

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

---

**Žanetić, Mario Branko**

**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:171:041615>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-30**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Mario Branko Žanetić**

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

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin**

**Split, listopad 2024.**

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 ŽELJEZA IZ ORALNIH FARMACEUTSKIH OBLIKA REGISTRIRANIH U REPUBLICI HRVATSKOJ

Mario Branko Žanetić, broj indeksa: 201930

### Sažetak

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je analizirati sadržaj željeza u četiri oralna pripravka dostupna na hrvatskom tržištu te ispitati oslobađanje željeza iz tih pripravaka u mediju koji simulira želučanu sredinu.

**Materijali i metode:** Ispitivanjem su obuhvaćena četiri pripravka koja sadrže željezo u tri različita oblika. Jedan pripravak je registriran kao lijek i sadrži željezov (II) fumarat u obliku kapsule. Ostala tri pripravka su dodaci prehrani dostupni u slobodnoj prodaji. Od tih pripravaka, dva sadrže željezov bisglicinat u kapsulama, dok jedan sadrži željezov glukonat u obliku tablete. Za kvantifikaciju željeza korištena je spektrofotometrijska metoda, dok je za *in vitro* ispitivanje oslobađanja željeza primijenjena aparatura s košaricom (Aparatura 1). Korišteni uvjeti za disoluciju uključivali su 900 mL 0,1 M klorovodične kiseline kao medij, brzinu vrtnje od 100 okretaja po minuti, temperaturu od  $37 \pm 0,5$  °C u trajanju od 120 minuta.

**Rezultati:** Pripravci uključeni u istraživanje pokazali su raznolike rezultate kod određivanja sadržaja željeza. Receptni pripravak pokazao je visoku podudarnost s deklariranim sadržajem, dok su ostali pripravci odstupali u različitoj mjeri. Dva pripravka su sadržavala više željeza od deklariranog (oko +13%), dok je jedan imao manje (-7,2%). Kod *in vitro* ispitivanja oslobađanja željeza tri pripravka su postigla potpuno oslobađanje željeza tijekom trajanja disolucije, dok je jedan pripravak pokazao značajno slabije oslobađanje unutar promatranog vremena.

**Ključne riječi:** Ispitani pripravci željeza pokazali su da deklarirani sadržaj varira ovisno o režimu izdavanja, budući da je od tri dodatka prehrane samo jedan bio unutar smjernica Ph. Eur. Na tržištu postoji veliki broj pripravaka s željezom koji se međusobno razlikuju po kemijskom obliku željeza, dozi i formulaciji pripravka. Također postoje i kombinirani pripravci sa željezom koji sadrže dodatne vitamine i minerale. Upravo zbog ovako velike raznolikosti, rezultati koji su dobiveni u ovom ispitivanju se ne mogu generalizirati na sve pripravke željeza koji su dostupni na tržištu. Međutim, može se uočiti da postoji odstupanje u sadržaju između ispitivanih pripravaka. Nijedan od testiranih dodataka prehrani nije pokazao usklađenost s deklariranim sadržajem u istoj mjeri kao pripravak registriran kao lijek. Postavljeni uvjeti disolucije nisu bili optimalni za otapanje receptnog pripravka dok su svi ispitani dodaci prehrane postigli potpuno oslobađanje željeza i ispunili zahtjeve farmakopeje za pripravke s trenutnim oslobađanjem.

**Ključne riječi:** željezo, sadržaj, oslobađanje, disolucija

**Rad sadrži:** 66 stranica, 14 tablica, 12 slika i 73 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. doc. dr. sc. Dario Leskur, predsjednik
2. doc. dr. sc. Diana Gujinović, član
3. doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin, član - mentor

**Datum obrane:** 29. 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 IRON FROM ORAL PHARMACEUTICAL FORMS REGISTERED IN REPUBLIC OF CROATIA**

Mario Branko Žanetić, broj indeksa: 201930

**Summary:** Examination of content and *in vitro* release of iron from oral pharmaceutical forms registered in Republic of Croatia

**Objectives:** The aim of this study was to analyze the iron content in four oral preparations available on the Croatian market and to examine the release of iron from these preparations in a medium that simulates the gastric environment.

**Materials and methods:** The study included four preparations containing iron in three different forms. One preparation is a prescription drug containing iron fumarate in capsule form. The other three are dietary supplements available over-the-counter. Of these, two contain iron bisglycinate in capsules, while one contains iron gluconate in tablet form. A spectrophotometric method was used for the quantification of iron, and a basket apparatus (Apparatus 1) was used for testing *in vitro* dissolution. The dissolution conditions included 900 mL of 0.1 M hydrochloric acid as the medium, a rotation speed of 100 rpm, and a temperature of  $37 \pm 0.5$  °C over a period of 120 minutes.

**Results:** The preparations included in the study showed varying results in terms of iron content. The prescription preparation demonstrated a high level of consistency with the declared iron content, while the other preparations deviated to different extents. Two preparations contained more iron than declared (around +13%), while one had less (-7.2%). In the *in vitro* iron release testing, three preparations achieved complete iron release during the dissolution period, while one preparation exhibited significantly slower release within the observed timeframe.

**Conclusion:** The tested iron preparations exhibited variability in their declared content depending on the dispensing regime, with only one of the three dietary supplements complying with Ph. Eur. guidelines. There is a wide variety of iron products on the market that differ in terms of the chemical form of iron, dosage, and formulation. Additionally, combination products containing iron along with other vitamins and minerals are also available. Due to this diversity, the results obtained in this study cannot be generalized to all iron preparations available on the market. However, discrepancies in iron content were observed among the tested preparations. None of the dietary supplements demonstrated the same level of consistency with the declared content as the prescription drug. The dissolution conditions used were not optimal for the prescription preparation, whereas all the tested dietary supplements achieved complete iron release and met the pharmacopeial requirements for immediate-release preparations.

**Key words:** iron, content, release, dissolution

**Thesis contains** 66 pages, 12 pictures, 14 tables and 73 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

1. Asst. Prof. Dario Leskur, MPharm, PhD, **chair person**
2. Asst. Prof. Diana Gujinović, MPharm, PhD, **member**
3. Asst. Prof. Ana Šešelja Perišin, MPharm, PhD, **member - supervisor**

**Defense date:** 29<sup>th</sup> October 2024.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of School of Medicine Split, Šotlanska 2a.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Uloga željeza u organizmu .....	2
1.1.1. Prijenos kisika .....	2
1.1.2. Biokemija .....	4
1.2. Raspodjela željeza u organizmu .....	4
1.2.1. Homeostaza željeza .....	5
1.3. Manjak željeza.....	8
1.3.1. Faze manjka željeza.....	9
1.3.2. Uzroci manjka željeza .....	10
1.3.3. Anemije .....	11
1.4. Suplementacija željeza .....	11
1.4.1. Indikacije za primjenu pripravaka željeza.....	12
1.4.2. Oblici preparata željeza dostupni na tržištu .....	13
1.4.3. Oralni pripravci željeza .....	13
1.4.4. Kombinirani pripravci željeza .....	15
1.4.5. Nuspojave oralnih preparata željeza.....	16
1.4.6. Interakcije željeza s drugim tvarima .....	18
1.5. Ispitivanje oslobađanja lijeka <i>in vitro</i> .....	19
1.5.1. Aparati i mediji za disoluciju.....	20
1.6. Spektrofotometrijska analiza željeza.....	24
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	26
3. MATERIJALI I METODE .....	28
3.1. Materijali .....	29
3.1.1. Kemikalije .....	29
3.1.2. Aparatura .....	29

3.1.3. Uzorci koji su analizirani .....	29
3.2. Metode.....	30
3.2.1. Princip metode određivanja željeza u uzorcima.....	30
3.2.2. Priprema otopina .....	31
3.2.3. Postupak mjerenja .....	34
3.2.4. Priprema uzorka za određivanje sadržaja željeza.....	34
3.2.5. Postupak određivanja sadržaja željeza u uzorcima .....	35
3.2.6. Metoda disolucije .....	35
4. REZULTATI .....	37
4.1. Baždarni pravac.....	38
4.2. Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) .....	39
4.3. Rezultati određivanja sadržaja spektrofotometrijom.....	39
4.4. Rezultati ispitivanja oslobađanja željeza metodom disolucije.....	42
5. RASPRAVA.....	48
6. ZAKLJUČCI.....	52
7. LITERATURA .....	54
8. SAŽETAK.....	61
9. SUMMARY .....	63
10. ŽIVOTOPIS .....	65

## **Zahvala**

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Ani Šešelji Perišin, na pomoći, smjernicama i prenesenom znanju tijekom izrade ovog diplomskog rada i cijelog studija.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji na neprestanoj podršci i motivaciji od početka mog školovanja.*

*Također, želim izraziti zahvalnost prijateljima s kojima sam prošao kroz sve prepreke na ovom studiju i koji su nesebično pomagali u svim nevoljama.*

## POPIS KRATICA

DCYTB1 - duodenalne citokrom b reduktaze 1

DMT1 - bivalentni prijenosnik metala (engl. *divalent metal transporter 1*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

EMA - Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

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

GI - gastrointestinalni

Hb - hemoglobin

HCP1 - proteinski nosač hema 1 (engl. *heme carrier protein 1*)

HH - nasljedna hemokromatoza

HO - hem oksidaze

IDA - anemija zbog manjka željeza

IPC - kompleks željezo polimaltoza

LOAEL - najniža razina opaženog štetnog učinka

LOD - granica dokazivanja

LOQ - granica određivanja

MCV - srednji volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NTBI - neprotein vezano željezo (engl. *non-transferrin bound iron*)

OTC - bezreceptni lijekovi

Ph. Eur. - Europska farmakopeja

PSH - prosječni stanični hemoglobin

PSKH - prosječna stanična koncentracija hemoglobina

PSV - prosječni stanični volumen



QC - kontrola kvalitete (engl. *quality control*)

RNA - ribonukleinska kiselina

ROS - reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

SmPC - sažetak opisa svojstava lijeka (engl. *summary of product characteristics*)

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

TF - transferin

TfR1 i TfR2 - receptori za transferin

USP - Američka farmakopeja (engl. *United States Pharmacopeia*)

## **1. UVOD**

## 1.1. Uloga željeza u organizmu

Željezo (Fe) je esencijalni element uključen u širok raspon biološki važnih reakcija nužnih za staničnu funkciju, a također igra temeljnu ulogu u prijenosu kisika. Iako je četvrti najzastupljeniji element u Zemljinoj kori, bioraspoloživost željeza je vrlo niska i unatoč niskim dnevnim potrebama, nedostatak željeza je najčešći prehrambeni poremećaj u svijetu (1).

Biološke funkcije željeza temelje se na njegovim kemijskim svojstvima, a to su sposobnost da formira različite koordinacijske komplekse s organskim ligandima te povoljan redoks potencijal koji omogućuje prebacivanje između fero ( $\text{Fe}^{3+}$ ) i feri ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oblika (2).

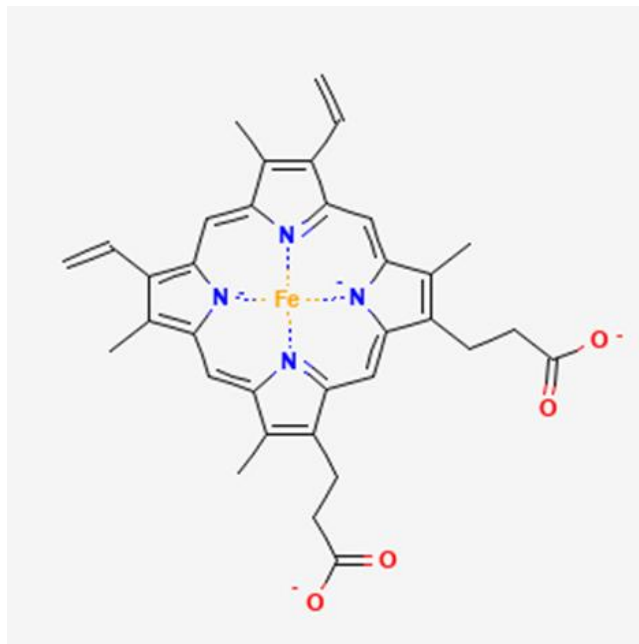
Nezamjenjivost željeza za žive organizme očituje se činjenicom da ono služi kao kofaktor za nekoliko hemoproteina i nehem proteina koji sadrže željezo, uključujući mnoge enzime. Oko dvije trećine ukupnog sadržaja željeza u tijelu vezano je za hemoproteine, uglavnom hemoglobin i mioglobin. Hemoproteini su uključeni u brojne biološke funkcije kao što su vezanje i transport kisika (hemoglobini), metabolizam kisika (katalaze, peroksidaze), stanično disanje i transport elektrona (citokromi). Nehemski proteini ovisni o željezu uključuju enzime mitohondrijskog energetskog metabolizma (kao što je mitohondrijska akonitaza ili Fe-S kompleksi koji su dio lanca prijenosa elektrona) i enzime sinteze DNA (kao što je ribonukleotidreduktaza). Željezo je dakle neophodno za fizičko funkcioniranje i dobrobit (3,4).

### 1.1.1. Prijenos kisika

Hemoglobin i mioglobin su hemske proteini koji omogućavaju opskrbu kisikom. Hemoglobin (Hb) je tetramerni protein eritrocita koji prenosi kisik do perifernih organa i tkiva te preuzima ugljikov dioksid kojeg zatim prenosi do pluća gdje se izdiše. Kisik ( $\text{O}_2$ ) koji se oslobađa u tkivima iz hemoglobina koristi se u oksidativnom metabolizmu. Hemoglobin služi kao međuskladište kisika u mišićnim stanicama i osigurava rezervu kisika za kratkotrajnu mišićnu aktivnost. Mioglobin je monomerni protein crvenih mišićnih vlakana koji skladišti kisik kao zalihu u slučaju nedostatka kisika (5,6).

Mioglobin i hemoglobin sadržavaju hem, ciklički tetrapirrol koji se sastoji od četiri pirolna prstena. Jedan ion dvovalentnog željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nalazi se u središtu hema (planarnog tetrapirola), što je vidljivo na slici 1 (5). Kada se svaka molekula hema poveže s polipeptidnim lancem, poznatim kao globin, formira se podjedinica hemoglobina nazvana hemoglobinski la-

nac. Hemoglobin se sastoji od četiri hemoglobinska lanca od kojih svaki ima hem kao prostetičku skupinu. Budući da svaki hem sadrži po jedan atom željeza, svaka molekula Hb sadrži ukupno četiri atoma željeza. Hem može prenositi jednu molekulu  $O_2$  koja se veže reverzibilno za  $Fe^{3+}$  i za histidinske ostatke u globinskom lancu. Svaka molekula hemoglobina stoga može prenijeti sveukupno 4 molekule  $O_2$ . Kisik se labavo i reverzibilno veže za Hb što je osnova prijenosa kisika (7,8).



**Slika 1.** Struktura hema (9).

U ljudi je eritropoeza biološki proces s najvećom potrebom za atomima željeza zbog njegove potrebe za sintezom hema i kasnijom ugradnjom u molekule hemoglobina. Cirkulirajući eritrociti sastoje se uglavnom od hemoglobina koji sadrži četiri skupine hema koji se privremeno vežu na molekule kisika u plućima i otpuštaju ih po cijelom tijelu. Eritrocite koji su pri kraju životnog vijeka fagocitirani će makrofazi te željezo onda postaje dostupno za ponovnu upotrebu. Posljedično, organizam iz prehrane treba apsorbirati samo onu količinu željeza koja je strogo potrebna za prevladavanje nespecifičnih gubitaka željeza u tijelu (2).

### 1.1.2. Biokemija

Željezo je prijelazni element koji postoji u dva biološki važna oblika: reduciranom ferri obliku (divalentno,  $\text{Fe}^{2+}$ ) i oksidiranom fero obliku (trivalentno,  $\text{Fe}^{3+}$ ). Željezo je učinkovit katalizator za prijenos elektrona i reakcije slobodnih radikala što također znači da je "slobodno željezo" (tj. željezo koje nije vezano za proteine ili druge organske molekule) potencijalno toksično i da organizmi moraju smanjiti svoju izloženost njemu (6). Redoks potencijal željeza predstavlja temelj njegove toksičnosti. Redukcija molekule kisika ( $\text{O}_2$ ) prijenosom jednog elektrona na Fe (II) dovodi do formiranja superoksidnog aniona, što potom pokreće niz Haber-Weis-Fentonovih reakcija. Ove reakcije rezultiraju stvaranjem ROS-a (engl. *reactive oxygen species*, reaktivne vrste kisika) koji je štetan za stanice. Hidroksilni radikal, koji je jedan od najjačih oksidansa u organizmu, odgovoran je za napad na proteine, nukleinske kiseline, ugljikohidrate i lipide (10). Organizam je razvio mehanizme zaštite za sprječavanje toksičnosti slobodnog željeza. Ova zaštita od izloženosti ovisi o proteinima koji su posebno uključeni u njegov unos iz prehrane i prijenos u sustavnu cirkulaciju, njegov transport po tijelu i skladištenje u tkivima, kao i njegovu dostavu do funkcionalnih mjesta (6,10). Proteini koji sadrže željezo prenose ili pohranjuju kisik (npr. hemoglobin ili mioglobin); kataliziraju metaboličke, signalne i antimikrobne redoks reakcije (npr. citokrome, ribonukleotid reduktazu, dušikov oksid sintazu, NADPH oksidazu, mijeloperoksidazu); skladište i transportiraju željezo (npr. transferin, laktoferin ili feritin) (11).

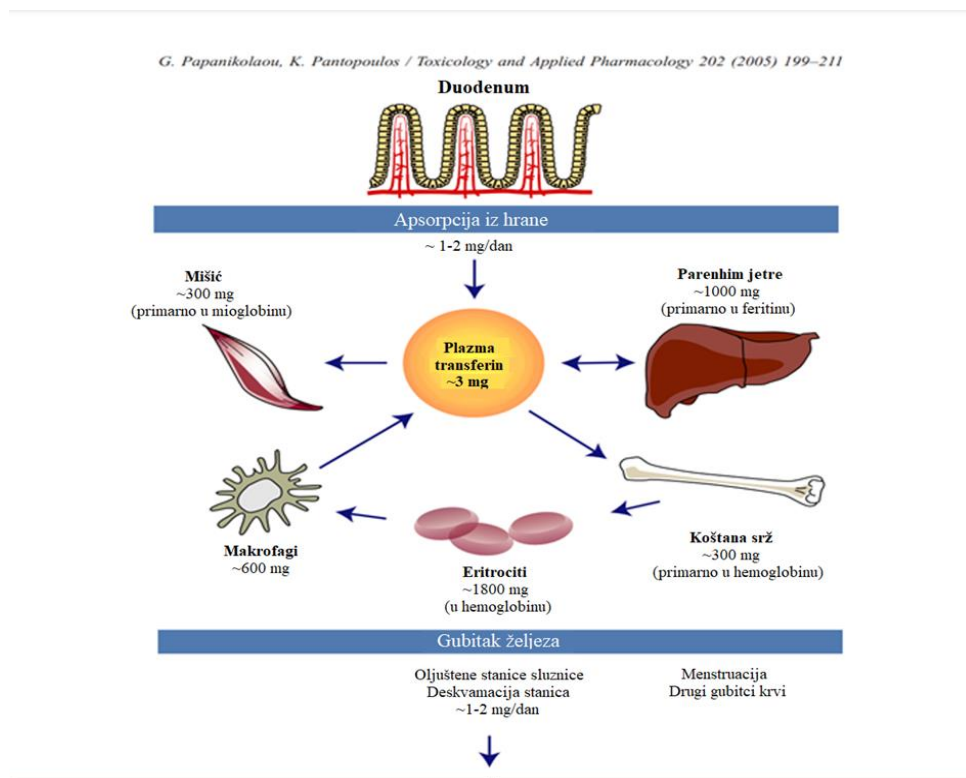
Željezo se stoga obično nalazi zajedno s proteinima. U serumu je uglavnom povezan s transferinom, dok ga unutar stanica pokreću šaperoni ili se pohranjuje unutar feritina (10).

## 1.2. Raspodjela željeza u organizmu

Ljudsko tijelo sadrži oko 3 do 5 grama željeza, što iznosi približno 45-55 mg/kg tjelesne težine kod odraslih žena i muškaraca (slika 2) (1). Nema stanice u tijelu koja ga ne sadrži budući da je sastavni dio većine intracelularnih enzima koji su neophodni za proizvodnju energije, sintetski metabolizam i druge važne funkcije (12). Većina tjelesnog željeza (60-70%) je prisutna kao hem u hemoglobinu eritroidnih stanica ( $>2$  g) ili mioglobinu mišića (4% odnosno oko 300 mg) (3,12). Ostala tkiva bogata željezom uključuju jetru i slezenu. Otprilike 20–30% željeza u tijelu je pohranjeno u hepatocitima i retikuloendotelnim makrofagima, u velikoj mjeri unutar feritina (specijaliziranom citoplazmatskom proteinu za skladištenje željeza) i njegovog

produkta razgradnje hemosiderina. Procjenjuje se da svi ostali stanični proteini i enzimi koji sadrže željezo vežu ukupno oko 8 mg željeza (2,12).

Željezo se dostavlja eritroblastima i većini tkiva putem cirkulirajućeg transferina (Tf), koji prenosi oko 3 mg željeza u stanju ravnoteže. S obzirom da se Tf-vezano željezo mijenja oko 10 puta tijekom dana, ono predstavlja najdinamičniju tjelesnu zalihu željeza. Željezo se u plazmi uglavnom nadoknađuje retikuloendotelnim makrofagima, a u maloj mjeri (~1-2 mg/dan) apsorpcijom iz prehrane, posredovanom duodenalnim enterocitima. Makrofagi dobivaju željezo primarno putem eritrofagocitoze, a enterociti internalizacijom hema ili anorganskog željeza iz lumena crijeva (1,3).



**Slika 2.** Shematski prikaz raspodjele željeza u tijelu (2).

### 1.2.1. Homeostaza željeza

Odrasla osoba dnevno prosječno unosi oko 15 mg željeza putem uobičajene prehrane, od čega se apsorbira samo 5-10%, odnosno 0,5-1,0 mg. Željezo se primarno apsorbira u dvanaesniku i proksimalnom dijelu jejunuma, ali i distalniji dijelovi crijeva mogu preuzeti ovu funkciju ako je to potrebno (13). Ne postoji poznati regulirani put izlučivanja željeza pa se sadržaj željeza u tijelu regulira precizno kontroliranom crijevnom apsorpcijom. Crijevna

sluznica prilagođava apsorpciju željeza u odgovoru na tkivnu hipoksiju, promjene u tjelesnim zalihama, i povećanu potrebu za željezom, regulirajući unos prema trenutnim potrebama organizma. Apсорpcija je povećana u slučaju nedostatka željeza, dok je smanjena u slučaju preopterećenja željezom (1).

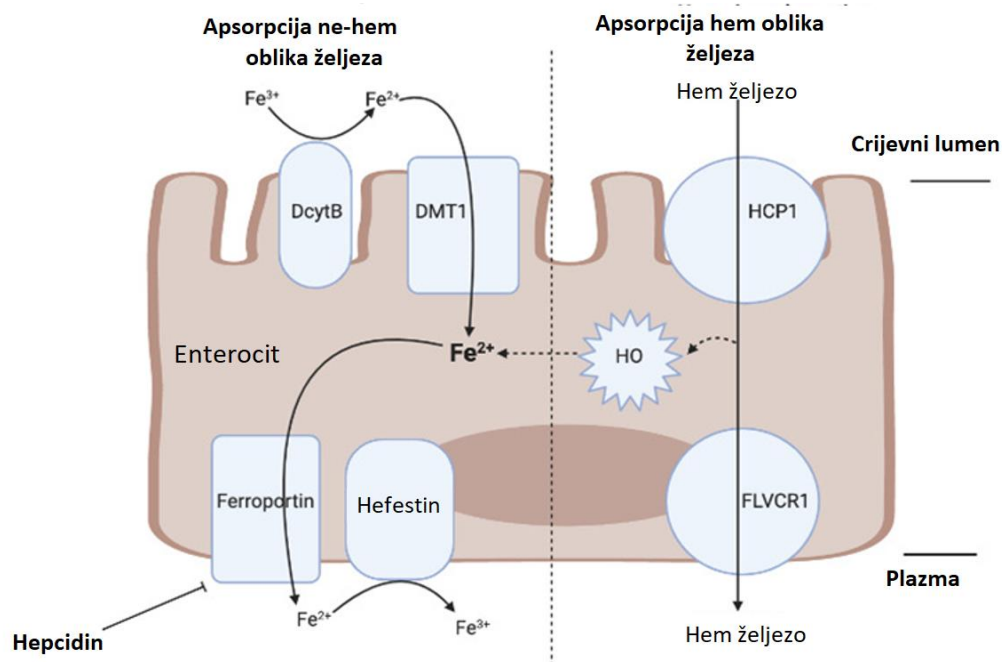
Muškarci dnevno gube oko 0,6 mg željeza, uglavnom putem fecesa. Taj gubitak može se povećati u slučaju krvarenja. Kod žena, zbog menstruacijskog krvarenja, dugoročni prosječni dnevni gubitak željeza raste na približno 1,3 mg (7).

Željezo iz prehrane može biti hemsko ili nehemsko (anorgansko) i ovi različiti oblici prolaze odvojene puteve (14). Za optimalnu prehranu potreban je dnevni unos 8-10 mg željeza. Nehemsko željezo čini približno 90% željeza u standardnoj prehrani, dok hem željezo čini preostalih 10%. Iako hem željezo čini manji dio ukupnog unosa, ono je vrlo bioraspoloživo te se apsorbira učinkovitije od nehenskog željeza. Za razliku od nehenskog oblika, na apсорpciju hem željeza ne utječu prehrambeni faktori što ga čini važnim izvorom u hrani (1). Enterociti u proksimalnom duodenumu odgovorni su za apсорpciju željeza (slika 3) (14).

Budući da se trovalentni oblik željeza ne može apsorbirati on se prvo mora reducirati u fero oblik (dvovalentni oblik). Redukciju feri oblika u fero oblik kataliziraju duodenalne citokrom b reduktaze 1 (DCYTB 1) (1). Fero željezo se zatim prenosi u enterocite preko bivalentnog prijenosnika metala (eng. *divalent metal transporter*, DMT1). Ovaj prijenosnik nije specifičan samo za željezo već prenosi i druge dvovalentne elemente kao što su mangan, kobalt, bakar, cink i olovo (12,14). Prisutnost reducirajućih tvari poput vitamina C pospješuje redukciju feri-iona u fero-ion te na taj način potiče apсорpciju. Unos vitamina C od 25 do 50 mg po obroku poboljšat će apсорpciju željeza dok će apсорpcija i anorganskog i henskog željeza biti smanjena uz kalcij (čaja mlijeka uz obrok smanjuje iskoristivost željeza) (15). Tetraciklini stvaraju netopljive kelate željeza, što rezultira otežanom apсорpcijom obiju tvari (8). Nakon apсорpcije, fero željezo se može pohraniti kao feritin ili otpustiti u cirkulaciju putem feroportina, jedinog poznatog izvoznika željeza iz stanice. Prije izlaska iz enterocita  $Fe^{2+}$  mora prvo biti oksidiran natrag u  $Fe^{3+}$  pomoću hefestina ili ceruloplazmina (16).

Hem oblik željeza se u enterocite prenosi uz pomoć proteinskog nosača hema 1 (engl. *heme carrier protein 1*, HCP1). Nakon što uđe u enterocite željezo iz hema se može otpustiti u plazmu preko hem izvoznika FLVCR1 ili se prevesti natrag u  $Fe^{2+}$  putem enzima hem oksidaze (HO) (16). Željezo koje se ne izveze iz enterocita u plazmu gubi se ljuštenjem crijevnog epitela.

Stoga transport željeza feroportinom kroz bazolateralnu membranu određuje hoće li se željezo isporučiti u cirkulaciju ili ukloniti iz tijela s izdvojenim enterocitima (1).



**Slika 3.** Prikaz apsorpcije dvaju oblika željeza (16).

Važnu ulogu u metabolizmu željeza ima hepcidin koji se primarno sintetizira u jetri (14). Hepcidin je negativni regulator metabolizma željeza. On se veže na svoj receptor feroportin čime se potiče internalizacija i konačno lizosomska razgradnja ovog izvoznika željeza. Gubitak feroportina sa stanične membrane uzrokuje staničnu retenciju željeza i potiskuje efluks željeza iz mjesta glavnog protoka željeza (makrofaga, hepatocita i enterocita) u krv, smanjujući tako zasićenje transferina i smanjujući dostupnost željeza (1). Kada je koncentracija željeza u plazmi povišena, raste sinteza hepcidina, a suprotno se događa kada je koncentracija željeza niska (14).

Disregulacija proizvodnje hepcidina, genetska ili stečena, uzrokuje poremećaj željeza. Kod zdrave osobe porast razine željeza u tijelu rezultirao bi povećanom ekspresijom hepcidina, što bi dovelo do smanjene apsorpcije željeza. Kod pacijenata zahvaćenih nasljednom hemokromatozom (HH), zbog neadekvatne ili neučinkovite hepcidinom posredovane regulacije feroportina, apsorpcija željeza se nastavlja unatoč velikom opterećenju tijela željezom (1). Patološka prekomjerna ekspresija hepcidina pod dugotrajnim upalnim stanjima povezana je s anemijom kronične bolesti, koju karakterizira preusmjerenje željeza na mjesta skladištenja, hipoferemija i smanjena dostupnost željeza za eritropoezu (3).



Željezo se u krvnoj plazmi spaja za beta globulin, nazvan apotransferin, pa nastaje transferin koji je glavni prijenosnik željeza u krvi. Za njega se mogu vezati dvije molekule željeza u feri obliku. Željezo je labavo vezano za transferin što omogućuje da se ono lako preda svakoj stanici u tijelu (7). Odjeljak transferina u plazmi služi kao tranzitni odjeljak kroz koji svaki dan cirkulira približno 20 mg željeza. Vezanje Fe za transferin osigurava topivost i smanjuje reaktivnost što omogućuje siguran prijenos željeza do svih stanica u tijelu (1). Na površini mnogih stanica postoje receptori (TfR1 i TfR2) za transferin. Transferin se veže za receptore, te se unosi endocitozom posredovanom receptorom. Kiseli pH unutar lizosoma uzrokuje disocijaciju feri oblika željeza s proteina (14). Feri oblik se zatim reducira ferireduktazom STEAP3 (engl. *six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3*) te se prenosi preko endosoma u citoplazmu putem DMT1 (1). U citoplazmi stanice fero oblik se ili ugrađuje u hemoglobin ili pohranjuje u obliku feritina (13). Apotransferin koji ostaje vezan za receptor se zatim vraća na površinu stanice dovršavajući ciklus transferina i oslobađa se da bi se ponovno napunio željezom. U normalnim uvjetima, željezo vezano za Tf ovaj ciklus ponavlja 10 do 20 puta na dan (14).

Željezo može biti uskladišteno u dva oblika: kao feritin i kao hemosiderin (17). Željezo u feritinu zove se pohranjeno željezo te je to najčešći oblik rezervnog željeza. Feritin je u vodi topljiv kompleks koji se sastoji od kristala željeznog hidroksida prekrivena ljuskom bjelančevine apoferitina (7,17). Feritin je evolucijski očuvan, sveprisutan protein koji može primiti do 4500 atoma željeza. L-feritin prevladava u tkivima koja skladište željezo, dok se H-feritin prvenstveno eksprimira u stanicama koje brzo preuzimaju i oslobađaju željezo (3).

Manje količine pohranjenog željeza nalaze se u gotovo netopljivom obliku zvanom hemosiderin, što je posebno izraženo kada količina željeza u tijelu premašuje kapacitet apoferitina. Kada se razina željeza u plazmi smanji, željezo se iz feritinskih zaliha lako oslobađa u plazmu i transportira u obliku transferina do dijelova tijela kojima je potrebno (7). Osim u stanicama crijevne sluznice, željezo u obliku feritina, pohranjuje se u makrofagima u jetri, slezeni i kosti, te u stanicama jetrenog parenhima. Mobilizacija željeza iz makrofaga i hepatocita prvenstveno je pod kontrolom hepcidinom regulirane aktivnosti feroportina (13).

### **1.3. Manjak željeza**

Nedostatak željeza je vodeći uzrok anemije u cijelom svijetu i predstavlja značajan zdravstveni problem. Prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), anemija

uzrokovana nedostatkom željeza (engl. *iron deficiency anemia*, IDA) pogađa čak 30% svjetske populacije (18). Ovo stanje ukazuje na problem koji zahtijeva hitnu pozornost, jer je nedostatak željeza najčešći prehrambeni poremećaj koji pogađa oko 20% svjetske populacije (19).

Nedostatak željeza nastaje kada tjelesne potrebe za željezom nisu zadovoljene unosom željeza iz hrane. Ovo dovodi do smanjene isporuke željeza na ključna mjesta u tijelu kao što su jetra, koštana srž i mišići. Posljedica toga je oštećenje funkcija koje ovise o željezu, poput proizvodnje crvenih krvnih stanica (eritropoeze). Nedostatak željeza može uzrokovati mikrocitnu anemiju, koja je obilježena manjom prosječnom veličinom crvenih krvnih stanica. Konačni ishod je smanjena sposobnost prijenosa kisika i posljedična hipoksija tkiva. Iako blagi nedostatak željeza možda nije osobito štetan, progresija do anemije zbog manjka željeza (IDA) može imati ozbiljne fiziološke posljedice (19).

### **1.3.1. Faze manjka željeza**

U razvoju manjka željeza razlikuju se tri faze. U prvom stadiju unos željeza je niži od potrebne količine, što uzrokuje progresivno smanjenje zaliha željeza, prvenstveno u stanicama jetre i mišića (18,20). To se očituje smanjenjem koncentracije feritina u serumu i hemosiderina u stanicama koštane srži. Apsorpcija željeza iz hrane raste kako se depoi feritina smanjuju (6). Kada je to praćeno odsutnošću sideroblasta u koštanoj srži, govorimo o pre-latentnoj anemiji (20). Bolesnici u ovoj fazi općenito nemaju simptome, a dijagnoza nedostatka željeza postavlja se kada se razine feritina u serumu smanje ispod 20 ng/mL (20 µg/L) (18).

U drugoj fazi zahvaćeni su prijenosni sustavi tako da dolazi do smanjenja plazmatske koncentracije željeza i zasićenja transferina željezom (latentna hipoferemija), a povećava se koncentracija ukupnog i nezasićenog transferina u plazmi. Ako se opskrba željezom ne poboljša, dolazi do promjena u sadržaju željeza u eritrocitima. To rezultira smanjenjem prosječnog staničnog volumena (PSV) i prosječnog staničnog hemoglobina (PSH), što potom dovodi do pada koncentracije hemoglobina u krvi i prosječne stanične koncentracije hemoglobina (PSKH) (20). Razine skladištenja željeza iscrpljuju se do te mjere da više ne mogu podržavati proizvodnju hemoglobina i stvarati dovoljno crvenih krvnih stanica (eritrocita). Nedostatak željeza smanjuje sintezu crvenih krvnih zrnaca i proizvodnju hemoglobina, što dovodi do anemije (18).

Tijekom prelatentne faze nedostatka željeza, prehrana bogata željezom u većini slučajeva pomogne u izlječenju. Međutim, pacijenti s IDA-om trebaju dodatke željeza kako bi

nadoknadili željezo, uspostavili normalnu hematopoezu, liječili anemiju i ublažili simptome (18).

Nakon nadoknade željeza oporavak će se odvijati obrnutim tijekom. Prvo dolazi do povećanja koncentracije Hb, a nakon toga i ostalih pokazatelja sadržaja željeza u eritrocitima (PSV, PSH, PSKH). Nakon toga se postupno normaliziraju koncentracije željeza u serumu, zasićenje transferina željezom i koncentracija feritina, da bi se na kraju stabilizirala i apsorpcija željeza (20).

### **1.3.2. Uzroci manjka željeza**

Manjak željeza može nastati iz različitih razloga, pri čemu je najznačajniji povećani gubitak željeza zbog kroničnih krvarenja. Ako ta krvarenja ne premaše određenu granicu (primjerice, 6 mg željeza dnevno putem stolice), organizam može nadoknaditi gubitak pojačanom apsorpcijom željeza iz crijeva (20). Stroga veganska i vegetarijanska prehrana i kronični gubitak krvi koji je posljedica velikih menstrualnih krvarenja česti su uzroci anemije u razvijenim zemljama (21). Žene tijekom menstruacijskog ciklusa izgube oko 30 mg, a kod obilnih krvarenja taj gubitak se znatno povećava. Kod žena u postmenopauzi i kod muškaraca najčešći razlog gubitka krvi je krvarenje u probavnom traktu (13). Kronični gubitak krvi iz gastrointestinalnog trakta, uključujući okultnu krv, osobito kod muških pacijenata i starijih pacijenata, može otkriti prisutnost benignih lezija, angiodisplazije ili raka (21). Stoga bolesnike sa sideropeničnom anemijom nejasnog uzorka svakako treba testirati na okultno krvarenje iz probavnog trakta (13).

Još jedan uzrok nedostatka željeza je i njegov nedovoljan unos hranom, ali to se rijetko događa u razvijenim zemljama, osim kada su potrebe za željezom veće od uobičajenih, npr. u trudnoći, ranoj dojenačkoj dobi, za vrijeme laktacije te kod bolesnika sa kroničnim zatajenjem bubrega (zbog gubitka eritrocita tijekom hemodijalize te zbog stimuliranja eritropoeze eritropoetinom) (8).

Manjak željeza može nastati i zbog poremećaja apsorpcije željeza. To se javlja kod bolesnika nakon gastrektomije, gastroenterostomije, kod stanja u kojima se ne luči klorovodična kiselina (HCl) te kod oboljelih od teških bolesti tankog crijeva koje dovode do opće malapsorpcije (13,20). Nesteroidni protuupalni lijekovi i antikoagulansi mogu pridonijeti gubitku krvi, a inhibitori protonske pumpe često su zanemaren uzrok smanjene apsorpcije

željeza. Pretilost može biti povezana s blagim nedostatkom željeza zbog subkliničke upale, povišene razine hepcidina i smanjene apsorpcije željeza (21).

### **1.3.3. Anemije**

Anemija je stanje u kojem su koncentracija Hb i/ili broj crvenih krvnih zrnaca (eritrocita) ispod normalnih vrijednosti, što nije dovoljno za zadovoljenje fizioloških potreba pojedinca. Ovo stanje pogađa otprilike jednu trećinu svjetske populacije. Anemija je povezana s povećanim morbiditetom i mortalitetom žena i djece, lošijim ishodima porođaja, smanjenom radnom produktivnošću kod odraslih te poremećajem kognitivnog i bihevioralnog razvoja kod djece (22).

Postoje dva osnovna pristupa u dijagnostici anemije. Prvi je kinetički pristup, koji se usredotočuje na utvrđivanje uzroka anemije. Drugi je morfološki pristup, koji klasificira anemije na temelju srednjeg volumena eritrocita (MCV – srednji korpuskularni volumen) i retikulocitnog odgovora (23).

Anemija zbog manjka željeza i nedostatak željeza su globalni zdravstveni problemi i uobičajena medicinska stanja vidljiva u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Nedostatak željeza odnosi se na smanjenje zaliha željeza koje prethodi anemiji zbog manjka željeza ili traje bez progresije. Anemija zbog manjka željeza naziva se sideropeničnom anemijom koja spada u hipokromne, mikrocitne anemije (24). Anemija zbog manjka željeza je kronična i često asimptomatska te stoga može ostati nedijagnosticirana. Slabost, umor, poteškoće u koncentraciji i slaba radna produktivnost nespecifični su simptomi koji se pripisuju slaboj isporuci kisika u tjelesna tkiva i smanjenoj aktivnosti enzima koji sadrže željezo (21).

### **1.4. Suplementacija željeza**

Željezo se u hrani nalazi u različitim oblicima, pri čemu je najviše prisutno u mesu, dok se u biljkama pojavljuje u obliku metaloproteina, topljivih oblika željeza. Željezo se iz životinjskih izvora, kao što su hem željezo, feritin i hemosiderin, apsorbira mnogo učinkovitije u odnosu na anorgansko željezo iz biljnih izvora. Dok se hem željezo vrlo učinkovito apsorbira, apsorpcija anorganskog željeza iznosi tek 1-7%, s time da se većina nalazi u slabo topljivom trovalentnom obliku (25). Hrana koja ima relativno visok sadržaj željeza je jetra, crveno meso, grah, orasi, zeleno lisnato povrće i obogaćene žitarice, ali je apsorpcija tog željeza vrlo varijabilna (26).

Bioraspoloživost željeza, odnosno sposobnost tijela da ga iskoristi, nije određena samo količinom željeza u hrani, već i prisutnošću drugih sastojaka koji mogu pospješiti ili omesti apsorpciju. Konzumacija mesa bogatog hem željezom znatno povećava apsorpciju željeza u usporedbi s prehranom baziranom na žitaricama i povrću. U terapiji koja uključuje nadomjestke željeza, unos vitamina C preporučuje se jer pospješuje apsorpciju željeza (27). Hranjive tvari koje poboljšavaju bioraspoloživost željeza su i organske kiseline, riblji i mesni proteini te peptidi iz djelomično probavljenog mišićnog tkiva (28).

Obogaćivanje hrane mikronutrijentima, uključujući željezo, postalo je važan zdravstveni program u borbi protiv nedostatka mikronutrijenata. Karbonilni prah željeza, koji sadrži više od 98% elementarnog željeza, koristi se kao siguran i učinkovit dodatak za nadopunu željeza u prehrani (29).

Tipična prehrana osigurava 10-20 mg željeza dnevno, no tijelo može apsorbirati samo do 5 mg istovremeno putem aktivnog apsorpcijskog puta. Terapeutske doze oralnog željeza, poput 100 mg, daleko premašuju ovu količinu, što dovodi do pasivne apsorpcije kroz paracelularni put. Ova pasivna apsorpcija može rezultirati zasićenjem transferina i cirkulacijom neprotein vezanog željeza (NTBI) u plazmi, što može uzrokovati oksidativni stres u tkivima. Pri uzimanju željeznih soli s hranom također dolazi do povećanja razine NTBI, a povećanje doze oralnog željeza ne dovodi nužno do proporcionalnog povećanja apsorpcije, zbog zasićenja pasivnog apsorpcijskog puta (30).

#### **1.4.1. Indikacije za primjenu pripravaka željeza**

Jedina klinička indikacija za primjenu željeza jest liječenje i prevencija sideropenične anemije. Prije početka liječenja potrebno je pažljivo ispitati uzrok anemije kako bi se izbjeglo nepotrebno davanje željeza i preopterećenje željezom (13,31).

Kod pacijenata s IDA-om ključna je etiološka dijagnoza koja omogućuje liječenje temeljnog uzroka stanja. Primjerice, kod ulkusa, gastritisa i ezofagitisa koriste se inhibitori protonske pumpe, dok se kod pacijenata s ulkusima povezanim s bakterijom *Helicobacter pylori* preporučuje eradikacija ove bakterije. Za pacijente s celijakijom potrebna je bezglutenska dijeta, dok se angiodisplazije koaguliraju ili se reseciraju tumori. Liječenje osnovnog uzroka trebalo bi spriječiti daljnji gubitak željeza, ali bi svi pacijenti trebali uzimati dodatak željeza da se ispravi anemija i obnove zalihe u tijelu (32).

U slučajevima kada je apsorpcija iz GI trakta očuvana, preferira se oralna primjena preparata željeza jer ona omogućuje korekciju anemije jednako brzo i učinkovito kao i parenteralni pripravci. Pacijenti s kroničnim zatajenjem bubrega na hemodijalizi, koji se liječe eritropoetinom su iznimka jer imaju izrazito velike potrebe za željezom, pa se kod njih prednost daje parenteralnim pripravcima (13).

Preporučuje se da pacijenti budu temeljito pregledani prije nego što započnu s uzimanjem preparata željeza, jer slobodna prodaja preparata željeza nije podržana osim za pacijente koji su prošli temeljitu dijagnostiku (31).

#### **1.4.2. Oblici preparata željeza dostupni na tržištu**

Pripravci željeza dostupni na tržištu uvelike se razlikuju u dozi, sastavu, cijeni i bioraspoloživosti. Bioraspoloživost dodatka željeza definirana je kao udio željeza prisutnog u oralnom obliku koji se apsorbira i ugrađuje u eritrocite (33). Pripravci željeza se mogu primijeniti oralno i intravenski. Oralna primjena željeza je prikladan, jeftin i učinkovit način liječenja stabilnih pacijenata. Nasuprot tome, intravensko davanje željeza se primjenjuje kada je oralna primjena željeza neučinkovita ili se loše podnosi (34).

Parenteralna primjena može biti neophodna u pojedinaca koji ne mogu apsorbirati željezo peroralno zbog malapsorpcijskog sindroma, kao posljedica kirurških postupaka ili upalnih stanja u gastrointestinalnom traktu (8).

#### **1.4.3. Oralni pripravci željeza**

Oralni pripravci željeza široko su dostupni na tržištu zbog svoje ekonomičnosti i jednostavnosti primjene (27). Na tržištu se mogu pronaći kao lijekovi koji se izdaju na recept, kao bezreceptni (OTC) lijekovi te kao dodatci prehrani. Od farmaceutskih oblika postoje tablete s produljenim oslobađanjem, tablete za žvakanje, kapsule, šumeće tablete te tekući oblici koji se koriste u terapiji (35).

Oralni pripravci željeza se sastoje od dvovalentnog ili trovalentnog željeza. Među brojnim pripravcima na tržištu najčešće se koriste dvovalentne soli željeza koje se preferiraju zbog niske cijene i visoke bioraspoloživosti (dobra apsorpcija). Uobičajeno korišteni spojevi fero

željeza uključuju soli fero-fumarat, fero-sulfat, fero-glukonat i kelat aminokiselina, fero-bisglicinat (8,13,34). Bioraspoloživost spojeva dvostrukog željeza je slična kao i njihov profil nuspojava i učinkovitost u regeneraciji Hb, sve dok se daje dovoljno željeza. Međutim, razlikuju se po sadržaju elementarnog željeza. Stoga se izbor soli fero željeza obično temelji na količini elementarnog željeza u pripravku i o cijeni (33).

**Tablica 1.** Oralni pripravci željeza odobreni za primjenu u Hrvatskoj (35)

Djelatna tvar	Sadržaj elementarnog željeza	Oblik
željezov (III) maltolat	30 mg	kapsule, tvrde
kompleks željezovog (III) hidroksida s polimaltozom	100 mg	tableta za žvakanje
kompleks željezovog (III) hidroksida s polimaltozom	50 mg/5 ml	oralna otopina
željezov fumarat	115 mg	kapsula, tvrda
željezov (II) sulfat heptahidrat	20 mg/ 1ml	oralna otopina
Željezov (II) sulfat	80 mg	tableta s produljenim oslobađanjem
željezov (II) glukonat hidrat; folatna kiselina	60 mg	filmom obložena tableta
smjesa polinuklearnog željezovog(III) oksihidroksida	500 mg	tableta za žvakanje.

Kod osobe s nedostatkom željeza, dnevno se može ugraditi oko 100 mg željeza u Hb, a oko 25% primijenjene doze fero soli se apsorbira (13). Preporučena dnevna doza za odrasle s nedostatkom željeza je do 300 mg elementarnog željeza, a za djecu 3 do 6 mg po kilogramu tjelesne težine tekućeg pripravka; za obje skupine dodatak treba primijeniti u podijeljenim dozama bez hrane (uglavnom tri puta dnevno). Kod bolesnika koji ne podnose visoke dnevne doze one se mogu smanjiti, što će dovesti do sporijeg, ali ipak potpunog nadoknađivanja manjka željeza. Niske razine hepcidina u bolesnika kod anemije zbog manjka željeza će osigurati učinkovitu apsorpciju željeza i brzi oporavak razine hemoglobina; međutim, potrebno je 3 do 6 mjeseci liječenja za popunjavanje zaliha željeza i normalizaciju razine feritina u serumu (13,21).

Feri željezo ima vrlo nisku topljivost pri gotovo neutralnom ili alkalnom pH i mora se reducirati do fero oblika prije unosa u enterocite. Bioraspoloživost feri pripravaka željeza obično je 3 do 4 puta niža od one fero sulfata. Štoviše, u usporedbi s feri željezom, fero željezo općenito je učinkovitije u nadoknadi Hb u bolesnika s IDA. Dostupno je nekoliko kompleksa feri-željezo-polisaharid koji se često reklamiraju kao da imaju bolji okus i manje nuspojava, ali ne postoje ustrajni dokazi koji podupiru te tvrdnje (33).

Ako liječenje oralnim željezom ne uspije, mogući razlozi uključuju prijevremeni prekid terapije, nedovoljno pridržavanje propisanog režima od strane pacijenta ili istinski refraktoran odgovor na terapiju. U potonjem slučaju, drugi, specifični tretmani, kao što je eradikacija infekcije s *H. pylori* ili uvođenje bezglutenske dijeta u bolesnika s celijakijom, mogu obnoviti sposobnost apsorpcije željeza i eliminirati potrebu za suplementacijom u nekih bolesnika (21).

Na tržištu se nalaze i kompleksi željeza s organskim ligandom poput željezo (III) hidroksid polimaltoze (IPC) i željezo saharoza, koji stabiliziraju željezo i održavaju ga topljivim (36). Kompleks željezo (III) polimaltoza izgrađen je od neionskog željeza (III), u obliku polinuklearnog željezo (III) hidroksida, i polimaltoznih liganda. Rezultirajući kompleks je stabilan. S obzirom na to da je u neionskom obliku, željezo ne stupa u interakciju s sastojcima hrane i ne potiče stvaranje reaktivnih vrsta kisika (36,37). Brojne studije su primijetile nižu stopu prekida liječenja kompleksom željezo (III) polimaltoza nego sa željeznim solima, obično kao rezultat manjeg broja nuspojava u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta (36). Unatoč tvrdnji o poboljšanoj sigurnosti u odnosu na pripravke fero željeza (II), trenutačno su dostupni različiti dokazi o učinkovitosti IPC-a (37).

#### **1.4.4. Kombinirani pripravci željeza**

Uz suplemente koji sadrže samo željezo, na tržištu se može pronaći i niz kombinacija željeza i drugih tvari. Od farmaceutskih oblika prevladavaju kapsule, tablete i tekućine odnosno sirupi, a postoje i šumeće tablete i sprej.

Najčešće su kombinacije željeza s vitaminom C. Vitamin C, poznat i kao natrijev askorbat, igra ključnu ulogu kao kofaktor u brojnim metaboličkim reakcijama unutar ljudskog organizma. Ljudi nisu u stanju sintetizirati askorbat zbog neaktivnosti gena koji kodira enzim L-gulonol- $\gamma$ -lakton oksidazu, ključan za sintezu askorbata (38). Za vitamin C se navodi da je naj-snažniji pojačivač apsorpcije željeza koji može povećati apsorpciju feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) i fero željeza



(Fe<sup>2+</sup>). Takav učinak proizlazi iz redukcijskih svojstava askorbinske kiseline (redukcija feri u fero oblik koji je bolje topljiv), ali i zbog potencijala da kelira željezo i spriječi njegovo vezanje na polifenole i fitate (inhibitore apsorpcije željeza) (39). Askorbat također potiče sintezu feritina, inhibira lizosomalnu razgradnju feritina i smanjuje izlazak željeza iz stanica (38).

U stanjima koja odražavaju potrebu za nadomjesnom terapijom, primjerice tijekom trudnoće i pothranjenosti, stručnjaci također preporučuju željezo u kombinaciji s drugim mikro-nutrijentima kao što su folna kiselina i vitamin B12 (19).

Česte su kombinacije i s vitaminima B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B6, B12 i niacinom koji zajednički doprinose normalnom metabolizmu stvaranja energije. Tijelo ih ne skladišti, pa ih treba svakodnevno nadoknađivati. Općenito se funkcija vitamina B skupine može podijeliti na katabolički metabolizam, koji dovodi do proizvodnje energije, i anabolički metabolizam, koji rezultira bioaktivnim molekulama. Oni su ključni kofaktori za sintezu neurotransmitora i mnoge stanične metaboličke putove. Također su kofaktori za mnoge bitne enzime uključene u biosintezu RNA i DNA (40).

Mnogi multivitaminski/mineralni pripravci obično sadrže niske doze željeza koje su nedovoljne za ispravljanje nedostatka željeza i mogu sadržavati druge minerale (kao što je cink) koji ometaju apsorpciju željeza (33).

#### **1.4.5. Nuspojave oralnih preparata željeza**

Kao što je već rečeno fero pripravci željeza, posebno željezov (II) sulfat, koriste se kao prva linija terapije za nadoknadu željeza budući da su jeftini, imaju dobru bioraspoloživost, dostupni su u više pripravaka i pokazalo se da obnavljaju zalihe željeza i učinkovito ispravljaju anemiju (16). SZO također preporučuje uporabu fero željeznih soli, koje se smatraju učinkovitim, ekonomičnijim i poželjnijim tretmanom od feri dodataka, koji pokazuju lošiju apsorpciju (41).

Međutim, postoje i mnoga ograničenja u njihovoj uporabi, a najčešći su učestalost i težina nuspojava. S proljevom i konstipacijom obično se susreće oko 6% pacijenata, dok 6-12% pacijenata prijavljuje mučninu, povraćanje i želučane tegobe. Većina ovih nuspojava nastaje kao posljedica iritacije sluznice i promijenjenog gastrointestinalnog motiliteta koji su uzrokovani slobodnom koncentracijom željeza u lumenu koja ostaje neapsorbirana nakon gutanja (42). Količina apsorbiranog željeza nakon oralnog uzimanja iznosi 10-20% ili manje. Stoga 80-90%

progutanog željeza ostaje u lumenu crijeva i može uzrokovati značajnu štetu različitim mehanizmima pri toksičnim i terapijskim razinama doza (34). Neki su autori te nuspojave pripisali iritaciji GI sluznice katalizom slobodnih radikala iz slobodnog željeza koje nije vezano za transferin. Pri rastućim dozama zahvaćen je veći postotak bolesnika. LOAEL (engl. *lowest observed adverse effect level*) za iritaciju gornjih dijelova gastrointestinalnog trakta (GI) pri pojedinačnim dozama kreće se između 50 mg Fe, 60 mg Fe ili čak 80 mg Fe u trudnica. Proljev i zatvor manje ovise o dozi primijenjenog željeza (42). Jednake doze željeza kao što su fero sulfat, fero fumarat i fero glukonat u zdravih odraslih osoba nisu rezultirale značajnim razlikama u nuspojavama (33).

Sve nuspojave utječu na adherenciju pacijenata, što će vjerojatno dovesti do prekida i naposljetku neadekvatnog liječenja. Istraživanja pokazuju da je adherencija u terapiji anemije 40–60% te ovaj problem pridržavanja značajno smanjuje učinkovitost terapije (41). Novija stajališta su da je jedna dnevna doza (40-60 mg) ili nešto viša doza svaki drugi dan (80-100 mg) poželjni režim doziranja kako bi se smanjile nuspojave i optimizirao udio apsorbiranog elementarnog željeza (16). Također, za smanjivanje nuspojava se može pokušati s nižim dozama između obroka ili željezo dati uz obroke, iako hrana smanjuje apsorpciju medicinskog željeza za oko dvije trećine. Oralna terapija željezom dugotrajan je tretman što dodatno smanjuje adherenciju odnosno pridržavanje pacijenta terapiji. Prema novijim kliničkim istraživanjima potrebno je više od tri mjeseca za obnavljanje razine željeza u ljudskom tijelu (34).

Brzo topljive tablete brže oslobađaju željezo što može dovesti do nuspojava zbog prekomjerne lokalizacije/akumulacije slobodnog željeza i posljedične kemijske iritacije GI sluznice. Kako bi se to spriječilo, formulirane su tablete sa sporim ili modificiranim otpuštanjem. Tablete ili kapsule s promijenjenim otpuštanjem farmaceutske su strategije za održavanje sporog i postupnog otpuštanja aktivnog sastojka nakon gutanja, temeljene na obrazloženju da se željezo oslobođeno na takav način bolje podnosi jer bi se time izbjeglo prekomjerno nakupljanje i njegovi posljedični štetni učinci. Takvi pripravci željeza relativno su skuplji od uobičajenih tableta. Međutim, studija je pokazala da tablete željeznog sulfata s brzim otpuštanjem pokazuju najveću apsorpciju željeza, dok su tablete željeza s modificiranim otpuštanjem jednakoimale imale najnižu apsorpciju željeza (19). Pripravci željeza s kontroliranim ili sporim oslobađanjem stoga nemaju jasnu terapijsku prednost, obično se slabo apsorbiraju i ne preporučuju za korištenje. Mogu uzrokovati manje gastrointestinalnih nuspojava, ali to je vjerojatno zbog činjenice da se većina željeza prenosi kroz proksimalni duodenum (gdje se većina željeza apsorbira) u

distalni dio crijeva gdje je apsorpcija zanemariva (33). Oralno željezo može uzrokovati i tamnu stolicu, iako ono ne daje lažno pozitivne rezultate na testovima na okultnu krv (21).

#### 1.4.6. Interakcije željeza s drugim tvarima

Željezo iz pripravaka može tvoriti komplekse koji se ne mogu apsorbirati s različitim komponentama hrane u lumenu crijeva. Na primjer, komponente poput polifenola, fitinske kiseline, oksalne kiseline, taninske kiseline, karbonata i fosfata, značajno smanjuju bioraspoloživost željeza. Cjelovite žitarice i mahunarke bogate su fitinskom kiselinom, koja je jedna od najsnažnijih inhibitora apsorpcije željeza čak i pri niskim razinama. Kava, crni čaj, biljni čajevi, crno vino i vruća čokolada sadrže polifenole, pri čemu čaj može smanjiti apsorpciju čak i do 90% (26). Postoje korisne strategije za smanjenje količine inhibitora željeza u prehranbenim proizvodima, poput uklanjanja ili razgradnje fitinske kiseline. Međutim, kao što je prikazano u sustavnom pregledu, smanjenje opskrbe fitatima nije rezultiralo poboljšanjem statusa željeza u žena sa suboptimalnim zalihama željeza (28).

Kod tekućih pripravaka željeza kao što su sirupi često se dodaju arome i bojila kako bi se povećala prezentacija i okus (npr. aroma šipka). Nekoliko sirupa i otopina željeza sadrži voćne i biljne sokove koji su bogati polifenolima koji smanjuju apsorpciju željeza (19).

Također, komponente lijekova mogu se vezati za željezne ione, utječući na bioraspoloživost željeza i učinkovitost samog lijeka. Vezanje željeznih iona s komponentama hrane ili lijekova ovisi o pKa vrijednostima liganda i pH medija, što utječe na stupanj kompleksacije. Kelacija željeznih iona s organskim ligandima može spriječiti daljnje vezanje s komponentama hrane ili lijekova, čuvajući željezo u bioraspoloživom obliku. Međutim, kompleks s kelatima ne smije biti previše stabilan kako bi željezo moglo biti preneseno na ciljane molekule poput transferina (43). Apsorpcija željeza može se poboljšati konzumacijom proteina iz mesa te vitaminom C, koji održava željezo u topljivom obliku i pospješuje njegovu apsorpciju. S druge strane, kalcij, vlakna, antacidi te antibiotici poput tetraciklina mogu ometati apsorpciju željeza (27). Antacidi i inhibitori protonske pumpe ne smiju se uzimati sa željezom, jer povišen pH želuca smanjuje disoluciju i apsorpciju željeza (33).

Interakcija željeza i inhibitora protonske pumpe (IPP) temelji se na činjenici da želučana kiselina igra ključnu ulogu u apsorpciji željeza, posebno trovalentnog oblika. Smanjenje kiselosti želuca uzrokovano dugotrajnom primjenom IPP-ova može smanjiti apsorpciju željeza, što

potencijalno dovodi do sideropenične anemije. Dugotrajna primjena IPP-ova kod pacijenata s hereditarnom hemokromatozom smanjuje apsorpciju feri željeza, što smanjuje potrebu za flebotomijama (44).

### 1.5. Ispitivanje oslobađanja lijeka *in vitro*

*In vitro* ispitivanje oslobađanja lijeka (disolucija) najčešće je korištena biofarmaceutska metoda ispitivanja u razvoju formulacija. Koristi se od samog početka razvoja oblika lijeka te u svim kasnijim fazama (45). Cilj svakog testa disolucije je mjerenje brzine kojom se ljekovita tvar oslobađa iz dozirnog oblika i otapa u disolucijskom mediju. Ova ispitivanja moraju se provoditi pod jasno definiranim uvjetima kako bi se omogućila usporedivost rezultata (46).

Otapanje lijeka je preduvjet za oralnu apsorpciju. Dakle, lijek koji nije potpuno otopljen ne može se potpuno apsorbirati kroz gastrointestinalni epitel (47). Ako je lijek slabo topljiv u vodenim tekućinama gastrointestinalnog trakta, disolucija postaje ključni korak koji ograničava brzinu apsorpcije te tako određuje koliko brzo i u kojem opsegu lijek postaje dostupan u krvotoku. Zbog ove jake povezanosti između *in vivo* bioraspoloživosti i *in vitro* disolucije većina oralnih lijekova, poput suspenzija, granula, peleta, tableta i kapsula, zahtijeva ispitivanje svojih disolucijskih karakteristika (46). Standardno ispitivanje *in vitro* disolucije uključuje dva procesa: oslobađanje aktivne tvari iz čvrstog dozirnog oblika i samu disoluciju lijeka. Oslobađanje lijeka određeno je faktorima formulacije kao što su dezintegracija pomoćnih tvari formulacije ili difuzijom lijeka kroz formulaciju. Disolucija lijeka pod utjecajem je fizikalno-kemijskih svojstava tvari (npr. topljivost, difuzivnost), svojstava čvrstog stanja tvari (npr. površina čestica, polimorfizam) i svojstava formulacije (npr. vlaženje, topljivost) (45).

Specifični uvjeti disolucije za tablete i kapsule lijekova definirani su u farmakopejama. *In vitro* testovi disolucije široko se koriste kao prediktori *in vivo* ponašanja lijekova. Kada je neki lijek usklađen s farmakopejskim zahtjevima za oslobađanje, povećava se sigurnost da će se pravilno osloboditi iz formuliranog oblika *in vivo* i biti pravilno apsorbiran (48). Dobra disolucijska metoda treba osigurati postupno oslobađanje lijeka i postizanje preko 85% disolucije pri čemu se mjerenja uzimaju u određenim vremenskim točkama (46). U Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*, Ph. Eur.) specifikacija disolucije izražava se kao količina Q aktivne tvari, u postotku sadržaja navedenog na naljepnici proizvoda, koja se oslobodi u određenom vremenskom okviru. Za oblike doziranja s konvencionalnim oslobađanjem vrijednost Q iznosi 75%. U većini slučajeva, kada se test provodi pod razumno postavljenim i opravdanim

uvjetima, najmanje 75% aktivne tvari oslobađa se unutar 45 minuta (49). EMA (Europska agencija za lijekove) smjernice prate zahtjev iz Ph. Eur. (50) dok je Američka FDA (Agencija za hranu i lijekove) za proizvode s trenutnim oslobađanjem koji sadrže aktivnu tvar visoke topljivosti postavila kriterij disolucije  $Q=80\%$  unutar 30 minuta (51).

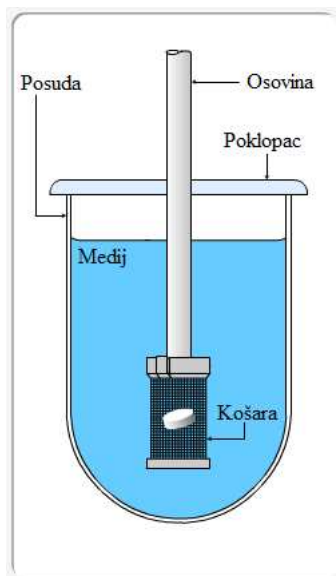
Disolucijski testovi osiguravaju dosljednost formulacije, omogućuju praćenje kvalitete u različitim serijama (engl. *quality control*, QC) te služe kao osnova za usporedbu generičkih i originalnih proizvoda (bioekvivalencija). Za postizanje točnih i pouzdanih rezultata potrebno je pažljivo odabrati odgovarajuću aparaturu i medij za disoluciju. Aparatura i medij moraju oponašati fiziološke uvjete u gastrointestinalnom traktu kako bi se osigurala korelacija između *in vitro* disolucije i *in vivo* apsorpcije (45).

### 1.5.1. Aparati i mediji za disoluciju

U Američkoj i Europskoj farmakopeji opisane su četiri aparature za ispitivanje disolucije oralnih čvrstih lijekova pri čemu su najčešće korištene aparatura s košaricom (engl. *Apparatus 1*) i aparatura s lopaticom (engl. *Apparatus 2*). Odabir aparature za disoluciju uglavnom ovisi o topljivosti lijeka i vrsti dozirnog oblika. Aparature s košaricom i lopaticom najčešći su izbor za QC disolucije zbog svog jednostavnog dizajna koji omogućuje rutinsku upotrebu, a rezultati dobiveni njihovom primjenom su dosljedni i ponovljivi. Ove aparature češće se koriste za lijekove s trenutnim oslobađanjem nego za one s modificiranim oslobađanjem (52).

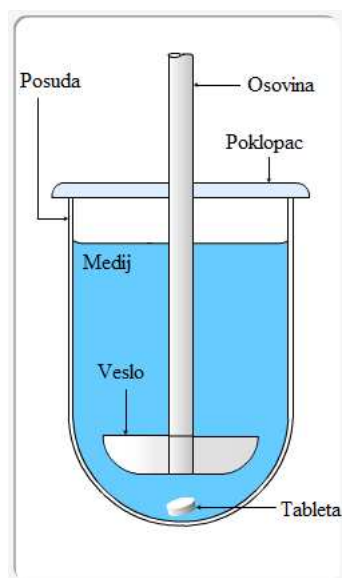
Aparatura s košaricom (Aparatura I, slika 4) sastoji se od sljedećih dijelova: posude izrađene od stakla ili drugog inertnog, prozirnog materijala; motora; pogonske osovine; i cilindričnog elementa za miješanje (košarica). Posuda je djelomično uronjena u vodenu kupelj ili se zagrijava prikladnim uređajem koji omogućuju održavanje temperature unutar posude na  $37 \pm 0,5$  °C tijekom trajanja ispitivanja. Nijedan dio aparature, uključujući okoliš u kojem se nalazi aparatura, ne smije doprinositi značajnom kretanju, miješanju ili vibracijama osim onih uzrokovanih rotacijom elementa za miješanje. Poželjna je aparatura koja omogućuje promatranje pripravka i elementa za miješanje tijekom ispitivanja. Posuda je cilindričnog oblika s hemisferičnim dnom, kapaciteta 1 litre. Može se koristiti poklopac kako bi se smanjilo isparavanje. Komponente osovine i košarice izrađene su od nehrđajućeg čelika. Dozirna jedinica se stavlja unutar rotirajuće košarice te se uranja u disolucijski medij. U unaprijed određenim vremenskim intervalima uzimaju se uzorci disolucijskog medija kako bi se analizirala koncentracija lijeka

(49). Neki od izvora varijabilnosti kod ove vrste aparature uključuju mogućnost da formulacija začepi mrežicu košarice te samo pozicioniranje košarice (45).



**Slika 4.** Aparatura s košaricom (engl. *Basket apparatus*) (53).

Aparatura s lopaticom (Aparatura 2, slika 5) koristi istu osnovnu konstrukciju kao Aparatura 1, osim što se kao element za miješanje koristi lopatica, koja je sastavljena od oštrice i osovine. Osovina mora biti postavljena tako da njezina os nije udaljena više od 2 mm od vertikalne osi posude u bilo kojoj točki i mora se glatko rotirati bez značajnog pomicanja koje bi moglo utjecati na rezultate. Tijekom testa udaljenost od dna lopatice do dna posude mora iznositi  $25 \pm 2$  mm. Prije početka rotacije lopatice dozirna jedinica mora potonuti na dno posude. Kako bi se spriječilo plutanje dozirne jedinice (što se često događa s kapsulama) preporučuje se upotreba malog komada nereaktivnog materijala poput žičane spirale (49). Neki od izvora varijabilnosti kod ove vrste aparature uključuju prianjanje formulacije uz stjenku posude, plutanje, "zarobljavanje" čvrstih čestica u stajaćem području ispod lopatice te pozicioniranje lopatice (45).



**Slika 5.** Aparatura s lopaticom (engl. *Paddle apparatus*) (53).

Kod korištenja aparature s lopaticom ili košaricom, volumen medija za disoluciju obično iznosi između 500 i 1000 mL. Brzina miješanja najčešće se bira između 50 i 100 okretaja u minuti, a maksimalna brzina ne smije premašiti 150 okretaja u minuti (49).

Kod određivanja brzine disolucije aktivne tvari iz čvrstog farmaceutskog oblika potrebno je definirati sljedeće kriterije: vrstu aparature; sastav, volumen i temperaturu disolucijskog medija; brzinu rotacije disolucijskog medija; vrijeme, metodu i broj uzorkovanja; metodu analize te kriterije prihvatljivosti (49).

Korištenje aparature s košaricom i lopaticom općenito se temelji na principu rada pod uvjetima potpunog otapanja (engl. *sink condition*). Ti uvjeti obično nastaju u volumenu disolucijskog medija koji je najmanje 3 do 10 puta veći od volumena potrebnog za zasićenje otopine lijekom. U pravilu se koristi vodeni medij, a sastav medija odabire se na temelju fizikalno-kemijskih karakteristika aktivne tvari i pomoćnih tvari unutar uvjeta kojima će oblik doziranja biti izložen nakon primjene. Raspon pH vrijednosti medija obično se postavlja između 1 i 8, no u određenim opravdanim slučajevima može biti potreban i viši pH. Za niže pH vrijednosti u kiselom rasponu obično se koristi 0,1 M HCl (49). Ovaj mediji je također prvi izbor za oblike doziranja s trenutnim oslobađanjem kod visoko topljivih lijekova. Otopine fosfatnih pufera, čiji se pH može prilagoditi između 5,0 i 8,0, prikladne su za testiranje slabo kiselih lijekova (52). Kod testiranja pripravaka koji sadrže slabo topljive aktivne tvari, može biti potrebna modifikacija medija. U takvim okolnostima preporučuje se korištenje male koncentracije surfaktanta, a

preporučuje se izbjegavanje korištenja organskih otapala (49). Surfaktant se dodaje u količima većim od njegove kritične micelarne koncentracije (CMC) kako bi se omogućila topljivost lijeka. Ovim pristupom topljivost lijeka može se povećati nekoliko stotina puta. Ovaj pristup je poželjan jer *in vivo* također dolazi do formiranja micela za otapanje lijeka u prisutnosti žučnih kiselina. Međutim, uporaba žučnih kiselina u standardnim metodama *in vitro* ne preporučuje se zbog varijacija u kvaliteti i visokih troškova, a i dalje bi bilo gotovo nemoguće simulirati kompleksnost *in vivo* uvjeta. Stoga su sintetski surfaktanti prvi izbor, a posebno se preporučuje natrijev lauril sulfat (SLS) (54).

Prihvatljivost konvencionalnih ili brzooslobađajućih pripravaka procjenjuje se na temelju količine djelatne tvari koja se otopi iz ispitivanog pripravka (tablica 2). Ako rezultati ispitivanja zadovoljavaju kriterije na razini S1 ili S2, daljnje testiranje nije potrebno. Količina, označena kao Q (engl. *quantity*), predstavlja određeni postotak oslobođene djelatne tvari u odnosu na deklarirani sadržaj lijeka. Vrijednosti od 5%, 15% i 25% u tablici prihvatljivosti također predstavljaju postotke deklariranog sadržaja kako bi se osigurala usklađenost između ovih vrijednosti i postotka Q. Testiranje se provodi kroz tri razine, osim ako su kriteriji ispunjeni na ranijim razinama (49).

**Tablica 2.** Kriterij prihvatljivosti čvrstih dozirnih oblika s konvencionalnim oslobađanjem (49)

Razina (S)	Broj testiranih uzoraka	Kriterij prihvatljivosti
S1	6	Svaka vrijednost nije manja od $Q + 5\%$
S2	6	Prosječna vrijednost 12 doznih jedinica (S1 + S2) je jednaka ili veća od Q, a niti jedna jedinica nije manja od $Q - 15\%$
S3	12	Prosječna vrijednost 24 dozne jedinice (S1 + S2 + S3) je jednaka ili veća od Q; ne više od 2 jedinice su manje od $Q - 15\%$ ; niti jedna jedinica nije manja od $Q - 25\%$



## 1.6. Spektrofotometrijska analiza željeza

Spektrometrija, posebno u vidljivom području elektromagnetskog spektra, jedna je od najčešće korištenih metoda analize. Uvelike se koristi u kliničkoj kemiji i laboratorijima za zaštitu okoliša jer se mnoge tvari mogu selektivno pretvoriti u obojeni derivat. Mjerenja se mogu vršiti u infracrvenom, vidljivom i ultraljubičastom području spektra. Ultraljubičasto područje proteže se od 10 do 380 nm, ali analitički najkorisnije područje je od 190 do 380 nm. Vidljivo (Vis) područje zapravo je vrlo mali dio elektromagnetskog spektra, a podrazumijeva područje valnih duljina koje može vidjeti ljudsko oko, odnosno gdje se svjetlost pojavljuje u različitim bojama ovisno o valnoj duljini. Vidljivo područje proteže se od ultraljubičastog područja (380 nm, duboko ljubičasto) do oko 780 nm (daleko crveno) (55). Količina elektromagnetskog zračenja koju apsorbira uzorak mjeri se pomoću instrumenta koji se naziva spektrofotometar (slika 6), a ta je apsorbancija kvantitativno povezana s koncentracijom vrste za koju se uzorak analizira. Kada se koristi izvor vidljivog zračenja, odnos između apsorbancije,  $A$ , i koncentracije,  $c$ , poznat je kao Beer-Lambertov zakon:

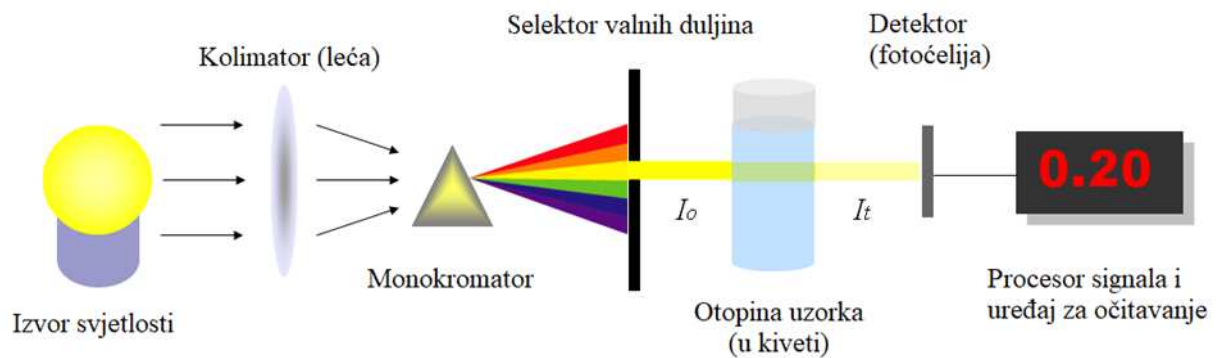
$$A = \varepsilon \times c \times l$$

pri čemu je  $l$  duljina puta ili udaljenost koju svjetlost prođe kroz uzorak te najčešće iznosi 1 cm, a  $\varepsilon$  je molarni koeficijent apsorpcije. Apsorbancija je veličina bez dimenzije (56).



**Slika 6.** UV-Vis spektrofotometar (Lambda 25, PerkinElmer).

Većina spektroskopskih uređaja sastoji se od pet osnovnih komponenti (a) izvora kontinuiranog zračenja preko valnih duljina od interesa, (b) selektora valnih duljina koji služi za izdvajanje određenog valnog područja (monokromator, filtri), (c) spremnika za uzorke, može biti jedan ili više njih, (d) detektora ili pretvornika energije zračenja u električnu energiju i (e) uređaja za očitavanje odgovora detektora (slika 7) (57).



**Slika 7.** Dijelovi UV-Vis spektrofotometra (58).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati sadržaj željeza u nekoliko različitih pripravaka dostupnih na hrvatskom tržištu te ispitati kako se željezo iz tih pripravaka oslobađa u mediju koji oponaša želučanu sredinu. U istraživanju je obuhvaćen jedan pripravak registriran kao lijek koji se izdaje na recept te tri dodatka prehrani koja su dostupna u slobodnoj prodaji.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Materijali**

#### **3.1.1. Kemikalije**

- amonij-željezo (II) sulfat-6 hidrat (Thermo scientific)
- 1,10-fenantrolin hidroklorid monohidrat (Carl Roth GmbH + Co. KG)
- Hidrokinon (Sigma-Aldrich)
- Natrij-citrat-dihidrat (Kemika, Zagreb)
- Etanol (Biognost, Zagreb)
- 95% sumporna kiselina (BDH PROLAB, UK)
- Koncentrirana HCl (12,00 mol/L) (BDH PROLAB, UK)
- Deionizirana voda

#### **3.1.2. Aparatura**

UV-Vis

- UV-Vis spektrofotometar (Lambda 25, PerkinElmer)

Disolucija

- Uređaj za disoluciju (708-DS dissolution apparatus, Agilent)

Mjerenje

- Analitička vaga (KERN ALJ 220-4M, KERN & Sohn GmbH)

#### **3.1.3. Uzorci koji su analizirani**

Za određivanje sadržaja željeza korištena su četiri različita pripravka kod kojih je jedan registriran kao lijek, dok su preostala tri dodaci prehrani različitih proizvođača. Sva su ispitivanja provedena unutar rokova valjanosti proizvoda.

- Pripravak 1 (lijek) – jedna tableta sadrži 115 mg željeza u obliku željezova (II) fumarata. Pomoćne tvari su laktoza hidrat, silicijev dioksid, koloidni, bezvodninaatrijev laurilsulfat i magnezijev stearat.

- Pripravak 2 (dodatak prehrani) – jedna tableta sadrži 28 mg željeza u obliku željezovog bisglicinata i 60 mg vitamina C. Pomoćne tvari su vitaminski kompleksi, mikrokristalična celuloza i magnezijeve soli masnih kiselina.
- Pripravak 3 (dodatak prehrani) – jedna tableta sadrži 20 mg željeza u obliku željezovog bisglicinata. Pomoćne tvari su mikrokristalična celuloza, limunska kiselina, maltodekstrin i magnezij stearat.
- Pripravak 4 (dodatak prehrani) – jedna tableta sadrži 14 mg željeza u obliku željezovog glukonata i 180 mg vitamina C. Pomoćne tvari su maltodekstrin, mikrokristalična celuloza, hidroksipropil celuloza, magnezij karbonat, magnezijeve soli masnih kiselina i silicijev dioksid.

**Tablica 3.** Pripravci korišteni u ispitivanju sadržaja i disolucije

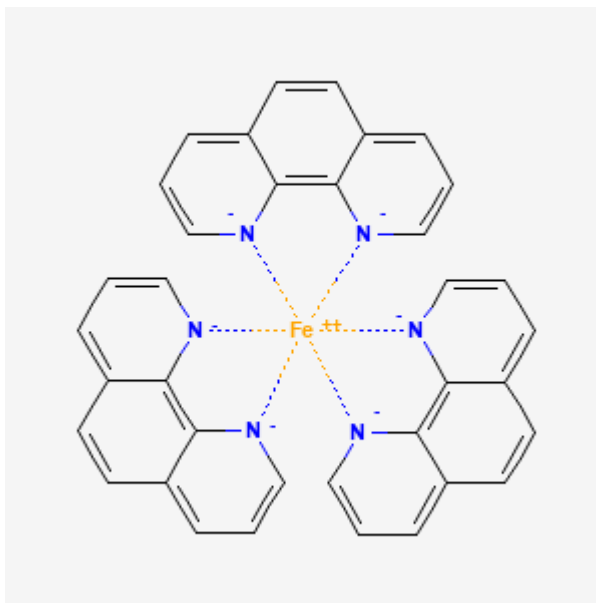
Pripravak	Djelatna tvar	Oblik	Deklarirani sadržaj (mg)
1	željezov (II) fumarata	kapsule	115
2	željezov bisglicinat	kapsule	28
3	željezov bisglicinat	kapsule	20
4	željezov glukonat	tablete	14

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Princip metode određivanja željeza u uzorcima

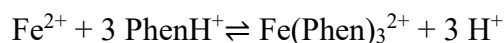
Sadržaj željeza iz prikupljenih uzoraka analiziran je metodom UV-Vis spektroskopije opisane u poglavlju 1.6. Kako bi se željezo moglo analizirati pomoću ove metode, potrebna je otopina koja apsorbira zračenje u vidljivom području spektra. Da bi se to postiglo, željezo mora reagirati s organskim spojem zvanim 1,10-fenantrolin (59). Ova molekula reagira s  $\text{Fe}^{2+}$  stvarajući feroin, kompleks koji sadrži jedan atom željeza i tri molekule 1,10-fenantrolina (slika 8). Boja ovog kompleksa u otopini je narančasto-crvena i vrlo snažno apsorbira svjetlost u vidljivom području na valnoj duljini od 508 nm. Da bi se proizveo obojeni kompleks, ioni željeza moraju biti u  $\text{Fe}^{2+}$  oksidacijskom stanju. Budući da  $\text{Fe}^{2+}$  lako oksidira u  $\text{Fe}^{3+}$  u kiselini i vodi, u otopinu se dodaje redukcijski agens hidrokinon. Kiselost otopine se mora pažljivo kontrolirati radi sprječavanja taloženja soli željeza te se uglavnom preporučuje vrijednost pH

od približno 3,5. Dodavanje natrijevog citrata u otopinu neutralizirat će dio kiseline i održati odgovarajući pH (60).



**Slika 8.** Struktura feroina (61).

Reakciju  $\text{Fe}^{2+}$  s 1,10-fenantrolinom opisuje jednačba (60):



Sadržaj željeza u ispitivanim uzorcima izračunat je iz jednačbe baždarnog pravca dobivenog iz standardne otopine željeza. Oslobođanje željeza iz pripravaka u metodi disolucije također je određeno na isti način.

### 3.2.2. Priprema otopina

Reagensi i otopine pripremljeni su prema uputama opisanim u prethodno objavljenom radu (62):

Stock otopina željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ): 20 mg/L (ppm)

Pripremljena je otapanjem 0,1404 g amonij-željezo (II) sulfat heksahidrata u odmjernoj tikvici od 1000 mL. Prvo se na analitičkoj vagi precizno izmjeri 0,1404 g amonij-željezo (II) sulfat heksahidrata koji se zatim kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu. Doda se 100-200 ml



deionizirane vode i otopi se uz miješanje. Zatim se doda 2,5 mL 98%- tne sumporne kiseline te se nadopuni do oznake s deioniziranom vodom.

Otopina Na-citrata:

Napravljena je otapanjem 12,501 g Na-citrat-dihidrata u odmjerne tikvici od 500 mL. Na analitičkoj vagi precizno se izmjeri 12,501 g Na-citrat-dihidrata koji se zatim kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

1%-tna otopina hidrokinona:

Pripremljena je otapanjem 2,5025g hidrokinona u odmjerne tikvici od 250 mL. Na analitičkoj vagi precizno se izmjeri 2,5025 g hidrokinona koji se zatim kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

Otopina fenantrolina:

Pripremljena je otapanjem 0,814 g 1,10-fenantrolin hidroklorid monohidrata u odmjerne tikvici od 250 mL. Na analitičkoj vagi precizno se izmjeri 0,814 g 1,10-fenantrolin hidroklorid monohidrata koji se zatim kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu. Potom se doda 25 mL etanola i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

0,1 M HCl:

Pripremljena je prema Ph. Eur. (63) iz koncentrirane HCl. Prvo se u odmjernu tikvicu od 1000 ml doda 200 mL deionizirane vode te se potom doda 8,3 mL koncentrirane HCl. Tikvica se zatim nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

6 M HCl;

Pripremljena je prema Ph. Eur. (63) iz koncentrirane HCl. Prvo se u odmjernu tikvicu od 500 ml doda 100 ml deionizirane vode te se potom doda 250 mL koncentrirane HCl. Tikvica se zatim nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

## Priprema standardnih otopina za UV-Vis

Pripremljene otopine korištene su za izradu serijskih razrjeđenja unutar odgovarajućih koncentracijskih raspona koristeći deioniziranu vodu. Dobivene standardne otopine su potom korištene za izradu baždarnih pravaca. Baždarni pravac dobiven iz niza standardnih otopina koje sadrže poznate koncentracije kompleksa željezo-fenantrolin se koristiti za kvantificiranje koncentracije otopina željeza. U osam odmjernih tikvica od 100 ml dodani su različiti volumeni stock otopine željeza (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 25 mL). U svaku tikvicu je potom dodano:

- 8 mL otopine Na-citrata
- 2 mL otopine hidrokinona
- 3 mL otopine fenantrolina

Svaka tikvica se nadopuni deioniziranom vodom do oznake te se dobro promiješa. Otopine se puste da odstoje deset minuta kako bi razvile boju te se potom provodi mjerenje. Tikvica sa 0 mL stock otopine željeza služi kao slijepa proba.



**Slika 9.** Standardne otopine željeza, s lijeve strane prema desnoj u koncentraciji 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3 i 5 mg/L (na tikvicama su označeni volumeni dodane stock otopine željeza).

**Tablica 4.** Priprema standardnih otopina željeza

Koncentracija Fe u standardnoj otopini (mg/L)	Volumen (mL) stock otopine Fe, 20 mg Fe/L	Volumen otopine Na-citrata (mL)	Volumen otopine hidrokinona (mL)	Volumen otopine fenantrolina (mL)	Volumen dodane ultračiste vode (mL)	Ukupan volumen standarde otopine Fe (mL)
0	0	8	2	3	87	100
0,1	0,5	8	2	3	86,5	100
0,2	1	8	2	3	86	100
0,5	2,5	8	2	3	84,5	100
1	5	8	2	3	82	100
2	10	8	2	3	77	100
3	15	8	2	3	72	100
5	25	8	2	3	62	100

### 3.2.3. Postupak mjerenja

Za mjerenje je korišten Lambda 25, PerkinElmer UV/VIS spektrofotometar pri valnoj duljini od 508 nm.

Prije mjerenja spektra standardnih otopina uzoraka provodi se slijepa proba zbog kalibracije uređaja. Svaka kvarcna kiveta se ispiru barem tri puta otopinom koja će se u njoj mjeriti. Kvarcna kiveta se napuni do tri četvrtine pripremljenom otopinom nakon čega se postavlja u odgovarajući držač. Zrake svjetlosti prolaze kroz uzorak pri čemu se jedan dio svjetlosti apsorbira, a drugi transmitira. Instrument mjeri apsorbanciju prema Beerovom zakonu. Iz apsorbancija standarda napravi se baždarni pravac.

### 3.2.4. Priprema uzorka za određivanje sadržaja željeza

Od svakog pripravka uzima se po 10 tableta/kapsula koje se pojedinačno važu na analitičkoj vagi. Izračunom aritmetičke sredine mase tih 10 tableta/kapsula dobiva se srednja vrijednost mase tablete/kapsule. Nakon odvage, svih 10 tableta/kapsula se prenese u čašu od 150 mL i prelije s 50mL 6M HCl. Nakon 10 minuta, pripremljeni uzorak zagrijava se 15 minuta

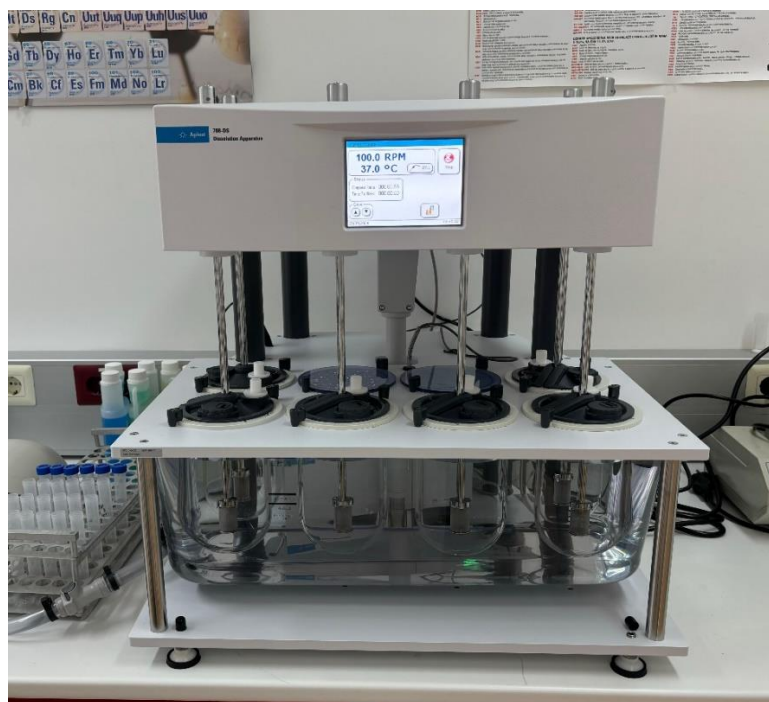
na električnoj grijalici uz neprekidno miješanje. Kada se otopina ohladi prenese se u odmjernu tikvicu od 1000 mL preko filter papira koji se nakon toga uz čašu i lijevak dobro ispere deioniziranom vodom kako bi se osiguralo kvantitativno prebacivanje. Odmjerna tikvica se nadopuni do oznake deioniziranom vodom. Uzima se 5 mL tako pripremljene otopine te se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

### 3.2.5. Postupak određivanja sadržaja željeza u uzorcima

Uzima se 5 mL alikvota iz prethodno pripremljene otopine uzorka i prenese se u odmjernu tikvicu od 100 mL te se doda 8 mL otopine Na-citrata, 2 mL otopine hidrokinona, 3 mL otopine fenantrolina i nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Otopine odstoje 10 min da razviju boju te se provodi mjerenje.

### 3.2.6. Metoda disolucije

Ispitivanje disolucije za sve pripravke je provedeno korištenjem Aparature 1, odnosno aparature s košaricom. Ispitivanje se provodi prijenosom 900 mL ( $\pm 1\%$ ) 0,1 M HCl u šest posuda za disoluciju i stabiliziranjem temperature na  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Jedna tableta ili jedna kapsula stavlja se u suhu košaricu unutar svake posude kako bi se započeo test disolucije pri 100 okretaja u minuti (slika 10). Trajanje disolucije postavljeno je na 120 min. U vremenskim intervalima od 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minuta se pomoću mikropipete uzima 5 mL uzorka. Uzorak se iz posude svaki put uzima s približno iste visine, na pola udaljenosti između rotirajuće košarice i površine disolucijskog medija. Kako bi se održao konstantan volumen tijekom ispitivanja jednak volumen disolucijskog medija se vraća u posudu nakon uzimanja uzorka. Izvučeni volumeni su usklađeni u izračunima. Da bi se kvantificirala količina otpuštenog željeza, uzorci su analizirani pomoću spektrofotometra jednakim postupkom koji je korišten za određivanje sadržaja opisano u poglavlju 3.2.5. Razlika je u tome što se uz alikvot dodaje i 1 mL standardne otopine željeza koncentracije 20 mg Fe/L („spike“) kako bi ostali unutar granice određivanja čiji je izračun prikazan u poglavlju 4.2. Svi alikvoti su filtrirani te nije potrebna daljnja obrada. Analizom se dobiva koncentracija željeza u alikvotu od 5,00 mL iz koje se izračuna koncentracija i konačno masa željeza u cijelom mediju za disoluciju, odnosno u 900 mL. Ova masa predstavlja količinu željeza koja se oslobodila iz pripravka do te vremenske točke i služi za prikaz postotka oslobođenog željeza.



**Slika 10.** Uređaj za disoluciju (708-DS dissolution apparatus, Agilent).

Američka farmakopeja (engl. *United States Pharmacopeia*, USP) specificira test disolucije za tablete željeznog fumarata (u 0,1 M klorovodične kiseline koja sadrži 0,5% natrijevog lauril sulfata, Aparatura br. 2, 75 okretaja u minuti), ali ne i za kapsule željeznog fumarata. Ne postoje u USP bazi disolucijskih metoda propisani uvjeti za ispitivanje oslobađanja željezova glicinata, a za tablete željeznog glukonata specificira se 0,1 M HCl, Aparatura br. 2 i 150 okretaja u minuti (64).

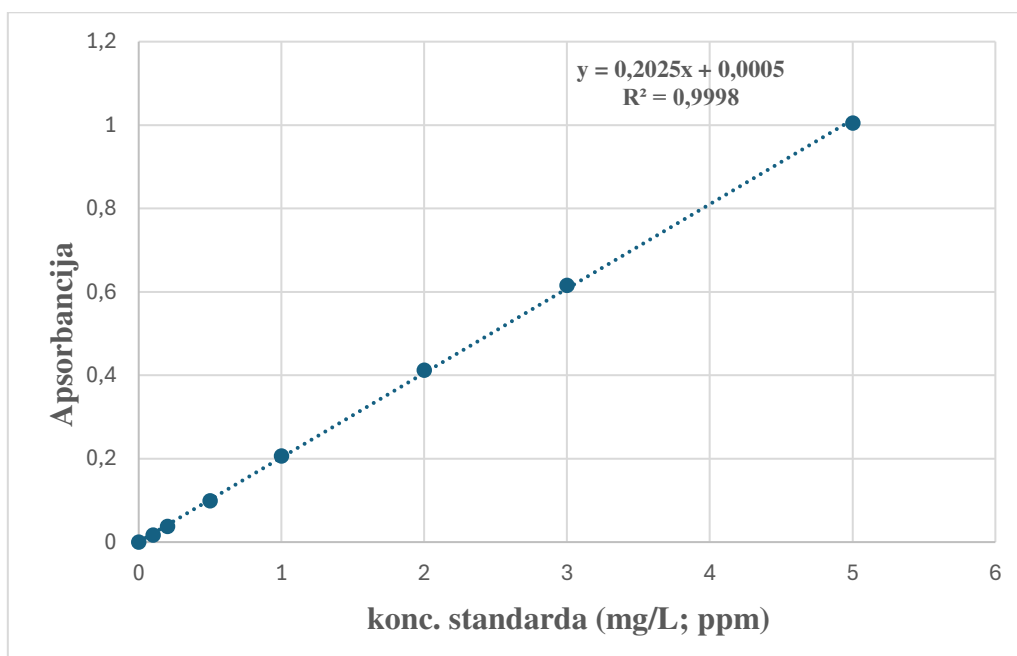
U ovom eksperimentu ispitivani su pripravci željeza u različitim oblicima te su zbog toga odabrani jedinstveni uvjeti. Budući da su kapsule plutale, a utezi za kapsule nisu bili na raspolaganju korištena je Aparatura 1. Ostali uvjeti koji su primijenjeni odgovaraju jedinom dostupnom USP zahtjevu za kapsule željeza, a to su uvjeti za kapsule željeznog glukonata (0,1 M HCl, 900 mL medija, Aparatura br. 1, 100 okretaja u minuti) (64).

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Baždarni pravac

Baždarni pravac za određivanje  $\text{Fe}^{2+}$  je grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji  $\text{Fe}^{2+}$  u otopini. Uzima se široko područje koncentracija analita u kojemu postoji linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji, tzv. linearno dinamičko područje (LDP) (65).

Baždarni pravac se konstruira mjerenjem apsorbancije niza standardnih otopina koje sadrže poznate koncentracije spoja željezo-1,10-fenantrolin opisane u poglavlju 3.2.2. Koncentracija željeza u otopini uzorka, a time i količina željeza sadržana u proizvodu, može se naknadno izračunati.



**Slika 11.** Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji  $\text{Fe}^{2+}$  u otopini.

Jednadžba pravca dobivena iz kalibracijske krivulje iznosi  $y = 0,2025x + 0,0005$ , uz koeficijent korelacije  $R^2 = 0,9998$ . Na temelju ovih rezultata zaključuje se da je analitička metoda linearna i prikladna za određivanje koncentracije željeza u analiziranim uzorcima.

## 4.2. Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ)

Preporučuje se izračun temeljen na standardnoj devijaciji odgovora (SD) i nagibu ili osjetljivosti (S) kalibracijske krivulje u području blizu granice (66).

Za određivanje granice dokazivanja (LOD) koristi se sljedeća jednadžba:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \text{SD}}{S}$$

Za granicu određivanja (LOQ) jednadžba glasi:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{S}$$

U dobivenoj jednadžbi pravca, nagib regresijskog pravca (S) iznosi 0,2025, dok standardna devijacija (SD) iznosi 0,003911. Prema prethodno opisanim formulama, izračunate su granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ), a dobivene vrijednosti su:

$$\text{LOD} = 0,063728 \text{ mg/L (ppm)}$$

$$\text{LOQ} = 0,193116 \text{ mg/L (ppm)}$$

## 4.3. Rezultati određivanja sadržaja spektrofotometrijom

Koncentracija željeza u otopinama uzoraka određena je pomoću prethodno izrađene kalibracijske krivulje (slika 11). Otopine uzoraka pripremljene su prema postupku opisanom u poglavljima 3.2.4. i 3.2.5. U njima je izmjerena sadržaj željeza. Dobivene vrijednosti uspoređene su s deklariranim sadržajem željeza, a rezultati su prikazani u tablici 5. Na temelju dobivene masene koncentracije izračunata je količina željeza u analiziranim uzorcima.

Da bi se dobila srednja masa kapsule/tablete zbraja se masa 10 dozirnih oblika, a zatim se taj broj dijeli sa 10. U tablici 4 su prikazane mase pojedinačnog dozirnog oblika (tablete ili kapsule) za svaki pripravak, zajedno sa srednjom masom dozirnog oblika i standardnom devijacijom.



**Tablica 4.** Mase pojedinačnih dozirnih oblika (tablete/kapsule) dobivene vaganjem na analitičkoj vagi i srednja masa tablete/kapsule

Dozirni oblik	m (tablete/kapsule) (g)			
	Pripravak 1	Pripravak 2	Pripravak 3	Pripravak 4
1	0,4939	0,4671	0,4889	0,648
2	0,4883	0,4747	0,4938	0,6311
3	0,4837	0,4294	0,4555	0,6472
4	0,4882	0,4629	0,4789	0,642
5	0,4853	0,4670	0,4971	0,6425
6	0,4847	0,4701	0,4999	0,6486
7	0,4866	0,4687	0,4688	0,6568
8	0,4856	0,4760	0,4733	0,6417
9	0,4838	0,4720	0,4998	0,6314
10	0,4869	0,4551	0,4844	0,6608
<b>Δm (tablete/kapsule) (g)</b>	0,4867	0,4640	0,4840	0,6450
<b>SD</b>	0,0030	0,0137	0,0148	0,0095

Δm (tablete) – srednja masa tablete/kapsule

SD – standardna devijacija

Koncentracije željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) u uzorcima izračunate su pomoću sljedećih izraza.

$$y = 0,2025x + 0,0005 \text{ (jednadžba pravca)}$$

$$A \equiv y$$

$$\gamma_3 \equiv x$$

Spektrofotometrijsko mjerenje se provodilo na pripremljenom uzorku. Iz svakog uzorka se provodi mjerenje u triplikatu, a dobivene apsorbancije su prikazane u tablici 5. Uvrštavanjem apsorbancija u jednadžbu pravca dobije se masena koncentracija,  $\gamma_3$ .

**Tablica 5.** Dobivene apsorbancije i koncentracije željeza

Mjerenje	Pripravak 1	Pripravak 2	Pripravak 3	Pripravak 4
A -1.	0,5733	0,1607	0,1163	0,0666
A -2.	0,5753	0,1627	0,1154	0,0646
A -3.	0,5737	0,1616	0,1150	0,0677
$\gamma_3(\text{Fe u uzorku})$ 1. (mg/L)	2,8285	0,7911	0,5721	0,3263
$\gamma_3(\text{Fe u uzorku})$ 2. (mg/L)	2,8383	0,8009	0,5674	0,3166

$\gamma_3(\text{Fe u uzorku})$ 3. (mg/L)	2,8306	0,7955	0,5656	0,3318
---	--------	--------	--------	--------

A- apsorbancija

$\gamma_3$ - masena koncentracija (mg/L) u pojedinom mjerenju

Masena koncentracija  $\gamma_3$  dobivena iz mjerenih apsorbancija je koncentracija razrijeđenog uzorka. Da bi se dobila koncentracija  $\gamma_1$  u otopini uzorka od 1L, koriste se formule razrjeđenja:

$$\gamma_2 \times V_2 = \gamma_3 \times V_3$$

$$\gamma_2 = \frac{\gamma_3 \times V_3}{V_2}$$

$$V_3 = 0,1 \text{ L}$$

$$V_2 = 0,005 \text{ L (5 mL)}$$

$\gamma_2$  je masena koncentracija u tikvici od 0,1 L (100 mL) od koje je uzimano 0,005 L otopine uzorka ( $V_2$ ).

$$\gamma_1 \times V_1 = \gamma_2 \times V_2$$

$$\gamma_1 = \frac{\gamma_2 \times V_2}{V_1}$$

$\gamma_1$  je masena koncentracija željeza u tikvici od 1 L.

$$V_2 = 0,1 \text{ L}$$

$$V_1 = 0,005 \text{ L (volumen uzorka koji se uzima iz tikvice od 1L)}$$

Iz  $\gamma_1$  (masena koncentracija u tikvici od 1L) se izračuna masa  $\text{Fe}^{2+}$  u svih 10 tableta/kapsula te se dijeljenjem sa 10 dobije masa  $\text{Fe}^{2+}$  u pojedinačnoj tableti/kapsuli što je prikazano u tablici 6.

$$\gamma_1 = \frac{m}{V_1}$$

**Tablica 6.** Sadržaj željeza u tabletama/kapsulama

Mjerenje	Pripravak 1	Pripravak 2	Pripravak 3	Pripravak 4
<b>m (Fe<sup>2+</sup>) 1 (mg)</b>	113,1412	31,6440	22,8831	13,0538
<b>m (Fe<sup>2+</sup>) 2 (mg)</b>	113,5320	32,0364	22,6942	12,6630
<b>m (Fe<sup>2+</sup>) 3 (mg)</b>	113,2226	31,8195	22,6242	13,2739
<b>Δm (Fe<sup>2+</sup> u tbt/caps) (mg)</b>	113,2986	31,8333	22,7338	12,9969
<b>SD</b>	0,2062	0,1965	0,1339	0,3094
<b>deklarirana m (Fe<sup>2+</sup> u tbt/caps) (mg)</b>	115	28	20	14
<b>podudarnost eksperimentalnog s deklariranim (%)</b>	98,52	113,68	113,65	92,83

Δm (Fe<sup>2+</sup> u tableti/kapsuli) – srednja masa željeza u tableti/kapsuli

SD – standardna devijacija

#### 4.4. Rezultati ispitivanja oslobađanja željeza metodom disolucije

U metodi disolucije iz pripravaka se željezo oslobađa u 900 mL otopine medija. Uzorkovano je 5 mL alikvota u određenim vremenskim intervalima te se otopina uzorka pripremila prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6. Budući da se u svaki uzorak dodalo 1 ml stock otopine željeza 20 mg/L, dobivena masena koncentracija željeza u alikvotu ( $\gamma_2$ ) se oduzimala sa koncentracijom dodanog spike-a 0,2 mg/L.

Da bi se dobila masena koncentracija željeza u mediju ( $\gamma_1$ ) koristi se formula za razrjeđenje:

$$\gamma_1 \times V_1 = \gamma_2 \times V_2$$

$$\gamma_1 = \frac{\gamma_2 \times V_2}{V_1}$$

$$V_2 = 0,1 \text{ L}$$

$$V_1 = 0,005 \text{ L (aliquot 5 mL)}$$

Srednja masa oslobođenog željeza u mediju dobiva se iz formule:

$$\gamma_1 = \frac{m}{V_1}$$

$$V_1 = 0,9 \text{ L (medij)}$$

U **Tablici 7** se nalaze srednje apsorbancije i pomoću njih izračunate srednje mase željeza u alikvotu za pripravak 1. Ostali podaci o oslobađanju željeza iz pripravka 1 navedeni su u **Tablici 8**.

**Tablica 7.** Srednje apsorbancije i srednje mase željeza određene u alikvotu pripravka 1

t (min)	$\Delta A$	SD	$\Delta \gamma_2$ (Fe <sup>2+</sup> u alikvotu) (mg/L)	$\Delta m$ (Fe <sup>2+</sup> u alikvotu) (mg)
5	0,0533	0,0044	0,0607	0,0003
10	0,0758	0,0067	0,1717	0,0009
15	0,0918	0,0086	0,2509	0,0013
30	0,1555	0,0036	0,5652	0,0028
45	0,2066	0,0144	0,8175	0,0041
60	0,2583	0,0197	1,0731	0,0054
90	0,3599	0,0316	1,5746	0,0079
120	0,4405	0,0222	1,9731	0,0099

$\Delta A$ - srednja apsorbancija alikvota

SD-standardna devijacija

$\Delta \gamma$  (mg/L) – srednja masena koncentracija željeza u alikvotu

$\Delta m$  (Fe<sup>2+</sup> u alikvotu)- srednja masa željeza u alikvotu

**Tablica 8.** Prikaz oslobađanja željeza iz kapsule pripravka 1

t (min)	$\Delta Q$ (mg)	SD	$\Delta Q'$ (mg)	SD	$\Delta Q_{exp}$ (%)	SD
5	1,0921	0,3892	1,0921	0,3892	0,9496	0,3385
10	3,0899	0,5953	3,0902	0,5952	2,6872	0,5176
15	4,5169	0,7666	4,5180	0,7665	3,9287	0,6666
30	10,1739	0,3231	10,1763	0,3232	8,8490	0,2811
45	14,7156	1,2831	14,7209	1,2832	12,8007	1,1158
60	19,3150	1,7502	19,3243	1,7507	16,8038	1,5223
90	28,3424	2,8066	28,3571	2,8078	24,6583	2,4415
120	35,5149	1,9747	35,5375	1,9766	30,9022	1,7188

$\Delta Q$  - srednja masa oslobođenog željeza u 900,00 mL

SD - standardna devijacija

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

$\Delta Q_{exp}$  (%) - srednji udio željeza oslobođen iz kapsule

U **Tablici 9** nalaze se srednje apsorbancije i pomoću njih izračunate srednje mase željeza u alikvotu za pripravak 2. Ostali podaci o oslobađanju željeza iz pripravka 2 navedeni su u **Tablici 10**.

**Tablica 9.** Srednje apsorbancije i srednje mase željeza određene u alikvotu pripravka 2

t (min)	$\Delta A$	SD	$\Delta \gamma_2$ ( $\text{Fe}^{2+}$ u alikvotu) (mg/L)	$\Delta m(\text{Fe}^{2+}$ u alikvotu) (mg)
5	0,0450	0,0001	0,0199	9,9E-05
10	0,0457	0,0007	0,0233	0,0001
15	0,0862	0,0015	0,2230	0,0011
30	0,3348	0,0081	1,4509	0,0073
45	0,3884	0,0090	1,7154	0,0086
60	0,3965	0,0037	1,7714	0,0089
90	0,3958	0,0043	1,7688	0,0088
120	0,3955	0,0037	1,7676	0,0088

$\Delta A$ - srednja apsorbancija alikvota

SD-standardna devijacija

$\Delta \gamma$  (mg/L) – srednja masena koncentracija željeza u alikvotu

$\Delta m$  ( $\text{Fe}^{2+}$  u alikvotu)-srednja masa željeza u alikvotu

**Tablica 10.** Prikaz oslobađanja željeza iz kapsule pripravka 2

t (min)	$\Delta Q$ (mg)	SD	$\Delta Q'$ (mg)	SD	$\Delta Q_{\text{exp}}$ (%)	SD
5	0,3582	0,0096	0,3582	0,0096	1,1253	0,0301
10	0,4203	0,0643	0,4204	0,0643	1,3206	0,2020
15	4,0146	0,1334	4,0147	0,1334	12,6131	0,5063
30	26,1171	0,7200	26,1180	0,7204	82,0547	2,2631
45	30,8769	0,9230	30,8849	0,9232	97,0307	1,5947
60	31,8849	0,3268	31,9016	0,3273	100,2249	1,0283
90	31,8376	0,3851	31,8631	0,3857	100,1041	1,2116
120	31,8167	0,3312	31,8512	0,3319	100,0665	1,0428

$\Delta Q$  - srednja masa oslobođenog željeza u 900,00 mL

SD - standardna devijacija

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

$\Delta Q_{\text{exp}}$  (%) - srednji udio željeza oslobođen iz kapsule

U **Tablici 11** nalaze se srednje apsorbancije i pomoću njih izračunate srednje mase željeza u alikvotu za pripravak 3. Ostali podaci o oslobađanju željeza iz pripravka 3 navedeni su u **Tablici 12**.

**Tablica 11.** Srednje apsorbancije i srednje mase željeza određene u alikvotu pripravka 3

t (min)	$\Delta A$	SD	$\Delta \gamma_2$ (Fe <sup>2+</sup> u alikvotu) (mg/L)	$\Delta m$ (Fe <sup>2+</sup> u alikvotu) (mg)
5	0,0448	0,0049	0,0106	5,3080E-05
10	0,0485	0,0078	0,0519	0,0003
15	0,0802	0,0014	0,2413	0,0012
30	0,2173	0,0061	0,8849	0,0044
45	0,2668	0,0038	1,1341	0,0057
60	0,2963	0,0056	1,2608	0,0063
90	0,2991	0,0066	1,2747	0,0064
120	0,2990	0,0066	1,2740	0,0064

$\Delta A$ - srednja apsorbancija alikvota

SD-standardna devijacija

$\Delta \gamma$  (mg/L) – srednja masena koncentracija željeza u alikvotu

$\Delta m$  (Fe<sup>2+</sup> u alikvotu)- srednja masa željeza u alikvotu

**Tablica 12.** Prikaz oslobađanja željeza iz kapsule pripravka 3

t (min)	$\Delta Q$ (mg)	SD	$\Delta Q'$ (mg)	SD	$\Delta Q_{exp}$ (%)	SD
5	0,3385	0,4339	0,3385	0,4339	2,7195	0,1690
10	0,6646	0,6901	0,6647	0,6902	4,9357	0,1919
15	3,4803	0,1249	3,4806	0,1249	15,3126	0,5494
30	15,6704	0,5452	15,6715	0,5452	68,9465	2,3985
45	20,0671	0,3359	20,0732	0,3350	90,7489	1,4740
60	22,6939	0,4977	22,7055	0,4970	99,8924	2,1867
90	22,9448	0,5902	22,9627	0,5898	101,0239	2,5949
120	22,9316	0,5845	22,9559	0,5843	100,9939	2,5705

$\Delta Q$  - srednja masa oslobođenog željeza u 900,00 mL

SD - standardna devijacija

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

$\Delta Q_{exp}$  (%) - srednji udio željeza oslobođen iz kapsule

U **Tablici 13** nalaze se srednje apsorbancije i pomoću njih izračunate srednje mase željeza u alikvotu za pripravak 4. Ostali podaci o oslobađanju željeza iz pripravka 4 navedeni su u **Tablici 14**.

**Tablica 13.** Srednje apsorbancije i srednje mase željeza određene u alikvotu pripravka 4

t (min)	$\Delta A$	SD	$\Delta \gamma_2$ (Fe <sup>2+</sup> u alikvotu) (mg/L)	$\Delta m$ (Fe <sup>2+</sup> u alikvotu) (mg)
5	0,0601	0,0015	0,0942	0,0005
10	0,0789	0,0033	0,1871	0,0009
15	0,0966	0,0045	0,2746	0,0014
30	0,1399	0,0055	0,4886	0,0024
45	0,1718	0,0035	0,6460	0,0032
60	0,1845	0,0020	0,7086	0,0035
90	0,1856	0,0012	0,7142	0,0036
120	0,1857	0,0012	0,7147	0,0036

$\Delta A$ - srednja apsorbancija alikvota

SD-standardna devijacija

$\Delta \gamma$  (mg/L) – srednja masena koncentracija željeza u alikvotu

$\Delta m$  (Fe<sup>2+</sup> u alikvotu)- srednja masa željeza u alikvotu

**Tablica 14.** Prikaz oslobađanja željeza iz tablete pripravka 4

t (min)	$\Delta Q$ (mg)	SD	$\Delta Q'$ (mg)	SD	$\Delta Q_{exp}$ (%)	SD
5	1,6227	0,0612	1,6952	0,1328	12,4918	0,4714
10	3,2098	0,1524	3,3678	0,2934	24,7132	1,1730
15	4,7320	0,2274	4,9447	0,3999	36,4380	1,7513
30	8,5222	0,4877	8,7983	0,4880	65,6260	1,2748
45	11,7923	0,1917	11,6337	0,3146	90,8201	1,4798
60	12,7543	0,1748	12,7627	0,1752	97,5292	0,7176
90	12,8564	0,1024	12,8684	0,1027	99,0636	0,7909
120	12,8649	0,1090	12,8805	0,1093	99,1572	0,8413

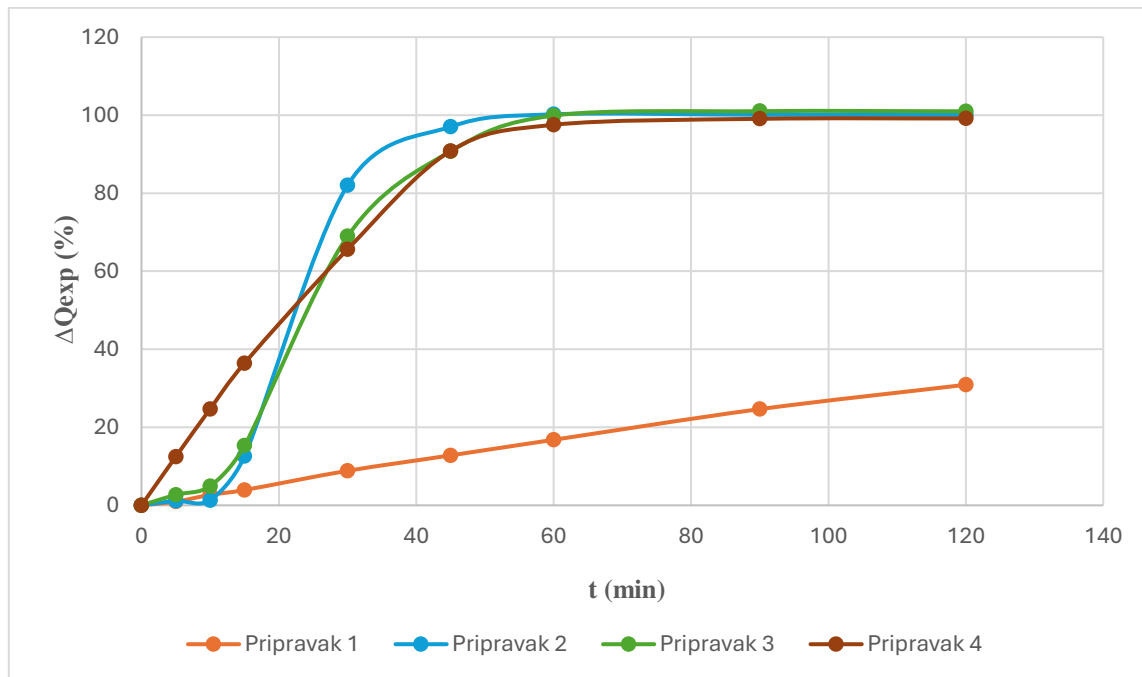
$\Delta Q$  - srednja masa oslobođenog željeza u 900,00 mL

SD - standardna devijacija

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

$\Delta Q_{exp}$  (%) - srednji udio željeza oslobođen iz tablete

Grafički prikaz oslobađanja željeza iz četiriju ispitivanih pripravka tijekom 120 minuta prikazan je na slici 12.



Slika 12. Krivulje oslobađanja željeza iz ispitivanih pripravaka za vrijeme trajanja disolucije.



## **5. RASPRAVA**

Analiza rezultata eksperimenta omogućila je procjenu količine željeza u ispitivanim pripravcima te usporedbu s deklariranim sadržajem. Među ispitivanim uzorcima nalazila su se tri dodatka prehrani te jedan lijek dostupan na recept. Korištenjem *in vitro* modela koji simulira uvjete u želučanom mediju, prikupljeni su podaci o oslobađanju željeza iz tih pripravaka.

Rezultati ispitivanja sadržaja željeza metodom spektrofotometrije pokazuju različit stupanj podudarnosti s deklariranim vrijednostima u ispitivanim pripravcima. Pripravak 1, registriran kao lijek u Republici Hrvatskoj, prema specifikacijama sadrži 350 mg željezova (II) fumarata što odgovara 115 mg elementarnog željeza. Eksperimentalno određeni sadržaj iznosi 98,52% u odnosu na deklariranu vrijednost. To je jedini pripravak među ispitivanim koji pokazuje visoku razinu podudarnosti što je u skladu s činjenicom da je jedini registriran kao lijek. Pripravak 2 navodi 28 mg željeza u obliku željezovog bisglicinata, dok je laboratorijskim mjerenjem utvrđeno 31,83 mg po kapsuli što čini 113,68 % deklariranog sadržaja. Kod pripravka 3, koji također sadrži željezo u obliku bisglicinata, deklarirana količina iznosi 20 mg, dok je analiza pokazala sadržaj od 22,73 mg što daje postotak usklađenosti od 113,65 %. Pripravak 4, s deklariranih 14 mg željeza, pokazao je eksperimentalni sadržaj od 12,99 mg, čime se postigla usklađenost od 92,83%.

Prema zahtjevima Ph. Eur., pripravak je prihvatljiv ako prosječni sadržaj 10 dozirnih jedinica varira unutar raspona od 90% do 110% deklariranih vrijednosti, dok pojedinačni sadržaj svake doze mora biti između 75% i 125% prosječnog sadržaja (67). Uzimajući u obzir ove standarde, pripravci 2 i 3 ne zadovoljavaju stupanj podudarnosti s deklariranim sadržajem željeza jer premašuju deklarirane vrijednosti. Pripravak 4 zadovoljava farmakopejske kriterije, dok pripravak 1 u potpunosti ispunjava zahtjeve. Budući da se radi o dodacima prehrani, oni nisu obvezni zadovoljiti kriterije Ph. Eur., za razliku od receptnog lijeka koji mora ispuniti navedene zahtjeve (68).

Metoda disolucije omogućila je usporedbu oslobađanja željeza iz ispitivanih pripravaka. Dobiveni rezultati pokazuju da su svi pripravci, osim pripravka 1, postigli potpuno oslobađanje željeza. U prvih 15 minuta najviše željeza je oslobođeno iz pripravka 4 koji se nalazi u obliku tablete. Ovo brzo početno oslobađanje može biti posljedica brže dezintegracije tablete u usporedbi s kapsulama. Međutim, u tridesetoj minuti uzorkovanja kod pripravka 2 je oslobođeno najviše željeza 82,05% te je iz njega najranije oslobođena cjelokupna količina željeza (približno unutar 45 minuta). Kod pripravka 3 i 4 željezo je potpuno oslobođeno unutar 60 minuta. Prema zahtjevima Ph. Eur. za pripravke s trenutnim oslobađanjem unutar prvih 45 minuta disolucije

se mora najmanje osloboditi 75% aktivne tvari. Svi pripravci osim pripravka 1 ispunjavaju ovaj zahtjev (49).

Pripravci 2 i 3 pokazuju slične profile oslobađanja što se može objasniti njihovim istim sastavom (oba sadrže željezo u obliku željezovog bisglicinata). Osim toga, oboje sadrže kapsulu od hidroksipropil metil celuloze. Pripravak 2 u jednoj kapsuli ima višu dozu željeza od pripravka 1. Treba napomenuti da oni pokazuju i jednako odstupanje od deklariranog sadržaja. Pripravci 2 i 4 sadrže i vitamin C koji povećava apsorpciju željeza (15), a količina vitamina C u pripravku 4 (180 mg) je tri puta veća od količine vitamina C u pripravku 2 (60 mg).

Pripravak 1, koji sadrži željezo u obliku fero fumarata, imao je najnižu stopu oslobađanja među ispitivanim pripravcima s 30,90% oslobođenog željeza do završetka praćenja disolucije. Budući da je riječ o pripravku registriranom kao lijek koji mora ispuniti stroge uvjete disolucije prema farmakopejskim standardima, korišteni eksperimentalni uvjeti nisu bili optimalni za njegovo potpuno otapanje. Fero fumarat stoga zahtijeva specifične uvjete poput drugačije pH vrijednosti medija ili prisutnosti surfaktanata kako bi se postigla adekvatna disolucija. Pronađeno je istraživanje koje je uključivalo kapsule fero fumarata koristeći aparaturu 2 s brzinom od 75 okretaja u minuti i 0,1 M klorovodične kiseline s 0,5% natrijevog lauril sulfata kao surfaktantom što su zahtjevi propisani za tabletu fumarata u USP (64). U ovom istraživanju je postignuto bolje oslobađanje budući da se nakon 60 minuta oslobodilo 70% željeza iz kapsule (69). Također ovaj pripravak je sadržavao 330 mg fero fumarata što je slično kao kod pripravka 1. Prema Ph. Eur. fero fumarat je slabo topljiv u vodi i vrlo slabo topljiv u alkoholu (70). Kod testiranja pripravaka koji sadrže slabo topljive aktivne tvari u medij se mogu dodati surfaktanti kako bi se poboljšala topljivost lijeka (49). Unatoč tome u literaturi je pronadeno da surfaktante treba izbjegavati kad se kapsula sastoji od želatine (kapsula pripravka 1) jer mogu reagirati s njom i utjecati na dezintegraciju i brzinu disolucije (52). U istraživanju u kojem je korištena Aparatura 2 s acetatnim puferom (pH 4,5) i brzinom od 50 okretaja u minuti, nakon 6 sati oslobođeno je 19,3% fero fumarata iz kapsule te 7,8% iz tablete (71). U ovom istraživanju postignuto je slabije oslobađanje nego u našem ispitivanju, i to tijekom dužeg vremena disolucije. Zanimljivo je spomenuti i istraživanje u kojem je ispitivana tableta fero fumarata, a korištena je Aparatura 1 kao i u našem istraživanju, ali s disolucijskim medijem promjenjivog pH od 1,5 do 6,9. Nakon 4 sata, tableta je oslobodila 48,5% fero fumarata. Unatoč višem stupnju oslobađanja u odnosu na prethodno istraživanje, primijećeno je da je oslobađanje fero fumarata i dalje ograničeno zbog njegove slabe topljivosti u kiselim uvjetima (72).

Prema SmPC-u pripravka 1 (73), fero fumarat se gotovo u potpunosti apsorbira iz probavnog sustava, a 4 sata nakon primjene postiže maksimalne koncentracije u plazmi. Ova činjenica može objasniti sporije oslobađanje u prvih 120 minuta budući da je formulacija prilagođena za otpuštanje željeza u duodenumu gdje je apsorpcija najefikasnija.

Nije pronađeno istraživanje koje ispituje disoluciju željezovog bisglicinata. Željezov glukonat je ispitivano u jednom od prethodno spomenutih istraživanja u kojem su dva pripravka pokazala različitu disoluciju. Jedan pripravak je oslobodio 92,1%, a drugi 66,6% željeza do kraja disolucije (71).

Pri provođenju ovog eksperimenta postojala su određena ograničenja. Budući da se željezo na tržištu pojavljuje u mnogo oblika, uspoređivana su tri različita oblika. Osim kapsula, ispitivana je i tableta. Sva pronađena istraživanja također su pristupila na sličan način (69,71,72). Ograničenja su bila prisutna i u provedbi metode disolucije jer je bilo potrebno odabrati jedinstvene uvjete ispitivanja. Stoga je korišten isključivo jedan medij- 900 mL 0,1 M HCl koja je jedan od najčešće korištenih medija (52). Brzina vrtnje uvijek je bila postavljena na 100 okretaja u minuti. U ovom istraživanju nije ispitan utjecaj promjene pH vrijednosti na brzinu oslobađanja željeza niti utjecaj promjene brzine vrtnje. Također nije ispitan utjecaj različitih surfaktanata koji se koriste kada je topljivost lijeka u mediju niska za poboljšanje topljivosti i postizanje uvjeta potpunog otapanja (49). Kao što je već spomenuto, zbog nedostatka utega za kapsule (engl. *sinker*), korištena je aparatura s košaricom (Aparatura 1), a ne Aparatura 2. Mijenjanje ovih parametara može utjecati na oslobađanje što bi pružilo dodatne podatke. Budući da su u svrhu izrade ovog diplomskog rada analizirana samo četiri pripravka, dobiveni podaci se ne mogu generalizirati.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Pripravci 1 i 4 pokazuju zadovoljavajući sadržaj željeza, dok se pripravci 2 i 3 ne nalaze unutar raspona propisanog prema Europskoj farmakopeji (Ph. Eur.). Pripravak 1, kao receptni lijek, mora udovoljavati ovim zahtjevima, dok dodaci prehrani nisu obvezni ispuniti iste kriterije. Ipak, pripravak 4 se nalazi unutar propisanog raspona.
2. Uočeno je određeno odstupanje u sadržaju između pripravka registriranog kao lijek i pripravka registriranih kao dodaci prehrani.
3. Tri pripravka postigla su potpuno oslobađanje željeza te su do 45. minute oslobodili više od 75% djelatne tvari pri čemu zadovoljavaju zahtjeve Ph. Eur. za pripravke s trenutnim oslobađanjem.
4. Pripravak 1, koji sadrži željezov (II) fumarat, pokazao je nepotpuno oslobađanje željeza u uvjetima korištenim tijekom disolucijskog ispitivanja.

## **7. LITERATURA**

1. Tandara L, Salamunic I. Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22:311-28.
2. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;202:199-211.
3. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. 2012;51:5705-24.
4. Ludwig H, Evstatiev R, Kornek G, Aapro M, Bauernhofer T i sur. Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wien Klin Wochenschr*. 2015;127:907-19.
5. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. 43. str.
6. Geissler C, Singh M. Iron, meat and health. *Nutrients*. 2011;3:283-316.
7. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 450-451.
8. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. 5. izdanje. Zagreb: Golden marketing-Tehnička knjiga; 2006. str. 331-332.
9. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 53356674, Heme b; [citirano 10. rujna 2024].  
Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Heme-b>
10. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852:1347-59.
11. Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*. 2013;93:1721-41.
12. Labar B , Hauptmann E i sur. Hematologija. 4. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2007. str. 28-29.
13. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 14 izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2020. str. 593-595.
14. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 571-571.



15. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 463.
16. Kumar A, Sharma E, Marley A, Samaan MA, Brookes MJ. Iron deficiency anaemia: pathophysiology, assessment, practical management. *BMJ Open Gastroenterol.* 2022;9:e000759.
17. Bulat M, Geber J, Lacković Z. Medicinska farmakologija. 2. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 1996. str. 333.
18. Li N, Zhao G, Wu W, Zhang M, Liu W i sur. The Efficacy and Safety of Vitamin C for Iron Supplementation in Adult Patients With Iron Deficiency Anemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open.* 2020;3:e2023644.
19. Zariwala MG, Somavarapu S, Farnaud S, Renshaw D. Comparison study of oral iron preparations using a human intestinal model. *Sci Pharm.* 2013;81:1123-39.
20. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur, urednici. Patofiziologija. 7. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 261-262.
21. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med.* 2015;372:1832-43.
22. Chaparro CM, Suchdev PS. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1450:15-31.
23. Labar B , Hauptmann E i sur. Hematologija. 4. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2007. str. 110.
24. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur, urednici. Patofiziologija. 7. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 821-823.
25. DeLoughery TG. Iron Deficiency Anemia. *Med Clin North Am.* 2017;101:319-332.
26. Lynch S, Pfeiffer CM, Georgieff MK, Brittenham G, Fairweather-Tait S i sur. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Iron Review. *J Nutr.* 2018;148(10):1001S-1067S.
27. Vrhovac B i sur. Interna medicina. 4 izdanje. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str. 931-936.
28. Skolmowska D, Głąbska D, Kołota A, Guzek D. Effectiveness of Dietary Interventions to Treat Iron-Deficiency Anemia in Women: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Nutrients.* 2022;14:2724.

29. Zhu Q, Qian Y, Yang Y, Wu W, Xie J i sur. Effects of carbonyl iron powder on iron deficiency anemia and its subchronic toxicity. *J Food Drug Anal.* 2016;24:746-753.
30. Hutchinson C, Al-Ashgar W, Liu DY, Hider RC, Powell JJ i sur. Oral ferrous sulphate leads to a marked increase in pro-oxidant nontransferrin-bound iron. *Eur J Clin Invest.* 2004;34:782-4.
31. Walker R, Edwards C, ur. *Klinička farmacija i terapija.* 2 izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2004. str. 712.
32. Polin V, Coriat R, Perkins G, Dhooge M, Abitbol V i sur. Iron deficiency: From diagnosis to treatment. *Dig Liver Dis.* 2013;45:803–9.
33. Stoffel NU, von Siebenthal HK, Moretti D, Zimmermann MB. Oral iron supplementation in iron-deficient women: How much and how often? *Mol Aspects Med.* 2020;75:100865.
34. Man Y, Xu T, Adhikari B, Zhou C, Wang Y i sur. Iron supplementation and iron-fortified foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;62:4504-4525.
35. Baza lijekova [Internet]. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. 2024 [citirano 20. kolovoza 2024.]. Dostupno na: <https://www.halmed.hr/lijekovi/baza-lijekova/>
36. Geisser P, Burckhardt S. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of iron preparations. *Pharmaceutics.* 2011;3:12-33
37. Di Francesco T, Delafontaine L, Philipp E, Lechat E, Borchard G. Iron polymaltose complexes: Could we spot physicochemical differences in medicines sharing the same active pharmaceutical ingredient? *Eur J Pharm Sci.* 2020;143:105180.
38. Lane DJ, Richardson DR. The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: much more than just enhanced iron absorption! *Free Radic Biol Med.* 2014;75:69-83.
39. Teucher B, Olivares M, Cori H. Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *Int J Vitam Nutr Res.* 2004;74:403-19.
40. Hanna M, Jaqua E, Nguyen V, Clay J. *B Vitamins: Functions and Uses in Medicine.* Perm J. 2022;26:89-97.
41. Cancelo-Hidalgo MJ, Castelo-Branco C, Palacios S, Haya-Palazuelos J, Ciria-Recasens i sur. Tolerability of different oral iron supplements: a systematic review. *Curr Med Res Opin.* 2013;29:291-303.

42. Schümamm K, Ettle T, Szegner B, Elsenhans B, Solomons NW. On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. *J Trace Elem Med Biol.* 2007;21:147-68.
43. Geisser P. In vitro studies on interactions of iron salts and complexes with food-stuffs and medicaments. *Arzneimittelforschung.* 1990;40:754–60.
44. Mikolašević I, Orlić L, Mavrinac V, Štimac D, Ostojić D i sur. Sigurnost dugotrajne primjene inhibitora protonske pumpe. *Med Flum.* 2016;52.
45. Gibson M, urednik. *Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form.* 2. izdanje. New York: Informa Healthcare; 2009. str. 248-253.
46. Taylor K, Aulton ME, urednici. *Aulton's Pharmaceutics: the design and manufacture of medicines.* 6. izdanje. London: Elsevier Health Sciences; 2022. str. 612-615.
47. Gibson M, urednik. *Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form.* 2. izdanje. New York: Informa Healthcare; 2009. str. 131.
48. Taylor K, Aulton ME, urednici. *Aulton's Pharmaceutics: the design and manufacture of medicines.* 6. izdanje. London: Elsevier Health Sciences; 2022. str. 316.
49. *European pharmacopoeia.* 6. izdanje. Strasbourg: Council of Europe; 2007. str. 263-275.
50. Dissolution specification for generic oral immediate release products - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA) [Internet]. 2017 [citirano 28. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/dissolution-specification-generic-oral-immediate-release-products-scientific-guideline>
51. FDA/CDER/"Yeaton A. *Dissolution Testing and Acceptance Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Form Drug Products Containing High Solubility Drug Substances Guidance for Industry.* 2018;
52. Taylor K, Aulton ME, urednici. *Aulton's Pharmaceutics: the design and manufacture of medicines.* 6. izdanje. London: Elsevier Health Sciences; 2022. str. 617-620.

53. Dissolution 1-on-1 [Internet]. [citirano 28. rujna 2024.]. Dostupno na:  
<https://www.collegeofpharmacy.com/callearningcentre/demonstrationCALPackages/Disso-lutionDemo/1Introduction/page-7.html>
54. Gibson M, urednik. Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. 2. izdanje. New York: Informa Healthcare; 2009. str. 254-255.
55. Christian G, Dasgupta P, Schug K. Analytical chemistry. 7. izdanje. Washington: Wiley; 2014. str. 477-481.
56. Christian G, Dasgupta P, Schug K. Analytical chemistry. 7. izdanje. Washington: Wiley; 2014. str. 494-497.
57. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler. Osnove analitičke kemije. 6. izdanje(englesko), prvo izdanje (hrvatsko). Zagreb: Školska knjiga; 1999. str. 516.
58. Chemistry LibreTexts [Internet]. 2013 [citirano 02. listopada 2024.]. 2.1.5: Spectrophotometry. Dostupno na:  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Kinetics/02%3A\\_Reaction\\_Rates/2.01%3A\\_Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/2.1.05%3A\\_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry)
59. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler. Osnove analitičke kemije. 6. izdanje(englesko), prvo izdanje (hrvatsko). Zagreb: Školska knjiga; 1999. str. 552-553.
60. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler. Osnove analitičke kemije. 6. izdanje(englesko), prvo izdanje (hrvatsko). Zagreb: Školska knjiga; 1999. str. 856-857.
61. Iron(2+);1,10-phenanthroline-1,10-diide [Internet]. PubChem. [citirano 29. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5232042>
62. Raguž A. Usporedba sadržaja željeza s dvije analitičke metode u uzorcima dodataka prehrani [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2021 [pristupljeno 02.10.2024.] Dostupno na:  
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:484199>
63. European pharmacopoeia. 6. izdanje. Strasbourg: Council of Europe; 2007. 441. str

64. Resources - Dissolution Methods Database: | USP [Internet]. [citirano 10. listopada 2024.]. Dostupno na: <https://www.usp.org/resources/dissolution-methods-database>
65. Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet. 2003:6-12.
66. Christian G, Dasgupta P, Schug K. Analytical chemistry. 7. izdanje. Washington: Wiley; 2014. str. 106-107.
67. European pharmacopoeia. 6. izdanje. Strasbourg: Council of Europe; 2007. 310. str.
68. Pravilnik o dodacima prehrani [Internet]. [citirano 05. listopada 2024]. Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_10\\_126\\_2740.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_10_126_2740.html)
69. Basualdo S, Torti H, Fuda J, Nuñez M, Segall AI. Comparison of Dissolution Profiles of Formulations Containing Ferrous Sulfate and Fumarate. *Dissolution Technol.* 2012;19:47–50.
70. European pharmacopoeia. 6. izdanje. Strasbourg: Council of Europe; 2007. 1883. str
71. Bannerman J, Campbell NRC, Hasinoff BB, Venkataram S. The dissolution of iron from various commercial preparations. *Pharm Acta Helv.* 1996;71:129–33.
72. Patrício JP, Santos C, Cerdeira R. In vitro dissolution profile of two commercially available iron preparations. *Drugs R D.* 2012;12:35-40.
73. Heferol 350 mg tvrde kapsule [Internet]. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. 2024 [citirano 10. listopada 2024.]. Dostupno na: <https://www.halmed.hr/lijekovi/baza-lijekova/Heferol-350-mg-tvrde-kapsule/11703/>

## **8. SAŽETAK**

**Cilj:** Cilj ovog istraživanja bio je analizirati sadržaj željeza u četiri oralna pripravka dostupna na hrvatskom tržištu te ispitati oslobađanje željeza iz tih pripravaka u mediju koji simulira želučanu sredinu.

**Materijali i metode:** Ispitivanjem su obuhvaćena četiri pripravka koja sadrže željezo u tri različita oblika. Jedan pripravak je registriran kao lijek i sadrži željezov (II) fumarat u obliku kapsule. Ostala tri pripravka su dodaci prehrani dostupni u slobodnoj prodaji. Od tih pripravaka, dva sadrže željezov bisglicinat u kapsulama, dok jedan sadrži željezov glukonat u obliku tablete. Za kvantifikaciju željeza korištena je spektrofotometrijska metoda, dok je za *in vitro* ispitivanje oslobađanja željeza primijenjena aparatura s košaricom (Aparatura 1). Korišteni uvjeti za disoluciju uključivali su 900 mL 0,1 M klorovodične kiseline kao medij, brzinu vrtnje od 100 okretaja po minuti, temperaturu od  $37 \pm 0,5$  °C u trajanju od 120 minuta.

**Rezultati:** Pripravci uključeni u istraživanje pokazali su raznolike rezultate kod određivanja sadržaja željeza. Receptni pripravak pokazao je visoku podudarnost s deklariranim sadržajem, dok su ostali pripravci odstupali u različitoj mjeri. Dva pripravka su sadržavala više željeza od deklariranog (oko +13%), dok je jedan imao manje (-7,2%). Kod *in vitro* ispitivanja oslobađanja željeza tri pripravka su postigla potpuno oslobađanje željeza tijekom trajanja disolucije, dok je jedan pripravak pokazao značajno slabije oslobađanje unutar promatranog vremena.

**Zaključak:** Ispitani pripravci željeza pokazali su da deklarirani sadržaj varira ovisno o režimu izdavanja, budući da je od tri dodatka prehrane samo jedan bio unutar smjernica Ph. Eur. Na tržištu postoji veliki broj pripravaka s željezom koji se međusobno razlikuju po kemijskom obliku željeza, dozi i formulaciji pripravka. Također postoje i kombinirani pripravci sa željezom koji sadrže dodatne vitamine i minerale. Upravo zbog ovako velike raznolikosti, rezultati koji su dobiveni u ovom ispitivanju se ne mogu generalizirati na sve pripravke željeza koji su dostupni na tržištu. Međutim, može se uočiti da postoji odstupanje u sadržaju između ispitivanih pripravaka. Nijedan od testiranih dodataka prehrani nije pokazao usklađenost s deklariranim sadržajem u istoj mjeri kao pripravak registriran kao lijek. Postavljeni uvjeti disolucije nisu bili optimalni za otapanje receptnog pripravka dok su svi ispitani dodatci prehrane postigli potpuno oslobađanje željeza i ispunili zahtjeve farmakopeje za pripravke s trenutnim oslobađanjem.

## **9. SUMMARY**



**Diploma Thesis Title:** Examination of content and *in vitro* release of iron from oral pharmaceutical forms registered in Republic of Croatia

**Objectives:** The aim of this study was to analyze the iron content in four oral preparations available on the Croatian market and to examine the release of iron from these preparations in a medium that simulates the gastric environment.

**Material and methods:** The study included four preparations containing iron in three different forms. One preparation is a prescription drug containing iron fumarate in capsule form. The other three are dietary supplements available over-the-counter. Of these, two contain iron bisglycinate in capsules, while one contains iron gluconate in tablet form. A spectrophotometric method was used for the quantification of iron, and a basket apparatus (Apparatus 1) was used for testing *in vitro* dissolution. The dissolution conditions included 900 mL of 0.1 M hydrochloric acid as the medium, a rotation speed of 100 rpm, and a temperature of  $37 \pm 0.5$  °C over a period of 120 minutes.

**Results:** The preparations included in the study showed varying results in terms of iron content. The prescription preparation demonstrated a high level of consistency with the declared iron content, while the other preparations deviated to different extents. Two preparations contained more iron than declared (around +13%), while one had less (-7.2%). In the *in vitro* iron release testing, three preparations achieved complete iron release during the dissolution period, while one preparation exhibited significantly slower release within the observed timeframe.

**Conclusion:** The tested iron preparations exhibited variability in their declared content depending on the dispensing regime, with only one of the three dietary supplements complying with Ph. Eur. guidelines. There is a wide variety of iron products on the market that differ in terms of the chemical form of iron, dosage, and formulation. Additionally, combination products containing iron along with other vitamins and minerals are also available. Due to this diversity, the results obtained in this study cannot be generalized to all iron preparations available on the market. However, discrepancies in iron content were observed among the tested preparations. None of the dietary supplements demonstrated the same level of consistency with the declared content as the prescription drug. The dissolution conditions used were not optimal for the prescription preparation, whereas all the tested dietary supplements achieved complete iron release and met the pharmacopeial requirements for immediate-release preparations.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podaci:****Obrazovanje:**

- 2006. - 2014. - Osnovna škola Blato
- 2013. - 2017. - Srednja škola „Ivo Padovan“ Blato– gimnazija, opći smjer
- 2019. - 2024. - Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko - tehnološki fakultet, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

**Materinski jezik:**

- hrvatski

**Ostali jezici:**

- engleski jezik

**Radno iskustvo:**

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

**Posebne vještine:**

- Rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000
- Položen vozački ispit B kategorije