

Ispitivanje farmakopejskih svojstava kvalitete i antioksidativne aktivnosti tableta za žvakanje koje sadrže ekstrakt kore crvenog brijesta

Morić-Španić, Kristian

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:863364>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



Kristian Morić-Španić

**Ispitivanje farmakopejskih svojstava kvalitete i
antioksidativne aktivnosti tableta za žvakanje
koje sadrže ekstrakt kore crvenog brijesta**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na utrošenom vremenu, organizaciji i vođenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i ostalim članovima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova koji su mi bili na raspolaganju dok sam obavljao eksperimentalni dio rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene tijekom studiranja i podržavali me.

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Crveni brijest | 1 |
| 1.1.1. Opće informacije o biljci..... | 1 |
| 1.1.2. Sastojci kore crvenog brijesta..... | 1 |
| 1.1.3. Upotreba kore crvenog brijesta..... | 2 |
| 1.1.4. Kliničke studije..... | 2 |
| 1.1.5. Tehnološki oblici i doziranje..... | 2 |
| 1.2. USP ispitivanja | 2 |
| 1.2.1. Ispitivanje varijacije mase tableta..... | 3 |
| 1.2.2. Ispitivanje rastrošljivosti tableta..... | 3 |
| 1.2.3. Ispitivanje sile loma tableta..... | 4 |
| 1.2.4. Ispitivanje gubitka sušenjem..... | 4 |
| 1.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata | 5 |
| 1.3.1. Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata..... | 5 |
| 1.3.2. DPPH metoda..... | 5 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 7 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 8 |
| 3.1. Materijali | 8 |
| 3.1.1. Uzorci..... | 8 |
| 3.1.2. Kemikalije i reagensi..... | 8 |
| 3.1.3. Radni instrumenti..... | 8 |
| 3.1.4. Pribor..... | 8 |
| 3.2. Metode | 9 |
| 3.2.1. Farmakopejska ispitivanja..... | 9 |
| 3.2.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom..... | 10 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 11 |
| 4.1. Rezultati USP ispitivanja | 11 |
| 4.2. Antioksidativna aktivnost | 13 |
| 5. ZAKLJUČAK | 15 |
| 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA | 16 |
| 7. LITERATURA | 17 |
| 8. SAŽETAK/SUMMARY | 20 |

1. UVOD

1.1. CRVENI BRIJEST

1.1.1. Opće informacije o biljci

Crveni (skliski) brijest (*Ulmus rubra*, *Ulmaceae*) drvo je iz porodice brijestova. Geografski je distribuiran preko istočnog i središnjeg dijela Sjedinjenih Američkih Država. Pridjev skliski (engl. *slippery*) dolazi od viskozne, sluzave tekućine koja se stvara pri žvakanju unutarnje kore. Unutarnja kora je dio drveta koji se koristi u medicinske svrhe. Ona je tanka, čvrsta, fleksibilna te ima fibroznu strukturu. Svježa kora ima crveno-žutu ili crveno-smeđu boju. U medicinske svrhe unutarnja kora se osuši i samelje u prah koji je sivkaste boje. (Watts i Rousseau, 2012.)

1.1.2. Sastojci kore crvenog brijesta

Najvažniji sastojci kore su sluzi i tanini.

1) Sluz koja formira glavni dio kemijskih sastojaka crvenog brijesta sastoji se od ugljikohidrata koji dodatkom vode bubre i formiraju viskoznu i sluzavu tvar. Takve viskozne tvari poput gela povećavaju vrijeme zadržavanja polimera na mukoznim površinama i olakšavaju njihovu adheziju. Time se postiže oblaganje mukoznih membrana i pomaže ublažavanje nesvjesnih refleksa (kašljanja, čišćenja grla). Među sastavnice sluzi ubrajaju se: monosaharidi (heksoze, pentoze), metilpentoze i uronske kiseline. Navedene sastavnice imaju sposobnost vezanja vode i smanjenu topljivost. Proizvodi skliskog brijesta u obliku praška mogu se koristiti kao demulcenti odnosno kada se pomiješaju s vodom formira se tanki gel koji se može nanijeti na mukozne membrane.

2) Tanini su u vodi topljivi polifenolni spojevi koji mogu vezati i taložiti proteine putem hidroksilnih i karboksilnih grupa. Imaju snažno adstrigentno djelovanje. Mehanizam djelovanja uključuje unakrsno povezivanje strukturalnih proteina. Taloženjem proteina smanjuju tkivni eksudat, omogućuju sušenje zahvaćenog područja i ubrzano cijeljenje rana. Kontrakcija kože i cijeljenje rane bitno je zbog prevencije infekcija. Tanini imaju jako antioksidativno djelovanje i štite od reaktivnih kisikovih spojeva. Na mnoge stanične procese uključujući lipidnu peroksidaciju, denaturaciju proteina, stvaranje ugljikohidrata i nukleinskih kiselina mogu utjecati slobodni radikali formirani tijekom oksidativnog stresa. Akumulacija reaktivnih kisikovih spojeva tijekom oksidativnog stresa može smetati normalnim fiziološkim procesima.

Polifenoli crvenog brijesta su pokazali antioksidativna svojstva inhibicijom nastajanja citotoksičnih reaktivnih spojeva poput peroksinitrita. Ekstrakti kore crvenog brijesta su istraživani s obzirom na antioksidativno i protuupalno djelovanje. Istraživanja upućuju na sistemske protuupalne učinke u želucu i crijevima na svinjskom životinjskom modelu. Također je uočen utjecaj kore crvenog brijesta na aktivnost imunskog sustava preko povećane sinteze citokina na mišjem životinjskom modelu. (Watts i Rousseau, 2012.)

1.1.3. Upotreba kore crvenog brijesta

Kora crvenog brijesta tradicionalno se koristi kod tegoba poput kašlja, dijareje i bolesti gastrointestinalnog trakta. Zbog antioksidativnog učinka kora crvenog brijesta bi mogla biti učinkovita pri liječenju upalnih bolesti crijeva. (Joo, 2014.)

Topikalno djeluje blagotvorno na rane i suhu kožu. Sluzi iz kore bubre i formiraju vlažnu ljepljivu masu koja umiruje suhu i upaljenu kožu što može biti korisno kod manjih ozljeda na koži. (<https://www.verywellhealth.com>)

1.1.4. Kliničke studije

Jedna randomizirana klinička studija pokazala je da ljudima s upalom grla pijenje čaja napravljenog od male količine kore crvenog brijesta dovodi do smanjenja boli u grlu. Čaj je sadržavao korijen sladića i još neke biljke pa je teško pripisati taj učinak crvenom brijestu. (Brinckmann i sur., 2003.)

U drugoj studiji ljudi su uzimali kombinirane suplemente koji sadržavaju crveni brijest i biljke poput kurkume, aloe vere itd. Prijavili su poboljšanje gastrointestinalnih simptoma poput abdominalne boli i konstipacije. (Ried i sur., 2020.)

1.1.5. Tehnološki oblici i doziranje

Kao dodatak prehrani crveni brijest je dostupan u raznim oblicima: tablete, kapsule napunjene prahom, pastile, mljevena kora za čajeve i oblozi. Doza ovisi o upotrebi, ali najčešće doze u kapsulama su 400 do 500 mg biljne droge, preporučena primjena 3-4 puta dnevno kroz 8 tjedana. (<https://www.clinicaladvisor.com>).

1.2. USP ISPITIVANJA

Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Pharmacopeia*, USP) u svojim propisima uključuje ispitivanja dodataka prehrani.

1.2.1. Ispitivanje varijacije mase tableta

Proces tabletiranja ima za cilj pripremu tableta ujednačene mase. Postupak je visoko kontroliran, no odstupanja su moguća zbog varijacija u gustoći praha ili neujednačenog postupka pripreme. Stoga farmakopeje specificiraju prihvatljivu razinu varijacije mase. (<https://www.gmp-compliance.org>)

Ispitivanje varijacije mase opisano je u poglavlju USP <2091> „Varijacija mase dodataka prehrani“. Potrebno je pojedinačno izvagati 20 netaknutih tableta i izračunati im prosječnu masu. Zahtjev farmakopeje (za tablete mase veće od 324 mg) je da maksimalno 2 tablete variraju od srednje vrijednosti mase više od 5 %. Također, nijedna od te 2 tablete ne smije varirati od srednje vrijednosti više od 10 %.

1.2.2. Ispitivanje rastrošljivosti tableta

Tijekom pakiranja, skladištenja ili rukovanja s tabletama moguće je da dođe do njihova oštećenja kao posljedica abrazije, trenja ili mehaničkog udara. Tablete bi trebale zadržati svoj oblik, veličinu, masu i boju u normalnim uvjetima rukovanja i skladištenja unutar definiranog roka trajanja. Rastrošljivost tableta je svojstvo povezano s njihovom tvrdoćom, a predstavlja mjeru njihove sposobnosti da se odupru stresu kojem su izložene prilikom pakiranja, transporta i rukovanja. Ukoliko tableta ima veliku rastrošljivost, to dovodi do gubitka djelatne tvari, npr. pri čuvanju i rukovanju. Također, oštećen izgled tablete (tragovi pucanja, okrhnutost, neujednačenost boje, rasutost odlomljenog praha po spremniku itd.) pacijentu može izazvati dvojbe oko kvalitete tableta. Rastrošljivost je postala važno svojstvo tableta i atribut kvalitete koji se procjenjuje tijekom razvoja proizvoda. (Osei-Yeboah i Sun, 2015)

Ispitivanje rastrošljivosti tableta opisano je u poglavlju USP <1216> „Rastrošljivost tableta“. Za ispitivanje se koristi uređaj čiji središnji dio čini bubanj unutarnjeg promjera između 283 i 291 mm te dubine između 36 i 40 mm napravljen od prozirnog sintetskog polimera koji ima polirane unutarnje površine te nije podložan nakupljanju statičkog elektriciteta. Tijekom ispitivanja tablete se kotrljaju u bubnju pomoću zakrivljene površine unutarnjeg radijusa između 75,5 i 85,5 mm koja se pruža od unutrašnjosti bubnja prema vani. Brzina rotacije bubnja iznosi 25 ± 1 okretaja po minuti. Tijekom rotacije tablete padaju na stijenku bubnja, klize i međusobno se sudaraju.

Kod ispitivanja tableta jedinične mase jednake ili manje od 650 mg, uzima se uzorak tableta koji ima masu blisku 6,5 g. Ako su tablete jedinične mase veće od 650 mg, uzima se 10 cijelih tableta. Tablete se izvažu i polože u bubanj, bubanj se rotira 100 puta nakon čega se tablete izvade te se s njih ukloni prašina. Ukoliko su prisutne puknute, rascijepljene ili slomljene

tablete donosi se zaključak da uzorak ne zadovoljava propisane kriterije. Ako vizualno nema oštećenih tableta onda se one izvažu. Prema propisu farmakopeje ispitivanje se provodi jednom. Ako su rezultati dvojbjeni, test se ponavlja još 2 puta. Za većinu tableta dozvoljeni gubitak mase manji od 1 % je prihvatljiv.

1.2.3. Ispitivanje sile loma tableta

Test tvrdoće tableta izvodi se mjerenjem sile potrebne za lom tablete u određenoj ravnini. Tablete za žvakanje bi trebale biti dovoljno tvrde da izdrže procese proizvodnje, pakiranja, transporta, ali ne i pretvrde da uzrokuju probleme sa žvakanjem (Antil i sur., 2023).

Ispitivanje sile loma tableta opisano je u poglavlju USP<1217> „Sila loma tableta“. Tablete se umetnu između dvije ploče, jedna ploča je pomična i djeluje silom na tabletu uzrokujući lom dok je druga ploča nepomična. Za tablete okruglog oblika sila se primjenjuje preko dijametra i lom se događa u dijametralnoj ravnini. Nužno je da su ploče paralelne te da su njihove površine glatke i okomite na smjer kretanja. Tijekom gibanja ploča mora se očuvati njihova okomitost na smjer gibanja te otpornost na savijanje i torzijski pomak. Površine ploča moraju biti veće od dodirne površine s tabletom. Brzina kojom se primjenjuje sila treba biti konstantna. To je bitno jer rapidna povećanja tlačnih opterećenja mogu dovesti do nekontroliranog drobljenja i varijabilnosti u mjerenjima. Test se mora izvoditi s opremom koja je redovito kalibrirana. Da bi se osigurala usporedivost podataka, testiranja se moraju izvoditi pri jednakim uvjetima primjene sile. Rezultati se izražavaju u standardnim mjernim jedinicama sile, obično u newtonima ili kilopondima. Razlučivost uređaja za silu loma bi trebala biti barem 1N. Potrebno je testirati najmanje 6 uzoraka tableta da bi se osigurala statistička preciznost.

1.2.4. Ispitivanje gubitka sušenjem

Udio vlage u gotovim tabletama bitan je atribut kvalitete koji utječe na stabilnost (fizički izgled i kemijsko raspadanje), topljivost i vijek trajanja proizvoda. Djelatne tvari pod utjecajem vlage mogu se hidrolizirati i formirati hidrate. Nepravilno skladištenje farmaceutskih proizvoda može dovesti do oštećenja tableta (pukotine i promjene boje/pigmentacije) kao i gubitka djelatne tvari. (Patel i sur., 2023.)

Ispitivanje gubitka sušenjem opisano je u poglavlju USP<731> „Gubitak sušenjem“. Masa uzorka koji se analizira obično je od 1 do 2 g. Prije analize uzorke je potrebno usitniti na čestice veličine približne 2 mm. Izvaže se plitka staklena boca s čepom koja je prethodno osušena 30 minuta. Uzorak se stavi u staklenu bocu te izvaže. Bitno je da se uzorak ravnomjerno rasporedi po površini. Uzorak i boca se stavljaju u komoru za sušenje, ukloni čep koji se također

ostavi u komori. Uzorak se suši na određenoj temperaturi i vremenu. Kada je postupak sušenja završen, boca se zatvara čepom te ohladi na sobnu temperaturu u eksikatoru prije vaganja.

1.3. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI BILJNIH EKSTRAKATA

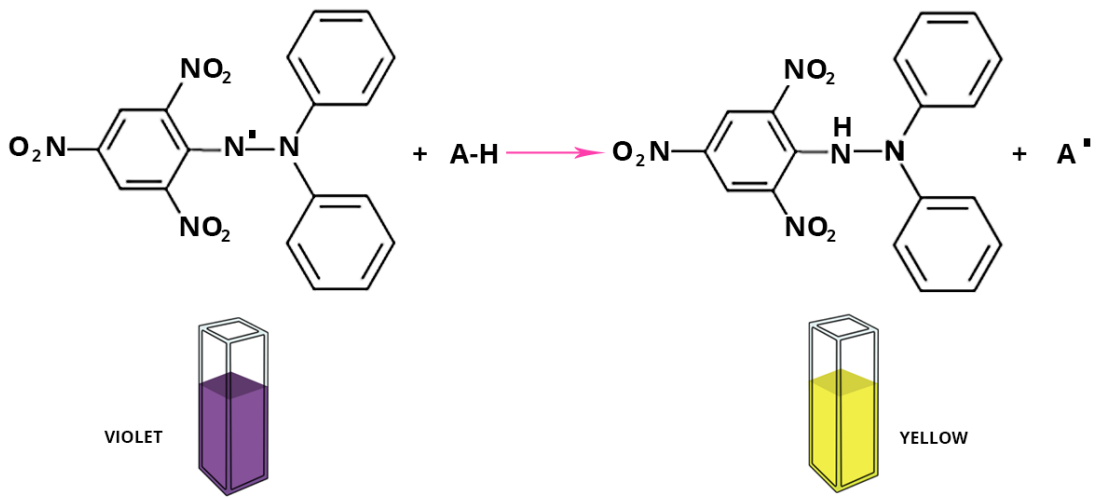
1.3.1. Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata

Biljke imaju veliki broj bioaktivnih spojeva s visokom antioksidativnom aktivnošću. Zbog nepovoljnih uvjeta: ekstremnih temperatura, suše, teških metala, nedostatka nutrijenata i visokog saliniteta, biljke stvaraju velike koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva. Zbog toga biljke imaju složeni antioksidativni sustav. Bitnu ulogu u njemu imaju fenolni spojevi, sekundarni metaboliti biljaka. Ti spojevi djeluju antioksidativno donirajući vodik ili elektrone te su stabilni radikalni intermedijeri. Oni imaju i zaštitni učinak na ljude. Njihova antioksidativna aktivnost u biljnim ekstraktima je povezana s prevencijom kardiovaskularnih bolesti i raka. Studije za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata različitih biljaka mogu doprinijeti uspostavljanju vrijednosti tih vrsta kao izvora antioksidativnih spojeva.

Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti mogu se klasificirati u 2 skupine po mehanizmu djelovanja: prijenos vodikova atoma (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT) i prijenos jednog elektrona (engl. *Single Electron Transfer*, SET). Najčešće korištene SET metode su: metoda s DPPH (2,2-di-phenyl-1-picrylhydrazyl) radikalom, analiza redukcije željeza (engl. *Ferric Reducing Assay*, FRAP), analiza antioksidativnog kapaciteta ekvivalenta troloksa (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC), analiza redukcije bakra (engl. *copper reduction*, CUPRAC), RP (engl. *reducing power*) analiza. (Chaves i sur., 2020.)

1.3.2. DPPH metoda

DPPH metoda je jedna od najstarijih, ali još uvijek i najčešće korištenih metoda mjerenja antioksidativne učinkovitosti lijekova, biljnih ekstrakata, dodataka prehrani, hrane itd. (Amidžić Klarić i sur., 2011; Amidžić Klarić i sur., 2020; Amidžić Klarić i sur., 2022; Jasprica i sur., 2007; Jeličić i sur., 2022; Plazonić i sur., 2013). Određivanje se temelji na mjerenju sposobnosti antioksidansa da hvata radikal. Slobodni dušikov elektron u DPPH radikalnu reducira se u hidrazin preuzimanjem vodikova atoma antioksidansa. DPPH pokazuje snažnu apsorpcijsku vrpcu na 517 nm što se vidi kao crveno-ljubičasto obojenje, dok se u proton-donorskoj otopini generira njegov reducirani oblik (neradikalni) s gubitkom ljubičaste i pojavom blijedo-žute boje. (Kedare i Singh, 2011.).



Slika 1. Kemijska reakcija radikala DPPH i antioksidansa (preuzeto iz <https://chimactiv.agroparistech.fr/en>)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kora crvenog brijesta tradicionalno se koristi kod tegoba poput želučanih smetnji, dijareje i kašlja. Ima dvojako zaštitno djelovanje koje ostvaruje preko sluzi i polifenola. Danas na tržištu nalaze se proizvodi registrirani kao dodaci prehrani koji sadrže crveni brijest odnosno uz crveni brijest sadrže i druge biljne vrste. Navedeni proizvodi su široko dostupni, relativno niske cijene te se mogu nabaviti bez savjetovanja sa stručnim zdravstvenim djelatnikom. Većina bolesnika koja koristi dodatke prehrani smatra kako su oni općenito dobri za zdravlje, sigurni i učinkoviti za liječenje odnosno prevenciju specifičnih stanja. Budući da su ovi proizvodi prirodnog porijekla te se neki od njih stoljećima koriste u tradicionalnoj medicini, bolesnici ih smatraju sigurnima za upotrebu. Međutim, Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA) ne odobrava dodatke prehrani u pogledu sigurnosti ili učinkovitost proizvoda (iako dodaci moraju imati podatke o sigurnosti u svojoj povijesti) već je odgovornost proizvođača da osigura sigurnosne standarde proizvoda. Nadalje, ovi proizvodi ne podliježu istim zakonima i kontrolama kao i lijekovi.

Posljednjih godina sve više raste svijest proizvođača, zdravstvenih djelatnika te bolesnika o potrebi za dodacima prehrani visoke kvalitete koja osigurava njihovu učinkovitost i sigurnost.

U ovo istraživanje uključen je dodatak prehrani dostupan u ljekarnama u RH koji sadrži ekstrakt kore crvenog brijesta u nalazi se u obliku tableta za žvakanje.

Cilj ovog rada je provesti sljedeća ispitivanja na odabranom proizvodu koji sadrži ekstrakt crvenog brijesta:

- 1) Procijeniti kvalitetu ispitivanog dodatka prehrani prema USP zahtjevima kvalitete
- 2) Procijeniti antioksidativnu aktivnost ekstrakta

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

U ispitivanje je uzet uzorak koji sadrži kao biljnu vrstu crveni brijest, dostupan u ljekarnama u RH te registriran kao dodatak prehrani. Uzorak se nalazi u obliku tableta za žvakanje a na deklaraciji proizvoda je navedeno da sadrži 200 mg ekstrakta crvenog brijesta. Jedno pakiranje sadrži 16 dozirnih oblika.

3.1.2. Kemikalije i reagensi

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH, slobodni radikal, 95% (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Metanol, čistoće 98%-100% (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Ultra-čista voda pročišćena s uređajem WaterPro (Labconco, Kansas City, MI, Sjedinjene Američke Države)

3.1.3. Radni instrumenti

- Analitička vaga OHAUS PA114 (Pioneer, Parsippany, SAD)
- PTF 100 Single Drum Tablet Friability and Abrasion Tester (Pharma Test, Hainburg, Njemačka)
- PTB 311E „3in1“ Tablet Hardness Tester (Pharma Test, Hainburg, Njemačka)
- Vlagomjer DBS-60-3 (Kern and Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex miješalica LLG-uniTEXER1 (LLG Labware, Meckenheim, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj BANDELIN DT100H (GmbH & Co., Berlin, Njemačka)
- Centrifuga IKA MINI G S000 (Ika-Werke GmbH & Co. KG., Staufen, Njemačka)
- UV-VIS spektrofotometar Agilent 8453 E (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

3.1.4. Pribor

- posudice za vaganje okrugle AI (90 mm, 4 mm) (Kern and Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)

3.2 METODE

3.2.1. Farmakopejska ispitivanja

1) Ispitivanje varijacije mase tableta

Provedeno je ispitivanje varijacije mase opisano u poglavlju USP <2091> „Varijacija mase dodataka prehrani“. Pri vaganju je korištena analitička vaga (OHAUS PA114 Pioneer) s točnošću od 0,0001 g. Pojedinačno je izvagano 20 netaknutih tableta za žvakanje i izračunata je prosječna masa. Zahtjev farmakopeje (za tablete mase veće od 324 mg) je ispunjen ukoliko najviše mase dviju tableta odstupaju od srednje vrijednosti za više od 5 %. Također, masa niti jedne od tih dviju tableta ne smije varirati od srednje vrijednosti za više od 10 %.

2) Ispitivanje rastrošljivosti tableta

Provedeno je ispitivanje rastrošljivosti opisano u poglavlju USP <1216> „Rastrošljivost tableta“. Korišten je instrument PTF 100 proizvođača Pharma Test. U ispitivanje je uzeto 10 tableta za žvakanje. Tablete su izvagane prije i nakon postupka ispitivanja rastrošljivosti. Prema USP zahtjevima, gubitak mase tableta ne smije biti veći od 1 %.

3) Ispitivanje sile loma tableta

Provedeno je ispitivanje sile loma tableta opisano u poglavlju USP <1217> „Sila loma tableta“. Korišten je instrument PTB311E proizvođača Pharma Test. U ispitivanje je uzeto 8 tableta za žvakanje. Primjenom navedenog uređaja izmjerena je najmanja sila koja uzrokuje lom pojedine tablete.

4) Ispitivanje gubitka sušenjem

Za ispitivanje gubitka sušenjem korišten je uređaj DBS 60-3 od proizvođača Kern and Sohn. U ispitivanje je uzeto 6 tableta za žvakanje. Neposredno prije ispitivanja uzorci su se usitnili u tarioniku. Ispitivanje je provedeno na svakoj pojedinoj tableti. Ispitivani uzorak tablete sušio se na 105 °C do konstantne mase, odnosno dok razlika između dviju odvaga nije bila manja od 0,5 mg. Nakon toga je zabilježen gubitak mase koji odgovara udjelu hlapljivih tvari.

3.2.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

1) Ekstrakcija polifenola iz uzorka

U odmjerne tikvice od 25 mL u triplicatu je odvagana prikladna masa (25 ± 2 mg) prethodno usitnjenih tableta uzorka, zatim je u svaku tikvicu dodano 15 mL smjese metanol:ultračista voda (80:20, v/v). Nakon toga su uzorci promućkani na vorteks miješalici LLG-uniTEXER1 15 sekundi te stavljeni na ultrazvučnu kupelj BANDELIN DT100H 15 minuta. Zatim je proveden postupak centrifugiranja uređajem IKA mini G S000 na 2000G tijekom 10 minuta pri 25 °C. Supernatant dobiven postupkom centrifugiranja je filtriran kroz PES filter veličine pora 0,22 μ m te je dobivena bistra otopina koja se dalje koristila u ispitivanju.

2) Priprema otopine DPPH i uzorka

Pripremljena je 1 mM otopina DPPH otapanjem odgovarajuće mase DPPH u 50 mL metanola. Pripremljene su otopine uzoraka na 3 različite koncentracijske razine (uzeto je 0,5 mL, 2 mL i 3mL ekstrakta uzorka), u svaku tikvicu dodano je 0,5 mL 1 mM otopine DPPH te nadopunjeno metanolom do 4,5 mL. Odvojeno su pripremljene otopine DPPH dodavanjem 0,5 mL 1 mM otopine DPPH i nadopunjene metanolom do 4,5 mL. Sve otopine su promućkane na vorteks miješalici LLG-uniTEXER1 15 sekundi te ostavljene na tamnom mjestu 30 minuta. Nakon toga im je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm na UV-spektrofotometru Agilent 8453E.

Sposobnost hvatanja DPPH radikala izračunata je kao postotak inhibicije slobodnog radikala korištenjem sljedeće formule:

$$\% \text{DPPH}_{\text{inhibicije}} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

A je apsorbancija otopine uzorka nakon dodatka otopine slobodnog radikala, a A_0 apsorbancija otopine slobodnog radikala.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Premda je kora crvenog brijesta već dugo vremena sastavni dio tradicionalne medicine u posljednje vrijeme se koristi kao dodatak prehrani za ublažavanje gastrointestinalnih tegoba. Poznato je da sadrži tvari koje bubre te tako štite sluznicu gastrointestinalnog trakta kao i antioksidanse koji pomažu kod upalnih stanja gastrointestinalnog trakta. Posljednjih godina istraživanja na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu usmjerena su na ispitivanja sastava aktivnih i toksičnih sastavnica dodataka prehrani (Buhač i sur., 2020; Brusač i sur., 2022). Nadalje, najnovija ispitivanja su usmjerena prema fizikalnoj karakterizaciji dodataka prehrani prema propisima USP-a (Amidžić Klarić i sur., 2023).

Ispitivanja koja se provode u sklopu izrade ovog diplomskog rada usmjerena su na dodatke prehrani koji sadrže ekstrakt crvenog brijesta. U ispitivanje je uzet uzorak tableta za žvakanje. Provedena su sljedeća ispitivanja tableta sukladno USP: varijacija mase, rastrošljivost, sila loma i gubitak sušenjem. Osim navedenog ispitana je antioksidativna aktivnost uzorka.

4.1. Rezultati USP ispitivanja

Prema poglavlju USP <2091> „Varijacija mase dodataka prehrani“ ispitana je varijacija mase tablete za žvakanje. Rezultati su prikazani u **Tablici 1**.

Ispitivani uzorak zadovoljava zahtjev USP-a ukoliko najviše mase dviju tableta odstupaju od srednje vrijednosti za ne više od 5 %. Nadalje, nijedna od tih dviju tableta ne smije odstupati od srednje vrijednosti za više od 10 %. Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 1**, vidljivo je da je prosječna masa tableta iznosila 1,9930 g. Najveće odstupanje mase od srednje vrijednosti koje je zabilježeno iznosilo je 1,68 %. Sukladno navedenom uzorak odgovara propisima USP s obzirom na odstupanja mase pojedinog dozirnog oblika. Nadalje, izmjerena prosječna masa tableta odstupala je od deklarirane vrijednosti za 7 mg.

Tablica 1: Varijacija mase ispitivanih tableta za žvakanje

| Varijacija mase | Deklarirana masa/g | Prosječna masa ($n = 20$)/g | Najmanji postotak od prosječne mase/% | Najveći postotak od prosječne mase/% | Kriterij USP ¹ |
|------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| | 2 | 1,9930 | 98,66 | 101,68 | Zadovoljen |

¹ USP - Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Pharmacopeia*)

Prema poglavljima USP <1216> „Rastrošljivost tableta“, USP <1217> „Sila loma tableta“ te USP<731> „Gubitak sušenjem“ analizirani su rastrošljivost, sila loma i gubitak sušenjem tableta za žvakanje. Prikupljeni podaci su obrađeni te prikazani u **Tablici 2**.

Za ispitivanje rastrošljivosti uzeto je 10 tableta te su skupa analizirane. Prema USP poglavlju <1216> maksimalni dozvoljeni gubitak mase prilikom ispitivanja rastrošljivosti je 1 % što znači da je ispitivani uzorak tableta za žvakanje zadovoljio navedeni kriterij. Gubitak mase iznosi 0,2472 % što znači da je USP kriterij zadovoljen (**Tablica 2**).

Za ispitivanje najmanje sile potrebne da izazove lom tableta za žvakanje uzeto je 8 dozirnih oblika. Prema izmjerenim vrijednostima uočava se da je najmanja sila koja je bila potrebna za njihov lom bila je u rasponu od 128,4 N do 145,7 N. Relativno standardno odstupanje (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD) od srednje vrijednosti iznosilo je 6,52 % (**Tablica 2**).

Za ispitivanje gubitka sušenjem uzeto je 6 tableta za žvakanje. Postoji gubitak mase tableta kretali su se od 4,00 % do 4,98 %. RSD vrijednost iznosila je 7,66 % (**Tablica 2**).

Tablica 2: Rastrošljivost, sila loma i gubitak sušenjem ispitivanih tableta za žvakanje

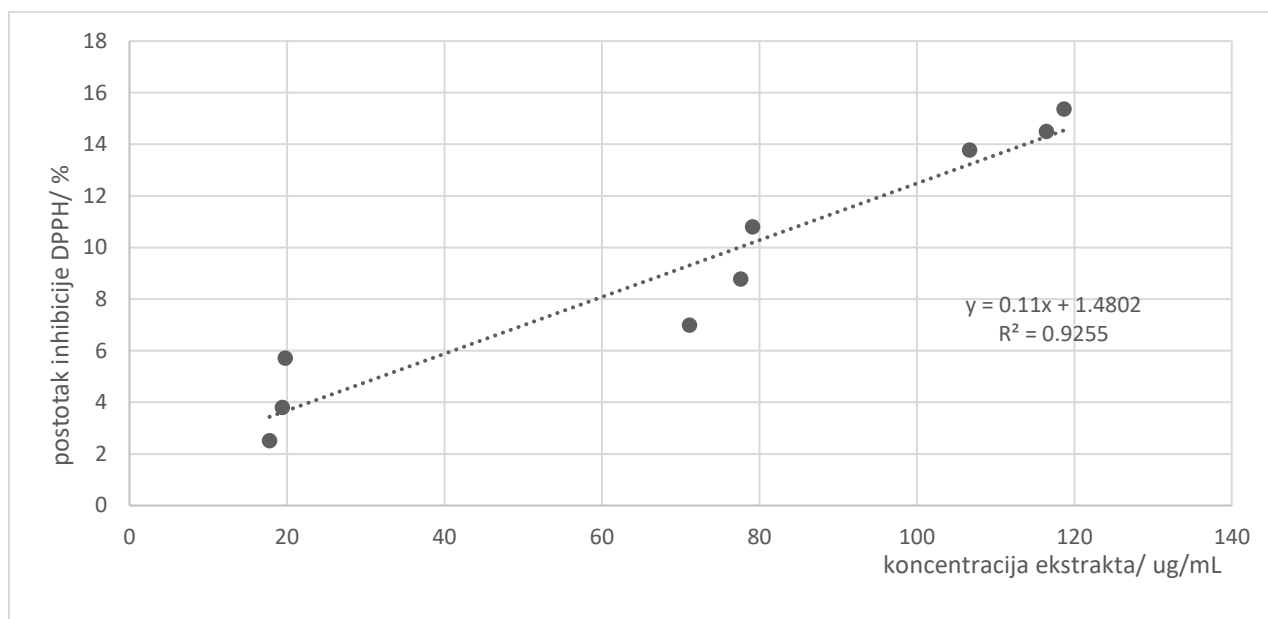
| Rastrošljivost | | Sila loma | | Gubitak sušenjem | |
|---------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------------------|----------------------|
| Postotak gubitka mase / % | Kriterij USP ¹ | Tvrdoća ($n = 8$) /N | RSD ² /% | Postotak gubitka mase ($n = 6$) / % | RSD ² / % |
| 0,2472 | Zadovoljen | 137,05 | 6,52 | 4,44 | 7,66 |

¹ USP - Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Pharmacopeia*)

² RSD - Relativno standardno odstupanje (engl. *Relative Standard Deviation*)

4.2. Antioksidativna aktivnost

Prema DPPH metodi ispitana je antioksidativna aktivnost uzoraka koji sadrže ekstrakt crvenog brijesta. Rezultati istraživanja izraženi su pomoću grafa kao ovisnost postotka inhibicije DPPH radikala o koncentraciji ekstrakta crvenog brijesta u ispitivanoj otopini (**Slika 2**). Pri izračunu koncentracije ekstrakta u ispitivanoj otopini, u obzir je uzeta deklarirana masa ekstrakta od 200 mg i deklarirana masa tableta od 2 g.



Slika 2: Graf ovisnosti postotka inhibicije DPPH radikala o koncentraciji ekstrakta kore crvenog brijesta prisutnog u ispitivanim tabletama.

Iz grafa je vidljivo da se pri analiziranim koncentracijama povećanjem koncentracije uzorka (ekstrakta kore crvenog brijesta) povećava i postotak inhibicije radikala, a time i antioksidativna aktivnost ekstrakta. Iz kalibracijske krivulje vidljiva je linearna ovisnost te je koeficijent determinacije (R^2) iznosio 0,9255.

Dobiveni podaci uspoređeni su s literaturno dostupnim. Jose i suradnici (Jose i sur., 2011.) ispitali su antioksidativnu aktivnost raznovrsnog biljnog materijala. U istraživanje su uključili biljne druge koje se koriste u tradicionalnoj indijskoj medicini poput ekstrakta lišća manga, ekstrakta vlaknastog perikarpa kokosa itd. Usporedbom rezultata iz navedenog istraživanja uočava se usporedan postotak inhibicije radikala DPPH pri analiziranim koncentracijama ekstrakta stabljike Barbadoskog oraščića (*Jatropha curcas*) i u ovom radu analiziranog ekstrakta kore crvenog brijesta. No, potrebno je istaknuti kako su u navedenom

istraživanju ispitani ekstrakti biljnog materijala dok je provedeno istraživanje uključivalo analizu gotovih farmaceutskih proizvoda. Na deklaraciji ispitanog proizvoda navedeno je da osim 200 mg ekstrakta kore crvenog brijesta sadrži izomalt i kalcijev karbonat kao punila, natrijev bikarbonat kao regulator kiselosti, natrijev alginat i saharozu kao zgušnjivače, prirodnu aromu metvice, te tvari protiv zgrudnjavanja mono- i digliceride masnih kiselina i magnezijev stearat.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija tableta za žvakanje koje sadrže ekstrakt crvenog brijesta sukladno propisima USP-a. Nadalje, ispitivanje je uključivalo i analizu antioksidativne aktivnosti.

Ispitivane tablete za žvakanje zadovoljavaju USP propise s obzirom na varijaciju mase i rastrošljivost. Rezultati ispitivanja sile loma tableta i gubitka sušenjem imaju vrijednost relativne standardne devijacije manju od 10 %. S obzirom na rezultate istraživanja moguće je zaključiti da uzorak zadovoljava propise USP-a za provedene testove.

Analizom antioksidativne aktivnosti uzorka DPPH metodom pokazana je linearna ovisnost povećanja inhibicije radikala o povećanju koncentracije ekstrakta u ispitivanom rasponu koncentracija.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

FDA - Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *US Food and Drug Administration*)

R² - koeficijent determinacije (engl. *Coefficient of Determination*)

RSD - Relativno standardno odstupanje (engl. *Relative Standard Deviation*)

USP - Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Pharmacopeia*)

7. LITERATURA

Amidžić Klarić D, Klarić I, Mornar A. Polyphenol content and antioxidant activity of commercial blackberry wines from Croatia: The application of multivariate analysis for the geographical origin differentiation. *J Food Nutr Res* 2011, 50, 199–209.

Amidžić Klarić D, Klarić I, Mornar A, Velić N, Velić D. Assessment of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of blackberry wines. *Foods* 2020, 9, 1623. doi: 10.3390/foods9111623

Amidžić Klarić D, Kovačić J, Jeličić M-L, Zubčić S, Stankov V, Gulan Čičak M, Bučar B, Klarić I, Mornar A. Assessment of physicochemical parameters and contaminants in herbal dietary supplements used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 893. doi: 10.3390/ph16060893

Amidžić Klarić D, Mornar A, Kovačić J, Jeličić M-L, Brusač E, Brletić I, Klarić I. Polyphenol content and antioxidant activity of phytoestrogen containing food and dietary supplements: DPPH free radical scavenging activity by HPLC. *Acta Pharm* 2022, 72, 375–388. doi: 10.2478/acph-2022-0031

Antil A, Dahiya M, Tomar D. An overview on efficacy of chewable tablets in improving oral drug delivery. *Sys Rev Pharm* 2023, 14, 571–577. doi: 10.31858/0975-8453.14.9.571-577

Benefits of Slippery Elm, 2023., <https://www.verywellhealth.com>, pristupljeno 16. 4. 2024.

Brinckmann J, Sigwart H, van Houten Taylor L. Safety and efficacy of a traditional herbal medicine (Throat Coat) in symptomatic temporary relief of pain in patients with acute pharyngitis: a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *J Altern Complement Med*. 2003 Apr;9(2):285-98. doi: 10.1089/10755530360623400.

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, 434–448. doi: 10.17113/ftb.60.04.22.7560

Buhač T, Amidžić Klarić D, Klarić I, Nigović B, Brusac E, Jeličić M-L, Mornar A. Assessment of active ingredients and metal impurities in phytoestrogen-containing food and dietary supplements. *J Food Nutr Res* 2020, 59, 87–97.

Causes for Weight Variations during Tableting, 2015., <https://www.gmp-compliance.org>, pristupljeno 7. 4. 2024.

Chaves N, Santiago A, Alías JC. Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. *Antioxidants* 2020, 9, 76. doi: 10.3390/antiox9010076

Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH• assay, Test principles. 2024., <https://chimactiv.agroparistech.fr/en>, pristupljeno 4. 5. 2024.

Jasprica I, Bojić M, Mornar A, Bešić E, Bućan K, Medić-Šarić M. Evaluation of antioxidative activity of Croatian propolis samples using DPPH• and ABTS•+ stable free radical assays. *Molecules* 2007, 12, 1006–1021. doi: 10.3390/12051006

Jeličić M-L, Kovačić J, Cvetnić M, Mornar A, Amidžić Klarić D. Antioxidant activity of pharmaceuticals: Predictive QSAR modeling for potential therapeutic strategy. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 791. doi: 10.3390/ph15070791

Joo YE. Natural product-derived drugs for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Intest Res* 2014, 12, 103–109. doi: 10.5217/ir.2014.12.2.103

Jose M, Varghese I, Shantaram M. In vitro antioxidant activities and phytochemical analysis of five selected plant materials used for oral health and hygiene among people of Dakshina Kannada. *Int J Appl Biol Pharm* 2011, 2, 95–103.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011, 48, 412–422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1

Osei-Yeboah F, Sun CC. Validation and applications of an expedited tablet friability method. *Int J Pharm* 2015, 484, 146–155. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.061

Patel A, Jin C, Handzo B, Kalyanaraman R. Measurement of moisture content in pharmaceutical tablets by handheld near-infrared spectrometer: adopting quality by design approach to analytical method lifecycle management. *J Pharm Biomed Anal* 2023, 229, 115381. doi: 10.1016/j.jpba.2023.115381.

Plazonić A, Mornar A, Maleš Ž, Kujundžić N. Phenolic content and antioxidant activities of Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.). *Molecules* 2013, 18, 8666–8681. doi: 10.3390/molecules18078666

Ried K, Travica N, Dorairaj R, Sali A. Herbal formula improves upper and lower gastrointestinal symptoms and gut health in Australian adults with digestive disorders. *Nutr Res*. 2020 Apr;76:37-51. doi: 10.1016/j.nutres.2020.02.008.

Slippery elm: an effective anti inflammatory agent, 2016., <https://www.clinicaladvisor.com>, pristupljeno 4. 5. 2024.

USP <731> Loss on drying, In: USP–NF. Rockville, MD: USP; Dec 1, 2020

USP <1216> Tablet Friability, In: USP–NF. Rockville, MD: USP; Dec 1, 2020

USP <1217> Tablet Breaking Force, In: USP–NF. Rockville, MD: USP; Dec 1, 2021

USP <2091> Weight variation of dietary supplements, In: USP–NF. Rockville, MD: USP; Dec 1, 2020

Watts CR, Rousseau B. Slippery Elm, its biochemistry, and use as a complementary and alternative treatment for laryngeal irritation. *JIB* 2012, 1, 17-23. doi: 10.5455/jib.20120417052415

8. SAŽETAK/SUMMARY

Kora crvenog brijesta ima široko rasprostranjenu tradicionalnu upotrebu, poglavito kod gastrointestinalnih smetnji poput želučanih tegoba i dijareje te respiratornih smetnji poput kašlja. Na tržištu su prisutni pripravci koji sadrže koru brijesta u obliku dodataka prehrani. Dodaci prehrani ne podliježu istim zakonima i strogim kontrolama kao lijekovi.

Cilj ovog rada bio je ispitati kvalitetu prema zahtjevima Farmakopeje Sjedinjenih Američkih Država te procijeniti antioksidativnu aktivnost dodatka prehrani koji sadrži ekstrakt kore crvenog brijesta. Rezultati ispitivanja kvalitete pokazuju da pripravak zadovoljava kriterije kvalitete Farmakopeje Sjedinjenih Američkih Država. Antioksidativna aktivnost procijenjena je DPPH metodom i pokazano je da povećanjem koncentracije ekstrakta linearno raste i antioksidativna aktivnost u ispitivanom području koncentracija.

The red elm bark has a widespread traditional use, mainly for gastrointestinal problems such as stomach disorders and diarrhea, but also for respiratory problems such as cough. Products on the market contain red elm bark in the form of dietary supplements. However, dietary supplements are not subject to the same laws and rigorous controls as medicines.

This study aimed to evaluate the quality of such dietary supplement according to United States Pharmacopeia requirements and also to measure its antioxidant activity. The results of quality tests show that the supplement satisfies the United States Pharmacopeia quality criteria. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH method, and it was shown that increasing the concentration of the extract linearly increases the antioxidant activity in the examined range of concentration.

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

ISPITIVANJE FARMAKOPEJSKIH SVOJSTAVA KVALITETE I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI TABLETA ZA ŽVAKANJE KOJE SADRŽE EKSTRAKT KORE CRVENOG BRIJESTA

Kristian Morić-Španić

SAŽETAK

Kora crvenog brijesta ima široko rasprostranjenu tradicionalnu upotrebu, poglavito kod gastrointestinalnih smetnji poput želučanih tegoba i dijareje te respiratornih smetnji poput kašlja. Na tržištu su prisutni pripravci koji sadrže koru brijesta u obliku dodataka prehrani. Dodaci prehrani ne podliježu istim zakonima i strogim kontrolama kao lijekovi. Cilj ovog rada bio je ispitati kvalitetu prema zahtjevima Farmakopeje Sjedinjenih Američkih Država te procijeniti antioksidativnu aktivnost dodatka prehrani koji sadrži ekstrakt kore crvenog brijesta. Rezultati ispitivanja kvalitete pokazuju da pripravak zadovoljava kriterije kvalitete Farmakopeje Sjedinjenih Američkih Država. Antioksidativna aktivnost procijenjena je DPPH metodom i pokazano je da povećanjem koncentracije ekstrakta linearno raste i antioksidativna aktivnost u ispitivanom području koncentracija.

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

Rad sadrži: 21 stranica, 2 grafička prikaza, 2 tablice i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: farmakopejska svojstva kvalitete, antioksidativna aktivnost, crveni brijest

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. Daniela Amidžić Klarić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Domagoj Kifer, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANALYZING THE PHARMACOPEIAL PROPERTIES OF THE QUALITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CHEWABLE TABLETS THAT CONTAIN RED ELM BARK EXTRACT

Kristian Morić-Španić

SUMMARY

The red elm bark has a widespread traditional use, mainly for gastrointestinal problems such as stomach disorders and diarrhea, but also for respiratory problems such as cough. Products on the market contain red elm bark in the form of dietary supplements. However, dietary supplements are not subject to the same laws and rigorous controls as medicines. This study aimed to evaluate the quality of such dietary supplement according to United States Pharmacopeia requirements and also to measure its antioxidant activity. The results of quality tests show that the supplement satisfies the United States Pharmacopeia quality criteria. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH method, and it was shown that increasing the concentration of the extract linearly increases the antioxidant activity in the examined range of concentration.

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

Thesis includes: 21 pages, 2 figures, 2 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pharmacopeial properties of the quality, antioxidant activity, Red Elm

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
Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Domagoj Kifer, Ph.D. *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2024.