

# Određivanje minerala u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva atomskom apsorpcijskom spektrometrijom

---

Manzin, Pavle

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:312795>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

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



**Pavle Manzin**

**Određivanje minerala u dodacima prehrani za  
liječenje upalnih bolesti crijeva atomskom  
apsorpcijskom spektrometrijom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Daniele Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Danieli Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije na uloženom trudu i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala prof. dr.sc. Ani Mornar Turk, voditeljici projekta, i cijelom Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova koji su mi omogućili izradu eksperimentalnog rada.

Također jedno veliko hvala mojoj obitelji, posebice roditeljima, braći i sestri koji su mi bili potpora tijekom cjelokupnog obrazovanja. Također, zahvaljujem se i svim mojim prijateljima koji su mi uvelike uljepšali fakultetske dane i s kojima sam ostvario nezaboravne uspomene.

Rad je dijelom financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekt: *Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva*

[HRZZ-UIP-2017-05-3949].



## SADRŽAJ

<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija .....	2
1.1.2. Atom i atomska spektroskopija .....	2
1.1.3. Načelo atomske apsorpcijske spektroskopije .....	3
1.1.4. Kvantitativna analiza atomskom spektroskopijom .....	3
1.1.5. Atomski apsorpcijski spektrometar .....	4
1.1.6. Vrste atomske apsorpcijske spektroskopije za određivanje metala .....	5
1.2. Biološki aktivne tvari u terapiji upalnih bolesti crijeva .....	6
1.2.1. Upalne bolesti crijeva .....	6
1.2.2. Kurkuminoidi .....	6
1.2.3. Andrografolidi .....	8
1.2.4. Bosvelične kiseline .....	8
1.3. Minerali .....	9
1.2.1. Kalcij.....	9
1.2.2. Magnezij.....	10
<b>2 OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>11</b>
<b>3 MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>13</b>
3.1. Materijali .....	14
3.1.1. Uzorci .....	14
3.1.2. Radni instrumenti .....	14
3.1.3. Standardne supstancije .....	14
3.1.4. Ostale korištene kemikalije .....	14
3.1.5. Pribor i posuđe .....	14
3.1.6. Programski paketi .....	15
3.2. Metode .....	18
3.2.1. Određivanje gubitka sušenjem analizatorom vlage .....	18
3.2.2. Spaljivanje uzorka mikrovalnom digestijom .....	18
3.2.3. Priprema standardnih otopina i uvjeti rada na AAS .....	18
3.2.4. Statističke metode .....	19
<b>4 REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
4.1. Gubitak sušenjem u dodacima prehrani .....	21
4.2. Sadržaj metala u dodacima prehrani .....	23
<b>5 ZAKLJUČCI</b> .....	<b>25</b>

<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
<b>7 SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>32</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD.....</b>	<b>35</b>

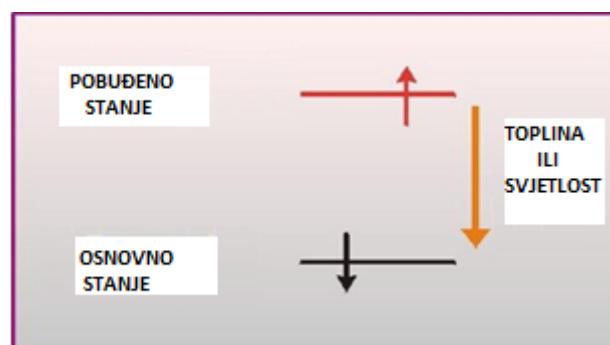
# **1 UVOD**

## 1.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS, engl. *Atomic absorption spectroscopy*) je analitička tehnika koja se temelji na fenomenu da atomi ispareni u plamenu obasjani frekvencijom svjetla apsorbiraju zračenje te prelaze u pobuđeno stanje. Ocem moderne AAS smatra se Alan Walsh, te je od tada toliko napredovala da je postala jedna od najvažnijih tehnika u analizi elemenata. Tehnika je primjenjiva za određivanje koncentracije metala u različitim uzorcima (npr. biološki uzorci), u praćenju onečišćenja u okolišu te u industriji pri određivanju toksičnih tvari u sirovinama i različitim materijalima. U analitici lijekova AAS ima važnu ulogu, a koristi se u određivanju sadržaja metala (npr. magnezij u talku), a također ima neizostavnu ulogu u ispitivanju čistoće utvrđivanjem graničnih vrijednosti onečišćenja metalima. Ta onečišćenja mogu biti prisutna u gotovim farmaceutskim oblicima kao posljedica onečišćenja u proizvodnom procesu, a mogu biti prisutna i u spremnicima za lijekove (Van Loon, 1980).

### 1.1.2. Atom i atomska spektroskopija

Atom je građen od atomske jezgre i elektronskog oblaka koji je okružuje. Svaki element ima jedinstven broj elektrona povezanih s atomskom jezgrom u specifičnoj orbitalnoj strukturi karakterističnoj za pojedini element. Stanje najniže energije, najstabilnije elektronske konfiguracije, naziva se osnovno stanje. Ukoliko atomu u osnovnom stanju dovedemo zračenje određene energije, vanjski elektroni će apsorbirati tu energiju i preći u pobuđeno, nestabilno stanje. Kako se elektron nalazi u nestabilnom stanju tako će se trenutačno i spontano vratiti u osnovno stanje pri čemu će se emitirati energija ekvivalentna energiji koju je atom apsorbirao pri ekscitacijskom procesu. Proces je prikazan na Slici 1. (Beaty i Kerber, 1993).



Slika 1. Prikaz osnovnog i pobuđenog stanja elektrona (preuzeto i prilagođeno: [www.passel2.unl.edu](http://www.passel2.unl.edu))

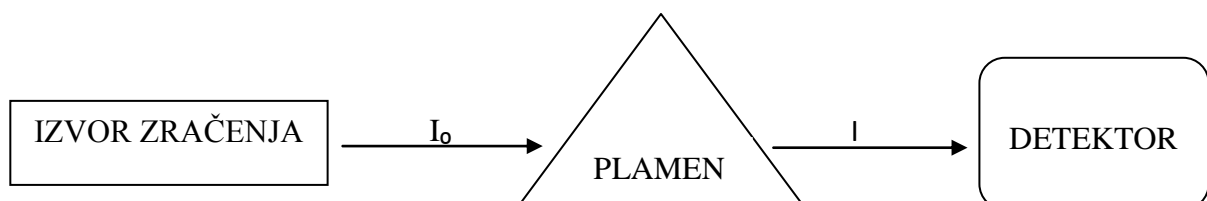


### 1.1.3. Načelo atomske apsorpcijske spektroskopije

Kako bi se uspješno izvelo mjerenje atomskom apsorpcijskom spektroskopijom, atomi metala koji se analiziraju toplinskom energijom se prvo moraju prevesti u plinovite neutralne atome. Za razliku od atomske emisijske spektroskopije gdje je za prelazak u pobuđeno stanje potrebna samo toplinska energija te atomi koji se nađu u pobuđenom stanju brzo pređu natrag u osnovno stanje pritom emitirajući energiju koja se mjeri, u atomskoj apsorpcijskoj spektroskopiji potreban je dodatan izvor zračenja da atomi pređu u pobuđeno stanje te se pritom mjeri apsorbirana energija. Dakle, atomi uz navedene energije prelaze u pobuđeno stanje, a apsorbirana energija proporcionalna je koncentraciji ispitivanog elementa. Ta činjenica koristi se za kvantitativnu analizu metala u različitim uzorcima (Watson, 1999; Beaty i Kerber, 1993).

### 1.1.4. Kvantitativna analiza atomskom spektroskopijom

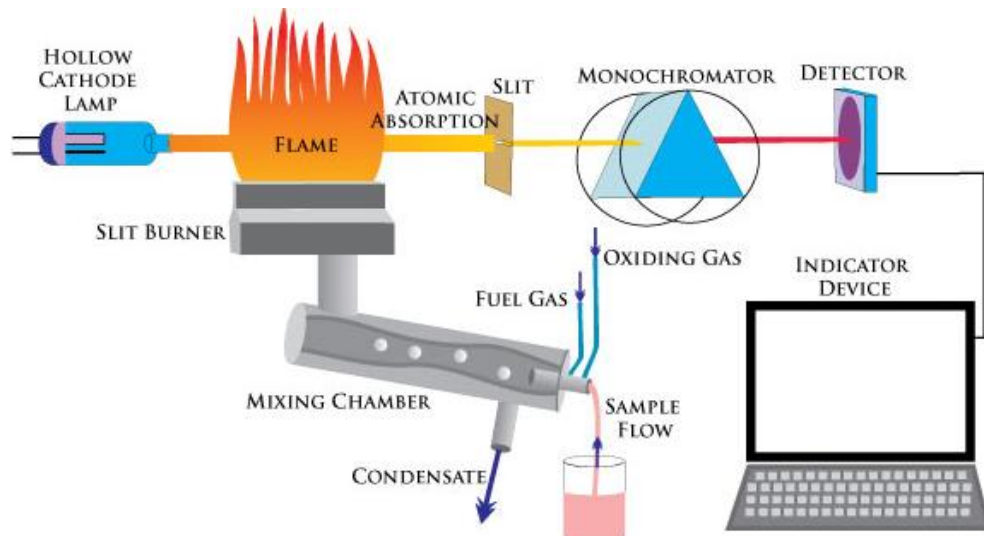
Svjetlost početnog intenziteta,  $I_0$  usmjerena je na plamen gdje se nalaze atomi metala u plinovitom stanju koji apsorbiraju zračenje stoga se intenzitet nakon prolaska kroz uzorak smanjuje,  $I$  (Slika 2). Najpogodnija veličina za karakterizaciju apsorpcije svjetlosti je apsorbancija,  $A$ , određena kao  $\log(I_0/I)$ , a definirana Beer- Lambertovim zakonom kao  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$  ( $A$ - apsorbancija,  $\epsilon$ - koeficijent apsorpcije,  $c$ - koncentracija analita,  $l$ - duljina svjetlosnog puta, tj. širina kivete). Prema tom zakonu jasno je vidljivo da je apsorbancija direktno proporcionalna koncentraciji analita, sve dok su vrijednosti  $\epsilon$  i  $l$  konstantne (Beaty i Kerber, 1993; Van Loon, 1980).



Slika 2. Shema principa rada apsorpcijskog spektrometra

### 1.1.5. Atomski apsorpcijski spektrometar

Dijelovi atomskog apsorpcijskog spektrometra su: izvor zračenja (žarulja sa šupljom katodom), generator atomske pare, monokromator, detektor te signalni procesor (Slika 3). Princip rada atomskog apsorpcijskog spektrometra je jednostavan, katoda je prevučena metalom koji se analizira, a atomi tog metala pobuđuju se električki. Stoga, žarulja sa šupljom katodom emitira zračenje uske vrpce na valnoj duljini na kojoj apsorbiraju atomi analita u plamenu. Atomi analita nastaju termički u generatoru atomske pare i nalaze su u plinovitom neutralnom stanju, apsorbiraju dovedeno zračenje te smanjuju intenzitet snopa svjetlosti. Monokromator izolira usku vrpcu zračenja te dopušta samo tom zračenju da pada na detektor (fotomultiplikator), uklanjajući interferirajuće zračenje plamena. Detektor pretvara snop svjetlosti u električnu struju, a signalni procesor tu struju pretvara u signal na monitoru koji daljnjom obradom daje informacije o koncentraciji analita (Amidžić Klarić, 2016; Van Loon, 1980).



Slika 3. Dijelovi atomskog apsorpcijskog spektrofotometra (preuzeto i prilagođeno: [www.chemistry.stackexchange.com](http://www.chemistry.stackexchange.com))

### 1.1.6. Vrste atomske apsorpcijske spektroskopije za određivanje metala

Postoji nekoliko vrsta tehnika za određivanje metala u različitim uzorcima: plamena AAS (F-AAS engl. *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*), grafitna AAS (GF-AAS engl. *Graphite furnace atomic absorption spectroscopy*), hidridna AAS (HG-AAS engl. *Hydride generation atomic absorption spectroscopy*), induktivno spregnuta plazma-atomska emisijsku spektrometrija (ICP-AES engl. *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*) i induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija (ICP-MS engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*).

**Plamena tehnika** je brza metoda gdje je potrebno tek nekoliko sekundi za analizu uzorka. Uzorak u tekućem stanju se pomoću podtlaka plinova uvlači u plamen gdje se atomizira te tako stvoreni atomi apsorbiraju zračenje izvora. Ova tehnika je relativno jeftina i jednostavna za izvođenje, a prednost joj je i ta da ima prag detekcije za većinu metala u ppm. Također, plamena tehnika ima i svoje nedostatke kao što je rasipanje uzorka tako da je za analizu potreban dosta veliki volumen uzorka. Točnije, tek mali dio raspršenog uzorka dolazi do plamena, dok se ostatak kreće prema odvodu. Problem kod ove metode je i proces raspršenja uzroka koji ograničava brzinu uvođenja uzorka, a posljedično tome i količinu uzorka koju je moguće dovesti do plamena (Beaty i Kerber, 1993).

U **grafitnoj tehnici** se mali volumen uzorka unosi kroz suženi otvor u zagrijanu grafitnu cijev gdje se gdje uslijed zagrijavanja dolazi do ekscitacije atoma. Granice dokazivanja niže su (ppb) nego u plamenoj tehnici (ppm) stoga se ova metoda koristi za određivanje elemenata u tragovima, a za analizu su dovoljne male količine uzorka. Nedostaci metode su visoka cijena, duže vrijeme analize i veće iskustvo analitičara u radu. Bitno je i naglasiti kako se plamena i grafitna AAS temelje na Beer-Lambertovom zakonu (Welz i Sperling, 1999).

**Hidridna tehnika** koristi se pri određivanju lakohlapljivih elemenata kao što su As, Bi, Ge, Pb, Se, Sn, Te koji se pomoću reducensa, najčešće  $\text{NaBH}_4$ , prevode u oblik isparljivih hidrida. Reakcija se odvija u zatvorenoj posudi, a nastali hidridi se pomoću struje plinovitog dušika prenose u kvarcnu apsorpcijsku cijev koja se zagrijava te dolazi do atomizacije. Metoda nudi mogućnost određivanja koncentracija ispod  $\mu\text{g/L}$ , a najveći nedostatak metode je ograničenost elemenata koji se mogu analizirati (Beaty i Kerber, 1993).

## 1.2. Biološki aktivne tvari u terapiji upalnih bolesti crijeva

### 1.2.1. Upalne bolesti crijeva

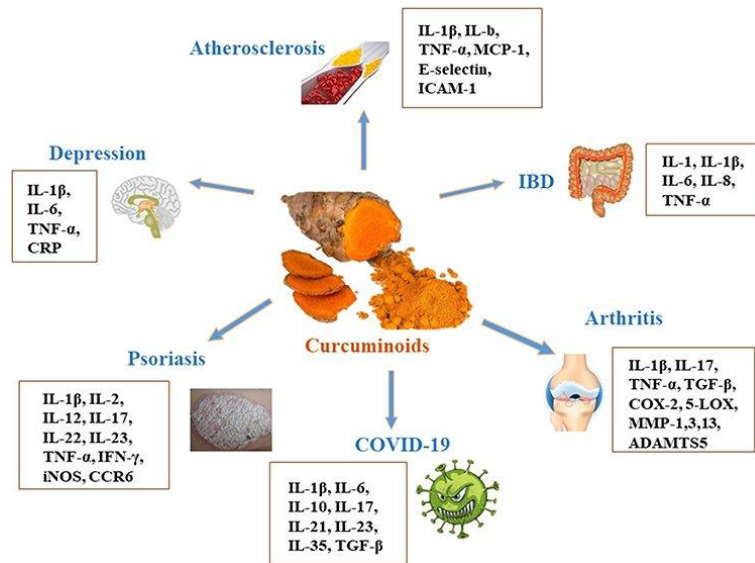
Upalne bolesti crijeva zahvaćaju milijune ljudi diljem svijeta sa simptomima koji im otežavaju svakodnevne aktivnosti i kvalitetu života. Upalne bolesti crijeva karakteriziraju imunosna disfunkcija i kronična upala crijevnih sluznica karakterizirane periodima relapsa i remisije bolesti. Iako etiopatogeneza još nije do kraja poznata, ipak je poznato da je u upalnim bolestima crijeva povećana koncentracija određenih citokina, poglavito onih proupalnih, kao što su: TNF- $\alpha$ (tissue necrosis factor- $\alpha$ ), interleukin-1(IL-1), IL-6, IL-8 te ostali proupalni citokini. Glavne manifestacije upalnih bolesti crijeva su ulcerozni kolitis i Chronova bolest koje imaju slične kliničke karakteristike što ukazuje na sličnost u nastanku i patogenezi bolesti. Ulcerozni kolitis je upalna bolest koja zahvaća sluznicu kolona i rektuma sa gastrointestinalnim simptomima kao što su dijareja i abdominalna bol. S druge strane, Chronova bolest zahvaća bilo koji dio gastrointestinalnog sustava, od usta do anusa, a karakterizira ju transmuralnost i diskontinuitet upalnih promjena, za razliku od Ulceroznog kolitisa gdje su upalne promjene kontinuirane. Neki od gastrointestinalnih simptoma Crohnove bolesti su abdominalna bol, stenoza i krvarenja. Terapija upalnih bolesti crijeva uključuje lijekove kao što su 5-aminosalicilati (5-aminosalicilna kiselina (5-ASA) i njezini prolijekovi), sistemske steroide, imunomodulatore (metotreksat, azatioprin) i biološku terapiju (infliksimab, adalimumab), a cilj terapije je što prije postići duboku remisiju bolesti i potaknuti mukozno cijeljenje (Vucelić, 2013).

### 1.2.2. Kurkuminoidi

Spojevi izolirani iz biljaka imali su veliku ulogu u održavanju zdravlja, prevenciji bolesti i liječenju kroz cijelu povijest čovječanstva, a jedan od njih je i kurkumin. Kurkumin je glavna sastavnica kurkuminoida, čini čak 77 % ukupnih kurkuminoida, dok demetoksikurkumin (17 %) i bidemetoksikurkumin (3 %) čine tek manji dio. Sve njih nalazimo u biljci kurkumi, lat. *Curcuma longa*, *Zingiberaceae*. U tradicionalnoj medicini kurkumin je korišten za liječenje različitih bolesti kao što su: ateroskleroza, plućna disfunkcija, jetrene bolesti, amenoreja, rak, neurodegenerativne bolesti, pankreatitis i reumatoidni artritis.

Zahvaljujući njegovoj dugotrajnoj upotrebi i sigurnosnom profilu, studije kurkumina za medicinske potrebe rađene su u velikom broju i dokazale su mnogo toga. U predkliničkim studijama, otkrilo se zašto kurkumin ima tako pleiotropno djelovanje (Slika 4), a to je zbog njegovog mehanizma djelovanja. Pokazalo se da kurkumin inhibira aktivnost NFκB (transkripcijski faktor odgovoran za nastajanje proupalnih citokina) u mnogim tipovima stanica, inhibira IL-1β- ovisne adhezijske molekule i ekspresiju gena za IL-8 u različitim tipovima stanica (Jobin i sur., 1999). U predkliničkim studijama najčešće su se koristili miševi kojima je izazvana upalna bolest crijeva lokalnom aplikacijom trinitrobenzen sulfonske kiseline (TNBS) ili nekog drugog ulceroznog agensa. Primjenom kurkumina takvima miševima dokazano je da se u mukozi kolona smanjuje aktivacija NFκB, infiltracija efektorskih CD4T<sup>+</sup> stanica te ekspresija proinflammatorne mRNA (Sugimoto i sur., 2002) Zhang i sur. (2006) su tom metodom dokazali da kurkumin smanjuje razinu Th1 citokina (IL-12, INF-γ, TNF-α, IL-1) koji su proupalni, a povećava razinu Th2 citokina (IL-4, IL-10) koji su protuuplani. Istom metodom je pokazano da se uslijed primjene kurkumina miševima sa kolitisom smanjuje infiltracija neutrofila, smanjuje aktivacija inducibilne NO sintaze i inhibira aktivnost NFκB (Ukil i sur., 2003). Rađene su i mnoge kliničke studije koje su pokazale djelotvornost kurkumina u terapiji upalnih bolesti crijeva. Randomizirana dvostruko slijepa studija (Hanai i sur., 2009) na uzorku od 89 pacijenata s ulceroznim kolitisom pokazala je djelotvornost kurkumina u sprječavanju relapsa bolesti. 45 pacijenata uzimalo je 1 g kurkumina dva puta dnevno, zajedno sa standardnom terapijom koja je bila sulfasalazin/mesalamin. Ostatak, 44 pacijenata s ulceroznim kolitisom umjesto kurkumina dobilo je placebo također dva puta dnevno uz svoju standardnu terapiju sulfasalazinom/mesalaminom. Zbog kršenja protokola 7 pacijenata je izuzeto iz analize, a rezultati analize pokazali su da je u 2 od 43 pacijenata koji su uzimali kurkumin došlo do relapsa, dok je u drugoj skupini pacijenata koji su uzimali placebo, u 8 od 39 pacijenata došlo do relapsa bolesti. Također dokazano je poboljšanje u CAI (engl. *clinical activity index*) i EI (engl. *endoscopic index*) u kurkuminskoj, ali ne i u placebo skupini pacijenata. Druga važna studija pokazala je djelotvornost kurkumina u indukciji remisije sa 5-aminosalicilnom kiselinom kod blagog i srednje teškog ulceroznog kolitisa. Na uzorku od 50 pacijenata, 26 pacijenata je primalo 3g kurkumina na dan, a 24 pacijenta placebo uz peroralnu i topikalnu terapiju 5-ASA. Remisija je postignuta u 14/26 pacijenata u kurkuminskoj skupini te u 0/24 pacijenata u placebo skupini. Također, uočeno je kliničko poboljšanje 17/26 pacijenata u kurkuminskoj skupini, a tek 3/24 pacijenta u placebo skupini (Lang i sur., 2015.). Iako je iz svega navedenog vidljivo da kurkumin ima veliki protuuplani potencijal, također kao dokaz

njegove pleiotropnosti, ima antioksidativni, antikancerogeni i antidijabetički učinak te korisne kardiovaskularne učinke (Hanai i Sugimoto, 2009.).



Slika 4. Pleiotropno djelovanje kurkumina (preuzeto i prilagođeno: Peng et al, 2021)

### 1.2.3. Andrografolidi

Andrografolidi su skupina biološki aktivnih tvari koji se nalaze u lista i zeleni justicije *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees, *Acanthaceae*. Prema dostupnim literaturnim podacima diterpenski laktoni andrografolid (ANDR), neoandrografolid (NANDR) i 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid (14-DANDR) pokazali su imunomodulatorno, protuupalno i antikarcinogeno djelovanje (Jayakumar i sur., 2013; Sandborn i sur., 2013; Tang i sur., 2011).

### 1.2.4. Bosvelične kiseline

Smola indijskog tamjanovca (*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr., *Burseraceae*) glavni je izvor bosveličnih kiselina kojima se pripisuje protuupalno i imunomodulatorno djelovanje. U glavne biološki aktivne sastavnice ove skupine ubrajaju se: keto derivati 11-keto- $\beta$ -bosvelična (KBA) i 3-O-11-keto- $\beta$ -bosvelična kiselina (AKBA),  $\alpha$ - i  $\beta$ -bosvelična kiselina (ABA, BBA) te 3-O-acetil- $\alpha$ - i  $\beta$ -bosvelična kiselina (AABA, ABBA) (Holtmeier i sur., 2011; PoECKel i sur., 2006; Gerhardt i sur., 2001).

### 1.3. Minerali

Minerali su anorganske sastavnice namirnica, koje ljudski organizam često puta sadrži u iznimno uskim rasponima te su nužni za normalno funkcioniranje. Zbog toga se tijekom cijelog života moraju unositi u organizam uravnoteženom prehranom. Prema potrebnim dnevnim količinama ove esencijalne tvari dijele se u tri skupine: makroelementi, elementi u tragovima i ultra elementi u tragovima. Makroelementi (Na, K, Ca, Mg) imaju različite funkcije, poput elektroliti, kao sastavnice enzima ili kao gradivni materijal npr. kostiju i zuba. Treba istaknuti kako se unose u količini iznad 50 mg/dan (Belitz, 2004; Reilly, 2004).

U biljnom materijalu sadržaj minerala značajno može oscilirati ovisno o genetskim i klimatskim faktorima, poljoprivrednim postupcima, sastavu tla i mnogim drugim faktorima. Osim toga, promjene mineralnog sadržaja obično se pojavljuju tijekom tehnoloških postupaka, npr. termičkoj obradi sirovina, odvajanju pojedinih dijelova sirovine, ekstrakciji i dr. Dovoljan unos minerala ne ovisi samo o njihovoj količini unesenoj hranom, nego primarno o bioraspoloživosti koja ovisi o sastavu namirnice (Belitz, 2004; Reilly, 2004).

#### 1.3.1. Kalcij

Kalcij je jedan od najznačajnijih minerala u organizmu, uglavnom zastupljen u koštanom sustavu, dok su manje količine ovog esencijalnog elementa prisutne u vanstaničnoj tekućini, citoplazmi i mekim tkivima. Kalcijevi ioni apsorbiraju se u tankom crijevu aktivnim transportom i pasivnom difuzijom, a njihova apsorpcija ovisi o nizu faktora (Belitz, 2004; Brody, 1994).

Glavni izvor kalcija su mlijeko i mliječni proizvodi, zatim slijede voće, povrće, meso, riba i jaja. Adekvatan unos vitamina D nužan je za apsorpciju kalcija. Nedostatak kalcija relativno je česta pojava, a simptomi nedostatnog unosa ovog minerala su: tetanija, spazam mišića, grand mal, depresija, produženi QT interval, malapsorpcija i intestinalni grčevi, rahitis kod djece i osteoporoza kod odraslih.

Osim toga, važno je naglasiti kako je povećani unos ovog elementa izuzetno važan u nekim životnim razdobljima, prije svega za vrijeme rasta te u starijoj životnoj dobi. Mali i nedovoljan unos kalcija, uz još neke druge faktore može dovesti do ubrzanog gubitka koštane mase (Belitz, 2004).

### 1.3.2. Magnezij

Magnezij je nužan element za život kao sastavni dio, ali i aktivator mnogih enzima, posebno onih koji sudjeluju u stvaranju i iskorištavanju ATP-a, zatim stabilizator plazmatskih i intracelularnih membrana te nukleinskih kiselina. Glavne zalihe magnezija, više od polovice, smještene su u kostima. Na proces apsorpcije iz probavnog trakta utječu mnogobrojne sastavnice hrane poput: vlakna, masnoće, oksalna kiselina, Fe, P, Mn. Nedostatak magnezija relativno se često pojavljuje zbog nepravilne prehrane i unosa velike količine rafiniranih šećera, kave i alkohola. Zbog njegove važne uloge u metabolizmu, nedostatak uzrokuje ozbiljna oštećenja: osteoporoza, gubitak apetita, mišićni grčevi, lupanje srca preuranjenih kontrakcija ventrikula i njihove fibrilacije, pojačano zgrušavanje krvi, mišićni tremor, slabost, poremećaj gutanja, mučnina i povraćanje, a javlja se kao posljedica poremećaja u probavnom sustavu ili kod bolesnika na hemodijalizi, kod dijabetesa, oštećenja bubrega, kroničnog alkoholizma, primjene nekih diuretika te hormonskih i metaboličkih poremećaja. Manjak magnezija uvijek prati i promjena u metabolizmu kalcija i kalija (Belitz, 2004; Brody, 1994).



## **2 OBRAZLOŽENJE TEME**

Minerali su sastavnice biljaka i dodataka prehrani koji sadrže jednu ili više biljnih vrsta. Primjena dodataka prehrani u preporučenim dnevnim dozama ima pozitivne učinke na zdravlje ljudi, a posebice uslijed njihovog dugotrajnog i kroničnog konzumiranja. Iz tog razloga važno je utvrditi sadržaj minerala u dodacima prehrani, u ovom slučaju onima za liječenje upalnih bolesti crijeva. Pri tome je izabrana analitička tehnika atomska apsorpcijska spektrometrija zbog svoje jednostavnosti, brzine i mogućnosti određivanja širokog raspona koncentracija minerala u uzorcima. U analitičkom pogledu, određivanje minerala u dodacima prehrani općenito predstavlja problem za analitičara zbog kompleksnog sastava samih uzorka te dosta promjenjivih koncentracija metala u uzorcima. Nadalje, u kontroli kvalitete biljnih droga i dodataka prehrani često se određuje sadržaj vlage i hlapljivi tvari te dobivene vrijednosti uspoređuje s maksimalno dopušteni gubitak sušenjem.

Iz navedenih razloga cilj ovog rada bio je:

- odrediti sadržaj kalcija i magnezija te gubitak sušenjem u dodacima prehrani koji sadrže jednu ili više biljnih vrsta koje se koriste u ublažavanju simptoma upalnih bolesti crijeva: indijski tamjanovac (*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr., *Burseraceae*), justicija (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees, *Acanthaceae*) i kurkuma (*Curcuma longa* L. *Zingiberales*)
- usporediti sadržaj analiziranih metala u prikupljenim dodacima prehrani s dostupnim literaturnim podacima za druge dodatke prehrani
- procijeniti kvalitetu ispitivanih uzoraka obzirom na gubitak sušenjem i sadržaj analiziranih minerala

## **3 MATERIJALI I METODE**

### **3.1 Materijali**

#### **3.1.1 Uzorci**

Za ispitivanje sadržaja kalcija i magnezija u uzorcima koji sadrže: indijski tamjanovac, justiciju i/ili kurkumu kao biljne droge prikupljeno je 15 uzorka (Tablica 1). Uzorci su prikupljeni u trgovinama zdravom hranom ili putem internet trgovine. Prikupljeni uzorci razvrstani su prema postupcima pripreme biljnih sirovina kao suhi ekstrakt, biljna droga i usitnjena biljna droga, a kao zemlja porijekla navedeno je 7 država, dok kod jednog uzorka nije navedena zemlja porijekla.

#### **3.1.2 Radni instrumenti**

- Atomski apsorpcijski spektrometar AAnalyst 800 THGA (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Pećnica za mikrovalno spaljivanje uzoraka ETHOS UP (Milestone, Sorisole, Italija)
- Analitička vaga AG245 s mogućnošću očitavanja 0,01 mg (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Analizator vlage KERN DBS60-3 (Kern & Sohn, Balingen, Germany)
- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)

#### **3.1.3 Standardne otopine**

- Standardna otopina kalcija i magnezija (koncentracija:  $1000 \pm 0,002$  mg/L) (Panreac, Barcelona, Španjolska)

#### **3.1.4 Ostale korištene kemikalije**

- Nitratna kiselina TraceSELECT® Ultra, za analizu elemenata u tragovima, 65-71 %, (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska)
- Vodikov peroksid TraceSELECT® Ultra, za analizu elemenata u tragovima,  $\geq 30$  %, (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska)
- Voda: za pripremu svih otopina korištena je ultračista voda otpornosti 18,2 M $\Omega$  cm (25 °C) dobivena korištenjem Milipore sustava za pročišćavanje (Bedford, MA, SAD)

#### **3.1.5 Pribor i posuđe**

- Aluminijska posudica za vaganje na analizatoru vlage (Kern & Sohn, Balingen, Njemačka)

- Lampa sa šupljom katodom HCL (engl. *Hollow Cathode Lamp*) – pojedinačna lampa za kalcij i magnezij (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- PTFE posude za mikrovalno spaljivanje (Milestone, Sorisole, Italija)
- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Plastične odmjerene tikvice (Vitelab, Großostheim, Njemačka)
- Plastična posuda za grafitnu tehniku
- Kapaljke (ISOLAB, Wertheim, Njemačka)

### **3.1.6 Programski paketi**

- AA WinLab Version 32 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- EasyControl software (Milestone, Sorisole, Italija)
- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- Statistica ver. 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD)

Tablica 1. Popis uzoraka

<b>Redni broj</b>	<b>Naziv proizvoda</b>	<b>Vrsta uzorka</b>	<b>Dozirni oblik</b>	<b>Zemlja porijekla</b>	<b>Način nabave</b>	<b>Opis uzorka</b>
1	MapleLifeSciences Curcumin + Boswellia + Piperine powder	suhi ekstrakt	rinfuza	Indija	internetska trgovina	kurkumin (200 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoida), ekstrakt indijskog tamjanovca (192 mg, standardiziran na 65 % bosveličnih kiselina), ekstrakt crnog papra (8 mg, standardiziran na 95 % piperina)
2	Maple life sciences - Piperine/black pepper extract powder	suhi ekstrakt	rinfuza	Indija	internetska trgovina	standardiziran na min. 95 % piperina
3	MapleLifeSciences Boswellia serata 400 mg	suhi ekstrakt	rinfuza	Indija	internetska trgovina	minimalno 60 % bosveličnih kiselina
4	Bio&Bio Superfoods Kurkuma Prah	usitnjena biljna droga	rinfuza	Hrvatska	trgovina zdravom hranom	organski uzgojena kurkuma
5	Lebensbaum Kurkuma (Gelbwurz)	usitnjena biljna droga	rinfuza	Njemačka	trgovina zdravom hranom	100 % organski uzgojena kurkuma
6	Harissa Kurkuma prah bio	usitnjena biljna droga	rinfuza	Hrvatska	trgovina zdravom hranom	usitnjeni podanak kurkume
7	Harissa Kurkuma prah	usitnjena biljna droga	rinfuza	Hrvatska	trgovina zdravom hranom	usitnjeni podanak kurkume
8	Kotany Kurkuma mljevena	usitnjena biljna droga	rinfuza	Austrija	trgovina zdravom hranom	usitnjena kurkuma
9	Only Nature kurkuma prah	usitnjena biljna droga	rinfuza	Hrvatska	trgovina zdravom	usitnjena kurkuma

					hranom	
10	YouHerbIt Indian Frankincense Resin Tears	biljna droga	sirovi materijal	Grčka	internetska trgovina	smola indijskog tamjanovca
11	Supplyist Frankincense Resin - Boswellia Tears Gum - Olibanum Aromatic Incense	biljna droga	rinfuza	Turska	internetska trgovina	smola indijskog tamjanovca
12	Sapiens Store Boswellia Resin	biljna droga	rinfuza	nije navedeno	internetska trgovina	smola indijskog tamjanovca
13	Maple life sciences - organic Andrographis Paniculata Leaves Powder	usitnjena biljna droga	rinfuza	Indija	internetska trgovina	justicija
14	HerbaDiet - Organic Andrographis Paniculata Leaf Powder (2)	usitnjena biljna droga	rinfuza	Indija	internetska trgovina	justicija
15	Herbal infusion Certified Organic Royal Green Superfood Beautiful Turmeric	usitnjena biljna droga	čajna mješavina	Nizozemska	trgovina zdravom hranom	organski uzgojena kurkuma (49 %), sporiš (31 %), kora limuna (15 %), crni papar (5 %)

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Određivanje gubitka sušenjem analizatorom vlage

Određivanje vlage u ispitivanim uzorcima provedeno je prema propisu Američke Farmakopeje (U.S. Pharmacopeia) <731> *Loss on Drying*.

Ukratko, usitnjen i homogenizirani uzorak ravnomjerno se raspoređi po aluminijskoj posudici u što tanjem sloju te odvaži oko 1,000 g za vagi u sklopu analizatoru vlage. Nakon toga, zatvori se poklopac kako bi analizator vlage automatski počeo sa zagrijavanjem. Halogeni grijač zagrijava i suši uzorak dok integrirana vaga stalno bilježi masu uzorka. Pri temperaturi zagrijavanja od 105 °C provodi se mjerenje do konstantne mase, odnosno dok razlika između dvije izmjerene mase ne bude manja od 0,5 mg. Nakon toga je zabilježen gubitak mase koji odgovara udjelu hlapljivih tvari. Sva mjerenja su provedena u triplicatu.

### 3.2.2 Spaljivanje uzorka mikrovalnom digestijom

Budući da uzorci dodataka prehrani predstavljaju složenu matricu za određivanje metala, u cilju dobivanja homogene otopine prikladne za određivanje metala plamenom tehnikom svi analizirani uzorci prethodno su spaljeni mikrovalnom digestijom.

Ukratko, oko 400 mg uzorka odvažano je u PTFE posudu za mikrovalno spaljivanje te dodano 9 mL nitratne kiseline (65-71 %) TraceSELECT® Ultra i 1 mL vodikov peroksid ( $\geq 30$  %) TraceSELECT® Ultra za analizu elemenata u tragovima. Zatim su PTFE posude zatvorene te proveden program mikrovalne digestije u dva koraka (Tablica 2.). Nakon spaljivanja i hlađenja, uzorak je kvantitativno prenesen u plastičnu odmjernu tikvicu, nakon čega je slijedio postupak određivanja metala plamenom tehnikom.

Tablica 2. Program mikrovalne digestije

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

### 3.2.3 Priprema standardnih otopina i uvjeti rada na AAS

Radne otopine analiziranih metala potrebne za izradu kalibracijskog pravca dobivene su tako da su standardne otopine analiziranih metala razrijeđene ultračistom vodom u prikladnim omjerima. Osnovni analitički parametri predloženih metoda plamene tehnike prikazani su u tablici 3.



Tablica 3. Analitički parametri za određivanje koncentracije metala plamenom tehnikom

Element	Ca	Mg
Tip signala	Atomska apsorpcija	Atomska apsorpcija
Valna duljina (nm)	422,67	285,21
Otvor pukotine monokromatora (nm)	0,7	0,7
Lampa	C-HCL	C-HCL
Struja lampe (mA)	10	6
Tip plamena	Zrak/ acetilen	Zrak/ acetilen
Način mjerenja	Srednje vrijeme – 5 s	Srednje vrijeme – 5 s

### 3.2.4 Statističke metode

Varijable s normalnom raspodjelom prikazane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD). Određen je Pearsonov koeficijent korelacije kako bi se ispitala potencijalna ovisnost između ispitivanih varijabli u uzorcima.  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom razlikom, a  $p < 0,01$  vrlo značajnom. Za obradu podataka korišten je statistički paket STATISTICA v. 12.1 od StatSoft® (Tulsa, OK, SAD).

## **4 REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Gubitak sušenjem u dodacima prehrani

Gubitak sušenjem definira se kao gubitak mase ispitivane tvari nakon provedbe postupka sušenja u propisanim uvjetima. Ovo termogravimetrijsko ispitivanje zastupljeno je u velikom broju farmakopejskih monografija za ispitivanje čistoće biljnih droga i dodataka prehrani. U ovom radu gubitak sušenjem određen je za rinfuze i čajne mješavine. U Tablici 4. prikazan je gubitak sušenjem (%) dobiven propisanom metodom. Prema dobivenim rezultatima moguće je utvrditi kako se gubitak sušenjem kod rinfuza bio u rasponu od 1,75 do 8,65 %.

Tablica 4. Gubitak sušenjem u suhim dozirnim oblicima određen prema USP <731> *Loss on Drying*.

Uzorak	w srednja vrijednost (%) n = 3	SD <sup>1</sup>
<b>Rinfuza</b>		
1	1,75	0,19
2	5,15	0,25
3	3,04	0,06
4	8,40	0,30
5	8,65	0,09
6	8,24	0,35
7	7,73	0,18
8	7,19	0,71
9	7,89	0,48
10	2,99	0,42
11	2,40	0,13
12	2,84	1,35
13	7,63	0,31
14	6,13	0,06
<b>Čajna mješavina</b>		
15	5,43	0,08

<sup>1</sup> SD – Standardna devijacija

U USP monografijama za ekstrakte i biljne droge (rinfuza) ovih biljnih vrsta naveden je maksimalno dopušteni gubitak sušenjem. Prema tome, za uzorke u obliku rinfuze bilo je moguće provjeriti odgovaraju li analizirani uzorci USP propisima. Također je potrebno istaknuti da se maksimalni dopušteni gubitak sušenjem razlikuje ukoliko se radi o usitnjenj

biljnoj drogi ili suhom ekstraktu droge. Naime, prema USP suhi ekstrakti dobivaju iz usitnjene droge ekstrakcijom s prikladnim otapalom (izopropanol, etanol, metanol, heksan, aceton i drugim). Nakon ekstrakcije korištena otapala se uklanjaju te stoga i dopuštene vrijednosti gubitka sušenjem trebaju biti niže u odnosu na usitnjene biljne droge.

Dakle, u Tablici 5. dan je popis uzoraka koji su razvrstani prema vrsti pripravka (suhi ekstrakt ili biljna droga). U navedenoj tablici nalazi se eksperimentalno utvrđeni gubitak sušenjem, maksimalno dopušteni gubitak sušenjem za pojedinu biljnu vrstu odnosno njen pripravak (biljna droga ili suhi ekstrakt) prema USP monografijama. Iz rezultata vidljivo je da svi uzorci osim uzorka 2- S21 (sadrži suhi ekstrakt papra) zadovoljavaju USP kriterije.

Tablica 5. Usporedba gubitka sušenjem ( $w$ , %) dobivenog prema USP propisu s limitima definiranim u monografijama pojedinog biljnog pripravka.

Uzorak	Vrsta uzorka	Biljna vrsta	$w$ (%)	USP limit (%) <sup>1</sup>	Odstupanje <sup>2</sup>
1	suhi ekstrakt	kurkuma, indijski tamjanovac, crni papar	1,75	7 / 5 / 2	-0,25 <sup>3</sup>
2	suhi ekstrakt	crni papar	5,15	2	+3,15 <sup>4</sup>
3	suhi ekstrakt	indijski tamjanovac	3,04	5	-1,96
4	usitnjena biljna droga	kurkuma	8,40	10	-1,60
5	usitnjena biljna droga	kurkuma	8,65	10	-1,35
6	usitnjena biljna droga	kurkuma	8,24	10	-1,76
7	usitnjena biljna droga	kurkuma	7,73	10	-2,27
8	usitnjena biljna droga	kurkuma	7,19	10	-2,81
9	usitnjena biljna droga	kurkuma	7,89	10	-2,11
10	biljna droga	indijski tamjanovac	2,99	12	-9,01
11	biljna droga	indijski tamjanovac	2,40	12	-9,60
12	biljna droga	indijski tamjanovac	2,84	12	-9,16
13	usitnjena biljna droga	justicija	7,63	10	-2,37
14	usitnjena biljna droga	justicija	6,13	10	-3,87

<sup>1</sup> USP limit je naveden sukladno monografiji pojedine biljne vrste odnosno njegovog pripravka (suhi ekstrakt ili biljna droga).

<sup>2</sup> Odstupanje je iskazano kao razlika između limita definiranog USP propisom te eksperimentalno dobivene vrijednosti.

<sup>3</sup> Uzorak sadrži 3 biljne vrste te je gubitak sušenjem uspoređen s dozvoljenim gubitkom sušenjem navedenim u propisu odnosno monografiji s najstrožim kriterijem.

<sup>4</sup> Podebljano su označena ona odstupanja koja ne zadovoljavaju USP propis.

## 4.2. Sadržaja metala u dodacima prehrani

Analize kalcija i magnezija u 15 uzoraka dodataka prehrani koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva provedene su metodama atomske apsorpcijske spektrometrije plamenom tehnikom na instrumentu AAnalyst 800 THGA (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD).

Kako bi se dobili valjani rezultati analize, provedena je verifikacija već postojećih metoda (Perkin Elmer, 2000; Welz i Sperling 1997; ICH 2005) te su ispitani validacijski parametri: radno područje, linearnost, granica dokazivanja (LOD) i određivanja (LOQ). Pri tome je granica dokazivanja i određivanja za svaki metal određena uzastopnim mjerenjem (n=10) slijepe probe te izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija mjerenja. Trostruka vrijednost standardne devijacije uzeta je kao LOD, a deseterostruka vrijednost standardne devijacije kao LOQ.

Visoka linearnost metoda ( $r > 0.999$ ) određena je za radno područje, a granica određivanja iznosila je 0,015 mg/L za Ca i 0,010 mg/L za Mg (Tablica 6). Niske vrijednosti relativnih standardnih devijacija (RSD) upućuju na visoku preciznost odabrane analitičke metode.

Nakon toga provedena je analiza uzoraka. Kako bi se uspješno mogla provesti analiza metala u uzorcima složene matrice, najprije je potrebno sve uzorke prevesti u pogodan oblik za mjerenje, odnosno kao bistré otopine. Tako je u prikupljenim uzorcima prvo provedena mineralizacija procedurom mikrovalne digestije (poglavlje 3.2.2).

Tablica 6. Značajke validacije za određivanje metala u dodacima prehrani F-AAS tehnikom

	Ca	Mg
Radno područje (mg/L)	1,25 – 5,00	0,063 – 0,250
Kalibracijska krivulja (n=3)	$y = 0,07484x - 0,00063$	$y = 2,40998x + 0,01415$
Koeficijent korelacije	0,9998	0,9997
LOD (mg/kg) <sup>a</sup> (n=10)	0,375	0,250
LOQ (mg/kg) <sup>a</sup> (n=10)	0,125	0,075
LOD (mg/L) <sup>b</sup> (n=10)	0,005	0,003
LOQ (mg/L) <sup>b</sup> (n=10)	0,015	0,010

<sup>a</sup> na temelju odvage 0,250 g uzorka

<sup>b</sup> na temelju odgovarajuće slijepe probe

Koncentracija metala u uzorku dodataka prehrani određena je iz kalibracijske krivulje, ovisnosti površine pika o koncentraciji metala. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Sadržaj kalcija i magnezija u dodacima prehrani analizirani AAS metodom

	<b>Ca (mg/kg)</b>	<b>Mg (mg/kg)</b>
<b>Kvantificirani raspon</b>	30,26 - 15029,72	33,74 - 1207,18
<b>Srednja vrijednost</b>	3827,87	764,48
<b>Median</b>	568,89	818,34
<b>Interkvartilni raspon</b>	444,39 - 6128,85	721,89 - 933,34

Dobiveni rezultati ukazuju na varijabilnost sadržaja kalcija u analiziranim dodacima prehrani. Sadržaj ovog makroelementa dobiven primjenom F-AAS metode kreće se u rasponu od 30,26 mg/kg (suhi ekstrakt indijskog tamjanovca) do 15029,72 mg/kg (usitnjena biljna droga justicije) (Tablica 7), pri čemu su sva mjerenja provedena u triplicatu, te su RSD vrijednosti bile do 1,3 %. Kada se promatra analiziran sadržaj kalcija u različitim biljnim vrstama, kod dodataka prehrani kurkume uočava se užji raspon ovog makroelementa (407,78 mg/kg - 672,35 mg/kg), dok je značajno širi raspon bio kod dodataka prehrani justicije (1943,03 mg/kg - 15029,72 mg/kg).

Kada se pogleda tablica 7, vidljivo je kako je sadržaj magnezija u analiziranim dodacima prehrani bio u značajno užem rasponu od 33,74 mg/kg (suhi ekstrakt crnog papra) do 1207,18 mg/kg (biljna droga indijskog tamjanovca).

Treba istaknuti kako je sadržaj oba makrominerala značajno veći kod biljnih droga (srednja vrijednost Ca: 6132,16 mg/kg; Mg: 928,36 mg/kg) i usitjenih biljnih droga (srednja vrijednost Ca: 2928,78 mg/kg; Mg: 896,04 mg/kg) nego kod suhog ekstrakta (srednja vrijednost Ca: 220,88 mg/kg; Mg: 205,92 mg/kg). Ovi rezultati su očekivani obzirom na način dobivanja ovih skupina uzoraka.

Osim toga, dobiveni rezultati za sadržaj kalcija i magnezija u skladu su s dostupnim literaturnim podacima (Asagwara i sur., 2018; Mane i sur., 2018; Ikpeama i sur., 2014).

Na temelju rezultata ovog istraživanja, znatan sadržaj kalcija i magnezija nalazi se u dodacima prehrani koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva.

## **5 ZAKLJUČCI**

Ciljevi ovog rada obrazloženi su u poglavlju 2. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

1. Analizirani dodaci prehrani koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva mogu se smatrati dobrim izvorom minerala kalcija i magnezija.
2. Sadržaj minerala u ispitivanim dodacima prehrani u skladu je s dostupnim literaturnim podacima.
3. Atomska apsorpcijska spektrometrija – plamena tehnika je brza i iznimno ponovljiva metoda te prikladne za rutinske analize različitih vrsta dodataka prehrani.
4. Primjena mikrovalne digestije potrebna je zbog uklanjanja složenih sastavnica biljnog materijala.
5. Svi analizirani dodaci prehrani osim jednog uzorka koji sadrži suhi ekstrakt papra zadovoljavaju USP zahtjeve kod gubitka sušenjem.



## **6 LITERATURA**

Amidžić Klarić D, Primjena atomske spektrometrije u kontroli kvalitete lijekova i dodataka prehrani, predavanje, Farm Gla, 2016.

Asagwara JO, Emeribe EO, Enoch LN. Minerals Determination of Turmeric (*Curcuma Longa* Linn) Leaves and Rhizomes. *Direct Res. J Biol Biotechnol Sci*, 2018, 4, 46-50.

Beaty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, The Perkin - Elmer Corporation, 1993., str.1-6.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. Food Chemistry. 3rd revised ed. Berlin, Springer, 2004.

Brody T. Nutritional biochemistry. San Diego, Academic Press, 1994.

Chemistry Stack Exchange , [www.chemistry.stackexchange.com](http://www.chemistry.stackexchange.com), pristupljeno 4. 4. 2022.

European Medicines Agency. ICH Topic Q 2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology; European Medicines Agency: London, UK, 2005.

Gerhardt H, Seifert F, Buvari P, Vogelsang H, Repges R. Therapie des aktiven morbus Crohn mit dem Boswellia-serrata-extrakt H 15. *Z Gastroenterol*, 2001, 39(1), 11–17.

Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Koide Y. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006; 4, 1502-1506.

Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has Bright Prospects for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15, 2087-2094.

Holtmeier W, Zeuzem S, Prei J, Kruis W, Böhm S, Maaser C, Raedler A, Schmidt C, Schnitker J, Schwarz J, Zeitz M, Caspary W. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of *Boswellia serrata* in maintaining remission of Crohn's disease: Good safety profile but lack of efficacy. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(2), 573–582.

Ikpeama A, Onwuka G, Nwankwo C. Nutritional Composition of Tumeric (*Curcuma longa*) and its Antimicrobial Properties. *Int J Eng Res*, 2014, 5(10), 1085 – 1089.

Jayakumar T, Hsieh CY, Lee JJ, Sheu JR. Experimental and clinical pharmacology of *Andrographis paniculata* and its major bioactive phytoconstituent andrographolide. *Evidence-based Complement Altern Med*, 2013, 2013:846740.

Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol*, 1999, 163, 3474-3483.

Lang A, Salomon N, Wu J, Kopylov U, Lahat A, Har-Noy O, Ching Y, Kuan Cheong P, Avidan B, Gamus D, Kaimakliotis I, Eliakim R, Siew C.Ng, Ben-Horin S. Curcumin in Combination With 5-aminosalicylate Induces Remission in Patients with Mild to Moderate Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial, *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2015, 13, 1444-1449.

Mane RP, Kshirsagar RB, Sawate AR, Patil BM and Kale RG. Studies on evaluation of physicochemical and nutritional properties of fresh turmeric rhizome. *J pharmacogn phytochem*, 2018, 7(2), 2895-2897.

Peng Y, Ao M, Dong B, Jiang Y, Yu L, Chen Z, Hu C, Xu R. Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15, 4504-4506.

Perkin Elmer. Analytical methods for atomic absorption spectrometry. Norwalk, Perkin-Elmer, 2000.

Plant & Soil Sciences eLibrary , [www.passel2.unl.edu](http://www.passel2.unl.edu), pristupljeno 11. 5. 2022.

Poeckel D, Werz O. Boswellic Acids: Biological Actions and Molecular Targets. *Curr Med Chem*, 2006, 13(28), 3359–3369.

Reilly C. The nutritional trace metals. Oxford, Blackwell Publishing, 2004.

Sandborn WJ, Targan SR, Byers VS, Ruddy DA, Mu H, Zhang X, Tang T. Andrographis paniculata extract (HMPL-004) for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(1), 90–98.

Sugimoto K, Hanai H, Tozawa K, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Koide Y. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Gastroenterology*, 2002, 123, 1912-1922.

Tang T, Targan SR, Li ZS, Xu C, Byers VS, Sandborn WJ. Randomised clinical trial: Herbal extract HMPL-004 in active ulcerative colitis - A double-blind comparison with sustained release mesalazine. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 33(2), 194–202.

U.S. Pharmacopeia, <https://www.usp.org/>, pristupljeno 11. 5. 2022.

Ukil A, Maity S, Karmakar S, Datta N, Vedasiromoni JR, Das PK. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Br J Pharmacol*, 2003, 139, 209-218.

Van Loon JC, Analytical Atomic Absorption Spectroscopy: selected methods. Toronto, Academic Press, 1980, str.1-12.

Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. *Reumatizam*, 2013, 60(2), 13-23.

Watson G. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, str 126.

Welz B, Sperling M. Atomabsorptions-spektrometrie. 4. Neubearbeitete Auflage, Weinheim, Wiley-VCH, 1997, str. 171-175.

Zhang M, Deng C, Zheng J, Xia J. Curcumin regulated shift from Th1 to Th2 in trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Acta Pharmacol. Sin*, 2006, 27, 1071-1077.

## **7 SAŽETAK/SUMMARY**

Biljke i dodaci prehrani su važan izvor biološki aktivnih sastavnica koje pozitivno utječu na zdravlje ljudi. Osim toga, primjena dodataka prehrani u stalnom je porastu. Budući da se indijski tamjanovac, justicija i kurkuma koriste u ublažavanju simptoma upalnih bolesti crijeva, cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu dodataka prehrani obzirom na sadržaj kalcija i magnezija. Sadržaj navedenih minerala u analiziranim dodacima prehrani određen je plamenom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije nakon postupka mikrovalne digestije. Nadalje, u analiziranim uzorcima ispitan je gubitak sušenjem prema propisu Američke Farmakopeje. Rezultati istraživanja upućuju na visoki sadržaj ovih minerala te se analizirani dodaci prehrani mogu smatrati dobrim izvorom minerala. Osim toga, svi analizirani dodaci prehrani osim jednog uzorka koji sadrži suhi ekstrakt papra zadovoljavaju USP zahtjeve obzirom na gubitak sušenjem.

Plants and dietary supplements are an important source of biologically active components that have a positive effect on human health. In addition, the use of dietary supplements is constantly increasing. Since Indian frankincense, Green chiretta and Turmeric are used to relieve the symptoms of inflammatory bowel diseases, the aim of this work was to evaluate calcium and magnesium content in dietary supplements. The content of the mentioned minerals in the analyzed food supplements was determined by the flame technique of atomic absorption spectrometry after the microwave digestion procedure. Furthermore, the analyzed samples were tested for drying loss according to the regulation of the U.S. Pharmacopoeia. The obtained results indicate a high content of these minerals, and the studied dietary supplements can be considered a good source of minerals. In addition, all analyzed dietary supplements except for one sample containing dry extract of pepper meet the USP criteria regarding drying loss.



**TEMELJNA DOKUMNTACIJSKA  
KARTICA / BASIC  
DOCUMENTATION CARD**

## 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

### Određivanje minerala u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva atomskom apsorpcijskom spektrometrijom

Pavle Manzin

#### SAŽETAK

Biljke i dodaci prehrani su važan izvor biološki aktivnih sastavnica koje pozitivno utječu na zdravlje ljudi. Osim toga, primjena dodataka prehrani u stalnom je porastu. Budući da se indijski tamjanovac, justicija i kurkuma koriste u ublažavanju simptoma upalnih bolesti crijeva, cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu dodataka prehrani obzirom na sadržaj kalcija i magnezija. Sadržaj navedenih minerala u analiziranim dodacima prehrani određen je plamenom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije nakon postupka mikrovalne digestije. Nadalje, u analiziranim uzorcima ispitan je gubitak sušenjem prema propisu Američke Farmakopeje. Rezultati istraživanja upućuju na visoki sadržaj ovih minerala te se analizirani dodaci prehrani mogu smatrati dobrim izvorom minerala. Osim toga, svi analizirani dodaci prehrani osim jednog uzorka koji sadrži suhi ekstrakt papra zadovoljavaju USP zahtjeve obzirom na gubitak sušenjem.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 4 grafičkih prikaza, 7 tablica i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kalcij, magnezij, dodaci prehrani, upalne bolesti crijeva, kurkuma, justicija, indijski tamjanovac

Mentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

**Dr. sc. Toma Keser**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Mario-Livio Jeličić**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Determination of minerals in dietary supplement therapies for inflammatory bowel disease by atomic absorption spectrometry

Pavle Manzin

#### SUMMARY

Plants and dietary supplements are an important source of biologically active components that have a positive effect on human health. In addition, the use of dietary supplements is constantly increasing. Since Indian frankincense, Green chiretta and Turmeric are used to relieve the symptoms of inflammatory bowel diseases, the aim of this work was to evaluate calcium and magnesium content in dietary supplements. The content of the mentioned minerals in the analyzed food supplements was determined by the flame technique of atomic absorption spectrometry after the microwave digestion procedure. Furthermore, the analyzed samples were tested for drying loss according to the regulation of the U.S. Pharmacopoeia. The obtained results indicate a high content of these minerals, and the studied dietary supplements can be considered a good source of minerals. In addition, all analyzed dietary supplements except for one sample containing dry extract of pepper meet the USP criteria regarding drying loss.

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

Thesis includes: 35 pages, 4 figures, 7 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Calcium, magnesium, dietary supplements, inflammatory bowel diseases, Turmeric, Green chiretta, Indian frankincense

Mentor: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Assistant 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  
**Toma Keser, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario-Livio Jeličić, Ph.D.** *Postdoctoral researcher* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.