja čime se omogućava naknadna apsorpcija lijeka. Ljekoviti oblik koji se teško ili nikako ne raspada ne osigurava potpunu apsorpciju lijeka i odgađa potencijalni početak djelovanja. Sredstva za raspadanje dodaju se u formulaciju lijeka kako bi se osiguralo da se u doticaju s tekućim medijem ljekoviti oblik raspadne i osigura brzo otapanje.

Prvi korak raspadanja, ujedno i onaj koji obično određuje brzinu cijelog procesa jest prodiranje tekućine kroz pore komprimiranog praška. Prodiranje tekućine ne djeluje direktno na nastale međučestične veze, ali omogućava odvijanje mehanizama koji će u konačnici dovesti do samog raspadanja. Potrebno je naglasiti da su svojstva tekućine, poput kontaktnog kuta, viskoznosti i napetosti površine, također važna za odvijanje procesa (Markl i Zeitler, 2017). Jedan od najvažnijih mehanizama raspadanja je bubrenje. Bubrenje čestica u svim smjerovima rezultira pucanjem matrice dozirnog oblika. Razgradnja bubrenjem može se potaknuti dodavanjem u formulaciju sredstva za raspadanje koje bubri ovisno o svojoj kemijskoj strukturi i stupnju umreženosti. Ulogu ima i poroznost komprimiranog oblika koja, ako je visoka, može umanjiti silu bubrenja sredstva za raspadanje na okolnu matricu, a ako je niska, može spriječiti prodiranje tekućine u matricu (Silva i sur., 2018; Markl i Zeitler, 2017). Konačno, na ukupnu brzinu raspadanja utječe nekoliko međuovisnih faktora uključujući koncentraciju i vrstu lijeka, medija, veziva, sredstva za raspadanje, lubrikanta i sredstva za vlaženje, kao i proizvodni proces (npr. tlak sabijanja tableta) (Aulton i Taylor, 2018).

Test raspadljivosti u osnovi je mjerenje vremena potrebnog da se ljekoviti oblik raspadne u mediju za uranjanje u određenim definiranim eksperimentalnim uvjetima (Silva i sur., 2018). Prema USP-ovom općem poglavlju <2040> „Raspadanje i oslobađanje dodataka prehrani“ test je predviđen kako bi se utvrdilo raspadaju li se tablete i kapsule dodataka prehrani unutar propisanog vremena u tekućem mediju u određenim uvjetima. Ispitivanja opisana u ovom poglavlju alati su za kontrolu kvalitete i procjenu karakteristika gotovih dozirnih oblika dodataka prehrani. Namijenjeni su otkrivanju problema koji se mogu pojaviti zbog pogrešne uporabe ili drugih problema s mazivima, sredstvima za raspadanje i ostalim sastavnicama te otkrivanju problema proizvodnog procesa poput prekomjerne kompresije i sušenja koji mogu značajno utjecati na bioraspoloživost djelatne tvari.

Propisani uređaj A koristi se kod tableta i kapsula koje nisu veće od 18 mm, a B kod onih većih. Sastoje se od stalka na kojem je košara, posude volumena 1000 mL za medij za

uranjanje, termostatskog uređaja za zagrijavanje medija na 35 °C – 39 °C i uređaja za podizanje i spuštanje košarice umočene u medij konstantnom frekvencijom između 29 i 32 ciklusa u minuti. Stalak s košarom sastoji se od tri (aparatura B) ili šest (aparatura A) otvorenih prozirnih cijevi (kivete) koje u okomitom položaju drže dvije plastične ploče. Svaka cijev jednako je udaljena od središta ploče i drugih cijevi i sadrži cilindrični disk od prozirnog plastičnog materijala. Na donju površinu donje ploče pričvršćena je tkana žičana mreža od nehrđajućeg čelika.

Test se odvija tako da se u svaku kivetu stavi po jedna tableta ili kapsula na koje se, ako je propisano u monografiji, stavi cilindrični disk. Zatim se pokrene se cikličko uranjanje u propisani medij i proces se zaustavlja kada se svi uzorci raspadnu. Za potrebe ovog testa kontrole kvalitete, potpuno raspadanje podrazumijeva stanje u kojem je jedini u mrežici ili na površini zaostali dio ispitivanih tableta ili kapsula meka masa koja nema opipljivo čvrste jezgre i/ili netopljivi premaz ili ljuska kapsule. Ako se jedna ili dvije dozirne jedinice ne raspadnu, ispitivanje se ponavlja s dodatnih 12 dozirnih jedinica.

Test raspadljivosti ne može biti garancija prihvatljive bioraspoloživosti i kliničkog učinka *in vivo*, ali za uzorak koji nije prošao test možemo s velikom vjerojatnošću očekivati da neće biti učinkovit. Koristan je za procjenu utjecaja formulacije i proizvodnog procesa na biofarmaceutska svojstva i kao jedan od postupaka kontrole kvalitete tijekom proizvodnje (Aulton i Taylor, 2018). Preporučljivo ga je uključiti u ispitivanje stabilnosti proizvoda jer se raspadljivost može smanjiti tijekom skladištenja, a farmakopejski zahtjevi kvalitete vrijede do isteka roka trajanja. Zadovoljavanje testa raspadljivosti minimalan je uvjet za oslobađanje djelatne tvari iz oblika (Bouwman-Boer i sur., 2015). Usprkos svojim ograničenjima u predviđanju bioraspoloživosti, ostaje važan u ispitivanju kontrole kvalitete i, uz daljnje istraživanje, njegova se upotreba može proširiti (Al-Gousous i Langguth, 2014).

1.2.3. Ispitivanje pucanja mekih kapsula

USP 42-NF 38 opće poglavlje <2040> „Raspadanje i otapanje dodataka prehrani“ prihvaća test pucanja kapsule umjesto testa raspadljivosti za meke kapsule polukrutog ili tekućeg sadržaja. Za test pucanja kapsule koristi se aparatura za otapanje 2 (opisana u poglavlju <711> „Oslobađanje“) koja se sastoji od prozirne posude od inertnog materijala, motora, metalne pogonske osovine i rotirajuće lopatice koja služi za miješanje. Zahtjev poglavlja <2040> za meke kapsule ispunjen je ako kapsule svih uzoraka puknu unutar 15 minuta. Ako jedan ili dva uzorka puknu za više od 15, ali unutar 30 minuta, ispitivanje se ponavlja s dodatnih

12 mekih kapsula. Maksimalno dvije kapsule od ukupno 18 smiju puknuti za više od 15 minuta, ali sve moraju puknuti unutar 30 minuta.

Izlaganjem toplim i vlažnim uvjetima, aldehidima i peroksidima može se potaknuti proces umrežavanja želatine. Umrežavanje ili unakrsno povezivanje želatine čest je problem kod otapanja želatinskih kapsula. Pojavu karakterizira povezivanje molekula želatine preko peptidne okosnice i stvaranje membrane ili pelikule netopljive u vodi na unutarnjoj ili vanjskoj površini kapsule. Takva pelikula može usporiti ili onemogućiti otpuštanje lijeka u uobičajenim uvjetima ispitivanja. Međutim, to ne mora značiti i *in vivo* smanjenje biodostupnosti jer probavni enzimi potencijalno mogu otopiti takvu kapsulu zbog čega je prema USP smjernicama u testu pucanja mekih kapsula ostavljena mogućnost dodavanja probavnih enzima (Lu i Shah, 2017; Felton, 2013). Ako meka kapsula ne zadovoljava zahtjev testa pucanja, test se može ponoviti s dodatkom pepsina u medij (ako je monografijom propisani medij bio voda ili neko drugo sredstvo čiji je $\text{pH} < 6,8$) u koncentraciji pri kojoj aktivnost nije veća od 750 000 jedinica proteazne aktivnosti po litri medija ili s dodatkom pankreatina (ako je monografijom propisan medij čiji je $\text{pH} \geq 6,8$) u količini koja ne rezultira aktivnošću većom od 1750 jedinica proteazne aktivnosti po litri medija (USP 43-NF 38, 2021).

1.2.4. Ispitivanje rastrošljivosti

Stabilne tablete zadržavaju svoj oblik, veličinu, masu i boju u normalnim uvjetima rukovanja i skladištenja lijeka unutar svog roka trajanja. Velika količina zaostalog praha i čestica u spremniku, tragovi pukotina i okrhnutost na površini tableta pokazatelji su fizičke nestabilnosti dozirnog oblika. Rastrošljivost je svojstvo tablete povezano s tvrdoćom, a mjera je procjene sposobnosti tablete da se odupre stresu kojem je izložena prilikom pakiranja, transporta i rukovanja (Felton, 2013).

Tijekom rukovanja tablete su izložene naprezanjima i sudarima jedne s drugima i s drugim čvrstim površinama što može rezultirati lomom i okrhnućem dijelova tablete, ali i gubitkom čestica ili nakupina čestica s površinskih dijelova tablete. Rezultat može biti promjena mase tablete i njezinog izgleda. Otpor prema trošenju važno je svojstvo tablete koje osigurava primjenu točno određene količine lijeka unatoč stresu kojem se lijek izlaže postupcima od proizvodnje do samog korištenja (Aulton i Taylor, 2018). Stoga, važno je ispitati utjecaj blagog i jednolikog ponavljano mućkanja i prevrtanja tableta, a preporučeni test za takvo ispitivanje je test rastrošljivosti opisan u USP <1216> (Felton, 2013).

Poglavlje <1216> opisuje preporučeni uređaj i uvjete ispitivanja rastrošljivosti primjenjiv na većinu komprimiranih tableta. U ispitivanju se koristi bubanj unutarnjeg promjera između 283 i 291 mm te dubinom između 36 i 40 mm napravljen od prozirnog sintetskog polimera s poliranim unutarnjim površinama, nepodložan statičkom nakupljanju. Sa svakim okretom tablete se zakotrljaju pomoću zakrivljene projekcije unutarnjeg polumjera 75,5- 85,5 mm koja se proteže od sredine bubnja do vanjske stijenke. Bubanj je pričvršćen na horizontalnu os koja se okreće brzinom 25 ± 1 okretaja po minuti. Pri svakom okretu tablete se izlažu padu na stijenku bubnja, kliženju i međusobnom sudaranju.

Ako se ispituju tablete jedinične mase manje od 650 mg, ispitivanje se odvija s masom cijelih tableta koja je što bliža 6,5 g, a ukoliko se radi o tabletama jedinične mase veće od 650 mg, u ispitivanje se uzima 10 tableta. Tablete se pažljivo očiste od prašine te se izvažu i stave u bubanj. Bubanj se okrene 100 puta i tablete se izvade. Ukloni se sva prašina s tableta i ponovno se izvažu. Ako postoje očita napuknuća i lomovi prisutni nakon ispitivanja, uzorak nije prošao test. Ispitivanje se obično odvija jednom. Ako je gubitak mase nešto veći od maksimalnog dozvoljenog ili je teško interpretirati rezultate, ispitivanje se ponavlja još dva puta i kao konačni rezultat uzima se srednja vrijednost gubitka mase. Za većinu tableta najveći dozvoljeni srednji gubitak mase je 1 %.

1.2.5. Ispitivanje sile loma tablete

Postoji nekoliko metoda ispitivanja čvrstoće, a jedna od njih je mjerenje otpornosti na lom. Ispitivanje otpornosti na lom podrazumijeva mjerenje sile koju je potrebno primijeniti na uzorak da bi došlo do loma duž promjera (okrugle tablete) ili neke druge osi. Potrebno je osigurati primjenu opterećenja u definiranim i ponovljivim uvjetima u smislu vrste opterećenja i brzine primjene opterećenja. Test opterećenja kompresijom jednostavan je i ponovljiv te ima široku primjenu tijekom razvoja formulacije i proizvodnje tableta. Idealno, tableta se lomi duž promjera, paralelno sa silom opterećenja, na dva komada slične veličine i bilježi se primijenjena sila pri lomu (Aulton i Taylor, 2018).

Varijacije u čvrstoći tablete mogu utjecati na raspadanje i otapanje lijeka pa tako i na krajnju biodostupnost. Ispitivanje se često provodi tijekom razvojnih studija stabilnosti i kao kontrola procesa kompresije tableta u proizvodnji (Felton, 2013). Tablete se izlažu mehaničkom opterećenju prilikom rukovanja i transporta u proizvodnji, distribuciji i u rukama krajnjih korisnika. Proizvodni procesi mogu uzrokovati značajna opterećenja koja tablete moraju

izdržati, stoga se mehanička čvrstoća tableta rutinski mjeri. Uz rastrošljivost, sila loma tableta važna je mjera njihove mehaničke otpornosti.

Ispitivanje se odvija tako da se tablete stave između dvije ploče od kojih je jedna pomična i primjenjuje silu na tabletu dok ne dođe do loma. Ploče trebaju biti paralelne, glatkih ispoliranih površina te okomite na smjer kretanja. Okomitost ploča mora biti održana pri pomicanju, a njihova površina mora biti veća od kontaktne površine s tabletom. Brzina kojom se primjenjuje sila, tj. brzina opterećenja, mora biti konstantna. Održavanjem konstantne brzine opterećenja izbjegava se nakupljanje tlačnog opterećenja koje može dovesti do nekontroliranog gnječenja i varijabilnosti među mjerenjima. Kako bi se osigurala usporedivost rezultata, ispitivanje se mora odvijati pod identičnim uvjetima brzine kretanja ploče koja, zbog svog utjecaja na numerički rezultat mjerenja, mora biti naglašena zajedno sa izmjerenom silom loma. Bez normalizacije podataka, za izravnu usporedbu rezultata, mjerenja bi se morala odvijati na tabletama istog oblika, dimenzija i orijentacije jer navedeni faktori utječu na silu loma tablete. Kod okruglih tableta, orijentacija u dijametralnoj kompresiji je jasna i nedvosmislena. Međutim postoje i tablete kompleksnijih oblika koje nemaju očitu orijentaciju. U takvim slučajevima, izabire se ona orijentacija koja se najlakše reproducira. Općenito, tablete se ispituju poprečno ili paralelno s najdužom osi. Tablete s razdjelnim zarezom mogu se ispitivati tako da je zarez paralelno s površinama ili okomit na njih. U prvom slučaju, dobivaju se općenitije informacije o čvrstoći matrice, a u drugom informacije o čvrstoći matrice u najslabijoj točki u strukturi.

Moderni uređaji za mjerenje sile loma tablete obično su kalibrirani u kilopondima i njutnima. Razlučivost bi im trebala biti unutar 1 N. Potrebno je da senzor sile bude povremeno kalibriran na preciznost od 1 N za cijeli mjerni raspon ili barem za onaj koji se koristi pri ispitivanju određenog uzorka. Kako bi se postigla dovoljna statistička preciznost za određivanje prosječne sile loma, potrebno je ispitati najmanje šest uzoraka tableta (USP 43-NF 38, 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Upalne bolesti crijeva predstavljaju ozbiljno opterećenje kako za pacijenta, tako i za zdravstveni sustav u cjelini. Zabrinjava rastući trend incidencije i prevalencije IBD-a, osobito u mlađoj populaciji i uzevši u obzir zdravstvene rizike i utjecaj na kvalitetu života. Također, u stalnom su porastu i troškovi liječenja IBD-a koje snosi zdravstveni sustav. Osnovni cilj terapije IBD-a je kontrola simptoma i uvođenje u remisiju što danas podrazumijeva i mukozno i transmuralno cijeljenje koje se kod brojnih pacijenata teško postiže. Moderna biološka terapija također sa sobom nosi određene rizike poput nuspojava kao i samog zatajenja terapijskog odgovora. Kronično trajanje i relapsna priroda bolesti mogu ubrzati put do iscrpljivanja terapijskih opcija za pojedinog pacijenta što naglašava važnost širine terapijskih opcija primjenjivih u liječenju IBD-a. Navedeno vrlo često potakne pacijente da traže dodatnu pomoć kako bi smanjili simptome bolesti pa često posežu za različitim biljnim dodacima prehrani (engl. *dietary supplements*, DS) stoga je broj pacijenata s IBD koji koriste DS u porastu. Interes za terapijski potencijal ljekovitog bilja u liječenju IBD-a potaknuo je razvoj kliničkih istraživanja kojima se procjenjuje njihova učinkovitost i sigurnost, ali i stavio naglasak na važnost osiguranja i kontrole kvalitete DS-a. Česta su neslaganja o tome koliko i kako bi se trebala provoditi njihova kontrola. Svjetska zdravstvena organizacija u svojoj Strategiji za tradicionalnu medicinu 2014-2023 podcrtava važnost kvalitete i kao cilj postavlja ojačati osiguranje kvalitete, sigurnost i pravilnu upotrebu DS-a. Uslijed sve šireg interesa za ovu temu, raste konsenzus da su potrebni novi pristupi za održavanje kvalitete i povjerenja javnosti u dodatke prehrani. Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država (USP) podržava sveobuhvatan okvir javne politike za osiguranje kvalitete dodataka prehrani i pruža proizvođačima mogućnost da slijedeći USP standarde kvalitete lakše uspostave i održe dobru proizvođačku praksu.

Cilj ovoga rada bio je provesti fizikalno-kemijsku karakterizaciju u svrhu kontrole kvalitete tržišta DS-a i sirovina za proizvodnju DS-a koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva slijedeći USP protokole. Prema USP poglavljima za ispitivanje oralnih dozirnih oblika ispitane su sljedeće karakteristike: svojstava tečenja (nasipna gustoća i gustoća nakon protresivanja), varijacija mase dozirnih oblika, raspadljivost, pucanje mekih kapsula, rastrošljivost i sila loma tableta i rezultati su uspoređeni sa zahtjevima poglavlja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

34 komercijalno dostupna dodatka prehrani (S1-S20) i sirovine (S21-S34) nabavljeni su u ljekarnama, trgovinama zdrave hrane i putem internetske trgovine. Uzorci su kodirani i pohranjeni prema uputama proizvođača. Svi su uzorci analizirani prije navedenog roka trajanja. Detaljan opis svih uzoraka dan je u **Tablici 2**, koja je pripremljena na temelju informacija dostupnih na pakiranju proizvoda. Analizirani uzorci sastojali su se od 10 dodataka prehrani formuliranih u obliku tvrdih kapsula (S1 - S10), 4 u obliku mekih kapsula (S11 - S14) i 6 u obliku tableta (S15 - S20). 14 uzoraka bili su sastojci dodataka prehrani u obliku praha.

Tablica 2. Popis uzoraka.

Oznaka uzorka	Farmaceutski oblik	Biljni izvor	Preporučena dnevna doza	Broj dozirnih jedinica	Neto masa proizvoda	Zemlja podrijetla
S1	tvrde kapsule	kurkuma, crni papar	dvije kapsule	60	24 g	Hrvatska
S2	tvrde kapsule	kurkuma	dvije kapsule	60	30 g	Hrvatska
S3	tvrde kapsule	kurkuma	dvije kapsule	60	nije naznačeno	Italija
S4	tvrde kapsule	kurkuma, crni papar	jedna kapsula uz obrok	30	19 g	Austrija
S5	tvrde kapsule	kurkuma, crni papar	dvije kapsule uz obroci	60	35,22 g	Hrvatska
S6	tvrde kapsule	kurkuma, crni papar	šest kapsula 45 minuta prije obroka	60	nije naznačeno	nepoznato
S7	tvrde kapsule	kurkuma	jedna kapsula	66	77 g	Kanada
S8	tvrde kapsule	kurkuma, crni papar	dvije kapsule uz obrok	60	30 g	Nizozemska
S9	tvrde kapsule	kurkuma, crni papar	šest kapsula	60	nije naznačeno	Tajland
S10	tvrde kapsule	kurkuma	tri kapsule nakon obroka	100	nije naznačeno	Tajland
S11	meke kapsule	kurkuma, crni papar	jedna kapsula uz obrok	30	nije naznačeno	Hrvatska
S12	meke kapsule	kurkuma	osam kapsula	60	55 g	Belgija
S13	meke kapsule	kurkuma	jedna kapsula uz obrok	30	38,4 g	SAD
S14	meke kapsule	kurkuma	jedna kapsula uz obrok	30	17,8 g	Hrvatska

S15	tablete	kurkuma, crni papar	dvije tablete prije obroka	nije naznačeno	nije naznačeno	Tajland
S16	tablete	kurkuma	jedna tableta uz obrok	30	49 g	SAD
S17	tablete	kurkuma	dvije tablete	nije naznačeno	nije naznačeno	UK
S18	tablete	kurkuma, crni papar	deset tableta	300	90 g	Njemačka
S19	tablete	indijski tamjan	dvije tablete uz obrok	40	67,2 g	SAD
S20	tablete	kurkuma, indijski tamjan	dvije tablete prije obroka	60	nije naznačeno	SAD
S21	prašak	indijski tamjan	-	-	100 g	Indija
S22	prašak	andrografis	-	-	100 g	Indija
S23	prašak	andrografis	-	-	100 g	Indija
S24	prašak	andrografis	-	-	100 g	Indija
S25	prašak	crni papar	-	-	100 g	Indija
S26	prašak	kurkuma	-	-	200 g	Hrvatska
S27	prašak	kurkuma	-	-	100 g	Njemačka
S28	prašak	kurkuma	-	-	100 g	Hrvatska
S29	prašak	kurkuma	-	-	100 g	Hrvatska
S30	prašak	kurkuma	-	-	100 g	Austrija
S31	prašak	kurkuma	-	-	50 g	Hrvatska
S32	prašak	indijski tamjan	-	-	100 g	Grčka
S33	prašak	indijski tamjan	-	-	200 g	Turska
S34	prašak	indijski tamjan	-	-	100 g	nije naznačeno

3.2. Ispitivanje tečenja prašaka – nasipna gustoća i gustoća nakon protresivanja

Uzorcima S21 – S34 određena je nasipna gustoća pomoću instrumenta (PT-DT300) proizvođača Pharma Test (Hainburg, Njemačka). Prvo je 500 g ispitivanog praška propušteno kroz laboratorijsko sito s otvorima od 1 mm (Retsch, Hann, Njemačka). Nasipna gustoća i gustoća nakon protresivanja određena je za svaki uzorak u triplikatu prema protokolu opisanom u <616> „Nasipna gustoća i gustoća nakon protresivanja prašaka“ poglavlju u USP 43-NF 38. Za svako mjerenje, približno 100 g svakog uzorka pažljivo je uliveno u graduirani cilindar od 250 mL (s mogućnošću očitavanja 2 mL). Određen je početni volumen uzorka. Izvodilo se redom 50, 500 pa 1250 protresivanja i mjeren je dobiveni volumen nakon svakog koraka. Ukoliko je

razlika između volumena pri 500 i pri 1250 protresivanja bila manja od 2 mL, mjerenje se time završava i očitava se konačni volumen, a ukoliko je razlika veća od 2 mL, postupak se ponavlja dodatnih 1250 protresivanja sve dok razlika volumena ne bude manja od 2 mL.

3.3. Ispitivanje varijacije mase dozirnih oblika

Na dodacima prehrani u obliku tvrdih kapsula (S1 – S10), mekih kapsula (S11 – S14) i tableta (S16 – S20) provedeno je ispitivanje varijacije mase opisanom u poglavlju <2091> „Varijacija mase dodataka prehrani”. Korištena je analitička vaga s čitljivošću od 0,001 mg (MX5, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska). Izvagano je 20 netaknutih tvrdih kapsula uzorka i izračunata je prosječna masa. Ukoliko je masa pojedinih dozirnih jedinica određenog uzorka unutar granica od 90 % i 100 % od prosječne mase kapsula, uzorak zadovoljava USP zahtjeve. Po protokolu za meke kapsule, intaktne kapsule su pojedinačno izvagane i označene. Zatim je svaka kapsula otvorena, a sadržaj je uklonjen ispiranjem ultra-čistom vodom. Zaostalo otapalo uklonjeno je isparavanjem na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Svaka pojedinačna kapsula je izvagana te je izračunat neto sadržaj. Zahtjevi farmakopeje jednaki su onima za tvrde kapsule. 20 cijelih tableta pojedinačno su vagane te im je izračunata prosječna masa. Zahtjevi USP-a bili su ispunjeni ako su se maksimalno dvije tablete razlikovale masom od prosječne tablete za 1) >5 % ako se radi o tabletama prosječne mase manje od 130 mg, 2) >7,5 % ako se radi o tabletama prosječne mase između 130 mg i 324 mg, 3) 10 % ukoliko je prosječna masa tableta veća od 324 mg. Nijedna tableta ne smije se razlikovati u masi za više od dvostrukog navedenog postotka.

3.4. Ispitivanje raspadljivosti

Raspadljivost tableta (S16 – S20), tvrdih (S1 – S10) i mekih (S11 – S14) kapsula određena je pomoću uređaja za ispitivanje raspadljivosti (PTZ-S) proizvođača Pharma Test (Hainburg, Njemačka) prema protokolu opisanom u USP 43-NF 38 smjernicama u poglavlju <2040> „Raspadljivost i oslobađanje dodataka prehrani“. Po šest tableta/kapsula svakog dodatka prehrani stavljeno je u kivete u košari i prekriveno cilindričnim diskom. Korišten je medij (ultra čista voda za ispitivanja tableta i 0,05 M acetatni pufer za kapsule) temperature 37 ± 2 °C. Prema USP zahtjevima sve dozirne jedinice trebaju se raspasti unutar 30 minuta.

3.5. Ispitivanje pucanja mekih kapsula

Za kapsule s mekom ovojnicom (S11 – S14) prema poglavlju <2040> „Raspadljivost i oslobađanje dodataka prehrani“ iz USP 42-NF 38 propisano je i ispitivanje pucanja meke kapsule pomoću instrumenta za oslobađanje tipa 2. Korišten je instrument LDLT-A10 (Labtron

Equipment Ltd., Fleet, UK) s brzinom rotacije lopatice 50 okretaja u minuti u mediju (ultra čista voda) pri 37,0 °C. Prema USP kriterijima prihvatljivosti, sve testirane kapsule trebale bi puknuti unutar 15 minuta uz dozvoljeno odstupanje dvije od 18 kapsula koje moraju puknuti unutar 30 minuta.

3.6. Ispitivanje rastrošljivosti

Ispitivanje rastrošljivosti tableta (S16 – S20) provedeno je prema USP 43-NF 38 smjernicama u poglavlju <1216> „Rastrošljivost tableta“ koristeći instrument PTF 100 proizvođača Pharma Test (Hainburg, Njemačka). Za tablete s jediničnom masom manjom ili jednakom 650 mg uzet je uzorak cijelih tableta čija je masa najbliža 6,5 g. Za tablete s jediničnom masom većom od 650 mg uzet je uzorak 10 cijelih tableta. Test se izvodio u triplicatu. Očigledno napuknute ili okrhnutе tablete ne prolaze test. Prema USP zahtjevima prihvatljiv gubitak mase iznosi do 1 %.

3.7. Ispitivanje sile loma tableta

Sila loma tableta (S16 – S20) određena je prema USP 43-NF 38 smjernicama u poglavlju <1217> „Sila loma tablete“ na uređaju za ispitivanje tvrdoće tableta TBH 125 (Erweka, Germany). Sila loma tableta određena je za 10 tableta svakog uzorka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju prikupljeno je 34 uzoraka koji sadrže biljne vrste koje se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva. U uzorcima je utvrđen sadržaj biološki aktivnih tvari kao i fizikalno-kemijska svojstava ovih tvari (Brusač i sur., 2022; Jeličić i sur., 2022). Istraživanja su potom usmjerena prema fizikalno-kemijskoj karakterizaciji dozirnih oblika.

Prema USP-ovom <616> poglavlju ispitana je nasipna gustoća i gustoća nakon protresivanja biljnih sirovina koje se koriste u pripremi dodataka prehrani (**Tablica 3**). Rezultati su izraženi pomoću Hausnerovog omjera i indeksa kompresibilnosti. Ranije je prikazan odnos Hausnerovog omjera i indeksa kompresibilnosti s USP opisom svojstava tečenja (**Tablica 1**).

Tablica 3. Nasipna gustoća, gustoća nakon protresivanja, indeks kompresibilnosti i Hausnerov omjer sastojaka dodataka prehrani.

Biljni izvor	Kurkuma	Indijski tamjan	Andrografis	Crni papar
Nasipna gustoća (g/mL)				
Srednja vrijednost	0,4778	0,4201	0,3172	0,4555
Medijan	0,4698	0,4196	0,3236	-
Raspon vrijednosti	0,4070-0,5525	0,2958-0,5329	0,3040-0,3240	-
Nasipna gustoća nakon protresivanja (g/mL)				
Srednja vrijednost	0,6569	0,6159	0,5847	0,6263
Medijan	0,6664	0,61946	0,5892	-
Raspon vrijednosti	0,5644-0,7375	0,4986-0,7190	0,5779-0,5892	-
Hausnerov omjer				
Srednja vrijednost	1,38	1,50	1,84	1,38
Medijan	1,39	1,45	1,81	-
Raspon vrijednosti	1,32-1,45	1,35-1,69	1,79-1,92	-
Indeks kompresibilnosti (%)				
Srednja vrijednost	27,5	32,7	45,7	27,3
Medijan	28,0	33,0	44,8	-
Raspon vrijednosti	24,3-31,0	25,9-40,7	44,0-48,4	-
USP kategorija	Loše - prihvatljivo	Loše – vrlo loše	Vrlo, vrlo loše	Loše

Prema cijelom rasponu izračunatih vrijednosti Hausnerovog omjera i indeksa kompresibilnosti uzorci andrografisa po svojstvima tečenja spadaju u posljednju USP kategoriju „vrlo, vrlo loše“ što označava da se radi o izrazito kohezivnim sirovinama loše sipkosti. Prema istoj USP kategorizaciji, odnosno opisu tečenja, uzorci sirovina indijskog tamjana smješteni su u kategoriju „loše – vrlo loše“ što znači da su njihova svojstva tečenja i sipkosti nešto povoljnija nego ona uzoraka andrografisa, međutim i dalje neprihvatljiva. Kod andrografisa je primjetan i velik raspon među dobivenim vrijednostima čija srednja vrijednost ulazi u kategoriju „vrlo loše“. Tečenje analiziranog uzorka crnog papra opisano je kao „loše“. Uzorci sirovina kurkume po rezultatima raspona vrijednosti Hausnerovog omjera i indeksa kompresibilnosti spadaju u kategoriju „loše – prihvatljivo“, s medijanom i srednjom vrijednosti unutar kategorije „loše“. Sirovine kurkume u prosjeku su najpovoljnije sipkosti i svojstava tečenja među ispitivanim sirovinama.

Prema USP poglavljima <2091> „Varijacija mase dodataka prehrani“ i <2040> „Raspadljivost i oslobađanje dodataka prehrani“ za uzorke tvrdih kapsula (S1 – S10) ispitana je varijacija mase (**Tablica 4**) i raspadljivost (**Tablica 5**).

Tablica 4. Varijacija mase dodataka prehrani u obliku tvrdih kapsula.

Oznaka uzorka	Varijacija mase					
	Naznačena masa (mg)	Prosječna masa (mg, n = 20)	Postotak naznačene mase (%)	Minimalni postotak od prosječne mase (%)	Maksimalni postotak od prosječne mase (%)	USP kriterij
S1	400	496,8	124,2	95,6	104,4	zadovoljen
S2	500	601,1	120,2	93,6	105,4	zadovoljen
S3	600	600,3	100,1	94,7	106,9	zadovoljen
S4	633	649,8	102,6	93,3	106,5	zadovoljen
S5	587	597,8	101,8	95,5	104,4	zadovoljen
S6	nije naznačeno	1101,0	nepoznato	94,3	105,3	zadovoljen
S7	1167	830,2	71,1	98,6	101,6	zadovoljen
S8	500	499,6	99,9	97,7	104,2	zadovoljen
S9	nije naznačeno	579,4	nepoznato	92,6	107,1	zadovoljen
S10	nije naznačeno	507,8	nepoznato	89,5	106,5	zadovoljen

Prema zahtjevu USP-a za varijaciju mase tvrdih kapsula po kojem masa svake pojedine od 20 ispitivanih dozirnih jedinica mora biti u rasponu od 90 % do 110 % od prosječne mase kapsula, sve ispitane kapsule odgovaraju propisu. Kod uzorka S10 uočljivo je nešto značajnije odstupanje minimalne mase pojedine tvrde kapsule od prosječne mase kapsula. Uočljiva su vrlo velika odstupanja srednje vrijednosti mase određenog uzorka od mase naznačene (deklarirane) na proizvodu. Primjerice, kapsule uzorka S7 u prosjeku sadrže 71,1 % mase naznačene na proizvodu, dok kapsule uzorka S1 sadrže čak 124,2 % naznačene mase. Uzorci S1 i S8 u prosjeku minimalno odstupaju od mase naznačene na pakiranju. Uzorci dodataka prehrani označeni s S6, S9 i S10 nisu imali naznačenu masu na proizvodu.

Tablica 5. Raspadljivost dodataka prehrani u obliku tvrdih kapsula.

Oznaka uzorka	Test raspadljivosti	
	Raspadljivost (vrijeme raspadanja)	USP kriterij
S1	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen
S2	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen
S3	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen
S4	6 kapsula unutar 30 minuta	zadovoljen
S5	6 kapsula unutar 15 min	zadovoljen
S6	6 kapsula unutar 30 minuta	zadovoljen
S7	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen
S8	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen
S9	6 kapsula unutar 30 minuta	zadovoljen
S10	6 kapsula unutar 30 minuta	zadovoljen

Svi ispitivani uzorci tvrdih kapsula zadovoljili su zahtjev USP poglavlja <2040> pri ispitivanju raspadljivosti, odnosno svi uzorci su se potpuno raspali u roku od 30 minuta.

Prema USP poglavljima <2091> „Varijacija mase dodataka prehrani“ i <2040> „Raspadljivost i oslobađanje dodataka prehrani“ za uzorke mekih kapsula (S11 – S14) ispitani su varijacija mase (**Tablica 6**), raspadljivost i test pucanja mekih kapsula (**Tablica 7**).

Tablica 6. Varijacija mase dodataka prehrani u obliku mekih kapsula.

Oznaka uzorka	Varijacija mase					
	Naznačena masa (mg)	Prosječna masa (mg, n=20)	Postotak naznačene mase (%)	Minimalni postotak od prosječne mase (%)	Maksimalni postotak od prosječne mase (%)	USP kriterij
S11	nije naznačeno	1581,8	nepoznato	99,0	101,3	zadovoljen
S12	916,7	959,6	104,7	95,4	102,7	zadovoljen
S13	1280	1303,0	101,8	97,8	101,6	zadovoljen
S14	596	589,8	99,0	99,0	101,0	zadovoljen

Svi ispitani uzorci mekih kapsula (S11 – S14) zadovoljili su USP kriterij poglavlja <2091> u ispitivanju varijacije mase. Niti jedan uzorak ne sadrži dozirne jedinice koje značajnije odstupaju od prosječne mase uzorka (ispod 90 % ili iznad 110 % mase uzorka). Najmanja odstupanja mase dozirne jedinice od prosječne mase uzorka su kod uzorka S14, dok su dozirne jedinice uzorka S12 pokazale najveću varijaciju u odnosu na prosječnu masu.

Tablica 7. Test raspadljivosti i test pucanja dodataka prehrani u obliku mekih kapsula

Oznaka uzorka	Test raspadljivosti		Test pucanja	
	Raspadljivost (vrijeme raspadanja)	USP kriterij	Vrijeme pucanja	USP kriterij
S11	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen	6 kapsula unutar 1 minute	zadovoljen
S12	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen	6 kapsula unutar 1 minute	zadovoljen
S13	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen	6 kapsula unutar 3 minute	zadovoljen
S14	6 kapsula unutar 15 minuta	zadovoljen	6 kapsula unutar 7 minuta	zadovoljen

Prema propisima USP poglavlja <2040> za ispitivanje raspadljivosti mekih kapsula, sve kapsule zadovoljavaju USP kriterij. Svih šest ispitivanih kapsula svakog uzorka potpuno se raspalo unutar 15 minuta. Svi uzorci mekih kapsula zadovoljili su i USP kriterij za ispitivanje pucanja mekih kapsula prema USP poglavlju <2040>. Svih 6 mekih kapsula uzoraka S11 i S12 pukle su unutar jedne minute, dok je kod uzorka S14 bilo potrebno više vremena (sedam minuta) za pucanje svih kapsula.

Prema USP poglavljima <2091> „Varijacija mase dodataka prehrani“ i <2040> „Raspadljivost i oslobađanje dodataka prehrani“ za uzorke tableta (S15 – S20) također su ispitani varijacija mase (**Tablica 8**) i raspadljivost (**Tablica 9**). Prema poglavlju <1217> „Sila loma tablete“ određena je sila loma tableta, a prema propisu iz poglavlja <1216> „Rastrošljivost tableta“ ispitana je rastrošljivost tableta (**Tablica 9**).

Tablica 8. Varijacija mase dodataka prehrani u obliku tableta.

Oznaka uzorka	Varijacija mase					
	Naznačena masa (mg)	Prosječna masa (mg, n=20)	Postotak naznačene mase (%)	Minimalni postotak prosječne mase (%)	Maksimalni postotak prosječne mase (%)	USP kriterij
S15	nije naznačeno	224,5	nepoznato	94,1	103,1	zadovoljen
S16	1633,3	1621,2	99,3	98,4	102,9	zadovoljen
S17	nije naznačeno	335,7	nepoznato	97,7	102,1	zadovoljen
S18	300	294,0	98,0	95,0	107,7	zadovoljen (1 tableta više od 7,5%)
S19	1680	1617,5	96,3	97,9	103,8	zadovoljen
S20	1584,5	1958,7	123,6	98,8	101,0	zadovoljen

Sve ispitivane tablete uzoraka S15 – S20 zadovoljavaju zahtjeve USP-a prema rezultatima ispitivanja varijacije mase tableta. Kod uzorka S18 masa jedne tablete odstupala je od prosječne mase za više od 7,5 % (granica odstupanja za tablete prosječne mase između 130 mg i 324 mg) što je i dalje prihvatljivo jer se ne radi o više od dvije tablete i odstupanje nije veće od 15 % (za tablete prosječne mase između 130 mg i 324 mg).

Tablica 9. Test raspadljivosti, sile loma tablete i rastrošljivosti dodataka prehrani u obliku tableta.

Oznaka uzorka	Test raspadljivosti		Sila loma tablete		Rastrošljivost	
	Raspadljivost (vrijeme raspadanja)	USP kriterij	Tvrdoća (N, n=10)	RSD (%)	Rastrošljivost (%; n=3)	USP kriterij
S15	6 tableta se u potpunosti raspalo unutar 15 minuta	zadovoljen	46,0	0,1	≤0,01	zadovoljen
S16	6 tableta se u potpunosti raspalo unutar 30 minuta	zadovoljen	248,5	7,7	≤0,01	zadovoljen
S17	6 tableta se u potpunosti raspalo unutar 1 minute	zadovoljen	73,7	12,4	≤0,01	zadovoljen
S18	6 tableta se u potpunosti raspalo unutar 5 minuta	zadovoljen	27,7	6,5	0,14-0,38	zadovoljen
S19	6 tableta se u potpunosti raspalo unutar 25 minuta	zadovoljen	241,0	10,2	≤0,01	zadovoljen
S20	niti jedna tableta se nije potpuno raspala unutar 30 minuta	nije zadovoljen	138,2	7,2	0,1-0,28	zadovoljen

Kriterij USP-a za ispitivanje raspadljivosti za tablete prema poglavlju <2040> zadovoljile su sve tablete osim onih uzorka S20. Niti jedna tableta uzorka S20 nije se u potpunosti raspala u propisanom vremenu (30 minuta). Tablete uzorka S17 potpuno su se raspale unutar samo jedne minute. Sila loma tableta uzoraka bila je u rasponu od 27,7 N do 248,5 N. Uočljivo je da je za tablete veće mase bilo potrebno primijeniti veću silu da bi pukle. Neki od ispitivanih uzoraka (S17, S19) imaju relativno standardno odstupanje u rezultatima sile loma tableta veće od 10 %.

Prema USP poglavlju <1216> maksimalni dozvoljeni gubitak mase prilikom ispitivanja rastrošljivosti je 1 % što znači da su sve ispitivane tablete zadovoljile navedeni kriterij. Masa uzoraka S15, S16, S17 i S19 neznatno se promijenila prilikom ispitivanja rastrošljivosti.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija dodataka prehrani koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva. Provedena su ispitivanja nasipne gustoće i gustoće nakon protresivanja (USP <616>), varijacije mase dozirnih oblika (USP <2091>), raspadljivosti (USP <2040>), pucanja mekih kapsula (USP <2040>), rastrošljivosti tableta (USP <1216>) i ispitivanje sile loma tableta (USP <1217>).

1) Uzorci praškastih sirovina za izradu biljnih dodataka prehrani u ispitivanju nasipne gustoće i gustoće nakon protresivanja pokazali su loša svojstva tečenja. To znači da se radi o izrazito kohezivnim prašcima loše sipkosti što bi moglo uzrokovati poteškoće u proizvodnom procesu dodataka prehrani te rezultirati neujednačenošću sadržaja i značajnom varijacijom mase dozirnih jedinica. Najbolja svojstva tečenja pokazale su sirovine kurkume, a najlošija sirovine andrografisa.

2) Svi ispitivani uzorci zadovoljili su USP uvjete za varijaciju mase dozirnih oblika, pucanje mekih kapsula i rastrošljivost tableta.

3) Jedan uzorak tableta nije prošao kriterije USP-a za raspadljivost jer se niti jedna od 6 ispitivanih tableta nije raspala unutar 30 minuta. Zadovoljavanje testa raspadljivosti minimalan je uvjet za oslobađanje djelatne tvari iz oblika pa možemo zaključiti da uzorak neće biti učinkovit *in vivo*.

4) Iz rezultata ispitivanja sile loma tableta za uzorke tableta S10 i S12 (RSD > 10 %) možemo zaključiti da postoji varijabilnost među jedinicama u izmjerenoj sili loma što može indicirati potencijalne varijacije u raspadanju i otapanju lijeka.

6. LITERATURA

Al-Gousous J, Langguth P. Oral Solid Dosage Form Disintegration Testing - The Forgotten Test. *J Pharm Sci*, 2015, 104(9), 2664-2675.

Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Rodriguez-Cabezas ME, Risco S, Ocete MA, Galvez J. Botanical Drugs as an Emerging Strategy in Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Mediators inflammation*, 2015, 179616.

Aulton ME, Taylor KMG. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 5th. ed. Edinburgh, Churchill Livingstone/Elsevier, 2018

Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P. Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products. London, Springer, 2015, str. 719.

Brusač E, Jeličić M-L, Nigović B, Amidžić Klarić D, Mornar A. Determination of Curcuminoids, Piperine, Boswellic Acids and Andrographolides in Food and Dietary Supplements by HPLC, *Food Technol Biotechnol*, 2022, 60(4), 434-448.

Carson JW, Pittenger BH. Bulk properties of powders. U: ASM Handbook, Volume 7: Powder Metal Technologies and Applications. Lee, PWT, Iacocca R, German RM, Ferguson BL, Eisen WB, Moyer K, Madan D, Sanderow H, urednici, Almere, ASM International, 1998, str. 287-301.

Causes for Weight Variations during Tableting, 2015., <https://www.gmp-compliance.org/>, pristupljeno 3. 5. 2023.

Dalavaye N, Erridge S, Nicholas M, et al. The effect of medical cannabis in inflammatory bowel disease: analysis from the UK Medical Cannabis Registry. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 17(1), 85-98.

Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(30), 4807-4812.

De Conno B, Pesce M, Chiurazzi M, et al. Nutraceuticals and Diet Supplements in Crohn's Disease: A General Overview of the Most Promising Approaches in the Clinic. *Foods*, 2022, 11(7), 1044.

Duan Z, Xie H, Yu S, Wang S, Yang H. Piperine Derived from *Piper nigrum* L. Inhibits LPS-Induced Inflammatory through the MAPK and NF- κ B Signalling Pathways in RAW264.7 Cells. *Foods*, 2022;11(19):2990.

European Chron's and Colitis Organisation [ECCO]. ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment. *J Chrons Colitis*, 2022, 16(1), 2-17.

Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res*. 2014, 7, 113-120.

Felton L. Remington - Essentials of Pharmaceutics. London, Pharmaceutical Press, 2013, str. 18; 40-41; 601.

Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*, 2019, 7247238.

Jeličić M-L, Amidžić Klarić D, Kovačić J, Verbanac D, Mornar A. Accessing lipophilicity and biomimetic chromatography profile of biologically active ingredients of botanicals used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(8):965.

Katzung BG. Temeljna i klinička farmakologija, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 1109.

Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2011, 474(7351), 307-317.

Larussa T, Imeneo M, Lizza F. Potential role of nutraceutical compounds in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(14), 2483-2492.

Lönnfors S, Vermeire S, Greco M, Hommes D, Bell C, Avedano L. IBD and health-related quality of life -- discovering the true impact. *J Crohns Colitis*, 2014, 8(10), 1281-1286.

Markl D, Zeitler JA. A Review of Disintegration Mechanisms and Measurement Techniques. *Pharm Res*, 2017, 34(5), 890-917.

Milaković D, i Crnčević Urek M. (2020). Biološka terapija u liječenju kroničnih upalnih bolesti crijeva, *Medicina Flum*, 56(2), str. 137-146.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012, 142, 46-54.

Odze RD. A contemporary and critical appraisal of 'indeterminate colitis'. *Mod Pathol*, 2015, 28 Suppl 1, S30-S46.

Parian AM, Limketkai BN, Shah ND, Mullin GE. Nutraceutical Supplements for Inflammatory Bowel Disease. *Nutr Clin Pract*, 2015, 30(4), 551-558.

Park KT, Colletti RB, Rubin DT, Sharma BK, Thompson A, Krueger A. Health Insurance Paid Costs and Drivers of Costs for Patients With Crohn's Disease in the United States. *Am J Gastroenterol*, 2016, 111(1), 15-23.

Silva DA, Webster GK, Bou-Chacra N, Löbenberg R. The significance of disintegration testing in pharmaceutical development. *Dissolution Technol*, 2018, 25(3), 30-8.

Thomson ABR, Shaffer EA. First Principles of Gastroenterology and Hepatology. CAPStone Academic Publishers, 2012, str. 260-263.

United States Pharmacopeial Convention. <616> Tapped Density. U: United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38). United States Pharmacopeial Convention, urednici, Rockville, Maryland, Sjedinjene Američke Države, 2021.

United States Pharmacopeial Convention. <711> Dissolution. U: United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38). United States Pharmacopeial Convention, urednici, Rockville, Maryland, Sjedinjene Američke Države, 2021.

United States Pharmacopeial Convention. <1216> Tablet Friability. U: United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38). United States Pharmacopeial Convention, urednici, Rockville, Maryland, Sjedinjene Američke Države, 2021.

United States Pharmacopeial Convention. <1217> Tablet Breaking Force. U: United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38). United States Pharmacopeial Convention, urednici, Rockville, Maryland, Sjedinjene Američke Države, 2021.

United States Pharmacopeial Convention. <2040> Disintegration and Dissolution. U: United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38). United States Pharmacopeial Convention, urednici, Rockville, Maryland, Sjedinjene Američke Države, 2021.

Vecchi Brumatti L, Marcuzzi A, Tricarico PM, Zanin V, Girardelli M, Bianco AM. Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. *Molecules*, 2014, 19(12), 21127-21153.

Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. *Medicus*, 2006, 15, 53-62.

Vucelić B, i sur.. Hrvatski konsenzus o liječenju upalnih bolesti crijeva biološkom terapijom. *Acta med Croatica*, 67(2), 75-86.

Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434.

Xujin L, Shah P. Dissolution of gelatin capsules: Evidence and confirmation of cross-linking. *Dissolut. Technol*, 2017, 24, 6-21.

Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1), 91-99.

Zhao M, Gönczi L, Lakatos PL, Burisch J. The Burden of Inflammatory Bowel Disease in Europe in 2020. *J Crohns Colitis*. 2021, 15(9), 1573-1587.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Upalne bolesti crijeva skupina su autoimunih bolesti koje karakterizira kronično ili relapsno upalno stanje u gastrointestinalnom traktu. Zabrinjava rast incidencije i prevalencije ovih bolesti u općoj populaciji jer ozbiljno narušavaju kvalitetu života pacijenata i predstavljaju brojne izazove za zdravstvo. Zbog izazovnog i dugotrajnog liječenja, pacijenti s upalnim bolestima crijeva nerijetko posežu za dodacima prehrani. Kako je broj pacijenata koji koriste dodatke prehrani u porastu, u fokus dolazi pitanje kontrole kvalitete dodataka prehrani.

Cilj ovoga rada bio je prema USP protokolima provesti fizikalno-kemijsku karakterizaciju biljnih dodataka prehrani koji se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva.

Ispitano je 36 uzoraka u različitim dozirnim oblicima: tablete, prašci, tvrde i meke kapsule. Provedena su sljedeća ispitivanja: ispitivanje nasipne gustoće i gustoće nakon protresivanja (USP <616>), varijacije mase dozirnih oblika (USP <2091>), raspadljivosti (USP <2040>), pucanja mekih kapsula (USP <2040>), rastrošljivosti tableta (USP <1216>) i sile loma tableta (USP <1217>). Najbolja svojstva tečenja prema nasipnoj gustoći nakon protresivanja među ispitivanim uzorcima prašaka imaju sirovine kurkume, a najlošija uzorci andrografisa. Sve ispitivane tablete i kapsule zadovoljile su kriterij USP-a u ispitivanju varijacije mase. Samo jedan uzorak (S20) nije zadovoljio kriterij raspadljivosti. U ispitivanju pucanja mekih kapsula i rastrošljivosti tableta svi su uzorci zadovoljili USP kriterije. Sila loma ispitanih tableta bila je u rasponu od 27,7 do 248,5 N. Loša svojstva tečenja sirovina mogla bi uzrokovati neujednačenost dozirnih jedinica, a tableta koja se nije raspala najvjerojatnije neće biti učinkovita *in vivo*.

Inflammatory bowel diseases are a group of autoimmune diseases characterized by chronic or relapsing inflammatory conditions in the gastrointestinal tract. The increasing incidence and prevalence of these diseases in the general population are concerning because they seriously compromise the quality of life of patients and present numerous challenges for healthcare. Due to challenging and prolonged treatment, patients with inflammatory bowel diseases often turn to dietary supplements. As the number of patients using these supplements is growing, it is important to investigate their effectiveness and safety.

The aim of this thesis was to conduct a physicochemical characterization of herbal dietary supplements used in the therapy of inflammatory bowel diseases according to the USP protocols.

36 samples were tested in various dosage forms: tablets, powders, hard and soft capsules. The following tests were carried out: bulk density and tapped density (USP <616>), weight variation of dosage forms (USP <2091>), disintegration (USP <2040>), soft capsule rupture (USP <2040>), tablet friability (USP <1216>) and tablet breaking force (USP <1217>). The raw materials of turmeric have the best flow properties, according to tapped density testing, among the tested powder samples, while the andrographis samples have the least desirable flow properties. All tested tablets and capsules passed the USP weight variation test. Only one sample (S20) did not meet the disintegration criteria. In the soft capsule rupture and tablet friability testing, all samples met the USP criteria. Tablet breaking force was in the range from 27.7 to 248.5 N. Poor raw material flow characteristics can cause unequal dosing units, while a tablet that did not disintegrate is unlikely to be effective *in vivo*.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA DODATAKA PREHRANI KOJI SE KORISTE U TERAPIJI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Matea Perko

SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva skupina su autoimunih bolesti koje karakterizira kronično ili relapsno upalno stanje u gastrointestinalnom traktu. Zabrinjava rast incidencije i prevalencije ovih bolesti u općoj populaciji jer ozbiljno narušavaju kvalitetu života pacijenata i predstavljaju brojne izazove za zdravstvo. Zbog izazovnog i dugotrajnog liječenja, pacijenti s upalnim bolestima crijeva nerijetko posežu za dodacima prehrani. Kako je broj pacijenata koji koriste dodatke prehrani u porastu, u fokus dolazi pitanje kontrole kvalitete dodataka prehrani.

Cilj ovoga rada bio je prema USP protokolima provesti fizikalno-kemijsku karakterizaciju biljnih dodataka prehrani koji se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva.

Ispitivano je 36 uzoraka u različitim dozirnim oblicima: tablete, prašci, tvrde kapsule i meke kapsule. Provedena su sljedeća ispitivanja: ispitivanje nasipne gustoće i gustoće nakon protresivanja (USP<616>), varijacije mase dozirnih oblika (USP <2091>), raspadljivosti (USP <2040>), pucanja mekih kapsula (USP <2040>), rastrošljivosti tableta (USP <1216>) i ispitivanje sile loma tableta (USP <1217>). Najbolja svojstva tečenja prema nasipnoj gustoći nakon protresivanja među ispitivanim uzorcima prašaka imaju sirovine kurkume, a najlošija uzorci andrografisa. Sve ispitivane tablete i kapsule zadovoljile su kriterij USP-a u ispitivanju varijacije mase. Samo jedan uzorak nije zadovoljio kriterij raspadljivosti. U ispitivanju pucanja mekih kapsula i rastrošljivosti tableta svi su uzorci zadovoljili USP kriterije. Sila loma ispitivanih tableta bila je u rasponu od 27,7 do 248,5N. . Loša svojstva tečenja sirovina mogla bi uzrokovati neujednačenost dozirnih jedinica, a tableta koja se nije raspala najvjerojatnije neće biti učinkovita *in vivo*.

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

Rad sadrži: 32 stranica, 9 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Upalne bolesti crijeva, farmakopeja, dodaci prehrani

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Marijana Zovko Končić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF DIETARY SUPPLEMENTS USED IN THE THERAPY OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Matea Perko

SUMMARY

Text Inflammatory bowel diseases are a group of autoimmune diseases characterized by chronic or relapsing inflammatory conditions in the gastrointestinal tract. The increasing incidence and prevalence of these diseases in the general population are concerning because they seriously compromise the quality of life of patients and present numerous challenges for healthcare. Due to the challenging and prolonged treatment, patients with inflammatory bowel diseases often turn to dietary supplements. As the number of patients using these supplements is growing, it is important to investigate their effectiveness and safety.

The aim of this work was to conduct a physicochemical characterization of herbal dietary supplements used in the therapy of inflammatory bowel diseases according to the USP protocols.

36 samples were tested in various dosage forms: tablets, powders, hard capsules and soft capsules. The following tests were carried out: bulk density and tapped density (USP <616>), weight variation of dosage forms (USP <2091>), disintegration (USP <2040>), soft capsule rupture (USP <2040>), tablet friability (USP <1216>) and tablet breaking force (USP <1217>). The raw materials of turmeric have the best flow properties, according to tapped density testing, among the tested powder samples, while the andrographis samples have the least desirable flow properties. All tested tablets and capsules passed the USP weight variation test. Only one sample did not meet the disintegration criteria. In the soft capsule rupture and tablet friability testing, all samples met the USP criteria. Tablet breaking force was in the range from 27.7 to 248.5N. Poor raw material flow characteristics can cause unequal dosing units, while a tablet that did not disintegrate is unlikely to be effective *in vivo*.

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

Thesis includes: 32 pages, 9 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: IBD, Pharmacopeia, Dietary supplements

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.