

Ispitivanje sadržaja i oslobađanja kalcija iz oralnih farmaceutskih oblika registriranih u Republici Hrvatskoj

Slišković, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:530282>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

I

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Anja Slišković

**ISPITIVANJE SADRŽAJA I OSLOBAĐANJA KALCIJA IZ ORALNIH
FARMACEUTSKIH OBLIKA REGISTRIRANIH U REPUBLICI HRVATSKOJ**

Diplomski rad

Akademska godina:

2023./2024.

Mentor:

doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin

Split, listopad 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti

Znanstveno polje: Farmacija

Tema rada: prihvaćena je na 84. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 11. sjednici fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 2. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin, mag. pharm.

ISPITIVANJE SADRŽAJA I OSLOBAĐANJA KALCIJA IZ ORALNIH FARMACEUTSKIH OBLIKA REGISTRIRANIH U REPUBLICI HRVATSKOJ

Anja Slišković, broj indeksa: 201921

Sažetak

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti sadržaj kalcija u nekoliko različitih oralnih pripravaka koji su dostupni na hrvatskom tržištu te ispitati kako se kalcij iz navedenih proizvoda oslobađa u mediju koji simulira želučani medij.

Materijali i metode: Ispitivanjem su obuhvaćena 4 pripravka u obliku tableta s kalcijevim karbonatom. Jedan pripravak registriran je kao lijek i nalazi se u receptnom načinu izdavanja, dok su ostala tri pripravka dodaci prehrani koji se nalaze u slobodnoj prodaji. U laboratorijskom radu za ispitivanje navedenih pripravaka korištene su metoda određivanja kalcija kompleksometrijskom titracijom i metoda oslobađanja lijeka *in vitro* (disolucijska metoda s lopaticom) kako bi se ispitali sadržaj i oslobađanje kalcija iz izabranih pripravaka. Uvjeti korišteni za disoluciju propisani su u Američkoj farmakopeji (USP) za tablete kalcijevog karbonata, a to su 0,1 M klorovodična kiselina kao medij, brzina vrtnje od 75 okretaja po minuti, temperatura od $37 \pm 0,5$ °C i vrijeme trajanja od 90 minuta.

Rezultati: Svi preparaci uključeni u istraživanje pokazali su zadovoljavajuće rezultate kod određivanja sadržaja, s malim odstupanjima od deklarirane količine kalcija (od -1,60 % do +4,36 %). Za razliku od toga, rezultati ispitivanja oslobađanja kalcija *in vitro* bili su raznoliki. Dva pripravka pokazala su jako brzo i potpuno oslobađanje kalcija, dok su ostala dva pokazala značajno manje razine oslobađanja kalcija unutar promatranog vremena.

Zaključak: Ispitani preparaci u obliku tableta s kalcijevim karbonatom pokazali su da im se deklarirani sadržaj, neovisno o načinu izdavanja, nalazi unutar raspona koji su propisani prema smjernicama u Europskoj farmakopeji. Na tržištu postoji cijeli niz pripravaka s kalcijem koji se međusobno razlikuju po dozi kalcija, kemijskom obliku u kojem se kalcij nalazi, farmaceutskoj formulaciji pripravka, pomoćnim tvarima ili pak drugim djelatnim tvarima, ukoliko se radi o kombiniranom pripravku. Zbog velike raznolikosti pripravaka, rezultati dobiveni u ovom ispitivanju ne mogu se generalizirati na sve pripravke s kalcijem koji su dostupni na tržištu. Međutim, može se zaključiti da iako sadržajno nema značajnih odstupanja između ispitivanih pripravaka, njihovo oslobađanje *in vitro* prema uvjetima propisanim u USP značajno se međusobno razlikuje, pri čemu samo jedan ispitani dodatak prehrani s kalcijevim karbonatom pokazuje sličnost s pripravkom registriranim kao lijek.

Ključne riječi: kalcij, sadržaj, oslobađanje, disolucija

Rad sadrži: 64 stranice, 12 tablica, 9 slika i 96 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Doris Rušić, predsjednica
2. doc. dr. sc. Josipa Bukić, član
3. doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin, član - mentor

Datum obrane: 16. listopada 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2a

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia**

Scientific area: Biomedical sciences

Scientific field: Pharmacy

Thesis subject: was approved by Council Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, no. 84 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 11 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 2

Mentor: Asst. Prof. Ana Šešelja Perišin, MPharm, PhD

EXAMINATION OF CONTENT AND *IN VITRO* RELEASE OF CALCIUM FROM ORAL PHARMACEUTICAL FORMS REGISTERED IN REPUBLIC OF CROATIA

Anja Slišković, index number: 201921

Summary

Objectives: The aim of this research was to determine the calcium content of several different oral preparations that are available on the Croatian market and to examine how calcium is released from the mentioned products in a medium that simulates the gastric medium.

Materials and methods: The test included 4 preparations in the form of tablets with calcium carbonate. One preparation is registered as a medicinal product and is available by prescription, while the other three preparations are dietary supplements available over the counter. In the laboratory work for testing the mentioned preparations, the calcium determination method by complexometric titration and the *in vitro* drug release method (dissolution method with a spatula) were used to test the content and release of calcium from the selected preparations. The conditions used for dissolution were prescribed in the US Pharmacopoeia (USP) for calcium carbonate tablets, namely 0.1 M hydrochloric acid as medium, a rotation speed of 75 revolutions per minute, a temperature of 37 ± 0.5 °C and a duration of 90 minutes.

Results: All preparations included in the research showed satisfactory results when determining the content, with small deviations from the declared amount of calcium (from -1.60 % to +4.36 %). In contrast, results from *in vitro* calcium release assays were mixed. Two preparations showed a very fast and complete release of calcium, while the other two showed significantly lower levels of calcium release within the observed time.

Conclusion: The tested preparations in the form of calcium carbonate tablets showed that their declared content, regardless of the dispensing regime, was within the range prescribed according to the guidelines in the European Pharmacopoeia. There is a whole range of preparations with calcium on the market, which differ from each other in terms of the dose of calcium, the chemical form in which the calcium is found, the pharmaceutical formulation of the preparation, auxiliary substances or other active substances, if it is a combined preparation. Due to the wide variety of preparations, the results obtained in this trial cannot be generalized to all calcium preparations available on the market. However, it can be concluded that although there are no significant differences between the tested preparations in terms of content, their release *in vitro* according to the conditions prescribed in the USP differs significantly from each other, with only one tested dietary supplement with calcium carbonate showing similarity with the preparation registered as a drug.

Key words: calcium, content, release, dissolution

Thesis contains: 64 pages, 9 pictures, 12 tables and 96 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Asst. Prof. Doris Rušić, MPharm, PhD, **chair person**
2. Asst. Prof. Josipa Bukić, MPharm, PhD, **member**
3. Asst. Prof. Ana Šešelja Perišin, MPharm, PhD, **member - supervisor**

Defense date: 16th October 2024.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of School of Medicine Split,

Šoltanska 2a.

POPIS KRATICA

ADP – adenzin difosfat

ATP – adenzin trifosfat

CCM – kalcij citrat malat

EEAs – ekscitacijske aminokiseline

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EKG – elektrokardiogram

eNOS – endotelna sintaza dušikovog oksida

IP3 – inozitol trifosfat

IU – internacionalna jedinica

MCU – mitohondrijski kalcijski uniporter

NMDA – N-metil-D-aspartat

Ph. Eur. – Europska farmakopeja

P_i – fosfat

PTH – paratireoidni hormon

USP – Američka farmakopeja

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Uloga kalcija u organizmu..... | 2 |
| 1.1.1. Kalcij i mišićna funkcija | 2 |
| 1.1.2. Kalcij i živčani sustav | 4 |
| 1.1.3. Kalcij i krvne žile..... | 5 |
| 1.1.4. Kalcij i stanični metabolizam..... | 6 |
| 1.1.5. Kalcij i stanična signalizacija..... | 7 |
| 1.2. Homeostaza kalcija..... | 8 |
| 1.3. Promjene u razini kalcija i pridružene bolesti | 10 |
| 1.3.1. Hiperkalcijemija..... | 11 |
| 1.3.2. Hipokalcijemija..... | 12 |
| 1.4. Suplementacija kalcija..... | 13 |
| 1.4.1. Indikacije za primjenu dodataka prehrani s kalcijem..... | 14 |
| 1.4.2. Oblici preparata kalcija dostupni na tržištu..... | 15 |
| 1.4.3. Kombinirani pripravci kalcija | 16 |
| 1.4.4. Nuspojave suplemenata kalcijem..... | 18 |
| 1.4.5. Interakcije kalcija s drugim tvarima..... | 19 |
| 1.5. <i>In vitro</i> oslobađanje iz čvrstih oralnih oblika | 20 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 26 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 28 |
| 3.1. Materijali | 28 |
| 3.1.1. Kemikalije korištene za kompleksometrijsku titraciju | 28 |
| 3.1.2. Kemikalije korištene za pripremu reagensa..... | 28 |
| 3.1.3. Uzorci korišteni za kompleksometrijsku titraciju | 28 |
| 3.2. Metode | 29 |

| | |
|--|----|
| 3.2.1. Princip metode određivanja kalcija u uzorcima | 29 |
| 3.2.2. Priprema uzorka za određivanje sadržaja kalcija | 30 |
| 3.2.3. Priprema ostalih reagensa | 31 |
| 3.2.4. Postupak određivanja sadržaja kalcija u uzorcima | 32 |
| 3.2.5. Princip metode disolucije | 32 |
| 4. REZULTATI..... | 35 |
| 4.1. Rezultati određivanja sadržaja kompleksometrijskom titracijom | 35 |
| 4.2. Rezultati ispitivanja oslobađanja kalcija <i>in vitro</i> metodom s lopaticom | 38 |
| 5. RASPRAVA | 44 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 49 |
| 7. LITERATURA..... | 50 |
| 8. SAŽETAK | 60 |
| 9. SUMMARY | 62 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 64 |

1. UVOD

1.1. Uloga kalcija u organizmu

Kalcij je po zastupljenosti prvi mineral u ljudskom organizmu, a ujedno i peti od svih elemenata po zastupljenosti u tijelu. Preko 99 % kalcija pohranjeno je u kostima i zubima u obliku hidroksiapatita – kompleksne molekule kalcijeva fosfata. Kao takav, kalcij igra važnu ulogu u izgradnji kostiju i održavanju njihove čvrstoće, ali i u održavanju serumskih razina kalcija (1).

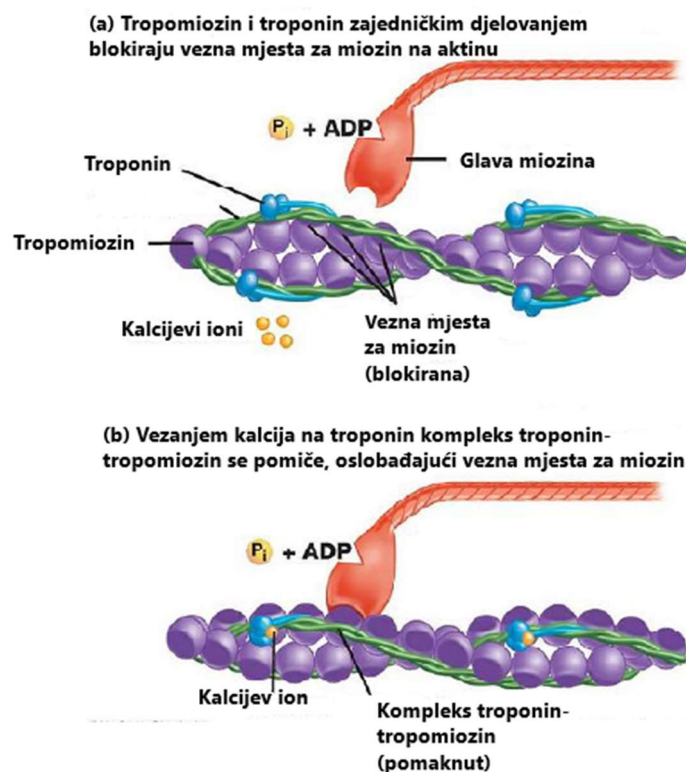
U serumu se kalcij javlja u tri oblika – kalcij vezan za protein, ionizirani kalcij (slobodna frakcija) i kelirani kalcij (kompleksna molekula). Glavni proteini koji vežu kalcij u serumu su albumini i globulini, dok je unutar stanice to protein kalmodulin. Kalcij vezan za protein čini oko 40 % serumskog kalcija i tkiva ga ne mogu iskoristiti. Za razliku od njega, kelirani kalcij čini oko 9 % serumskog kalcija i mogu ga iskoristiti brojna tkiva. Konačno, preostalih 51 % pripada slobodnom (ioniziranom) kalciju kojeg organizam koristi za održavanje brojnih fizioloških funkcija (2).

Osim ključne uloge u koštanom sustavu, kalcij je esencijalan element i za funkciju mišića, normalno funkcioniranje živčanog sustava, lučenje hormona, funkciju krvnih žila (vazokonstrikcija i vazodilatacija), energetski metabolizam, diobu stanica i staničnu signalizaciju. Ne smije se zanemariti ni njegova uloga u izgradnji zuba (3).

1.1.1. Kalcij i mišićna funkcija

Kalcij je okidač za početak procesa mišićne kontrakcije. To postiže reakcijom s regulatornim proteinima koji u odsutnosti kalcija imaju inhibitorni učinak na kontrakciju (4). Radi se o proteinskom kompleksu troponin-tropomiozin. I jedan i drugi protein, uz protein aktin, dio su aktinskih niti koje se u procesu mišićne kontrakcije brzo i čvrsto vežu s miozinskim nitima. Međutim, da bi se ta interakcija ostvarila, aktinske niti moraju biti slobodne, odnosno bez prisustva troponina i tropomiozina jer oni blokiraju interakciju – tropomiozin se veže za aktivna mjesta na aktinske lancu, a troponin se nalazi pričvršćen na njegove postranične dijelove. Dakle, u slučaju njihove vezanosti za aktin nemoguće je vezanje aktina i miozina i govorimo o stanju mirovanja mišića. Troponin se sastoji od triju proteinskih podjedinica koje su povezane slabim vezama – troponin I (ima veliki afinitet prema aktinu), troponin T (ima veliki afinitet prema tropomiozinu) i troponin C (ima veliki afinitet prema

kalcijevim ionima). Upravo taj veliki afinitet troponina prema kalcijevim ionima zaslužan je za pokretanje procesa kontrakcije. Prisustvo velikih količina kalcijevih iona i njihovo vezanje za troponin C dovodi do poništavanja inhibicijskog učinka proteinskog kompleksa troponin-tropomiozin. Smatra se da je to posljedica promjene konformacije proteinskog kompleksa uslijed vezanja četiriju kalcijevih iona, uvlačenja tropomiozina dublje između dvaju aktinskih lanaca i konačno otkrivanja aktivnih mjesta na aktinu. Takve slobodne aktinske niti mogu stvoriti poprečne mostove s miozinskim glavicama i uzrokovati kontrakciju. Radi se o procesu takozvanog „međusobnog klizanja” u kojemu se glavice miozina nagnju naprijed-natrag i klize po aktinskoj niti tako da povlače krajeve dviju susjednih aktinskih niti prema centru miozinske niti (5). Budući da kalcij ima ključnu ulogu u mišićnoj kontrakciji, njegov deficit može dovesti do tegoba kao što su bol u mišićima, grčevi ili trnci (6). Pojednostavljeni prikaz mišićne kontrakcije nalazi se na slici 1.



Slika 1. Proces mišićne kontrakcije (7).

1.1.2. Kalcij i živčani sustav

Kalcij ima temeljnu ulogu u fiziologiji neurona i njihovoj plastičnosti. Njegove uloge poput sudjelovanja u staničnom metabolizmu, regulaciji membranske ekscitabilnosti, reguliranja genske ekspresije neurona i sinaptičke transmisije čine ga bitnim sekundarnim glasnikom u brojnim signalnim putevima (8).

Učinak kalcija na promjene u živčanom sustavu objašnjava se postojanjem kompleksne mreže proteina koji precizno reguliraju kretanje kalcija između staničnih odjeljaka. U stanju mirovanja u neuronima postoji značajan gradijent između niske intracelularne koncentracije kalcija $[Ca^{2+}]$; (0,1–0,5 μM) i visoke ekstracelularne koncentracije kalcija $[Ca^{2+}]$; (oko 1 mM). Promjene nastupaju kada dođe do influksa kalcija u stanicu, a to se događa putem kalcijevih kanala ovisnih o naponu, N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora ili tranzicijskih potencijalnih receptorshih kanala (engl. *transient receptor potential*, TRP) koji se nalaze na plazmatskoj membrani. Povratak na bazalno stanje postiže se istiskivanjem kalcija iz stanice (primjerice Ca^{2+} -ATPaza), vezanjem kalcija za proteine (kalmodulin, kalcineurin) ili ulaskom kalcija u stanične organele (endoplazmatski retikulum) (9).

Gubitak regulacije ovakvog prometa kalcija u središnjem živčanom sustavu i posljedično povećanje intracelularne frakcije kalcija mehanizam je koji je potencijalno uključen u razne patološke događaje poput traume mozga, epilepsije ili drugih bolesti, pa čak i moždanog udara. Primjerice, u slučaju ishemijske traume mozga uslijed hipoksije dolazi do pojačanog oslobađanja ekscitacijskih aminokiselina (engl. *excitatory amino acids* - EEAAs) koje moduliraju intracelularni sadržaj kalcija tijekom neurotransmisije (10). Dolazi do ogromnog ulaska kalcija u stanicu i njegove akumulacije, što je preduvjet za ispoljavanje njegovih toksičnih učinaka (11).

Dvije su najbitnije uloge kalcija u živčanom sustavu – stabilizacija ekscitabilnih membrana te sekrecija neurotransmitera iz živčanih završetaka. Prvi je mehanizam najvjerojatnije posljedica adsorpcije pozitivno nabijenih kalcijevih iona na vanjsku površinu stanične membrane, čime se stvara električno polje unutar membrane. S druge strane, neurosekrecija je potaknuta mrežnim transportom kalcija u završetke živčanih stanica. Smatra se da je otpuštanje neurotransmitera iz živčanih stanica u sinapsu potaknuto porastom razine intracelularnog kalcija, odnosno depolarizacijom stanice (12).

1.1.3. Kalcij i krvne žile

Citosolna frakcija kalcijevih iona najvažniji je čimbenik u funkciji endotelnih i glatkih mišićnih stanica krvnih žila. Prema tome, promjene u intracelularnoj koncentraciji kalcija, odnosno nastanak takozvanog kalcijuskog signala, mogu dovesti ili do širenja (dilatacije) ili do sužavanja (konstrukcije) krvnih žila. Ishod ovisi o vrsti stanica i o izvoru samog kalcijuskog signala (13). Dakle, svi procesi koji utječu na intracelularnu koncentraciju kalcija mogu imati bitne fiziološke i patofiziološke posljedice (14). Prema nekim istraživanjima većina kalcijuskih signala koji nastaju u vaskularnim glatkomišićnim stanicama lokalizirani su signali, odnosno ograničeni su na funkcionalno važne domene stanice. Tako je ograničen jedinstveni porast razine kalcija u cijeloj stanici, a samim time i njime uzrokovana toksičnost. Takva se lokalizacija postiže stvaranjem klastera kalcijevih iona u ciljanim mikropodručjima stanice, proteinima koji vežu kalcij te visokom viskoznošću citosola koja ograničava difuziju kalcija (13).

Generalno, povećanje razine kalcija unutar stanica glatkih mišića krvnih žila povezano je s vazokonstrukcijom, dok obrnuta situacija vrijedi za endotelne stanice u kojima povišena razina kalcija ima vazodilatacijski učinak (13). Izvori kalcija za kalcijuski signal u stanicama glatkih mišića su ionski kanali na staničnoj membrani te intracelularni spremnici kalcija (sarkoplazmatski retikulum) (15). Na staničnoj membrani za prolazak kalcija najbitniji su L i T tip kalcijevih kanala, a na membrani sarkoplazmatskog retikuluma to su rajanodinski receptori i receptori za inozitol 1,4,5-trifosfat (14). Predloženi je mehanizam porasta razine intracelularnog kalcija sekvencijalno širenje vala kalcija kroz stanicu (16).

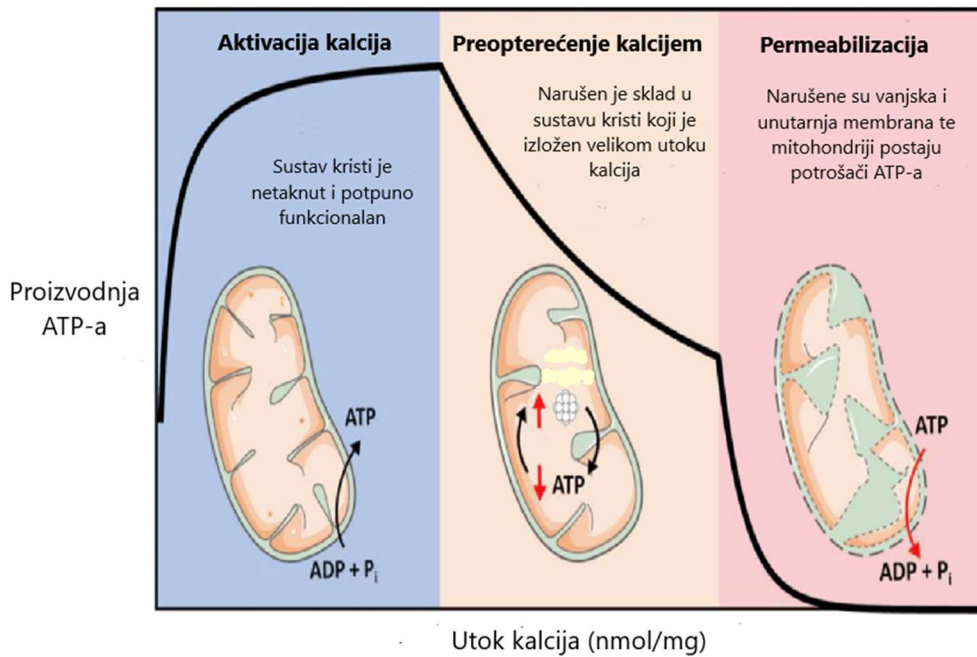
U endotelnim stanicama, intracelularni kalcij ključni je signal za postizanje o endotelu ovisne vazodilatacije. Kalcijem posredovana endotelna vazodilatacija može se javiti uslijed aktivacije endotelne sintaze dušikova oksida (eNOS) ili kao posljedica oslobađanja prostaglandina (16).

1.1.4. Kalcij i stanični metabolizam

Poznato je da su mitohondriji ključni stanični izvor energije te da o njihovoj aktivnosti ovisi funkcija stanice. To se osobito odnosi na stanice podložne ekscitaciji, kao što su stanice skeletnog i srčanog mišića te neuroni. To su stanice koje proizvode molekulu adenzin-5'-trifosfat (ATP) (17). Upravo proizvodnja ATP-a, uz još neke aspekte mitohondrijske aktivnosti, područje je djelovanja kalcija kao sekundarnog glasnika u staničnom metabolizmu. Kalcij može proći u međumembranski prostor mitohondrija gdje regulira proteine uključene u sintezu ATP-a, uključujući i ključne enzime i transportere (18).

Budući da je uloga kalcija u mitohondrijima toliko značajna, postavlja se pitanje o načinu na koji kalcij dopiše u te stanične odjeljke. Naime, mitohondriji imaju dvije membrane – vanjsku, koja je visokopropusna za ione i male molekule, te nepropusnu unutarnju membranu. Da bi ioni kalcija prešli unutarnju membranu nužna je prisutnost posebnih nosača i kanala, a osobito opisan je takozvani mitohondrijski kalcijski uniporter (engl. *Mitochondrial Calcium Uniporter*, MCU) (18). Radi se o pomno reguliranom procesu, čemu u prilog govori i položaj mitohondrija u stanici u blizini endoplazmatskog retikuluma koji služi kao unutarstanični izvor kalcija. Pokazano je i da u slučaju stanične stimulacije mitohondriji mogu akumulirati vrlo visoke razine kalcija (19).

U samom procesu proizvodnje energije u mitohondrijima kalcij regulira aktivnost triju bitnih enzima – glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (GPDH), piruvat dehidrogenaza fosfataze (PDP) i izocitrat dehidrogenaze (IDH). Na taj način kalcij izravno stimulira proizvodnju energije. Međutim, važno je naglasiti kako pretjerana razina kalcija u mitohondriju može imati toksične učinke i potencijalno dovesti do apoptoze stanice, što prikazuje slika 2 (17).



Slika 2. Ovisnost funkcije mitohondrija o razini kalcijevih iona; ATP – adenzin trifosfat; ADP – adenzin difosfat; P_i - fosfat (20).

1.1.5. Kalcij i stanična signalizacija

Stanica na vanjski podražaj odgovara povećanjem razine unutarstaničnog kalcija. Taj podražaj mogu biti hormoni, antitijela, promjena temperature, promjena pH vrijednosti, citotoksični agensi i slično. Nastali porast kalcija u stanici smatra se signalom koji dalje modulira stanični odgovor (21). Svako tkivo posjeduje jedinstven način signalizacije kalcijem, osiguravajući tako nastanak signala koji odgovaraju fiziologiji tog tkiva. Primjerice, za stanice srčanog mišića karakterističan je brzi val kalcija koji se širi cijelom stanicom kako bi se osigurala kontrakcija svakog trena. S druge strane, u stanicama koje ne pokazuju električnu ekscitabilnost oscilacije kalcija traju i nekoliko desetaka sekundi, a mogu se javljati i u razmacima od nekoliko minuta (22).

Valovi kalcija nastali unutar stanice ne zadržavaju se samo u njoj, nego se mogu širiti i na druge stanice. Na taj način stanice mogu međusobno komunicirati i jedna stanica može koordinirati aktivnost susjednih stanica. Osim prodiranjem kroz praznine u spojnicama stanica, kalcijski se signal može širiti i putem glasnika inozitol trifosfata (IP3) (22).

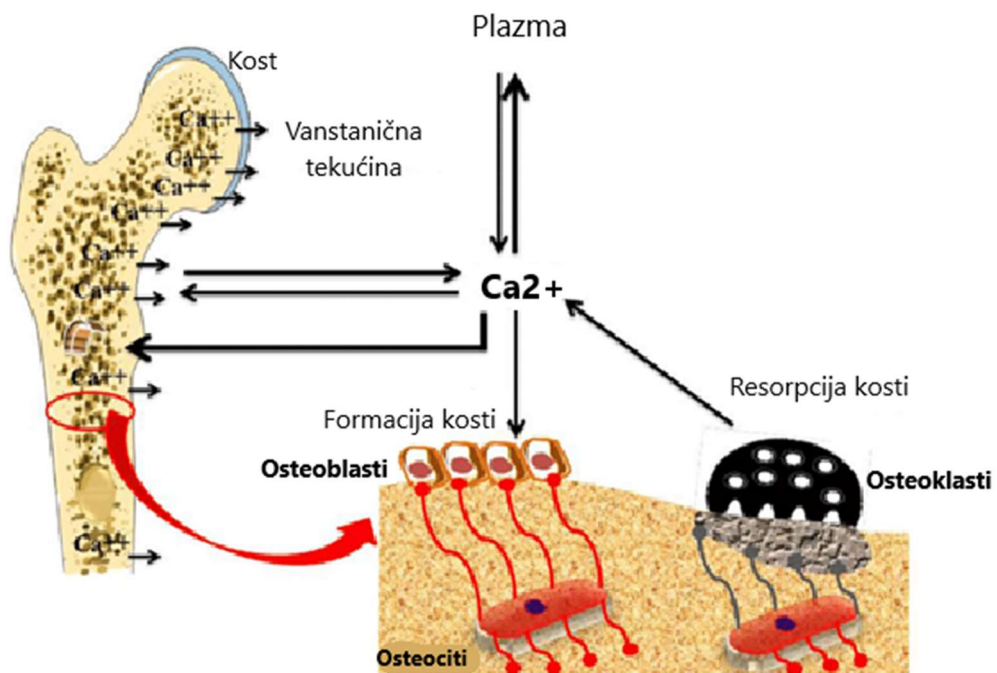
1.2. Homeostaza kalcija

Za normalno funkcioniranje organizma u cijelosti nužno je precizno održavanje razine kalcija, kako izvanstaničnog, tako i unutarstaničnog. Radi se o kompleksnom procesu koji je pod utjecajem dvaju glavnih mehanizama – prvi je puferska zadaća izmjenjivog kalcija u kostima, a drugu liniju održavanja razine kalcija čini hormonski nadzor (23). U cijelom procesu svojom važnošću ističu se tri hormona: paratireoidni hormon, kalcitonin i vitamin D, a bilo kakav poremećaj u cijeloj kaskadi može dovesti do ozbiljnih kliničkih stanja. Organizam ima nisku stopu tolerancije na promjene koncentracije kalcijevih iona u izvanstaničnoj tekućini pa u stanju disbalansa kalcija teški poremećaji nastaju u vrlo kratkom roku (24).

U izvanstaničnoj tekućini koncentracija kalcija precizno se održava na vrijednosti od približno 2,4 mmol/L. Međutim, samo polovicu od toga čini slobodni ionizirani kalcij pa je koncentracija kalcijevih iona u plazmi i međustaničnoj tekućini približno 1,2 mmol/L. To je ujedno i aktivna frakcija kalcija koja je zaslužna za gotovo sve njegove učinke u organizmu, za razliku od ostatka koji je vezan ili za plazmatske proteine ili za anionske tvari. Na promjene u koncentraciji kalcija osobito su osjetljive podražljive stanice kao što su neuroni. U stanju povišene razine kalcijevih iona (hiperkalcijemiji), aktivnost će živčanog sustava biti potisnuta. Suprotno tome, u stanju snižene razine kalcijevih iona (hipokalcijemiji) javlja se veća pobuđenost živčanog sustava (24).

Apsorpcija kalcija odvija se u crijevima. Općenito je apsorpcija dvovalentnih kationa iz crijeva slaba, ali uz pomoć vitamina D apsorpcija kalcija povećava se na oko 35 % od unesene količine. Ostatak se izlučuje stolicom zajedno s kalcijem koji je u crijeva dospio s probavnim sokovima i oljuštenim stanicama crijevne sluznice. Osim stolicom, jedan dio kalcija izlučuje se iz organizma i mokraćom. Radi se o kalciju koji nije vezan za proteine plazme pa se može filtrirati glomerularnom filtracijom. Ipak, gotovo 99 % od filtriranog kalcija reapsorbira se pa se mokraćom izluči svega oko 2,5 mmol/dan kalcija. Od toga, 90 % reapsorpcije odvija se u proksimalnijim dijelovima bubrežnih kanalića, dok se ostalih 10 % odvija u završnim distalnim kanalićima i na početku sabirnih cijevi. Upravo je tih 10 % reapsorpcije podložno promjenama i ovisno o koncentraciji kalcija u krvi. Kada je koncentracija kalcija u krvi niska, razina reapsorpcije je visoka i kalcij se gotovo ne gubi mokraćom. Međutim, čak i u slučaju vrlo malog povećanja razine kalcija u krvi, reapsorpcija kalcija se smanji a izlučivanje se značajno povećava (25).

Kako je već spomenuto na samom početku, glavno su skladište kalcija u organizmu kosti gdje se kalcij nalazi u obliku kristalne soli hidroksiapatita. Kalcifikacija kosti odvija se tako da se na površinu kolagenskih vlakana, koje stvaraju osteoblasti, talože kalcijeve soli. U početku nastaju amorfni, odnosno nekristalni spojevi, a kasnije izmjenom ili dodavanjem atoma te apsorpcijom i ponovnim taloženjem nastaju kristali. Ovaj je proces također pomno reguliran pa se tako taloženje kalcijevih soli događa isključivo u koštanom tkivu, unatoč prezasićenosti izvanstanične tekućine kalcijevim i fosfatnim ionima. Kao takve, kosti služe kao izvor izmjenjivoga kalcija koji omogućuje brzo puferiranje, odnosno održavanje razine kalcijevih iona u plazmi (slika 3). Tako je organizam zaštićen od velikih oscilacija u razini kalcija u stanjima njegovog viška, odnosno manjka (25). Procesom pregradnje kosti, koji ovisi o ravnoteži osteoblasta (stanice koje odlažu kost) i osteoklasta (stanice koje resorbiraju kost), kalcij i fosfati oslobađaju se u plazmu (26).



Slika 3. Održavanje serumskih razina kalcija pregradnjom kosti (27).

Vitamin D, odnosno 1,25-dihidroksikolekalciferol, na nekoliko razina utječe na metabolizam kalcija. Ima hormonsko djelovanje i potiče apsorpciju kalcija iz crijeva tako što stimulira stvaranje bjelančevine kalbindina koja veže kalcij i prenosi ga u unutrašnjost stanica (28). Uz to, pospješuje reapsorpciju kalcija kroz epitel bubrežnih kanalića i tako smanjuje

njegovo izlučivanje mokraćom. U manjim količinama vitamin D potaknut će kalcifikaciju kosti, dok će u prekomjernim količinama dovesti do resorpcije kosti (25).

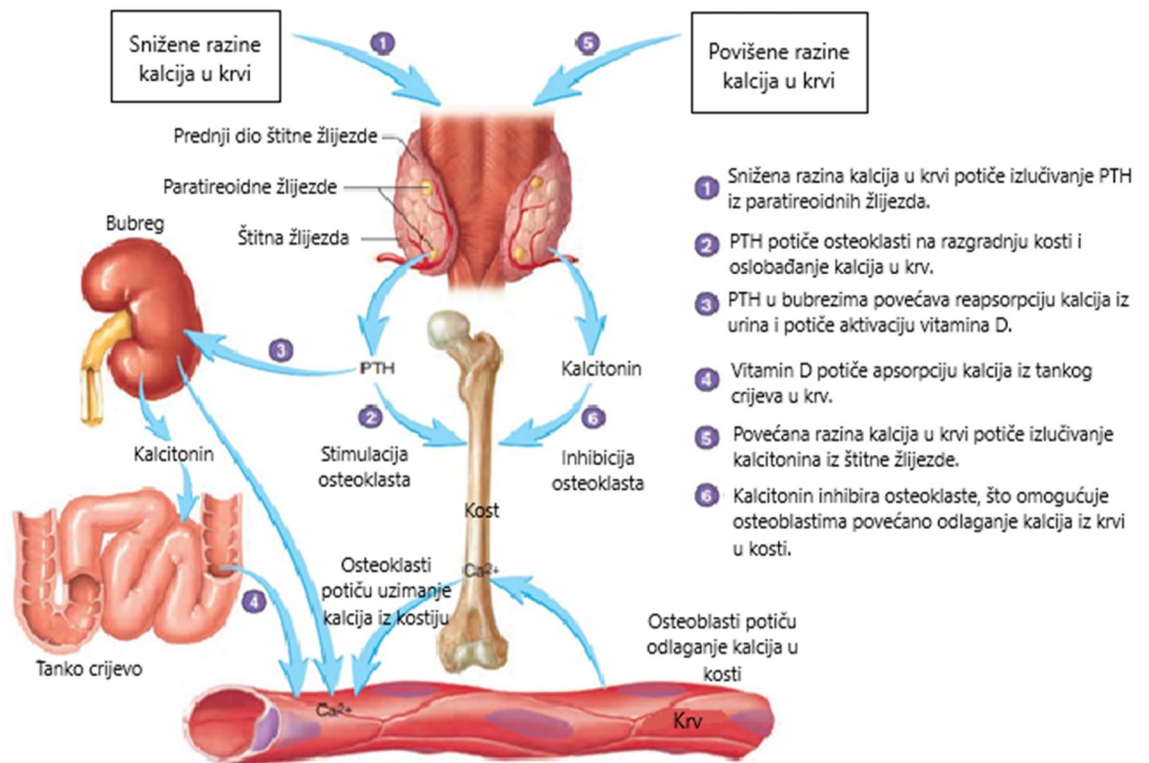
Paratireoidni hormon (PTH) drugi je važan regulator homeostaze kalcija. Sintetiziraju ga i izlučuju paratireoidne žlijezde. Uslijed njegovog pojačanog djelovanja, kalcijeve soli se oslobađaju iz kostiju i dolazi do hiperkalcijemije, dok se kod smanjene funkcije paratireoidnih žlijezda javlja hipokalcijemija. Osim učinka na mobilizaciju kalcija iz kosti, PTH povećava crijevnu apsorpciju kalcija u crijevima. Taj učinak ostvaruje posredno povećavajući stvaranje aktivnog oblika vitamina D – 1,25-dihidroksikolekalciferola u bubrezima (28). Na membrani paratireoidnih stanica nalazi se receptor koji je osjetljiv na kalcij. On zamjećuje promjene razine kalcija u izvanstaničnoj tekućini. Kada je koncentracija kalcija visoka, receptor aktivira enzim fosfolipazu C i putem drugih glasnika potiče oslobađanje kalcija iz unutarstaničnih zaliha, što dovodi do smanjenja sekrecije PTH. U obrnutoj situaciji, niska koncentracija kalcijevih iona blokira navedene puteve i potiče sekreciju PTH (29).

U parafolikularnim stanicama štitnjače sintetizira se i iz njih izlučuje hormon kalcitonin. U metabolizmu kalcija ima manje značajan učinak od PTH, ali ipak ne smije biti zanemaren. Učinci su mu suprotni učincima PTH. Njegovo lučenje potaknuto je povećanom plazmatskom koncentracijom kalcija, a on je odgovoran za smanjivanje koncentracije kalcija. To postiže na dva načina – prvi je neposredan, smanjenjem resorpcijske aktivnosti osteoklasta i posljedično većim odlaganjem kalcija iz plazme u kost, a drugi je smanjenjem stvaranja novih osteoklasta (29). Premda su svi učinci kalcitonina na plazmatski kalcij kratkotrajni i slabi, njegov se učinak smatra nešto bitnijim u trudnoći i dojenju. Povišena razina kalcitonina, a posljedično i vitamina D, u navedenim je stanjima bitna za prijenos kalcija s majke na fetus, odnosno novorođenče (30).

1.3. Promjene u razini kalcija i pridružene bolesti

Unatoč postojanju opisane mreže mehanizama kojom se nadziru razine serumskog kalcija, ponekad se javljaju stanja narušene ravnoteže kalcija koja za posljedicu mogu imati ozbiljne bolesti. Također, pacijenti s hiperkalcijemijom ili hipokalcijemijom ponekad mogu biti bez simptoma, pa je kod sumnje na neko od ovih stanja bitno uvijek prvo odrediti serumsku koncentraciju kalcija (31). Prilikom postavljanja dijagnoze u obzir treba uzeti i frakciju kalcija koja je vezana za albumin jer ona može ne utjecati na slobodni serumski kalcij, pa postoji

opasnost da hiperkalcijemija prođe nezamijećeno (32). Pojednostavljeni prikaz cjelokupne homeostaze kalcija nalazi se na slici 4.



Slika 4. Homeostaza kalcija (33).

1.3.1. Hiperkalcijemija

Hiperkalcijemija se javlja kada serumske razine kalcija premaše ekskrecijsku sposobnost bubrega. Najčešći su uzroci primarni hiperparatireoidizam i maligna stanja. Kada govorimo o višku PTH kao uzročniku, u pozadini je najčešće hiperplazija ili dobroćudni tumor jedne ili više paratireoidnih žlijezda. Djelovanjem povišenih razina PTH, kalcij se prekomjerno mobilizira u serum iz kostiju, crijeva, te smanjenom bubrežnom ekskrecijom. Povišene razine kalcija javljaju se u malignim stanjima poput bubrežnih karcinoma, limfoma, leukemija i mijeloma. Najčešće se javljaju uslijed povećane resorpcije kosti posredovane osteoklastima koja se javlja neovisno o postojanju koštanih metastaza (34). Uz navedeno, moguća je i hipervitaminoza D koja može biti jatrogena, uzrokovana povećanim unosom mliječnih proizvoda ili povezana s nekim drugim bolestima poput gljivičnih infekcija (35).

Simptomi hiperkalcijemije uglavnom se javljaju kada serumska koncentracija prelazi 0,66 mmol/L. Ističu se gastrointestinalne tegobe poput mučnine, povraćanja i opstipacije, osteoporoza, osteomalacija i artritis, bubrežni kamenci te potisnuta aktivnost središnjeg živčanog sustava koja uključuje letargiju i depresiju (36).

Terapija hiperkalcijemije ovisi o samom uzroku i težini stanja. Kod pacijenata sa srčanim ili bubrežnim zatajenjem terapija izbora bila bi hemodijaliza. U slučaju hiperparatireoidizma potrebna je kirurška intervencija kako bi se uklonio izvor prekomjerne sekrecije PTH. Moguća je i supkutana administracija kalcitonina čiji su učinci suprotni PTH, ali je njegov učinak blag i kratkotrajan. U svakom slučaju, cilj je liječenja povećati eliminaciju kalcija iz seruma, smanjiti njegovu apsorpciju iz crijeva te konačno smanjiti resorpciju koštanog tkiva (36).

1.3.2. Hipokalcijemija

Hipokalcijemija je stanje izrazito niskih serumskih razina kalcija. Javlja se rjeđe od hiperkalcijemije ali može dovesti do jako teških kliničkih slika, osobito ako nije na vrijeme prepoznata. Također, može biti akutno ili kronično stanje. Različiti su mogući uzroci hipokalcijemije, a često se javlja kao popratni simptom kod drugih bolesti i stanja. Može se javiti i kod novorođenčadi i tada su veliki izgledi da se radi o genetskoj pozadini (36).

Čest je uzrok hipoparatiroidizam. U nedostatku PTH, resorpcija se kalcija toliko smanji da osteoklasti postanu gotovo neaktivni. Posljedično, kalcij se iz kostiju oslobađa jako sporo i smanjuje se razina kalcija u tjelesnim tekućinama (23). Hipoparatiroidizam se može javiti postoperativno, primjerice nakon uklanjanja štitne ili paratiroidnih žlijezda. Osim toga, zapažen je kod autoimunih bolesti koje karakterizira prisustvo autoantitijela na stanice paratiroidne žlijezde te kod abnormalnog razvoja žlijezda uslijed kompleksnih genetskih sindroma (37).

Od ostalih uzroka hipokalcijemije važno je spomenuti acidozu, odnosno alkalozu, s obzirom da vezanje kalcija za albumin ovisi o pH vrijednosti pa će se u teškoj acidozi kalcij više vezati za albumin, a izmjerena razina serumskog kalcija bit će snižena. Može se javiti i kao posljedica uzimanja nekih lijekova kao što su bisfosfonati koji inhibiraju osteoklastima posredovanu resorpciju kosti. Rizik za hipokalcijemiju nose još neka stanja kao što su trudnoća, masivne transfuzije krvi i akutni pankreatitis (38).

Klinička slika osobe s manifestnom hipokalcijemijom obuhvaća simptome različitih organskih sustava. Ističe se povećana neuromuskularna iritabilnost koja uključuje grčeve mišića, tetaniju, parestezije, laringospazam, bronhospazam te konvulzije (39). Na mentalnom stanju osobe mogu se primijetiti dezorijentiranost, anksioznost, depresija, loše pamćenje i nedostatak koncentracije. Moguća su i kožna stanja poput ekcema, psorijaze i ekfolijativnog dermatitisa te alopecija i lomljivi nokti. U teškoj je hipokalcijemiji osobito opasan simptom poremećaj srčanog ritma, aritmija (40).

Zastupljenost simptoma značajno ovisi i o tome radi li se o akutnom ili kroničnom deficitu kalcija. Primjerice, u akutnim stanjima često se javljaju srčane manifestacije u vidu promjena u elektrokardiogramu (EKG) i aritmija. Simptomi koji se više povezuju s kroničnom, dugogodišnjom hipokalcijemijom neurološke su komplikacije uzrokovane kalcifikacijom bazalnih ganglija i drugih dijelova mozga (41).

Terapija hipokalcijemije ovisi o težini i frekvenciji simptoma te o etiologiji. U blažim stanjima mogu se dati oralni pripravci kalcija pri čemu je cilj dozirati 1500 do 2000 mg kalcija dnevno podijeljeno u 2 ili 3 doze. Uz oralne oblike kalcija često se preporučuje i suplementacija vitaminom D kako bi se poboljšala apsorpcija kalcija. Teža, akutna stanja praćena promjenama u EKG-u zahtijevaju intravensku primjenu kalcija u obliku kalcijevog glukonata ili kalcijevog klorida u infuzijama u trajanju 10 do 20 minuta (39). Kada se u pozadini hipokalcijemije nalazi hipoparatiroidizam, terapijska je opcija davanje rekombinantnog humanog PTH. Međutim, u praksi se isti rijetko primjenjuje zbog visoke cijene i kratkotrajnog učinka (42).

1.4. Suplementacija kalcija

U svakodnevnoj uravnoteženoj prehrani prisutne su namirnice koje predstavljaju nutritivne izvore kalcija. Tu prvenstveno ubrajamo mlijeko i mliječne proizvode, osobito sir i jogurt, za koje se procjenjuje da predstavljaju preko 70 % izvora kalcija (43). Slijede ih biljni izvori kalcija poput kelja, kupusa, brokule, blitve, mahunarki i orašastih plodova te morski plodovi od kojih se ističu losos i sardine. Pritom je biorasploživost kalcija iz biljnih izvora značajno manja nego iz mlijeka i mliječnih proizvoda (44). Kod biljnih izvora kalcija moguća je interakcija kalcijevih iona s drugim tvarima zastupljenim u istom izvoru. Najbolji je primjer zeleno povrće, primjerice špinat, koje je osim kalcijem bogato i oksalatnom kiselinom. U probavnom sustavu oksalati keliraju ione kalcija, a u manjoj mjeri i druge minerale, stvarajući tako netopljive soli kalcija i smanjujući njegovu apsorpciju i iskoristivost. Vrijedno je

spomenuti i važnost obrnute interakcije – učinka kalcija na apsorpciju oksalata. Nastankom spomenutih netopljivih soli kalcija smanjuje se i apsorpcija oksalatne kiseline, što može biti korisno u osoba koje imaju povišen rizik za nastanak oksalatnih bubrežnih kamenaca (45).

1.4.1. Indikacije za primjenu dodataka prehrani s kalcijem

Preporučeni dnevni unos kalcija za odrasle osobe iznosi između 800 i 1200 mg. Gornja granica unosa kalcija koja se smatra sigurnom iznosi između 2000 i 2500 mg/dan. Značajan dio populacije prehranom ne uspijeva postići zadovoljavajući unos kalcija pa se javlja potreba za uzimanjem dodataka prehrani, kako za prevenciju, tako i za liječenje deficita kalcija. Osobito su važne skupine osobe s osteoporozom ili osteopenijom, žene u perimenopauzi i postmenopauzi, žene s amenorejom, vegani te žene koje doje više novorođenčadi istovremeno. Rizična su skupina za deficit kalcija i osobe koje zbog intolerancije na laktozu prehranom ne mogu unijeti adekvatne količine kalcija te osobe s malapsorpcijskim stanjima poput celijakije i upalne bolesti crijeva (46).

Poseban je naglasak na dovoljan unos kalcija stavljen u kontekstu prevencije i liječenja koštanih poremećaja. U osoba starijih od 50 godina dostatan unos kalcija potreban je za prevenciju osteoporoze, a ženama u menopauzi preporučuje se unos od 1000 do 1600 mg kalcija na dan. Postoje preporuke i za suplementaciju kalcijem u pedijatrijskoj i adolescentskoj populaciji s ciljem smanjenja rizika za osteoporozu i prijelome u starijoj životnoj dobi (46).

Suplementacija kalcija može biti korisna i za zdravlje endokrinog sustava. U liječenju hiperparatireoidizma povećan unos kalcija smanjit će serumske razine PTH i posljedično smanjiti resorpciju kosti (47).

Kalcij je pokazao korisne učinke i u ublažavanju tegoba predmenstrualnog sindroma. Ako je unos kalcija hranom nedostatan, suplementacija kalcijem u dozi od 1000 do 1200 mg/dan može smanjiti rizik od pojave simptoma predmenstrualnog sindroma ili ublažiti njihov intenzitet (48).

1.4.2. Oblici preparata kalcija dostupni na tržištu

Glavninu dodataka prehrani s kalcijem na tržištu čine dva oblika – kalcijev citrat i kalcijev karbonat. Udio elementarnog kalcija u kalcijevom karbonatu je 40 %, a u citratu oko 21 % (46).

Kalcijev karbonat cjenovno je najpristupačniji, što je često presudan čimbenik u odabiru pojedinaca. Međutim, on ima nešto manju topljivost te zbog prisutnosti karbonata blago antacidno djelovanje. Za njegovu apsorpciju bitna je kiselost želuca pa ga je potrebno uzimati uz obrok. Kod osoba koje uzimaju inhibitore protonske pumpe njegov će učinak biti smanjen. Unatoč tome, pokazuje dobru apsorpciju i podnošljivost kod većine ljudi. Prednost nad citratom daje mu i veći sadržaj kalcija, zbog čega je doziranje karbonata jednostavnije. Potrebno je uzeti veći broj tableta ili kapsula citrata kako bi se postigla doza ekvivalentna onoj postignutoj kalcijevim karbonatom (46).

Kalcijev citrat ima veću iskoristivost i bolju biodostupnost u odnosu na karbonat. Prednost mu je i to što njegova apsorpcija ne ovisi o kiselosti želučanog sadržaja pa se može uzimati i s hranom i bez nje. Upravo je zbog toga pogodan kod starijih osoba kod kojih je lučenje želučane kiseline često smanjeno (46).

Od ostalih oblika kalcija ističu se glukonat i laktat. Radi se o oblicima koji imaju znatno manji sadržaj kalcija – u laktatu se nalazi 13 % elementarnog kalcija, a u glukonatu svega 9 %. Tako nizak sadržaj kalcija zahtijeva učestalo doziranje kako bi se postigle adekvatne doze kalcija, a kod takvog režima uzimanja adherencija pacijenata vidno je smanjena (49).

Vrijedno je spomenuti i jedan kompleksniji oblik kalcija koji nije čest na tržištu i rijetki su proizvođači koji ga nude. Radi se o kalcij citrat malatu (CCM). Riječ je o obliku čija je apsorpcija, kao i kod samog citrata, neovisna o kiselosti u probavnom sustavu pa se može uzimati neovisno o hrani. Prednost mu je i izostanak rizika od stvaranja bubrežnih kamenaca, što je jedan od rizika kod uzimanja kalcijeva karbonata. Ne utječe na status drugih minerala u organizmu, a pokazuje i sposobnost smanjenja krvnog tlaka. Cijena mu je nešto viša u odnosu na druge dostupne preparate kalcija (50).

Na tržištu se može pronaći i nekoliko preparata pod nazivom koraljni kalcij. Dobiva se iz koraljnih grebena i smatra se najprirodnijim oblikom kalcija. Njegov sastav kalcija ima najviše sličnosti sa sastavom kalcija u ljudskoj kosti. Većinu sadržaja čini kalcijev karbonat, ali sadrži i magnezij i druge minerale u tragovima (51). Neposredno po njegovu otkriću pripisivala su mu se brojna ljekovita svojstva uključujući izlječenje od karcinoma, multiple skleroze i

Parkinsonove bolesti, a naglašavali su se i njegovi benefiti za zdravlje mozga, krvožilnog sustava, zubiju i kostiju. Međutim, nedovoljan broj znanstvenih dokaza rezultirao je obustavom pripisivanja navedenih svojstava ovom preparatu u marketinškim krugovima (46). Zabrinutost se javila i zbog mogućnosti kontaminacije koraljnih grebena teškim metalima poput olova i žive (52).

Kalcij pokazuje svojstvo ovisnosti apsorpcije o primijenjenoj dozi. Najveća je apsorpcija kalcija kada se primijeni u dozi od 500 mg ili manje. Zbog toga se ne preporučuje da pojedinačna doza bude veća od 500 mg. Ukoliko je dnevno potrebno unijeti više od 500 mg, preporučuje se podijeliti na nekoliko dnevnih doza. Osim što će se optimizirati apsorpcija, na taj će se način na minimum svesti gastrointestinalne nuspojave i izbjeći veliki gubici kalcija putem bubrega. Pri odabiru preparata kalcija, kako je već spomenuto, značajnu ulogu igra režim doziranja, a on ovisi o udjelu elementarnog kalcija u pojedinim obliku. Primjerice, kalcijev karbonat sadrži 40 % elementarnog kalcija, što znači da je potrebno 1250 mg kalcijeva karbonata kako bi se osigurao unos 500 mg kalcija (53).

1.4.3. Kombinirani pripravci kalcija

Uz dodatke prehrani koji sadrže samo kalcij, na tržištu se može pronaći i niz kombinacija kalcija i drugih tvari. Od farmaceutskih oblika prevladavaju šumeće tablete, tablete i kapsule, a nekoliko njih dolaze i u tekućem obliku te u obliku direkt praha u vrećicama. Ovakvi se pripravci ističu svojom praktičnošću jer omogućuju suplementaciju više tvari istovremeno, a režim doziranja pritom ne postaje kompliciraniji (54).

Najčešće su kombinacije kalcija s vitaminom D. Budući da vitamin D poboljšava apsorpciju kalcija iz probavnog sustava, ovakvom se kombinacijom sinergistički djeluje na održavanje razine kalcija u krvi, a pritom se sprječava resorpcija kosti. Ispitivanja su pokazala da je kombinacija kalcija i vitamina D učinkovita u prevenciji osteoporoze kod osoba starijih od 50 godina. Za najbolji učinak preporučuje se minimalna doza od 1200 mg kalcija i 800 IU (engl. *international units*) vitamina D (54).

Postoji i niz pripravaka u kojima se kalcij kombinira s vitaminom C. Uglavnom su to šumeće tablete u kojima se kombinira više različitih soli kalcija, primjerice laktat glukonat i karbonat, s askorbatnom kiselinom. Koriste se kod deficita kalcija i askorbatne kiseline, u stanjima povećane potrebe te za prevenciju očekivanog deficita. Uz sve benefite koje

suplementacija kalcija sa sobom donosi, dodatak vitamina C pruža i svojevrsnu zaštitu imuniteta (55).

Brojni proizvođači nude i trojnu kombinaciju – kalcij, magnezij i cink. Ova kombinacija može imati određenu korist za osobe koje iz različitih razloga ne uspijevaju unijeti dovoljne količine ovih minerala u organizam hranom. Ovakvim se pripravcima pripisuju razni benefiti – smanjenje anksioznosti (55), kontrola razine glukoze u krvi (56), jačanje imuniteta te poboljšanje kvalitete sna (57). Uz kalcij i ostala dva minerala mogu pozitivno djelovati na zdravlje kostiju. Magnezij taj učinak postiže aktivacijom vitamina D. Gotovo svi enzimi koji sudjeluju u sintezi i aktivaciji vitamina D zahtijevaju magnezij za obavljanje svoje funkcije. O prisutnosti magnezijevih iona ovise učinci i endogenog i egzogenog vitamina D (58).

U tekućim oblicima koji su dostupni na tržištu, kalcij se najčešće nalazi u kombinaciji s magnezijem, a uz magnezij, mogu biti dodani i fosfor i vitamin D. Kod takvih pripravaka naglasak se stavlja na očuvanje zdravlja i funkcije kostiju, a pojedini su posebno namijenjeni za normalan razvoj kostiju u pedijatrijskoj populaciji. Mogu se uzimati samostalno, a mogu se i pomiješati s vodom ili nekim drugim napitkom. Kalcij i magnezij u tekućim se pripravcima najčešće nalaze u obliku citrata (46).

Uz prethodno spomenuti koraljni kalcij, dostupna je i kombinacija kalcija i magnezija dobivenih iz koraljnih grebena s dodatkom vitamina D. Međutim, problem koji se javlja isti je kao i kod samog koraljnog kalcija, a to je pitanje onečišćenosti teškim metalima i posljedičnoj toksičnosti za organizam (51).

Rijetka, ali pažnje vrijedna kombinacija kalcija svakako je ona s magnezijem i borom. Istraživanje koje je objavljeno za ovu kombinaciju napravljeno je na životinjama i pokazalo je potencijalne dobrobiti za koštani sustav. Takav se učinak pripisuje pozitivnom utjecaju bora na osteoblastičnu aktivnost. Dodatak bora kalciju, prema objavljenoj studiji, može ubrzati proces oporavka nakon prijeloma kostiju (59).

1.4.4. Nuspojave suplemenata kalcijem

Kada je doziran unutar preporučenih vrijednosti, kalcij se smatra sigurnim suplementom uz eventualne blaže gastrointestinalne tegobe poput nadutosti. Međutim, kada dnevne doze prelaze gornje granice, tolerancija organizma na kalcij smanjuje se i raste rizik od neželjenih učinaka. Ta gornja granica iznosi 2500 mg za odrasle osobe između 19 i 50 godina te 2000 mg za starije od 50 godina (60).

Nakon niza godina smatranja kalcija nezamjenjivim suradnikom u prevenciji fraktura u starijih osoba, rezultati nekih ispitivanja doveli su u pitanje njegovu učinkovitost, ali i sigurnost. Najveća se zabrinutost javila oko povećanja rizika od kardiovaskularnih bolesti (61). Glavni mehanizam koji se nalazi u pozadini ove priče je odlaganje kalcija u stijenke krvnih žila, što je jedan od neizostavnih koraka aterosklerotskog procesa. Najveći rizik za kalcifikaciju koronarnih arterija uslijed suplementacije kalcijem pronađen je u osoba s kroničnom bubrežnom bolešću (62). S obzirom na postojanje dokaza da uzimanje kalcija ima umjerene benefite u reguliranju krvnog tlaka i razine lipida u krvi, iznenađuje činjenica da je njegova primjena povezana s povećanom incidencijom infarkta miokarda. Navedeno je pokazano u randomiziranom kontroliranom ispitivanju na 1471 zdravih postmenopausalnih žena u trajanju od 5 godina, pri čemu je infarkt miokarda definiran kao potvrđen rast ili pad određenih biokemijskih markera uz prisustvo barem jednog od sljedećeg: simptoma ishemije, karakterističnih promjena na EKG-u te obavljene koronarne arterijske intervencije. Važno je naglasiti da su simptomi koje su pacijentice same prijavile odgovarali navedenoj definiciji infarkta miokarda, a rezultat je bio statistički značajno povećanje njegove incidencije (63).

Nakon kardiovaskularnih rizika, važno je spomenuti neželjene učinke kalcija u probavnom sustavu. Premda manje ozbiljni, ovi su učinci znatno češće zapaženi i odavno je poznata njihova povezanost s primjenom kalcija. Najčešći se radi o akutnim tegobama kao što su konstipacija, proljev i bolovi u abdomenu. Kod primjene kalcijevog karbonata moguća je nadutost zbog oslobađanja ugljikovog (II) oksida (46). Jedna od težih manifestacija naziva se *Milk-alkali* sindrom, a radi se o stanju koje uključuje povišene razine serumskog kalcija, metaboličku alkalozu i akutno oštećenje bubrega. Javljaju se mučnina, povraćanje, konstipacija, a moguća je i anoreksija te pojava palpitacija (64).

Povezanost primjene kalcija i pojave bubrežnih kamenaca nedovoljno je utvrđena, ali postoje dokazi da povišena razina kalcija u serumu dovodi do hiperkalciurije, odnosno povećanog izlučivanja kalcija putem urina. Nadalje, hiperkalciurija je glavna predispozicija za formiranje bubrežnih kamenaca (65). U obzir treba uzeti i činjenicu da se često radi o kristalima

kalcijeva oksalata pa se uzrok problema može kriti i u metabolizmu oksalata (66). Da bi se smanjila mogućnost nastanka bubrežnih kamenaca preporučuje se uzimanje kalcija uz obrok radije nego između obroka i prije spavanja. Ukoliko pacijent u anamnezi ima bubrežne kamence, poželjno je napraviti ispitivanje razine kalcija u urinu prije početka suplementacije kalcijem (65).

Od ostalih neželjenih učinaka vrijedno je spomenuti i vrlo rijetke, ali teške alergijske reakcije koje uključuju oticanje lica, jezika i usana te otežano gutanje, kao i simptome poput crvenila, žarenja kože i svrbeža (67).

1.4.5. Interakcije kalcija s drugim tvarima

Kod uzimanja kalcija putem dodataka prehrani, u nekim je situacijama od velikog značaja vrijeme doziranja. Prvenstveno je važno razmotriti međudjelovanje kalcija s tvarima iz hrane, kao i s drugim dodacima prehrani i lijekovima. Na posebnom oprezu svakako trebaju biti osobe s određenom terapijom jer osim što pojedini lijekovi mogu utjecati na apsorpciju kalcija i kalcij može utjecati na njihovu apsorpciju, a samim time i na njihov konačni farmakološki učinak (46).

Poželjno je kalcij odvojiti od drugih minerala i vitamina kako bi apsorpcija i jednih i drugih bila optimalna. Osobito je važan oprez kod uzimanja željeza, ali i kod uzimanja cinka i magnezija. Također, ne preporučuje se uzimati kalcij uz namirnice bogate željezom kao što su meso, morski plodovi te određeno povrće i žitarice. Poznato je da kalcij, bilo da se radi o onome iz hrane ili iz dodataka prehrani, smanjuje apsorpciju željeza. Zbog toga se preporučuje mliječne proizvode odvojiti od uzimanja željeza. Ova je činjenica stvorila određene nejasnoće, s obzirom na to da je populacijama koje su pod rizikom od deficita željeza preporučen povećan unos kalcija. To se prvenstveno odnosi na žene te na djecu u razvoju. Međutim, ispitivanja su pokazala da se vrlo vjerojatno radi o prolaznom efektu te da dugoročno kalcij ne dovodi do promjena u statusu željeza i hematološkim parametrima. Potencijalno je to rezultat i kompenzacijskih mehanizama organizma (68).

Povećan unos kalija može dovesti do povećane ekskrecije kalcija iz organizma. Nasuprot tome, prehrana obogaćena kalijem može spriječiti povećanu ekskreciju kalcija i resorpciju kosti kod žena u postmenopauzi (69). Nadalje, potrebno je paziti na unos alkohola jer on može smanjiti apsorpciju kalcija (70), dok povećan unos kofeina može povećati izlučivanje kalcija putem urina (71).

Niz je lijekova s kojima kalcij ulazi u interakciju. Neke skupine antibiotika, kao što su kinoloni i tetraciklini, imaju svojstvo vezanja kalcijevih iona u probavnom sustavu. Na taj se način smanjuje apsorpcija spomenutih antibiotika pa je kalcij potrebno uzeti barem 2 sata prije ili nakon njihova uzimanja (72).

Poznate su interakcije kalcija s lijekovima za liječenje osteoporoze, bisfosfonatima, gdje kalcij može dovesti do smanjenje apsorpcije ovih lijekova. To ponovno sa sobom donosi određene nejasnoće jer je suplementacija kalcijem i vitaminom D preporučljiva kod terapije bisfosfonatima kako bi ovi lijekovi postigli maksimalan učinak. Međutim, dovoljnim vremenskim razmakom između uzimanja kalcija i bisfosfonata moguće je balansirati dovoljan unos kalcija i adekvatnu apsorpciju ovih lijekova (73). Osim na apsorpciju bisfosfonata, kalcij negativno djeluje i na apsorpciju antiretrovirusnih lijekova dolutegravira i elvitegravira (74).

Zapažena je i interakcija kalcija s antiaritmikom digoksinom. Radi se o dvije krajnosti – niske razine kalcija mogu dovesti do neučinkovitosti digoksina, dok visoke razine mogu potaknuti njegovu toksičnost. Važno je pomno praćenje razina kalcija kod osoba koje su na terapiji digoksinom (75).

Estrogeni povoljno utječu na serumske razine kalcija pa je kombinacija estrogena i kalcija vrlo korisna za povećanje gustoće kostiju kod žena u postmenopauzi (76). Razine kalcija mogu povećati i tiazidni diuretici pa je uz njih potreban poseban oprez u slučaju suplementacije kalcija (77).

Nasuprot prethodno spomenutim lijekovima, značajno je veći broj lijekova koji smanjuju serumske razine kalcija pa je uz njih poželjna nadoknada kalcija. Primjer su diuretici Henleove petlje, antiepileptici poput karbamazepina, fenobarbitola i fenitoina, a ističu se kortikosteriodi kod dugotrajnije primjene. Apsorpciju kalcija mogu smanjiti hipolipemici kolestiramin i kolestipol koji osim što na sebe vežu žučne kiseline u probavnom sustavu, vežu i brojne druge tvari, uključujući i sam kalcij (78).

1.5. *In vitro* oslobađanje iz čvrstih oralnih oblika

In vitro ispitivanje oslobađanja (disolucija) analitička je tehnika koja se koristi za određivanje karakteristika oslobađanja djelatne komponente iz farmaceutskog pripravka kao i konzistencije samog pripravka. Radi se o općeprihvaćenoj analitičkoj tehnici, a sama metoda oslobađanja razvija se za svaku tvar pojedinačno. Metoda oslobađanja prvenstveno je svojstvo čvrstih doziranih oblika, pa tako gotovo svaki čvrsti farmaceutski pripravak mora imati razvijen

test oslobađanja. Pritom je moguća prilagodba korištene aparature, medija te uvjeta provođenja ispitivanja, primjerice brzine miješanja (79).

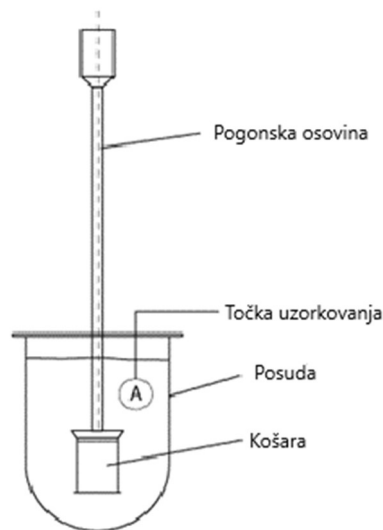
U svrhu određivanja kojom se brzinom tvar oslobađa iz čvrstog dozirnog oblika, odnosno kojom se brzinom otapa na mjestu apsorpcije, provodi se test disolucije. U brojnim slučajevima upravo je brzina disolucije ključni korak koji određuje brzinu apsorpcije, a posljedično i početak, intenzitet i trajanje biološkog učinka tvari (80).

Za razumijevanje samog procesa disolucije bitno je razlikovati pojam disolucije od pojma topljivosti. Disolucija podrazumijeva prijelaz molekula ili iona iz čvrstog stanja u otopinu i određena je afinitetom između molekula čvrste faze i molekula otapala. Topljivost tvari daje informaciju o opsegu u kojem se disolucija odvija u danim uvjetima, odnosno o količini tvari koja je iz čvrstog oblika prešla u otopinu nakon postizanja ravnoteže između tvari otopljene u otapalu i neotopljene tvari. Dakle, disolucija govori o brzini kojom se tvar otapa, dok topljivost govori o količini koja se može otopiti. Iako je u praksi veća topljivost najčešće povezana s većom brzinom disolucije, postoje i iznimke. Primjerice, neke tvari imaju veliku topljivost u vodi, ali je potrebno jako puno vremena do njihove potpune disolucije u vodi (81).

Mehanizam disolucije može se razmatrati kroz dva uzastopna koraka – prvi je površinska reakcija, a drugi je difuzija otopljenih molekula kroz granični sloj. Pretpostavka je da je čvrsta tvar u kristalnom obliku te da je po prirodi molekulska tvar, premda je mehanizam primjenjiv i na tvari građene od iona. Površinska reakcija obuhvaća oslobađanje molekula iz čvrste faze i njihov prelazak u tekuću fazu. Tijekom nje dolazi do prelaska molekula čvrste tvari iz okoliša u kojem su bile okružene identičnim molekulama u okoliš u kojem su okružene neidentičnim molekulama – molekulama otapala. Slijedi prijenos molekula tvari iz graničnog sloja između čvrste i tekuće faze u veći, glavni dio tekućine. Za granični sloj karakteristična je statičnost ili vrlo sporo kretanje slojeva tekućine, pa će i prijenos mase difuzijom biti spor. Tijekom ovog procesa dolazi do promjene energije te se većinom radi o endotermnom procesu gdje dolazi do hlađenja otopine. U slučaju značajno velikog afiniteta između otopljene tvari i otapala proces je egzoterman i može doći do stvaranja topline (81).

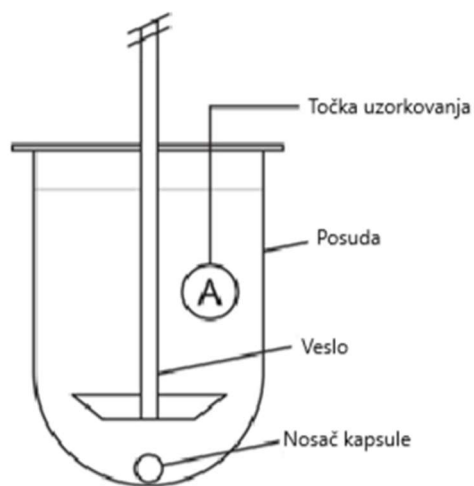
U Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*, Ph. Eur.) opisano je nekoliko vrsta aparatura koje se koriste za provođenje testa disolucije. Najčešće su korištene aparatura s košarom (engl. *Basket apparatus*) i aparatura s lopaticom (engl. *Paddle apparatus*). Prva se aparatura sastoji od posude napravljene od inertnog i prozirnog materijala, motora, pogonske osovine i cilindrične košare. Kako bi tijekom cijelog procesa disolucije temperatura

bila održavana na $37 \pm 0,5$ °C, posuda je uronjena u vodenu kupku ili zagrijavana prikladnim uređajem za zagrijavanje. Element za miješanje osigurava konstantno blago kretanje medija za disoluciju. Osim toga, nijedan drugi dio aparature, kao ni okoliš u kojem se aparatura nalazi, ne stvara značajne pokrete ili vibracije. Poželjno je da aparatura omogućuje uvid u pripremu i provođenje cijelog procesa. Posuda je cilindrična, ima hemisferično dno i kapacitet od 1 litre. Pogonska osovina namještena je tako da njena vertikalna os ni u jednoj točki nije više od 2 mm udaljena od vertikalne osi posude. Osovina, kao i element za miješanje, izrađeni su od nehrđajućeg čelika. Dozirna jedinica, odnosno 1 kapsula ili 1 tableta, na početku procesa stavlja se u suhu košaru (82). Opisana aparatura prikazana je na Slici 5.



Slika 5. Aparatura s košarom (engl. *Basket apparatus*) (83).

Druga vrsta aparature, aparatura s lopaticom, jako je slična prvoj. Razlika je u elementu za miješanje koji ovdje čini lopatica s oštricom i osovina. Osovina se sporo rotira, bez naglih pokreta i klimanja koji bi utjecali na rezultate testa. Tijekom provođenja testa održava se udaljenost između dna vesla i unutarnje stijenke dna posude od 25 ± 2 mm. Oštrica lopatice i osovina mogu se obložiti prikladnom prevlakom kako bi bili inertni. Prije nego što osovina krene rotirati dozirna se jedinica pusti da potone na dno posude. U slučaju da dozirne jedinice plutaju mogu im se pridružiti vrlo mali komadići nereaktivnog materijala, primjerice žičane spirale (82). Prikaz opisane aparature nalazi se na slici 6.



Slika 6. Aparatura s lopaticom (engl. *Paddle apparatus*) (84).

Zahtjevi za disolucijski medij opisani u Ph. Eur. vrijede za sve dozirne čvrste oblike – kako za oblike s konvencionalnim oslobađanjem, tako i za oblike s produljenim ili odgođenim oslobađanjem. Također, odnose se na obje opisane vrste aparature. Zadani volumen otopine odnosi se na mjerenja dobivena na temperaturi između 20 i 25 °C. Ukoliko je disolucijski medij puferirana otopina potrebno je namjestiti pH vrijednost tako da bude unutar $\pm 0,05$ pH jedinica od zadane. Ponekad otopljeni plinovi mogu utjecati na rezultate testa pa ih je potrebno ukloniti prije početka testiranja (82).

Prilikom interpretacije rezultata ključno je poznavati vrijednost Q (engl. *quantity*). Q označava količinu oslobođene aktivne tvari, izražene kao postotak korištenog sadržaja. Testiranje se provodi na tri razine, osim ako se odgovarajući rezultati pojave na razini 1 ili razini 2. Kod svih čvrstih dozirnih oblika na prvoj i drugoj razini koristi se po 6 dozirnih jedinica, dok se na trećoj razini koristi 12 dozirnih jedinica. Kriteriji prihvatljivosti razlikuju se ovisno radi li se o oblicima s konvencionalnim, produljenim ili odgođenim oslobađanjem. Kriteriji za oblike s konvencionalnim oslobađanjem navedeni u Ph. Eur. nalaze se u tablici 1 (82).

Tablica 1. Zahtjevi za čvrste dozirne oblike s konvencionalnim oslobađanjem

| Razina (S) | Broj testiranih jedinica | Kriteriji prihvatljivost |
|------------|--------------------------|---|
| S_1 | 6 | Nijedna jedinica nema vrijednost ispod $Q + 5$ %. |
| S_2 | 6 | Prosjek 12 jedinica ($S_1 + S_2$) jednak je ili veći od Q ; nijedna jedinica nema vrijednost ispod $Q - 15$ %. |
| S_3 | 12 | Prosjek 24 jedinice ($S_1 + S_2 + S_3$) jednak je ili veći od Q ; najviše 2 jedinice imaju vrijednost manju od $Q - 15$ %; nijedna jedinica nema vrijednost ispod $Q - 25$ %. |

Q – količina oslobođene aktivne tvari

Kod provođenja testa disolucije za čvrsti farmaceutski oblik uvijek su definirani sljedeći kriteriji: vrsta aparature, sastav, volumen i temperatura disolucijskog medija; brzina rotacije disolucijskog medija; vrijeme, metoda i broj uzorkovanja; metoda analize; kriteriji prihvatljivosti. Uglavnom se koristi vodeni medij, a sastav ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima djelatne i pomoćnih tvari. U nekim slučajevima disolucijski medij može sadržavati i enzime, surfaktante ili neke druge dodatne organske ili anorganske tvari. Kako je već spomenuto, na rezultate može utjecati i prisustvo otopljenih plinova, pa je ponekad prije testa disolucije potrebno provesti takozvani postupak deaeracije (uklanjanja otopljenih plinova). Od velike je važnosti da oprema za provođenje testa disolucije bude kvalificirana. U obzir je potrebno uzeti veličinu i razinu tolerancije aparature, a kritične parametre poput temperature i volumena disolucijskog medija i brzine rotacije potrebno je periodično monitorirati. Osim kvalifikacije, bitna je i validacija cijelog sustava koja u obzir uzima točnost, preciznost i otpornost na kontaminaciju (82).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati sadržaj kalcija u 4 pripravka kalcijevog karbonata u obliku tableta koji su dostupni na hrvatskom tržištu te ispitati kako se kalcij iz navedenih pripravaka oslobađa u mediju koji simulira želučani medij. Ispitivanjem je obuhvaćen jedan pripravak koji je registriran kao lijek i nalazi se u receptnom načinu izdavanja te tri dodatka prehrani koja se nalaze u slobodnoj prodaji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije korištene za kompleksometrijsku titraciju

- Razrijeđena HCl (Ph. Eur.)
- 2,00 mol/L NaOH
- Deionizirana voda
- Triturat kalkanokarboksilne kiseline
- 0,025 mol/L EDTA

3.1.2. Kemikalije korištene za pripremu reagensa

- 12,00 mol/L HCl (koncentrirana) (VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- NaOH (VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Kalkanokarboksilna kiselina
- NaCl (Fagron, Hrvatska)
- Dinatrijev edetat dihidrat (Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države)
- Deionizirana voda

3.1.3. Uzorci korišteni za kompleksometrijsku titraciju

Za određivanje sadržaja kalcija korištena su četiri različita pripravka s kalcijevim karbonatom, od kojih je jedan lijek, a ostala tri su dodaci prehrani od različitih proizvođača.

- Pripravak 1 (lijek) – 1 tableta sadrži 1000 mg kalcijeva karbonata. Pomoćne su tvari povidon, mikrokristalična celuloza, natrijev škroboglikolat, magnezijev stearat, natrijev laurilsulfat i koloidno bezvodni silicijev dioksid.
- Pripravak 2 (dodatak prehrani) – 1 tableta sadrži 600 mg kalcija u obliku kalcijeva karbonata te 3,1 mcg vitamina D. Pomoćne su tvari mikrokristalinična celuloza, maltodekstrin, natrijeva karboksimetil celuloza, celulozna ovojnica i magnezijeve soli masnih kiselina.

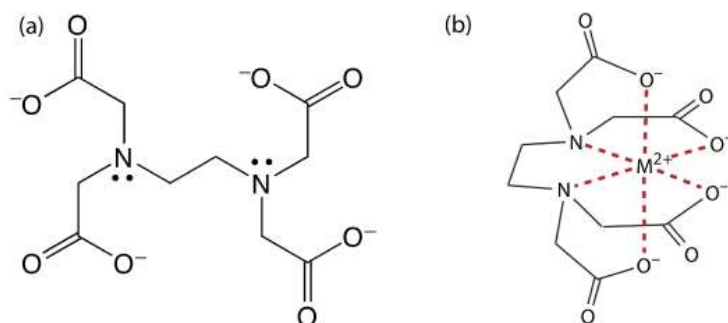
- Pripravak 3 (dodatak prehrani) – 1 tableta sadrži 400 mg kalcija u obliku kalcijeva karbonata i 25 mcg vitamina D. Pomoćne su tvari mikrokristalinična celuloza, polivinilpirolidon-vinil acetat i magnezijeve soli masnih kiselina.
- Pripravak 4 (dodatak prehrani) – 1 tableta sadrži 600 mg kalcija u obliku kalcijeva karbonata, 5 mcg vitamina D i 80 mcg vitamina K. Pomoćne su tvari umrežena karboksimetilceluloza, polivinilni alkohol, polietilen glikol, talk i magnezijeve soli masnih kiselina.

3.2. Metode

3.2.1. Princip metode određivanja kalcija u uzorcima

Sadržaj kalcija u uzorcima određuje se metodom kompleksometrijske titracije. Radi se o volumetrijskoj analitičkoj metodi koja se temelji na reakciji između analita i titranta. Mjeri se volumen titranta koji u potpunosti, sukladno kemijskoj reakciji, reagira s analitom. Izjednačenje množine analita i titranta događa u se točki ekvivalencije, dok se u završnoj točki titracije vizualno (ili pomoću instrumenta) zapaža potpunost reakcije. Te bi dvije točke trebale biti jednake, ili bi eventualna razlika trebala biti što je moguće manja i poznata (85).

Titrant je uglavnom kelirajuća tvar koja s ionima metala tvori stabilan, u vodi topljiv kompleks. Najčešće se koristi etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) jer ona s velikim brojem metala, pa tako i s kalcijem, tvori stabilne komplekse u stehiometrijskom odnosu 1:1 (85). Strukture potpuno deprotonirane EDTA i EDTA u kompleksu s dvovalentnim metalnim ionom prikazane su na slici 7.



Slika 7. Struktura EDTA: u potpuno deprotoniranom obliku (a); u kompleksu s dvovalentnim ionom (b) (86).

Kako bi se osigurala selektivnost ove reakcije prema željenom elementu može se regulirati pH vrijednost reakcijskog medija. Za indiciranje završne točke titracije koriste se vizualni indikatori. Oni s ionima metala u pripremljenoj otopini uzorka tvore obojeni kompleks koji je relativno stabilan, ali manje stabilan od kompleksa metala s EDTA. Indikator u završnoj točki titracije prelazi u svoje slobodno stanje jer se metal otpušta s njegovih veznih mjesta i veže na EDTA, a to registriamo kao promjenu boje. U ovom je slučaju to triturat kalkanokarboksilne kiseline – indikator selektivan za kalcij koji u završnoj točki titracije mijenja boju iz ljubičaste u plavu (slika 8).



Slika 8. Boja otopine prije početka titracije (lijevo) i nakon promjene boje u završnoj točki titracije (desno)

3.2.2. Priprema uzorka za određivanje sadržaja kalcija

Za određivanje sadržaja kalcija uzima se po 10 tableta od svakog pripravka i svaka tableta pojedinačno se izvaže na analitičkoj vagi te se izračunom aritmetičke sredine mase 10 tableta dobije srednja vrijednost mase tablete i standardna devijacija. Potom se tablete usitne u tarioniku te se iz usitnjene mase u čašu od 100,00 mL na analitičkoj vagi važe uzorak mase od 0,200 grama ($\pm 5\%$). U čašu s uzorkom dodaje se klorovodična kiselina kako bi se uzorak otopio, a volumen koji je bio potreban za otapanje je 5,0 mL. Nakon otapanja uz miješanje otopina se preko filter papira prenese u odmjernu tikvicu od 500,00 mL te se deioniziranom vodom dobro isperu čaša, filter papir i lijevak kako bi prebacivanje bilo što kvantitativnije.

Kako bi se pH otopine podesio za titraciju, u ovom se koraku vrši zaluživanje pripremljenom otopinom natrijeva hidroksida. pH vrijednost koja pogoduje tritratu kalkanokarboksilne kiseline kao indikatoru je 12 (87), a postignuta je dodavanjem 4,0 mL otopine natrijeva hidroksida. Na kraju, u odmjernu se tikvicu do oznake doda deionizirana voda i pripremljeni uzorak se promućka.

3.2.3. Priprema ostalih reagensa

Razrijeđena klorovodična kiselina izrađena je po Ph. Eur. (88) iz koncentrirane klorovodične kiseline.

Otopina natrijeva hidroksida molarne koncentracije 2,00 mol/L korištena je u ispitivanju. Pripremi se na način da se izvaži 7,9874 g natrijeva hidroksida te se u odmjernoj tikvici od 100 mL razrijedi s deioniziranom vodom do oznake.

Indikator za kompleksometrijsku titraciju, tritrat kalkanokarboksilne kiseline, također je izrađen po Ph. Eur. (89). Pomiješa se jedan dio kalkanokarboksilne kiseline s 99 dijelova natrijeva klorida. U ovom slučaju ukupna je masa pripremljenog indikatora iznosila 10,00 g, a dobiven je vaganjem 0,100 g kalkanokarboksilne kiseline i miješanjem s 9,9 g natrijeva klorida. Praškasta mješavina prebačena je u plastičnu falkonicu kako bi se prije same titracije mogla kratko vorteksirati radi ujednačenja sadržaja.

Za titraciju je korištena 0,025 mol/L EDTA, a ona je pripremljena vaganjem 9,306 g dinatrijevog edetata dihidrata koji se u odmjernoj tikvici od 1000 mL razrijedi s deioniziranom vodom do oznake.

Za titraciju uzoraka uzetih tijekom metode disolucije korištena je 0,1 mol/L EDTA koja je dobivena vaganjem 3,723 mg dinatrijevog edetata dihidrata i njegovim razrijeđivanjem s deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 1000 mL.

3.2.4. Postupak određivanja sadržaja kalcija u uzorcima

Iz odmjerne tikvice u kojoj se nalazi pripremljeni uzorak uzima se alikvot od 25,00 mL i prenese u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL, gdje mu se vrhom metalne žličice dodaje mala količina indikatora i pomiješa se kružnim pokretima dok se dobije ujednačena ljubičasta boja. Potom se uzorak titrira 0,025 mol/L EDTA, a utrošeni volumen EDTA bilježi se i koristi za izračun sadržaja kalcija u tableti.

3.2.5. Princip metode disolucije

Metoda disolucije provedena je koristeći uvjete za tablete kalcijevog karbonata opisane u Američkoj farmakopeji (USP) (90). Za sve korištene pripravke s kalcijem koristi se aparatura 2, odnosno aparatura s lopaticom. Disolucijski medij koji je korišten bila je 0,1 mol/L HCl. U svaku posudu se ulije 900 mL ($\pm 1\%$) disolucijskog medija i pričekava oko 30 minuta da se zagrije na temperaturu od $37 \pm 0,5$ °C. Kad se temperatura postigne, dozirne jedinice (tablete) dodaju se u posude. Vrijeme trajanja disolucije postavljeno je 90 minuta, a brzina vrtnje na 75 okretaja po minuti.

Uzorkovanje se provodi u određenim vremenskim točkama. U ovom istraživanju to su 5, 10, 15, 30, 45, 60 te 90 minuta od početka disolucije. Uzorak se uzima svaki put s približno iste visine, a to je otprilike na pola udaljenosti između površine disolucijskog medija i vrha rotirajuće oštrice lopatice. Nakon uzimanja uzorka za analizu u posudu je potrebno vratiti jednak volumen disolucijskog medija. U ovom slučaju, volumen uzorkovanja bio je 10,00 mL, pa je u sustav nakon svakog uzorkovanja dodano 10,00 mL svježeg disolucijskog medija.

Metoda disolucije omogućuje nam da vizualno uočimo kako se promatrane tablete ponašaju u disolucijskom mediju kroz zadano vrijeme, odnosno kako se otapaju. Međutim, uzorci koji se tijekom metode uzimaju koriste se za daljnu analizu kako bi se dobile točne brojčane vrijednosti. Na uzorcima se provodi kompleksometrijska titracija, jednaka onoj koja je provedena za određivanje sadržaja. Razlika je u tome što je potrebna značajno manja obrada uzorka prije same titracije. Uzorci su zaluzeni s otopinom NaOH dok nije postignut pH 12 te im je potom dodan indikator. Ciljna pH vrijednost u ovom je slučaju postignuta dodavanjem

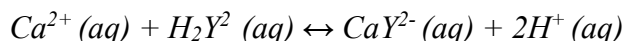
1,5 mL otopine NaOH. Također, u ovom je određivanju korištena EDTA molarne koncentracije 0,01 mol/L.

Volumeni EDTA utrošeni u titraciji služe za izračunavanje mase kalcija u alikvotu od 10,00 mL, iz čega se daljnjim izračunima dobije masa kalcija u cijelom disolucijskom mediju, odnosno u 900,00 mL u točno određenoj vremenskoj točki. To je ujedno količina kalcija koja se oslobodila do te vremenske točke, a služi za računanje postotka oslobođenog kalcija.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati određivanja sadržaja kompleksometrijskom titracijom

Pripravom uzorka opisanom u dijelu 3.2.2. dobije se volumen od 500,00 mL iz čega se uzima alikvot od 25,00 mL na kojem se provodi titracija. Iz utrošenog volumena titranta izračuna se sadržaj kalcija u tom alikvotu, pa će sadržaj kalcija u uzorku biti 20 puta veći nego u alikvotu. Konačno, iz omjera masa dobijemo sadržaj kalcija u cijeloj tableti. Reakcija između kalcija i EDTA može se prikazati idućom jednačbom, gdje H_2Y^{2-} predstavlja EDTA:



Iz stehiometrije kemijske reakcije vidljiv je omjer množina kalcija i EDTA, a iz njega se dobije izraz za izračun mase kalcija:

$$n (Ca^{2+}) : n (H_2Y^{2-}) = 1:1$$

$$n (Ca^{2+}) = n (H_2Y^{2-}) = c (H_2Y^{2-}) \times V (H_2Y^{2-})$$

$$n (Ca^{2+}) = \frac{m (Ca^{2+})}{M (Ca^{2+})}$$

Masa kalcija u alikvotu jednaka je:

$$m (Ca^{2+})/mg (aliquot) = c (H_2Y^{2-}) \times V (H_2Y^{2-}) \times M (Ca^{2+}) \times 1000$$

Množenjem dobivene mase s 20 dobijemo masu kalcija u uzorku:

$$m (Ca^{2+})/mg (uzorak) = m (Ca^{2+})/mg (aliquot) \times 20$$

Masu kalcija u tableti dobijemo iz sljedećeg omjera:

$$m (Ca^{2+})/mg (uzorak) : m (uzorak) = m (Ca^{2+})/mg (tableta) : m (tableta)$$

Srednja masa tablete izračuna se zbrajanjem masa 10 tableta i dijeljenjem s 10. U tablici 2 prikazane su mase tableta svakog pripravka, srednja masa tablete te standardna devijacija.

Tablica 2. Mase tableta dobivene vaganjem na analitičkoj vagi i srednja masa tablete

| Tableta | m (tablete) (g) | | | |
|--|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | Pripravak 1 | Pripravak 2 | Pripravak 3 | Pripravak 4 |
| 1 | 1,206 | 1,852 | 1,293 | 1,674 |
| 2 | 1,204 | 1,846 | 1,283 | 1,670 |
| 3 | 1,240 | 1,844 | 1,283 | 1,674 |
| 4 | 1,205 | 1,823 | 1,283 | 1,677 |
| 5 | 1,232 | 1,840 | 1,290 | 1,681 |
| 6 | 1,194 | 1,863 | 1,285 | 1,689 |
| 7 | 1,215 | 1,848 | 1,281 | 1,676 |
| 8 | 1,211 | 1,839 | 1,285 | 1,662 |
| 9 | 1,202 | 1,854 | 1,281 | 1,669 |
| 10 | 1,216 | 1,848 | 1,289 | 1,667 |
| Δm (tablete) (g) | 1,213 | 1,846 | 1,286 | 1,674 |
| SD | 0,0141 | 0,0106 | 0,0041 | 0,0076 |

Δm (tablete) – srednja masa tablete

SD – standardna devijacija

Kompleksometrijska titracija provodi se na alikvotu otopljenog uzorka. Za svaki pripravak uzimaju se po 3 alikvota od 25,00 mL, odnosno provode se 3 titracije. Utrošeni volumeni titracije prikazani su u tablici 3, a iz formule za masu kalcija u alikvotu iz njih je izračunata masa kalcija u titriranom volumenu od 25,00 mL. Srednja masa kalcija u alikvotu izračunata je kao aritmetička sredina masa kalcija dobivenih u tri titracije. Pritom vrijedi da je $c(\text{H}_2\text{Y}^{2-}) = 0,025 \text{ mmol/mL}$, a $M(\text{Ca}^{2+}) = 40,078 \text{ mg/mmol}$.

Tablica 3. Utrošeni volumeni titranta i mase kalcija određene u alikvotima

| Titracija | Pripravak 1 | Pripravak 2 | Pripravak 3 | Pripravak 4 |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| V (EDTA) (mL) 1 | 3,400 | 3,500 | 3,100 | 3,500 |
| V (EDTA) (mL) 2 | 3,350 | 3,400 | 3,050 | 3,550 |
| V (EDTA) (mL) 3 | 3,200 | 3,400 | 3,050 | 3,500 |
| m (Ca u alikvotu) 1 (mg) | 3,407 | 3,507 | 3,106 | 3,507 |
| m (Ca u alikvotu) 2 (mg) | 3,356 | 3,407 | 3,056 | 3,557 |
| m (Ca u alikvotu) 3 (mg) | 3,207 | 3,407 | 3,056 | 3,506 |
| Δm (Ca u alikvotu) (mg) | 3,323 | 3,440 | 3,073 | 3,524 |
| SD | 0,104 | 0,058 | 0,029 | 0,029 |

m (Ca u alikvotu) 1,2,3 – masa kalcija određena pojedinom titracijom

Δm (Ca u alikvotu) – srednja masa kalcija u alikvotu

SD – standardna devijacija

Množenjem srednje mase kalcija u alikvotu s 20 dobiva se masa kalcija u izvaganom uzorku tablete, iz čega pomoću omjera masa dobivamo sadržaj kalcija u tableti.

Tablica 4. Sadržaj kalcija u tabletama

| | Pripravak 1 | Pripravak 2 | Pripravak 3 | Pripravak 4 |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Δm (Ca u alikvotu) | 3,323 | 3,440 | 3,073 | 3,524 |
| m (uzorka) (mg) | 199,500 | 202,800 | 200,100 | 199,800 |
| m (Ca u uzorku) (mg) | 66,463 | 68,801 | 61,453 | 70,470 |
| m (Ca u tableti) (mg) | 403,940 | 626,160 | 394,730 | 590,390 |
| deklarirana m (Ca u tableti) (mg) | 400,436 | 600,000 | 400,000 | 600,000 |
| Eksperimentalno određen sadržaj u odnosu na deklarirani (%) | 100,860 | 104,360 | 98,680 | 98,400 |

4.2. Rezultati ispitivanja oslobađanja kalcija *in vitro* metodom s lopaticom

U tablici 5 nalaze se srednji utrošeni volumen titranta i pomoću njega izračunata srednja masa kalcija u alikvotu za pripravak 1. Ostali podaci o oslobađanju kalcija iz tableta pripravka 1 dobiveni izračunom iz prethodnih navedeni su u tablici 6.

Tablica 5. Srednji volumeni titranta i srednje mase kalcija određene u alikvotu pripravka 1

| t (min) | ΔV (EDTA) (mL) | SD | Δm (Ca u alikvotu) (mg) | SD |
|---------|------------------------|-------|---------------------------------|-------|
| 5 | 8,320 | 0,495 | 3,334 | 0,198 |
| 10 | 11,100 | 0,100 | 4,449 | 0,040 |
| 15 | 11,470 | 0,058 | 4,596 | 0,023 |
| 30 | 11,500 | 0,000 | 4,609 | 0,000 |
| 45 | 11,500 | 0,000 | 4,609 | 0,000 |
| 60 | 11,500 | 0,000 | 4,609 | 0,000 |
| 90 | 11,500 | 0,000 | 4,609 | 0,000 |

SD – standardna devijacija

ΔV (EDTA) – srednji volumen titranta

Δm (Ca u alikvotu) – srednja masa kalcija u alikvotu

Tablica 6. Srednja masa i srednja kumulativna masa oslobođenog kalcija u 900,00 mL i srednji udio kalcija oslobođenog iz tablete pripravka 1

| t (min) | ΔQ (mg) | SD | $\Delta Q'$ (mg) | SD | ΔQ_{exp} (%) | SD |
|---------|-----------------|--------|------------------|--------|-----------------------------|-------|
| 5 | 300,100 | 17,861 | 300,100 | 17,861 | 75,030 | 4,465 |
| 10 | 400,380 | 3,607 | 403,860 | 3,808 | 100,960 | 0,952 |
| 15 | 413,600 | 2,082 | 421,530 | 2,074 | 105,380 | 0,518 |
| 30 | 414,810 | 0,000 | 426,250 | 1,892 | 106,560 | 0,473 |
| 45 | 414,810 | 0,000 | 427,780 | 0,893 | 106,950 | 0,223 |
| 60 | 414,810 | 0,000 | 427,780 | 0,893 | 106,950 | 0,223 |
| 90 | 414,810 | 0,000 | 427,780 | 0,893 | 106,950 | 0,223 |

ΔQ – srednja masa oslobođenog kalcija u 900,00 mL

$\Delta Q'$ – srednja kumulativna masa oslobođenog kalcija do te vremenske točke, uključujući i nju

ΔQ_{exp} (%) – srednji udio kalcija oslobođenog iz tablete

SD – standardna devijacija

U tablici 7 nalaze se srednji utrošeni volumen titranta i pomoću njega izračunata srednja masa kalcija u alikvotu za pripravak 2, a ostali podaci dobiveni metodom disolucije za pripravak 2 nalaze se u tablici 8.

Tablica 7. Srednji volumeni titranta i srednje mase kalcija određene u alikvotu pripravka 2

| t (min) | ΔV (EDTA) (mL) | SD | Δm (Ca u alikvotu) (mg) | SD |
|---------|------------------------|-------|---------------------------------|-------|
| 5 | 14,090 | 0,345 | 5,646 | 0,138 |
| 10 | 16,100 | 0,173 | 6,453 | 0,069 |
| 15 | 16,500 | 0,100 | 6,613 | 0,040 |
| 30 | 16,830 | 0,416 | 6,746 | 0,167 |
| 45 | 16,800 | 0,436 | 6,733 | 0,175 |
| 60 | 17,030 | 0,252 | 6,827 | 0,101 |
| 90 | 17,170 | 0,153 | 6,880 | 0,061 |

SD – standardna devijacija

ΔV (EDTA) – srednji volumen titranta

Δm (Ca u alikvotu) – srednja masa kalcija u alikvotu

Tablica 8. Srednja masa i srednja kumulativna masa oslobođenog kalcija u 900,00 mL i srednji udio kalcija oslobođenog iz tablete pripravka 2

| t (min) | ΔQ (mg) | SD | $\Delta Q'$ (mg) | SD | ΔQ_{exp} (%) | SD |
|---------|-----------------|--------|------------------|--------|----------------------|-------|
| 5 | 508,110 | 12,439 | 508,110 | 12,439 | 84,680 | 2,073 |
| 10 | 580,730 | 6,247 | 586,380 | 6,377 | 97,730 | 1,063 |
| 15 | 595,160 | 3,607 | 607,260 | 3,804 | 101,21 | 0,634 |
| 30 | 607,180 | 15,017 | 625,890 | 15,228 | 104,320 | 2,538 |
| 45 | 605,980 | 15,723 | 631,440 | 16,113 | 105,240 | 2,685 |
| 60 | 614,400 | 9,077 | 653,410 | 9,700 | 108,900 | 1,617 |
| 90 | 619,210 | 5,510 | 652,580 | 5,971 | 108,760 | 0,995 |

ΔQ – srednja masa oslobođenog kalcija u 900,00 mL

$\Delta Q'$ – srednja kumulativna masa oslobođenog kalcija do te vremenske točke, uključujući i nju

ΔQ_{exp} (%) – srednji udio kalcija oslobođenog iz tablete

SD – standardna devijacija

U tablici 9 nalaze se srednji utrošeni volumen titranta i pomoću njega izračunata srednja masa kalcija u alikvotu za pripravak 3, a ostali podaci dobiveni metodom disolucije za pripravak 3 nalaze se u tablici 10.

Tablica 9. Srednji volumeni titranta i srednje mase kalcija određene u alikvotu pripravka 3

| t (min) | ΔV (EDTA) (mL) | SD | Δm (Ca u alikvotu) (mg) | SD |
|---------|------------------------|-------|---------------------------------|-------|
| 5 | 1,270 | 0,058 | 0,508 | 0,023 |
| 10 | 2,130 | 0,153 | 0,855 | 0,061 |
| 15 | 2,970 | 0,153 | 1,189 | 0,061 |
| 30 | 3,870 | 0,058 | 1,550 | 0,023 |
| 45 | 4,700 | 0,100 | 1,884 | 0,040 |
| 60 | 5,370 | 0,289 | 2,151 | 0,116 |
| 90 | 6,400 | 0,100 | 2,565 | 0,040 |

SD – standardna devijacija

ΔV (EDTA) – srednji volumen titranta

Δm (Ca u alikvotu) – srednja masa kalcija u alikvotu

Tablica 10. Srednja masa i srednja kumulativna masa oslobođenog kalcija u 900,00 mL i srednji udio kalcija oslobođenog iz tablete pripravka 3

| t (min) | ΔQ (mg) | SD | $\Delta Q'$ (mg) | SD | ΔQ_{exp} (%) | SD |
|---------|-----------------|--------|------------------|--------|----------------------|-------|
| 5 | 45,690 | 2,082 | 45,690 | 2,082 | 11,420 | 0,521 |
| 10 | 76,950 | 5,510 | 77,460 | 5,527 | 19,360 | 1,382 |
| 15 | 107,010 | 5,510 | 108,370 | 5,458 | 27,090 | 1,364 |
| 30 | 139,470 | 2,082 | 142,020 | 2,036 | 35,510 | 0,509 |
| 45 | 169,530 | 3,607 | 173,630 | 3,647 | 43,410 | 0,912 |
| 60 | 193,580 | 10,412 | 199,560 | 10,471 | 49,890 | 2,618 |
| 90 | 230,850 | 3,607 | 238,990 | 3,427 | 59,750 | 0,857 |

ΔQ – srednja masa oslobođenog kalcija u 900,00 mL

$\Delta Q'$ – srednja kumulativna masa oslobođenog kalcija do te vremenske točke, uključujući i nju

ΔQ_{exp} (%) – srednji udio kalcija oslobođenog iz tablete

SD – standardna devijacija

U tablici 11 nalaze se srednji utrošeni volumen titranta i pomoću njega izračunata srednja masa kalcija u alikvotu za pripravak 4, a ostali podaci dobiveni metodom disolucije za pripravak 4 nalaze se u tablici 12.

Tablica 11. Srednji volumeni titranta i srednje mase kalcija određene u alikvotu pripravka 4

| t (min) | ΔV (EDTA) (mL) | SD | Δm (Ca u alikvotu) (mg) | SD |
|---------|---------------------------|-------|------------------------------------|-------|
| 5 | 0,430 | 0,029 | 0,174 | 0,012 |
| 10 | 0,900 | 0,173 | 0,361 | 0,069 |
| 15 | 1,000 | 0,100 | 0,401 | 0,040 |
| 30 | 1,870 | 0,115 | 0,748 | 0,046 |
| 45 | 2,570 | 0,153 | 1,029 | 0,061 |
| 60 | 3,530 | 0,115 | 1,416 | 0,046 |
| 90 | 4,730 | 0,153 | 1,897 | 0,061 |

SD – standardna devijacija

ΔV (EDTA) – srednji volumen titranta

Δm (Ca u alikvotu) – srednja masa kalcija u alikvotu

Tablica 12. Srednja masa i srednja kumulativna masa oslobođenog kalcija u 900,00 mL i srednji udio kalcija oslobođenog iz tablete pripravka 4

| t (min) | ΔQ (mg) | SD | $\Delta Q'$ (mg) | SD | ΔQ_{exp} (%) | SD |
|---------|-----------------|-------|------------------|-------|----------------------|-------|
| 5 | 15,630 | 1,041 | 15,630 | 1,041 | 2,610 | 0,173 |
| 10 | 32,460 | 6,247 | 32,640 | 6,259 | 5,440 | 1,043 |
| 15 | 36,070 | 3,607 | 36,600 | 3,677 | 6,100 | 0,613 |
| 30 | 67,330 | 4,165 | 68,270 | 4,241 | 11,380 | 0,707 |
| 45 | 92,580 | 5,510 | 94,260 | 5,660 | 15,710 | 0,943 |
| 60 | 127,450 | 4,165 | 130,160 | 4,362 | 21,690 | 0,727 |
| 90 | 170,730 | 5,510 | 174,860 | 5,747 | 29,140 | 0,958 |

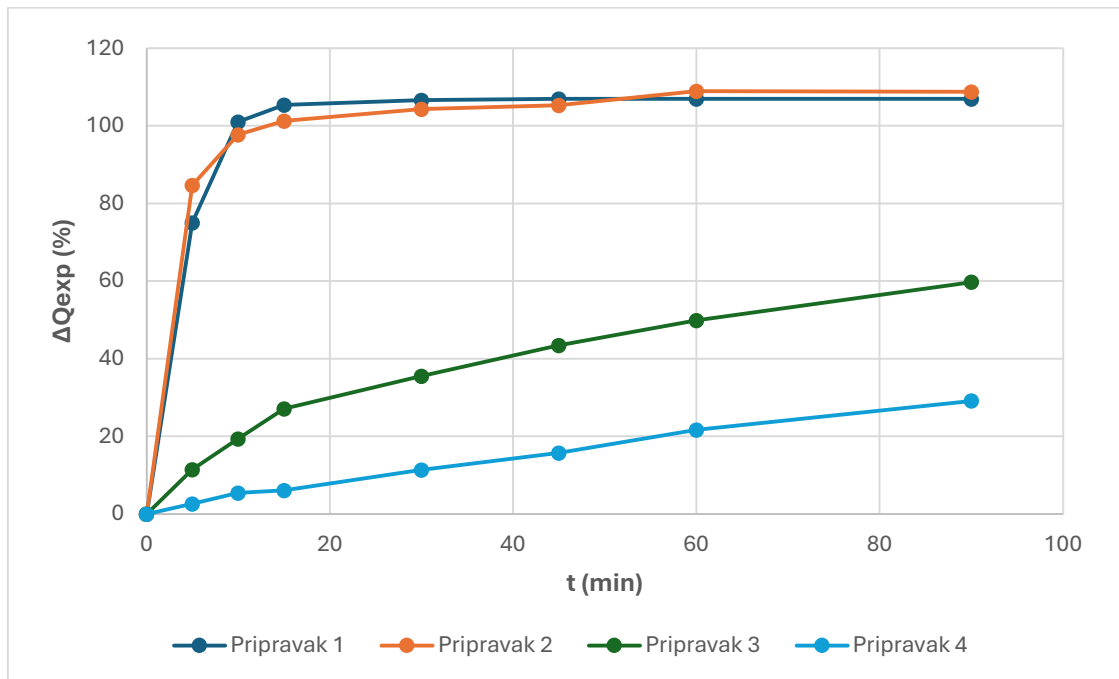
ΔQ – srednja masa oslobođenog kalcija u 900,00 mL

$\Delta Q'$ – srednja kumulativna masa oslobođenog kalcija do te vremenske točke, uključujući i nju

ΔQ_{exp} (%) – srednji udio kalcija oslobođenog iz tablete

SD – standardna devijacija

Grafički prikaz oslobađanja kalcija iz četiri ispitivana pripravka u vremenu trajanja disolucije (90 minuta) nalazi se na slici 9.



Slika 9. Krivulje oslobađanja kalcija iz ispitivanih pripravaka tijekom trajanja disolucije

5. RASPRAVA

Analiza rezultata dobivenih eksperimentalnim radom dovela je do podataka o količinama kalcija u ispitivanim pripravcima te razini njihove podudarnosti s deklariranim sadržajem. Također, dobiveni su podaci o oslobađanju kalcija iz 4 različita pripravka kalcijevog karbonata u obliku tableta, čije je oslobađanje ispitano metodom s lopaticom prema uvjetima propisanim za ispitivanje oslobađanja sadržaja prema USP.

Rezultati dobiveni ispitivanjem sadržaja kalcija kompleksometrijskom titracijom pokazuju visoku razinu podudarnosti sa sadržajem deklariranim od strane proizvođača za sva četiri pripravka. Zahtjev za sadržaj djelatne tvari u dozirnoj jedinici opisan je u Ph. Eur. (91) i prema njemu bi sadržaj u svakoj pojedinoj testiranoj tableti trebao biti između 85 i 115 % prosječnog sadržaja.

Pripravak 1, koji je registriran kao lijek u Republici Hrvatskoj, prema deklaraciji sadrži 1000 mg kalcijevog karbonata, što odgovara 400,436 mg kalcija. Odnos eksperimentalnog i deklariranog sadržaja u postotcima iznosi 100,86 %. Pripravak 2 prema deklaraciji sadrži 600 mg kalcija u obliku kalcijevog karbonata. Eksperimentom je dobiven sadržaj od 626,16 mg kalcija po tableti, što odgovara omjeru od 104,36 %. Za pripravak 3 deklarirani je sadržaj 400 mg kalcija, a eksperimentom dobiveni je 394,73 mg. Postotak podudarnosti za pripravak 3 je 98,68 %. Konačno, pripravak 4 prema deklaraciji sadrži 600 mg kalcija, a eksperimentom je određeno 590,39 mg; postotak podudarnosti za pripravak 4 iznosi 98,40 %.

Rezultati dobiveni metodom disolucije omogućili su usporedbu oslobađanja kalcija iz ispitivanih pripravaka koja je vidljiva na slici 9. Iz grafičkog prikaza jasno je vidljivo da pripravak 1 i pripravak 2 pokazuju znatno veće oslobađanje kalcija u odnosu na pripravak 3 i pripravak 4. Vizualno zapažanje, odnosno položaj krivulja koji do tog zaključka dovodi može se potvrditi i brojevima iz tablice 6, gdje je vidljivo da je već do kraja 10. minute oslobođena cjelokupna količina kalcija iz tablete pripravka 1, a kalcij iz pripravka 2 u potpunosti je oslobođen do 15. minute. Do završetka disolucije iz tablete pripravka 3 oslobođeno je 59,75 % ukupnog kalcija sadržanog u tableti te 29,14 % ukupnog kalcija sadržanog u tableti pripravka 4. Iz navedenog se može zaključiti da pripravci 1 i 2 odgovaraju zahtjevima Ph. Eur. za pripravke s trenutnim oslobađanjem koji kaže da se $\geq 80\%$ aktivne tvari mora osloboditi unutar prvih 30 minuta od početka disolucije. Za pripravak 3 i 4 isto nije utvrđeno ovim istraživanjem.

Navedeni rezultati pokazuju da je u organizmu najbrže i najpotpunije oslobađanje kalcija iz pripravka 1, a pritom je i odstupanje sadržaja od deklariranog minimalno, što opravdava njegov status lijeka. Tek malo iza njega po oslobađanju kalcija nalazi se pripravak 2. On pokazuje nešto veće odstupanje u sadržaju, ali to odstupanje ne prelazi granice

prihvatljivosti, osobito kada se uzme u obzir da se radi o pripravku koji je registriran kao dodatak prehrani, a ne kao lijek. Također, bitno je imati na umu i da pripravak 2 u jednoj tableti ima višu dozu kalcija od pripravka 1.

Pripravak 3 također pokazuje vrlo malo odstupanje u sadržaju kalcija (-1,32 %), ali značajno slabije oslobađanje kalcija pri uvjetima korištenim u ovom istraživanju u odnosu na prva dva pripravka. Isto vrijedi i za pripravak 4, a oslobađanje kalcija iz njega je gotovo dvostruko slabije nego iz pripravka 3. Opet je važno spomenuti i različit sadržaj kalcija po tableti koji je viši kod pripravka 4. I jedan i drugi imaju dodatak vitamina D koji povećava apsorpciju kalcija (25), a količina vitamina D u pripravku 3 (25 mcg) je pet puta veća od količine u pripravku 4 (5 mcg).

Jedno ispitivanje provedeno u Sjedinjenim Američkim Državama 2014. godine dalo je pažnje vrijedne rezultate o sadržaju kalcija u dodacima prehrani. Cilj ispitivanja bio je usporediti dvije metode – kompleksometrijsku titraciju i ionsku izmjenu u određivanju sadržaja kalcija u dva različita proizvođača tableta. Rezultati kompleksometrijske titracije, koja je korištena i u našem radu i kao takva nama bitna za usporedbu, pokazali su odstupanje od deklariranog sadržaja +3,49 % na uzorku jednog, odnosno +6,40 % na uzorku drugog proizvođača. Premda pripravci uključeni u ovo ispitivanje sadrže kalcij u obliku kalcijevog citrata, autori ispitivanja zaključno navode da ne vide razlog zbog kojeg ove iste metode ne bi pokazale jednako dobre rezultate i na kalcijevom laktatu i karbonatu (92).

Zanimljivo je spomenuti i jedno slično ispitivanje provedeno u Srbiji gdje je analiziran sadržaj kalcija u dodacima prehrani. U ispitivanje je bilo uključeno deset različitih pripravaka s kalcijem od kojih pet sadrži kalcijev karbonat. Metoda određivanja kalcija također je bila titracija s EDTA, a kao indikator korišten je mureksid. Udio kalcija u pripravcima s kalcijevim karbonatom iznosio je između 95,11 i 99,80 % teoretske vrijednosti. Glavnina tih pripravaka bile su šumeće tablete, ali za usporedbu s našim ispitivanjem mogu poslužiti tablete u kojima je kalcij u kombinaciji s vitaminom D. Odnos eksperimentom određenog sadržaja u njima u odnosu na teoretski iznosi 98,20 %, što je također usporedivo s našim rezultatima (93).

U ispitivanju oslobađanja kalcija *in vitro* zanimljivo je jedno istraživanje iz SAD-a. Predmet istraživanja bilo je 27 pripravaka s kalcijevim karbonatom, a svi uvjeti metode disolucije bili su iz USP, identični onima korištenim u našem ispitivanju. Nakon 30 minuta od početka disolucije, iz 5 pripravaka bilo je oslobođeno preko 75 % kalcija, iz 4 pripravka između 33 i 74 % kalcija, a iz preostalih 18 manje od 33 % kalcija. Po završetku disolucije, nakon 90 minuta, iz 17 (63 %) pripravaka oslobađanje kalcija bilo je manje od 50 %. Jedno od bitnih

zapažanja ovog ispitivanja je postojanje negativne korelacije između disolucije i mase pomoćnih tvari u tableti. Dakle, pomoćne tvari igraju važnu ulogu u određivanju oslobađanja kalcija iz ovih tableta (94). Promatrajući učinak mase pomoćnih tvari na oslobađanje kalcija iz pripravaka korištenih u našem ispitivanju vidimo da kod prva tri pripravka također postoji negativna korelacija između mase pomoćnih tvari i oslobađanja. Međutim, kod pripravka 4 vidimo veliko odstupanje – iako je pokazao najmanje oslobađanje kalcija u 90 minuta, ima i najmanji udio pomoćnih tvari od četiri ispitivana pripravka. Osim mase, utjecaja na oslobađanje kalcija može imati i vrsta pomoćnih tvari. U sastavu pripravka 3 kao pomoćna tvar nalazi se polivinilpirolidon-vinil acetat, hidrofilni polimerni nosač koji u tabletama služi za maskiranje neugodnih mirisa i okusa, zaštitu djelatnih tvari od vanjskih čimbenika te za postizanje kontroliranog oslobađanja djelatnih tvari. Upravo posljednje navedena uloga može biti potencijalni razlog slabijeg oslobađanja kalcija iz pripravka 3 (95). U pripravku 4 nalazi se polivinilni alkohol koji se u formulaciji lijekova također koristi za postizanje prikladnog profila oslobađanja djelatne tvari. Kao takav, polivinilni alkohol jedan je od mogućih uzroka nepovoljnog profila oslobađanja kalcija iz pripravka 4 u uvjetima u kojima je provedeno ispitivanje u ovom istraživanju (96).

U provođenju ovog ispitivanja postojala su određena ograničenja. Sam izbor pripravaka koji će se ispitivati bio je ograničen na tablete u kojima se kalcij nalazi u obliku kalcijevog karbonata. Pritom je važno bilo paziti i na ostale tvari sadržane u tabletama, zbog čega su isključene kombinacije kalcija s drugim dvovalentnim metalima poput magnezija koji bi mogli interferirati s metodom određivanja kalcija. Za razliku od toga, prisustvo vitamina D u kombinaciji s kalcijem nije predstavljalo rizik od sličnih interferencija pa tako tri od četiri ispitivana pripravka sadrže vitamin D. Ograničenja su prisutna i u provođenju metode disolucije. Korišten je isključivo jedan medij, odnosno 0,1 M klorovodična kiselina koja je propisani medij za ispitivanje oslobađanja kalcija iz tableta kalcijevog karbonata prema USP (90). Takav medij dovoljno vjerodostojno simulira želučanu tekućinu. Također, brzina vrtnje uvijek je bila podešena na 75 okretaja po minuti, a volumen disolucijskog medija iznosio je 900 mL. Međutim, u ovom istraživanju nije ispitan utjecaj promjene brzine okretaja u minuti na brzinu oslobađanja kalcija kao ni utjecaj promjene pH, a ni dodatak različitih surfaktanata koji se znaju koristiti pri razvoju metoda za oslobađanje, a koji mogu značajno mijenjati profile i brzinu oslobađanja djelatnih tvari. Također, u svrhu izrade diplomskog rada, u istraživanju su analizirana samo 4 pripravka s tržišta pa se dobiveni podatci ne mogu poopćiti.

6. ZAKLJUČCI

1. Svi ispitivani pripravci pokazuju zadovoljavajući sadržaj kalcija, s malim odstupanjima između eksperimentalnog i teoretskog (od -1,60 do +4,36 %), ali unutar raspona propisanog prema Ph. Eur.
2. Nije zabilježeno značajno različito odstupanje u sadržaju između pripravka koji je registriran kao lijek i pripravaka koji su registrirani kao dodaci prehrani.
3. Dva pripravka pokazala su potpuno oslobađanje kalcija u kratkom vremenskom periodu te su do kraja 15. minute pokazala potpuno oslobađanje u uvjetima u kojima je provedena disolucijska metoda, čime odgovaraju zahtjevima Ph. Eur. za pripravke s trenutnim oslobađanjem.
4. Pripravak 3 i 4 unutar 90 minuta pokazali su nepotpuno i značajno sporije oslobađanje kalcija u uvjetima u kojima je provedena disolucijska metoda.

7. LITERATURA

1. Weaver CM, Peacock M. Calcium. *Adv Nutr.* 2019;10:546-8.
2. Matikainen N, Pekkarinen T, Ryhänen EM, Schalin-Jääntti C. Physiology of Calcium Homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2021;50:575-90.
3. Power ML, Heaney RP, Kalkwarf HJ, Pitkin RM, Repke JT, Tsang RC i sur. The role of calcium in health and disease. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181:1560-9.
4. Szent-Györgyi AG. Calcium regulation of muscle contraction. *Biophys J.* 1975;15:707-23.
5. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija.* 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 79-80.
6. Gifondorwa DJ, Thompson TD, Wiley J, Culver AE, Shetler PK, Rocha GV, i sur. Vitamin D and/or calcium deficient diets may differentially affect muscle fiber neuromuscular junction innervation. *Muscle Nerve.* 2016;54:1120-32.
7. Muscle Contractions [Internet]. Wize Prep. 2022 [citirano 26. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://www.wizeprep.com/textbooks/undergrad/physiology/17078/sections/2331414>.
8. Carafoli E. The Intracellular Homeostasis of Calcium: An Overview. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;551:147-57.
9. Pivovarov NB, Andrews SB. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J.* 2010;277:3622-36.
10. DeCoster MA. Calcium dynamics in the central nervous system. *Adv Neuroimmunol.* 1995;5:233-9.
11. Garthwaite G, Hajós F, Garthwaite J. Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience.* 1986;18:437-47.
12. Baker PF. Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Prog Biophys Mol Biol.* 1972;24:177-223.
13. Ottolini M, Hong K, Sonkusare SK. Calcium signals that determine vascular resistance. *WIREs Syst Biol Med.* 2019;11:1448.

14. Amberg GC, Navedo MF. Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. *Microcirculation*. 2013;20:281-9.
15. Moosmang S. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J*. 2003;22:6027-34.
16. Miriel VA, Mauban JRH, Blaustein MP, Gil Wier W. Local and cellular Ca²⁺ transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J Physiol*. 1999;518:815-24.
17. Rossi A, Pizzo P, Filadi R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2019;1866:1068-78.
18. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476:341-5.
19. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 1983;306:67-9.
20. Walkon LL, Strubbe-Rivera JO, Bazil JN. Calcium Overload and Mitochondrial Metabolism. *Biomolecules*. 2022;12:1891.
21. Hüser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol*. 2000;524:415-22.
22. Dupont G, Combettes L, Bird GS, Putney JW. Calcium Oscillations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:a004226–a004226.
23. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 1013-1015.
24. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 1001-1002.
25. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 1002-1003.

26. Song L. Calcium and Bone Metabolism Indices. U: *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2017 [citirano 26. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242317300471>.
27. Arfat Y, Rani A, Jingping W, Hocart CH. Calcium homeostasis during hibernation and in mechanical environments disrupting calcium homeostasis. *J Comp Physiol B*. 2020;190:1-16.
28. Khazai N, Judd SE, Tangpricha V. Calcium and vitamin D: Skeletal and extraskeletal health. *Curr Rheumatol Rep*. 2008;10:110-7.
29. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. 1010-1012. str.
30. Felsenfeld AJ, Levine BS. Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten? *Clin Kidney J*. 2015;8:180-7.
31. Bushinsky DA, Monk RD. Calcium. *The Lancet*. 1998;352:306-11.
32. Fukagawa M, Kurokawa K. Calcium Homeostasis and Imbalance. *Nephron*. 2002;92:41-5.
33. Calcium Homeostasis and Hormonal Regulation [Internet]. *Basicmedical Key*. 2017 [citirano 26. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://basicmedicalkey.com/calcium-homeostasis-and-hormonal-regulation/>
34. Efthymiou C, Spyrtos D, Kontakiotis T. Endocrine paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Hormones*. 2018;17:351-8.
35. Alon US. The Effects of Diuretics on Mineral and Bone Metabolism. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2018;15:291-7.
36. Walker J. Diagnosis and management of patients with hypercalcaemia: Jennie Walker discusses the signs, symptoms and treatment of this common, yet potentially life-threatening, condition. *Nurs Older People*. 2015;27:22-6.
37. Carsote M, Nistor C. Forestalling Hungry Bone Syndrome after Parathyroidectomy in Patients with Primary and Renal Hyperparathyroidism. *Diagnostics*. 2023;13:1953.

38. Tsvetov G, Amitai O, Shochat T, Shimon I, Akirov A, Diker-Cohen T. Denosumab-induced hypocalcemia in patients with osteoporosis: can you know who will get low? *Osteoporos Int.* 2020;31:655-65.
39. Meesters K, Wassenberg T, Vanbesien J. Hypocalcemia as a Cause of Complex Febrile Seizures in a Toddler. *Case Rep Pediatr.* 2021;2021:1798741.
40. Dickerson R, Alexander K, Minard G, Croce M, Brown R. Accuracy of methods to estimate ionized and “corrected” serum calcium concentrations in critically ill multiple trauma patients receiving specialized nutrition support. *J Parenter Enter Nutr.* 2004;28:133-41.
41. Pepe J, Colangelo L, Biamonte F, Sonato C, Danese VC, Cecchetti V, i sur. Diagnosis and management of hypocalcemia. *Endocrine.* 2020;69:485-95.
42. Goujard C, Salenave S, Briot K, Chanson P, Grimon G, Kamenický P. Treating hypoparathyroidism with recombinant human parathyroid hormone (1–34): long-term safety concerns. *The Lancet.* 2020;395:1304.
43. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011 [citirano 26. rujna 2024.]. Dostupno na: <http://www.nap.edu/catalog/13050>.
44. Cormick G, Betrán AP, Metz F, Palacios C, Beltrán-Velazquez F, García-Casal MDLN, i sur. Regulatory and Policy-Related Aspects of Calcium Fortification of Foods. Implications for Implementing National Strategies of Calcium Fortification. *Nutrients.* 2020;12:1022.
45. Bsc SN, Gp Savage Bsc. Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pac J Clin Nutr.* 1999;8:64-74.
46. Straub DA. Calcium Supplementation in Clinical Practice: A Review of Forms, Doses, and Indications. *Nutr Clin Pract.* 2007;22:286-96.
47. Jorde R, Szumlas K, Haug E, Sundsfjord J. The effects of calcium supplementation to patients with primary hyperparathyroidism and a low calcium intake. *Eur J Nutr.* 2002;41:258-63.
48. Janelle KC, Barr SI. Nutrient Intakes and Eating Behavior see of Vegetarian and Nonvegetarian Women. *J Am Diet Assoc.* 1995;95:180-9.

49. Erfanian A, Rasti B, Manap Y. Comparing the calcium bioavailability from two types of nano-sized enriched milk using in-vivo assay. *Food Chem.* 2017;214:606-13.
50. Reinwald S, Weaver CM, Kester JJ. The Health Benefits of Calcium Citrate Malate: A Review of the Supporting Science. 2008;54:219-346.
51. Blumberg S. Is coral calcium a safe and effective supplement? *J Am Diet Assoc.* 2004;104:1335-6.
52. Kim M. Mercury, cadmium and arsenic contents of calcium dietary supplements. *Food Addit Contam.* 2004;21:763-7.
53. Harvey JA, Zobitz MM, Pak CYC. Dose dependency of calcium absorption: A comparison of calcium carbonate and calcium citrate. *J Bone Miner Res.* 1988;3:253-8.
54. Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *The Lancet.* 2007;370:657-66.
55. Li Z, Wang W, Xin X, Song X, Zhang D. Association of total zinc, iron, copper and selenium intakes with depression in the US adults. *J Affect Disord.* 2018;228:68-74.
56. Morais JBS, Severo JS, De Alencar GRR, De Oliveira ARS, Cruz KJC, Marreiro DDN, i sur. Effect of magnesium supplementation on insulin resistance in humans: A systematic review. *Nutrition.* 2017;38:54-60.
57. Wienecke E, Nolden C. Langzeit-HRV-Analyse zeigt Stressreduktion durch Magnesiumzufuhr. *MMW - Fortschritte Med.* 2016;158:12-6.
58. Uwitonze AM, Razzaque MS. Role of Magnesium in Vitamin D Activation and Function. *J Am Osteopath Assoc.* 2018;118:181-9.
59. Naghii MR, Torkaman G, Mofid M. Effects of boron and calcium supplementation on mechanical properties of bone in rats. *BioFactors.* 2006;28:195-201.
60. Hade JE, Spiro HM. Calcium and Acid Rebound: A Reappraisal. *J Clin Gastroenterol.* 1992;15:37-44.

61. Xiao Q, Murphy RA, Houston DK, Harris TB, Chow WH, Park Y. Dietary and Supplemental Calcium Intake and Cardiovascular Disease Mortality: The National Institutes of Health–AARP Diet and Health Study. *JAMA Intern Med.* 2013;173:639-46.
62. Di Iorio B, Bellasi A, Russo D. Mortality in Kidney Disease Patients Treated with Phosphate Binders: A Randomized Study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7:487-93.
63. Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN, Mason B, Horne A, Ames R, i sur. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomised controlled trial. *BMJ.* 2008;336:262-6.
64. Patel A, Adeseun G, Goldfarb S. Calcium-Alkali Syndrome in the Modern Era. *Nutrients.* 2013;5:4880-93.
65. Worcester EM, Coe FL. Calcium Kidney Stones. *N Engl J Med.* 2010;363:954-63.
66. Pentti K, Tuppurainen MT, Honkanen R, Sandini L, Kröger H, Alhava E, i sur. Use of calcium supplements and the risk of coronary heart disease in 52–62-year-old women: The Kuopio Osteoporosis Risk Factor and Prevention Study. *Maturitas.* 2009;63:73-8.
67. Ca-C 1000 Calvive šumeće tablete [Internet]. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. 2024 [citirano 26. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Ca-C-1000-Calvive-sumece-tablete/15272/>.
68. Lönnerdal B. Calcium and Iron Absorption - Mechanisms and Public Health Relevance. *Int J Vitam Nutr Res.* 2010;80:293-9.
69. Sellmeyer DE, Schloetter M, Sebastian A. Potassium Citrate Prevents Increased Urine Calcium Excretion and Bone Resorption Induced by a High Sodium Chloride Diet. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2008-12.
70. Matkovic V, Heaney R. Calcium balance during human growth: evidence for threshold behavior. *Am J Clin Nutr.* 1992;55:992-6.
71. Siris ES, Chen YT, Abbott TA, Barrett-Connor E, Miller PD, Wehren LE, i sur. Bone Mineral Density Thresholds for Pharmacological Intervention to Prevent Fractures. *Arch Intern Med.* 2004;164:1108.

72. Martin SR. Equilibrium and kinetic studies on the interaction of tetracyclines with calcium and magnesium. *Biophys Chem.* 1979;10:319-26.
73. Ringe JD, Van Der Geest SAP, Möller G. Importance of Calcium Co-Medication in Bisphosphonate Therapy of Osteoporosis: An Approach to Improving Correct Intake and Drug Adherence. *Drugs Aging.* 2006;23:569-78.
74. Song I, Borland J, Arya N, Wynne B, Piscitelli S. Pharmacokinetics of dolutegravir when administered with mineral supplements in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol.* 2015;55:490-6.
75. Levine M, Nikkanen H, Pallin DJ. The Effects of Intravenous Calcium in Patients with Digoxin Toxicity. *J Emerg Med.* 2011;40:41-6.
76. Gallagher JC, Riggs BL, Deluca HF. Effect of Estrogen on Calcium Absorption and Serum Vitamin D Metabolites in Postmenopausal Osteoporosis*. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:1359-64.
77. Griebeler ML, Kearns AE, Ryu E, Thapa P, Hathcock MA, Melton LJ, i sur. Thiazide-Associated Hypercalcemia: Incidence and Association With Primary Hyperparathyroidism Over Two Decades. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101:1166-73.
78. Thompson WG, Thompson GR. Effect of cholestyramine on the absorption of vitamin D3 and calcium. *Gut.* 1969;10:717-22.
79. Lex TR, Rodriguez JD, Zhang L, Jiang W, Gao Z. Development of In Vitro Dissolution Testing Methods to Simulate Fed Conditions for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. *AAPS J.* 2022;24:40.
80. Allen LV, McPherson TB. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 12. izdanje. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2023. str. 174-214.
81. Taylor K, Aulton ME, urednici. Aulton's Pharmaceutics: the design and manufacture of medicines. 6. izdanje. London: Elsevier Health Sciences; 2022. str. 14-15.
82. European pharmacopoeia. 6. izdanje. Strasbourg: Council of Europe; 2007. str. 263-275.

83. Apparatus 1 - The Rotating Basket [Internet]. Lab Hut. 2024 [citirano 26. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/apparatus-1-rotating-basket.html>.
84. Apparatus 2 - Rotating Paddle [Internet]. Lab Hut. 2024 [citirano 26. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/apparatus-2-paddle-test.html>.
85. Radić N, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 264-301.
86. Complexation Titrations [Internet]. LibreTexts. 2019 [citirano 26. rujna 2024.]. Dostupno na: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)/09%3A_Titrimetric_Methods/9.03%3A_Complexation_Titrations](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/09%3A_Titrimetric_Methods/9.03%3A_Complexation_Titrations).
87. Patton James, Reeder Wendell. New Indicator for Titration of Calcium with (Ethylenedinitrilo) Tetraacetate. *Anal Chem.* 1956.;28:1026-8.
88. European pharmacopoeia. 6. izdanje. Strasbourg: Council of Europe; 2007. 441. str.
89. European pharmacopoeia. 6. izdanje. Strasbourg: Council of Europe; 2007. 408. str.
90. The United States pharmacopoeia. 24. izd. Rockville, Md: United States Pharmacopoeial Convention; 2000. 2569 str.
91. European pharmacopoeia. 6. izdanje. Strasbourg: Council of Europe; 2007. 310. str.
92. Garvey SL, Shahmohammadi G, McLain DR, Dietz ML. Determination of Calcium in Dietary Supplements: Statistical Comparison of Methods in the Analytical Laboratory. *J Chem Educ.* 2015;92:167-9.
93. Marjanović-Balaban Ž, Antunović V, Jelić D, Živković T. Determination of calcium content in dietary supplements. *Hrana U Zdr Boles.* 2015;4. izdanje:28-33.
94. Brennan MJ, Duncan WE, Wartofsky L, Butler VM, Wray HL. In vitro dissolution of calcium carbonate preparations. *Calcif Tissue Int.* 1991;49:308-12.
95. Franco P, De Marco I. The Use of Poly(N-vinyl pyrrolidone) in the Delivery of Drugs: A Review. *Polymers.* 2020;12:1114.

96. Couți N, Porfire A, Iovanov R, Crișan AG, Iurian S, Casian T, i sur. Polyvinyl Alcohol, a Versatile Excipient for Pharmaceutical 3D Printing. *Polymers*. 2024;16:517.

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti sadržaj kalcija u nekoliko različitih oralnih pripravaka koji su dostupni na hrvatskom tržištu te ispitati kako se kalcij iz navedenih pripravaka oslobađa u mediju koji simulira uvjete prisutne u želučanom mediju.

Materijali i metode: Ispitivanjem su obuhvaćena 4 pripravka u obliku tableta s kalcijevim karbonatom. Jedan pripravak registriran je kao lijek i nalazi se u receptnom načinu izdavanja, dok su ostala tri pripravka dodatci prehrani koji se nalaze u slobodnoj prodaji. U laboratorijskom radu za ispitivanje navedenih pripravaka korištene su metoda određivanja kalcija kompleksometrijskom titracijom i metoda oslobađanja lijeka *in vitro* (disolucijska metoda s lopaticom) kako bi se ispitali sadržaj i oslobađanje kalcija iz izabranih pripravaka. Uvjeti korišteni za disoluciju propisani su u USP za tablete kalcijevog karbonata, a to su 0,1 M klorovodična kiselina kao medij, brzina vrtnje od 75 okretaja po minuti, temperatura od $37 \pm 0,5$ °C i vrijeme trajanja od 90 minuta.

Rezultati: Svi pripravci uključeni u istraživanje pokazali su zadovoljavajuće rezultate kod određivanja sadržaja, s malim odstupanjima od deklarirane količine kalcija (od -1,60 % do +4,36 %). Za razliku od toga, rezultati ispitivanja oslobađanja kalcija *in vitro* bili su raznoliki. Dva pripravka pokazala su jako brzo i potpuno oslobađanje kalcija, dok su ostala dva pokazala značajno manje razine oslobađanja kalcija unutar promatranog vremena.

Zaključak: Ispitani pripravci u obliku tableta s kalcijevim karbonatom pokazali su da im se deklarirani sadržaj, neovisno o režimu izdavanja, nalazi unutar raspona koji su propisani prema smjernicama u Ph. Eur. Na tržištu postoji cijeli niz pripravaka s kalcijem koji se međusobno razlikuju po dozi kalcija, kemijskom obliku u kojem se kalcij nalazi, farmaceutskoj formulaciji pripravka, pomoćnim tvarima ili pak drugim djelatnim tvarima, ukoliko se radi o kombiniranom pripravku. Zbog velike raznolikosti pripravaka, rezultati dobiveni u ovom ispitivanju ne mogu se generalizirati na sve pripravke s kalcijem koji su dostupni na tržištu. Međutim, može se zaključiti da iako sadržajno nema značajnih odstupanja između ispitivanih pripravaka, njihovo oslobađanje *in vitro* prema uvjetima propisanim u USP značajno se međusobno razlikuje, pri čemu samo jedan ispitanii dodatak prehrani s kalcijevim karbonatom pokazuje sličnost s pripravkom registriranim kao lijek.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Examination of content and *in vitro* release of calcium from oral pharmaceutical forms registered in Republic of Croatia

Objectives: The aim of this research was to determine the calcium content of several different oral preparations that are available on the Croatian market and to examine how calcium is released from the mentioned products in a medium that simulates the gastric medium.

Material and methods: The test included 4 preparations in the form of tablets with calcium carbonate. One preparation is registered as a medicinal product and is available by prescription, while the other three preparations are dietary supplements available over the counter. In the laboratory work for testing the mentioned preparations, the calcium determination method by complexometric titration and the *in vitro* drug release method (dissolution method with a spatula) were used to test the content and release of calcium from the selected preparations. The conditions used for dissolution were prescribed in the USP for calcium carbonate tablets, namely 0.1 M hydrochloric acid as medium, a rotation speed of 75 revolutions per minute, a temperature of 37 ± 0.5 °C and a duration of 90 minutes.

Results: All preparations included in the research showed satisfactory results when determining the content, with small deviations from the declared amount of calcium (from -1.60% to +4.36%). In contrast, results from *in vitro* calcium release assays were mixed. Two preparations showed a very fast and complete release of calcium, while the other two showed significantly lower levels of calcium release within the observed time.

Conclusion: The tested preparations in the form of calcium carbonate tablets showed that their declared content, regardless of the dispensing regime, was within the range prescribed according to the guidelines in the Ph. Eur. There is a whole range of preparations with calcium on the market, which differ from each other in terms of the dose of calcium, the chemical form in which the calcium is found, the pharmaceutical formulation of the preparation, auxiliary substances or other active substances, if it is a combined preparation. Due to the wide variety of preparations, the results obtained in this trial cannot be generalized to all calcium preparations available on the market. However, it can be concluded that although there are no significant differences between the tested preparations in terms of content, their release *in vitro* according to the conditions prescribed in the USP differs significantly from each other, with only one tested dietary supplement with calcium carbonate showing similarity with the preparation registered as a drug.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:**Obrazovanje:**

- Prva osnovna škola Široki Brijeg (2007.-2015.)
- Gimnazija fra Dominika Mandića, Široki Brijeg – opći smjer (2015.-2019.)
- Medicinski i Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Integrirani studij farmacije (2019. – 2024.)

Radno iskustvo:

- Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko – dalmatinske županije (veljača 2024. – kolovoz 2024.)

Aktivnosti:

- Volonter: Plivina škola ljekarničke skrbi u Splitu (2024.)

Priznanja i nagrade:

- Dekanova nagrada (lipanj 2022.)

Posebne vještine:

- Rad na računalu: Microsoft office, Eskulap 2000
- Položen vozački ispit B kategorije
- Strani jezici: engleski