

Kompatibilnost tiopurinskih imunosupresiva s folnom kiselinom i moguće interakcije s pripravcima odabranih biljnih vrsta

Brusač, Edvin

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:520173>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Edvin Brusač

**KOMPATIBILNOST TIOPURINSKIH
IMUNOSUPRESIVA S FOLNOM
KISELINOM I MOGUĆE INTERAKCIJE S
PRIPRAVCIMA ODABRANIH BILJNIH
VRSTA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Edvin Brusač

**KOMPATIBILNOST TIOPURINSKIH
IMUNOSUPRESIVA S FOLNOM
KISELINOM I MOGUĆE INTERAKCIJE S
PRIPRAVCIMA ODABRANIH BILJNIH
VRSTA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Ana Mornar Turk

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Edvin Brusač

**COMPATIBILITY OF THIOPURINE
IMMUNOSUPPRESSANTS WITH FOLIC
ACID AND THEIR POTENTIAL
INTERACTIONS WITH PREPARATIONS
OF SELECTED HERBAL SPECIES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Professor Ana Mornar Turk, PhD

Zagreb, 2022

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio eksperimenata proveden je na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, Zavodu za opću i anorgansku kemiju i Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Rad je financiran projektom Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva“ (HRZZ-UIP-2017-05-3949).



ZAHVALE

Hvala mentorici prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na pruženoj prilici, prenešenom znanju i savjetima te pozitivnoj atmosferi u svim trenucima.

Hvala i prof. dr. sc. Biljani Nigović na uvođenju te usmjeravanju mojih znanstvenih interesa ka analitici te mnoštvu savjeta koje je uvijek spremna dati.

Hvala dr. sc. Mariu-Liviu Jeličiću na mnogim raspravama i promišljanjima o znanstvenim mukama, ali i dobroj zabavi. Hvala i Lu Turković, mag. pharm., na uvijek veseloj atmosferi i raspravama. Hvala Zvonimiru Mlinariću, mag. pharm. te Jeleni Kovačić, mag. appl. chem. na dobrom raspoloženju na Zavodu.

Izv. prof. dr. sc. Mirandi Sertić i doc. dr. sc. Danieli Amidžić Klarić hvala na svim savjetima. Hvala i našoj tehničarki Đurđici Nestić na svakodnevnoj nasmijanosti koja je uvijek popravila dan.

“Asistentsko-docentskoj” ekipi s faksa hvala na svim veselim druženjima, smijehu i korisnim raspravama.

Mojim prijateljima Dinku, Ani-Mariji, Hani, Ivanu, Tomislavu, Barbari, Luciji, Ivoni, Mariji, zborasima... i svima drugima veliko hvala na prijateljstvu.

Na kraju, najveće hvala roditeljima Žani i Mladenu, sestri Lari, kao i cijeloj mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i potpori kroz cijeli život i školovanje. Bez njih ne bih bio gdje jesam.

SAŽETAK

U terapiji upalnih bolesti crijeva, kao i svih kroničnih bolesti, česti su problemi poput neadherencije te konzumacije neprovjerenih dodataka prehrani koja može dovesti do interakcija s farmakoterapijom, što utječe na kvalitetu života bolesnika. Cilj ovog rada je bio steći uvid u navedene probleme i potencijalna rješenja: specifično za terapiju tiopurinskim imunosupresivima, ispitati kompatibilnost azatioprina, odnosno 6-merkaptopurina i folne kiseline u svrhu mogućnosti izrade fiksnih kombinacija lijekova i poboljšanja adherencije, ispitati sadržaj aktivnih tvari biljnih droga i njihovih pripravaka korištenih u komplementarnoj terapiji upalnih bolesti crijeva (podanka kurkume, lista justicije, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra) u proizvodima dostupnima lokalno i putem interneta te procijeniti interakciju pripravaka navedenih droga i tiopurinskih imunosupresiva u pogledu distribucije i metabolizma. U slučaju azatioprina i folne kiseline, ispitivanja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom uputila su na moguću nekompatibilnost, ali studijom izotermalnog stresa, studijama prisilne razgradnje i ispitivanjem oslobađanja u biorelevantnom mediju ova tvrdnja je opovrgnuta. U slučaju 6-merkaptopurina i folne kiseline, sva ispitivanja utvrdila su kompatibilnost, no oprez je potreban kod odabira pomoćnih tvari zbog drastične razgradnje 6-merkaptopurina u smjesi ljekovitih oblika u lužnatim uvjetima. Dakle, fiksne kombinacije lijekova mogu se izraditi korištenjem jedinstvene formulacijske smjese. Kod aktivnih tvari u biljnim drogama i njihovim pripravcima, velike razlike u sadržaju i diskrepancije između nađenog i deklariranog sadržaja pronađene su za većinu proizvoda kupljenih putem internetske trgovine, što signalizira da je potrebno povećati svijest korisnika o rizicima kupnje sličnih pripravaka iz neprovjerenih izvora. Naposljetku, aktivne sastavnice i/ili ekstrakti odabranih droga nisu pokazali interakciju s 6-merkaptopurinom u vezanju na humani serumski albumin niti fiziološki relevantnu inhibiciju tiopurin metiltransferaze, no inhibicija ksantin oksidaze ekstraktom lista justicije ($K_i \sim 55 \mu\text{g/mL}$) mogla bi dovesti do promjena u razinama aktivnih metabolita 6-merkaptopurina; navedeni rezultat potrebno je potvrditi *in vivo* ispitivanjima. Zaključno, saznanja ostvarena u ovom doktorskom radu rasvjetljuju problematiku fiksnih kombinacija lijekova, kakvoće dodataka prehrani i interakcije hrana-lijek u pogledu tiopurinskih imunosupresiva te mogu biti iskorištena za unaprjeđenje kvalitete života bolesnika koji boluju od upalnih bolesti crijeva.

Ključne riječi: tiopurinski imunosupresivi, folna kiselina, kompatibilnost, biljni dodaci prehrani

SUMMARY

Background and aim: Inflammatory bowel diseases are a group of chronic diseases characterised by increasing prevalence and low mortality. Due to the fluctuations of the disease progression, periods of remission and periods of relapse (flare-ups) are common, each with their corresponding therapy. During remission, thiopurine immunosuppressants azathioprine and 6-mercaptopurine are most commonly used in mild to moderate cases. Folic acid, an important nutrient deficient in these patients, is often coprescribed, which increases the patients' pill burden and reduces adherence to therapy. Moreover, these patients often resort to use of herbal supplements based on turmeric, green chiretta, Indian frankincense and black pepper, the active substances of which have been shown to exert beneficial effects in inflammatory bowel disease therapy. The common problem is their low quality, either in terms of safety (heavy metals, pesticides or residual solvents above allowed limits or extremely high content of active substances) or efficacy (adulterated products, products very low in active substance content). In the age of the Internet, purchase of such products online is ever increasing, and, paradoxically, their quality is decreasing. Another potential problem is the interaction of food and herbal supplements with pharmacotherapy. Pharmacokinetics of thiopurine immunosuppressants are a point of interest here: azathioprine rapidly hydrolyses to 6-mercaptopurine *in vivo*, which is about 20% bound to human serum albumin; the metabolism following this step is extremely complex. Two inactivation pathways, via xanthine oxidase and thiopurine methyltransferase, are variable and susceptible to external activity modulation, while the activation pathway produces cytotoxic 6-thioguanine nucleotides responsible for the therapeutic effect. It follows that the herbal supplements could cause displacement or increased binding of 6-mercaptopurine, as well as modulation of thiopurine methyltransferase and xanthine oxidase pathways, thus leading to changes in active metabolite concentrations and therapeutic outcomes. The aims of this work included elucidating the aforementioned problems and proposing potential solutions to increase the patients' quality of life. In terms of low adherence, fixed dose combinations could be a potential solution, but compatibility of active substances needs to be tested first; the first aim was, therefore, to conduct a compatibility study of azathioprine and folic acid, as well as 6-mercaptopurine and folic acid, to decide on the dosage form (monolayer or multilayer tablets). The next aim was to investigate the quality of products based on turmeric, green chiretta, Indian frankincense and black pepper available locally and online in terms of their active substance (curcuminoids, andrographolides, boswellic acids and piperine) content.

Consequently, one could compare the quality of two groups of products (purchased from credible vendors and online from questionable sources) and draw conclusions based on the results. Assessment of *in vitro* potential of human serum albumin competition and relevant enzyme inhibition by active substances/extracts of selected herbal drugs was the last aim, which would shed light on potential dangers of using these products concomitantly with thiopurine immunosuppressants.

Methods: Compatibility studies were conducted using various techniques and approaches: differential scanning calorimetry, isothermal stress testing, stability in biorelevant media, forced degradation studies and Fourier transform infrared spectroscopy. For the needs of some approaches, stability-indicating high performance liquid chromatography methods were developed and validated. Active substance content in herbal drugs and their preparations was assessed using high performance liquid chromatography; the method was developed and validated, while the extraction optimization was conducted using a three-factorial Box-Behnken design. Competition studies on human serum albumin were conducted on a biomimetic human serum albumin chromatographic column. Extent of binding of selected active substances was determined, frontal analysis was used to assess the binding mode of 6-mercaptopurine to human serum albumin and zonal elution studies (done by injecting 6-mercaptopurine in mobile phases containing increasing amounts of herbal active substances) were used to observe potential changes in 6-mercaptopurine binding. Thiopurine methyltransferase inhibition studies were done *ex vivo* using a volunteer's hemolysate. Activity of the enzyme was tracked as 6-methylmercaptopurine formation, which was quantified using a newly developed and validated chromatographic method. Xanthine oxidase inhibition studies were done using a commercial enzyme and the activity was assayed spectrophotometrically by formation of 6-thiouric acid.

Results: In initial screening of azathioprine and folic acid compatibility, differential scanning calorimetry did not give encouraging results: the peak of folic acid shifted up to 6 °C, while the azathioprine peak was not present in some blends. However, isothermal stress testing revealed no major differences in recoveries of active substances in stressed and control samples, azathioprine and folic acid were stable in the biorelevant medium in each other's presence and forced degradation studies showed similar degradation profiles for pure substances, their blends and the dosage form blend (which contains excipients). Thus, it can be concluded that azathioprine and folic acid are compatible and direct contact should not affect the stability. As for the 6-mercaptopurine and folic acid, differential scanning

calorimetry gave clearer results, but again a shift of up to 8 °C was observed. This was thought to be because of the lower purity of the substance in the blends as all of the other approaches showed no interaction between the active substances: no significant differences in recoveries were seen in isothermal stress testing, dissolution profiles were not remarkably different for individual dosage forms and their combination, no loss of infrared spectrum bands or their shifts were observed (which was confirmed using principal component analysis and cluster analysis) and forced degradation studies showed similar degradation profiles for the blends of active substances compared to their profiles individually. There was, however, a drastic decrease in 6-mercaptopurine concentration in the dosage form blend when exposed to basic conditions: the cause of the phenomenon is presumed to be the interaction of 6-mercaptopurine with one or more excipient degradants. To conclude, compatibility of 6-mercaptopurine and folic acid was confirmed, but care should be exercised when choosing excipients for the final dosage form. Both active substance combinations were shown to be compatible and a monolayer dosage form could be made after excipient compatibility testing.

Regarding active substance content in herbal drugs and their preparations, extraction was optimized using a representative herbal drug mixture, while the factors were ethanol ratio in the extraction solvent, extraction temperature and sonication time. The parameters yielding maximum content of all active substances were 81.5% (*V/V*) ethanol in the hydroethanolic solvent, 60 °C extraction temperature and 30 min sonication time; model desirability was 0.927. The model was validated and the bias was lower than 3.98%, signifying good predictive power. Out of 54 samples analyzed, about half did not comply with relevant regulations in some way, mostly demonstrating very low active substance content. While these products imply inefficacy, two products showed very high amounts of piperine and andrographolides, which could cause pharmacokinetic interactions and dose-dependent adverse effects, respectively. It should be noted that both products with critically low and extremely high amounts of active substances were purchased from online sources, signifying the need for better quality control.

Lastly, interaction testing was conducted. Regarding human serum albumin binding, firstly binding of active substances of selected herbal species was assessed: all of the substances bound in extent equal to or higher than 80.1% (some boswellic acids even up to 99.8%), implying they could potentially cause changes in 6-mercaptopurine binding. Frontal analysis with increasing concentrations of 6-mercaptopurine in the mobile phase revealed multiple binding sites on human serum albumin. Zonal elution showed no changes in capacity factors

of 6-mercaptopurine when increasing concentrations of herbal active substances were applied in the mobile phase. Although they likely share the same binding sites on the human serum albumin, it is possible that the displacement of 6-mercaptopurine from its primary site only causes it to bind to the secondary site, thus not changing the extent considerably. As for the thiopurine methyltransferase inhibition, kinetics with respect to 6-mercaptopurine (substrate) and S-adenosylmethionine (cofactor) were examined. It was shown the kinetics followed the Michaelis-Menten model, with K_m values of 240 μM for 6-mercaptopurine and 7.5 μM for S-adenosylmethionine. Inhibition studies revealed high IC_{50} values (above 275 $\mu\text{g/mL}$) compared to reference inhibitor furosemide ($\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$), so it was concluded inhibition was physiologically improbable. Xanthine oxidase kinetics also followed the Michaelis-Menten model with a K_m value of 9.0 μM . Turmeric, Indian frankincense and black pepper extracts demonstrated no viable inhibitory effect. Green chiretta leaf extract, on the other hand, inhibited xanthine oxidase with an IC_{50} value of 105 $\mu\text{g/mL}$. Although this is two orders of magnitude higher compared to reference inhibitor allopurinol ($\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$), the potential of inhibition lies in high concentrations of the extract in the intestinal lumen, where it is available to intestinal xanthine oxidase. The inhibition of the extract was shown to be of the competitive type with an inhibitory constant (K_i) of about 55 $\mu\text{g/mL}$, which agrees well with the Cheng-Prusoff equation. Andrographolide and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide did not inhibit xanthine oxidase, so the inhibitory potential is presumed to originate from flavonoids, mainly apigenin. Therefore, care should be taken when using green chiretta preparations concomitantly with thiopurine immunosuppressants. These results should be confirmed *in vivo*.

Conclusion: This work presents the elucidation of common problematic in inflammatory bowel disease therapy. From the findings, it can be concluded that a monolayer fixed dose combination of azathioprine and folic acid, as well as 6-mercaptopurine and folic acid, can be produced, which might improve adherence in patients. Quality of herbal products bought online is generally low, so consumers should be directed at purchasing similar products from certified vendors such as pharmacies, thus improving outcomes. Finally, an interaction between green chiretta products and thiopurine therapy which could affect active metabolite levels is possible, so patients, but also health experts such as doctors or pharmacists, should be aware of this problem to help minimize or prevent it. All of the findings show potential for improving the quality of life of patients suffering from inflammatory bowel diseases.

Keywords: thiopurine immunosuppressants, folic acid, compatibility, herbal supplements

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Upalne bolesti crijeva.....	1
1.1.1. Etiologija i patogeneza upalnih bolesti crijeva	1
1.1.2. Klinička slika upalnih bolesti crijeva	2
1.1.3. Terapija.....	2
1.2. Tiopurinski imunosupresivi.....	3
1.2.1. Farmakokinetika i farmakodinamika	4
1.2.2. Tiopurin metiltransferaza i tiopurinski imunosupresivi	5
1.2.3. Ksantin oksidaza i tiopurinski imunosupresivi	7
1.3. Folna kiselina i važnost njene nadoknade u upalnim bolestima crijeva	8
1.4. Fiksne kombinacije lijekova i adherencija bolesnika prema propisanoj terapiji	9
1.4.1. Adherencija u upalnim bolestima crijeva.....	9
1.4.2. Fiksne kombinacije lijekova.....	10
1.4.2.1. Ispitivanje kompatibilnosti sastavnica fiksne kombinacije lijekova	11
1.5. Biljni dodaci prehrani u terapiji upalnih bolesti crijeva – problem kakvoće i interakcija s farmakoterapijom.....	13
1.5.1. Kakvoća biljnih dodataka prehrani	13
1.5.2. Biljni pripravci u terapiji upalnih bolesti crijeva	14
1.5.3. Problem interakcije dodataka prehrani i tiopurinskih imunosupresiva.....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Standardi i pomoćne tvari	18
3.1.2. Gotovi ljekoviti oblici	20
3.1.3. Otapala, soli, kiseline i lužine	20
3.1.4. Ostalo	21
3.1.5. Nepokretne faze korištene u razvoju kromatografskih metoda.....	21

3.2. Instrumentacija	22
3.3. Metode.....	23
3.3.1. Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti azatioprina i folne kiseline	23
3.3.1.1. Priprema krutina i otopina.....	23
3.3.1.2. Ispitivanja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom	24
3.3.1.3. Stabilitetno-indikativna HPLC metoda za istovremeno određivanje azatioprina i folne kiseline	24
3.3.1.4. Studije prisilne razgradnje.....	25
3.3.1.5. Studija izotermalnog stresa	26
3.3.1.6. Studije oslobađanja u biorelevantnom mediju	26
3.3.2. Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti 6-merkaptopurina i folne kiseline	27
3.3.2.1. Priprema krutina i otopina.....	27
3.3.2.2. Ispitivanja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom	28
3.3.2.3. Stabilitetno-indikativna HPLC metoda za istovremeno određivanje 6-merkaptopurina i folne kiseline	28
3.3.2.4. Studije prisilne razgradnje.....	29
3.3.2.5. Studija izotermalnog stresa	29
3.3.2.6. Ispitivanja infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom i multivarijatna analiza podataka.....	29
3.3.2.7. Studije oslobađanja u biorelevantnom mediju	30
3.3.3. Određivanje kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i piperina u biljnim drogama i njihovim pripravcima	30
3.3.3.1. Uzorci	30
3.3.3.2. Priprema otopina	33
3.3.3.3. Optimizacija ekstrakcijskog postupka korištenjem metodologije odzivne površine	33
3.3.3.4. Kromatografska analiza.....	33

3.3.3.5. Identifikacija acetiliranih bosveličnih kiselina pomoću masene spektrometrije	34
3.3.3.6. Validacija metode.....	34
3.3.4. Ispitivanje interakcije pripravaka lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra te 6-merkaptopurina u pogledu vezanja na humani serumski albumin	35
3.3.4.1. Priprema ekstrakata odabranih biljnih droga	35
3.3.4.2. Ispitivanje vezanja aktivnih sastavnica biljnih droga na humani serumski albumin.....	35
3.3.4.3. Ispitivanje načina vezanja 6-merkaptopurina na humani serumski albumin frontalnom analizom	37
3.3.4.4. Ispitivanje kompeticije aktivnih sastavnica/ekstrakta lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra te 6-merkaptopurina za vezanje na humani serumski albumin zonskom eluacijom	37
3.3.5. Ispitivanje inhibicije tiopurin metiltransferaze ekstraktima lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra.....	38
3.3.5.1. Uzorkovanje i predobradba krvi.....	38
3.3.5.2. Priprema i predobradba inkubata	38
3.3.5.3. Kromatografska analiza.....	39
3.3.5.4. Ispitivanje kinetike metilacije 6-merkaptopurina putem tiopurin metiltransferaze	39
3.3.5.5. Inhibicija tiopurin metiltransferaze ekstraktima odabranih biljnih droga	40
3.3.6. Ispitivanje inhibicije ksantin oksidaze ekstraktima lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra.....	40
3.3.6.1. Priprema inkubata	40
3.3.6.2. Praćenje aktivnosti ksantin oksidaze i ispitivanje kinetike oksidacije 6-merkaptopurina	40
3.3.6.3. Inhibicija ksantin oksidaze ekstraktima i aktivnim sastavnicama odabranih biljnih droga	41

3.3.7. Statistička analiza	41
4. REZULTATI I RASPRAVA	42
4.1. Studije kompatibilnosti azatioprina i folne kiseline	42
4.1.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija	42
4.1.2. Razvoj stabilitetno-indikativne HPLC metode za određivanje azatioprina i folne kiseline	43
4.1.2.1. Optimizacija uvjeta separacije	43
4.1.2.2. Validacija metode.....	45
4.1.3. Studije prisilne razgradnje na uzorcima azatioprina i folne kiseline	49
4.1.4. Studija izotermalnog stresa uzoraka azatioprina i folne kiseline	53
4.1.5. Procjena interakcije azatioprina i folne kiseline prilikom oslobađanja u biorelevantnom mediju.....	54
4.1.6. Pregled rezultata ispitivanja kompatibilnosti azatioprina i folne kiseline.....	55
4.2. Studije kompatibilnosti 6-merkaptopurina i folne kiseline	56
4.2.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija	56
4.2.2. Razvoj stabilitetno-indikativne HPLC metode za određivanje 6-merkaptopurina i folne kiseline	57
4.2.2.1. Odabir otapala za djelatne tvari, ljekovite oblike i placebo	57
4.2.2.2. Optimizacija uvjeta separacije	58
4.2.2.3. Validacija metode.....	59
4.2.3. Studije prisilne razgradnje na uzorcima 6-merkaptopurina i folne kiseline.....	61
4.2.4. Studije izotermalnog stresa uzoraka 6-merkaptopurina i folne kiseline	66
4.2.5. Analiza uzoraka 6-merkaptopurina i folne kiseline infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom	67
4.2.6. Procjena interakcije 6-merkaptopurina i folne kiseline u biološki relevantnom mediju.....	69
4.2.7. Pregled rezultata ispitivanja kompatibilnosti 6-merkaptopurina i folne kiseline...	70

4.3. Određivanje kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i piperina u biljnim drogama i njihovim pripravcima	71
4.3.1. Razvoj kromatografske metode za istovremeno određivanje kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i piperina	72
4.3.2. Identifikacija acetiliranih bosveličnih kiselina u realnom uzorku.....	74
4.3.3. Optimizacija ekstrakcije aktivnih tvari korištenjem metode odzivnih površina	75
4.3.4. Validacija metode.....	80
4.3.5. Sadržaj aktivnih sastavnica u uzorcima biljnih droga i pripravaka.....	86
4.4. Procjena interakcije droga i pripravaka lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra s 6-merkaptopurinom u pogledu vezanja na humani serumski albumin	93
4.5. Procjena inhibicijskog potencijala ekstrakata lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra prema tiopurin metiltransferazi.....	97
4.5.1. Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje aktivnosti tiopurin metiltransferaze u hemolizatu	97
4.5.2. Ispitivanje kinetike i optimizacija parametara enzimske metilacije 6-merkaptopurina putem tiopurin metiltransferaze.....	100
4.5.3. Ispitivanje utjecaja ekstrakata odabranih biljnih droga na aktivnost tiopurin metiltransferaze	102
4.6. Procjena inhibicijskog potencijala ekstrakata lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra prema ksantin oksidazi.....	103
4.6.1. Ispitivanje kinetike i optimizacija parametara enzimske oksidacije 6-merkaptopurina putem ksantin oksidaze.....	103
4.6.2. Ispitivanje utjecaja ekstrakata odabranih biljnih droga na aktivnost ksantin oksidaze.....	104
5. ZAKLJUČAK	108
6. POPIS LITERATURE	111
7. PRILOG	132
8. POPIS POKRATA I OZNAKA.....	141
9. ŽIVOTOPIS	145

1. UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel diseases*, IBD) kronične su, imunološki posredovane upalne bolesti multifaktorijalne etiologije, a uključuju Crohnovu bolest (engl. *Crohn's disease*, CD), ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC) i prijelazni oblik između dviju već spomenutih bolesti, tzv. nedeterminirani kolitis, prisutan u do 20 % bolesnika (1). Novija istraživanja procjenjuju da u Americi od IBD-a boluje oko 2 milijuna, a u Europi oko 3,2 milijuna ljudi (2). Iako se ove bolesti često nazivaju „bolestima zapadnog svijeta“, uočen je porast bolesnika u Aziji i Južnoj Americi, što se poklapa s industrijalizacijom te porastom stresa u populaciji. Utvrđeno je da u svijetu prevladava stopa incidencije od 5 do 15 na 100 000 osoba-godina, a doseže plato između 40 i 50 na 100 000 osoba-godina (2). S obzirom na to da je smrtnost bolesnika niža od stope incidencije, prisutan je specifičan fenomen eksponencijalnog porasta prevalencije IBD-a (3). Osim toga, stariji bolesnici često pate od komorbiditeta, što dodatno otežava terapiju. Zbog svih navedenih razloga, IBD su bolesti za koje se očekuje porast terećenja zdravstvenog sustava u bliskoj budućnosti (3).

1.1.1. Etiologija i patogeneza upalnih bolesti crijeva

Etiologija i patogeneza IBD-a vrlo su kompleksne. Nedavne studije sugeriraju kako su genetska podložnost, okoliš, intestinalna mikroflore i imunosni odgovor međusobno isprepleteni u patogenezi ovih bolesti. Jedan od bitnijih čimbenika za razvoj i progresiju IBD-a je genetska predispozicija: neke studije utvrdile su 163 genska lokusa povezanih s IBD-om (4), dok će taj broj sigurno rasti napretkom tehnologije. Neki od predloženih mehanizama podložnosti su genske varijante *NOD2* koji kodira za protein bitan u imunosnom odgovoru (5), *IL23R* koji kodira za receptor za proinflamatorni interleukin (IL)-23 (6) te *IL12B* koji kodira za podjedinice IL-12 i IL-23 (4). Što se tiče patologije, različit citokinski profil uočen je za CD i UC: u slučaju CD-a, puno je veći utjecaj pomagačkih T-stanica tipa 1 i 17, dok u UC-u prevladavaju citokini povezani sa pomagačkim T-stanicama tipa 2 (7), stoga i genetske varijante koje utječu na navedene profile imaju utjecaj na razvoj i progresiju bolesti.

Osim genetskih čimbenika, u etiologiji IBD-a bitnima su se pokazali i okolišni čimbenici. Nedavni pregled meta-analiza utvrdio je kako život u urbanoj sredini, upotreba antibiotika i oralnih kontraceptiva, konzumacija sahara, zaslađenih i gaziranih pića, pušenje

(kod UC-a) i pretjerana higijena u dječjoj dobi povećavaju rizik od IBD-a. S druge strane, majčino mlijeko, povećana fizička aktivnost, konzumacija čaja, visoke razine vitamina D i folata te pušenje (kod CD-a) pokazale su se protektivnima (2, 8). Intestinalna mikroflora je još uvijek upitan čimbenik: utvrđeno je kako bolesnici s IBD-om imaju smanjene udjele korisnih bakterija koljena i rodova *Firmicutes*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i dr., dok su povećani udjeli rodova *Pseudomonas*, *Helicobacter* i sl., no još nije razjašnjeno ima li navedena disbioza ulogu u patogenezi IBD-a ili je njihova posljedica (9).

1.1.2. Klinička slika upalnih bolesti crijeva

Ove bolesti primarno zahvaćaju gastrointestinalni trakt (GIT): iako se upale u CD-u mogu javiti duž cijelog GIT-a, najčešće su zahvaćeni terminalni ileum (47 % bolesnika), debelo crijevo (28 % bolesnika) te ileokolon (21 % bolesnika) (10). Osim toga, upala je transmuralna, tj. zahvaća sve slojeve crijevnih stijenke. U slučaju UC-a, upala zahvaća samo sluznicu, a proteže se od rektuma proksimalno te većinom zahvaća samo debelo crijevo. Od gastrointestinalnih simptoma najčešće se javljaju proljev, konstipacija, abdominalni grčevi, krv u stolici i tenezmi (11). Nerijetko se javljaju i ekstraintestinalne manifestacije bolesti koje uključuju artritis, nodozni eritem, gangrenoznu piodermu, aftozni stomatitis te iritis/uveitis, dok se rjeđe javljaju alopecija, ankilozni spondilitis, hemolitična anemija, pankreatitis, polimiozitis i dr. (12). Osim toga, zbog povećanog motiliteta te smanjene apsorpcijske sposobnosti uslijed oštećenja stijenke, nerijetko se javlja malapsorpcija raznih nutrijenata, među ostalima žučnih kiselina, vitamina i minerala (13), što posljedično dovodi do poremećaja uzrokovanih deficitom navedenih tvari.

1.1.3. Terapija

IBD su bolesti karakterizirane remisijama i relapsima. U fazama remisije postignuta je normalna učestalost stolica i mukozno cijeljenje te je smanjeno rektalno krvarenje. U novije vrijeme javlja se koncept „duboke remisije“, tj. mukoznog cijeljenja, biokemijske, kliničke i endoskopske remisije bolesti te kontrole simptoma, kao jedan od glavnih terapijskih ciljeva (14). S druge strane, u slučaju relapsa javljaju se upale, promjene u učestalosti i konzistenciji stolice, krvarenja i bol. S obzirom na relapsno-remitirajuću prirodu bolesti, i terapija korištena u određenoj fazi se razlikuje. Protuupalni aminosalicilati mesalazin, sulfasalazin, olsalazin i balsalazid najčešće se koriste u blažim oblicima bolesti te u emisijama relapsa u UC-u. Vrlo često su korišteni i tiopurinski imunosupresivi azatioprin (AZA) i 6-merkaptopurin (6MP) u

srednje teškim i teškim oblicima bolesti. Osim njih, drugi korišteni imunomodulatori su metotreksat, ciklosporin i takrolimus. U emisijama relapsa refraktornima na slabiju terapiju (tiopurinski imunosupresivi, aminosalicilati) indicirani su kortikosteroidi, no preporučena je samo kratkotrajna terapija ovim lijekovima zbog mnoštva nuspojava. Komplikacije u CD-u su često tretirane i antibioticima metronidazolom i ciprofloksacinom. U novije vrijeme u liječenju mnogih bolesti vrlo učinkovitom se pokazala biološka terapija (15). Najčešće korišteni biološki lijekovi u oblicima bolesti refraktornima na ostalu terapiju obuhvaćaju infliksimab, adalimumab, certolizumab (monoklonska protutijela protiv faktora nekroze tumora) (11), ustekinumab (monoklonsko protutijelo protiv IL12/23) (16, 17) i druge.

1.2. Tiopurinski imunosupresivi

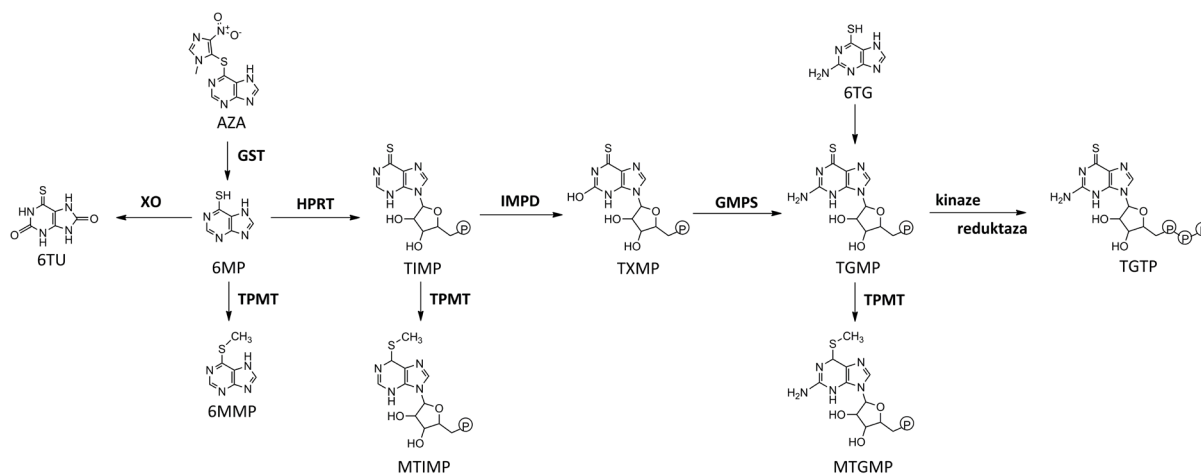
Tiopurinski imunosupresivi dobro su poznati lijekovi: prisutni su u kliničkoj primjeni od 1953. (6MP) i 1968. godine (AZA) nakon odobrenja Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) (18). Zbog nepovoljnog terapijskog profila 6MP, fokusiralo se na razvoj srodnih molekula pri čemu je otkriven AZA kao njegov prolijeak (19). Jedni su od najraširenijih lijekova u terapiji srednje teških do teških oblika IBD-a, dok su im druge indikacije reumatoidni artritis, sistemski eritematozni lupus, polimiozitis itd. Osim AZA i 6MP, sve više se primjenjuje i 6-tiogvanin (6TG) u slučaju rezistencije ili intolerancije na prethodno navedene (20, 21). Preporučeni su i za nastavak terapije u trudnica s IBD-om s obzirom na to da nije utvrđen rizik neželjenih ishoda trudnoće (22), kao ni imunoloških aberacija u djece izložene tiopurinskim imunosupresivima *in utero* i putem majčinog mlijeka (23, 24). Primjenjuju se oralno, svakodnevno u periodu od najmanje nekoliko mjeseci zbog odgođenog nastupa učinka; ravnotežno stanje postiže se nakon 2–4 tjedna (25). Što se tiče doziranja, uobičajene dnevne doze AZA u većine bolesnika iznose 2,0–2,5 mg/kg tjelesne težine, a one 6MP 1,0–1,5 mg/kg tjelesne težine (26). Doze rjeđe korištenog 6TG su nešto niže (10–40 mg dnevno) zbog moguće povezanosti s pojavom nodularne regenerativne hiperplazije kod visokih doza, iako je ta tema još uvijek predmet rasprave (27). Ovi lijekovi pokazuju dobru učinkovitost u terapiji IBD-a; međutim, njihove nuspojave su česte te sežu čak do 40 %, kako na o dozi ovisan, tako i na o dozi neovisan način (28). Najčešće se javljaju osip, vrućica, artralgijska, pankreatitis, gastrointestinalne smetnje, hepatotoksičnost i mijelotoksičnost (28, 29). Velik broj navedenih nuspojava povezan je s razgranatošću i varijabilnošću metaboličkih puteva tiopurinskih imunosupresiva, što će biti objašnjeno u narednim poglavljima.

1.2.1. Farmakokinetika i farmakodinamika

Farmakokinetika tiopurinskih imunosupresiva složena je, dok najkompleksniji stadij predstavlja metabolizam. Apsorpcija je nepotpuna i promjenjiva, a srednja bioraspoloživost 6MP nakon oralne primjene AZA iznosi 47 % (raspon 27–83 %) (30). AZA se u jetri i plazmi hidrolizira uz pomoć esteraza i glutation-S-transferaze (GST) u 6MP koji je glavni pokazatelj bioraspoloživosti (31). I AZA i 6MP se vežu na proteine plazme, pretežito na humani serumski albumin (HSA) oko 30 % (28, 32), dok je to relevantnije za 6MP zbog njegovog dužeg vremena polueliminacije iz plazme (33). Eliminacija se većinom odvija renalno (>50 %), a manjim dijelom hepatički (oko 12 % doze AZA, odnosno 22 % doze 6MP pronađeno je u 48-satnim uzorcima stolice) (28).

Kako bi se razumio mehanizam djelovanja tiopurina, prvo je potrebno objasniti njihov metabolizam. Osim AZA, i 6MP i 6TG moraju proći određenu bioaktivaciju kako bi ispoljili terapijski učinak. Ovdje dolazi do složenih procesa biotransformacije koji su u kompeticiji te dovode do nastanka aktivnih i inaktivnih metabolita (Slika 1). 6MP služi kao supstrat trima enzimskim putevima. Put ksantin oksidaze (engl. *xanthine oxidase*, XO) prvi je od dva inaktivacijska puta gdje se 6MP prevodi najprije u 6-tioksantin (engl. *6-thioxanthine*, 6TX), a zatim u 6-tiouričnu kiselinu (6TU), od kojih oba ne pokazuju farmakološko djelovanje. Oba navedena metabolita su najprisutnije forme izlučenog 6MP u urinu. Drugi inaktivacijski put, onaj tiopurin metiltransferaze (TPMT), prevodi 6MP u 6-metilmerkaptopurin (6MMP), također neaktivan, a prema nekim istraživanjima i metabolit odgovoran za hepatotoksičnost terapije (34, 35). Osim njega, TPMT metilira i ostale metabolite aktivacijske kaskade. S druge strane, aktivacijski put odvija se u više etapa: hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaza (HPRT) prevodi 6MP u 6-tioinozin monofosfat (TIMP), čiji je pak metilirani metabolit odgovoran za inhibiciju *de novo* sinteze purina. TIMP i njegov metabolit inhibiraju put sinteze purina blokadom stvaranja 1-aminoriboza-5-fosfata kao početnog spoja te inhibicijom adenilosukcinat sintaze koja metabolizira inozinsku kiselinu u daljnje purinske spojeve (36). Ovaj mehanizam specifično djeluje na limfocite koji ne posjeduju spasonosni (engl. *salvage*) metabolički put biosinteze purina (37), što u konačnici dovodi do njihove apoptoze te smanjenja pretjeranog imunosnog odgovora. Daljnjim biotransformacijama TIMP pomoću inozin monofosfat dehidrogenaze (IMPD) nastaje 6-tioksantozin monofosfat (TXMP); on se GMP sintazom (GMPS) prevodi u 6-tiogvanozin monofosfat (TGMP), jedan od 6-tiogvaninskih nukleotida (6TGN). TGMP ulazi u enzimsku kaskadu kinaza i reduktaza gdje

kao krajnji produkt nastaje 6-tiogvanozin trifosfat (TGTP); 6TGN se inkorporiraju u DNK te sprječavaju njenu replikaciju. Pretpostavlja se da su 6TGN glavni metaboliti odgovorni za terapijski učinak, videći da je veći broj studija i meta-analiza utvrdio povezanost viših razina 6TGN te kliničke remisije u CD-u i UC-u (38–40). Razine 6TGN oko $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrocita (u kojima se rutinski prati njihova koncentracija) smatraju se optimalnima za učinkovitost terapije; niže koncentracije povezane su s nesuradljivošću ili poddoziranjem, dok se kod viših koncentracija povećava rizik od nuspojava (41). Iako još postoje dvojbe o mehanizmu djelovanja 6TGN, najprihvaćenija teorija je ona o apoptozi posredovanoj mehanizmom popravka pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR). Naime, pri ugradnji 6TGN u DNK dolazi do ne-enzimske metilacije tiogvaninske baze koja zatim pokazuje najveći afinitet sparivanja s timinom. MMR mehanizam prepoznaje tiogvanin-timin nastali par kao replikacijsku grešku te uzrokuje apoptozu stanice (18, 42).



Slika 1. Metabolizam tiopurinskih imunosupresiva

Iako i aktivacijski putevi pokazuju određenu varijabilnost, najveći utjecaj na sigurnost i učinkovitost terapije imaju aktivnosti inhibicijskih puteva TPMT-a i XO-a. Samom promjenom aktivnosti jednog od inhibicijskih puteva, prema načelima enzimske kinetike, povećava/smanjuje se količina supstrata (6MP) dostupna ostalim metaboličkim putevima, što u konačnici dovodi do promjena u razinama 6TGN (43).

1.2.2. Tiopurin metiltransferaza i tiopurinski imunosupresivi

TPMT je citosolni enzim znatno eksprimiran u jetri i bubregu, dok su najniže razine zabilježene u mozgu i plućima. Dosad nisu pronađeni endogeni supstrati ovog enzima te njegova biološka uloga (izuzev metabolizma ksenobiotika poput tiopurina) nije utvrđena (44).

Aktivnost TPMT-a u bolesnika kojima je propisana ili će biti propisana tiopurinska terapija ključan je faktor za primjenjivost terapije općenito, a zatim i dozu koja će biti primijenjena. Interindividualna varijabilnost TPMT-a posljedica je polimorfizma *TPMT* gena. Naime, aktivnost TPMT-a nasljeđuje se kao monogensko kodominantno svojstvo (25). Četiri su vrste metabolizatora ovisno o varijantama *TPMT* gena: oko 0,3 % populacije pokazuje vrlo nisku aktivnost TPMT-a povezanu s dva nefunkcionalna alela, 11 % su intermedijarni metabolizatori s jednim funkcionalnim i jednim nefunkcionalnim alelom, 89 % su divlji tip, tj. posjeduju dva funkcionalna alela te pokazuju normalnu aktivnost TPMT-a, a novija istraživanja upućuju i na ultrabrze metabolizatore s više od dva funkcionalna *TPMT* alela (25, 41, 44). Istraživanja su pronašla oko 30 alelnih varijanti *TPMT*, dok tri polimorfizma (*TPMT*3A*, *TPMT*3C* i *TPMT*2*) opisuju 80–95 % smanjene aktivnosti bijelaca, Azijata i Afroamerikanaca (41). Kako se pri smanjenoj aktivnosti TPMT-a stvara više aktivnih 6TGN, u sporih i intermedijarnih metabolizatora javlja se rizik od opasne, pa čak i smrtonosne mijelosupresije (25). S druge strane, kod vrlo visokih aktivnosti TPMT-a i primjene uobičajenih doza tiopurina stvara se više 6-metilmerkaptopurin ribozida (6MMPR) potencijalno odgovornih za hepatotoksičnost, dok se razine 6TGN smanjuju, dovodeći bolesnike u subterapijski raspon. Više od 5700 pmol 6MMPR/ 8×10^8 eritrocita smatra se donjom granicom hepatotoksičnosti, dok je omjer 6MMPR/6TGN iznad 30 povezan s rezistencijom na tiopurinsku terapiju (41, 45). Praćenje aktivnosti TPMT-a, iako od nekih strana smatrano gubitkom novčanih i vremenskih resursa, provodi se genotipizacijom ili fenotipizacijom. Doza tiopurina je prilagođena ovisno o profilu TPMT aktivnosti: intermedijarnim metabolizatorima se propisuje 50 % uobičajene doze, dok se sporim metabolizatorima propisuje 10 % ili se razmatraju alternativne terapije (25, 26). Osim toga, terapijskim praćenjem 6MMPR i 6TGN moguće je titrirati dozu čime se poboljšavaju ishodi terapije, što se većinom i provodi u praksi (46).

Osim genetskog polimorfizma, i inhibicija TPMT-a ksenobioticima može utjecati na ishod terapije: Oselin i Anier su utvrdili kako često korišteni nesteroidni protuupalni lijekovi poput mefenaminske kiseline, naproksena, ketoprofena te drugi lijekovi u terapiji IBD-a poput olsalazina inhibiraju TPMT u *in vitro* uvjetima (47). Blaker i sur. ustanovili su kako i primjena alopurinola inhibira TPMT putem 6TX, što su ispitali u eritrocitima (48). Naravno, navedene je rezultate potrebno potvrditi kliničkim studijama.

1.2.3. Ksantin oksidaza i tiopurinski imunosupresivi

XO, drugi enzim odgovoran za varijabilnosti u metabolizmu tiopurina, homodimer je molekulske mase 290 kDa. Pripada obitelji molibden-proteina, a svaka od podjedinica sadrži atom molibdena, flavin adenin dinukleotid koji služi kao kofaktor te četiri atoma željeza u obliku feredoksinskih Fe-S klastera (49). Prisutan je u velikom broju tkiva, ali najviše je eksprimiran u jetri, intestinalnom traktu, bubrezima i dojci, gdje je odgovoran za regulaciju mikrobioma, zaštitu od mastitisa i infekcija, utjecaj na krvni tlak, detoksifikaciju endo- i ksenobiotika itd. (50). Značajne koncentracije ovog enzima mogu se naći i u krvi i majčinom mlijeku. XO je vrlo nespecifičan enzim te oksidira/reducira velik broj supstrata, među kojima je najbitniji katabolizam purina, pri čemu kao krajnji produkt nastaje mokraćna kiselina koja se izlučuje iz organizma (45). Povećana aktivnost XO-a, stoga, dovodi do hiperuricemije, gihta (stanja prekomjernog nakupljanja mokraćne kiseline u zglobovima), bubrežnih kamenaca i nefropatija (49). Kao što je već rečeno, i 6MP je supstrat ovog enzima pri čemu, analogno mokraćnoj kiselini, kao krajnji produkt nastaje 6TU koja se izlučuje urinom. S obzirom na to da je XO eksprimirana u intestinalnom traktu i jetri, ona je uvelike odgovorna za metabolizam prvog prolaska 6MP te samo oko 5–35 % nepromijenjenog lijeka dolazi do sustavnog krvotoka nakon oralne primjene (51). Smanjena aktivnost XO-a u vidu deficita ili inhibicije dovodi do značajnog povećanja plazmatskih koncentracija oralno primijenjenog 6MP (porast vršnih plazmatskih koncentracija i površina ispod krivulje čak do 500 % u slučaju inhibicije XO-a), dok na intravenski primijenjen 6MP aktivnost XO-a nema značajan utjecaj (52). U kliničkoj se praksi primjenjuje alopurinol, kompetitivni inhibitor XO-a, kao način poboljšanja bioraspoloživosti 6MP u bolesnika koji ne odgovaraju na standardne doze tiopurina (45). Sve se češće propisuje i istovremena terapija nižih doza tiopurina i alopurinola kao način smanjivanja nuspojava pri visokim dozama. S druge strane, u bolesnika s normalnim odazivom i visokim dozama tiopurina, pri uvođenju inhibitora XO-a u terapiju komorbiditeta potrebno je smanjiti dozu tiopurina za jednu trećinu ili više kako bi se izbjegla pretjerana mijelosupresija i toksičnost zbog posljedično većih razina 6TGN (41, 53). Za zaključiti je, dakle, kako bi svaki vanjski utjecaj na aktivnost XO-a (putem hrane, istovremeno korištenih lijekova ili dodataka prehrani) mogao utjecati na učinkovitost i sigurnost prethodno titriranih doza tiopurinskih imunosupresiva, na što treba obratiti pažnju.

1.3. Folna kiselina i važnost njene nadoknade u upalnim bolestima crijeva

Folna kiselina (engl. *folic acid*, FA) i folati, njeni oblici prisutni u prirodi, ključni su čimbenici u mnogim biokemijskim procesima koji se odvijaju u ljudskom organizmu. Primarna uloga folata je prijenos C1-jedinica u različitim oksidacijskim stanjima (formilne, formijatne, metilne i hidroksimetilne skupine), a bitan je za pretvorbu serina u glicin, katabolizam histidina te sintezu timidilata, metionina i purina. Kako ljudski organizam ne posjeduje mehanizam sinteze endogenih folata, njihov nedovoljan unos, dakle, dovodi do raznih patoloških stanja poput defekata neuralne cijevi fetusa prilikom trudnoće, vaskularnih komplikacija, povećanog rizika od pojave karcinoma i Alzheimerove bolesti itd. (54, 55). Bolesnici pogođeni IBD-om posebno su izloženi navedenim opasnostima jer se nedostatak folata vrlo često javlja zbog nedovoljnog unosa hranom, povećanog motiliteta GIT-a, smanjene apsorpcije uslijed resekcije ili oštećene stijenke tankog crijeva te istovremenog korištenja sulfasalazina i/ili metotreksata (54, 56–58). Nedavna meta-analiza s ukupno 2570 ispitanika utvrdila je bitno niže serumske razine folata i vitamina B₁₂ u bolesnika s IBD-om u usporedbi sa zdravim kontrolama te autori pretpostavljaju kako bi navedena razlika mogla biti značajan faktor rizika za ove bolesnike (59). Većina stručnjaka slaže se kako je potrebno redovito pratiti razine serumskih folata, vitamina B₁₂ i željeza u ovih bolesnika kako bi se pravovremeno spriječile komplikacije povezane s drastičnim nedostatkom folata (57–59).

Od svih komplikacija u IBD-u povezanih s malapsorpcijom nutrijenata, najčešće se javlja anemija uzrokovana nedostatkom željeza, vitamina B₁₂ i/ili folata, kroničnom upalom ili kao nuspojava lijekova, s prevalencijom čak do 70 %. Ovdje je makrocitna megaloblastična anemija kao podtip povezana s nedostatkom folata zbog aberacija u sintezi DNK i eritrocita (56). Nadalje, u bolesnika s IBD-om zamijećena je i hiperhomocisteinemija (26,5 % bolesnika u usporedbi s 3,3 % kontrola) koja uzrokuje hiperkoagulabilnost te arterijske i venske kardiovaskularne događaje (57, 60). Oba navedena problema bitno su umanjena nadoknadom FA (56). Osim toga, meta-analiza koja obuhvaća 4500 ispitanika pokazala je smanjen rizik pojave kolorektalnog karcinoma kada je administrirana nadoknada FA u raznim dozama (54). Kao posebna populacija bitne su trudnice kojima se i inače propisuje nadoknada FA: istraživanje s 240 ispitanica utvrdilo je dobru povezanost nadoknade FA te smanjenja relapsa bolesti u trudnoći (61). Neke smjernice i istraživanja predlažu da bi bolesnice s IBD-om koje planiraju trudnoću trebale uzimati 1–5 mg FA dnevno (62). Iz svega

navedenog proizlazi kako bi nadoknada folata, najčešće u obliku propisane terapije FA, mogla poboljšati kvalitetu života bolesnika s IBD.

1.4. Fiksne kombinacije lijekova i adherencija bolesnika prema propisanoj terapiji

1.4.1. Adherencija u upalnim bolestima crijeva

Adherencija (engl. *adherence*) prema terapiji definirana je kao bolesnikova razina pridržavanja propisanog i dogovorenog plana liječenja. Izraz „adherencija“ preferira se nad izrazom „suradljivost“ (engl. *compliance*) jer potonji podrazumijeva bolesnikovo pasivno slijeđenje liječnikovih uputa bez obostranog dogovora oko terapije. Adherencija je vrlo velik problem, pogotovo u terapiji kroničnih bolesti, gdje ona naglo opada nakon prvih šest mjeseci terapije. Istraživanja pokazuju kako je čak 70 % bolničkih prijema povezanih s terapijom uzrokovano lošom adherencijom, što u konačnici dovodi do troškova od 100 milijardi dolara godišnje (63). Mnogo je čimbenika koji utječu na adherenciju: Wheeler i sur. (64) kroz sustavni pregled literature navode mlađu životnu dob, demenciju, kulturne i religijske prepreke, samački način života, visoku cijenu liječenja, loš odnos liječnik–bolesnik, veću učestalost i kompleksniji režim doziranja kao prediktore lošije adherencije. Od navedenih čimbenika broj dnevno primijenjenih doza lijekova jedan je od nautjecajnijih: Claxton i sur. (65) kroz meta-analizu od 76 studija utvrdili su kako adherencija drastično opada od jedne (79 %) prema četiri doze dnevno (51 %).

Kako su IBD kronične bolesti, i ovdje se očekuju problemi u adherenciji. Longitudinalne studije pokazale su kako je 30–45 % bolesnika s IBD-om neadherentno (66, 67). Kao ključni čimbenici pokazali su se samački način života, doziranje lijekova tri–četiri puta dnevno, zaposlenost, muški spol itd. (68, 69). Još jedan bitan čimbenik je i tijek bolesti, pri čemu su bolesnici u remisiji bili puno neadherentniji što je u konačnici dovelo i do relapsa (68, 70). Neki autori pretpostavljaju kako je ova neadherencija nenamjerna jer bolesnici nemaju simptome, pa tako ni potrebu uzimati lijekove prema propisanoj terapiji (71). Bolesnici na terapiji aminosalicilatima pokazali su nižu stopu adherencije u usporedbi s imunosupresivima (68), što ponovno može biti povezano s većim brojem doza aminosalicilata koje se uzimaju dnevno.

1.4.2. Fiksne kombinacije lijekova

Fiksna kombinacija lijekova (engl. *fixed dose combination*, FDC) je pripravak koji sadrži dvije ili više aktivnih tvari u jednom dozirnom obliku. Pretpostavlja se kako su FDC-ovi jedina nova terapija koja će postići vrlo značajan porast u prodaji (72), čemu u prilog govori činjenica kako je broj registriranih FDC-ova od strane FDA-a oko 25 % svih ukupno registriranih pripravaka (73). Ove kombinacije su već široko korištene ili pokazuju potencijal u terapiji hipertenzije, raznih kardiovaskularnih bolesti, infekcije virusom humane imunodeficijencije, šećerne bolesti tipa 2 i mnogih drugih bolesti (74–78). Ovi pripravci pokazuju brojne prednosti nad konvencionalnim pripravcima s jednom djelatnom tvari: povećanu sigurnost i učinkovitost, povećanu suradljivost bolesnika, smanjene troškove terapije što sve posljedično povećava adherenciju bolesnika te kontrolu bolesti (73). Od specifičnih prednosti, navode se sinergizam više djelatnih tvari, smanjenje moguće zlouporabe lijekova, kombinacija kratko- i dugodjelujućih djelatnih tvari za bolju kontrolu bolesti, smanjenje antimikrobne rezistencije te smanjenje bolesnikovog opterećenja lijekovima (72). Naravno, postoje i nedostaci u primjeni FDC-ova, primjerice smanjena fleksibilnost doziranja, otežano određivanje uzročnika nuspojava FDC-ova, poteškoće u praćenju terapije te moguće farmakokinetičke i farmakodinamičke interakcije između djelatnih tvari (72, 73). Osim toga, neki produkti interakcije između djelatnih tvari ili djelatnih i pomoćnih tvari mogu utjecati na oslobađanje djelatne tvari iz oblika, organoleptička svojstva pripravka ili uzrokovati razgradnju aktivne tvari (79).

Postoje i preduvjeti razvoju FDC-a: primarno je to ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti aktivnih tvari kako bi se odabrao formulacijski put, a zatim i kompatibilnosti pomoćnih tvari s aktivnima. Kod oralnih dozirnih oblika koji su najčešće primjenjivani, u slučaju kompatibilnosti moguće je formulirati oblik iz jedinstvene smjese pomoćnih i djelatnih tvari. Ukoliko se utvrdi nekompatibilnost djelatnih tvari, istražuju se drugi oblici poput dvoslojnih ili troslojnih tableta u kojima su djelatne tvari, uz određene pomoćne tvari, fizički odvojene u slojevima te po potrebi i inertnim međuslojem (72, 73). Osim toga, jedan od preduvjeta je i sličan profil oslobađanja djelatnih tvari iz oblika. Ovi preduvjeti sa sobom nose i potrebu za razvojem analitičkih metoda za istovremeno određivanje djelatnih tvari, kao i njihovih mogućih produkata interakcije, prije i tijekom samog razvoja FDC-a kako bi se ispitivanja kompatibilnosti i oslobađanja aktivnih tvari mogla provoditi (73).

1.4.2.1. Ispitivanje kompatibilnosti sastavnica fiksne kombinacije lijekova

Ispitivanja fizikalno-kemijske kompatibilnosti sastavnica bilo koje formulacije, pa tako i FDC-a, provode se većim brojem tehnika kako bi se moguća interakcija okarakterizirala s više aspekata i u što većem broju okolišnih uvjeta. Najčešće korištene tehnike i pristupi uključuju brze termoanalitičke i spektroskopske tehnike, separacijske tehnike poput kromatografija i kapilarne elektroforeze, studije oslobađanja u biorelevantnom mediju te izlaganje sastavnica i njihovih smjesa raznim uvjetima stresa.

Budući da su termoanalitičke tehnike vrlo brze, zahtijevaju malu količinu uzorka te su dostupne prije kompleksnijih pristupa poput stabilitetno-indikativne kromatografske metode čiji je razvoj dugotrajan (80), nerijetko se koriste za inicijalni probir. U ispitivanju kompatibilnosti prevladava diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) koju slijede diferencijalna termalna analiza, termogravimetrijska analiza (TGA) te termalna mikroskopija (81–85). Ove tehnike pružaju informaciju poput promjene fizikalnog stanja, entalpije ili mase uslijed interakcije sastavnica u kratkom vremenu. Ukoliko se ne uoče znatne razlike u termogramima (poput pomaka pikova ili postotka gubitka mase pri određenoj temperaturi) ili izgledu smjese sastavnica u usporedbi s individualnim sastavnicama, može se pretpostaviti kako nije došlo do interakcije. Iako je ova skupina tehnika korisna u početnim fazama ispitivanja, obično se uzorci izlažu vrlo visokim temperaturama pri kojima razgradni putevi i kinetika razgradnje znatno odstupaju od onih pri propisanim uvjetima skladištenja gotovih dozirnih oblika, stoga mogu demonstrirati interakcije do kojih inače ne bi došlo. Iz navedenog razloga preporuča se dobivene rezultate potkrijepiti drugim tehnikama i pristupima (79, 86, 87).

Studije izotermalnog stresa (engl. *isothermal stress testing*, IST) su nešto blaža varijanta „termalnog stresa“ od klasičnih termoanalitičkih tehnika, stoga i daju reprezentativniju sliku kompatibilnosti sastavnica pod cijenu dužeg trajanja ispitivanja. U ovim studijama sastavnice te njihove smjese podvrgavaju se povišenoj temperaturi (obično 40–50 °C) uz ili bez kontroliranih uvjeta vlage na duži period od 3–4 tjedna. Nakon proteklog stresa, uzorci se ispituju vizualno, spektroskopski ili kromatografski te se smjese uspoređuju s individualnim sastavnicama. IST se relativno često koristi kao nadopuna ostalim pristupima (88–92).

Od spektroskopskih tehnika veliku moć u otkrivanju interakcija pokazuje infracrvena spektroskopija, najčešće ona s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR). Kako su molekulske vibracije detektirane na pojedinim valnim brojevima specifične za određene funkcionalne skupine, aromatske strukture i tzv. *fingerprint* područje, promjene u intenzitetu ili položaju apsorpcijskih vrpce upućuju na moguću kemijsku promjenu; u slučaju smjesa to uključuje interakciju između sastavnica. Tako se nastanak hidrata, dehidracija, polimorfne promjene ili prijelazi između kristalinične i amorfne forme lako mogu uočiti korištenjem FTIR-a (79). Uzorci se analiziraju netom nakon miješanja ili nakon IST-a (84, 90, 93–95). Nedostatak ove tehnike je što preklapanje vrpce različitih sastavnica može otežati interpretaciju rezultata (79), čemu se doskočilo korištenjem kemometrijskih pristupa poput analize glavnih komponenata (engl. *principal component analysis*, PCA) i klusterske analize (engl. *cluster analysis*, CA) (96, 97).

Studije oslobađanja najčešće se koriste za evaluaciju utjecaja pomoćnih tvari ili oblika s odgođenim/produljenim oslobađanjem, no mogu se koristiti i za ispitivanje utjecaja jedne djelatne tvari na oslobađanje i stabilnost druge u određenom mediju (98, 99). Nakon određenog perioda oslobađanja, medij se uzorkuje te analizira prikladnim metodama. Od medija koji vjerno oponašaju fiziološke uvjete (tzv. biorelevantni mediji) najčešće su korištene simulirana želučana tekućina (s pepsinom ili bez) te simulirana crijevna tekućina, koja može oponašati uvjete stanja sitosti (engl. *fed state simulated intestinal fluid*, FeSSIF) ili uvjete stanja natašte (engl. *fasted state simulated intestinal fluid*, FaSSIF), ovisno u kojem stanju bi se oralni dozirni oblik trebao primijeniti. Glavna razlika je u nešto nižem pH FeSSIF-a te većoj količini lecitina i žučnih soli (100). Za potrebe ispitivanja kompatibilnosti djelatnih sastavnica fiksne doze, biorelevantni mediji mogu pružiti uvid u moguće interakcije u pogledu oslobađanja, ali i na fizikalno-kemijske promjene nakon oslobađanja, a prije apsorpcije.

Separacijske tehnike uvelike se koriste u ispitivanju kompatibilnosti zbog mogućnosti identifikacije i određivanja produkata interakcije i razgradnje, često u vrlo niskim koncentracijama. Plinska kromatografija i kapilarna elektroforeza su rjeđe korištene, dok tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) prevladava u navedene svrhe. Prednosti separacijskih tehnika su mogućnost preparativne izolacije analita od interesa za daljnje strukturne karakterizacije, primjerice nuklearnom magnetskom rezonancijom ili IR-om. Nadalje, sprežanjem

separacijske tehnike s masenim spektrometrom (MS) moguće je dobiti informacije o strukturi analita bez preparativnog koraka. HPLC tehnika je najčešće korištena nakon određenih pristupa poput studija oslobađanja, IST-a te ubrzanih i dugoročnih studija stabilnosti (84, 89, 101, 102). Osim toga, pri razvoju novih djelatnih tvari ili ljekovitih oblika potrebno je razviti stabilitetno-indikativnu metodu koja može razlučiti sve moguće razgradne ili interakcijske produkte, kao i onečišćenja iz procesa, od analita od interesa (103). Nadalje, prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) kod razvoja FDC-a potrebno je procijeniti i razgradivost jedne djelatne tvari u prisutnosti druge putem studija prisilne razgradnje, za što je također potrebno razviti stabilitetno-indikativnu metodu za istovremeno određivanje obiju tvari (104). Naravno, nedostatak separacijskih tehnika je njihovo dugo trajanje, no prednost su visoka pouzdanost i točnost rezultata (79).

1.5. Biljni dodaci prehrani u terapiji upalnih bolesti crijeva – problem kakvoće i interakcija s farmakoterapijom

1.5.1. Kakvoća biljnih dodataka prehrani

Biljne droge i njihovi pripravci igraju važnu ulogu u medicini. Navedeni proizvodi se od davnih vremena koriste za liječenje i prevenciju patoloških stanja, a mnoge aktivne tvari izolirane iz biljnih droga pokazale su se kao vrlo dobri spojevi uzori za mnoštvo sintetskih lijekova korištenih i danas. Ne čudi, stoga, kako su biljni pripravci i dodaci prehrani danas popularniji nego ikad: prema nekim studijama, prevalencija njihovog korištenja u Europskoj Uniji doseže čak do 48 % (105). No, sveprisutan problem ovih proizvoda vrlo bitan za dobrobit korisnika je njihova kakvoća. U većini država, pa tako i u Republici Hrvatskoj, za dodatke prehrani propisana je zdravstvena ispravnost, tj. mikrobiološka čistoća, kontrola količine teških metala, ostalih otapala, pesticida itd. Učinkovitost u pogledu aktivnih tvari, za razliku od lijekova, nije potrebno pratiti. U takvim slučajevima pripravci mogu sadržavati vrlo malo do ništa aktivnih tvari, dovodeći učinkovitost proizvoda u pitanje, ili kao drugu krajnost mogu sadržavati visoke količine aktivnih tvari, pri čemu može doći do toksičnosti ovisnoj o dozi ili farmakokinetičkih/farmakodinamičkih interakcija s drugim biljnim proizvodima/farmakoterapijom. Zabilježen je velik broj drastičnih neslaganja deklariranih i stvarnih doza u proizvodima na tržištu (106–108). Osim toga, kupovinom putem interneta vrlo često su navedeni proizvodi dostavljeni na korisnikov kućni prag, time efektivno izbjegavajući bilo kakve kontrole kakvoće i dovodeći korisnika u opasnost (109, 110). Iz

navedenog je jasno da je potrebna stroža kontrola kakvoće biljnih proizvoda i dodataka prehrani u cijelom svijetu.

1.5.2. Biljni pripravci u terapiji upalnih bolesti crijeva

S obzirom na to da su IBD kronične bolesti, velik broj bolesnika pribjegava alternativnim načinima kontrole bolesti i smanjenja simptoma uz standardnu farmakoterapiju. Najkorištenija vrsta alternativne i komplementarne terapije su biljni pripravci, od čega prevladavaju pripravci kurkume, justicije i indijskog tamjanovca, kao i aloje, indijskog trputca, pšenice i pravog pelina (111–113). Iako je terapija navedenim pripravcima pokazala određene benefite, još uvijek je upitna njihova djelotvornost s obzirom na mali broj studija i drastične razlike u kvaliteti metodološkog pristupa (113). Unatoč tome, bolesnici ih i dalje koriste, vjerujući da su sigurni jer su biljnog porijekla.

Jedni od najčešće korištenih biljnih pripravaka ne samo u terapiji IBD-a, već i drugih patoloških stanja, su pripravci kurkume (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae). Za ekstrakte podanka kurkume i njihove biološki aktivne sastavnice (kurkuminoide) kurkumin (CUR), demetoksikurkumin (DMC) i bisdemetoksikurkumin (BDMC) utvrđena su ponajprije antioksidativna, ali i protuupalna, antikarcinogena i antibakterijska svojstva (114). Pretpostavlja se da kurkuminoidi moduliraju aktivnost glutaciona, katalaze i superoksid dismutaze, sprječavaju aktivaciju nuklearnog faktora κ B (NF- κ B), snižavaju plazmatske koncentracije C-reaktivnog proteina, smanjuju rezistenciju na inzulin, suprimiraju adipogenezu i snižavaju krvni tlak (115). Navedeni pripravci pokazali su se učinkovitima kao dodatak standardnoj terapiji UC-a (116, 117).

Pripravci smole indijskog tamjanovca (*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr., Burseraceae) poznati su po protuupalnom i imunomodulatornom djelovanju koje se pripisuje njihovim biološki aktivnim sastavnicama, bosveličnim kiselinama. Djelovanje se ostvaruje inhibicijom leukocitne elastaze, lipooksigenaze te NF- κ B i MAPK signalnih puteva (118). Od sastavnica, najaktivniji su keto derivati 11-keto- β -bosvelična (KBA) i 3-*O*-acetil-11-keto- β -bosvelična kiselina (AKBA), dok su manje potentne α - i β -bosvelična kiselina (ABA, BBA) te 3-*O*-acetil- α - i β -bosvelična kiselina (AABA, ABBA). Studije učinkovitosti pripravaka smole indijskog tamjanovca u IBD-u pokazale su miješane rezultate (119, 120).

Pripravci lista i zeleni justicije [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees, Acanthaceae] demonstriraju antikarcinogeno, imunomodulatorno i protuupalno djelovanje,

najvjerojatnije putem redukcije IL-a, inhibicije matriksnih metaloproteinaza i faktora rasta te utjecaja na aktivnost NF- κ B-a i signalnog puta Janus kinaze (121). Od aktivnih sastavnica, prevladavaju diterpenski laktoni andrografolid (ANDR), neoandrografolid (NANDR), 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid (14-DANDR) i drugi, dok su u velikoj količini prisutni i flavonoidi poput luteolina i apigenina (122). Što se tiče terapije IBD-a, dobiveni su obećavajući rezultati na velikom broju bolesnika s UC-om koji pokazuju usporedivost pripravaka justicije sa standardnom terapijom mesalazinom (123, 124).

1.5.3. Problem interakcije dodataka prehrani i tiopurinskih imunosupresiva

Interakcije hrana-lijek velik su problem u zdravstvenoj praksi jer mogu ugroziti učinkovitost i/ili sigurnost terapije; svima su poznati mnogobrojni slučajevi interakcija lijekova s pripravcima gospine trave (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae) čije su sastavnice inhibitori ili induktori CYP superporodice enzima, P-glikoproteina i mnogih drugih (125), kao i slučajevi interakcija soka od grejpa (*Citrus × paradisi* Macfad., Rutaceae) s farmakoterapijom (126). Ne izostaje, dakle, mogućnost da se interakcije jave i između terapije IBD-a i često korištenih dodataka prehrani. Utvrđeno je da lipofilnost spojeva uvelike utječe na rizik interakcija: lipofilniji spojevi su „promiskuitetniji“ te se u velikom obimu vežu za proteine poput receptora, enzima (modulirajući njihovu aktivnost) i proteina plazme (dovodeći do istiskivanja već vezanih tvari) (127, 128). Ovdje aktivne sastavnice gore navedenih često korištenih biljnih droga i pripravaka igraju ulogu s obzirom na to da su sve vrlo lipofilne, stoga ne treba isključiti mogućnost klinički značajnih interakcija. Piperin (PIP), aktivna sastavnica ploda crnog papra (*Piper nigrum* L., Piperaceae) koja se često kombinira s kurkuminoidima radi poboljšanja njihove bioraspoloživosti (129) je inače poznati inhibitor P-glikoproteina, CYP3A4 (130) i CYP1A1 (131) što potvrđuje gornji navod. Sa strane lijekova, tiopurinski imunosupresivi su vrlo vjerojatni kandidati za navedeni problem: osim što može doći do njihovog istiskivanja s proteina plazme, velika je opasnost i inhibicija inaktivacijskih puteva TPMT-a i XO-a što naposljetku može dovesti do toksičnosti terapije. Iz navedenih razloga su *in vitro* i *in vivo* ispitivanja interakcija hrana-lijek vrlo vrijedna u poboljšanju terapijskih ishoda.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U IBD-u, kao i svim kroničnim bolestima, niska adherencija i pribjegavanje neprovjerenj komplementarnoj i alternativnoj terapiji česti su problemi koji mogu utjecati na terapijske ishode u negativnom smislu. Što se tiče potonjeg, osim što pri korištenju dodataka prehrani i raznih pripravaka istovremeno sa standardnom farmakoterapijom može doći do farmakokinetičkih i/ili farmakodinamičkih interakcija, nerijetko su navedeni pripravci loše kakvoće, bilo u pogledu zdravstvene ispravnosti ili, češće, u pogledu učinkovitosti zbog vrlo male količine aktivnih sastavnica. Iako se taj problem može umanjiti ili zaobići kupovinom provjerenih proizvoda u ljekarnama i savjetovanjem sa stručnom osobom u vezi dobrobiti i opasnosti korištenja takvih pripravaka, u današnje doba sve više korisnika nabavlja proizvode putem internetske prodaje iz neprovjerenih izvora. Ovim doktorskim radom žele se rasvijetliti navedeni čimbenici koji bi mogli poboljšati kvalitetu života bolesnika s IBD-om.

Pod pretpostavkom da su često korišteni tiopurinski imunosupresivi AZA i 6MP fizikalno-kemijski kompatibilni s FA, nutrijentom koji je često propisivan istim bolesnicima zbog malapsorpcije, prvi cilj je provesti studije kompatibilnosti AZA i FA te 6MP i FA kako bi se odabrao optimalan formulacijski put za izradu FDC-a. Kompatibilnost će biti ispitana u omjeru najčešće primijenjenih dnevnih doza djelatnih tvari (100 mg AZA, odnosno 6MP te 5 mg FA dnevno, stoga u omjeru AZA:FA i 6MP:FA 20:1). Navedena fiksna kombinacija mogla bi poboljšati adherenciju bolesnika zbog manjeg opterećenja lijekovima, što bi konačno utjecalo na učinkovitost terapije. Nadalje, budući da velik broj bolesnika uzima i preparate kurkume, justicije i indijskog tamjanovca kao dodatak standardnoj terapiji, cilj je bio provesti ispitivanje kontrole kakvoće tih pripravaka u pogledu aktivnih sastavnica za koje se smatra da su odgovorne za njihovo djelovanje (kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i PIP). Ovime bi se ostvario uvid u kakvoću pripravaka nabavljenih putem pouzdanih dobavljača poput ljekarni i onih dostupnih putem internetske trgovine te bi se proizvodi mogli usporediti, što predstavlja vrijednu informaciju za same korisnike. Osim toga, sekundarni cilj ovog dijela istraživanja je standardizirati pripravke koji će se koristiti u ispitivanjima interakcija. Naposljetku, hipoteziramo da bi droge odabranih biljnih vrsta i njihovi pripravci mogli utjecati na farmakokinetiku tiopurinskih imunosupresiva, što bi dovelo do izostanka učinka i/ili toksičnosti. Stoga je posljednji cilj ovog dokorskog rada *in vitro* i *ex vivo* ispitivanjima utvrditi dolazi li do interakcije pripravaka ili njihovih aktivnih sastavnica i 6MP u vezanju na HSA te posljedično do promjene distribucije, kao i ispitati inhibicijsko

djelovanje ekstrakata prema TPMT-u i XO-u, što može uzrokovati promjene u metabolizmu tiopurinskih imunosupresiva. Dobivena saznanja bit će primijenjena u svrhu mogućeg poboljšanja terapije IBD-a i kvalitete života bolesnika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Sljedeći pododjeljci sadrže popise standarada, pomoćnih tvari, gotovih ljekovitih oblika, otapala, soli, kiselina i lužina, nepokretnih faza te ostalih materijala korištenih u ovom istraživanju.

3.1.1. Standardi i pomoćne tvari

- 11-keto- β -bosvelična kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 1-metil-4-nitroimidazol-5-amin (EDQM, Strasbourg, Francuska)
- 3-O-11-keto- β -bosvelična kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 6-metilmerkaptopurin, 98 % (Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- alopurinol, >98,0 % (TCI, Tokio, Japan)
- andrografolid (TCI, Tokio, Japan)
- azatioprin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- bisdemetoksikurkumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- ciprofloksacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- demetoksikurkumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- diklofenak natrij (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- fenobarbiton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- folna kiselina, odgovara Američkoj farmakopeji (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- furosemid, $\geq 98,0$ % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- hipoksantin, ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- kinidin sulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- kinin hidroklorid dihidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- kodein fosfat (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- kofein (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- krosopovidon (Ashland, Rotterdam, Nizozemska)
- kukuruzni škrob (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- kurkumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- laktoza monohidrat (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- magnezijev stearat (Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- merkaptopurin monohidrat, >98 % (TCI, Tokio, Japan)
- Methocel K100M Premium CR (Colorcon, Harleysville, PA, SAD)
- metotreksat (TCI, Tokio, Japan)
- metronidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- mikrokristalinična celuloza (Fagron, Donja Zelina, Hrvatska)
- neoandrografolid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- oksazepam (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- *p*-aminobenzoilglutaminska kiselina (EDQM, Strasbourg, Francuska)
- *p*-aminobenzojeva kiselina, ≥98 %, Fluka, Buchs, Švicarska)
- paracetamol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- piperin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- povidon (Ashland, Rotterdam, Nizozemska)
- propranolol hidroklorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- pteroińska kiselina (EDQM, Strasbourg, Francuska)
- S-(5'-adenozil)-L-metionin *p*-toluensulfonat, ≥80 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- stearinska kiselina (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- sulfametoksazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- tiamiprin (EDQM, Strasbourg, Francuska)
- varfarin natrij (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- α -bosvelična kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- β -bosvelična kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

3.1.2. Gotovi lijekoviti oblici

- Folacin® tablete, 5 mg folne kiseline po tableti (JGL, Rijeka, Hrvatska)
- Imuran® tablete, 50 mg azatioprina po tableti (Aspen, Dublin, Irska)
- Puri-Nethol® tablete, 50 mg 6-merkaptopurina po tableti (Aspen, Dublin, Irska)

3.1.3. Otapala, soli, kiseline i lužine

- acetonitril, MS čistoće (VWR International, Fontenay-sus-Bois, Francuska)
- dimetilsulfoksid, p.a. čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol, HPLC čistoće (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)
- Hanksova uravnotežena otopina soli, sterilna (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- klorovodična kiselina, 37 %, p.a. čistoće (Carlo Erba, Val-de-Reuil, Francuska)
- metanol, HPLC čistoće (VWR International, Fontenay-sus-Bois, Francuska)
- mravlja kiselina, HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- *N,N*-dimetilformamid, p.a. čistoće (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid, 97,0 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- natrijev karbonat, >99,0 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- natrijev klorid, p.a. čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- natrijev nitrat, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- perklorna kiselina, 70 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- vodikov peroksid, najmanje 30 %, p.a. čistoće (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska)

3.1.4. Ostalo

- Cell Culture mikrotitarska ploča za 96 uzoraka (Tecan, Männedorf, Švicarska)
- crni papar, mljeveni (Šafram, Zagreb, Hrvatska)
- DL-ditiotreitol, $>98,0$ % (TCI, Tokio, Japan)
- Extreme Potency Boswellia Extract (HerbaDiet, Rohtak, Indija)
- ksantin oksidaza iz goveđeg mlijeka, suspenzija u amonijevom sulfatu, 0,4 jedinice po mg proteina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- kurkumin, prirodni (TCI, Tokio, Japan)
- lecitin, iz soje, ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- natrijev dodecil sulfat, odgovara USP kriterijima (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Organic Andrographis Paniculata Leaves Powder (Maple life sciences, Delhi, Indija)
- polietersulfonski filteri veličine pora 0,22 μm (Obrnuta faza, Pazin, Hrvatska)
- polipropilenske epruvete od 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vacutainer epruvete od 5 mL s K₂EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, SAD)

3.1.5. Nepokretne faze korištene u razvoju kromatografskih metoda

- CHIRALPAK® kolona s vezanim HSA, dimenzije 3,0 $\times$ 50 mm, veličina čestica 5 μm (Daicel Corporation, Osaka, Japan)
- CORTECS Phenyl kolona, dimenzije 4,6 $\times$ 150 mm, veličina čestica 2,7 μm (Waters Corporation, Milford, MA, SAD)

- HSS Cyano kolona, dimenzije 3,0 × 150 mm, veličina čestica 3,5 μm (Waters Corporation, Milford, MA, SAD)
- Zorbax SB-C8 kolona, dimenzije 4,6 × 150 mm, veličina čestica 5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

3.2. Instrumentacija

U ovom istraživanju korištena je sljedeća instrumentacija:

- analitička vaga AG245 s mogućnošću očitavanja 0,01 mg (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- centrifuga mini G (IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka)
- centrifuga Z 326 K (Hermle, Wehingen, Njemačka)
- čitač mikrotitarskih pločica SPark 10M (Tecan, Männedorf, Švicarska)
- diferencijalni pretražni kalorimetar Pyris Diamond (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, SAD), kalibriran indijem (čistoća 99,98 %, talište 156,61 °C, fuzijska entalpija 28,71 J/g)
- grijaći blok TDB-120 (Biosan, Riga, Latvija)
- infracrveni spektrofotometar s Fourierovom transformacijom FTIR-8400S (Shimadzu, Kyoto, Japan) opremljen dodatkom za atenuiranu totalnu refleksiju PIKE MIRacle (PIKE Technologies, Fitchburg, WI, SAD)
- mikrovaga MX5 s mogućnošću očitavanja 1 μg (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- orbitalna tresilica-inkubator ES-20/60 (Biosan, Riga, Latvija)
- pH metar FiveEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- rotavapor R-200 (BÜCHI, Flawil, Švicarska)
- spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Synapt G2-Si ESI-QTOF-MS sustav (Waters Corporation, Milford, MA, SAD)
- tekućinski kromatograf 1100 Series sastavljen od kvaterne pumpe G1311A, degazera G1379A, autoinjektora G1329A s termostatom G1330B, termostatiranog odjeljka za

kolonu G1316A i detektora niza dioda G1315B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

- tekućinski kromatograf 1260 Series sastavljen od binarne pumpe G1312B, degazera G4225A, autoinjektora G1367E s termostatom G1330B, termostatiranog odjeljka za kolonu G1316C i detektora niza dioda G7115A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- ultrazvučna kupelj Elmasonic XtraTT (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka)
- uređaj za ispitivanje oslobađanja LDLT-A10 (Labtron Equipment Ltd., Fleet, UK)
- uređaj za pročišćavanje vode Ultra Clear UV (SG Water, Barsbüttel, Njemačka)
- uređaj za vorteksiranje Vortex 2 (IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka)

3.3. Metode

3.3.1. Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti azatioprina i folne kiseline

3.3.1.1. Priprema krutina i otopina

Smjese djelatnih tvari, usitnjenih gotovih ljekovitih oblika te pomoćnih tvari pripremljene su homogenizacijom točno odvaganih masa u tarioniku. Pripremljene su smjese djelatnih tvari AZA i FA u omjerima 1:1, 2:1, 5:1 i 20:1. Usitnjena smjesa ljekovitih oblika također je pripremljena homogenizacijom tableta Imurana® i Folacina® u tarioniku u omjeru djelatnih tvari 20:1. Smjesa pomoćnih tvari (placebo) pripremljena je homogenizacijom hidroksipropilmetilceluloze, magnezijeva stearata, stearinske kiseline, krospovidona, povidona, mikrokristalinične celuloze, laktoza monohidrata i kukuruznog škroba u najčešće korištenim omjerima u tabletiranim oblicima (132).

Matična otopina FA (1000 µg/mL) pripremljena je u *N,N*-dimetilformamidu (DMF). Matične otopine *p*-aminobenzoilglutaminske kiseline (engl. *p-aminobenzoylglutamic acid*, pABGA) i pteroiinske kiseline (engl. *pteroic acid*, PA) (100 µg/mL) pripremljene su u 30%-tnom (*V/V*) DMF-u u 0,01 M NaOH. Matične otopine AZA (1000 µg/mL), 6MP, 1-metil-4-nitroimidazol-5-amina (MNIA) i tiamiprina (TAP) (100 µg/mL) pripremljene su u 30%-tnom (*V/V*) DMF-u u ultračistoj vodi. U svim slučajevima prvotno je dodan DMF uz sonikaciju od 5 min, nakon čega su volumetrijske tikvice nadopunjene drugim navedenim

otapalom. Standardne otopine pripremljene su razrjeđivanjem matičnih otopina 30%-tnim (*V/V*) DMF-om u ultračistoj vodi.

Otopine djelatnih tvari, gotovih ljekovitih oblika i njihovih smjesa (konačne koncentracije 1000 µg/mL za AZA i 50 µg/mL za FA) te placebo (20,0 mg placebo u 10,0 mL otapala) pripremljene su u 30%-tnom (*V/V*) DMF-u u ultračistoj vodi prema sljedećem protokolu: krutine su otopljene/suspendirane u volumetrijskoj tikvici u čistom DMF-u uz sonikaciju od 15 min, nakon čega su dopunjene ultračistom vodom te promućkane. U studijama prisilne razgradnje, stresor (HCl, NaOH ili H₂O₂) je dodan uz ultračistu vodu. Suspenzije su nadalje filtrirane kroz filtre veličine pora 0,22 µm te injektirane u HPLC sustav. Za određivanje AZA, filtrati su deseterostruko razrijeđeni smjesom DMF-a i ultračiste vode.

3.3.1.2. Ispitivanja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom

DSC analize na Pyris Diamond instrumentu provedene su na čistim djelatnim tvarima i njihovim smjesama (AZA:FA omjeri 1:1, 2:1 i 5:1). 3,0 do 6,0 mg uzoraka vagano je u aluminijske posudice s probušenim poklopcem i mjereno u rasponu od 25 do 262 °C. Brzina zagrijavanja iznosila je 10 °C/min, a protok dušika 25 mL/min.

3.3.1.3. Stabilitetno-indikativna HPLC metoda za istovremeno određivanje azatioprina i folne kiseline

Stabilitetno-indikativna HPLC metoda za istovremenu analizu AZA i FA razvijena je na Agilent 1100 Series kromatografu. Kao stacionarna faza korištena je Zorbax SB-C8 kolona dimenzija 4,6 × 150 mm i veličine čestica 5 µm termostatirana na 35,0 °C. Mobilna faza sastojala se od ultračiste vode s mravljom kiselinom (0,1 %, *V/V*) kao sastavnice A te acetonitrila s mravljom kiselinom (0,1 %, *V/V*) kao sastavnice B. Provedena je gradijentna elucija prema programu prikazanom u Tablici 1 u ukupnom trajanju metode od 30 min. Protok mobilne faze iznosio je 1,0 mL/min, dok je volumen injektiranja bio 10,0 µL. Ispiranje igle nakon svakog injektiranja provedeno je 50%-tnim (*V/V*) acetonitrilom u ultračistoj vodi. Analiti su praćeni na valnoj duljini od 285 nm, bez referentne valne duljine. Ispitivanja čistoće pika provedena su u rasponu od 250 do 400 nm na 9 točaka pika, dok je granica čistoće iznosila 995.

Tablica 1. Gradijentni program elucije HPLC metode za određivanje AZA i FA

t (min)	φ_A (%)	φ_B (%)
0	95	5
5	95	5
17	87	13
21	87	13
25	70	30
27	70	30
28	95	5
30	95	5

Validacija metode provedena je prema smjernicama Međunarodnog vijeća za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za humanu primjenu (engl. *International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) (133). Ispitani su selektivnost, linearnost, preciznost, točnost, granice dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) u slučaju onečišćenja te robustnost.

3.3.1.4. Studije prisilne razgradnje

Studije prisilne razgradnje provedene su na pojedinačnim djelatnim tvarima, njihovoj smjesi (omjer AZA:FA 20:1), smjesi ljekovitih oblika (omjer AZA:FA 20:1), placebo i otapalu. Kisela, odnosno lužnata hidroliza provedene su koristeći 0,1 M HCl, odnosno 0,1 M NaOH tijekom 6 sati na 60 °C, nakon čega su uzorci neutralizirani. Oksidativni stres postignut je uz 3%-tni (V/V) H_2O_2 tijekom 30 min na 60 °C, dok je termalni stres proveden na krutinama na 80 °C tijekom 5 dana. Svjetlosnom stresu izložene su krutine, odnosno otopine/suspenzije tijekom 7 dana, odnosno 30 min. Za potrebe izračuna bilance mase, koncentracije poznatih razgradnih produkata dobivene su pomoću njihovih kalibracijskih krivulja, dok je za nepoznate razgradne produkte korištena kalibracijska krivulja odgovarajuće djelatne tvari razrijeđene u koncentracijsko područje onečišćenja.

3.3.1.5. Studija izotermalnog stresa

IST proveden je na pojedinačnim djelatnim tvarima, njihovoj smjesi (omjer AZA:FA 20:1), pojedinačnim usitnjenim ljekovitim oblicima te njihovoj smjesi (omjer AZA:FA 20:1). Svi uzorci stresirani su u termostatiranom inkubatoru na 60 °C u trajanju od 4 tjedna. Dio uzoraka pohranjen je na suhom i tamnom mjestu na sobnoj temperaturi u svrhu kontrole. Nakon 4 tjedna, stresirani i kontrolni uzorci pripremljeni su prema gore navedenom protokolu te analizirani HPLC metodom.

3.3.1.6. Studije oslobađanja u biorelevantnom mediju

Za određivanje koncentracije djelatnih tvari u biorelevantnom mediju razvijena je i validirana brza HPLC metoda za istovremenu analizu AZA, 6MP, 6TG i FA. Stacionarnu fazu predstavljala je Zorbax SB-C8 kolona (4,6 × 150 cm, veličina čestica 5 µm) termostatirana na 25,0 °C, a mobilnu fazu sačinjavali su ultračista voda i acetonitril zakiseljeni mravljom kiselinom (0,1 %, *V/V*) kao sastavnica A i B. Eluacija je provedena pri protoku 1,0 mL/min prema gradijentnom programu navedenom u Tablici 2. Injektirano je 10,0 µL uzorka, a analiti su praćeni na 280/360 (AZA i FA), 320/400 (6MP) i 343/400 nm (6TG), gdje druga vrijednost predstavlja referentnu valnu duljinu. Validacija je provedena koristeći vodenometanolne otopine standarada. Kromatogram smjese standardnih otopina i validacijski podaci prikazani su u Prilogu, Slika P1 i Tablica P1.

Tablica 2. Gradijentni program eluacije brze HPLC metode za analizu AZA, 6MP, 6TG i FA

<i>t</i> (min)	φ _A (%)	φ _B (%)
0	95	5
3	80	20
10	30	70
11	95	5
15	95	5

Studije oslobađanja u biorelevantnom mediju izvedene su u FaSSIF-u pri pH 6,5 (100), gdje je natrijev taurokolat zamijenjen sa natrijevim dodecil sulfatom (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) u koncentraciji 0,1 % (*m/V*). Ispitivanje je provedeno na LDLT-A10 instrumentu u USP aparaturi 2 s brzinom kretanja lopatice od 75 rpm u 500 mL FaSSIF-a termostatiranog na 37,0 ± 0,5 °C te u trajanju od 60 min. Praćeno je oslobađanje djelatnih tvari iz tableta Imurana® te Folacina® (ekvivalentnih masama od 50 mg AZA, odnosno 2,5 mg FA)

pojedinačno te u kombinaciji. Uzorkovanje je provedeno svakih 15 min, pri čemu je uzorkovano 5 mL medija, filtrirano te analizirano HPLC metodom za istovremenu analizu djelatnih tvari. Uzorkovani medij nadoknađen je istim volumenom svježeg medija. Sva ispitivanja provedena su u triplicatu.

3.3.2. Ispitivanje fizikalno-kemijske kompatibilnosti 6-merkaptopurina i folne kiseline

3.3.2.1. Priprema krutina i otopina

Smjese djelatnih tvari, usitnjenih ljekovitih oblika te pomoćnih tvari pripremljene su homogenizacijom točno odvaganih masa u tarioniku. Pripremljene su smjese 6MP i FA u omjerima 1:1, 2:1, 5:1, 10:1 i 20:1. Usitnjena smjesa ljekovitih oblika također je pripremljena homogenizacijom tableta Puri-Nethola® i Folacina® u tarioniku u omjeru djelatnih tvari 20:1. Placebo je pripremljen homogenizacijom laktoza monohidrata, stearinske kiseline, magnezijeva stearata, kukuruznog škroba, kros повідona, повідona i mikrokristalinične celuloze u najčešće korištenim omjerima u tabletama (132).

Matična otopina 6MP i FA pripremljena je u koncentracijama 600 µg/mL (6MP) i 30 µg/mL (FA) uz dodatak količine placeba ekvivalentne onoj u smjesi tableta u 30%-tni (*V/V*) metanol u ultračistoj vodi. Matična otopina hipoksantina (HX) koncentracije 100 µg/mL te matične otopine pABGA, PA i *p*-aminobenzojeve kiseline (engl. *p-aminobenzoic acid*, pABA) koncentracije 10 µg/mL pripremljene su u 20 mM NaOH. Sve matične otopine sonicirane su 5 min, dok je matična otopina 6MP i FA nakon sonikacije filtrirana kroz filter veličine pora 0,22 µm. Standardne otopine priređene su razrjeđivanjem matičnih otopina otopinom placeba.

Otopine djelatnih tvari, gotovih ljekovitih oblika i njihovih smjesa (konačne koncentracije 500 µg/mL za 6MP i 25 µg/mL za FA) te placeba (40,0 mg placeba u 50,0 mL otapala) za potrebe studija prisilne razgradnje te određivanja analita pripremljene su u 30%-tnom (*V/V*) metanolu u ultračistoj vodi prema sljedećem protokolu: krutine su otopljene/suspendirane u volumetrijskoj tikvici u čistom metanolu uz sonikaciju od 15 min na 50 °C, nakon čega je tikvica dopunjena ultračistom vodom te promućkana. U studijama prisilne razgradnje, stresor (HCl, NaOH ili H₂O₂) je dodan uz ultračistu vodu. Suspenzije su nadalje centrifugirane na 2000 g 10 min te supernatanti injektirani u HPLC sustav.

3.3.2.2. Ispitivanja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom

DSC analize (instrument Pyris Diamond) provedene su na djelatnim tvarima i njihovim smjesama (6MP:FA omjeri 1:1, 2:1, 5:1 i 10:1). 3,0 do 6,0 mg uzoraka vagano je u aluminijske posudice s probušenim poklopcem i mjereno u rasponu od 25 do 350 °C. Brzina zagrijavanja iznosila je 10 °C/min, a protok dušika 25 mL/min.

3.3.2.3. Stabilitetno-indikativna HPLC metoda za istovremeno određivanje 6-merkaptopurina i folne kiseline

Razdvajanje je postignuto na Agilent Series 1100 kromatografu. CORTECS Phenyl kolona dimenzija $4,6 \times 150$ mm, veličine čestica $2,7 \mu\text{m}$ termostatorirana na 30,0 °C služila je kao stacionarna faza, dok se mobilna faza sastojala od ultračiste vode i metanola, oboje zakiseljenih s mravljom kiselinom u koncentraciji 0,1 % (V/V) kao sastavnice A i B. Elucija je provedena prema gradijentnom programu navedenom u Tablici 3 u ukupnom trajanju od 30 min. Protok mobilne faze iznosio je 0,4 mL/min. Standardni volumen injektiranja iznosio je 5,0 μL , dok je 1,0 μL uzoraka injektirano za provjeru čistoće pika 6MP. Nakon svakog injektiranja, igla je ispirana sa 50%-tnim (V/V) metanolom u ultračistoj vodi. Detekcija je provedena na 275 nm s referentnom valnom duljinom od 400 nm. Ispitivanja čistoće pika su provedena na svim točkama pika u rasponu od 200 do 400 nm, dok je prag čistoće iznosio 995.

Tablica 3. Gradijentni program elucije HPLC metode za određivanje 6MP i FA

t (min)	φ_A (%)	φ_B (%)
0	95	5
3	95	5
10	40	60
18	40	60
20	0	100
22	0	100
23	95	5
30	95	5

Validacija metode provedena je prema ICH smjernicama (133). Ispitani su selektivnost, linearnost, preciznost, točnost, LOD i LOQ (za onečišćenja) te robustnost.

3.3.2.4. Studije prisilne razgradnje

Prisilnoj razgradnji podvrgnute su čiste djelatne tvari, njihova smjesa (omjer 6MP:FA 20:1), pojedinačni usitnjeni ljekoviti oblici, njihova smjesa (omjer 6MP:FA 20:1), placebo i otapalo. Kiseli stres je postignut u 0,1 M HCl tijekom 4 sata na sobnoj temperaturi, razgradnja lužinom u 0,1 M NaOH nakon 5 dana na sobnoj temperaturi, a oksidativni stres u 0,1%-tnom (*V/V*) H₂O₂ nakon 16 sati na sobnoj temperaturi. Otopine i suspenzije su također podvrgnute indirektnoj svjetlosti u trajanju od 15 min te toplinskom stresu od 60 °C tijekom 5 dana. Krutine su svjetlosno (indirektna svjetlost) te termalno stresirane (60 °C) 7 dana.

3.3.2.5. Studija izotermalnog stresa

Stresu na 50 °C u trajanju od 4 tjedna izložene su čiste djelatne tvari, njihove smjese (omjer 6MP:FA 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 i 1:20) te smjesa ljekovitih oblika (omjer 6MP:FA 20:1). Dio svih uzoraka pohranjen je na suhom i mračnom mjestu na sobnoj temperaturi u svrhu kontrole. Nakon isteka 4 tjedna, stresirani i kontrolni uzorci analizirani su HPLC-om (omjer 20:1) i FTIR-om.

3.3.2.6. Ispitivanja infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom i multivarijatna analiza podataka

Za FTIR analize korišten je instrument FTIR-8400S. Uzorci djelatnih tvari i njihovih smjesa podvrgnuti izotermalnom stresu i oni čuvani kao kontrole nanieseni su na modul za atenuiranu totalnu refleksiju (ATR) te su spektri snimljeni u rasponu od 400 do 5000 cm⁻¹ sa spektralnom rezolucijom od 1,929 cm⁻¹. Izvršeno je 45 snimanja svakog uzorka koja su uprosječena u konačni spektar. Atmosfera, koja je snimana između svakog uzorka, služila je kao pozadina. Nakon akvizicije spektara, podaci su predobrađeni metodom standardne normalne varijate (134), dobivajući nula kao srednju vrijednost spektra i jedan kao standardno odstupanje te uneseni u matricu od 11 redova (koji predstavljaju djelatne tvari i njihove smjese) i 649 kolona (koje predstavljaju apsorbancije na određenom valnom broju u rasponu od 550 do 1800 cm⁻¹). Za PCA korištena je kovarijantna matrica, dok su za CA korišteni Wardova metoda grupiranja i euklidska udaljenost između uzoraka.

3.3.2.7. Studije oslobađanja u biorelevantnom mediju

Studije oslobađanja u biorelevantnom mediju provedene su u već navedenoj modifikaciji FaSSIF-a pH 6,5, pri istim uvjetima oslobađanja, uzorkovanja i određivanja (postupak opisan u poglavlju 3.3.1.6). Kao uzorci korišteni su ljekoviti oblici 6MP (ekvivalent 50 mg) i FA (ekvivalent 2,5 mg) pojedinačno i u kombinaciji. Sva ispitivanja provedena su u triplikatu.

3.3.3. *Određivanje kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i piperina u biljnim drogama i njihovim pripravcima*

3.3.3.1. Uzorci

Nabavljena su 54 uzorka od kojih su 35 većinskim udjelom bili ekstrakti, dok je njih 19 sadržavalo usitnjene ili cijele biljne droge. 13 uzoraka dobavljeno je iz lokalnih ljekarni, 15 uzoraka iz trgovina zdravom hranom, a 26 ih je kupljeno putem internetske trgovine. Svi uzorci analizirani su prije isteka roka trajanja. Uzorci su označeni slovom S (*sample*) i odgovarajućim brojem. Detaljan opis uzoraka prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Opis analiziranih uzoraka biljnih droga i njihovih pripravaka

oznaka	postupak nabave	zemlja porijekla	vrsta uzorka	oblik uzorka	opis (po dozirom obliku, ukoliko nije drugačije navedeno)
S1	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	kurkuma (standardizirana na min. 90 % kurkuminoide), indijski tamjanovac (standardiziran na min. 65 % bosveličnih kiselina), plod crnog papra (standardiziran na min. 95 % piperina)
S2	ljekarna	Hrvatska	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt kurkume (350 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoide), ekstrakt crnog papra (5 mg, standardiziran na 95 % piperina)
S3	ljekarna	Hrvatska	meki ekstrakt	meke kapsule	ekstrakt kurkume (sadrži 48 mg kurkuminoide, od kojih 40 mg kurkumina), ekstrakt crnog papra (10 mg), vitamin D (3 µg)
S4	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	smjesa suhog ekstrakta kurkume i ulja korijena kurkume (standardizirano na 95 % kurkuminoide)
S5	ljekarna	Hrvatska	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	smjesa suhog ekstrakta kurkume i ulja korijena kurkume (250 mg, standardizirano na 95 % kurkuminoide), ekstrakt indijskog tamjanovca (250 mg, standardiziran na 10 % AKBA i 75 % bosveličnih kiselina)
S6	internetska trgovina	Tajland	suhi ekstrakt	tablete	ekstrakt kurkume : ekstrakt crnog papra (10 : 1)
S7	ljekarna	Belgija	meki ekstrakt	meke kapsule	bio-optimizirani ekstrakt kurkume (standardiziran na 42 mg kurkumina)
S8	ljekarna	Italija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt kurkume (standardiziran na 95 % kurkuminoide)
S9	ljekarna	Austrija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt kurkume (528 mg, od kojih 500 mg kurkuminoide), ekstrakt ploda crnog papra (5,3 mg, od kojih 5 mg piperina)
S10	ljekarna	Sjedinjene Američke Države	meki ekstrakt	meke kapsule	ekstrakt kurkume (48 mg kurkuminoide, od kojih 40 mg kurkumina)
S11	ljekarna	Hrvatska	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	suhi ekstrakt podanka kurkume (450 mg, standardiziran na min. 95 % kurkuminoide), suhi ekstrakt ploda crnog papra (10 mg, standardiziran na min. 95 % piperina), vitamin B ₆ (0,7 mg), vitamin B ₁₂ (1,25 µg), vitamin D ₃ (2,5 µg), selen (27,5 µg)
S12	ljekarna	Hrvatska	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	suhi ekstrakt podanka kurkume (50 mg, standardiziran na min. 95 % kurkuminoide), vitamin C (50 mg), suhi ekstrakt smole indijskog tamjanovca (40 mg, standardiziran na min. 75 % bosveličnih kiselina, od kojih min. 30 % AKBA), hijaluronska kiselina (15 mg), mangan (1 mg), suhi ekstrakt crnog papra (3 mg, standardiziran na min. 95 % piperina), vitamin D ₃ (2,5 µg)
S13	internetska trgovina	nije navedeno	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt korijena kurkume (500 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoide), BioPerine ekstrakt crnog papra (5 mg)
S14	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	rinfuza	kurkumin (200 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoide), ekstrakt indijskog tamjanovca (192 mg, standardiziran na 65 % bosveličnih kiselina), ekstrakt crnog papra (8 mg, standardiziran na 95 % piperina)
S15	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	tinktura	tinktura	eko kurkuma
S16	internetska trgovina	Bugarska	tinktura	tinktura	kurkuma (900 mg/dnevna doza)
S17	ljekarna	Hrvatska	meki ekstrakt	meke kapsule	kurkumin (30 mg), vitamin D ₃ (7 µg)
S18	trgovina zdravom hranom	Sjedinjene Američke Države	suhi ekstrakt	tablete	ekstrakt korijena kurkume (25 mg, standardiziran na 93 % kurkuminoide), vitamin B, vitamin C, vitamin E, željezo, ekstrakt brokule, ekstrakt čajevca
S19	trgovina zdravom hranom	Ujedinjeno Kraljevstvo	suhi ekstrakt	tablete	ekstrakt kurkume (175 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoide)
S20	internetska trgovina	Sjedinjene Američke Države	suhi ekstrakt	tablete	ekstrakt smole indijskog tamjanovca, ekstrakt korijena kurkume, glukozamin, hondroitin, metilsulfonilmetan, fenilalanin, bromelain, kalcij, cink, mangan, bor
S21	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	rinfuza	standardiziran na min. 95 % piperina
S22	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	rinfuza	minimalno 60 % bosveličnih kiselina
S23	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (500 mg, standardiziran na min. 65 % bosveličnih kiselina)

oznaka	postupak nabave	zemlja porijekla	vrsta uzorka	oblik uzorka	opis (po dozirnom obliku, ukoliko nije drugačije navedeno)
S24	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (500 mg, standardiziran na min. 75 % bosveličnih kiselina)
S25	internetska trgovina	Ujedinjeno Kraljevstvo	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (482 mg, standardiziran na min. 65 % bosveličnih kiselina)
S26	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (500 mg, standardiziran na min. 90 % bosveličnih kiselina)
S27	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (140 mg), ekstrakt balzamovca (140 mg), goveđi kolostrum
S28	ljekarna	Hrvatska	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt smole indijskog tamjanovca (80 mg, min. 25 % bosveličnih kiselina), glukozamin, hondroitin, vitamin C, hijaluronska kiselina
S29	ljekarna	Sjedinjene Američke Države	suhi ekstrakt	tablete	5-LOXIN® AKBA (50 mg), glukozamin, vitamin C, mangan, bor, hijaluronska kiselina
S30	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	standardiziran na min. 98 % andrografolida
S31	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt justicije (50 mg, min. 90 % andrografolida), usitnjena zelen justicije (350 mg)
S32	internetska trgovina	Indija	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt justicije (600 mg, min. 2 % andrografolida), usitnjena zelen justicije (200 mg)
S33	internetska trgovina	Sjedinjene Američke Države	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	mješavina ekstraktata kurkume, justicije i indijskog tamjanovca, piperin, glukozamin, kolagen, hijaluronska kiselina
S34	internetska trgovina	Sjedinjene Američke Države	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	ekstrakt kurkume (250 mg, standardiziran na 40 % kurkuminoida), PARACTIN® (150 mg, patentirana mješavina andrografolida)
S35	internetska trgovina	Sjedinjene Američke Države	suhi ekstrakt	tvrde kapsule	zelen justicije (25 mg), ekstrakt korijena kurkume (42 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoida), vitamini C i D, magnezij, selen, cink, ekstrakt ploda bazge, ekstrakt lista masline, prah korijena kudzu biljke, N-acetilcistein, usitnjena lukovica bijelog luka, kvercetin, usitnjeni list origana
S36	ljekarna	Kanada	suhi ekstrakt + usitnjena biljna droga	tvrde kapsule	podanak kurkume (500 mg), ekstrakt podanka kurkume (50 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoida)
S37	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	usitnjena biljna droga	sirovi materijal	organski uzgojena kurkuma
S38	trgovina zdravom hranom	Njemačka	usitnjena biljna droga	sirovi materijal	100 % organski uzgojena kurkuma
S39	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	usitnjena biljna droga	sirovi materijal	usitnjeni podanak kurkume
S40	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	usitnjena biljna droga	sirovi materijal	usitnjeni podanak kurkume
S41	trgovina zdravom hranom	Nizozemska	usitnjena biljna droga	tvrde kapsule	usitnjeni korijen kurkume (200 mg), usitnjeni korijen đumbira (160 mg), ekstrakt ploda crnog papra (25 mg)
S42	internetska trgovina	Tajland	usitnjena biljna droga	tvrde kapsule	<i>Curcuma longa</i> (450 mg), <i>Piper nigrum</i> (50 mg)
S43	internetska trgovina	Tajland	usitnjena biljna droga	tvrde kapsule	usitnjena kurkuma
S44	trgovina zdravom hranom	Nizozemska	usitnjena biljna droga	čajna mješavina	organski uzgojena kurkuma (49 %), sporiš (31 %), kora limuna (15 %), crni papar (5 %)
S45	trgovina zdravom hranom	Austrija	usitnjena biljna droga	sirovi materijal	usitnjena kurkuma
S46	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	usitnjena biljna droga	sirovi materijal	usitnjena kurkuma
S47	trgovina zdravom hranom	Njemačka	usitnjena biljna droga	tablete	korijen kurkume, plod crnog papra
S48	trgovina zdravom hranom	Hrvatska	usitnjena biljna droga	rinfuza	usitnjeni podanak kurkume
S49	internetska trgovina	Grčka	biljna droga	sirovi materijal	smola indijskog tamjanovca
S50	internetska trgovina	Turska	biljna droga	sirovi materijal	smola indijskog tamjanovca
S51	internetska trgovina	nije navedeno	biljna droga	sirovi materijal	smola indijskog tamjanovca
S52	internetska trgovina	Indija	usitnjena biljna droga	rinfuza	justicija
S53	internetska trgovina	Indija	usitnjena biljna droga	rinfuza	justicija
S54	internetska trgovina	Tajland	usitnjena biljna droga	tvrde kapsule	justicija (500 mg, min. 6 % andrografolida)

3.3.3.2. Priprema otopina

Matične otopine svih analita (ANDR, NANDR, 14-DANDR, CUR, DMC, BDMC, PIP, ABA, BBA, KBA, AKBA) pripremljene su u koncentraciji 250 µg/mL u 81,5%-tnom (*V/V*) etanolu u vodi sonikacijom od 5 min. Standardne otopine dobivene su razrjeđivanjem istim otapalom.

Sadržaj šest dozirnih oblika svakog od uzoraka izvagan je te homogeniziran u tarioniku. Za uzorke u rinfuzi, ovaj korak je izostavljen. 25,0 mg homogeniziranog uzorka je izvagano te suspendirano u 25,0 mL 81,5%-tnog (*V/V*) etanola u vodi, sonicirano 30 min na 60 °C te centrifugirano 10 min nakon hlađenja na sobnu temperaturu. Supernatant je po potrebi razrijeđen istim otapalom te injektiran u HPLC sustav. Tekući uzorci su centrifugirani 10 min na 2000 g i po potrebi razrijeđeni te injektirani u HPLC sustav. Sve ekstrakcije provedene su u triplicatu.

3.3.3.3. Optimizacija ekstrakcijskog postupka korištenjem metodologije odzivne površine

Ekstrakcija biološki aktivnih tvari optimirana je korištenjem Box-Behnkenovog dizajna metodologije odzivne površine. Kao modelni uzorak korištena je homogenizirana smjesa usitnjenih biljnih droga (list justicije, smola indijskog tamjanovca, podanak kurkume i plod crnog papra, 20:10:2:1, *m/m/m/m*). 25,0 mg smjese suspendirano je u 10,0 mL otapala i podvrgnuto ultrazvučnoj ekstrakciji pri odabranom trajanju i temperaturi. Kao nezavisne varijable, tj. faktori korišteni su omjer etanola u vodenoeetanolnom ekstrakcijskom sredstvu (40–100 %, *V/V*), temperatura ekstrakcije (30–80 °C) i vrijeme sonikacije (10–30 min). Zavisne varijable, tj. odazivi bili su zbrojevi ekstrakcijskih prinosa svih analita pojedine biljne sastavnice.

3.3.3.4. Kromatografska analiza

Analize su provedene na Agilent 1260 Series kromatografu. Stacionarnu fazu predstavljala je HSS Cyano kolona dimenzija 3,0 × 150 mm i veličine čestica 3,5 µm termostatirana na 40,0 °C. Mobilna faza sastojala se od ultračiste vode i acetonitrila (zakiseljenih mravljom kiselinom u koncentraciji 0,1 %, *V/V*) kao sastavnice A i B. Provedena je gradijentna elucija prema programu iz Tablice 5 pri protoku od 1,0 mL/min, uz ukupno trajanje metode od 25 min. Volumen injektiranja iznosio je 5,0 µL, a igla je nakon injektiranja ispirana metanolom. Temperatura autoinjektora podešena je na 15 °C. Valne duljine detekcije

bile su 206 nm za ABA, BBA, AABA, ABBA i NANDR, 230 nm za ANDR, 256 nm za 14-DANDR, KBA i AKBA, 340 nm za PIP i 422 nm za BDMC, DMC i CUR.

Tablica 5. Gradijentni program elucije HPLC metode za određivanje aktivnih sastavnica u biljnim drogama i njihovim pripravcima

t (min)	φ_A (%)	φ_B (%)
0	60	40
6	60	40
16,5	30	70
17,5	0	100
20	0	100
21	60	40
25	60	40

3.3.3.5. Identifikacija acetiliranih bosveličnih kiselina pomoću masene spektrometrije

Identifikacija AABA i ABBA u realnim uzorcima postignuta je korištenjem Synapt G2-Si MS-a sa ionizacijom elektroraspršenjem i kvadrupolnim analizatorom s analizatorom vremena leta. Postavke MS-a bile su kako slijedi: napon stošca za uzorkovanje 60 V, temperatura izvora 120 °C, temperatura desolvatacije 350 °C, napon kapilare 3 kV, protok plina za desolvataciju 600 L/h. Spektri su snimani u pozitivnom ionskom modu. MS/MS analize provedene su odabirom 499,4 kao prekursorskog omjera mase i naboja (m/z) te kolizijskom energijom od 5 V snimanjem u rasponu od 100 do 500 m/z .

3.3.3.6. Validacija metode

Metoda je validirana prema ICH smjernicama (133). Ispitani parametri uključivali su selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, LOD, LOQ i robustnost. Kao modelni uzorci korišteni su već spomenuta homogenizirana smjesa biljnih droga (*vide supra*, odjeljak 3.3.3.3) i homogenizirana smjesa suhih ekstrakata (S31, S26, S21 i S4 u omjerima 20:5:5:1, $m/m/m/m$).

3.3.4. Ispitivanje interakcije pripravaka lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra te 6-merkaptopurina u pogledu vezanja na humani serumski albumin

3.3.4.1. Priprema ekstrakata odabranih biljnih droga

Ekstrakti podanka kurkume (kurkumin, prirodni) i smole indijskog tamjanovca (Extreme Potency Boswellia Extract) nabavljeni su od navedenih proizvođača i korišteni kao takvi. Za ekstrakte lista justicije i ploda crnog papra, 2,5 g usitnjenog lista justicije (Organic Andrographis Paniculata Leaves Powder), odnosno 2,5 g usitnjenog ploda crnog papra (crni papar, mljeveni) suspendirano je u 50 mL 81,5%-tnog (*V/V*) etanola u vodi te sonicirano na 60 °C u trajanju od 30 min, nakon čega su supernatanti filtrirani te upareni do suha na rotavaporu R-200. Svim ekstraktima određen je sadržaj aktivnih sastavnica (kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i PIP) razvijenom HPLC metodom za njihovo istovremeno određivanje u biljnim drogama i pripravcima. Maseni udjeli aktivnih sastavnica u ekstraktima iznosili su 92,7 % kurkuminoida, 63,7 % bosveličnih kiselina, 17,3 % andrografolida i 37,3 % PIP.

3.3.4.2. Ispitivanje vezanja aktivnih sastavnica biljnih droga na humani serumski albumin

Vezanje aktivnih sastavnica na HSA ispitano je HPLC metodom na Agilent 1100 kromatografu korištenjem CHIRALPAK® biomimetičke kolone s vezanim HSA dimenzija 3,0 × 50 mm i veličine čestica 5 µm termostatisane na 37,0 °C. Kao sastavnica A mobilne faze korišten je 50 mM fosfatni pufer pH 7,4, dok je sastavnicu B sačinjavao izopropanol. Protok mobilne faze iznosio je 1,0 mL/min te je primijenjen linearni gradijent od 0 do 30 % sastavnice B u 6 min, nakon čega je elucija tekla izokratno s 30 % sastavnice B do 15 min. Ekvilibracija kolone na početne uvjete trajala je 5 min. Otopine kalibranta i ispitivanih sastavnica pripremljene su u koncentraciji 100 µg/mL u 50%-tnom (*V/V*) metanolu u ultračistoj vodi. Analiti su praćeni na 208, 220, 250, 310 i 420 nm. Ponovljivost i srednja preciznost metode ispitani su opetovanim injektiranjem otopine varfarina.

Za sve kalibrante pronađene su literaturne vrijednosti obima vezanja na HSA (HSA_{lit}) prikazane u Tablici 6 koje su prevedene u $\log K_{HSA}$ vrijednosti putem jednadžbe (1).

$$\log K_{HSA} = \log \frac{HSA_{lit}}{101 - HSA_{lit}} \quad (1)$$

Otopine kalibranata su analizirane opisanom HPLC metodom u triplicatu te su zabilježena njihova vremena zadržavanja. Zatim je konstruiran pravac ovisnosti $\log K_{\text{HSA}}$ vrijednosti o logaritmu vremena zadržavanja kalibranata. Nakon mjerenja vremena zadržavanja analita od interesa, izračunati je njihov obim vezanja na HSA (HSA_{exp}) putem jednadžbe (2).

$$\text{HSA}_{\text{exp}} = \frac{101 \times 10^{\log K_{\text{HSA}}}}{1 + 10^{\log K_{\text{HSA}}}} \quad (2)$$

Tablica 6. Kalibranti te njihovi literaturni podaci vezanja na HSA

kalibrant	HSA_{lit} (%)	izvor
metronidazol	10,0	(135)
paracetamol	14,0	(136)
kofein	27,0	(137)
kodein	28,5	(138)
fenobarbiton	37,5	(139)
ciprofloksacin	44,9	(139)
kinin	65,8	(140)
propranolol	66,6	(141)
metotreksat	70,0	(142)
sulfametoksazol	86,3	(139)
kinidin	87,0	(135)
oksazepam	89,6	(140)
furosemid	95,0	(143)
diazepam	97,9	(139)
varfarin	97,9	(135)
diklofenak	99,8	(135)

3.3.4.3. Ispitivanje načina vezanja 6-merkaptopurina na humani serumski albumin frontalnom analizom

Način vezanja 6MP na HSA ispitan je frontalnom analizom (144). Ispitivanja su provedena na CHIRALPAK® HSA koloni uz 67 mM fosfatni pufer pH 7,4 sa dodatkom različitih koncentracija 6MP (0–500 μ M) kao mobilnu fazu. Protok je iznosio 0,5 mL/min, a kolona je bila termostatisirana na 37,0 °C. Vrijeme izboja potrebno za izračun prividnog molarnog ekvivalenta zasićenja kolone (m_{Lapp}) praćeno je metodom jednakih površina (145). Vrijeme izboja 6MP iz kojeg su dobivene m_{Lapp} vrijednosti korigirano je za vrijeme izboja tvari koja se ne veže na HSA (natrijev nitrat). Iz m_{Lapp} vrijednosti i koncentracije 6MP u mobilnoj fazi konstruiran je dvostruko recipročni dijagram.

3.3.4.4. Ispitivanje kompeticije aktivnih sastavnica/ekstrakata lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra te 6-merkaptopurina za vezanje na humani serumski albumin zonskom eluacijom

Kompeticija aktivnih sastavnica/ekstrakata i 6MP za vezanje na HSA ispitana je zonskom eluacijom (146). U slučaju kurkume i indijskog tamjanovca, korišteni su gore navedeni ekstrakti, dok su u slučaju justicije i crnog papra korišteni ANDR i PIP kao najzastupljenije aktivne sastavnice. CHIRALPAK® HSA kolona zasićena je različitim koncentracijama otopina ekstrakata/aktivnih sastavnica (koncentracije aktivnih sastavnica 0–20 μ M) u 67 mM fosfatnom puferu pH 7,4 (za PIP i ANDR) ili smjesi 67 mM fosfatnog pufera pH 7,4 i metanola u omjeru 90:10, *V/V* (za kurkuminoide i bosvelične kiseline). Zatim je injektirana otopina 6MP koncentracije 20 μ M te je praćen njen faktor zadržavanja (k) opisan jednadžbom (3),

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

gdje t_R predstavlja vrijeme zadržavanja 6MP, a t_M mrtvo vrijeme, tj. vrijeme potrebno za eluciju sastavnice koja se ne zadržava na koloni (natrijev nitrat). Iz ovisnosti recipročne vrijednosti faktora zadržavanja o koncentraciji aktivnih sastavnica u mobilnoj fazi zaključeno je postoji li interakcija i kojeg je tipa.

3.3.5. Ispitivanje inhibicije tiopurin metiltransferaze ekstraktima lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra

3.3.5.1. Uzorkovanje i predobradba krvi

Provedeno istraživanje odobreno je od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa 643-02/21-03/01, ur. broj. 251-62-03-21-10, Zagreb, 22. veljače 2021.). 50 mL krvi dobrovoljca izvađeno je venepunkcijom u epruvete s K₂EDTA kao antikoagulantom. Puna krv centrifugirana je na 2000 g 10 min pri 4 °C te su plazma i sloj leukocita i trombocita odvojeni od eritrocita. Eritrociti su isprani istim volumenom Hanksove uravnotežene otopine soli te je nakon ponovnog centrifugiranja na 2000 g 10 min supernatant uklonjen. Postupak je ponovljen još dva puta. Koncentratu eritrocita dodan je četverostruki volumen ledene ultračiste vode kako bi se postigla hemoliza. Suspenzije su homogenizirane, alikvotirane te zamrznute na -20 °C do trenutka ispitivanja. Neposredno prije ispitivanja, hemolizati su odležani pri sobnoj temperaturi, centrifugirani na 2000 g 5 min te su supernatanti upotrijebljeni u daljnjem postupku. Svi hemolizati standardizirani su na količinu hemoglobina (Hb) prema modifikaciji metode Harboea i sur. (147). Ukratko, supernatant hemolizata razrijeđen je tisuću puta otopinom natrijeva karbonata koncentracije 0,1 g/L te je dobivenoj otopini izmjerena apsorbancija na 380, 415 i 450 nm uz korištenje istog otapala kao slijepe probe. Koncentracija Hb (u g/dL) izračunata je pomoću jednadžbe (4),

$$\text{Hb (g/dL)} = 8,36 (2 \times A_{415} - A_{380} - A_{450}) \quad (4)$$

gdje A_{380} , A_{415} i A_{450} predstavljaju apsorbancije na navedenim valnim duljinama (nm).

3.3.5.2. Priprema i predobradba inkubata

U Eppendorf epruvete od 1,5 mL dodano je 200 µL hemolizata, 201 µL 100 mM fosfatnog pufera pH 7,4 s 1,7 mM ditiotreitolom, 14 µL otopine inhibitora u dimetilsulfoksidu (DMSO) ili čistog DMSO-a i 20 µL otopine S-(5'-adenozil)-L-metionina (SAM) u vodi (konačna koncentracija 20 µM). Smjesa je predinkubirana 5 min na 37 °C, a zatim je dodano 40 µL otopine 6MP u 10 mM NaOH (konačna koncentracija 500 µM). Smjesa je inkubirana 90 min na 37 °C, nakon čega je u smjesu dodano 25 µL hladne perklorne kiseline (ukupni volumen inkubata 500 µL). Epruvete su centrifugirane 10 min na 2000 g te su supernatanti injektirani u HPLC sustav.

3.3.5.3. Kromatografska analiza

Separacije su provedene na Agilent 1100 Series instrumentu te na CORTECS Phenyl koloni dimenzija $4,6 \times 150$ mm i veličine čestica $2,7 \mu\text{m}$. Mobilna faza sastojala se od 0,1%-tne (V/V) mravlje kiseline u ultračistoj vodi, odnosno metanolu kao sastavnice A, odnosno B, a elucija je provedena prema programu prikazanom u Tablici 7 uz protok $1,0 \text{ mL/min}$. Kolona je termostatirana na $35,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Volumen injektiranja iznosio je $40,0 \mu\text{L}$, a igla je isprana vodom nakon svakog injektiranja. Detekcija 6MMP provedena je na 291 nm , bez referentne valne duljine. Ukupno trajanje analize iznosilo je 22 min .

Tablica 7. Gradijentni program elucije HPLC metode za određivanje 6MMP u hemolizatu

$t \text{ (min)}$	$\varphi_A \text{ (\%)}$	$\varphi_B \text{ (\%)}$
0	90	10
12	78	22
12,5	0	100
16	0	100
16,5	90	10
22	90	10

Validacija metode provedena je prema ICH smjernicama (133) na uzorku hemolizata obogaćenom standardnom otopinom 6MMP te predobrađenom prema postupku navedenom u odjeljku 3.3.5.2. Ispitani su selektivnost, linearnost, točnost, preciznost i LOQ.

3.3.5.4. Ispitivanje kinetike metilacije 6-merkaptopurina putem tiopurin metiltransferaze

Kinetika metilacije u odnosu na 6MP kao supstrat ispitana je u rasponu koncentracija 6MP od 0 do $2000 \mu\text{M}$ uz konstantnu koncentraciju SAM od $50 \mu\text{M}$, dok je kinetika u odnosu na SAM kao supstrat ispitana u rasponu koncentracija SAM od 0 do $50 \mu\text{M}$ uz konstantnu koncentraciju 6MP od $2000 \mu\text{M}$. Aktivnost enzima izražena je kao $\text{nmol nastalog 6MMP/h/g Hb}$. Maksimalna brzina enzimske reakcije (V_{max}) i Michaelisova konstanta (K_m) određene su nelinearnom regresijom.

3.3.5.5. Inhibicija tiopurin metiltransferaze ekstraktima odabranih biljnih droga

Inhibicijska moć ekstrakata praćena je padom koncentracije metabolita 6MMP nakon inkubacije s određenom koncentracijom ekstrakta prema protokolu navedenom u odjeljku 3.3.5.2. Kao negativna kontrola (0 % inhibicije) umjesto otopine inhibitora u DMSO-u dodan je čisti DMSO. Kao pozitivna kontrola korišten je poznati inhibitor TPMT-a furosemid (148). Sva ispitivanja provedena su u triplicatu.

3.3.6. Ispitivanje inhibicije ksantin oksidaze ekstraktima lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra

3.3.6.1. Priprema inkubata

U jažice mikrotitarske ploče preneseno je 90 μL 70 mM fosfatnog pufera pH 7,4, 40 μL otopine XO (pripremljena razrjeđivanjem suspenzije XO-a u 70 mM fosfatnom puferu pH 7,4; konačna koncentracija XO u inkubatu 40 mU/mL) i 20 μL otopine inhibitora u 10%-tnom (*V/V*) DMSO-u u vodi [ili samog 10%-tnog (*V/V*) DMSO-a u vodi u slučaju negativne kontrole]. Smjese su predinkubirane 5 min te je u njih dodano 50 μL otopine 6MP u 5 mM NaOH (konačna koncentracija 10 μM). Inkubati su promiješani (konačan volumen 200 μL) te centrifugirani kako bi se uklonili mjehurići zraka.

3.3.6.2. Praćenje aktivnosti ksantin oksidaze i ispitivanje kinetike oksidacije 6-merkaptopurina

Aktivnost XO-a praćena je spektrofotometrijskim mjerenjem inkubata na SPark M10 instrumentu. Apsorbancija inkubata praćena je na 355 nm ponovljenim mjerenjima u razmaku od 30 sekundi kroz 60 ciklusa. Vrijeme mirovanja nakon pomicanja glave, a prije snimanja apsorbancije (engl. *settle time*) iznosilo je 150 ms, a broj bljesaka 10. Aktivnost XO-a izražena je kao brzina promjene apsorbancije na 355 nm u ovisnosti o vremenu u uvjetima početne brzine reakcije (engl. *initial reaction rate*). Kinetika oksidacije 6MP ispitana je u rasponu koncentracija 6MP od 0 do 75 μM . Maksimalna brzina enzimske reakcije (V_{max}) i Michaelisova konstanta (K_{m}) određene su nelinearnom regresijom.

3.3.6.3. Inhibicija ksantin oksidaze ekstraktima i aktivnim sastavnicama odabranih biljnih droga

Inhibicijska moć ekstrakata praćena je smanjenjem početne brzine reakcije nakon inkubacije s određenom koncentracijom ekstrakta prema protokolu navedenom u odjeljku 3.3.6.1. Kao negativna kontrola (0 % inhibicije) umjesto otopine inhibitora u 10%-tnom (*V/V*) DMSO-u u vodi dodan je 10%-tni (*V/V*) DMSO u vodi. Kao pozitivna kontrola korišten je poznati inhibitor XO-a alopurinol (149). Sva ispitivanja provedena su u triplicatu.

3.3.7. Statistička analiza

Svi podaci iz validacija i analiza HPLC metoda opisanih u poglavljima 3.3.1.3., 3.3.1.6., 3.3.2.3., 3.3.3.4., 3.3.4.2., 3.3.4.3. i 3.3.5.3. uz izuzetak procjene robustnosti metode za određivanje aktivnih sastavnica u biljnim drogama i pripravcima obrađeni su u programu Microsoft Office Excel v. 2112 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD). PCA i CA analiza FTIR podataka provedene su u SPSS v23.0 programskom paketu (IBM, Armonk, NY, SAD). Optimizacija ekstrakcije aktivnih sastavnica iz biljnih droga i pripravaka i procjena robustnosti odgovarajuće kromatografske metode provedeni su u programskom paketu Design Expert v7.0.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, SAD). Podaci interakcije aktivnih sastavnica biljnih droga i pripravaka te 6MP za vezanje na HSA te ostalih aktivnosti TPMT-a i XO-a nakon inhibicije obrađeni su u programskom paketu Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Pri statističkoj analizi podataka kao razina značajnosti uzeta je vrijednost od 5 % ($\alpha = 0,05$), ukoliko nije drugačije navedeno.

4. REZULTATI I RASPRAVA

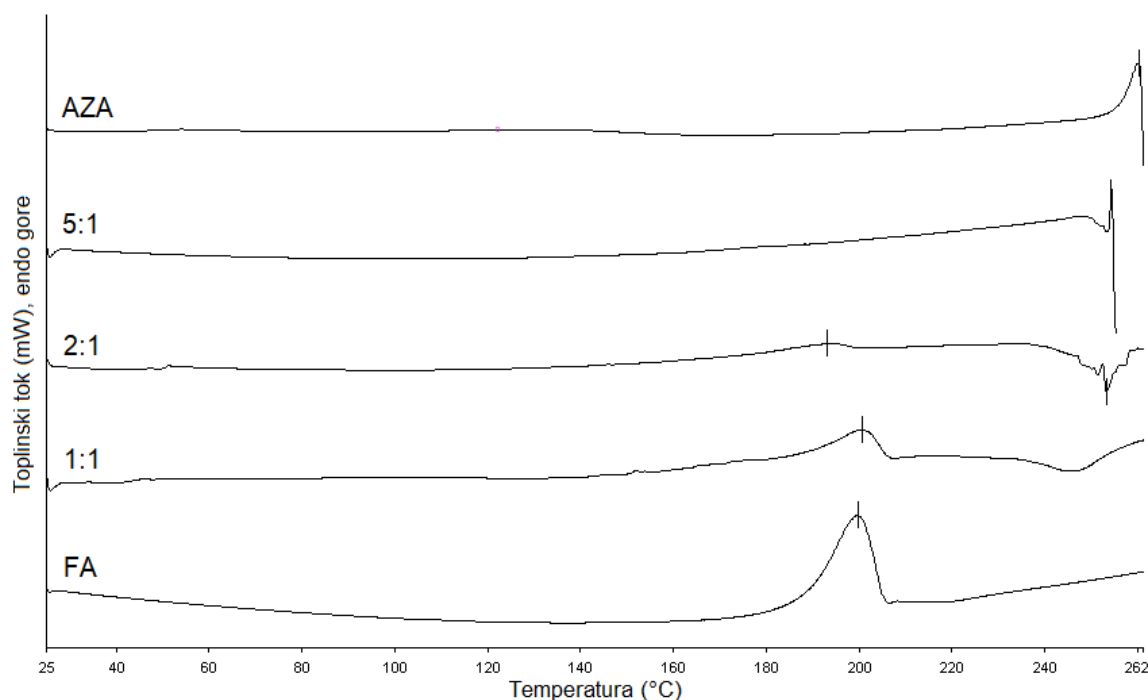
4.1. Studije kompatibilnosti azatioprina i folne kiseline

Fizikalno-kemijska kompatibilnost AZA i FA ispitana je upotrebom većeg broja pristupa (DSC, IST, prisilna razgradnja i oslobađanje u biorelevantnom mediju) kako bi se moguća interakcija okarakterizirala iz više aspekata, kao i potvrdili rezultati dobiveni pojedinačnim pristupima. Za inicijalna saznanja upotrijebljena je brza i ekonomična DSC tehnika, nakon čega je razvijena stabilitetno-indikativna HPLC metoda za istovremenu analizu AZA i FA. U sklopu razvoja stabilitetno-indikativne metode, provedena je i prisilna razgradnja te su na kraju izvedeni IST i studija oslobađanja u biorelevantnom mediju. U pojedinim ispitivanjima korištene su i pomoćne tvari tipične za izradu tableta pod pretpostavkom da bi navedeni FDC bio u obliku tableta s obzirom na to da su pripravci AZA i FA registrirani u Republici Hrvatskoj najčešće u tom ljekovitom obliku (150).

4.1.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Kao prvi od pristupa, upotrijebljena je brza, jednostavna i vremenski te financijski vrlo isplativa termoanalitička DSC tehnika. Pod pretpostavkom kompatibilnosti u DSC ispitivanjima podrazumijeva se izostanak novih pikova, kao i prisutnost već postojećih pikova u termogramu smjese ispitivanih tvari u odnosu na termograme pojedinačnih tvari (79). Osim toga, temperaturni pomaci pikova trebali bi biti manji od 5 °C (151). U suprotnom, rezultati upućuju na moguću nekompatibilnost. Analizirane su pojedinačne djelatne tvari, kao i njihove 1:1, 2:1 i 5:1 AZA:FA smjese (termogrami prikazani na Slici 2). Na termogramu djelatne tvari FA vidljiv je endotermni pik na oko 200 °C koji odgovara njenom prividnom taljenju. Na termogramu AZA, s druge strane, prisutan je endotermni pik na 260 °C kojeg prati brza egzotermna reakcija koja predstavlja raspad AZA nakon taljenja, što je i u skladu s literaturom (152, 153). No, pri analizi smjesa na Slici 2 vidljivo je kako je pik FA pomaknut prema nižim temperaturama (do 6 °C), dok je pik AZA ili pomaknut prema nižim temperaturama (oko 6 °C), ili nije ni prisutan u nekim smjesama. Iako ovi rezultati impliciraju interakciju sastavnica, moguće je da dolazi do otapanja AZA u talini FA, što objašnjava odsutnost pika u smjesama s višim udjelom FA. Ova pretpostavka objasnila bi i prisutnost pika u 5:1 smjesi s obzirom na to da se suvišak AZA ne može otopiti u ograničenoj količini taline FA. Navedena teorija, ipak, ne objašnjava temperaturni pomak pikova AZA i FA te i dalje upućuje na interakciju između sastavnica. Osim toga, pri niskim udjelima FA u smjesi zbog ograničene osjetljivosti same tehnike otežava se praćenje endotermnog taljenja FA. S

obzirom na sve navedeno, rezultati dobiveni DSC-om su nejasni i dvojbeni te je pristupljeno daljnjim istraživanjima kako bi oni bili potvrđeni ili opovrgnuti.

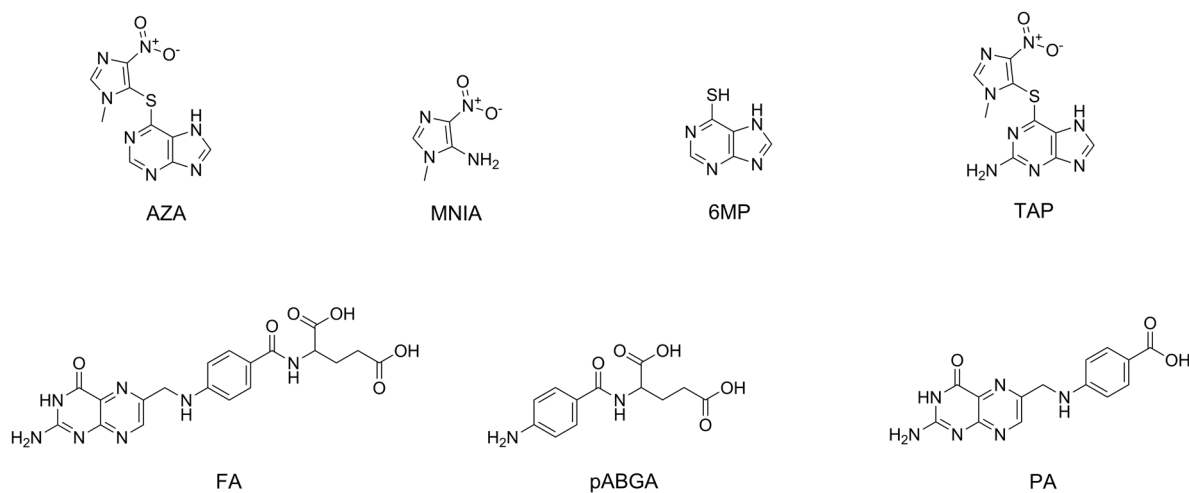


Slika 2. DSC termogrami AZA, FA i njihovih smjesa. Omjeri predstavljaju masene udjele AZA:FA u smjesi

4.1.2. Razvoj stabilitetno-indikativne HPLC metode za određivanje azatioprina i folne kiseline

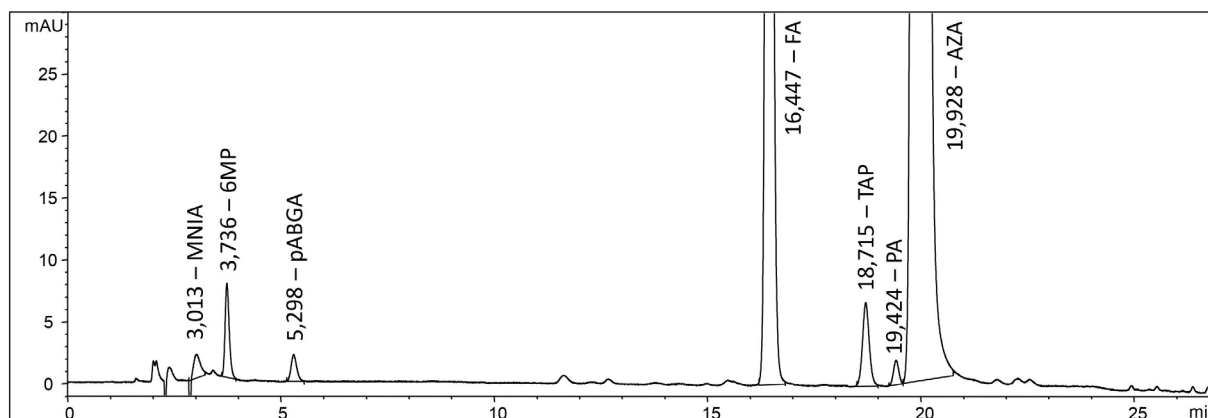
4.1.2.1. Optimizacija uvjeta separacije

Prije daljnjih ispitivanja kompatibilnosti, bilo je potrebno razviti i optimirati HPLC metodu za određivanje AZA i FA. Jedan od ključnih zahtjeva navedene metode je i njena stabilitetno-indikativna moć; razgradni produkti ne smiju ometati određivanje djelatnih tvari kako bi se mogla provesti ispitivanja kompatibilnosti putem prisilne razgradnje. Za početak razvoja metode, od standarada korišteni su AZA i FA, ali i neki mogući razgradni produkti kako bi se jasnije okarakterizirali razgradni putevi djelatnih tvari, kao i moguća onečišćenja u djelatnim tvarima ili ljekovitim oblicima. Od onečišćenja vezanih uz AZA, korišteni su MNIA, 6MP i TAP, dok su pABGA i PA predstavljali onečišćenja FA (Slika 3). Razvoj navedene HPLC metode započet je korištenjem smjese navedenih standarada, a nastavljen na smjesi djelatnih tvari te ljekovitim oblicima i njihovim smjesama.



Slika 3. Kemijske strukture AZA, FA i njihovih onečišćenja

Pri optimizaciji metode kolona Zorbax SB-C8 (150 × 4,6 mm, 5 μm) pokazala je najbolju separacijsku moć u odnosu na ostale kemizme i dimenzije stacionarnih faza, stoga je ona korištena u daljnjim ispitivanjima. Što se tiče vodene sastavnice mobilne faze, ispitani su 10 mM puferi amonijeva formijata pH 3,5 i 4,5 te vodena otopina mravlje kiseline. Korištenjem pufera pH 4,5 nije postignuto zadržavanje svih analita (pABGA je eluirala unutar mrtvog vremena čak i pri najmanjem mogućem postotku organske faze). Pufer pH 3,5 i mravlja kiselina dali su vrlo slične kromatograme sa zadovoljavajućim zadržavanjem svih analita te je kao vodena sastavnica odabrana mravlja kiselina u ultračistoj vodi (0,1 %, *V/V*) zbog jednostavnosti pripreme. Kao organska sastavnica mobilne faze korišten je acetonitril koji je pokazao prednosti nad metanolom u pogledu selektivnosti i brzine elucije, što povećava protočnost metode. Nadalje, utjecaj temperature kolone proučavan je na 30,0, 35,0 i 40,0 °C. U ispitivanjima selektivnosti otkriveno je da pri 40,0 °C jedan od razgradnih produkata koeluirao s AZA, dok su pri 30,0 °C pikovi bili znatno niži i širi. Temperatura od 35,0 °C odabrana je kao kompromis te je utvrđena dobra selektivnost, kao i poželjan izgled pikova, osiguravajući niže granice dokazivanja i određivanja. Naposljetku, odabrana je valna duljina detekcije: kako bi metoda mogla biti primijenjena i na detektoru s jednom valnom duljinom, korištena je valna duljina od 285 nm, koja odgovara apsorpcijskim maksimumima pABGA i PA očekivanim u najmanjim koncentracijama. Pri navedenoj valnoj duljini, nije dobiven linearan odaziv AZA zbog visokih koncentracija te preopterećenja detektora, stoga su za određivanje AZA uzorci deseterostruko razrijeđeni čime je postignuta zadovoljavajuća linearnost. Kromatogram otopine standarada pri optimiranim uvjetima prikazan je na Slici 4.



Slika 4. Kromatogram smjese standardnih otopina (AZA – 1000 $\mu\text{g/mL}$, FA – 50 $\mu\text{g/mL}$, MNIA, 6MP i TAP – 10 $\mu\text{g/mL}$, pABGA i PA – 1 $\mu\text{g/mL}$)

4.1.2.2. Validacija metode

Nakon razvoja, metoda je validirana prema ICH smjernicama. Selektivnost je ispitana kao prvi i ključan parametar. U svim ispitivanjima kao mjera selektivnosti uzeta je odsutnost drugih pikova na vremenima zadržavanja ili čistoća pikova AZA i FA. Studije prisilne razgradnje (detaljan opis u idućem odlomku) izvršene su na smjesi ljekovitih oblika AZA i FA kao najsloženijem uzorku te je ispitana čistoća pikova AZA i FA, koja je u svim ispitivanjima bila iznad 995, čime možemo zaključiti kako nema zamjetne koelucije. Za dodatnu provjeru provedene su studije prisilne razgradnje i na placebo i samom otapalu, pri čemu nisu uočeni pikovi na vremenima zadržavanja AZA i FA. Nadalje, sama otopina placeba, kao i ona obogaćena standardima, su analizirane. U otopini placeba nisu uočeni interferirajući pikovi, dok je čistoća pikova svih analita u otopini placeba obogaćenoj standardima također bila iznad 995. Ovime je dokazana više nego zadovoljavajuća selektivnost metode.

Nadalje, ispitani su linearnost i LOD/LOQ metode. Korišteno je barem pet koncentracijskih razina standardnih otopina u rasponu od 80 do 120 % nominalne koncentracije za AZA i FA te od LOQ-a do 150 % gornje granice onečišćenja u ljekovitom obliku prema monografiji Britanske farmakopeje za onečišćenja; gornja granica iznosi 1 % nominalne koncentracije AZA za njegova onečišćenja te 2 % nominalne koncentracije FA za njena onečišćenja (154). Dobiveni su vrlo visoki koeficijenti korelacije (iznad 0,9992, Tablica 8) sa statistički neznačajnim odsječkom na y -osi ($p \geq 0,163$) za sve analite, što ukazuje na linearnost metode u navedenom području. Rasip reziduala bio je nasumičan. LOD, odnosno LOQ procijenjeni su na temelju omjera signal/šum 3:1, odnosno 10:1. Iz Tablice 8 vidljivo je

kako su postignute niske granice, pogotovo za onečišćenja/razgradne produkte FA (LOQ = 0,25 µg/mL), što je bitno s obzirom na to da su ona očekivana u najmanjim koncentracijama. Izraženi su i relativno vrijeme zadržavanja (engl. *relative retention time*, RRT) i relativni faktor odaziva detektora (engl. *relative response factor*, RRF) za sva onečišćenja, što omogućava njihovo određivanje navedenom metodom i u odsustvu njihovih standarada korištenjem kalibracijskih pravaca AZA i FA razrijeđenih u koncentracijsko područje onečišćenja.

Tablica 8. Linearnost, LOD i LOQ metode

analit	radno područje ($\mu\text{g/mL}$)	jednadžba pravca	<i>p</i> -vrijednost odsječka na <i>y</i> -osi	koeficijent korelacije	RRT ^a	RRF ^b	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
AZA	80,0–120,0	$y = 31,70 x + 121,53$	0,163	0,9994	/	/	/	/
FA	40,0–60,0	$y = 32,61 x + 35,25$	0,313	0,9995	/	/	/	/
MNIA	2,50–15,00	$y = 2,86 x + 5,76$	0,946	0,9992	0,15	0,09	0,80	2,50
6MP	0,75–15,00	$y = 8,89 x - 1,72$	0,336	0,9996	0,19	0,26	0,25	0,75
TAP	0,75–15,00	$y = 13,85 x - 0,04$	0,529	0,9999	0,94	0,41	0,25	0,75
pABGA	0,25–1,50	$y = 19,40 x - 0,06$	0,796	0,9998	0,32	0,73	0,08	0,25
PA	0,25–1,50	$y = 41,27 x + 0,27$	0,225	0,9999	1,18	1,56	0,08	0,25

^aizraženo kao omjer vremena zadržavanja onečišćenja/razgradnog produkta i odgovarajuće djelatne tvari, ^bizraženo kao omjer nagiba pravca onečišćenja i odgovarajuće djelatne tvari u koncentracijskom području onečišćenja

Točnost je ispitana metodom standardnog dodatka; smjesa ljekovitih oblika ekstrahirana na nisku koncentracijsku razinu AZA i FA (80 % nominalne koncentracije) obogaćena je standardnim otopinama na srednju i visoku razinu (100, odnosno 120 %). Za onečišćenja, otopina placeba obogaćena je standardnim otopinama na tri koncentracijske razine (navedene u Tablici 9). Sva ispitivanja provedena su u triplikatu. Analitički prinosi u rasponu od 97,7 do 105,9 % za djelatne tvari te 94,1 do 110,5 % za onečišćenja upućuju na dobru točnost metode.

Preciznost metode ispitana je u aspektima injekcijske ponovljivosti, ponovljivosti i srednje preciznosti. Injekcijska ponovljivost proučena je ponovljenim injektiranjem smjese standardnih otopina u heptaplikatu te se pokazala zadovoljavajućom; relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation*, RSD) površina bilo je manje od 0,5 % za djelatne tvari te manje od 2,8 % za onečišćenja. Ponovljivost za djelatne tvari ispitana je ponovljenom ekstrakcijom smjese ljekovitih oblika AZA i FA (srednja koncentracijska razina) u heksaplikatu te je RSD analitičkih prinosa bio manji od 1,6 % (Tablica 9). Za onečišćenja, procedura je provedena obogaćivanjem otopine placeba standardnim otopinama onečišćenja (u koncentraciji granice Britanske farmakopeje za pojedino onečišćenje u ljekovitom obliku) u heksaplikatu; RSD vrijednosti bile su manje od 4,2 %, što je očekivano zbog njihovih nižih koncentracija. Srednja preciznost ispitana je na isti način kroz tri dana u triplikatu. RSD-ovi površina za djelatne tvari bili su manji od 1,4 %, a za onečišćenja manji od 5,0 %. Metoda je, stoga, pokazala dostatnu preciznost.

Tablica 9. Parametri točnosti i preciznosti metode

analit	niska/srednja/visoka koncentracijska razina (µg/mL)	analitički prinos (srednja vrijednost ± RSD, %, <i>n</i> = 3)			ponovljivost (RSD, <i>n</i> = 6)	srednja preciznost (RSD, <i>n</i> = 9)
		niska razina	srednja razina	visoka razina		
AZA	80/100/120	105,9 ± 0,3	101,3 ± 3,6	100,5 ± 2,0	1,5	1,4
FA	40/50/60	97,7 ± 1,6	100,0 ± 0,3	99,0 ± 0,4	1,6	1,3
MNIA	2,50/5,00/15,00	100,7 ± 1,0	101,5 ± 0,4	99,7 ± 0,3	2,6	2,1
6MP	1,00/5,00/15,00	94,9 ± 1,2	95,4 ± 0,9	94,8 ± 0,6	4,2	5,0
TAP	1,00/5,00/15,00	94,1 ± 0,2	99,9 ± 0,4	99,9 ± 0,1	2,0	1,7
pABGA	0,25/0,50/1,50	110,5 ± 5,3	99,4 ± 4,9	97,5 ± 4,1	3,8	3,0
PA	0,25/0,50/1,50	109,5 ± 2,1	100,9 ± 0,5	98,6 ± 0,6	3,3	3,2

Na kraju, robustnost je ispitana variranjem protoka ($\pm 0,05$ mL/min), temperature kolone (± 1 °C) te gradijenta (± 1 %). Razlučivanje između svih analita u svim slučajevima bilo je više od 1,5.

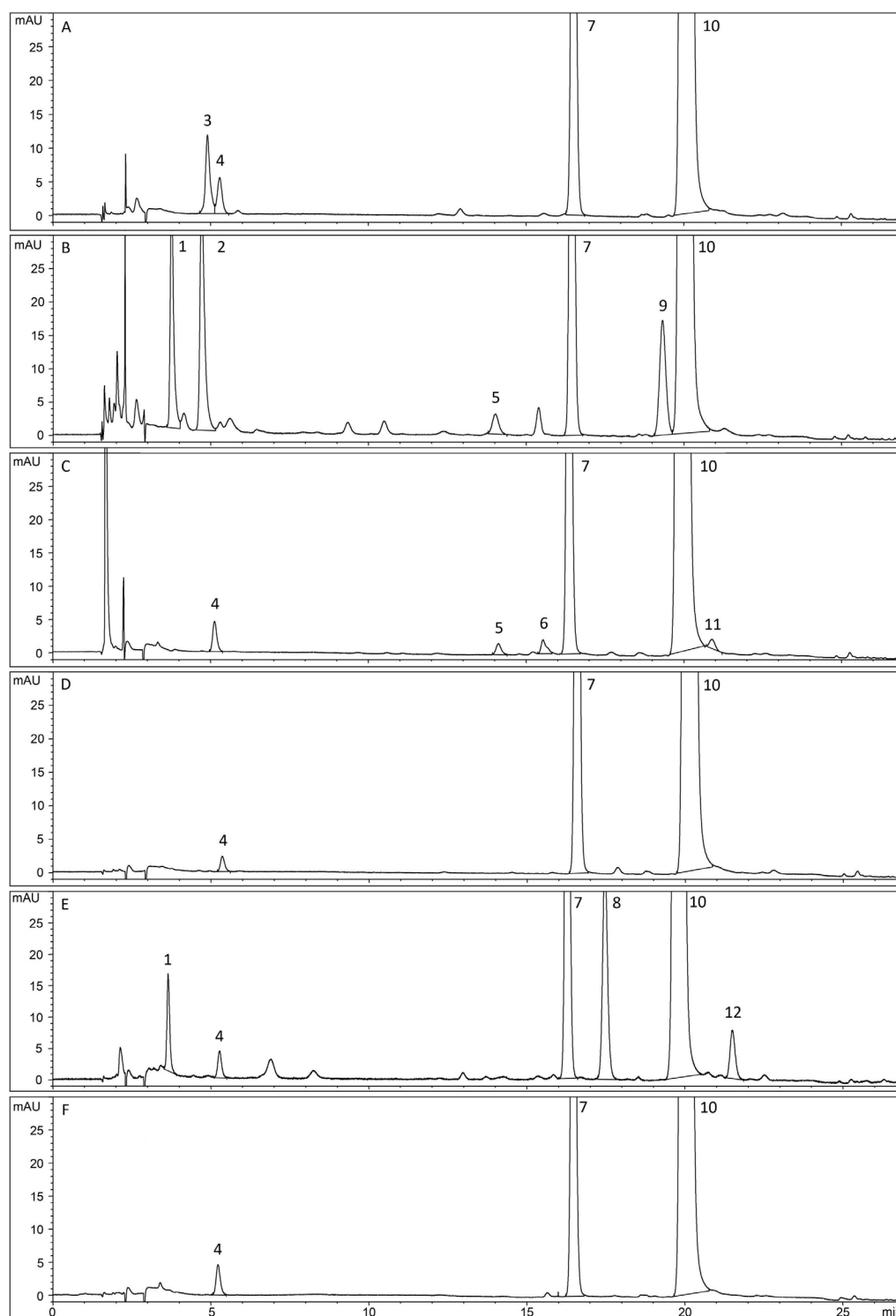
4.1.3. Studije prisilne razgradnje na uzorcima azatioprina i folne kiseline

U studijama prisilne razgradnje praćen je razgradni profil svake od djelatnih sastavnica zasebno te u kombinaciji kako bi se uočile razlike u postotku razgradnje te mogućim interakcijskim i razgradnim produktima, što upućuje na njihovu nekompatibilnost. Osim toga, stresirana je i smjesa lijekovitih oblika kako bi se ispitao mogući utjecaj pomoćnih tvari na kompatibilnost. Placebo i otapalo stresirani su za eliminaciju pikova nastalih njihovom razgradnjom. Uzorci su podvrgnuti stresu kojim se postiže do 20 % razgradnje labilnije djelatne tvari; pri razgradnji iznad navedene vrijednosti javlja se mogućnost nastanka sekundarnih razgradnih produkata, što nije poželjno (155). Ukoliko nije došlo do dostatne razgradnje unutar 5–7 dana, stresiranje je prekinuto. Uvjeti i postotak razgradnje svakog od uzoraka pri različitim vrstama stresa prikazani su u Tablici 10, dok su na Slici 5 prikazani kromatogrami stresirane smjese lijekovitih oblika.

Tablica 10. Rezultati studije prisilne razgradnje na uzorcima AZA i FA

vrsta stresa	uvjeti razgradnje	razgradnja (%)					
		AZA djelatna tvar	FA djelatna tvar	smjesa djelatnih tvari		smjesa ljekovitih oblika	
				AZA	FA	AZA	FA
kiselina	0,1 M HCl, 60 °C, 6 h	1,6	10,4	0,7	18,2	0,2	14,8
lužina	0,1 M NaOH, 60 °C, 6 h	8,5	0,5	9,4	^a	6,8	2,2
oksidativni	3%-tni H ₂ O ₂ , 60 °C, 30 min	/	9,6	/	7,4	/	10,1
termalni	80 °C, 5 dana	/	2,1	/	/	0,3	1,2
svjetlosni (krutine)	indirektna svjetlost, 7 dana	1,5	1,3	1,5	5,1	4,7	3,9
svjetlosni (suspenzije/otopine)	indirektna svjetlost, 30 min	/	10,0	0,6	6,1	2,7	5,4

^arazgradnja nije uočena



Slika 5. Kromatogrami prisilne razgradnje smjese lijekovitih oblika. A) kisela razgradnja, B) lužnata razgradnja, C) oksidativni stres, D) termalni stres, E) svjetlosni stres (krutine), F) svjetlosni stres (suspenzije/otopine). Legenda: 7 – FA, 10 – AZA, 1 – 6MP, 4 – pABGA, 2, 8, 9, 11 i 12 – razgradni produkti AZA, 3 i 6 – razgradni produkti FA, 5 – mogući produkt interakcije

Vidljivo je da je FA labilnija u većini uvjeta stresa od AZA, pri čemu kao glavni razgradni produkt nastaje pABGA (označena brojem 4 na Slici 5). Prema navedenim rezultatima može se zaključiti kako je veza između pteridinskog prstena i *p*-aminobenzojeve kiseline najpodložnija promjenama. I druge istraživačke skupine su utvrdile kako je pABGA jedan od najčešćih i najprisutnijih razgradnih produkata (156, 157). Osim pABGA, u kiseloj razgradnji uočen je dodatan razgradni produkt FA (označen brojem 3 na Slici 5) na RRT-u 0,29 u usporedbi s FA. On eluira nešto ranije od pABGA, što upućuje na njegov hidrofilniji karakter. Još jedan razgradni produkt FA (označen brojem 6, $RRT_{FA} = 0,95$) javlja se u oksidativnoj razgradnji, a pretpostavka je oksidacija neke od funkcionalnih skupina bez cijepanja veze. S druge strane, AZA je stabilniji u svim uvjetima osim pri lužnatom pH, gdje se primarno javlja cijepanje sulfidne veze te odcjepljenje imidazolskog prstena, čime kao glavni razgradni produkt nastaje 6MP (označen brojem 1 na Slici 5, $RRT_{AZA} = 0,19$). Ovo saznanje je u skladu s literaturom (158). Osim njega, prisutna su još dva dominantna razgradna produkta u lužnatoj razgradnji, označeni brojevima 2 ($RRT_{AZA} = 0,24$) i 9 ($RRT_{AZA} = 0,97$). Ostali razgradni produkti AZA (8, 11 i 12) prisutni su u manjim količinama, no ipak su uočljivi zbog vrlo visoke koncentracije AZA. Ispitivanjem čistoće pikova AZA i FA utvrđen je faktor čistoće pika iznad 995 u svim razgradnjama, što upućuje na dobru separaciju analita djelatnih tvari od svih razgradnih produkata.

Za kriterije kompatibilnosti odabrani su postoci razgradnje djelatnih tvari te sličnosti razgradnih profila među uzorcima pod istim uvjetima stresa. Iz Tablice 10 vidi se kako nema drastičnih razlika u razgradnji djelatnih tvari (najveća razlika između uzoraka je 3,2 % za AZA te 7,8 % za FA). Nadalje, nisu uočene znatne razlike u razgradnim produktima između uzoraka, kao ni novi pikovi u kiselom, termalnom i svjetlosnom stresu. Pri oksidativnom stresu i lužnatoj razgradnji, međutim, pojavio se novi pik u smjesi ljekovitih oblika, dok u drugim uzorcima nije uočen. Kako pik nije prisutan u smjesi djelatnih tvari, pretpostavka je kako on nije produkt interakcije AZA i FA, već interakcije jedne od djelatnih tvari s jednom od pomoćnih tvari. Naravno, u daljnjim istraživanjima potrebno je utvrditi javlja li se navedeni interakcijski produkt u ubrzanim i dugoročnim studijama stabilnosti te ga po potrebi strukturno i farmakološki okarakterizirati. Dodatno je ispitana i bilanca mase razgradnji kako bi se osiguralo da nema razgradnih produkata koji se ne mogu detektirati navedenom metodom (Tablica 11). Bilanca mase svih razgradnji bila je zadovoljavajuća, u rasponu od 95,2 do 100,1 %. Prema navedenim rezultatima može se pretpostaviti kako AZA i FA ne stupaju u znatne interakcije pri ispitanim uvjetima.

Tablica 11. Bilanca mase prisilnih razgradnji smjese ljekovitih oblika AZA i FA

Vrsta stresa	prinos analita (u odnosu na 100 % djelatne tvari), %												
	AZA	6MP RRT ^a = 0,19	AZA RP ^b 1 RRT = 0,24	AZA RP 2 RRT = 0,88	AZA RP 3 RRT = 0,97	AZA RP 4 RRT = 1,06	AZA RP 5 RRT = 1,09	AZA zbroj	FA	pABGA RRT = 0,32	FA RP 1 RRT = 0,29	FA RP 2 RRT = 0,95	FA zbroj
kiselina	99,8	/ ^c	/	/	/	/	/	99,8	85,2	3,4	8,0	/	96,6
lužina	93,2	2,9	1,4	/	0,9	/	/	98,4	97,8	/	/	/	97,8
oksidativni	100,0	/	/	/	/	0,1	/	100,1	89,9	3,2	/	2,1	95,2
termalni	99,7	/	/	/	/	/	/	99,7	98,8	0,8	/	/	99,6
svjetlosni (krutine)	95,3	1,4	/	1,6	/	/	0,4	98,7	96,1	3,7	/	/	99,8
svjetlosni (suspenzije/ otopine)	97,3	/	/	/	/	/	/	97,3	94,6	4,0	/	/	98,6

^arelativno vrijeme zadržavanja u odnosu na djelatnu tvar iz koje razgradni produkt nastaje, ^bbrazgradni produkt, ^cispod granice dokazivanja

4.1.4. Studija izotermalnog stresa uzoraka azatioprina i folne kiseline

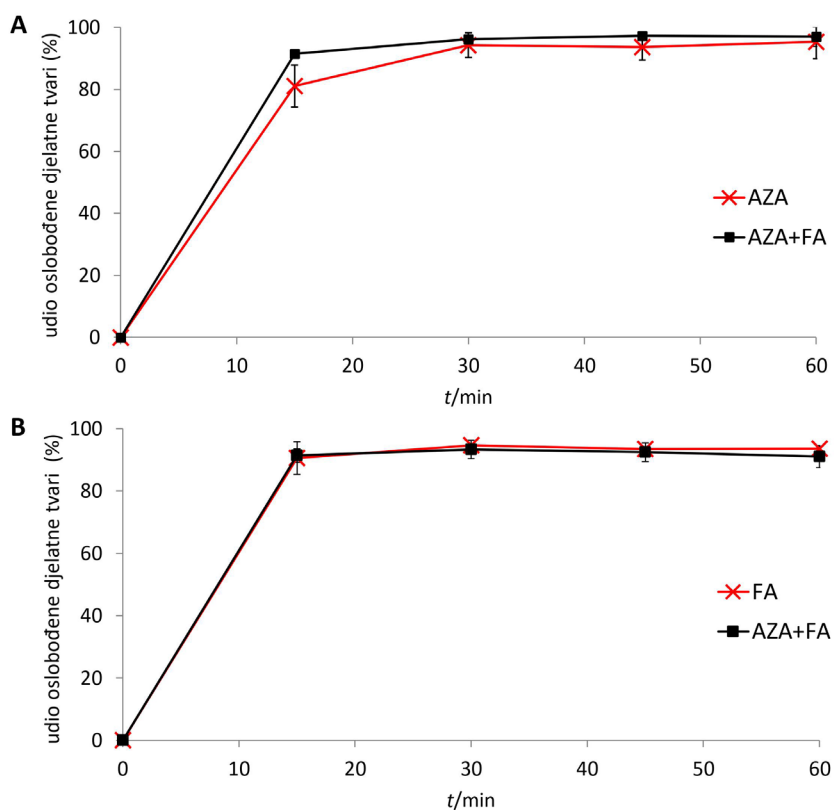
DSC analizama nije bilo moguće nedvojbeno tvrditi dolazi li do interakcije AZA i FA. Iako je DSC vrlo brza tehnika, uzorci se zagrijavaju na ekstremne temperature pri kojima se priroda i kinetika puteva razgradnje mogu bitno razlikovati od onih pri temperaturama skladištenja ljekovitih oblika. Velik je broj radova u literaturi u kojima je, prema rezultatima DSC analiza, prvotno pretpostavljena nekompatibilnost dviju djelatnih tvari ili djelatne te pomoćne tvari, da bi ona kasnije bila opovrgnuta korištenjem drugih tehnika poput infracrvene spektroskopije, rendgenske difrakcije na prahu, termalne mikroskopije te IST studija (92, 159–161). U tu svrhu provedena je IST studija koja, unatoč dugotrajnosti, daje realniju sliku kompatibilnosti. Djelatne tvari AZA, FA i njihova smjesa (omjer AZA:FA 20:1) te ljekoviti oblici AZA, FA i njihova smjesa (omjer AZA:FA 20:1) izložene su temperaturi od 50 °C 4 tjedna te su svi uzorci analizirani razvijenom HPLC metodom. Usporedo su analizirani i kontrolni uzorci čuvani zaštićeni od svjetla pri sobnoj temperaturi. Pri vizualnoj inspekciji nisu zamijećene promjene stresiranih uzoraka u odnosu na kontrolne. Osim toga, analitički prinosi stresiranih i kontrolnih uzoraka (Tablica 12) nisu se znatno razlikovali. Time je IST studijom utvrđena kompatibilnost AZA i FA, kao i njihova kompatibilnost s pomoćnim tvarima prisutnima u smjesi ljekovitih oblika.

Tablica 12. Rezultati IST studije na uzorcima AZA i FA

uzorak	promjena u izgledu stresiranog uzorka (u odnosu na kontrolni uzorak)	analitički prinos (srednja vrijednost ± RSD, <i>n</i> = 3)	
		stresirani uzorci	kontrolni uzorci
AZA djelatna tvar		101,7 ± 0,7	101,0 ± 1,6
FA djelatna tvar		100,5 ± 0,8	99,8 ± 3,0
smjesa djelatnih tvari	AZA	101,7 ± 0,8	101,9 ± 0,5
	FA	100,3 ± 0,1	99,8 ± 0,6
	nema vidljive promjene		
AZA ljekoviti oblik		99,2 ± 1,0	100,2 ± 0,9
FA ljekoviti oblik		99,9 ± 1,7	102,8 ± 0,8
smjesa ljekovitih oblika	AZA	98,9 ± 2,2	99,2 ± 1,4
	FA	102,9 ± 2,3	100,2 ± 2,9

4.1.5. Procjena interakcije azatioprina i folne kiseline prilikom oslobađanja u biorelevantnom mediju

Stabilnost djelatnih tvari u raznim biološki važnim medijima nakon primjene ljekovitog oblika je također od velike važnosti. Studije stabilnosti u biorelevantnom mediju koji simulira želučanu tekućinu su izostavljene iz par razloga: za početak, i AZA i FA su slabo topljivi u kiselom mediju te se ne očekuje kako će se ostvariti interakcija u čvrstom stanju. Osim toga, u kiselim uvjetima prisilne razgradnje, koji su pH vrijednošću slični onima u želucu, nije došlo do interakcije. Nadalje, istraživanja su utvrdila kako se 85 % volumena želuca prazni unutar 30 min u stanju gladovanja (u kojem se primjenjuju ovi lijekovi), što znači da djelatne tvari neće biti izložene kiselom mediju znatan vremenski period (162). Budući da će se djelatne tvari dulje zadržati u tankom crijevu, iz fiziološkog aspekta je, stoga, bitnije ispitati interakciju u FaSSIF-u. Oslobađanje djelatnih tvari iz ljekovitog oblika ispitano je na individualnim ljekovitim oblicima te pri njihovom zajedničkom izlaganju mediju te su uspoređeni profili oslobađanja (Slika 6) u periodima od 15 min. Nisu postignute znatne razlike u profilima oslobađanja (razlika između oslobođene količine djelatne tvari individualno i u kombinaciji u vremenskoj točki od 60 min bila je 1,6 % za AZA te 2,5 % za FA). Uz to, površina pika 6MP, glavnog razgradnog produkta AZA, nije se mijenjala tokom cijelog ispitivanja, što je dodatni pokazatelj stabilnosti AZA. Rezultati ovog ispitivanja upućuju na postojanost djelatnih tvari u biorelevantnom mediju pri istovremenoj primjeni.



Slika 6. Profili oslobađanja djelatnih tvari iz lijekovitih oblika: A) AZA individualno i u kombinaciji te B) FA individualno i u kombinaciji. Trake pogreške predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

4.1.6. Pregled rezultata ispitivanja kompatibilnosti azatioprina i folne kiseline

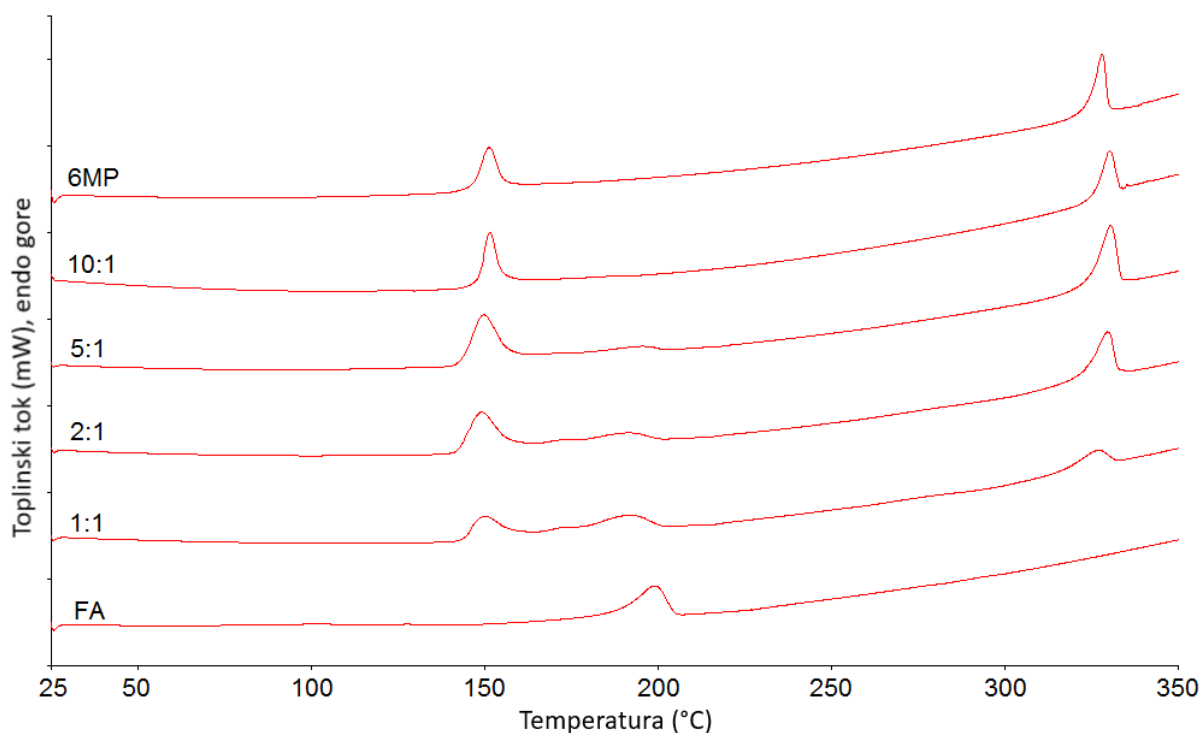
Inicijalna ispitivanja DSC-om uputila su na moguću nekompatibilnost AZA i FA zbog gubitka i pomaka pikova na termogramima smjese. Međutim, u svim ostalim pristupima ova tvrdnja je opovrgnuta. U studijama prisilne razgradnje dobivena je sličnost razgradnih profila AZA i FA u međusobnoj prisutnosti pri svim uvjetima stresa, izuzev nastanka mogućeg produkta interakcije jedne od djelatnih tvari s jednom od pomoćnih tvari u lužnatom i oksidativnom stresu smjese lijekovitih oblika; vjerojatnost nastanka interakcijskog produkta valja ispitati u realnim uvjetima nakon izrade FDC-a. IST studijom utvrđena je odsutnost znatnih promjena u analitičkim prinosima pri analizi stresiranih i kontrolnih uzoraka, što upućuje da nije došlo do interakcije. Naposljetku, AZA i FA postojani su u FaSSIF-u pH 6,5 pri istovremenom oslobađanju iz njihovih lijekovitih oblika. Zbirno, hipoteza o kompatibilnosti AZA i FA je potvrđena te je moguća upotreba jedinstvene smjese djelatnih i pomoćnih tvari za izradu FDC-a.

4.2. Studije kompatibilnosti 6-merkaptopurina i folne kiseline

Nakon potvrde kompatibilnosti AZA i FA, iduća etapa istraživanja bila je provesti studiju kompatibilnosti za drugi često korišteni tiopurinski imunosupresiv 6MP te FA. Iako u Republici Hrvatskoj trenutno nema registriranog čvrstog oralnog oblika 6MP, već je registrirana samo oralna suspenzija (163), tablete 6MP su često korištene kao alternativa terapiji AZA diljem svijeta. Stoga je studija kompatibilnosti provedena uzimajući u obzir tabletu kao najprikladniji ljekoviti oblik za izradu FDC-a te su u ispitivanjima korištene pomoćne tvari tipične za čvrste oralne oblike. Primijenjeni su svi već viđeni pristupi (DSC, IST studije, studije prisilne razgradnje i studija oslobađanja u biorelevantnom mediju) uz dodatak analize FTIR-om nakon IST-a kao kvalitativnog pristupa te nadopune kvantitativnoj analizi HPLC metodom.

4.2.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Za inicijalni uvid u termoanalitička svojstva 6MP, FA i njihovih smjesa upotrijebljen je DSC. Analizirane su čiste djelatne tvari te smjese u 6MP:FA omjerima 1:1, 2:1, 5:1 i 10:1, a pripadajući termogrami prikazani su na Slici 7. Na termogramu FA ponovno je prisutan endotermni pik na oko 200 °C koji odgovara njenom taljenju. 6MP u ispitanoj temperaturnom rasponu pokazuje dva endotermna pika: pik na oko 150 °C odgovara gubitku kristalne vode (korišteni 6MP je u obliku monohidrata), a pik na oko 330 °C predstavlja taljenje 6MP, što su zaključili i Franklin i sur. (164), kao i Kersten i sur. (165). Što se tiče smjesa, primjetno je širenje pikova, kao i blagi temperaturni pomaci prema višim (pik taljenja 6MP) ili nižim temperaturama (pik dehidracije 6MP i pik taljenja FA). U slučaju 6MP, pomaci su iznosili do 2,4 °C, što je unutar prihvatljivih granica. Pik FA se, međutim, pomaknuo do 7,9 °C u određenim smjesama, što može upućivati na određene fizikalno-kemijske promjene. No, navedeni događaji nerijetko se javljaju zbog samog miješanja analita, što smanjuje njihovu čistoću, a time i utječe na termoanalitička svojstva (166). Ponovno je nedostatak ove tehnike nedovoljna osjetljivost te je pik FA u 5:1 smjesi jedva zamjetan, a u 10:1 smjesi ga je nemoguće detektirati, što znači da se i omjer predviđen za FDC (20:1) ne može ispitati ovom tehnikom. Iako je DSC u ovom slučaju dao nešto jednoznačnije rezultate nego u ispitivanju AZA i FA te ukazao na moguću kompatibilnost, korišteni su i drugi pristupi da se ta saznanja potvrde.



Slika 7. DSC termogrami 6MP, FA i njihovih smjesa. Omjeri predstavljaju masene udjele 6MP:FA u smjesi

4.2.2. Razvoj stabilitetno-indikativne HPLC metode za određivanje 6-merkaptopurina i folne kiseline

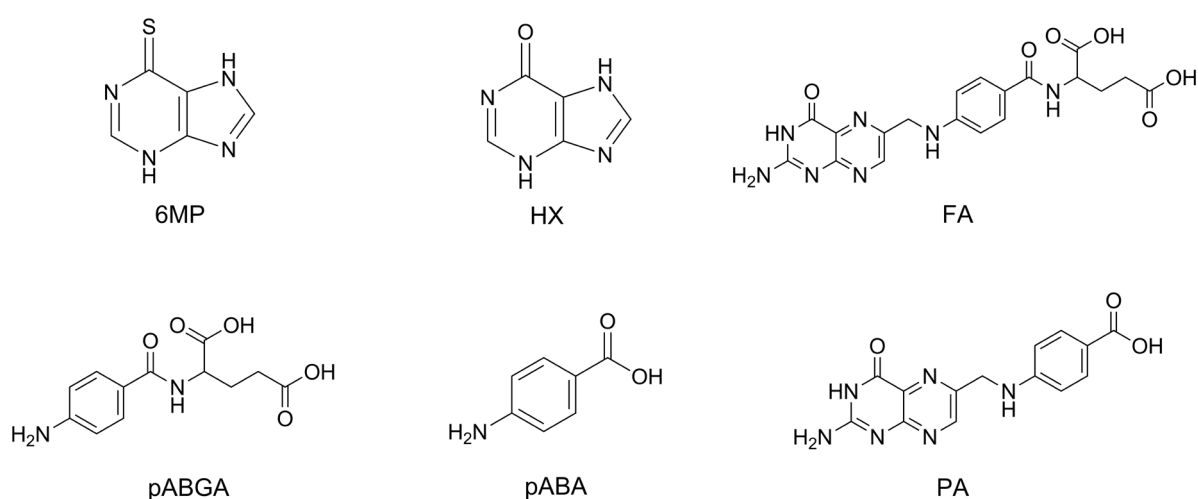
4.2.2.1. Odabir otapala za djelatne tvari, lijekovite oblike i placebo

Izbor otapala uvelike je bitan u stabilitetno-indikativnim studijama jer bi ono trebalo biti u blizini pH neutralnog područja da bi se pouzdano mogle provesti razgradnje kiselinom i lužinom. Kako je omjer 6MP i FA namijenjen za FDC prilično visok (20:1), potrebno je otopiti dovoljnu količinu smjese kako bi se metodom mogli dokazati i odrediti razgradni produkti FA. Prvotno je ispitan tetrahidrofuran zbog visoke topljivosti 6MP u njemu. No, uočena je ubrzana razgradnja 6MP već u samom otapalu (7 % unutar 15 min u 50%-tnom tetrahidrofuranu u vodi, *V/V*) zbog čega je tetrahidrofuran eliminiran. U studijama prisilne razgradnje je kasnije utvrđeno kako je jedan od razgradnih produkata oksidativnog stresa nastao pri otapanju 6MP u tetrahidrofuranu, što implicira na oksidaciju 6MP u tom otapalu. Sljedeće otapalo s nešto nižom topljivošću 6MP bio je metanol, u kojem se 6MP pokazao stabilan. Da bi se izbjegao utjecaj organskog otapala na prisilnu razgradnju, ali i smanjio učinak otapala (engl. *solvent effect*, distorzija ranoizlazećih pikova zbog jače elucijske moći otapala od početnog sastava mobilne faze) na kromatografske analize, potrebno je smanjiti

udio metanola u vodenometanolnom otapalu na minimum, pritom i dalje osiguravajući topljivost 6MP. Nakon studije učinka otapala i topljivosti, kao konačno otapalo odabran je 30%-tni (*V/V*) metanol u ultračistoj vodi.

4.2.2.2. Optimizacija uvjeta separacije

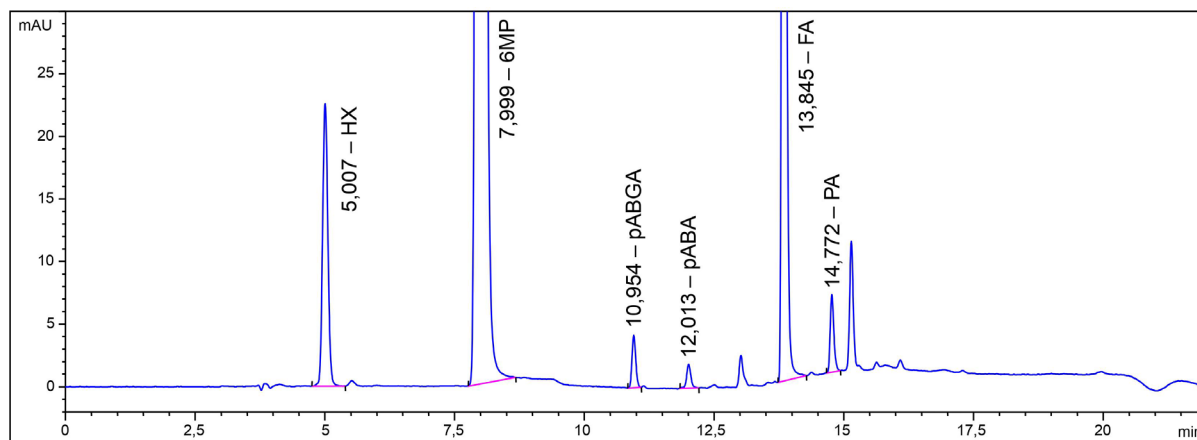
Za potrebe određivanja 6MP i FA, ali i njihovih razgradnih produkata te produkata interakcije razvijena je i validirana nova HPLC metoda. Od standarada korišteni su 6MP i FA, kao i neka od dostupnih onečišćenja (prema Europskoj i Britanskoj farmakopeji) koja su i najvjerojatniji razgradni produkti: HX za 6MP te pABGA, pABA i PA za FA (Slika 8) (154, 167).



Slika 8. Kemijske strukture 6MP, FA i njihovih onečišćenja

U preliminarnim istraživanjima korištene su tri stacionarne faze različitih kemizama: oktilsilil (C8), oktadecilsilil (C18) i fenil. Simetrija pikova bila je narušena na C8 i C18 kolonama, dok je fenilna kolona (CORTECS Phenyl, 150 × 4,6 mm, veličina čestica 2,7 μm) pokazala uske i simetrične pikove te je korištena u daljnjim istraživanjima. Puferi amonijeva acetata (pH 3,5 i 4,5) ispitani su kao vodena sastavnica mobilne faze, no doveli su do smanjenog zadržavanja analita (povećavajući rizik od koelucije) u usporedbi s odabranom sastavnicom, vodenom otopinom mravlje kiseline (0,1 %, *V/V*). Metanol, također zakiseljen mravljom kiselinom u koncentraciji 0,1 % (*V/V*) predstavljao je organsku sastavnicu mobilne faze s obzirom na to da povećava selektivnost ne narušavajući π - π interakcije između analita i fenilne stacionarne faze u usporedbi s acetonitrilom (168). Nakon optimizacije volumena injektiranja, protoka i gradijenta mobilne faze te temperature kolone, odabrana je valna duljina od 275 nm, ponovno

bliska maksimumima onečišćenja FA. Kromatogram smjese standardnih otopina prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Kromatogram smjese standardnih otopina (6MP – 500 µg/mL, FA – 25 µg/mL, HX – 10 µg/mL, pABGA i PA – 0,5 µg/mL, pABA – 0,125 µg/mL)

4.2.2.3. Validacija metode

Metoda je validirana sukladno ICH smjernicama. Prvi ispitan parametar bila je selektivnost. Prvotno je ekstrahirana smjesa pomoćnih tvari (placebo) te je supernatant analiziran, pri čemu je utvrđeno kako nema interferirajućih pikova. Otopina placeba obogaćena je standardnim otopinama te su ispitane čistoće pikova analita; svi faktori čistoće bili su iznad 998,6 (za donju granicu je postavljena vrijednost od 995). Osim toga, čistoća pikova 6MP i FA ispitana je i u studijama prisilne razgradnje; faktori čistoće bili su viši od 999,6 za 6MP i 995,4 za FA. Dakle, razvijena metoda je selektivna te se može koristiti u daljnjim ispitivanjima.

Linearnost (Tablica 13) je ispitana u rasponu od 80 do 120 % nominalnih koncentracija za djelatne tvari (500 µg/mL za 6MP i 25 µg/mL za FA) te od LOQ-a do 150 % gornje granice za onečišćenja prema monografijama Britanske farmakopeje za pojedinačne oblike; gornja granica iznosi 2 % nominalne koncentracije djelatne tvari za HX, pABGA i PA te 0,5 % nominalne koncentracije djelatne tvari za pABA (154). Otopine su pripremljene u triplicatu i analizirane na najmanje pet koncentracijskih razina. Dobiveni koeficijenti korelacije bili su iznad 0,9992, a pravci su pokazali statistički neznačajan odsječak na y-osi ($p \geq 0,357$) te nasumičan rasip reziduala. LOD i LOQ vrijednosti dobivene su putem omjera signal/šum (3:1, odnosno 10:1). Metoda se pokazala vrlo korisnom za dokazivanje i

određivanje niskih koncentracija onečišćenja (LOD, odnosno LOQ za onečišćenja FA iznosio je 0,02, odnosno 0,05 µg/mL).

Tablica 13. Linearnost, LOD i LOQ metode

analit	radno područje (µg/mL)	jednadžba pravca	p-vrijednost odsječka na y-osi	koeficijent korelacije	RRT ^a	RRF ^b	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
6MP	400–600	$y = 8,48 x - 10,37$	0,586	0,9999	/	/	/	/
FA	20–30	$y = 34,10 x + 5,12$	0,528	0,9999	/	/	/	/
HX	0,15–15,00	$y = 12,54 x - 0,97$	0,958	0,9999	0,63	1,46	0,06	0,15
pABGA	0,05–0,75	$y = 24,95 x + 0,04$	0,632	0,9999	0,79	0,75	0,02	0,05
pABA	0,05–0,20	$y = 57,51 x + 0,25$	0,520	0,9995	0,87	1,72	0,02	0,05
PA	0,05–0,75	$y = 40,40 x - 0,29$	0,357	0,9992	1,07	1,21	0,02	0,05

^aizraženo kao omjer vremena zadržavanja onečišćenja/razgradnog produkta i odgovarajuće djelatne tvari,

^bizraženo kao omjer nagiba pravca onečišćenja i odgovarajuće djelatne tvari u koncentracijskom području onečišćenja

Točnost i preciznost ispitani su obogaćivanjem otopine placeba standardnim otopinama. Točnost je ispitana na tri koncentracijske razine (navedene u Tablici 14) u triplicatu. Dobiveni su vrlo dobri analitički prinosi (od 99,6 do 100,9 % za djelatne tvari te od 97,1 do 105,9 % za onečišćenja), što ukazuje na prikladnu točnost metode. Preciznost je ponovno ispitana kao injekcijska ponovljivost, ponovljivost i srednja preciznost. Za injekcijsku ponovljivost, smjesa standardnih otopina injektirana je u nonaplikatu. RSD vrijednosti površina bile su manje od 0,3 % za djelatne tvari te manje od 2,6 % za onečišćenja, dok RSD vrijednosti vremena zadržavanja nisu prelazile 0,1 %, čime je demonstrirana prikladnost kromatografskog sustava. Ponovljivost je ispitana pripremom šest individualnih uzoraka u istom danu, a srednja preciznost kroz tri dana u triplicatu. RSD vrijednosti ponovljivosti za djelatne tvari i onečišćenja (Tablica 14) bile su niže od 0,5, odnosno 4,3 %, dok su one za srednju preciznost bile niže od 0,7, odnosno 4,7 %.

Tablica 14. Točnost i preciznost metode

analit	niska/srednja/visoka koncentracijska razina (µg/mL)	analitički prinos (srednja vrijednost ± RSD, %, <i>n</i> = 3)			ponovljivost (RSD, <i>n</i> = 6)	srednja preciznost (RSD, <i>n</i> = 9)
		niska razina	srednja razina	visoka razina		
6MP	400/500/600	99,6 ± 1,7	99,8 ± 0,4	100,1 ± 0,1	0,2	0,3
FA	20/25/30	99,9 ± 1,7	100,1 ± 0,8	100,9 ± 1,1	0,5	0,7
HX	1,50/7,50/12,50	103,8 ± 1,5	100,2 ± 1,7	97,4 ± 0,8	1,6	2,1
pABGA	0,15/0,50/0,75	102,8 ± 4,2	102,2 ± 1,0	101,7 ± 1,0	1,2	3,2
pABA	0,07/0,15/0,20	98,4 ± 3,5	104,6 ± 3,2	105,9 ± 0,5	4,3	4,7
PA	0,15/0,50/0,75	97,1 ± 3,5	104,5 ± 1,2	105,5 ± 1,4	2,2	3,0

Robustnost je ispitana na smjesi standardnih otopina variranjem protoka mobilne faze ($\pm 0,02$ mL/min), temperature kolone (± 2 °C) i gradijentnog programa (± 1 %). RSD vrijednosti površina, odnosno vremena zadržavanja bile su niže od 6,4, odnosno 3,9 %. Osim toga, razlučivanje između pikova je bilo više od 2,48 u svim slučajevima.

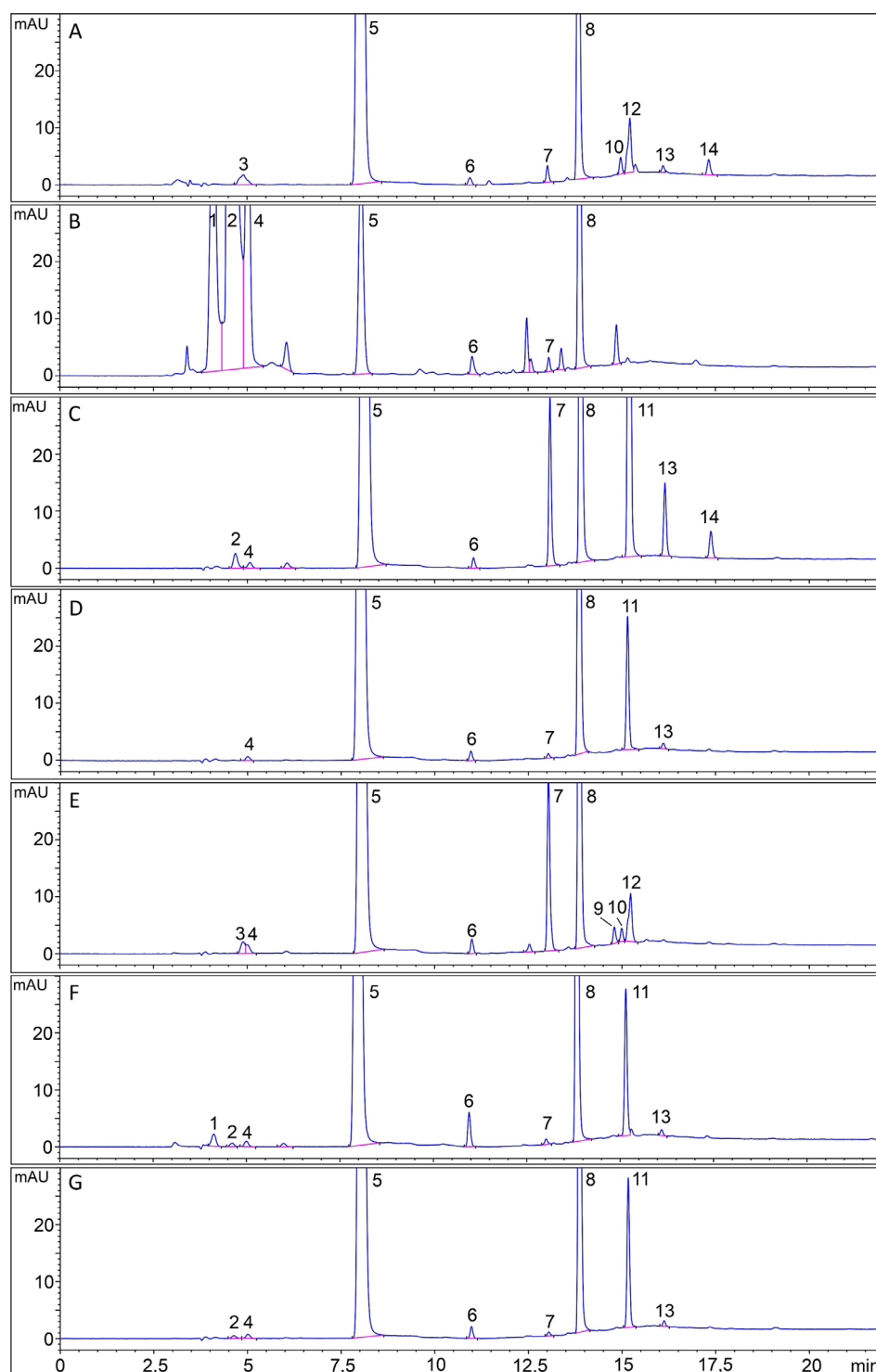
4.2.3. Studije prisilne razgradnje na uzorcima 6-merkaptopurina i folne kiseline

Studije prisilne razgradnje u uvjetima kiselog, lužnatog, oksidativnog, termalnog i svjetlosnog stresa su provedene na djelatnim tvarima i ljekovitim oblicima 6MP i FA te smjesama u 6MP:FA omjeru 20:1, kao i na placebo i otapalu. Kao što je već navedeno, za krajnju točku stresa odabrano je 5–20 % razgradnje labilnije djelatne tvari; ukoliko do navedene razgradnje nije došlo u razdoblju stresa od 7 dana, on je prekinut. Glavni kriterij kompatibilnosti bile su sličnosti razgradnih profila pojedinih sastavnica i smjesa, što uključuje postotak razgradnje te nastala onečišćenja, bilo razgradne ili interakcijske produkte. U Tablici 15 opisani su uvjeti i obimi razgradnje 6MP i FA pri raznim uvjetima stresa, a Slika 10 prikazuje kromatograme prisilne razgradnje smjese ljekovitih oblika.

Tablica 15. Rezultati studije prisilne razgradnje na uzorcima 6MP i FA

vrsta stresa	uvjeti razgradnje	razgradnja (%)					
		6MP djelatna tvar	FA djelatna tvar	smjesa djelatnih tvari		smjesa ljekovitih oblika	
				6MP	FA	6MP	FA
kiselina	0,1 M HCl, 4 h	3,1	8,9	/ ^a	10,9	/	9,2
lužina	0,1 M NaOH, 5 dana	7,2	1,8	2,6	1,9	90,0	1,8
oksidativni	0,1%-tni H ₂ O ₂ , 16 h	4,4	/	6,1	1,5	5,1	1,7
termalni (krutine)	60 °C, 7 dana	0,7	/	/	/	1,2	/
termalni (suspenzije/otopine)	60 °C, 5 dana	4,5	7,7	1,2	6,2	2,7	4,4
svjetlosni (krutine)	indirektna svjetlost, 7 dana	/	2,1	/	4,4	/	6,9
svjetlosni (suspenzije/otopine)	indirektna svjetlost, 15 min	0,5	5,1	/	/	0,2	1,4

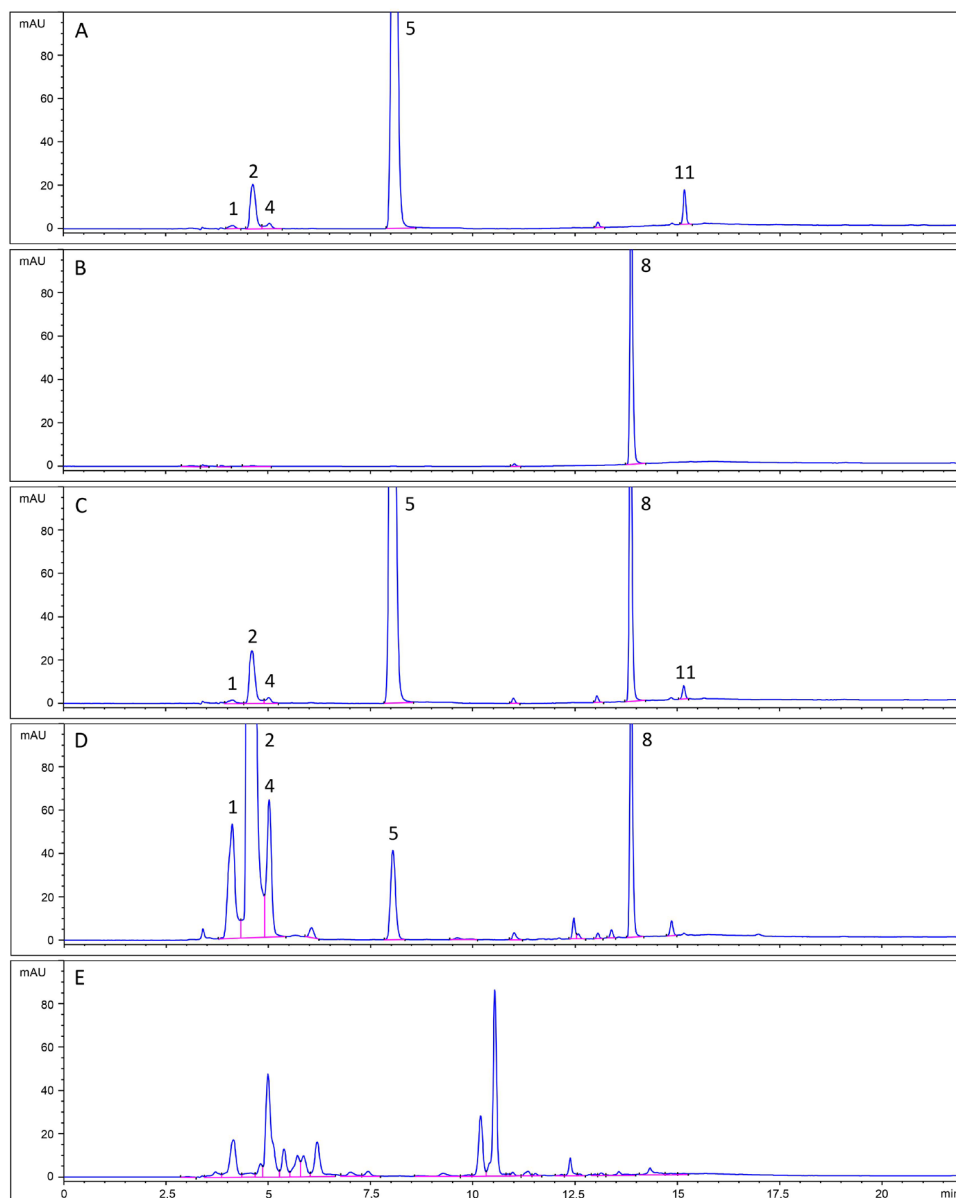
^arazgradnja nije uočena



Slika 10. Kromatogrami prisilne razgradnje smjese ljekovitih oblika. A) kisela razgradnja, B) lužnata razgradnja, C) oksidativni stres, D) termalni stres (krutine), E) termalni stres (suspenzije/otopine), F) svjetlosni stres (krutine), G) svjetlosni stres (suspenzije/otopine). Legenda: 5 – 6MP, 8 – FA, 4 – HX, 6 – pABGA, 9 – PA, 1, 2, 7, 11, 13 i 14 – razgradni produkti 6MP, 3, 10 i 12 – razgradni produkti FA

U ispitivanjima kisele hidrolize labilnijom se pokazala FA. Od nastalih onečišćenja jedino identificirano bila je pABGA (označena brojem 6 na Slici 10), dok su još značajni bili razgradni produkti označeni brojevima 10 ($RRT_{FA} = 1,08$) i 12 ($RRT_{FA} = 1,10$). Kako se ovi produkti zadržavaju na koloni duže od FA, a UV spektri su im identični, pretpostavka je kako su ova dva onečišćenja metilni esteri FA. Obimi razgradnje nisu se zamjetno razlikovali između uzoraka (Tablica 15, maksimalno 3,1 % za 6MP i 2,0 % za FA).

Kod stresa u lužnatom pH uočen je zanimljiv fenomen. Uzorci su stresirani 0,1 M NaOH (konačna koncentracija) u trajanju od pet dana. Iz Tablice 15 uočljivo je kako je 6MP pri ovim uvjetima nešto labilniji od FA. Nisu postignute znatne razlike u razgradnim profilima djelatnih tvari i njihove smjese, što je i prikazano na Slici 11, kromatogramima A, B i C. No, pri stresiranju smjese ljekovitih oblika (Slika 10B, Slika 11D) dolazi do drastičnog pada površine 6MP (90,0 %) te nastanka HX (označen brojem 4 na Slikama 10 i 11, djelomična koelucija s degradantima placebo), kao i velikih količina degradanata označenih brojevima 1 ($RRT_{6MP} = 0,51$, djelomična koelucija s degradantima placebo) i 2 ($RRT_{6MP} = 0,56$), dok je FA pokazala očekivan postotak razgradnje. Kako nije bilo razlika u razgradnji vrijednih spomena u profilima čistih djelatnih tvari i njihovih smjesa, za pretpostaviti je kako su pomoćne tvari odgovorne za smanjenu stabilnost 6MP. Uistinu, pri analizi placebo stresiranog pri istim uvjetima (Slika 11E) vidljiv je velik broj nastalih pikova. Promjena je bila i vizualno zamjetna pojavom žute boje otopine. Vjerojatno objašnjenje takve razgradnje 6MP je interakcija ne s FA, već s jednim ili više razgradnih produkata placebo. Pri izradi potencijalnog FDC-a, stoga, valja obratiti posebnu pažnju na odabir pomoćnih tvari. No, sami uvjeti stresa u prisilnoj razgradnji su ekstremni te je i moguće da se uočeni profil razgradnje nikad ne bi postigao pri uvjetima skladištenja, što je red ispitati dugoročnim i ubrzanim studijama stabilnosti.



Slika 11. Kromatogrami prisilne razgradnje u lužnatim uvjetima: A) djelatna tvar 6MP, B) djelatna tvar FA, C) smjesa djelatnih tvari, D) smjesa lijekovitih oblika, E) smjesa pomoćnih tvari. Legenda: 5 – 6MP, 8 – FA, 4 – HX, 1, 2, i 11 – razgradni produkti 6MP

Iako su primijenjeni uvjeti oksidacijskog stresa bili vrlo blagi (0,1%-tni H_2O_2 , V/V), postignut je dostatan pad koncentracije 6MP, što znači da je oksidacija vrlo vjerojatno jedan od primarnih puteva njegove razgradnje. Od razgradnih produkata prevalentni su oni označeni brojevima 7 ($\text{RRT}_{6\text{MP}} = 1,61$), 11 ($\text{RRT}_{6\text{MP}} = 1,87$) i 13 ($\text{RRT}_{6\text{MP}} = 1,99$) na Slici 10. Pik označen brojem 11 je već primijećen korištenjem tetrahidrofurana kao otapala, kao što je već navedeno. Budući da se sva tri razgradna produkta zadržavaju duže od 6MP, za pretpostaviti je da je došlo do dimerizacije putem nastanka disulfidne veze te dodatnih oksidacija na

nekima od funkcionalnih skupina. U slučaju FA, primijećen je mali porast pika pABGA. Razlike u profilima razgradnje nisu zamjetne (do 1,7 % za obje djelatne tvari).

Krutine su se pokazale stabilnima pri termalnom stresiranju kroz 7 dana s obzirom na to da nije postignuta razgradnja do 5 % ni za jedan analit. Nema velikih razlika između uzoraka (za FA nije zamijećena razgradnja, a razlike u razgradnjama 6MP iznosile su do 1,2 %). Termalna razgradnja djelatnih tvari u otopini je, kao što je i za očekivati, bila izraženija. FA je bila nešto labilnija u ovom slučaju (razgradnja do 7,7 %) u usporedbi s 6MP (razgradnja do 4,5 %). Od identificiranih razgradnih produkata FA nastaje pABGA, ali i PA (označena brojem 9 na Slici 10), što upućuje kako dolazi do hidrolize peptidne veze pri povišenoj temperaturi. Od ostalih onečišćenja FA nastaju vjerojatni metilni esteri (pikovi 10 i 12), kao i u stresu kiselinom. Prevalentni razgradni produkt 6MP označen je brojem 7, također prisutan u oksidativnom stresu. Razlike u razgradnjama između uzoraka su iznosile do 3,3 % za obje djelatne tvari, a produkti interakcije nisu uočeni.

FA se pokazala manje stabilnom pri izlaganju svjetlosnom stresu. U slučaju krutina, navedeni stres proveden je 7 dana te je postignuta razgradnja FA do 6,9 %. Kod izlaganja otopina i suspenzija svjetlosnom stresu, pad koncentracije FA od 5,1 % uočen je već nakon 15 min, dok su smjese pokazale manju razgradnju, moguće zbog prisutnosti velike količine otopljenog 6MP i/ili neotopljenih čestica pomoćnih tvari. U oba slučaja 6MP pokazao je zanemariv pad koncentracije (do 0,5 %). Glavni razgradni produkt FA bila je pABGA. Odstupanja u razgradnim profilima nisu znatna (nema produkata interakcije, razlike do 4,8 % za krutine i 3,7 % za otopine/suspenzije).

4.2.4. Studije izotermalnog stresa uzoraka 6-merkaptopurina i folne kiseline

Studije IST su primijenjene kao blaža inačica termalnog stresa u usporedbi s DSC-om za vjerniji prikaz mogućih interakcija između sastavnica. Smjesa djelatnih tvari te smjesa ljekovitih oblika (obje smjese u omjeru 6MP:FA 20:1) izlagane su temperaturi od 50 °C kroz 4 tjedna. Osim toga, stresirane su i čiste djelatne tvari kako bi se utvrdilo dolazi li do raspada neke od sastavnica zbog samog termalnog stresa, a ne posljedice nekompatibilnosti. Nakon isteka navedenog vremenskog razdoblja, pri vizualnoj inspekciji nisu zamijećene značajne razlike u izgledu uzoraka. Nadalje su stresirani uzorci pripremljeni prema protokolu te analizirani HPLC metodom usporedo s kontrolnim uzorcima koji su čuvani na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi; dobiveni analitički prinosi prikazani su u Tablici 16. Razlike između prinosa stresiranih i kontrolnih uzoraka u svim slučajevima su manje od 1,0 %, što je unutar

greške same metode te isključuje interakciju 6MP i FA. Osim toga, stabilnost analita u uzorcima smjese ljekovitih oblika ukazuje na kompatibilnost pomoćnih tvari u smjesi s obje djelatne tvari.

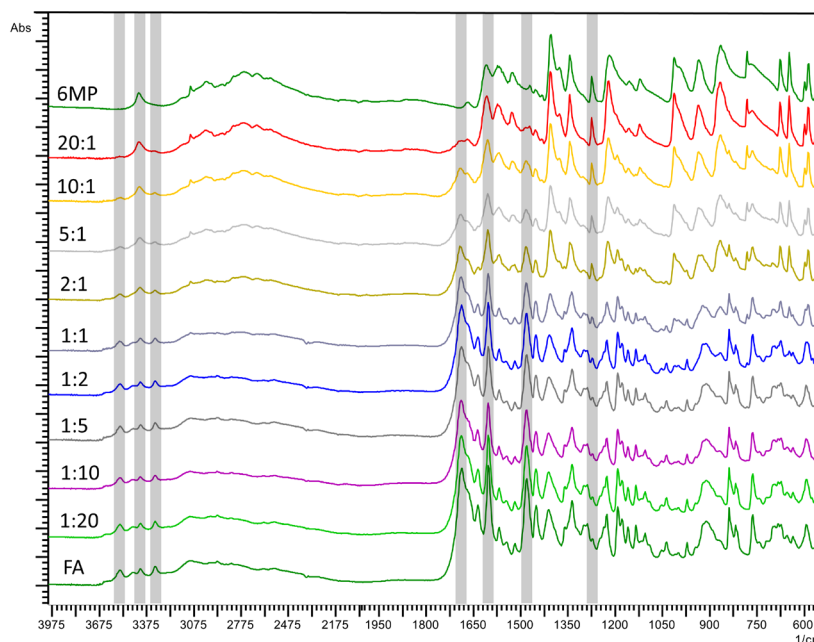
Tablica 16. Rezultati IST studije na uzorcima 6MP i FA

uzorak	promjena u izgledu stresiranog uzorka (u odnosu na kontrolni uzorak)	analitički prinos (srednja vrijednost $\pm$ RSD, $n = 3$)	
		stresirani uzorci	kontrolni uzorci
6MP djelatna tvar		100,5 $\pm$ 0,4	99,6 $\pm$ 1,1
FA djelatna tvar		100,0 $\pm$ 0,6	100,2 $\pm$ 1,4
smjesa djelatnih tvari	6MP	99,7 $\pm$ 0,6	99,3 $\pm$ 0,6
	FA	98,5 $\pm$ 0,4	99,4 $\pm$ 0,4
smjesa ljekovitih oblika	6MP	100,8 $\pm$ 0,3	99,8 $\pm$ 0,5
	FA	101,0 $\pm$ 0,2	100,4 $\pm$ 0,6

4.2.5. Analiza uzoraka 6-merkaptopurina i folne kiseline infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom

Osim kvantitativne analize uzoraka termalno stresiranih u IST studiji, primijenjena je i FTIR tehnika za kvalitativnu analizu djelatnih tvari i njihovih smjesa kako bi se utvrdilo dolazi li do mogućih strukturnih promjena. Čiste djelatne tvari, kao i smjese 6MP:FA u omjerima 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 i 1:20 stresirane su na 40 °C tijekom 4 tjedna te analizirane ATR-FTIR metodom usporedo s kontrolnim uzorcima čuvanima na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Prvotno su dobiveni spektri stresiranih uzoraka uspoređeni s odgovarajućim spektrima kontrolnih uzoraka da se utvrdi je li termalni stres doveo do promjena. Budući da su koeficijenti korelacije pravaca ovisnosti apsorbancija spektra stresiranog uzorka o apsorbancijama spektra kontrolnog uzorka bili viši od 0,9992, zaključeno je kako nema bitnih promjena. Nadalje, spektri stresiranih uzoraka (Slika 12) su uspoređeni te su praćene karakteristične vrpce za pojedine funkcionalne skupine i dijelove molekula; u slučaju interakcije, javio bi se gubitak pojedinih ili pojava novih vrpce. Na spektru FA mogu se naći karakteristične vrpce na 1690 cm^{-1} (rastezanje karbonilne skupine), 1603 cm^{-1} (savijanje N-H veze unutar amida) i 1481 cm^{-1} (deformacijske vibracije aromatskog prstena)

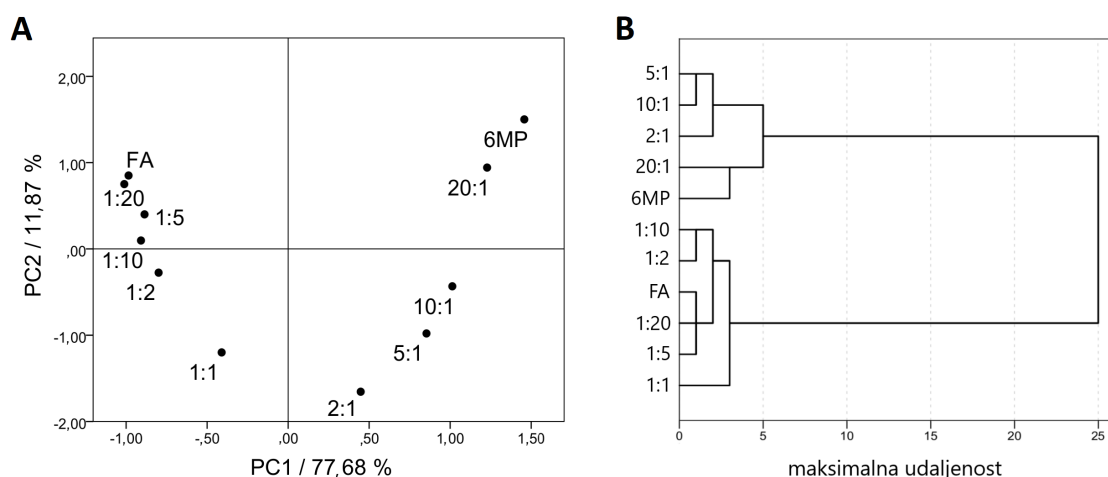
(169). Osim toga, vrpce na 3545, 3141 i 3320 cm^{-1} odgovaraju deformacijama N-H i O-H veza. Na spektru 6MP prisutne su vrpce na 1275 cm^{-1} (rastezanje C=S veze) i 3425 cm^{-1} (savijanje N-H veze).



Slika 12. FTIR spektri djelatnih tvari 6MP i FA te njihovih smjesa. Omjeri predstavljaju masene udjele 6MP:FA u smjesi. Istaknuti dijelovi spektara odnose se na karakteristične vrpce opisane u tekstu

U svim smjesama vrpce odgovarajuće tvari se proporcionalno smanjuju padom udjela iste sastavnice, što naviješta odsustvo interakcije. No, kako su FTIR spektri vrlo kompleksni te vizualna inspekcija može dovesti do krivih zaključaka, primijenjena je multivarijatna analiza kako bi dobiveni rezultati bili potvrđeni. Pristupi poput PCA i CA već su korišteni u ispitivanjima kompatibilnosti djelatnih i pomoćnih tvari putem TGA, DSC i FTIR analiza s velikom pouzdanošću (96, 97, 134), stoga su korišteni i u ovom radu. Korišteno je područje od 550 do 1800 cm^{-1} jer ono sadrži najveću količinu informacija bitnih za procjenu kompatibilnosti. Nakon analize podataka, utvrđeno je kako prve dvije glavne komponente (engl. *principal component*, PC) objašnjavaju 89,55 % varijabilnosti, stoga su dobivene vrijednosti prezentirane u obliku raspršenog grafikona koristeći prve dvije komponente (Slika 13A). Vidljivo je kako su čiste djelatne tvari na suprotnim krajevima PC1 osi, dok se smjese nalaze između njih i to redom povećavanja udjela jedne djelatne tvari, a smanjivanja udjela druge. Na PC2 osi vidimo pozitivnije vrijednosti za čiste tvari, dok su pri negativnijim vrijednostima izražene smjese. Vidljivo je i grupiranje smjesa sličnog sastava jednih s

drugima, kao 10:1 i 5:1 smjese ili 1:20 smjese i FA. Sve navedeno ide u prilog tvrdnji kompatibilnosti: u slučaju interakcije, vrlo vjerojatno ne bi bilo trendova duž PC1 i PC2 osi, bilo bi uočljivo grupiranje smjesa vrlo različitog sastava ili bi se čiste tvari pozicionirale usred smjesa, a ne na suprotnim krajevima neke od osi (96). Nadalje, provedena je i CA, a dobiveni dendrogram prikazan je na Slici 13B. Na dendrogramu vidljive su dvije glavne grupe, tj. klasteri: ona 6MP i smjesa gdje on prevladava te ona FA i njenih predominantnih smjesa. Grupacije unutar ta dva klastera također pokazuju povezanost s udjelima djelatnih tvari, tako da su, primjerice, FA, 20:1 i 5:1 smjese pokazale najveću sličnost itd. Ponovno, u slučaju interakcije grupiranja bi bila nasumičnija. Prema svim pristupima nakon FTIR analize može se utvrditi kako pri miješanju i termalnom stresiranju 6MP i FA nije došlo do interakcije, gubitka funkcionalnosti skupina ili znatnih promjena u strukturi.

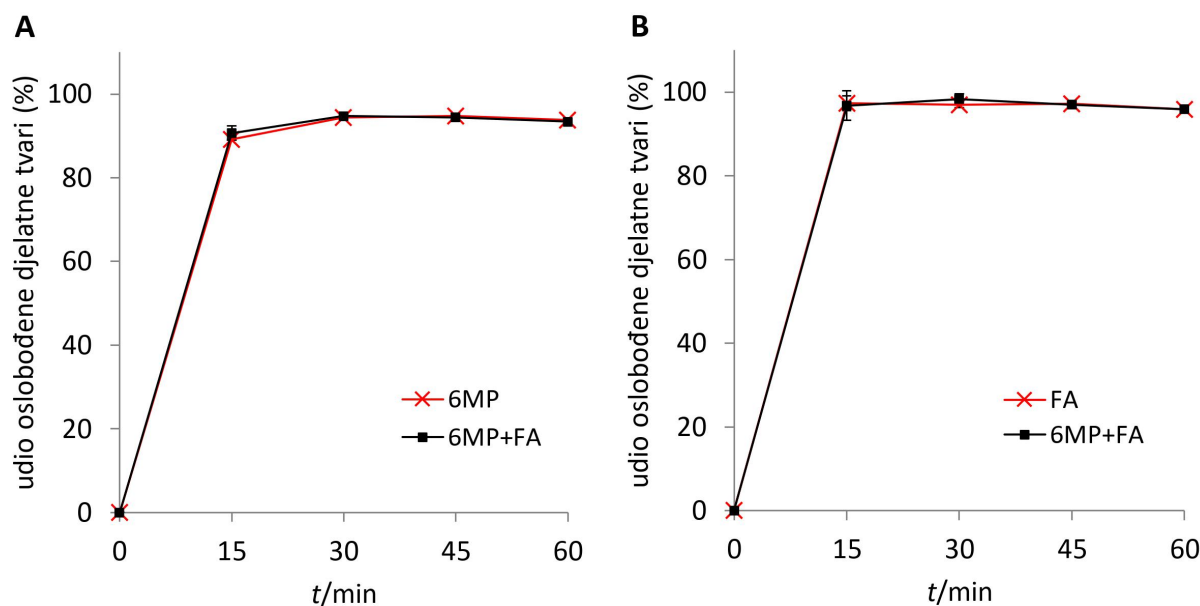


Slika 13. A) PCA dijagram 6MP, FA i njihovih smjesa, B) dendrogram 6MP, FA i njihovih smjesa. Omjeri predstavljaju masene udjele 6MP:FA u smjesi

4.2.6. Procjena interakcije 6-merkaptopurina i folne kiseline u biološki relevantnom mediju

Naposljetku, ispitana je interakcija 6MP i FA u FASSIF-u. Ispitivanje stabilnosti i oslobađanja u kiselom mediju izostavljeno je iz već navedenih razloga u slučaju AZA i FA. Ispitivanja oslobađanja provedena su na individualnim ljekovitim oblicima te u kombinaciji u triplicatu. Profili oslobađanja prikazani su na Slici 14 te je vidljivo da nema znatnih razlika u količinama oslobođene tvari; navedeno pokazuje kako prisutnost jedne djelatne tvari u mediju ne ometa oslobađanje druge. Budući da se većina djelatne tvari oslobađa unutar prvih 15 min, i 6MP i FA su potpuno izloženi mediju te mogućnosti interakcije kroz cijeli vremenski period ispitivanja. No, kao što se vidi u zadnjoj vremenskoj točki ispitivanja (60 min), nađene

količine djelatnih tvari u slučaju ispitivanja oslobađanja u kombinaciji u usporedbi s individualnim oblikom se ne razlikuju, upućujući na stabilnost djelatnih tvari u međusobnom prisustvu u FaSSIF-u, a time, vrlo vjerojatno, i u samom GIT-u.



Slika 14. Profili oslobađanja djelatnih tvari iz ljekovitih oblika: A) 6MP individualno i u kombinaciji te B) FA individualno i u kombinaciji. Trake pogreške predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

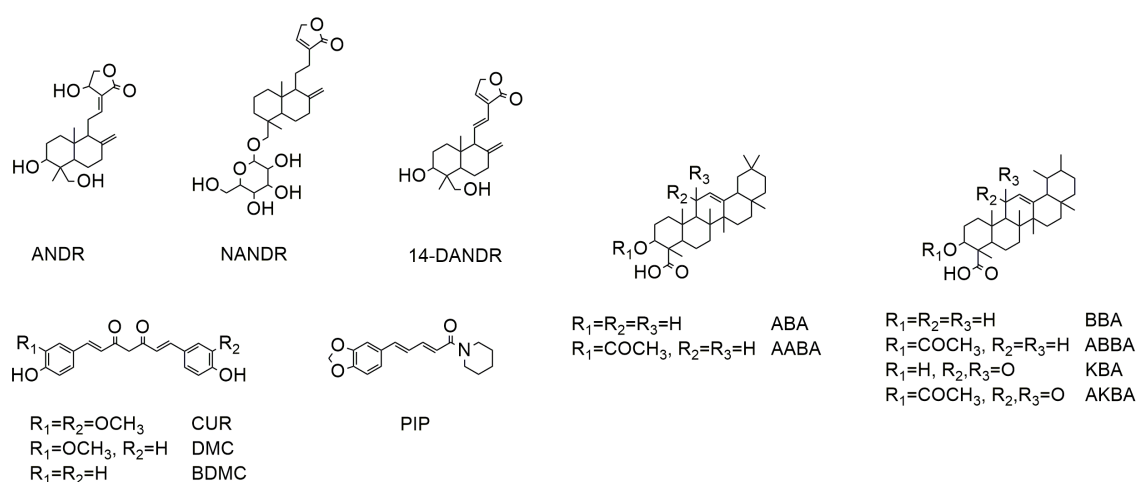
4.2.7. Pregled rezultata ispitivanja kompatibilnosti 6-merkaptopurina i folne kiseline

U ispitivanjima DSC tehnikom nije došlo do pojave novih pikova ili nestanka već prisutnih. Pikovi 6MP pokazali su mali temperaturni pomak u smjesama, no pik FA pomaknuo se za skoro 8 °C, što bi moglo uputiti na određene interakcije. U studijama prisilne razgradnje nije bilo znatnih razlika između razgradnih profila djelatnih tvari i njihove smjese, kao ni smjese ljekovitih oblika u svim ispitivanjima osim pri stresu lužinom. Razgradnja 6MP u navedenoj smjesi je bila drastično veća (90,0 %) u usporedbi s ostalim uzorcima pri istim uvjetima stresa (do 7,2 %). Zaključeno je kako razgradni produkti pomoćnih tvari ulaze u interakciju s 6MP i time smanjuju njegovu stabilnost, zbog čega je odabir pomoćnih tvari od iznimne važnosti u izradi konačne formulacije za FDC. Studije IST pokazale su termalnu stabilnost djelatnih tvari, kao i usporedive analitičke prinose stresiranih uzoraka s onima kontrolnima. FTIR ispitivanjima utvrđeno je prisustvo vrpce koje opisuju bitne funkcionalne skupine i dijelove molekula u svim smjesama; također nisu uočene nove vrpce. PCA-om i

CA-om FTIR spektara dodatno je pojačana tvrdnja o kompatibilnosti. Studije oslobađanja u biorelevantnom mediju demonstrirale su neometano oslobađanje jedne djelatne tvari u prisustvu druge, kao i njihovu međusobnu stabilnost. Sve navedeno upućuje kako su 6MP i FA fizikalno-kemijski kompatibilni te je moguće pripremiti jedinstvenu formulaciju djelatnih i pomoćnih tvari za izradu FDC-a.

4.3. Određivanje kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i piperina u biljnim drogama i njihovim pripravcima

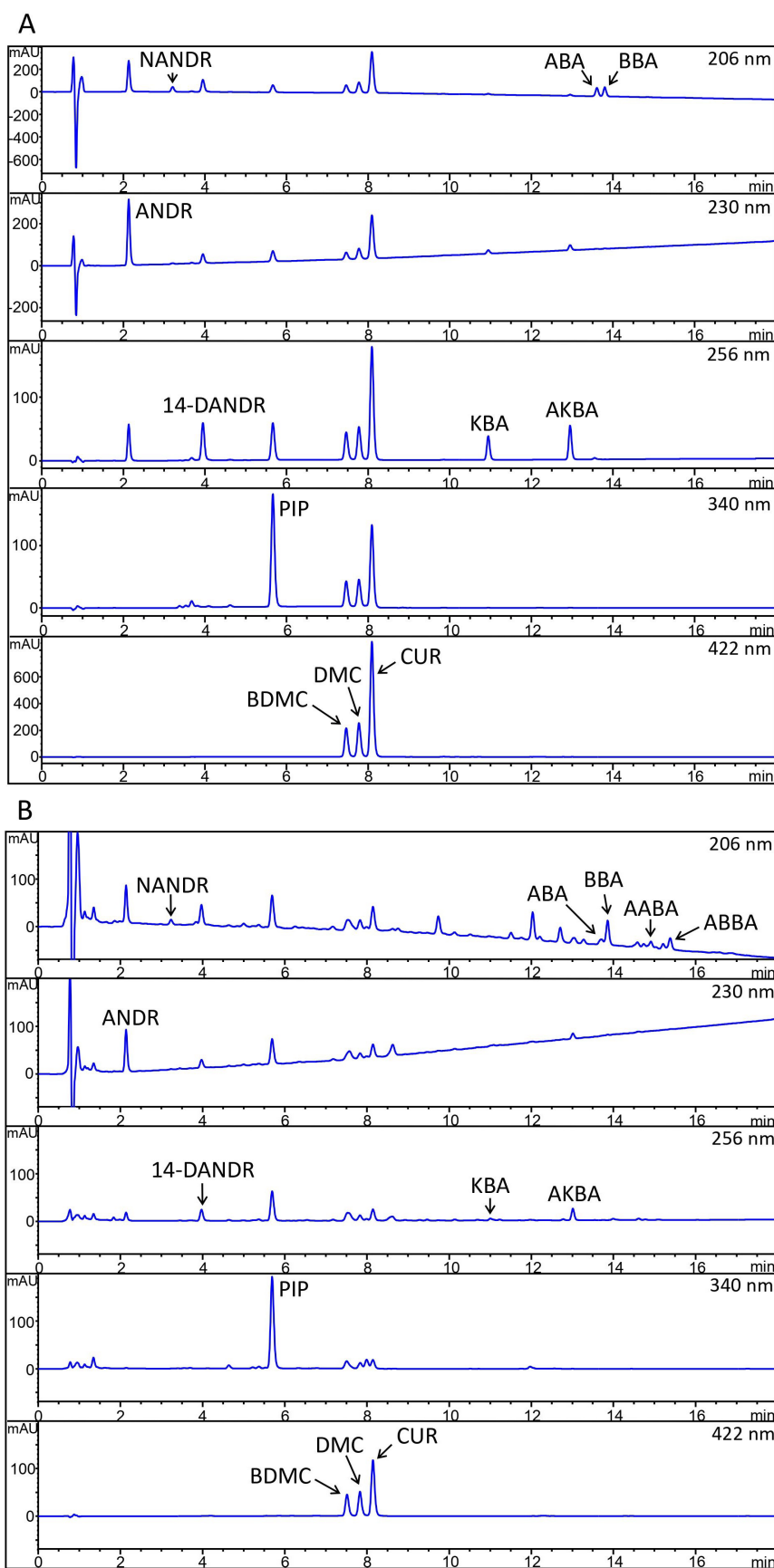
Iduća etapa istraživanja bila je usmjerena na ispitivanje kakvoće biljnih droga i njihovih pripravaka na bazi kurkume, justicije i indijskog tamjanovca u pogledu sadržaja kurkuminoida, andrografolida i bosveličnih kiselina (Slika 15) kao sastavnica za koje se pretpostavlja da su primarno odgovorne za njihov terapijski učinak. Kao što je već rečeno, navedene droge i pripravci vrlo često su korišteni kao komplementarna terapija u IBD-u istovremeno sa standardnom farmakoterapijom. PIP je dodatno praćen zbog njegovog utjecaja na bioraspoloživost kurkuminoida te aktivnost P-glikoproteina i superporodice CYP enzima (130, 131). Određivanjem aktivnih tvari u uzorcima, usporedbom s deklariranim sadržajem i procjenom dnevnog unosa se, stoga, želi procijeniti učinkovitost i sigurnost uzoraka. Poseban fokus je usmjeren na lokaciju i način dobavljanja uzoraka: jedna od pretpostavki je da su proizvodi nabavljeni putem internetske prodaje lošije kakvoće, a time i manje učinkoviti i sigurni za korisnika, što će također biti ispitano u ovom istraživanju.



Slika 15. Kemijske strukture aktivnih sastavnica određivanih u biljnim drogama i pripravcima

4.3.1. Razvoj kromatografske metode za istovremeno određivanje kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i piperina

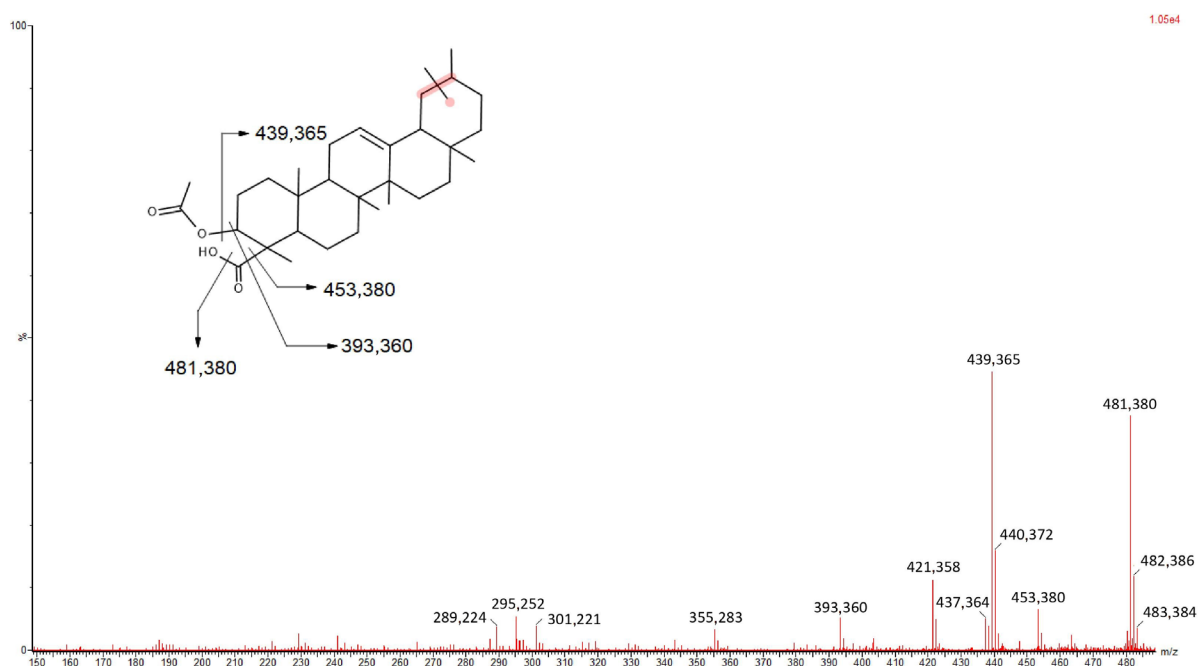
HPLC tehnika spregnuta s detektorom niza dioda odabrana je za razvoj metode za istovremeno određivanje aktivnih sastavnica četiriju biljnih vrsta. Prvotno su proučene log *D* vrijednosti analita koje su bile znatno više pri nižim pH vrijednostima, zbog čega je odabrana kiselna mobilna faza (mravlja kiselina kao modifikator) kako bi se ostvarila bolja separacija hidrofilnih sastavnica matrice od samih analita. Od stacionarnih faza ispitani su različiti kemizmi (C4, C8, C18, fenil i cijano). Na svim kolonama upotreba metanola kao organskog modifikatora uzrokovala je koeluciju sva tri kurkuminoida. Acetonitriлом je postignuto dobro razlučivanje između kurkuminoida, no CUR i PIP su koeluirali u svim ispitanim uvjetima na nepolarnijim kolonama (C4, C8, C18 i fenil). Osim toga, za bosvelične kiseline kao najlipofilnije analite bilo je potrebno koristiti čisti acetonitril kao mobilnu fazu kako bi eluirale s kolone, što predstavlja vremenski i financijski trošak i smanjuje ekološku isplativost metode. Korištenjem polarnije cijano kolone (HSS Cyano, 3,0 × 150 mm, veličina čestica 3,5 μm) postignuto je dobro razlučivanje svih analita (iznad 1,53), kao i brža elucija bosveličnih kiselina. Analiti su praćeni na više valnih duljina kako bi se postigla što bolja osjetljivost metode. Nakon optimizacije ostalih parametara (temperatura kolone, gradijent, protok mobilne faze, volumen injektiranja) dobivena je metoda u trajanju od 25 min, uključujući i korak kondicioniranja. Kromatogrami smjese standardnih otopina i smjese biljnih droga prikazani su na Slici 16. Kao što se vidi sa Slike 16B, postignuto je dobro razlučivanje između sastavnica čak i u kompleksnom uzorku poput mješavine biljnih droga, uz nešto lošiju separaciju ABA i BBA, AABA i komponenti matrice te ABBA i komponenti matrice (razlučivanja redom 0,90, 1,35 i 1,23), no nije očekivano da će navedena prepreka znatno utjecati na rezultate ispitivanja.



Slika 16. Kromatogrami A) smjese standardnih otopina i B) smjese biljnih droga

4.3.2. Identifikacija acetiliranih bosveličnih kiselina u realnom uzorku

U nemogućnosti nabavke standarada AABA i ABBA, korišteni su drugi pristupi identifikacije i određivanja navedenih analita u realnim uzorcima. Kao prvi korak korištena je detekcija MS-om pri analizi uzorka smole indijskog tamjanovca kao oruđe za identifikaciju. Utvrđeno je da pikovi na približno 14,8 i 15,3 min kao dominantnu m/z vrijednost pokazuju 499,385, što vrlo vjerojatno odgovara pseudomolekularnom ionu analita. Monoizotopne mase AABA i ABBA nakon adicije protona (499,379) odlično odgovaraju navedenoj vrijednosti. Nadalje, provedena su MS/MS ispitivanja s m/z prekursorom 499,4. Već spomenuti pikovi pokazali su jednak fragmentacijski obrazac (Slika 17) s fragmentnim ionima na 481,380 (gubitak hidroksila karboksilne skupine), 453,380 (gubitak karboksilne skupine), 439,365 (odcjepljenje acetoksi- skupine) te 393,360 (gubitak acetoksi- i karboksilnih skupina), što je vrlo dobra potvrda identiteta. Navedenoj činjenici ide u prilog i duže kromatografsko zadržavanje navedenih analita u odnosu na neacetilirane oblike, relativna prisutnost u uzorcima i njihovi UV/Vis spektri, što su utvrdile i druge istraživačke skupine (170, 171).



Slika 17. Reprezentativni MS/MS spektar pika na 15,3 min. Odabrana m/z vrijednost prekursora iznosi 499,4. Umetak: predloženi fragmentacijski put acetiliranih bosveličnih kiselina

Što se tiče određivanja AABA i ABBA, u literaturi su pronađeni slični nagibi kalibracijskih pravaca za acetilirane i neacetilirane oblike na valnim duljinama detekcije u rasponu od 200 do 210 nm (170, 171), tako da su za određivanje AABA, odnosno ABBA korištene kalibracijske krivulje ABA, odnosno BBA.

4.3.3. Optimizacija ekstrakcije aktivnih tvari korištenjem metode odzivnih površina

S obzirom na to da se aktivne sastavnice ispitivanih biljnih vrsta strukturno prilično razlikuju, za očekivati je kako će imati i različita fizikalno-kemijska svojstva, a time i različite optimalne uvjete ekstrakcije. Kako bi se izbjegla dugotrajna optimizacija probirom pojedinačnih parametara, upotrijebljena je metodologija odzivnih površina, točnije Box-Behnkenov dizajn te su pronađeni uvjeti optimalni za istovremenu ekstrakciju svih sastavnica. Budući da se otežanija ekstrakcija očekuje u uzorcima droga u usporedbi s uzorcima ekstrakata, kao modelni uzorak korištena je smjesa usitnjenih biljnih droga. Da bi se odredio prostor dizajna u pogledu ekstrakcijskog sredstva, provedena su preliminarne ispitivanja korištenjem različitih hidroorganskih otapala (20, 60 i 100%-tni metanol, acetonitril ili etanol). Ekstrakcijska otapala s metanolom su pokazala najmanje prinose za sve analite. Za ona s acetonitrilom utvrđeni su visoki prinosi za sve analite osim za bosvelične kiseline, dok su etanolna otapala pokazala najbolju ekstrakcijsku moć svih navedenih sastavnica, stoga su ona korištena za daljnju optimizaciju. U nastavku je pristupljeno Box-Behnkenovu dizajnu te su kao nezavisne varijable (faktori) korišteni volumni udio etanola u vodoetanolnom ekstrakcijskom sredstvu (40–100 %, V/V), temperatura ekstrakcije (30–80 °C) i vrijeme sonikacije (10–30 min). Zavisne varijable (odazive) predstavljali su ekstrakcijski prinosi pojedinih skupina aktivnih sastavnica iz smjese biljnih droga (u mg analita/g smjese usitnjenih biljnih droga). Tablica 17 prikazuje eksperimentalni dizajn, faktore i odazive.

Tablica 17. Box-Behnkenov dizajn s faktorima i dobivenim odazivima

standard	A (% etanola, V/V)	B (temperatura ekstrakcije, °C)	C (vrijeme sonikacije, min)	kurkuminoidi (mg/g) ^a	andrografolidi (mg/g) ^a	bosvelične kiselina (mg/g) ^a	piperin (mg/g) ^a
16	70	55	20	3,05	12,43	71,41	1,32
2	100	30	20	2,32	8,61	71,13	1,28
7	40	55	30	2,53	12,58	23,39	1,25
9	70	30	10	2,41	10,22	47,37	1,22
8	100	55	30	2,85	11,33	75,96	1,39
11	70	30	30	3,03	12,09	73,01	1,47
12	70	80	30	3,21	12,45	74,46	1,47
10	70	80	10	3,02	11,79	72,02	1,54
6	100	55	10	2,55	9,88	81,35	1,39
4	100	80	20	2,81	11,90	71,39	1,29
1	40	30	20	2,00	12,12	13,70	1,13
14	70	55	20	2,91	12,65	69,56	1,64
15	70	55	20	3,11	12,58	73,29	1,28
17	70	55	20	2,80	11,71	62,94	1,49
3	40	80	20	2,27	11,78	18,58	1,18
13	70	55	20	3,11	12,60	69,45	1,37
5	40	55	10	1,85	12,45	6,57	1,08

^aizraženo kao mg analita/g smjese biljnih droga

Nakon analize podataka, utvrđeno je kako reducirani kvadratni modeli najbolje opisuju ekstrakcijske prinose. Dobivene jednadžbe modela (5–8) prikazane su u nastavku:

$$\text{prinos kurkuminoida (mg/g)} = -2,789 + 0,101 A^{**} + 0,032 B^{**} + 0,068 C^{**} - 3,109 \times 10^{-3} AC^{*} - 4,349 \times 10^{-4} BC - 6,182 \times 10^{-4} A^{2**} - 1,385 \times 10^{-4} B^2 \quad (5)$$

$$\text{prinos andrografolida (mg/g)} = 11,527 - 0,011 A^{**} + 0,048 B^{**} - 0,026 C^{**} + 1,210 \times 10^{-3} AB^{**} + 1,097 \times 10^{-3} AC - 7,673 \times 10^{-4} A^{2**} - 9,829 \times 10^{-4} B^{2**} \quad (6)$$

$$\text{prinos bosveličnih kiselina (mg/g)} = -195,758 + 4,924 A^{**} + 0,620 B^{**} + 3,066 C^{**} - 0,019 AC^{**} - 0,023 BC^{**} - 0,025 A^{2**} \quad (7)$$

$$\text{prinos piperina (mg/g)} = -0,276 + 0,030 A^{**} + 0,008 B + 0,022 C - 3,194 \times 10^{-4} BC - 1,934 \times 10^{-4} A^{2**} \quad (8)$$

Članovi označeni jednom zvjezdicom (*) značajni su na razini od 5 %, dok su oni s dvije zvjezdice (**) značajni na razini od 1 %.

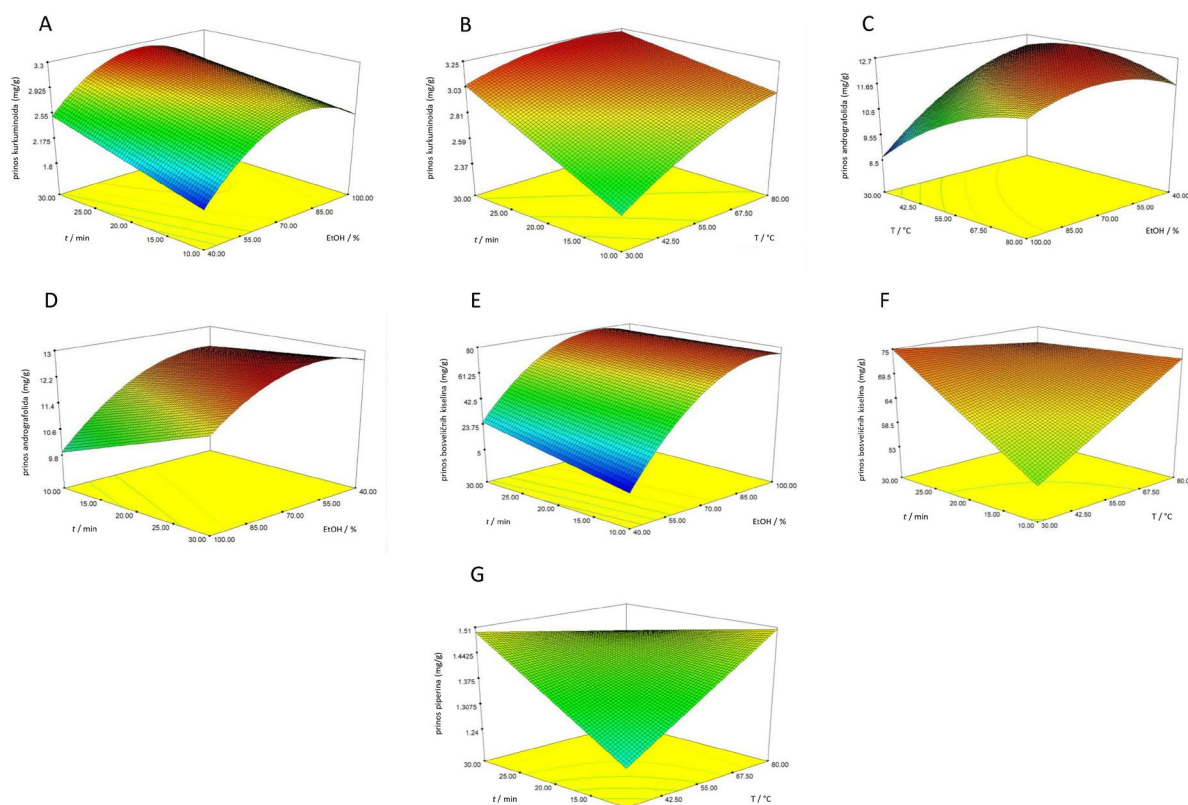
Provedena je analiza varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) i provjera validnosti modela. Utvrđeno je kako su svi modeli validni s obzirom na rezultate ANOVA-e (Prilog, Tablice P2–P5). Osim toga, reziduali prate normalnu raspodjelu, što se očituje njihovim linearnim trendom na normaliziranom grafu vjerojatnosti (Prilog, Slike P2–P5). Najbitnije karakteristike dobivenih modela prikazane su u Tablici 18. Svi modeli bili su značajni pri razini od 5 % ($p \leq 0,012$) s neznačajnim odstupanjima od modela ($p \geq 0,293$). Dobivene su i visoke vrijednosti koeficijenata determinacije (R^2) za kurkuminoide, andrografolide i bosvelične kiseline ($R^2 \geq 0,934$), dok je model ekstrakcije PIP pokazao nešto lošije, ali ipak adekvatno poklapanje ($R^2 = 0,698$). Prilagođeni i predviđeni R^2 u dobrom su slaganju, a adekvatna preciznost je iznad 6 u svim slučajevima, što upućuje da se modeli mogu koristiti za navigaciju prostorom dizajna.

Tablica 18. Karakteristike reduciranih kvadratnih modela

sastavnica	značajnost modela (<i>p</i> -vrijednost)	značajnost odstupanja od modela (<i>p</i> -vrijednost)	PRESS ^a	<i>R</i> ²	prilagođeni <i>R</i> ²	predviđeni <i>R</i> ²	adekvatna preciznost	predviđeni prinos (mg/g) ^b	nađeni prinos (mg/g) ^b	odstupanje (%) ^c
kurkuminoidi	<0,001	0,941	0,20	0,965	0,938	0,926	19,09	3,21	3,21	−0,03
andrografolidi	<0,001	0,530	4,46	0,934	0,883	0,782	15,97	12,69	12,48	−1,60
bosvelične kiseline	<0,001	0,293	915,66	0,978	0,964	0,909	24,13	78,63	75,90	−3,47
piperin	0,012	0,977	0,18	0,698	0,561	0,482	6,69	1,47	1,41	−3,98

^apredviđena ostatna suma kvadrata (engl. *predicted residual sum of squares*), ^bizraženo kao mg analita/g smjese biljnih droga, ^cizraženo kao (nađeni prinos−predviđeni prinos)/predviđeni prinos

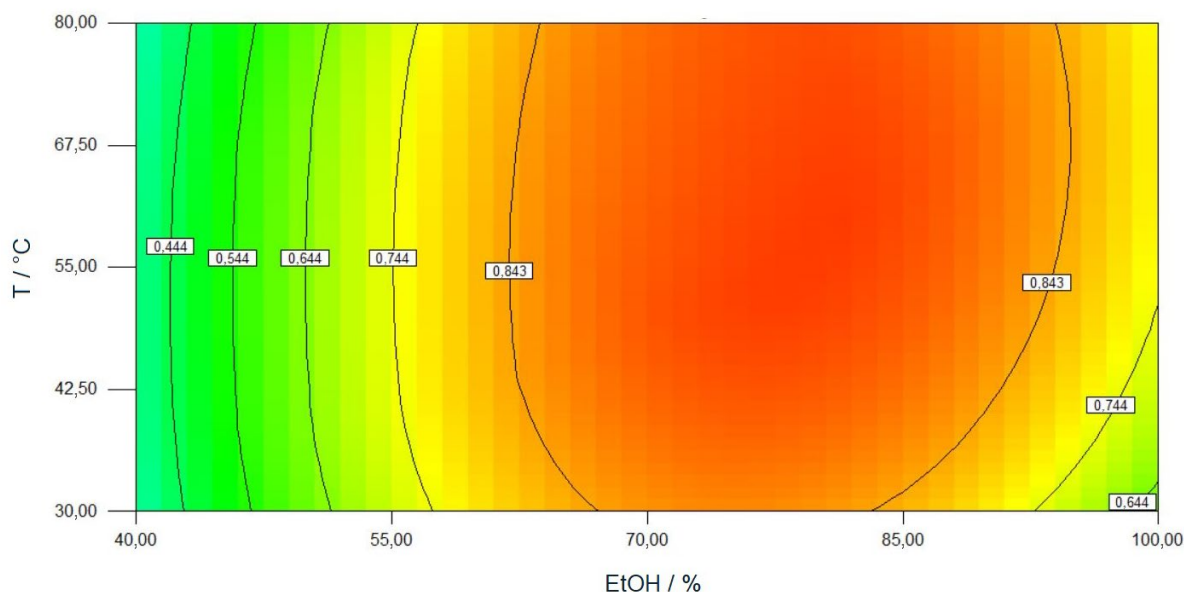
Iz 3D dijagrama odzivnih površina (Slika 18) i dobivenih jednadžbi modela jasno je da je udio etanola u ekstrakcijskom otapalu najutjecajniji faktor, pogotovo u slučaju bosveličnih kiselina. Vidi se da i vrijeme i temperatura ekstrakcije pozitivno utječu na prinose. Može se, dakle, pretpostaviti da su analiti stabilni pri uvjetima produljene sonikacije i visoke temperature.



Slika 18. 3D dijagram odzivnih površina prinosa: A, B) kurkuminoida, C, D) andrografolida, E, F) bosveličnih kiselina, G) piperina

Nadalje, modeli su korišteni kako bi se pronašli optimalni uvjeti za istovremenu ekstrakciju svih skupina analita. Modelom su dobiveni maksimalni teorijski prinosi za svaku skupinu analita pojedinačno te su uspoređeni s maksimalnim teorijskim prinosima dobivenima za sve skupine istovremeno. Prinosi su se razlikovali za manje od 4,02 %, stoga je zaključeno kako nema velikih gubitaka pri istovremenoj ekstrakciji svih skupina. Izrađen je i graf ukupne poželjnosti (engl. *desirability*) ekstrakcijskih uvjeta: budući da su analiti stabilni tijekom produljene ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije je maksimizirano (30 min), a utjecaj ostala dva faktora na poželjnost prikazan je na Slici 19. Vidi se da su uvjeti između 75 i 85 % etanola u otapalu te između 50 i 70 °C najpoželjniji za istovremenu ekstrakciju svih analita; računskom

optimizacijom odabrani su uvjeti od 81,5%-tnog (V/V) etanola u vodi, 60 °C i 30 min s ukupnom poželjnošću od 0,927.



Slika 19. Poželjnost uvjeta u ovisnosti o udjelu etanola u otapalu i temperaturi ekstrakcije

Konačno, model je validiran ekstrakcijom modelnog uzorka na predviđenim uvjetima optimalnih prinosa. Odstupanja između eksperimentalno dobivenih i modelom predviđenih prinosa bila su manja od 3,98 % (Tablica 18), čime dobiveni model pokazuje odličnu prediktivnu sposobnost.

4.3.4. Validacija metode

Validacija je provedena prema ICH smjernicama. Kako su navedeni uzorci vrlo kompleksni, selektivnost je ispitana na više načina. U slučaju formuliranih uzoraka očekuje se prisutnost pomoćnih tvari, stoga je smjesa pomoćnih tvari podvrgnuta ekstrakcijskom postupku i analizirana. Nisu utvrđeni pikovi koji bi mogli ometati određivanje analita. Zatim, provjera čistoće pika u rasponu od 200 do 500 nm provedena je na kromatogramu smjese standardnih otopina, smjese biljnih droga i smjese suhih ekstrakata. U svim uzorcima čistoća svih pikova osim BDMC i DMC bila je iznad 997,23. U realnim uzorcima utvrđeno je da BDMC i DMC koeluiraju s određenim sastavnicama matrice, no te sastavnice pokazale su vrlo malu apsorbanciju na 422 nm gdje su praćeni kurkuminoidi, stoga koelucija ne utječe na njihovo određivanje. Naposljetku, utjecaj na određivanje ispitan je usporedbom nagiba kalibracijskih pravaca dobivenih metodom vanjske kalibracije i metodom standardnog dodatka u ekstrakt smjese biljnih droga; pravci su izrađeni u približno istom koncentracijskom

području. U Tablici 19 vidljivo je da nema značajnih razlika između nagiba pravaca pri razini od 5 % ($p \geq 0,073$), što signalizira kako čak i tako kompleksna matrica ne utječe na određivanje analita.

Tablica 19. Rezultati ispitivanja selektivnosti usporedbom nagiba kalibracijskih pravaca

analit	nagib pravca (vanjska kalibracija) $n = 5$	nagib pravca (standardni dodatak) $n = 5$	standardna pogreška nagiba (vanjska kalibracija)	standardna pogreška nagiba (standardni dodatak)	koeficijent korelacije (vanjska kalibracija)	koeficijent korelacije (standardni dodatak)	t^a	p -vrijednost
ANDR	9,80	9,53	0,09	0,13	0,9999	0,9997	1,690	0,141
NANDR	7,42	7,17	0,07	0,09	0,9999	0,9997	2,166	0,073
14-DANDR	7,39	7,27	0,10	0,13	0,9997	0,9995	0,695	0,513
PIP	31,59	31,92	0,44	0,71	0,9997	0,9993	0,391	0,709
BDMC	28,10	27,46	0,52	0,65	0,9999	0,9996	1,242	0,260
DMC	39,05	37,70	0,34	0,53	0,9999	0,9997	2,154	0,075
CUR	37,69	36,63	0,31	0,49	0,9999	0,9937	1,835	0,116
KBA	6,46	6,06	0,06	0,39	0,9999	0,9997	1,003	0,355
AKBA	6,51	6,31	0,06	0,09	0,9999	0,9997	1,804	0,121
ABA	2,71	2,57	0,02	0,16	0,9999	0,9944	0,874	0,416
BBA	2,70	2,76	0,05	0,04	0,9995	0,9997	0,930	0,388

^akritična t -vrijednost iznosi 2,447 u svim slučajevima

Linearnost (Tablica 20) je ispitana na smjesama standardnih otopina u triplicatu na barem pet koncentracijskih razina. Za analite koji su očekivani u višim koncentracijama u uzorcima (ANDR, CUR, ABA i BBA) radno područje rasprostiralo se od LOQ-a do 200 $\mu\text{g/mL}$, dok je za ostale analite uključivalo raspon od LOQ-a od 50 $\mu\text{g/mL}$. Dobiveni su zadovoljavajući koeficijenti korelacije pravaca (iznad 0,9990), nasumičnog rasipa reziduala te neznačajnih odsječaka na y -osi ($p \geq 0,092$). Granice dokazivanja i određivanja (Tablica 20) bile su niske, pogotovo u slučaju kurkuminoida (do 0,03, odnosno 0,10 $\mu\text{g/mL}$).

Tablica 20. Linearnost, LOD i LOQ metode

analit	radno područje (µg/mL)	jednadžba pravca	<i>p</i> -vrijednost odsječka na <i>y</i> -osi	koeficijent korelacije	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
ANDR	0,2–200	$y = 10,361 x + 1,092$	0,841	0,9998	0,06	0,20
NANDR	1,0–50	$y = 7,113 x + 3,911$	0,102	0,9994	0,35	1,00
14-DANDR	0,2–50	$y = 8,054 x + 0,553$	0,769	0,9995	0,05	0,20
PIP	0,1–50	$y = 33,423 x - 1,525$	0,837	0,9993	0,04	0,10
BDMC	0,1–50	$y = 29,326 x + 2,895$	0,385	0,9998	0,04	0,10
DMC	0,1–50	$y = 39,785 x + 6,610$	0,219	0,9997	0,03	0,10
CUR	0,1–200	$y = 39,934 x + 1,620$	0,964	0,9990	0,03	0,10
KBA	0,2–50	$y = 6,357 x + 1,494$	0,150	0,9996	0,05	0,20
AKBA	0,2–50	$y = 6,567 x + 1,385$	0,092	0,9998	0,05	0,20
ABA	2,5–200	$y = 2,666 x - 0,701$	0,798	0,9992	0,80	2,50
BBA	2,5–200	$y = 2,623 x - 0,229$	0,901	0,9995	0,80	2,50

Preciznost je ispitana na realnim uzorcima, tj. ponovljenom analizom smjese biljnih droga i smjese suhih ekstrakata. Za ponovljivost, uzorci su ekstrahirani i analizirani u heksaplikatu u istom danu, dok je za srednju preciznost isti postupak proveden kroz tri dana (ukupno 18 uzoraka). RSD vrijednosti (Tablica 21) za preciznost nisu prelazile 4,2 %, dok je ANOVA demonstrirala neznačajnu razliku ekstrakcijskih prinosa kroz tri dana na razini od 5 % ($p \geq 0,064$). Točnost je ispitana na tri koncentracijske razine u triplicatu na smjesi standardnih otopina; analitički prinosi (Tablica 21) iznosili su od 91,4 do 103,4 %.

Tablica 21. Preciznost i točnost metode

analit	smjesa biljnih droga				smjesa suhih ekstrakata				analitički prinos (srednja vrijednost $\pm$ RSD, %, $n = 3$)		
	c ($\mu\text{g/mL}$)	ponovljivost (RSD, %, $n = 6$)	srednja preciznost ($n = 18$) ^a		c ($\mu\text{g/mL}$)	ponovljivost (RSD, %, $n = 6$)	srednja preciznost ($n = 18$) ^a		niska razina (5/20 $\mu\text{g/mL}$) ^b	srednja razina (25/100 $\mu\text{g/mL}$) ^b	visoka razina (50/200 $\mu\text{g/mL}$) ^b
			F (2,15)	p - vrijednost			F (2,15)	p - vrijednost			
ANDR	30	2,3	2,638	0,104	200	1,4	1,122	0,351	94,4 $\pm$ 2,7	98,4 $\pm$ 0,3	95,9 $\pm$ 1,0
NANDR	5	3,0	2,474	0,118	10	1,8	3,323	0,064	92,3 $\pm$ 4,5	101,4 $\pm$ 0,6	99,6 $\pm$ 1,2
14-DANDR	15	2,7	2,278	0,137	15	2,0	0,915	0,422	98,9 $\pm$ 2,5	103,4 $\pm$ 0,4	100,8 $\pm$ 1,0
PIP	30	1,3	0,846	0,448	50	2,9	0,131	0,878	97,0 $\pm$ 2,7	101,2 $\pm$ 0,4	98,5 $\pm$ 1,0
BDMC	10	2,5	0,039	0,961	2	4,2	0,498	0,618	91,4 $\pm$ 2,8	98,5 $\pm$ 0,4	96,5 $\pm$ 1,0
DMC	10	0,9	0,743	0,492	10	3,7	0,009	0,991	94,0 $\pm$ 2,8	100,7 $\pm$ 0,4	98,4 $\pm$ 1,0
CUR	20	1,4	1,873	0,188	50	3,7	0,046	0,955	94,1 $\pm$ 2,7	98,1 $\pm$ 0,4	95,4 $\pm$ 0,9
KBA	2	1,2	2,618	0,106	15	0,9	1,162	0,339	94,5 $\pm$ 2,6	101,5 $\pm$ 0,3	99,4 $\pm$ 1,0
AKBA	20	1,3	1,404	0,276	30	0,8	2,033	0,166	96,7 $\pm$ 2,7	102,5 $\pm$ 0,4	100,1 $\pm$ 0,9
ABA	30	1,2	1,101	0,358	50	0,9	1,484	0,158	93,3 $\pm$ 3,4	96,7 $\pm$ 0,8	94,2 $\pm$ 1,1
BBA	120	1,0	2,475	0,118	150	1,4	0,235	0,793	96,9 $\pm$ 3,7	102,3 $\pm$ 0,5	99,6 $\pm$ 1,1

^akritična F -vrijednost iznosi 3,682 u svim slučajevima, ^btočnost ANDR, CUR, ABA i BBA ispitana na višoj navedenoj koncentraciji

Stabilnost uzoraka ispitana je tijekom ekstrakcijskog postupka i u autoinjektoru. Iako su ekstrakcijski modeli već pokazali stabilnost analita pri povišenoj temperaturi i sonikaciji, ispitan je utjecaj cijelog postupka na smjesi standardnih otopina koja je pripremljena otapanjem blagim vorteksiranjem te analizirana. Nakon toga, smjesa je podvrgnuta ekstrakcijskom postupku te ponovno analizirana pri čemu nije uočen pad sadržaja, što potvrđuje stabilnost analita tijekom postupka. Stabilnost u autoinjektoru na 15 °C ispitana je kroz tri dana. Pad sadržaja unutar 24 sata iznosio je do 1,0, 1,8 i 4,8 % za standardne otopine, uzorke suhih ekstrakata i uzorke biljnih droga, nakon čega je on bio puno izraženiji. Analize se, stoga, mogu provoditi unutar jednog dana od pripreme uz čuvanje pripremljene otopine na 15 °C.

Robustnost je ispitana upotrebom Plackett-Burmanovog dizajna na reprezentativnom uzorku smjese biljnih droga. Proučavan je utjecaj vremena sonikacije, temperature ekstrakcije, udjela etanola u ekstrakcijskom sredstvu, protoka mobilne faze, temperature kolone, promjene valne duljine detekcije i promjene gradijenta na ekstrakcijski prinos te razlučivanje između analita i susjednih pikova; eksperimentalni dizajn, odnosno odazivi prikazani su u Tablici P6, odnosno P7 (Prilog). Modeli su analizirani te su izračunati doprinosi faktora modelu (Prilog, Tablica P8). Nakon toga, značajni faktori za pojedini odaziv izraženi su iz usporedbe neznačajnih i kritičnih efekata pri razinama značajnosti od 5 i 1 %, iz Pareto dijagrama (iznad Bonferronijeve granice, razina značajnosti 5 %) te iz grafa polunormalne vjerojatnosti (Prilog, Tablica P9). Utvrđeno je da faktori koji obuhvaćaju pripremu uzorka i ekstrakcijski postupak nisu značajno utjecali na većinu odaziva (prinos i razlučivanje za BDMC bila je iznimka), što znači kako je metoda robustna u pogledu ljudskog utjecaja. Parametri kromatografskog razdvajanja imali su veći učinak na odazive. U Tablici 22 prikazane su vrijednosti neznačajnih intervala za odabrane faktore, tj. rasponi unutar kojih neće doći do značajnih promjena odaziva. Na prinose najviše su utjecali protok mobilne faze i promjena valne duljine detekcije, dok su temperatura kolone i promjena gradijenta bili ključni za razlučivanje, kao što je i za očekivati. Većina navedenih intervala vrlo je uska, što upućuje na nužnost korištenja vrlo robustnog kromatografa kako bi se postigli što pouzdaniji rezultati.

Tablica 22. Intervali neznačajnosti značajnih faktora za odabrane odazive

odaziv	faktor	interval neznačajnosti
ANDR _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,981 – 1,019
ANDR _{prinos}	promjena valne duljine detekcije (nm) ^a	–1,5 – 1,5
NANDR _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,980 – 1,020
NANDR _{prinos}	promjena valne duljine detekcije (nm)	–0,8 – 0,8
14-DANDR _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,983 – 1,017
14-DANDR _{prinos}	promjena valne duljine detekcije (nm)	–1,1 – 1,1
PIP _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,974 – 1,026
BDMC _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,980 – 1,020
DMC _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,983 – 1,017
CUR _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,982 – 1,018
KBA _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,985 – 1,015
KBA _{prinos}	promjena valne duljine detekcije (nm)	–0,7 – 0,7
AKBA _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,992 – 1,008
AKBA _{prinos}	promjena valne duljine detekcije (nm)	–0,4 – 0,4
ABA _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,990 – 1,010
ABA _{prinos}	temperatura kolone (°C)	39,32 – 40,68
ABA _{prinos}	promjena valne duljine detekcije (nm)	–0,2 – 0,2
BBA _{prinos}	protok mobilne faze (mL/min)	0,992 – 1,008
BBA _{prinos}	promjena valne duljine detekcije (nm)	–0,1 – 0,1
ANDR _{Rs}	promjena gradijenta (%) ^a	–0,41 – 0,41
NANDR _{Rs}	temperatura kolone (°C)	39,07 – 40,93
14-DANDR _{Rs}	protok mobilne faze (mL/min)	0,980 – 1,020
14-DANDR _{Rs}	temperatura kolone (°C)	39,55 – 40,45
14-DANDR _{Rs}	promjena gradijenta (%)	–0,38 – 0,38
PIP _{Rs}	promjena gradijenta (%)	–0,11 – 0,11
DMC _{Rs}	temperatura kolone (°C)	39,82 – 40,18
DMC _{Rs}	promjena gradijenta (%)	–0,25 – 0,25
CUR _{Rs}	temperatura kolone (°C)	39,90 – 40,10
CUR _{Rs}	promjena gradijenta (%)	–0,30 – 0,30
KBA _{Rs}	protok mobilne faze (mL/min)	0,990 – 1,010
KBA _{Rs}	temperatura kolone (°C)	39,94 – 40,06
AKBA _{Rs}	protok mobilne faze (mL/min)	0,980 – 1,020
AKBA _{Rs}	temperatura kolone (°C)	39,91 – 40,09
ABA _{Rs}	protok mobilne faze (mL/min)	0,983 – 1,017
ABA _{Rs}	temperatura kolone (°C)	39,69 – 40,31
BBA _{Rs}	protok mobilne faze (mL/min)	0,986 – 1,014
BBA _{Rs}	temperatura kolone (°C)	39,88 – 40,12

^apromjena (nm ili % B u mobilnoj fazi) u odnosu na standardne uvjete metode

4.3.5. Sadržaj aktivnih sastavnica u uzorcima biljnih droga i pripravaka

Pri analizi nabavljenih uzoraka utvrđene su velike razlike u sadržaju aktivnih tvari između uzoraka (Tablica 23), kao i drastična neslaganja nađenog i deklariranog sadržaja za većinu njih (Tablica 24). Najprije je proučen sadržaj uzoraka koji su većinski deklarirani kao ekstrakti (S1–S35). Najveća varijabilnost uočena je u sadržaju kurkuminoida (od 0,1 mg/g u S16 do 894 mg/g u S9). Nadalje, prema Američkoj farmakopeji pripravci kurkuminoida dobiveni iz vrste *C. longa* moraju pratiti određenu raspodjelu ukupnih kurkuminoida, točnije 70–80 % CUR, 15–25 % DMC i 2,5–6,5 % BDMC (172). Od svih analiziranih uzoraka na bazi kurkume, 7 ih nije zadovoljilo navedeni kriterij. Posebno se ističu S1 s 99 % CUR te S6 i S13 u kojima je prisutno oko 30 % BDMC. Navedene distribucije upućuju na moguće krivotvorenje navedenih uzoraka, bilo obogaćivanjem uzorka sintetskim tvarima ili korištenjem patvorina, tj. drugih vrsta roda *Curcuma* (173). U pogledu nađenog i deklariranog sadržaja, 12 od 19 uzoraka na bazi kurkume odgovaralo je kriteriju monografije Američke farmakopeje za kurkuminoide od 90 do 110 % deklariranog sadržaja. Uzorci S6, S13 i S16 su, s druge strane, sadržavali ispod 20 % onog što je deklarirano; valja napomenuti da su sva tri uzorka kupljena putem internetske prodaje. Kod pripravaka justicije ponovno je uočena mogućnost krivotvorenja: uzorak S30 sadržavao je samo ANDR (912 mg/g), dok su drugi andrografolidi bili jedva prisutni. Uzorci S31, S33 i S34 sadržavali su niže razine andrografolida (do 159,8 mg/g), ali karakterističnije raspodjele za ekstrakt lista justicije. U uzorcima S32 i S35 prisutne su vrlo niske razine andrografolida: navedeno je i očekivano za S35 koji je kombinirani proizvod, ali S32 je trebao sadržavati puno više razine andrografolida s obzirom na tvrdnje da je on kombinacija suhog ekstrakta i usitnjene biljne droge lista justicije. Jedino je uzorak S30 imao jasno deklariran sadržaj andrografolida te nađeni sadržaj (93,8 %) zadovoljava kriterije Američke farmakopeje. Sadržaj PIP bio je u rasponu od virtualno nepostojećeg (ispod granice dokazivanja, S6) do 190,2 mg/g (S21, monopreparat). Manje od polovice uzoraka (4 od 9) odgovaralo je granicama Američke farmakopeje od 90 do 110 % deklariranog sadržaja. Štoviše, za uzorke s manje od 20 % deklariranog sadržaja (S3, S13 i S21, od kojih su potonja dva nabavljena putem internetske trgovine) može se pretpostaviti da su ozbiljno poddozirani te da posljedično postižu vrlo malu do nikakvu terapijsku učinkovitost. Uzorci pripravaka indijskog tamjanovca sadržavali su od 1,6 (S28) do 636,7 (S26) mg bosveličnih kiselina/g. Aktivni keto derivati (KBA i AKBA) nađeni su u rasponu od ispod granice određivanja do 128,3 mg/g (S26). Od interesa je uzorak S25 nabavljen putem internetske trgovine: iako deklaracija navodi da se uzorak sastoji od čistog

suhog ekstrakta indijskog tamjanovca standardiziranog na 65 % bosveličnih kiselina, pronađeno ih je samo 12,9 mg/g (1,3 %) s 3,0 mg/g aktivnih derivata. Što se tiče omjera nađenog i deklariranog sadržaja, on je iznosio od 2,0 (S25) do 176,8 % (S14), iako je na deklaracijama specificiran minimalni sadržaj, a ne apsolutni.

Uzorci usitnjenih biljnih droga (S36–S54) također su analizirani: iako se one same mogu koristiti kao sirovi materijal u izradi pripravaka, često se pojavljuju na tržištu i u „neekstrahiranom“ obliku, bilo u rinfuzi ili kao dio nekog dozirnog oblika. Sadržaj je ponovno prikazan kao mg analita po gramu uzorka (Tablica 23), dok je u Tablici 24 naveden maseni udio aktivnih sastavnica u biljnoj drogi po uzorku. Očekivano su uočeni niži sadržaji u usporedbi s uzorcima ekstrakata. Kurkuminoidi su pronađeni u rasponu od 14,7 (S44) do 102,3 (S43) mg/g uzorka, s masenim udjelima od 2,7 do 10,2 %. Slična opažanja utvrđena su i u literaturi (174, 175). Uzorci S42 i S43 sadržavali su vrlo visoke udjele kurkuminoida (8,8, odnosno 10,2 %). Udio BDMC u tim uzorcima približava se onom CUR, što nije karakteristično za vrstu *C. longa* i ponovno bi moglo ukazivati na krivotvorenje, s obzirom na to da je prema Japanskoj farmakopeji maksimalni dopušteni udio kurkuminoida u navedenoj vrsti 5,0 % (176). Od uzoraka justicije, sadržaj se protezao od 12,1 (S53) do 44,4 (S54) mg/g; potonji viši sadržaj karakterističan je za uzorke s Tajlanda (177). Smole indijskog tamjanovca pokazale su od 27,8 do 30,5 % bosveličnih kiselina, s iznad 1,5 % KBA i iznad 7,0 % AKBA. Valja napomenuti da svi uzorci osim S46 odgovaraju kriterijima Europske i/ili Američke farmakopeje (2, odnosno 3 % kurkuminoida, 0,8, odnosno 1 % andrografolida i 1 % keto derivata bosveličnih kiselina) (167, 172).

Tablica 23. Rezultati analize sadržaja i ispitivanja homogenosti dozirnih oblika

uzorak	odstupanje mase dozirnog oblika, RSD (%, $n = 6$)	sadržaj (mg/g uzorka) $\pm$ RSD (%), $n = 3$												
		ANDR	NANDR	14-DANDR	PIP	BDMC	DMC	CUR	KBA	AKBA	ABA	BBA	AABA	ABBA
S1	1,90	— ^a	—	—	23,9 $\pm$ 5,7	0,8 $\pm$ 4,2	1,0 $\pm$ 6,4	231,7 $\pm$ 3,8	<LOQ ^b	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
S2	2,68	—	—	—	12,1 $\pm$ 1,2	99,6 $\pm$ 3,3	147,8 $\pm$ 2,8	590,6 $\pm$ 2,8	—	—	—	—	—	—
S3	0,74	—	—	—	0,4 $\pm$ 11,9	0,7 $\pm$ 3,9	3,4 $\pm$ 0,4	16,6 $\pm$ 1,2	—	—	—	—	—	—
S4	2,86	—	—	—	—	23,1 $\pm$ 1,7	151,3 $\pm$ 1,9	695,9 $\pm$ 2,0	—	—	—	—	—	—
S5	3,84	—	—	—	—	7,7 $\pm$ 2,2	55,8 $\pm$ 3,7	266,2 $\pm$ 3,6	2,2 $\pm$ 4,3	61,2 $\pm$ 5,1	10,3 $\pm$ 8,5	32,6 $\pm$ 7,6	17,6 $\pm$ 2,3	169,7 $\pm$ 8,3
S6	1,09	—	—	—	<LOD ^c	7,4 $\pm$ 2,2	4,8 $\pm$ 1,0	12,1 $\pm$ 0,6	—	—	—	—	—	—
S7	1,76	—	—	—	—	0,3 $\pm$ 2,3	4,9 $\pm$ 0,5	51,6 $\pm$ 0,2	—	—	—	—	—	—
S8	2,97	—	—	—	—	20,0 $\pm$ 4,0	109,3 $\pm$ 3,3	581,2 $\pm$ 3,1	—	—	—	—	—	—
S9	2,89	—	—	—	9,1 $\pm$ 3,0	34,1 $\pm$ 1,7	142,5 $\pm$ 1,7	717,4 $\pm$ 1,8	—	—	—	—	—	—
S10	0,78	—	—	—	—	2,2 $\pm$ 2,4	10,0 $\pm$ 0,8	46,6 $\pm$ 0,6	—	—	—	—	—	—
S11	2,82	—	—	—	9,3 $\pm$ 4,3	23,9 $\pm$ 1,9	131,6 $\pm$ 2,3	684,1 $\pm$ 2,5	—	—	—	—	—	—
S12	2,22	—	—	—	3,0 $\pm$ 2,6	1,8 $\pm$ 3,5	8,4 $\pm$ 2,8	43,2 $\pm$ 2,1	1,4 $\pm$ 20,7	1,2 $\pm$ 37,9	5,3 $\pm$ 2,7	12,5 $\pm$ 4,5	<LOQ	3,0 $\pm$ 5,6
S13	5,41	—	—	—	0,9 $\pm$ 9,6	7,6 $\pm$ 1,8	5,9 $\pm$ 0,7	14,3 $\pm$ 0,7	—	—	—	—	—	—
S14	/	—	—	—	7,8 $\pm$ 8,2	4,7 $\pm$ 2,5	18,5 $\pm$ 3,4	229,5 $\pm$ 4,2	39,9 $\pm$ 3,3	29,8 $\pm$ 3,3	129,0 $\pm$ 3,5	267,9 $\pm$ 2,4	24,8 $\pm$ 3,3	60,8 $\pm$ 2,8
S15	/	—	—	—	—	0,2 $\pm$ 1,2	0,1 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,4	—	—	—	—	—	—
S16	/	—	—	—	—	0,1 $\pm$ 3,6	<LOQ	<LOQ	—	—	—	—	—	—
S17	0,45	—	—	—	—	1,9 $\pm$ 1,1	11,5 $\pm$ 0,2	48,7 $\pm$ 0,3	—	—	—	—	—	—
S18	1,37	—	—	—	—	0,3 $\pm$ 7,3	1,9 $\pm$ 1,9	11,7 $\pm$ 2,2	—	—	—	—	—	—
S19	1,18	—	—	—	6,2 $\pm$ 8,7	16,3 $\pm$ 0,5	76,5 $\pm$ 1,0	379,8 $\pm$ 1,0	—	—	—	—	—	—
S20	0,99	—	—	—	—	<LOQ	0,3 $\pm$ 3,0	1,7 $\pm$ 1,8	<LOQ	<LOQ	0,9 $\pm$ 4,6	2,2 $\pm$ 2,8	<LOQ	<LOQ
S21	/	—	—	—	190,2 $\pm$ 2,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S22	/	—	—	—	—	—	—	—	42,8 $\pm$ 2,7	32,4 $\pm$ 2,8	135,7 $\pm$ 4,7	299,4 $\pm$ 1,7	18,0 $\pm$ 9,3	74,9 $\pm$ 2,9
S23	5,75	—	—	—	—	—	—	—	17,6 $\pm$ 1,3	15,7 $\pm$ 1,0	53,4 $\pm$ 2,3	121,4 $\pm$ 0,6	9,8 $\pm$ 2,2	33,6 $\pm$ 1,2
S24	2,94	—	—	—	—	—	—	—	35,0 $\pm$ 1,5	12,9 $\pm$ 1,7	97,5 $\pm$ 0,9	196,2 $\pm$ 1,5	11,4 $\pm$ 4,3	34,9 $\pm$ 3,7
S25	3,20	—	—	—	—	—	—	—	0,7 $\pm$ 6,8	2,3 $\pm$ 4,3	2,4 $\pm$ 6,9	5,0 $\pm$ 3,1	<LOQ	2,5 $\pm$ 5,0
S26	1,08	—	—	—	—	—	—	—	44,0 $\pm$ 0,8	84,3 $\pm$ 0,5	131,2 $\pm$ 0,9	294,8 $\pm$ 0,9	26,2 $\pm$ 2,4	56,2 $\pm$ 1,1

uzorak	odstupanje mase dozirnog oblika, RSD (%, $n = 6$)	sadržaj (mg/g uzorka) $\pm$ RSD (%), $n = 3$												
		ANDR	NANDR	14-DANDR	PIP	BDMC	DMC	CUR	KBA	AKBA	ABA	BBA	AABA	ABBA
S27	2,54	–	–	–	–	–	–	–	18,5 $\pm$ 10,1	7,2 $\pm$ 10,2	67,6 $\pm$ 11,0	151,7 $\pm$ 9,9	13,3 $\pm$ 10,0	25,4 $\pm$ 11,3
S28	1,29	–	–	–	–	–	–	–	0,1 $\pm$ 10,6	0,2 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 15,3	0,7 $\pm$ 12,4	0,1 $\pm$ 19,1	0,2 $\pm$ 19,7
S29	1,21	–	–	–	–	–	–	–	0,8 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 2,8	1,2 $\pm$ 0,5
S30	/	912,0 $\pm$ 1,4	<LOD	<LOQ	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
S31	3,08	146,7 $\pm$ 2,8	5,1 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 0,6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
S32	2,73	<LOD	<LOD	<LOD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
S33	1,37	6,9 $\pm$ 3,7	<LOD	0,1 $\pm$ 1,8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,8 $\pm$ 1,2	0,7 $\pm$ 1,1	2,0 $\pm$ 1,7	5,0 $\pm$ 1,2	0,3 $\pm$ 9,0	1,5 $\pm$ 2,7
S34	1,68	149,1 $\pm$ 6,0	3,8 $\pm$ 10,0	6,7 $\pm$ 3,7	–	10,3 $\pm$ 5,9	37,1 $\pm$ 5,8	174,8 $\pm$ 5,6	–	–	–	–	–	–
S35	0,90	0,6 $\pm$ 9,2	<LOD	<LOD	–	6,0 $\pm$ 5,2	8,5 $\pm$ 3,6	34,4 $\pm$ 3,4	–	–	–	–	–	–
S36	1,20	–	–	–	–	2,0 $\pm$ 7,9	6,3 $\pm$ 8,5	28,8 $\pm$ 7,7	–	–	–	–	–	–
S37	/	–	–	–	–	9,8 $\pm$ 2,1	9,1 $\pm$ 1,2	24,0 $\pm$ 1,0	–	–	–	–	–	–
S38	/	–	–	–	–	9,8 $\pm$ 1,8	8,0 $\pm$ 0,6	21,8 $\pm$ 0,4	–	–	–	–	–	–
S39	/	–	–	–	–	11,5 $\pm$ 1,9	10,0 $\pm$ 1,4	23,9 $\pm$ 1,0	–	–	–	–	–	–
S40	/	–	–	–	–	10,6 $\pm$ 1,9	6,6 $\pm$ 1,3	15,9 $\pm$ 1,4	–	–	–	–	–	–
S41	1,28	–	–	–	3,4 $\pm$ 1,7	4,2 $\pm$ 4,8	3,7 $\pm$ 1,9	10,2 $\pm$ 1,3	–	–	–	–	–	–
S42	3,77	–	–	–	2,8 $\pm$ 4,7	27,6 $\pm$ 0,5	15,1 $\pm$ 0,3	36,8 $\pm$ 0,2	–	–	–	–	–	–
S43	5,31	–	–	–	–	40,3 $\pm$ 0,5	18,6 $\pm$ 0,3	43,4 $\pm$ 0,3	–	–	–	–	–	–
S44	/	–	–	–	3,8 $\pm$ 13,9	4,0 $\pm$ 3,3	3,0 $\pm$ 4,8	7,7 $\pm$ 4,8	–	–	–	–	–	–
S45	/	–	–	–	–	8,0 $\pm$ 1,0	6,4 $\pm$ 0,6	17,4 $\pm$ 0,7	–	–	–	–	–	–
S46	/	–	–	–	–	7,6 $\pm$ 1,5	5,7 $\pm$ 0,1	14,1 $\pm$ 0,4	–	–	–	–	–	–
S47	4,27	–	–	–	1,2 $\pm$ 3,6	13,9 $\pm$ 1,0	6,3 $\pm$ 1,1	12,4 $\pm$ 1,5	–	–	–	–	–	–
S48	/	–	–	–	–	15,0 $\pm$ 2,8	11,3 $\pm$ 2,2	27,4 $\pm$ 2,2	–	–	–	–	–	–
S49	/	–	–	–	–	–	–	–	11,1 $\pm$ 5,9	21,5 $\pm$ 1,7	52,3 $\pm$ 2,9	150,3 $\pm$ 2,6	24,6 $\pm$ 5,7	45,5 $\pm$ 5,8
S50	/	–	–	–	–	–	–	–	6,7 $\pm$ 4,5	40,2 $\pm$ 4,6	31,7 $\pm$ 3,0	125,4 $\pm$ 3,2	25,2 $\pm$ 2,0	50,5 $\pm$ 4,6
S51	/	–	–	–	–	–	–	–	4,1 $\pm$ 2,0	24,3 $\pm$ 0,9	35,9 $\pm$ 1,8	126,7 $\pm$ 1,1	22,7 $\pm$ 2,9	63,2 $\pm$ 0,2
S52	/	14,5 $\pm$ 6,5	2,3 $\pm$ 10,0	6,1 $\pm$ 7,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
S53	/	9,4 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 8,6	1,6 $\pm$ 0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
S54	3,87	33,9 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 1,4	4,0 $\pm$ 0,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

^anije očekivan u uzorku, ^bispod granice određivanja, ^cispod granice dokazivanja

Tablica 24. Nađeni/deklarirani sadržaj i dnevni unos aktivnih sastavnica

uzorak	prosječna masa sadržaja dozirnog oblika (mg, n = 6)	sadržaj (%) ^a				dnevni unos (mg) ^b			
		andrografolidi	piperin	kurkuminoidi	bosvelične kiseline	andrografolidi	piperin	kurkuminoidi	bosvelične kiseline
S1	456	— ^c	n/d ^d	n/d	n/d	—	21,8	213,0	<LOQ ^e
S2	403	—	102,7	101,6	—	—	9,8	675,4	—
S3	1169	—	5,0	50,4	—	—	0,5	24,2	—
S4	501	—	—	91,8	—	—	—	872,0	—
S5	507	—	—	70,3	79,4 (AKBA 124,1)	—	—	334,3	297,7
S6	293	—	<LOQ	2,8	—	—	<LOQ	28,5	—
S7	694	—	—	93,9	—	—	—	315,4	—
S8	486	—	—	90,9	—	—	—	690,6	—
S9	541	—	98,4	96,7	—	—	4,9	483,7	—
S10	886	—	—	108,5	—	—	—	52,1	—
S11	486	—	95,4	95,2	—	—	9,0	816,1	—
S12	853	—	90,3	95,9	66,5 (AKBA 11,4)	—	5,1	91,1	40,0
S13	322	—	6,1	1,9	—	—	1,7	53,7	—
S14	/	—	41,0	53,2	176,7	—	6,4	202,2	441,8
S15	/	—	—	n/d	—	—	—	0,5	—
S16	/	—	—	1,4	—	—	—	0,1	—
S17	452	—	—	93,6	—	—	—	28,1	—
S18	1600	—	—	95,7	—	—	—	44,5	—
S19	340	—	n/d	102,3	—	—	6,3	482,1	—
S20	1623	—	—	n/d	n/d	—	—	6,6	7,8
S21	/	—	20,0	—	—	—	4,0	—	—
S22	/	—	—	—	92,8	—	—	—	482,6
S23	291	—	—	—	38,6	—	—	—	146,4
S24	441	—	—	—	60,0	—	—	—	342,1
S25	482	—	—	—	2,0	—	—	—	12,4
S26	314	—	—	—	70,7	—	—	—	399,8
S27	391	—	—	—	119,6 ^f	—	—	—	110,9

uzorak	prosječna masa sadržaja dozirnog oblika (mg, n = 6)	sadržaj (%) ^a				dnevni unos (mg) ^b			
		andrografolidi	piperin	kurkuminoidi	bosvelične kiseline	andrografolidi	piperin	kurkuminoidi	bosvelične kiseline
S28	1073	–	–	–	8,6	–	–	–	3,4
S29	1647	–	–	–	90,2 ^f	–	–	–	58,6
S30	/	93,1	–	–	–	91,2	–	–	–
S31	391	n/d	–	–	–	125,0	–	–	–
S32	504	n/d	–	–	–	<LOQ	–	–	–
S33	694	n/d	n/d	n/d	n/d	14,6	<LOQ	<LOQ	21,4
S34	528	n/d	–	117,2	–	168,5	–	234,6	–
S35	880	n/d	–	107,9	–	3,2	–	258,2	–
S36	699	–	–	n/d	–	–	–	26,0	–
S37	/	–	–	4,3	–	–	–	n/a ^g	–
S38	/	–	–	4,0	–	–	–	n/a	–
S39	/	–	–	4,5	–	–	–	n/a	–
S40	/	–	–	3,3	–	–	–	n/a	–
S41	400	–	5,2	3,5	–	–	2,7	14,5	–
S42	483	–	2,8	8,8	–	–	8,1	230,4	–
S43	395	–	–	10,2	–	–	–	40,4	–
S44	/	–	7,6	3,0	–	–	n/a	n/a	–
S45	/	–	–	3,2	–	–	–	n/a	–
S46	/	–	–	2,7	–	–	–	n/a	–
S47	297	–	4,4	4,0	–	–	3,6	96,8	–
S48	/	–	–	5,4	–	–	–	n/a	–
S49	/	–	–	–	30,5	–	–	–	n/a
S50	/	–	–	–	28,0	–	–	–	n/a
S51	/	–	–	–	27,8	–	–	–	n/a
S52	/	2,3	–	–	–	22,9	–	–	–
S53	/	1,2	–	–	–	48,4	–	–	–
S54	425	4,4	–	–	–	302,0	–	–	–

^aizraženo kao nađeno/deklarirano (%) za ekstrakte (S1–S35) i maseni udio odgovarajuće biljne sastavnice za biljne droge (S36–S54), ^bprema režimu doziranja kojeg navodi proizvođač, ^cnije očekivano, ^dsadržaj nije naveden, ^eispod granice određivanja, ^fpod pretpostavkom 65 % bosveličnih kiselina u uzorku, ^gpreporučeni dnevni unos nije naveden

Procijenjen je i dnevni unos aktivnih tvari po uzorku (Tablica 24). Ponovno se mogu vidjeti velike razlike u dnevnim unosima, pogotovo za kurkuminoide (čak do 9000 puta). Za nekoliko uzoraka kurkuminoida (S6, S15, S16 i S20) utvrđeni su dnevni unosi niži od 30 mg, što je vrlo mala doza s obzirom na nisku bioraspoloživost kurkuminoida. U drugim uzorcima s nižim koncentracijama kurkuminoidi su većinom bili u kombinaciji s PIP ili u obliku koji poboljšava apsorpciju, stoga se očekuje kako će biti nešto učinkovitiji. Niske razine bosveličnih kiselina utvrđene su u proizvodima S20, S25, S28 i S33 (ispod 12,4 mg po danu). Svi proizvodi osim S25 su preparati gdje bosvelične kiseline nisu glavna komponenta, stoga je manja količina opravdana, no S25 sadrži samo smolu indijskog tamjanovca te prema nađenoj količini bosveličnih kiselina nema nikakvu terapijsku učinkovitost. Neki uzorci demonstrirali su i vrlo visoke dnevne unose aktivnih sastavnica (do 872 mg kurkuminoida u S4, 21,4 mg PIP u S1, 483 mg bosveličnih kiselina u S22 i 302 mg andrografolida u S54). Studije su pokazale da bosvelične kiseline poboljšavaju simptome IBD-a i artritisa u dozama od 500 do 1000 mg dnevno s povoljnim sigurnosnim profilom (178, 179), stoga su preparati S5 i S26 poželjni u tom pogledu. Kurkuminoide su također pokazali dobar sigurnosni profil čak do 12 g dnevno, a doze od oko 500 do 1000 mg i učinkovitost u upalnim bolestima (180). S druge strane, visoke doze PIP i andrografolida mogu predstavljati opasnost za korisnika. Doze od 1 do 10 mg PIP su dostatne za poboljšanje bioraspoloživosti mnogih ksenobiotika; međutim, u dozama iznad 10 mg PIP inhibira P-glikoprotein i CYP3A4, što može dovesti do farmakokinetičkih interakcija (181). Uzorak S1 u jednoj dozi sadrži 21,8 mg PIP te tako predstavlja opasnost za bolesnike koji istovremeno uzimaju velik broj lijekova. Što se tiče andrografolida, u sustavnom pregledu Coon i Ernst (182) navode kako dnevna doza andrografolida iznad 5 mg/kg tjelesne težine dovodi do raznih nuspojava poput alergijskih reakcija, žgaravice i probavnih poteškoća. Konzumacijom preparata S54 unosi se 302 mg andrografolida dnevno, što je za korisnike niže tjelesne težine doza koja je blizu spomenute granice te se javlja rizik od navedenih nuspojava.

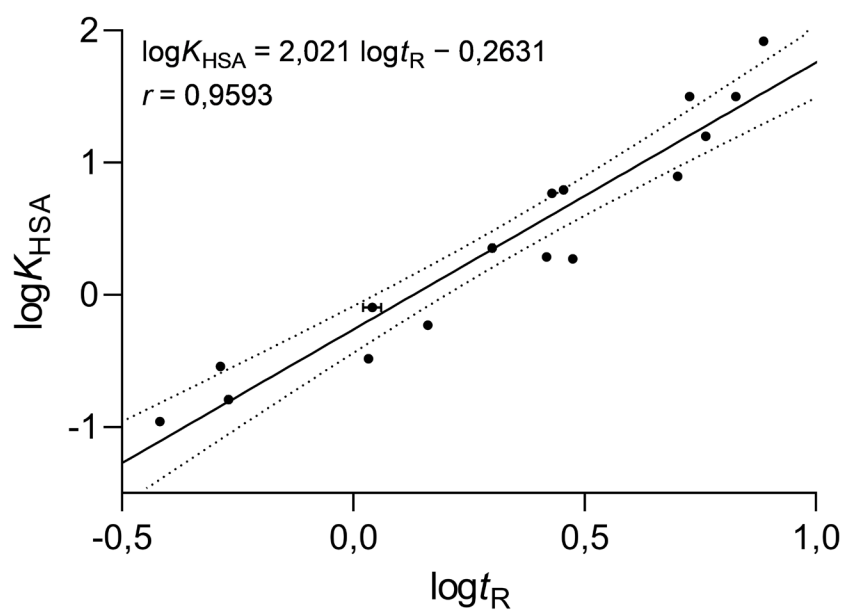
U ovom dijelu istraživanja otkriveno je kako su razlike između pronađenog i deklariranog sadržaja ispitivanih aktivnih sastavnica drastične u velikom broju uzoraka, naročito onih nabavljenih putem interneta. Osim toga, sadržaj aktivnih sastavnica znatno se razlikovao između uzoraka, a time i njihovi dnevni unosi. Iako će dobivena saznanja o sadržaju biti upotrijebljena za procjenu interakcije ovisno o najvećoj mogućoj primijenjenoj dozi nakon *in vitro* i *ex vivo* ispitivanja kompeticije vezanja na HSA i inhibicije relevantnih enzima, ovi rezultati su vrijedan doprinos za povećanje svijesti o nedostacima dodataka

prehrani nabavljenih internetskom trgovinom iz nepouzdanih izvora. Ovim putem se u potpunosti može zaobići kontrola kakvoće, ali i savjet stručne osobe poput liječnika ili ljekarnika, što naposljetku može dovesti do posljedica koje ugrožavaju zdravlje korisnika.

4.4. Procjena interakcije droga i pripravaka lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra s 6-merkaptopurinom u pogledu vezanja na humani serumski albumin

Kao što je već rečeno u uvodu, poznati su mnogi slučajevi interakcije hrane i dodataka prehrani s farmakoterapijom koje mogu dovesti do izostanka učinka same terapije ili čak do njene toksičnosti. Sljedeća poglavlja se bave *in vitro* i *ex vivo* ispitivanjem interakcije droga i pripravaka lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra s terapijom tiopurinskim imunosupresivima. Budući da je AZA prolijeke koji vrlo brzo prelazi u 6MP, fokus je usmjeren na 6MP kao glavni „liječnik/metabolit“ s kojim bi biljni pripravci mogli stupati u interakcije.

Prvi korak ispitivanja bio je procjena potencijala interakcije pri vezanju na HSA biomimetičkom kromatografijom. Iako se, kako je već spomenuto, 6MP veže na HSA u obimu od oko 30 %, tvari koje se iznimno vežu na HSA na isto vezno mjesto mogu ga istisnuti s ovog proteina i dovesti do značajnog povećanja njegove koncentracije u plazmi. Najprije je procijenjen obim vezanja aktivnih sastavnica ispitivanih biljnih vrsta. Ponovljivost metode za određivanje obima vezanja ispitana je praćenjem vremena zadržavanja racemične smjese varfarina. RSD vrijednosti unutar jednog dana ($n = 6$), odnosno tijekom tri dana ($n = 9$) bile su manje od 0,1, odnosno 0,6 %, dakle metoda se može koristiti za predviđenu namjenu. Konstruiran je pravac ovisnosti (Slika 20) logaritama konstanti vezanja lijekova iz literature (navedeni u Tablici 6) o logaritmu njihovih vremena zadržavanja koja su dobivena HPLC metodom na HSA koloni. Dobivena povezanost je značajna ($p < 0,001$) uz vrlo dobar koeficijent korelacije (0,9593). Zatim su nakon analize aktivnih sastavnica od interesa istom metodom putem dobivene ovisnosti izračunati njihovi obimi vezanja na HSA (HSA_{exp}) koji su prikazani u Tablici 25.



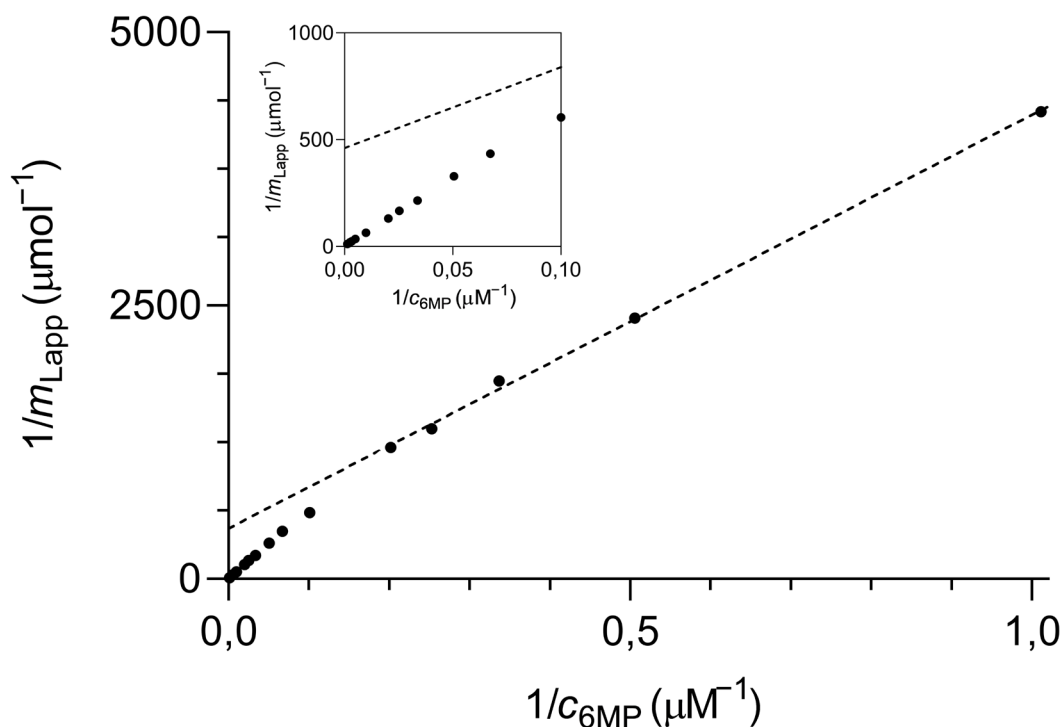
Slika 20. Kalibracijski pravac za izračun postotka vezanja na HSA. Istočkane linije predstavljaju 95%-tni interval pouzdanosti, a trake pogrešaka standardno odstupanje ($n = 3$)

Tablica 25. Rezultati biomimetičkih ispitivanja vezanja aktivnih sastavnica biljnih vrsta na HSA

analit	t_R (min)	$\log t_R$	$\log K_{HSA}$	HSA _{exp} (%)
ANDR	2,62	0,42	0,58	80,1
NANDR	3,44	0,54	0,82	87,7
14-DANDR	4,18	0,62	0,99	91,7
BDMC	8,11	0,91	1,57	98,4
DMC	7,54	0,88	1,51	98,0
CUR	7,03	0,85	1,45	97,5
KBA	7,70	0,89	1,53	98,1
AKBA	12,19	1,09	1,93	99,8
ABA	9,18	0,96	1,68	98,9
BBA	11,98	1,08	1,93	99,8
PIP	5,53	0,74	1,24	95,5

Sve aktivne sastavnice vežu se u velikom obimu na HSA (najmanje 80,1 %). Rezultati upućuju da bi moglo doći do istiskivanja 6MP s ovog proteina ukoliko se navedeni analiti vežu na isto vezno mjesto.

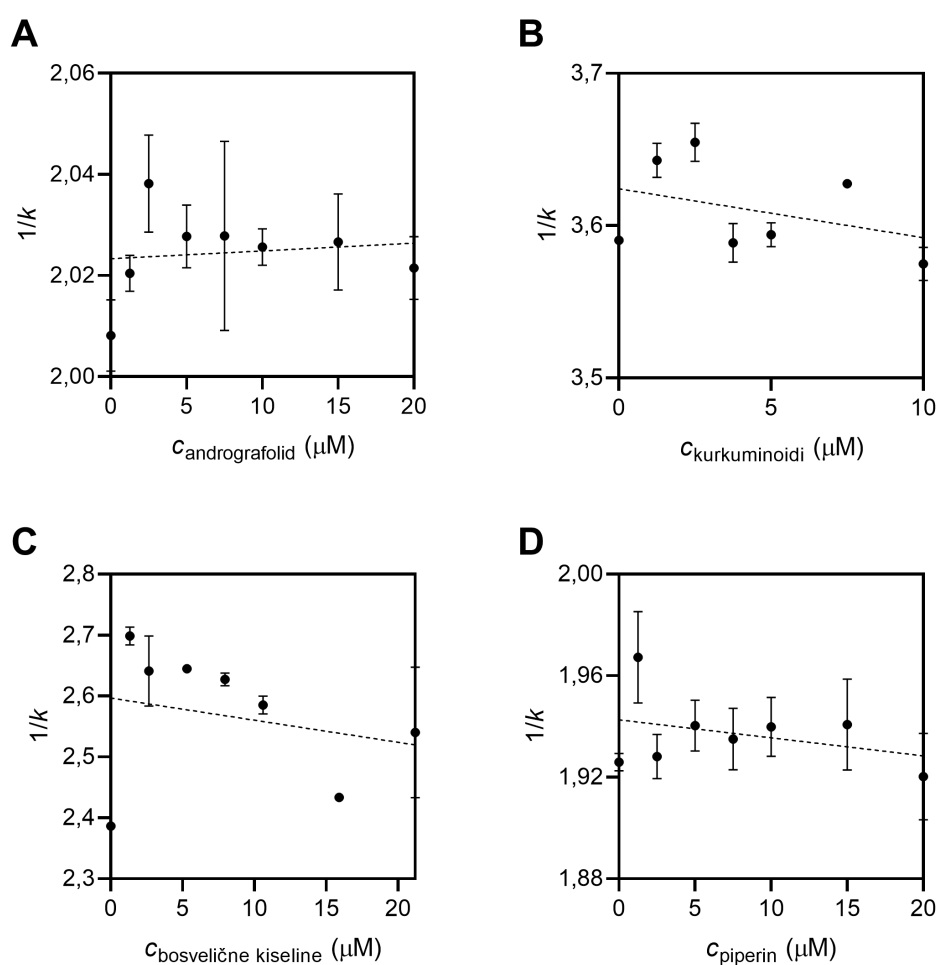
Sljedeće ispitivanje, tzv. frontalna analiza, provedeno je kako bi se procijenila vrsta vezanja 6MP na HSA. Praćeno je vrijeme izboja povećavajućih koncentracija 6MP u mobilnoj fazi s HSA kolone koje označava postizanje ravnoteže vezanog i nevezanog 6MP na koloni; usporedo je isto provedeno za natrijev nitrat (tvar koja se ne veže na HSA) kako bi se anulirao utjecaj kromatografskog sustava. Iz razlike vremena izračunati su prividni molarni ekvivalenti zasićenja kolone (m_{Lapp}) te je konstruiran dvostruko recipročni dijagram ovisnosti m_{Lapp} o primijenjenoj koncentraciji 6MP (Slika 21).



Slika 21. Dvostruko recipročni dijagram ovisnosti prividnog molarnog ekvivalenta zasićenja kolone o koncentraciji 6MP. Iscrtkana linija predstavlja pravac regresije dobiven pri niskim koncentracijama. Umetak: povećani prikaz odstupanja od trenda pri visokim koncentracijama

Podaci pokazuju odstupanje od linearnosti pri višim koncentracijama 6MP (nižim vrijednostima x-osi), što upućuje da bi 6MP mogao imati više veznih mjesta na HSA-u (145); isto su pretpostavili Sochacka i sur. kroz studije molekuskog sidrenja (183).

Naposljetku, ispitan je utjecaj povećavajućih koncentracija aktivnih sastavnica u mobilnoj fazi na zadržavanje 6MP. Faktor kapaciteta 6MP praćen je nakon zasićenja kolone koncentracijama aktivnih sastavnica od 0 do 20 μM . Ovisnosti recipročnih vrijednosti faktora kapaciteta o primijenjenoj koncentraciji sastavnica prikazane su na Slici 22. Ni u jednom slučaju nije utvrđena značajnost nagiba pravca pri razini od 5 % ($p \geq 0,115$) niti je uočen trend koji upućuje na alosteričku modulaciju, što bi značilo da ne dolazi do interakcije u vezanju.



Slika 22. Ovisnosti recipročnih vrijednosti faktora kapaciteta 6MP o koncentraciji A) andrografolida, B) kurkuminoide, C) bosveličnih kiselina i D) piperina u mobilnoj fazi. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

6MP se primarno veže na vezno mjesto I (184), no isto je utvrđeno i za ANDR (185), PIP (186) i CUR (187). Moguće je da oni istiskuju 6MP s veznog mjesta I, no on se veže na svoje sekundarno vezno mjesto s obzirom na gore navedene rezultate, stoga ne dolazi do interakcije. U ljudi, maksimalne plazmatske koncentracije ($c_{\max}$) svih navedenih aktivnih sastavnica sežu do 4 μM (188–190). One su niže nego koncentracije ispitane u ovom istraživanju, stoga se može pretpostaviti da ni u fiziološkim uvjetima neće doći do interakcije u pogledu distribucije. Naravno, nedostatak ovog pristupa je što nisu sve tvari prisutne u pripravcima uzete u obzir (pogotovo u slučaju justicije i crnog papra), no pretpostavka je da su ostale sastavnice prisutne u puno manjim količinama od ispitanih aktivnih sastavnica, stoga je i manji potencijal interakcije. Još jedna mana je niža osjetljivost za lijekove s manjim obimom vezanja na HSA poput 6MP, no ukoliko i dolazi do malih promjena u njegovom stupnju vezanja na HSA, one vrlo vjerojatno nisu fiziološki značajne te neće utjecati na ishod terapije.

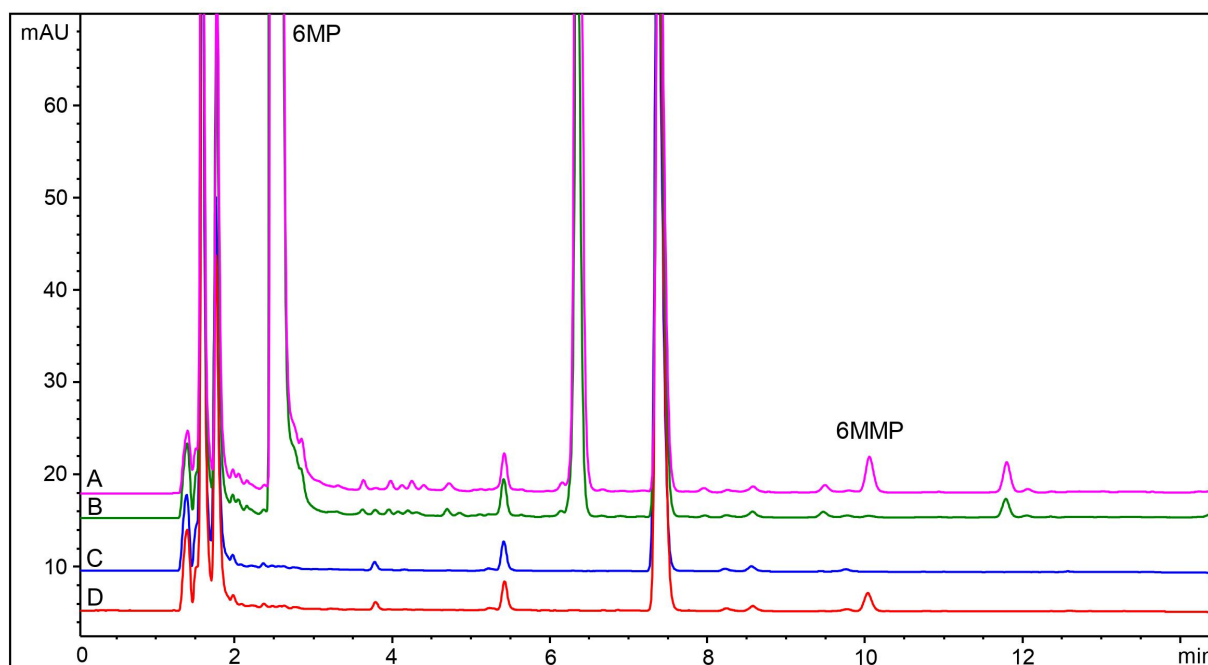
4.5. Procjena inhibicijskog potencijala ekstrakata lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra prema tiopurin metiltransferazi

Nakon utvrđivanja niske mogućnosti interakcije pripravaka odabranih biljnih vrsta i 6MP u pogledu vezanja na HSA, daljnji fokus istraživanja bio je usmjeren na inhibicije relevantnih enzima. S obzirom na bitnu inaktivacijsku ulogu TPMT-a u metabolizmu tiopurina, ispitan je utjecaj biljnih pripravaka na njegovu aktivnost. Prvotno je razvijena HPLC metoda za određivanje aktivnosti TPMT-a u hemolizatu, procijenjena je kinetika metilacije 6MP u ovisnosti o koncentraciji 6MP i SAM te je ispitan inhibicijski potencijal pripravaka prema TPMT-u.

4.5.1. Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje aktivnosti tiopurin metiltransferaze u hemolizatu

Iako već postoje HPLC metode za određivanje aktivnosti TPMT-a u hemolizatu (191–195), one uključuju ispitivanje metilacije 6TG (što ne mora reflektirati stvarno stanje metilacije 6MP), vrlo kompleksne i vremenski zahtjevne predobradbe ili predobradbe nakon kojih analizirani kromatogrami pokazuju velik broj sastavnica, što može ugroziti selektivnost metode. U konačnici, svaki biološki uzorak ima svoje specifičnosti, stoga je metoda razvijena i validirana na uzorku na kojem je i određivana aktivnost TPMT-a praćenjem nastanka 6MMP kao produkta metilacije. Iz saznanja dosad provedenih ispitivanja odabran je kiseli pH

mobilne faze zbog dobre simetrije pikova tiopurina. Od stacionarnih faza ispitane su kolone C18, cijano i fenilnih kemizama uz acetonitril i metanol kao organske sastavnice mobilne faze. Utvrđeno je kako kombinacija fenilne kolone (CORTECS Phenyl, $4,6 \times 150$ mm, $2,7 \mu\text{m}$) i metanola uzrokuje najbolje zadržavanje 6MMP, a time i povećava selektivnost s obzirom na činjenicu da hidrofilne sastavnice matrice eluiraju ranije. Gradijentni program i temperatura kolone nadalje su optimirani kako bi se postigla što bolja selektivnost. U svrhu bolje osjetljivosti i postizanja nižih granica određivanja, 6MMP je praćen na apsorpcijskom maksimumu od 291 nm, a injektirano je $40,0 \mu\text{L}$ supernatanata nakon predobradbe inkubata. Ispitan je i utjecaj predobradbe inkubata na selektivnost; kako je potrebno inaktivirati TPMT te istovremeno istaložiti proteine, inkubati su predobrađeni zagrijavanjem (120°C , 3 min) ili dodatkom perklorne kiseline ($25 \mu\text{L}$ na $200 \mu\text{L}$ hemolizata). Inkubati predobrađeni perklornom kiselinom pokazali su zamjetno manje pikova interferencija. 6MMP je bio stabilan u kiselim uvjetima do 24 h, stoga je predobradba perklornom kiselinom odabrana kao optimalna. Kromatogrami slijepog uzorka hemolizata, uzorka hemolizata obogaćenog otopinom 6MMP, uzorka inkubata bez SAM (kofaktora) i uzorka inkubata uz SAM prikazani su na Slici 23.



Slika 23. Kromatogrami: A) inkubata uz SAM, B) inkubata bez SAM, C) slijepog uzorka hemolizata, D) uzorka hemolizata obogaćenog otopinom 6MMP

Nisu uočene interferencije u slijepom uzorku hemolizata na vremenu zadržavanja 6MMP (oko 10 min). Oselin i sur. (191) te Lennard i sur. (196) utvrdili su kako u prisutnosti DMSO-a dolazi do značajne ne-enzimske metilacije 6MP (čak do 85 % standardne inkubacije), što može dati lažno povišene vrijednosti aktivnosti TPMT-a. Iako je DMSO korišten za pripremu otopina ekstrakata i aktivnih sastavnica, u našem istraživanju primijećen je vrlo mali porast pika 6MMP (3 % u odnosu na inkubaciju u prisutnosti SAM), čineći DMSO prikladnim otapalom. Moguće je da je do ne-enzimske metilacije došlo zbog visokih koncentracija DMSO-a i/ili 6MP, kao i zbog koraka kisele hidrolize pri povišenoj temperaturi (100 °C, 2 h) koji ubrzava kinetiku metilacije u potonjem istraživanju. Naposljetku, analizirani su uzorci inkubata bez 6MP, ali u prisustvu otopina biljnih ekstrakata/aktivnih sastavnica pri čemu nisu primijećeni pikovi na vremenu zadržavanja 6MMP. Ovime je utvrđeno kako je razvijena metoda selektivna, što je jedan od ključnih parametara s obzirom na kompleksnost samog uzorka.

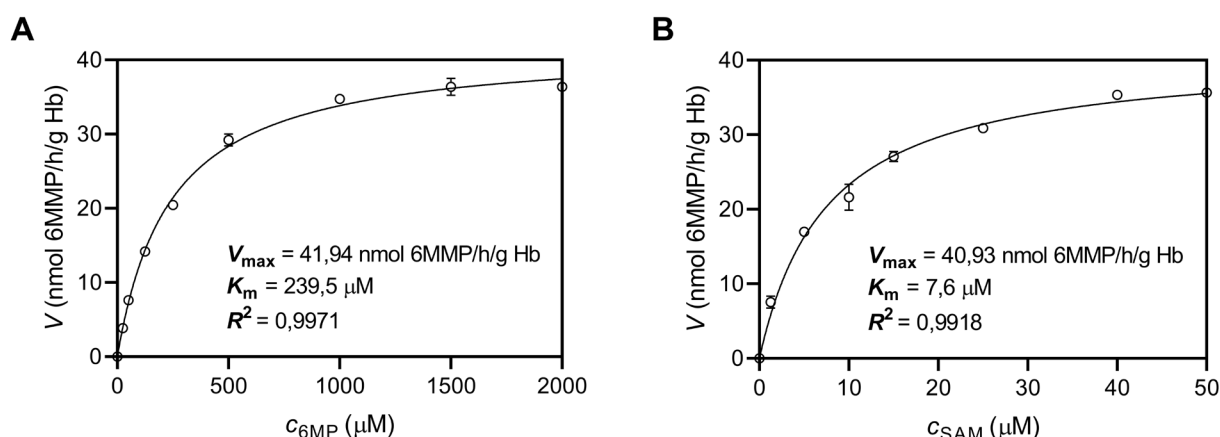
Ispitane su i ostale značajke validacije cijelog postupka (Tablica 26) na hemolizatu obogaćenog standardnom otopinom 6MMP. U svim slučajevima hemolizat je obogaćen prije predobradbe. Linearnost je ispitana na šest koncentracijskih razina u duplikatu u području od 10 (LOQ) do 150 ng/mL. Vrlo dobar koeficijent korelacije (0,9996) uz statistički neznačajan odsječak na y -osi ($p = 0,497$) upućuje na valjanost kalibracijskog pravca. Osim toga, postignuta je vrlo niska granica određivanja od 10 ng/mL. Nadalje, dobiveni su odlični analitički prinosi triplikata ispitivanja (od 96,6 do 98,7 %) te RSD vrijednosti prinosa heksaplikata predobradbi u istom danu na koncentraciji od 100 ng/mL (1,3 %), dok je ANOVA pokazala neznačajne razlike u prinosima heksaplikata kroz tri dana ($p = 0,071$). Prema navedenim rezultatima donosi se zaključak kako su postupak predobradbe i kromatografska metoda prikladni za određivanje 6MMP u hemolizatu. Valja istaknuti kako su, unatoč kompleksnosti uzorka i varijabilnosti u postupku predobradbe, dobivene i više nego zadovoljavajuće vrijednosti validacijskih parametara.

Tablica 26. Validacijski podaci postupka za određivanje 6MMP u hemolizatu

parametar		vrijednost
radno područje		10–150 ng/mL
jednadžba pravca		$y = 0,227x - 0,137$
koeficijent korelacije		0,9996
<i>p</i> -vrijednost odsjeka na <i>y</i> -osi		0,497
analitički prinos (srednja vrijednost ± RSD, <i>n</i> = 3)	niska razina (40 ng/mL)	98,7 ± 1,5
	srednja razina (100 ng/mL)	96,6 ± 0,8
	visoka razina (150 ng/mL)	97,1 ± 0,7
ponovljivost (RSD, <i>n</i> = 6)		1,3 %
srednja preciznost (<i>p</i> -vrijednost, ANOVA, <i>n</i> = 18)		0,071

4.5.2. Ispitivanje kinetike i optimizacija parametara enzimske metilacije 6-merkaptopurina putem tiopurin metiltransferaze

Da bi se uočio utjecaj kompetitivnih inhibitora, koncentracija supstrata i kofaktora mora biti u blizini Michaelisove konstante (K_m , koncentracija supstrata na kojoj se postiže polovina maksimalne brzine); pri koncentracijama supstrata puno višim od K_m postoji opasnost da se potencijalni kompetitivni inhibitor previdi (197). Iz navedenog razloga ispitana je kinetika metilacije 6MP s obzirom na supstrat 6MP i kofaktor SAM. Kako su potrebni uvjeti početne brzine enzimske reakcije za procjenu kinetike, proučena je ovisnost procesa metilacije o vremenu inkubacije. Utvrđen je linearan porast pika 6MMP do 2 h inkubacije ($r = 0,999$), nakon čega brzina opada. Daljnja ispitivanja su, stoga, provedena u trajanju inkubacija do 2 h da bi se osigurali uvjeti početne brzine. Kinetika je ispitana variranjem koncentracije 6MP uz stalnu koncentraciju SAM te obrnuto. Nelinearnom regresijom pokazalo se da dobiveni podaci najbolje slijede Michaelis-Menteničin model ($r \geq 0,996$) te su konstruirani grafovi ovisnosti početne brzine metilacije 6MP o koncentraciji supstrata/kofaktora (Slika 24).



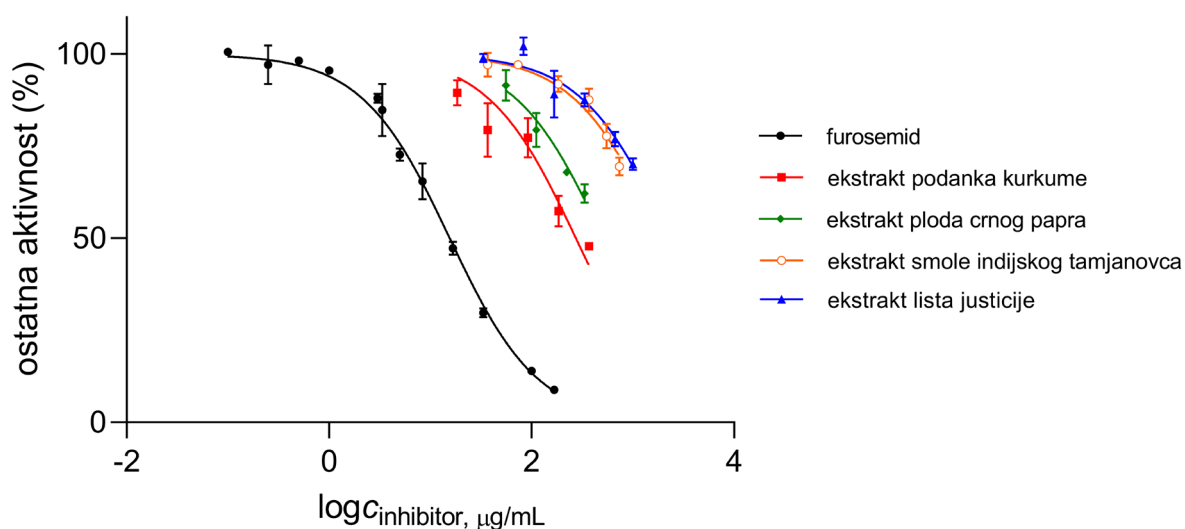
Slika 24. Grafovi ovisnosti početne brzine metilacije 6MP o koncentraciji: A) 6MP, B) SAM. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

U oba slučaja dosegnuta je približno ista vrijednost V_{max} (oko 40 nmol 6MMP/h/g Hb). Iz navedenog proizlazi zaključak kako je dobrovoljac koji je donirao uzorak pune krvi homozigot za tzv. „divlji tip“ alela, tj. ekstenzivni je metabolizator koji posjeduje dva funkcionalna *TPMT* alela (198, 199). Takav tip metabolizatora predstavlja najveći udio populacije i dobivena saznanja o inhibiciji se mogu translirati na većinu bolesnika. Nadalje, K_m vrijednosti za 6MP, odnosno SAM iznosile su 239,5, odnosno 7,6 μM , stoga su u daljnjim ispitivanjima korištene koncentracije do 3 K_m , tj. one od 500 μM 6MP i 20 μM SAM kako bi potencijalna kompetitivna inhibicija bila uočena kako je i navedeno na početku poglavlja.

Osim utvrđivanja optimalnih koncentracija i vremena inkubacije, ispitan je i utjecaj količine hemolizata te koncentracije DMSO-a na aktivnost *TPMT*-a. Očekivan je linearan odnos koncentracije nastalog 6MMP i korištene količine hemolizata u radnom području metode. Utvrđena je navedena linearnost pri volumenima hemolizata od 100 do 250 μL ($r = 0,999$), dok od 300 μL nadalje koncentracija 6MMP znatno odstupa od linearnog trenda, stoga je za daljnje eksperimente odabrana količina od 200 μL hemolizata. Nadalje, visoke koncentracije DMSO-a mogu dovesti do denaturacije enzima te tako prividno utjecati na njihovu aktivnost (200, 201). U ovom istraživanju u rasponu koncentracija DMSO-a od 0 do 5 % (V/V) u inkubacijskoj smjesi nije došlo do promjena u aktivnosti enzima. U ispitivanjima inhibicije su, stoga, korištene koncentracije od 3 % DMSO-a (V/V) u konačnoj smjesi.

4.5.3. Ispitivanje utjecaja ekstrakata odabranih biljnih droga na aktivnost tiopurin metiltransferaze

Nakon optimizacije kromatografske metode i parametara inkubacije, ispitan je inhibicijski učinak ekstrakata biljnih droga na TPMT. Budući da se većina pripravaka primjenjuje kao suhi ekstrakti, korišteni su komercijalno nabavljeni suhi ekstrakti podanka kurkume i smole indijskog tamjanovca, dok su u nedostatku valjanih komercijalnih ekstrakata priređeni ekstrakti lista justicije i ploda crnog papra. Učinak ekstrakata uspoređen je s furosemidom za kojeg je poznato da inhibira navedeni enzim. Na Slici 25 prikazana je ostatna aktivnost enzima (u odnosu na negativnu kontrolu inhibicije, tj. primjenu čistog DMSO-a umjesto otopine ekstrakta/furosevida prilikom pripreme inkubata) te su kao mjera inhibicije procijenjene IC_{50} vrijednosti (koncentracije inhibitora potrebne za smanjenje aktivnosti za 50 %).



Slika 25. Ostatna aktivnost TPMT-a u ovisnosti o logaritmu koncentracije inhibitora. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

Ekstrakti podanka kurkume ($IC_{50} = 275 \mu\text{g/mL}$) i ploda crnog papra ($IC_{50} = 490 \mu\text{g/mL}$) pokazali su jači inhibicijski učinak u odnosu na ekstrakte lista justicije ($IC_{50} = 2300 \mu\text{g/mL}$) i smole indijskog tamjanovca ($IC_{50} = 1900 \mu\text{g/mL}$). Kako se korišteni ekstrakt podanka kurkume gotovo u potpunosti (92,7 %) sastoji od kurkuminoida, vjerojatno je da su oni odgovorni za navedenu inhibiciju. U slučaju ekstrakta ploda papra, s obzirom na to da PIP inhibira velik broj enzima, pretpostavka je da je i ovdje bio zaslužan za inhibicijski učinak, što je utvrđeno naknadnim ispitivanjem ($IC_{50} = 330 \mu\text{g/mL}$). No, IC_{50} vrijednosti svih ispitanih uzoraka bile su za najmanje red veličine više od one furosevida ($15 \mu\text{g/mL}$), stoga

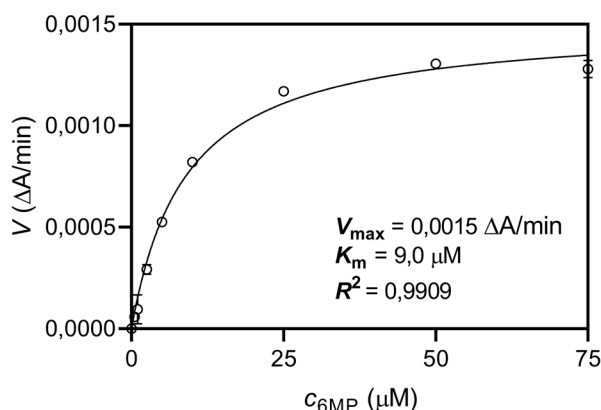
se oni ne mogu smatrati potentnim inhibitorima TPMT-a. Osim toga, bioraspoloživost aktivnih sastavnica, posebice kurkuminoida, niska je te u sustavnom krvotoku nisu očekivane koncentracije koje bi bile relevantne za fiziološki značajnu inhibiciju ovog enzima. Sumarno, možemo pretpostaviti da u slučaju pripravaka ispitanih biljnih droga i terapije tiopurinskim imunosupresivima neće doći do interakcije u pogledu metabolizma putem TPMT-a.

4.6. Procjena inhibicijskog potencijala ekstrakata lista justicije, podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra prema ksantin oksidazi

Aktivnost XO-a kao drugog relevantnog inaktivacijskog enzima u metabolizmu tiopurina može biti modulirana utjecajem raznih ksenobiotika. Nakon ispitivanja inhibicijskog učinka ekstrakata odabranih biljnih droga na TPMT, isto je provedeno za XO uz prethodnu procjenu kinetike u ovisnosti o koncentraciji supstrata.

4.6.1. Ispitivanje kinetike i optimizacija parametara enzimske oksidacije 6-merkaptopurina putem ksantin oksidaze

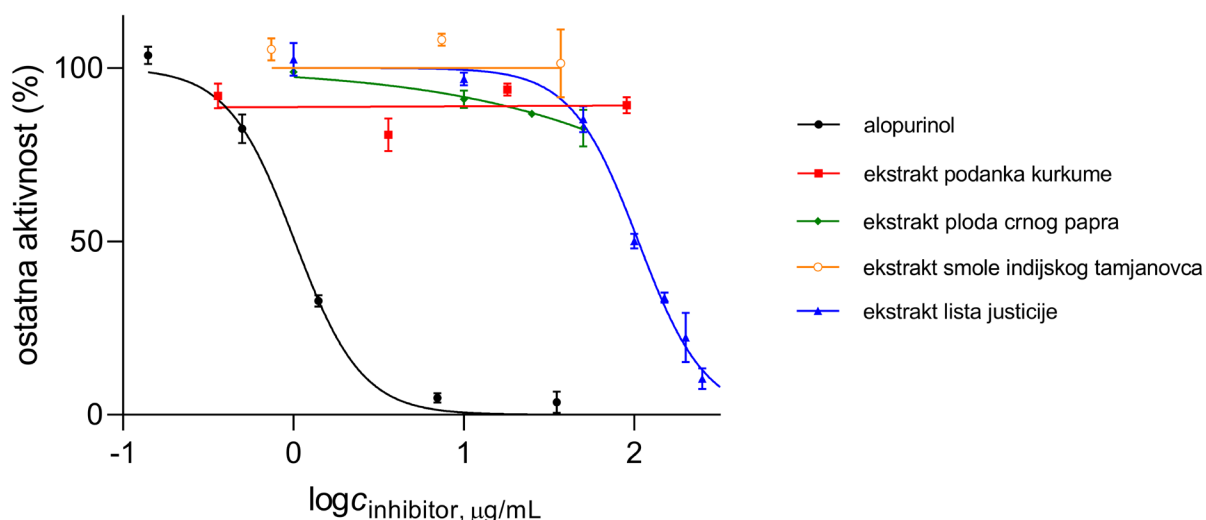
Za procjenu kinetike oksidacije 6MP korištena je konstantna koncentracija XO-a (40 mU/mL), dok je koncentracija supstrata varirana od 0 do 75 μM . Nelinearnom regresijom utvrđeno je da kinetika prati Michaelis-Menteničin model (Slika 26, $r = 0,995$). K_m vrijednost iznosila je 9,0 μM , stoga su iz razloga navedenih u prethodnom poglavlju za ispitivanja inhibicije korištene koncentracije supstrata od 10 μM .



Slika 26. Graf ovisnosti početne brzine oksidacije 6MP o njegovoj koncentraciji. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

4.6.2. Ispitivanje utjecaja ekstrakata odabranih biljnih droga na aktivnost ksantin oksidaze

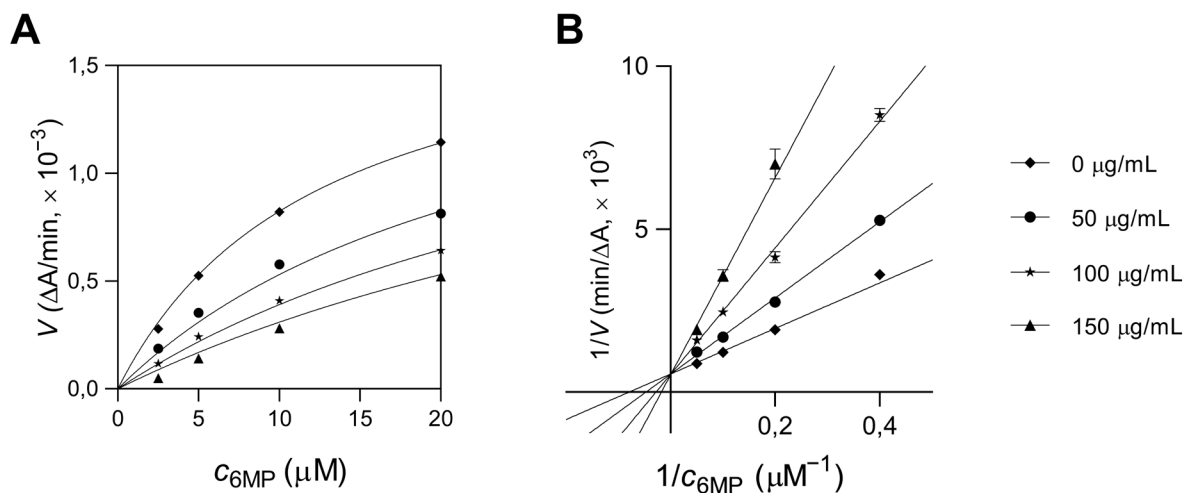
Ispitivanja inhibicije provedena su korištenjem ekstrakata odabranih biljnih droga ili referentnog inhibitora (alopurinol) otopljenih u 10%-tnom (*V/V*) DMSO-u u vodi. Preliminarna ispitivanja pokazala su da se aktivnost XO-a ne mijenja u rasponu od 0 do 2,5 % DMSO-a (*V/V*) u konačnom inkubatu; prema tome, koncentracije od 1 % koje su korištene u ispitivanju ne utječu na rezultate. Na Slici 27 prikazana je ostatna aktivnost enzima (u odnosu na negativnu kontrolu inhibicije, tj. primjenu 10%-tnog DMSO-a u vodi umjesto otopine ekstrakta/alopurinola) u ovisnosti o koncentraciji inhibitora.



Slika 27. Ostatna aktivnost XO-a u ovisnosti o logaritmu koncentracije inhibitora. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

U našim uvjetima, ekstrakti podanka kurkume, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra pokazali su slabu inhibicijsku moć sve do granice topljivosti. Ovi rezultati su oprečni s onima Gawlik-Dziki (202) koja je utvrdila kako ekstrakt ploda crnog papra značajno inhibira XO. Međutim, priprema ekstrakta u tom istraživanju uključivala je ekstrakciju kipućom vodom od 15 min, što bi moglo značiti kako dolazi do ekstrakcije različitih sastavnica, ali i njihovog mogućeg raspada zbog visoke temperature pri čemu neki od razgradnih produkata pokazuju inhibicijsko djelovanje prema XO-u. Ekstrakt lista justicije pokazao je umjereno inhibicijsko djelovanje na XO ($IC_{50} = 105 \mu\text{g/mL}$), što je u skladu s rezultatima Lin i sur. (203). No, uočena inhibicija znatno je slabija (čak za dva reda veličine) od inhibicije referentnim inhibitorom alopurinolom ($IC_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$). Unatoč tome, moguća opasnost od inhibicije leži u lokalizaciji ovog enzima u enterocitima i visokoj koncentraciji ekstrakta dostupnoj enzimu, o čemu će biti riječi u nastavku poglavlja.

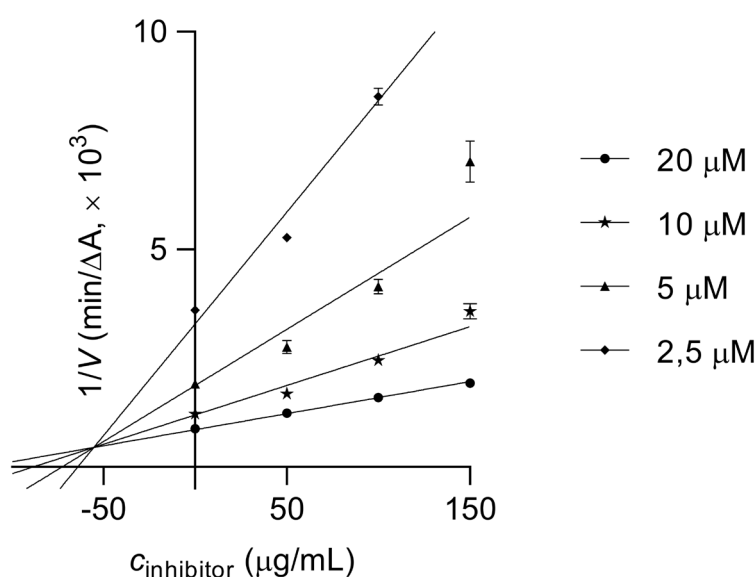
Kako je jedino ekstrakt lista justicije pokazao potencijal inhibicije, ispitan je tip te inhibicije. Primijenjene su koncentracije inhibitora od 0 do 150 $\mu\text{g/mL}$ te je praćena oksidacija 6MP pri koncentracijama supstrata od 2,5 do 20 μM . Nelinearnom regresijom utvrđeno je kako model kompetitivne inhibicije najbolje opisuje dobivene podatke ($r = 0,994$), što je predočeno grafom ovisnosti početne brzine oksidacije o koncentraciji supstrata (Slika 28A) i Lineweaver-Burkovim prikazom (Slika 28B).



Slika 28. A) ovisnost početne brzine enzimske reakcije o koncentraciji 6MP i B) Lineweaver-Burkov prikaz za ekstrakt lista justicije. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

Na Lineweaver-Burkovom prikazu jasno je vidljivo kako se pravci ovisnosti recipročnih vrijednosti početnih brzina o recipročnoj vrijednosti koncentracije supstrata za različite koncentracije inhibitora sijeku na y-osi, što naznačava jednaku V_{max} , a različite K_m vrijednosti. Navedeno je karakteristično za kompetitivnu inhibiciju, kao što je i rečeno. Naime, inhibitor (ili u slučaju smjesa kao što je ovaj ekstrakt, jedna ili više njenih sastavnica) su strukturno slični supstratu te se natječu s njim za vezanje na aktivno mjesto enzima (204). Povećavanjem koncentracije inhibitora u prisutnosti enzima smanjuje se količina produkta koja nastaje zbog manjeg broja jedinki supstrata koje se uspijevaju vezati na aktivno mjesto enzima, što posljedično dovodi do povećanja K_m , tj. potrebna je veća koncentracija supstrata u smjesi da bi se postigla početna brzina jednaka polovini V_{max} . Naravno, V_{max} se ne mijenja jer se povećanjem koncentracije supstrata inhibitor može potpuno istisnuti iz aktivnog mjesta enzima, pri čemu se obnavlja njegova normalna aktivnost (205).

Nadalje, za primijenjeni ekstrakt utvrđena je konstanta inhibicije (K_i). Iako IC_{50} vrijednosti daju približnu sliku o magnitudi inhibicije, one znatno ovise o korištenoj koncentraciji supstrata, dok je K_i vrijednost intrinzična za kombinaciju enzima i inhibitora, neovisna o koncentraciji supstrata i, prema tome, pouzdanija mjera inhibicije (206). Pomoću Dixonovog prikaza (Slika 29) određena je K_i vrijednost od 55,40 $\mu\text{g/mL}$, što je potvrđeno i nelinearnom regresijom ($K_i = 54,90 \mu\text{g/mL}$, 95%-tni interval pouzdanosti 46,53–66,20 $\mu\text{g/mL}$). Utvrđena K_i vrijednost iznosi otprilike polovinu IC_{50} vrijednosti, što je u skladu s Cheng-Prusoffovom jednadžbom za kompetitivne inhibitore te je dodatna potvrda tipa inhibicije (207).



Slika 29. Dixonov prikaz za ekstrakt lista justicije. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

Budući da nije došlo do znatnih promjena u aktivnosti XO-a prilikom primjene ANDR (koncentracije do 250 $\mu\text{g/mL}$) i 14-DANDR (koncentracije do 50 $\mu\text{g/mL}$) umjesto ekstrakta lista justicije, očito je da diterpenski laktoni nisu zaslužni za utvrđeni inhibicijski učinak ekstrakta. Osim diterpenskih laktona, droge i pripravci vrste *A. paniculata* u velikoj količini sadrže i fenilkarboksilne kiseline te flavonoide (208, 209). Već je poznato inhibitorno djelovanje flavonoida prema XO-u s vrlo niskim K_i , odnosno IC_{50} vrijednostima (210–212). Fitokemijske analize pokazale su da je apigenin jedna od najzastupljenijih sastavnica iz skupine flavonoida u vrsti *A. paniculata* (208). Lin i sur. (213) utvrdili su iznimno nisku K_i vrijednost za apigenin (0,61 μM), usporedivu onoj alopurinola (0,34 μM); drugi flavonoidi

demonstrirali su nešto slabiju inhibicijsku moć. Osim toga, ista istraživačka skupina dokazala je da su ispitani flavonoidi kompetitivni inhibitori XO-a, što podupire tvrdnju da su flavonoidi odgovorni za inhibicijsko djelovanje pripravaka lista justicije.

Kao što je već prije rečeno, iako inhibicijsko djelovanje ekstrakta lista justicije nije znatno, velika količina aktivnih sastavnica dostupna intestinalnom XO-u mogla bi utjecati na aktivnost enzima u fiziološkim uvjetima. Uvriježena mjera mogućnosti klinički značajne interakcije je omjer koncentracije inhibitora na mjestu djelovanja enzima i njegove K_i vrijednosti ($[I]/K_i$): za vrijednosti ispod 0,1, interakcija se smatra niskorizičnom, između 0,1 i 1 srednjerizičnom, a iznad 1 visokorizičnom (214, 215). Prema tome, koncentracije dobivenog ekstrakta (i pripravaka sličnog sastava) iznad samo 5 $\mu\text{g/mL}$ u lumenu tankog crijeva mogle bi prouzročiti inhibiciju XO-a i povećati količinu 6MP dostupnog narednim reakcijama biotransformacije. Osim toga, ovisno o mjestu i načinu uzgoja biljke te načinu izrade droga/pripravaka, neki proizvodi mogu sadržati veću količinu flavonoida te pokazati potentniju inhibiciju ovog enzima. Kako je i količina aktivnih sastavnica koja dolazi u sustavni krvotok manja, tako se smanjuje i potencijal inhibicije plazmatske inačice enzima. Pretpostavlja se kako ova interakcija ne bi imala velikog utjecaja na terapiju AZA koji se hidrolizira tek u plazmi te nije supstrat XO-a, već samo na terapiju oralno primijenjenog 6MP. Međutim, ovim ispitivanjem nije uzet u obzir utjecaj metabolita ekstrakata, kao ni moguća razgradnja unutar probavnog trakta, posebice u kiselom pH želuca. Dobivene rezultate potrebno je potvrditi *in vivo* ispitivanjima.

5. ZAKLJUČAK

U ovom doktorskom radu ispitani su čimbenici koji bi mogli utjecati na terapiju upalnih bolesti crijeva u pogledu adherencije, učinkovitosti i sigurnosti. Najprije, ispitana je fizikalno-kemijska kompatibilnost AZA i FA te 6MP i FA korištenjem raznovrsnih tehnika i pristupa u svrhu odabira tehnološkog oblika za FDC. Prvotni probir DSC-om ukazao je na moguću interakciju AZA i FA s obzirom na to da se u smjesama pik FA značajno pomaknuo u odnosu na čistu djelatnu tvar, dok je pik AZA u određenim smjesama bio odsutan. Ova tvrdnja ipak je opovrgnuta korištenjem drugih pristupa: studije prisilne razgradnje pokazale su slične razgradne profile djelatnih tvari, smjese djelatnih tvari i smjese ljekovitih oblika, IST studija nije pokazala značajne razlike u prinosima stresiranih i nestresiranih uzoraka, a kroz studiju oslobađanja u biorelevantnom mediju utvrđeno je dostatno oslobađanje i uzajamna stabilnost djelatnih tvari u FaSSIF-u. Što se tiče kompatibilnosti 6MP i FA, DSC termogrami pokazali su sličan profil čistih djelatnih tvari i njihovih smjesa, IST studija neznčajne razlike u prinosima i FTIR spektrima analita, a studija oslobađanja postojanost djelatnih tvari pri izlaganju oba ljekovita oblika biorelevantnom mediju istovremeno. Studije prisilne razgradnje su, s druge strane, pokazale narušenu stabilnost 6MP u smjesi ljekovitih oblika pri lužnatim uvjetima, što se pripisuje razgradnim produktima pomoćnih tvari te bi pri izradi formulacijskih smjesa za navedenu kombinaciju posebnu pozornost valjalo obratiti na izbor pomoćnih tvari. Zaključno, obje kombinacije moguće je izraditi upotrebom jedinstvene formulacijske smjese nakon ispitivanja kompatibilnosti djelatnih tvari s pomoćnicima. Ovime bi se izbjegli kompliciraniji i skuplji postupci izrade višeslojnih oblika. Osim toga, HPLC metode razvijene u ovom radu predstavljaju novi doprinos te bi se mogle koristiti za praćenje stabilnosti i kakvoće potencijalnih FDC-ova, s obzirom na to da pokazuju stabilitetno-indikativnu moć te su razvijene na realnim uzorcima, tj. kombinaciji ljekovitih oblika.

Nadalje, određen je sadržaj aktivnih tvari kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i PIP u biljnim drogama i njihovim pripravcima koje bolesnici s IBD-om često koriste kao komplementarnu terapiju. Cilj ovog dijela istraživanja bio je dvojak: standardizirati pripravke korištene za daljnja ispitivanja interakcija, kao i procijeniti kakvoću droga i pripravaka dostupnih na tržištu u pogledu aktivnih sastavnica. Najprije je razvijena i validirana HPLC metoda za istovremeno određivanje 13 aktivnih sastavnica koja pokazuje potencijal korištenja u rutinskim kontrolama kakvoće zbog svoje robustnosti i jednostavnosti. U 54 ispitana uzorka utvrđene su drastične razlike u dnevnim unosima aktivnih sastavnica

(od praktički nepostojećeg do 872 mg), kao i diskrepancije između nađenog i deklariranog sadržaja (od 2,0 do 176,8 %). Uzorci nabavljeni putem internetske trgovine u pravilu su bili lošije kakvoće (vrlo malen dnevni unos aktivnih sastavnica, što praktički znači neučinkovitost pripravka), pokazali znakove krivotvorenja ili sadržavali vrlo visoke količine aktivnih sastavnica koje bi mogle uzrokovati farmakokinetičke interakcije (22 mg PIP dnevno u S1) ili nuspojave povezane s dozom (302 mg andrografolida dnevno u S54). Zaključno, pomoću navedenih saznanja potrebno je podići svijest korisnika o opasnostima korištenja lijekova i dodataka prehrani nabavljenih putem neprovjerenih internetskih trgovina te ih usmjeriti na nabavu takvih i sličnih proizvoda od ovjerenih distributera poput ljekarni.

Naposljetku, procijenjen je potencijal interakcije odabranih biljnih droga i njihovih pripravaka s terapijom tiopurinskim imunosupresivima u pogledu vezanja na HSA i metabolizma putem TPMT-a i XO-a. Prvotno je utvrđeno kako se sve aktivne sastavnice odabranih biljnih droga vežu na HSA u obimu većem od 80,1 %, što samo po sebi predstavlja rizik istiskivanja drugih tvari vezanih na njega. Frontalnom analizom procijenjena je vrsta vezanja 6MP na HSA. Prema provedenim eksperimentima, 6MP ima više od jednog veznog mjesta na proteinu. Zonskom eluacijom 6MP s HSA kolone uz povećavajuće koncentracije aktivnih sastavnica biljnih droga u mobilnoj fazi proučen je tip interakcije, pri čemu je zaključeno kako aktivne sastavnice ne utječu na obim vezanja 6MP na HSA pod pretpostavkom da se on vezuje na svoje sekundarno vezno mjesto. Što se tiče TPMT-a, prvotno je razvijena i validirana kromatografska metoda za određivanje 6MMP u hemolizatu kako bi se mogla pratiti aktivnost TPMT-a, a zatim je ispitan utjecaj ekstrakata biljnih droga na njegovu aktivnost. Svi ekstrakti pokazali su visoke IC_{50} vrijednosti (iznad 275 $\mu\text{g/mL}$) u usporedbi s referentnim inhibitorom furosemidom ($IC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$). Osim toga, tako visoke koncentracije sastavnica ekstrakata ne očekuju se u sustavnom krvotoku, dakle potencijal interakcije je vrlo nizak. U slučaju XO-a, samo je ekstrakt lista justicije pokazao umjereni inhibicijski učinak ($IC_{50} = 105 \mu\text{g/mL}$, $K_i \sim 55 \mu\text{g/mL}$), no ipak puno slabiji od referentnog alopurinola ($IC_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$). Utvrđeno je da ekstrakt kompetitivno inhibira XO. Ispitani čisti diterpenski laktoni zanemarivo su inhibirali XO, stoga je pretpostavka kako su flavonoidi, posebice apigenin, prisutni u vrsti *A. paniculata* odgovorni za inhibicijsko djelovanje njenih pripravaka. Iako je dobivena K_i vrijednost prilično velika, opasnost interakcije leži u mogućoj visokoj koncentraciji sličnih pripravaka u probavnom traktu gdje su dostupni intestinalnom XO-u. U ovom slučaju interakcija se ne očekuje pri oralnoj terapiji AZA, već samo 6MP; pri intravenskoj primjeni oba lijeka potencijal interakcije je nizak. Sumarno, postoji mogućnost

interakcije pripravaka lista justicije i oralno primijenjenog 6MP koja bi mogla dovesti do toksičnosti terapije, no navedeni rezultati moraju se potvrditi *in vivo* istraživanjima.

Ovaj doktorski rad predstavlja doprinos kroz potencijalne načine poboljšanja učinkovitosti i sigurnosti terapije IBD-a, kako standardne, tako i one komplementarne. Izrada i primjena navedenih FDC-ova mogla bi poboljšati adherenciju bolesnika koja je jedan od najvećih problema kronične terapije. Širenje svijesti o kakvoći biljnih droga i pripravaka nabavljenih putem internetske prodaje doprinijelo bi povećanju benefita pri korištenju kvalitetnih i provjerenih pripravaka, ne samo u terapiji IBD-a, već i općenito. Na kraju, razumijevanje interakcija između standardne farmakoterapije i hrane/dodataka prehrani koje bolesnici s IBD-om koriste moglo bi spriječiti mnoge neželjene ishode. Objedinjeni rezultati predstavljeni u ovom radu, prema tome, pokazuju vrijedna saznanja koja bi, primijenjena, mogla povećati kvalitetu života bolesnika s IBD-om.

6. POPIS LITERATURE

1. Odze RD. A contemporary and critical appraisal of “indeterminate colitis.” *Mod Pathol* 2015;28:S30–46.
2. Ananthakrishnan AN, Kaplan GG, Ng SC. Changing Global Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases: Sustaining Health Care Delivery Into the 21st Century. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020;18:1252–60.
3. Kaplan GG. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:720–7.
4. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2014;20:91–9.
5. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 2001;411:603–6.
6. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwilliam R, Keniry A, et al. IL23R Variation Determines Susceptibility But Not Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2007;132:1657–64.
7. Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus* 2017;9:11.
8. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 2019;157:647–59.
9. Khan I, Ullah N, Zha L, Bai Y, Khan A, Zhao T, et al. Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): Cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome. *Pathogens* 2019;8:126.
10. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369:1641–57.
11. Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, et al. World gastroenterology organization practice guidelines for the diagnosis and management of

- IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:112–24.
12. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferri F, Fedeli G, et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005;11:7227–36.
 13. Lomer MCE. Symposium 7: Nutrition in inflammatory bowel disease Dietary and nutritional considerations for inflammatory bowel disease. *Proc Nutr Soc* 2011;70:329–35.
 14. Sandborn WJ, Hanauer S, Van Assche G, Panés J, Wilson S, Petersson J, et al. Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *J Crohn's Colitis* 2014;8:927–35.
 15. Kotsovilis S, Andreakos E. Therapeutic Human Monoclonal Antibodies in Inflammatory Diseases. In: Steinitz M, editor. *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2014:37–59.
 16. Sands BE, Sandborn WJ, Panaccione R, O'Brien CD, Zhang H, Johanns J, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* 2019;381:1201–14.
 17. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2016;375:1946–60.
 18. Karran P, Attard N. Thiopurines in current medical practice: Molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:24–36.
 19. Maltzman JS, Koretzky GA. Azathioprine: Old drug, new actions. *J Clin Invest* 2003;111:1122–4.
 20. Meijer B, Mulder CJJ, Peters GJ, Van Bodegraven AA, De Boer NKH. Efficacy of thioguanine treatment in inflammatory bowel disease: A systematic review. *World J Gastroenterol* 2016;22:9012–21.
 21. Ward MG, Patel K V., Kariyawasam VC, Goel R, Warner B, Elliott TR, et al. Thioguanine in inflammatory bowel disease: Long-term efficacy and safety. *United Eur Gastroenterol J* 2017;5:563–70.

22. Nguyen GC, Seow CH, Maxwell C, Huang V, Leung Y, Jones J, et al. The Toronto Consensus Statements for the Management of Inflammatory Bowel Disease in Pregnancy. *Gastroenterology* 2016;150:734–57.
23. Angelberger S, Reinisch W, Messerschmidt A, Miehsler W, Novacek G, Vogelsang H, et al. Long-term follow-up of babies exposed to azathioprine in utero and via breastfeeding. *J Crohn's Colitis* 2011;5:95–100.
24. De Meij TGJ, Jharap B, Kneepkens CMF, Van Bodegraven AA, De Boer NKH. Long-term follow-up of children exposed intrauterine to maternal thiopurine therapy during pregnancy in females with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:38–43.
25. Relling M V., Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui CH, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. *Clin Pharmacol Ther* 2019;105:1095–105.
26. Warner B, Johnston E, Arenas-Hernandez M, Marinaki A, Irving P, Sanderson J. A practical guide to thiopurine prescribing and monitoring in IBD. *Frontline Gastroenterol* 2018;9:10–5.
27. Seinen ML, van Asseldonk DP, Mulder CJJ, de Boer NKH. Dosing 6-thioguanine in inflammatory bowel disease: Expert-based guidelines for daily practice. *J Gastrointest Liver Dis* 2010;19:291–4.
28. Teml A, Schaeffeler E, Herrlinger K, Klotz U, Schwab M. Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: Clinical Pharmacology and Implication of Pharmacogenetically Guided Dosing. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:187–208.
29. Chaparro M, Ordás I, Cabré E, Garcia-Sanchez V, Bastida G, Peñalva M, et al. Safety of thiopurine therapy in inflammatory bowel disease: Long-term follow-up study of 3931 patients. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1404–10.
30. Van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ, Mays DC, Tremaine WJ, Mahoney DW, et al. Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut* 1996;39:63–8.
31. Derijks L, Wong D. Pharmacogenetics of Thiopurines in Inflammatory Bowel Disease.

- Curr Pharm Des 2010;16:145–54.
32. DailyMed – IMURAN – azathioprine tablet. Preuzeto s: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=606101a0-6244-7eff-e053-2a91aa0acadd> (pristupljeno: 22. veljače 2022.)
 33. Od lind B, Hartvig P, Lindstrom B, Lonnerhold G, Tufveson G, Grefberg N. Serum azathioprine and 6-mercaptopurine levels and immunosuppressive activity after azathioprine in uremic patients. *Int J Immunopharmacol* 1986;8:1–11.
 34. Gardiner SJ, Gearry RB, Burt MJ, Ding SL, Barclay ML. Severe hepatotoxicity with high 6-methylmercaptopurine nucleotide concentrations after thiopurine dose escalation due to low 6-thioguanine nucleotides. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:1238–42.
 35. Nygaard U, Toft N, Schmiegelow K. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:274–81.
 36. Pizzorno G, Diasio RB, Cheng Y-C. Purine Analogs. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine* 6th Edition. BC Decker; 2003.
 37. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;56:23–46.
 38. Andoh A, Tsujikawa T, Ban H, Hashimoto T, Bamba S, Ogawa A, et al. Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1373–7.
 39. Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR, Lewis JD. Association of 6-Thioguanine Nucleotide Levels and Inflammatory Bowel Disease Activity: A Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2006;130:1047–53.
 40. Moreau AC, Paul S, Del Tedesco E, Rinaudo-Gaujous M, Boukhadra N, Genin C, et al. Association between 6-thioguanine nucleotides levels and clinical remission in inflammatory disease: A meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:464–71.
 41. Ford LT, Berg JD. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting

- thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *J Clin Pathol* 2010;63:288–95.
42. Karran P. Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *Br Med Bull* 2006;79–80:153–70.
 43. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:753–67.
 44. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap* 2010;154:103–16.
 45. Moon W, Loftus E V. Review article: Recent advances in pharmacogenetics and pharmacokinetics for safe and effective thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;43:863–83.
 46. Gilissen LPL, Derijks LJJ, Bos LP, Verhoeven HMJM, Bus PJ, Hooymans PM, et al. Some cases demonstrating the clinical usefulness of therapeutic drug monitoring in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:705–10.
 47. Oselin K, Anier K. Inhibition of human thiopurine S-methyltransferase by various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: A mechanism for possible drug interactions. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1452–4.
 48. Blaker PA, Arenas-Hernandez M, Smith MA, Shobowale-Bakre EA, Fairbanks L, Irving PM, et al. Mechanism of allopurinol induced TPMT inhibition. *Biochem Pharmacol* 2013;86:539–47.
 49. Kostić DA, Dimitrijević DS, Stojanović GS, Palić IR, Dordević AS, Ickovski JD. Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition. *J Chem* 2015;2015:1–8.
 50. Bortolotti M, Polito L, Battelli MG, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks. *Redox Biol* 2021;41:101882.
 51. de Lemos ML, Hamata L, Jennings S, Leduc T. Interaction between mercaptopurine and milk. *J Oncol Pharm Pract* 2007;13:237–40.
 52. Zimm S, Collins JM, O'Neill D, Chabner BA, Poplack DG. Inhibition of first-pass metabolism in cancer chemotherapy: Interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol.

- Clin Pharmacol Ther 1983;34:810–7.
53. Duley JA, Florin THJ. Thiopurine Therapies: Problems, Complexities, and Progress With Monitoring Thioguanine Nucleotides. *Ther Drug Monit* 2005;27:647–54.
 54. Burr NE, Hull MA, Subramanian V. Folic Acid Supplementation May Reduce Colorectal Cancer Risk in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Gastroenterol* 2017;51:247–53.
 55. Lucock M. Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000;71:121–38.
 56. Hwang C, Ross V, Mahadevan U. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease: From A to zinc. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1961–81.
 57. Lucendo AJ, De Rezende LC. Importance of nutrition in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009;15:2081–8.
 58. Rossi RE, Whyand T, Murray CD, Hamilton MI, Conte D, Caplin ME. The role of dietary supplements in inflammatory bowel disease: A systematic review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2016;28:1357–64.
 59. Pan Y, Liu Y, Guo H, Jabir MS, Liu X, Cui W, et al. Associations between folate and vitamin B12 levels and inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Nutrients* 2017;9:1–15.
 60. Papa A, Stefano V, Danese S, Chiusolo P, Persichilli S, Casorelli I, et al. Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2677–82.
 61. de Lima A, Zelinkova Z, Mulders AGMGJ, van der Woude CJ. Preconception Care Reduces Relapse of Inflammatory Bowel Disease During Pregnancy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:1285–92.
 62. Selinger CP, Nelson-Piercy C, Fraser A, Hall V, Limdi J, Smith L, et al. IBD in pregnancy: Recent advances, practical management. *Frontline Gastroenterol* 2021;12:214–24.
 63. Osterberg L, Blaschke T. Adherence to medication. *N Engl J Med* 2005;353:487–97.

64. Wheeler KJ, Roberts ME, Neiheisel MB. Medication adherence part two: Predictors of nonadherence and adherence. *J Am Assoc Nurse Pract* 2014;26:225–32.
65. Claxton AJ, Cramer J, Pierce C. A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance. *Clin Ther* 2001;23:1296–310.
66. Ediger JP, Walker JR, Graff L, Lix L, Clara I, Rawsthorne P, et al. Predictors of medication adherence in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1417–26.
67. Selinger CP, Robinson A, Leong RW. Clinical impact and drivers of non-adherence to maintenance medication for inflammatory bowel disease. *Expert Opin Drug Saf* 2011;10:863–70.
68. Horne R, Parham R, Driscoll R, Robinson A. Patients' attitudes to medicines and adherence to maintenance treatment in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:837–44.
69. Jackson CA, Clatworthy J, Robinson A, Horne R. Factors associated with non-adherence to oral medication for inflammatory bowel disease: A systematic review. *Am J Gastroenterol* 2010;105:525–39.
70. Kane S, Huo D, Aikens J, Hanauer S. Medication nonadherence and the outcomes of patients with quiescent ulcerative colitis. *Am J Med* 2003;114:39–43.
71. Testa A, Castiglione F, Nardone OM, Colombo GL. Adherence in ulcerative colitis: An overview. *Patient Prefer Adherence* 2017;11:297–303.
72. Desai D, Wang J, Wen H, Li X, Timmins P. Formulation design, challenges, and development considerations for fixed dose combination (FDC) of oral solid dosage forms. *Pharm Dev Technol* 2013;18:1265–76.
73. Moon C, Oh E. Rationale and strategies for formulation development of oral fixed dose combination drug products. *J Pharm Investig* 2016;46:615–31.
74. Castellano JM, Sanz G, Peñalvo JL, Bansilal S, Fernández-Ortiz A, Alvarez L, et al. A polypill strategy to improve adherence. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2071–82.
75. Thom S, Poulter N, Field J, Patel A, Prabhakaran D, Stanton A, et al. Effects of a fixed-dose combination strategy on adherence and risk factors in patients with or at

- high risk of CVD: The UMPIRE randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc* 2013;310:918–29.
76. Pan F, Chernew ME, Fendrick AM. Impact of fixed-dose combination drugs on adherence to prescription medications. *J Gen Intern Med* 2008;23:611–4.
77. Ramjan R, Calmy A, Vitoria M, Mills EJ, Hill A, Cooke G, et al. Systematic review and meta-analysis: Patient and programme impact of fixed-dose combination antiretroviral therapy. *Trop Med Int Heal* 2014;19:501–13.
78. Wan X, Ma P, Zhang X. A promising choice in hypertension treatment: Fixed-dose combinations. *Asian J Pharm Sci* 2014;9:1–7.
79. Chadha R, Bhandari S. Drug-excipient compatibility screening-Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *J Pharm Biomed Anal* 2014;87:82–97.
80. Clas SD, Dalton CR, Hancock BC. Differential scanning calorimetry: Applications in drug development. *Pharm Sci Technol Today* 1999;2:311–20.
81. Nesseem DI. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *J Pharm Biomed Anal* 2001;26:387–99.
82. Peres-Filho MJ, Gaeti MPN, De Oliveira SR, Marreto RN, Lima EM. Thermoanalytical investigation of olanzapine compatibility with excipients used in solid oral dosage forms. *J Therm Anal Calorim* 2011;104:255–60.
83. Marini A, Berbenni V, Pegoretti M, Bruni G, Cofrancesco P, Sinistri C, et al. Drug-excipient compatibility studies by physico-chemical techniques: The case of indomethacin. *J Therm Anal Calorim* 2003;73:529–45.
84. Niguram P, Polaka SN, Rathod R, Kalia K, Kate AS. Update on compatibility assessment of empagliflozin with the selected pharmaceutical excipients employed in solid dosage forms by thermal, spectroscopic and chromatographic techniques. *Drug Dev Ind Pharm* 2020;46:209–18.
85. De Gomes ECL, Mussel WN, Resende JM, Fialho SL, Barbosa J, Yoshida MI. Chemical interactions study of antiretroviral drugs efavirenz and lamivudine concerning the development of stable fixed-dose combination formulations for AIDS treatment. *J Braz Chem Soc* 2013;24:573–9.

86. Bharate SS, Bharate SB, Bajaj AN. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: A comprehensive review. *J Excipients Food Chem* 2010;1:3–26.
87. Rojek B, Wesolowski M. DSC supported by factor analysis as a reliable tool for compatibility study in pharmaceutical mixtures. *J Therm Anal Calorim* 2019;138:4531–9.
88. Júlio TA, Zâmara IF, Garcia JS, Trevisan MG. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC-UV. *J Therm Anal Calorim* 2013;111:2037–44.
89. Liltorp K, Larsen TG, Willumsen B, Holm R. Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods. *J Pharm Biomed Anal* 2011;55:424–8.
90. Pani NR, Nath LK, Acharya S, Bhuniya B. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. *J Therm Anal Calorim* 2012;108:219–26.
91. Verma RK, Garg S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. *J Pharm Biomed Anal* 2005;38:633–44.
92. Verma RK, Garg S. Compatibility studies between isosorbide mononitrate and selected excipients used in the development of extended release formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2004;35:449–58.
93. Shete H, Patravale V. Long chain lipid based tamoxifen NLC. Part I: Preformulation studies, formulation development and physicochemical characterization. *Int J Pharm* 2013;454:573–83.
94. Joshi B V., Patil VB, Pokharkar VB. Compatibility studies between carbamazepine and tablet excipients using thermal and non-thermal methods. *Drug Dev Ind Pharm* 2002;28:687–94.
95. Bezerra GSN, Pereira MAV, Ostrosky EA, Barbosa EG, de Moura M de FV, Ferrari M, et al. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. *J Therm Anal Calorim* 2017;127:1683–91.

96. Rojek B, Wesolowski M, Suchacz B. Detection of compatibility between baclofen and excipients with aid of infrared spectroscopy and chemometry. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2013;116:532–8.
97. Rojek B, Wesolowski M. Fourier transform infrared spectroscopy supported by multivariate statistics in compatibility study of atenolol with excipients. *Vib Spectrosc* 2016;86:190–7.
98. Petruševska V, Lasić K, Mornar A. Compatibility investigation for a new antituberculous fixed dose combination with an adequate drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2020;46:1298–307.
99. Rajaram S, Vemuri VD, Natham R. Ascorbic acid improves stability and pharmacokinetics of rifampicin in the presence of isoniazid. *J Pharm Biomed Anal* 2014;100:103–8.
100. Klein S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *AAPS J* 2010;12:397–406.
101. Ali F, Kumar R, Sahu PL, Singh GN. Physicochemical characterization and compatibility study of roflumilast with various pharmaceutical excipients. *J Therm Anal Calorim* 2017;130:1627–41.
102. Monajjemzadeh F, Hassanzadeh D, Valizadeh H, Siahi-Shadbad MR, Mojarad JS, Robertson TA, et al. Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73:404–13.
103. International Conference on Harmonization. Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. Geneva: ICH Secretariat; 2005.
104. World Health Organization. Annex 5 Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products. *WHO Tech Rep Ser* 2005;94:142.
105. Eardley S, Bishop FL, Prescott P, Cardini F, Brinkhaus B, Santos-Rey K, et al. A systematic literature review of complementary and alternative medicine prevalence in EU. *Forsch Komplementarmed* 2012;19:18–28.
106. Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA. Content versus label claims in ephedra-

- containing dietary supplements. *Am J Heal Pharm* 2000;57:963–9.
107. Gilroy CM, Steiner JF, Byers T, Shapiro H, Georgian W. Echinacea and Truth in Labeling. *Arch Intern Med* 2003;163:699–704.
108. Mornar A, Buhač T, Amidžić Klarić D, Klarić I, Sertić M, Nigović B. Multi-targeted Screening of Phytoestrogens in Food, Raw Material, and Dietary Supplements by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal Methods* 2020;13:482–95.
109. Yoshida N, Numano M, Nagasaka Y, Ueda K, Tsuboi H, Tanimoto T, et al. Study on health hazards through medicines purchased on the Internet: A cross-sectional investigation of the quality of anti-obesity medicines containing crude drugs as active ingredients. *BMC Complement Altern Med* 2015;15:430.
110. Vaclavik L, Krynitsky AJ, Rader JJ. Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: A review. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:6767–90.
111. Triantafyllidi A, Xanthos T, Papalois A, Triantafyllidis JK. Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 2015;28:210–20.
112. Ng SC, Lam YT, Tsoi KKF, Chan FKL, Sung JJY, Wu JCY. Systematic review: The efficacy of herbal therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:854–63.
113. Langhorst J, Wulfert H, Lauche R, Klose P, Cramer H, Dobos GJ, et al. Systematic review of complementary and alternative medicine treatments in inflammatory bowel diseases. *J Crohn's Colitis* 2015;9:86–106.
114. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *J Funct Foods* 2015;18:820–97.
115. Hewlings S, Kalman D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods* 2017;6:92.
116. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, et al. Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Randomized, Multicenter, Double-Blind,

- Placebo-Controlled Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1502–6.
117. Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has Bright Prospects for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Curr Pharm Des* 2009;15:2087–94.
 118. Poeckel D, Werz O. Boswellic Acids: Biological Actions and Molecular Targets. *Curr Med Chem* 2006;13:3359–69.
 119. Gerhardt H, Seifert F, Buvari P, Vogelsang H, Repges R. Therapie des aktiven morbus Crohn mit dem Boswellia-serrata-extrakt H 15. *Z Gastroenterol* 2001;39:11–7.
 120. Holtmeier W, Zeuzem S, Prei J, Kruis W, Böhm S, Maaser C, et al. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of Boswellia serrata in maintaining remission of Crohn's disease: Good safety profile but lack of efficacy. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:573–82.
 121. Jayakumar T, Hsieh C-Y, Lee J-J, Sheu J-R. Experimental and clinical pharmacology of Andrographis paniculata and its major bioactive phytoconstituent andrographolide. *Evidence-based Complement Altern Med* 2013;2013:846740.
 122. Rafi M, Devi AF, Syafitri UD, Heryanto R, Suparto IH, Amran MB, et al. Classification of Andrographis paniculata extracts by solvent extraction using HPLC fingerprint and chemometric analysis. *BMC Res Notes* 2020;13:56.
 123. Sandborn WJ, Targan SR, Byers VS, Rutty DA, Mu H, Zhang X, et al. Andrographis paniculata extract (HMPL-004) for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:90–8.
 124. Tang T, Targan SR, Li ZS, Xu C, Byers VS, Sandborn WJ. Randomised clinical trial: Herbal extract HMPL-004 in active ulcerative colitis - A double-blind comparison with sustained release mesalazine. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:194–202.
 125. Mannel M. Drug interactions with St John's Wort: Mechanisms and clinical implications. *Drug Saf* 2004;27:773–97.
 126. Kane GC, Lipsky JJ. Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc* 2000;75:933–42.
 127. Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, DeCrescenzo GA, Devraj R V., et al. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes.

- Bioorganic Med Chem Lett 2008;18:4872–5.
128. Leeson PD, Springthorpe B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:881–90.
 129. Kesarwani K, Gupta R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3:253–66.
 130. Bhardwaj RK, Glaeser H, Becquemont L, Klotz U, Gupta SK, Fromm MF. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:645–50.
 131. Reen RK, Roesch SF, Kiefer F, Wiebel FJ, Singh J. Piperine impairs cytochrome P4501A1 activity by direct interaction with the enzyme and not by down regulation of CYP1A1 gene expression in the rat hepatoma 5L cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:562–9.
 132. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, editors. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. London, United Kingdom: Pharmaceutical Press; 2009.
 133. International Conference on Harmonization. *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, Q2 (R1)*. Geneva: ICH Secretariat; 2005.
 134. Rojek B, Wesolowski M. FTIR and TG analyses coupled with factor analysis in a compatibility study of acetazolamide with excipients. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2019;208:285–93.
 135. Valko K, Nunhuck S, Bevan C, Abraham MH, Reynolds DP. Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity. *J Pharm Sci* 2003;92:2236–48.
 136. Calibration mixtures. Preuzeto s: <https://www.bio-mimetic-chromatography.com/calibration-mixtures> (pristupljeno: 22. veljače 2022.)
 137. Cherrah Y, Zini R, Falconnet JB, Desage M, Tillement JP, Brazier JL. Study of deuterio-isotopomer-induced inhibition of caffeine and phenobarbitone binding to human serum albumin. *Biochem Pharmacol* 1988;37:1311–5.
 138. Judis J. Binding of Codeine, Morphine, and Methadone to Human Serum Proteins. *J*

- Pharm Sci 1977;66:802–6.
139. Vuignier K, Guilleme D, Veuthey JL, Carrupt PA, Schappler J. High performance affinity chromatography (HPAC) as a high-throughput screening tool in drug discovery to study drug-plasma protein interactions. *J Pharm Biomed Anal* 2013;74:205–12.
 140. Lázaro E, Lowe PJ, Briand X, Faller B. New approach to measure protein binding based on a parallel artificial membrane assay and human serum albumin. *J Med Chem* 2008;51:2009–17.
 141. Valko K, Nunhuck S, Hill AP. Estimating Unbound Volume of Distribution and Tissue Binding by In Vitro HPLC-Based Human Serum Albumin and Immobilised Artificial Membrane-Binding Measurements. *J Pharm Sci* 2011;100:849–62.
 142. Liegler DG, Henderson ES, Hahn MA, Oliverio VT. The effect of organic acids on renal clearance of methotrexate in man. *Clin Pharmacol Ther* 1969;10:849–57.
 143. Forrey AW, Kimpel B, Blair AD, Cutler RE. Furosemide concentrations in serum and urine, and its binding by serum proteins as measured fluorometrically. *Clin Chem* 1974;20:152–8.
 144. Tong Z, Joseph KS, Hage DS. Detection of heterogeneous drug-protein binding by frontal analysis and high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr A* 2011;1218:8915–24.
 145. Hage DS. High-performance affinity chromatography: A powerful tool for studying serum protein binding. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2002;768:3–30.
 146. Tao P, Poddar S, Sun Z, Hage DS, Chen J. Analysis of solute-protein interactions and solute-solute competition by zonal elution affinity chromatography. *Methods* 2018;146:3–11.
 147. Harboe M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin Lab Invest* 1959;11:66–70.
 148. Xin HW, Fischer C, Schwab M, Klotz U. Thiopurine S-methyltransferase as a target for drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:395–8.
 149. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors : Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Hum*

- Physiol 2006;58:87–114.
150. Mediatelly Baza Lijekova. Preuzeto s: <https://mediatelly.co/hr> (pristupljeno: 22. veljače 2022.)
 151. Lavor EP, Navarro MVM, Freire FD, Aragão CFS, Raffin FN, Barbosa EG, et al. Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs-excipient compatibility. *J Therm Anal Calorim* 2014;115:2303–9.
 152. Singh BN, Kim KH. Characterization and relevance of physicochemical interactions among components of a novel multiparticulate formulation for colonic delivery. *Int J Pharm* 2007;341:143–51.
 153. Covaci OI, Samohvalov D, Manta CM, Buhalteanu L, Barbatu A, Baibarac M, et al. Novel anhydrous solid-state form of Azathioprine: The assessing of crystal structure by powder X-Ray diffraction, Infrared Absorption Spectroscopy and Raman scattering. *J Mol Struct* 2019;1178:702–10.
 154. British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia* 2019. London, United Kingdom: The Stationery Office; 2019.
 155. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. *J Pharm Anal* 2014;4:159–65.
 156. Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, Acherar S, Azaïs H, Mordon S, et al. Stability of folic acid under several parameters. *Eur J Pharm Sci* 2016;93:419–30.
 157. Thomas AH, Suárez G, Cabrerizo FM, Martino R, Capparelli AL. Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions. *J Photochem Photobiol A Chem* 2000;135:147–54.
 158. Wilson WP, Benezra SA. Azathioprine. In: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drugs Substances*. New York: Academic Press, 1981:29–53.
 159. Mura P, Faucci MT, Manderioli A, Bramanti G, Ceccarelli L. Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy. *J Pharm Biomed Anal* 1998;18:151–63.
 160. Malan CEP, De Villiers MM, Lötter AP. Application of differential scanning

- calorimetry and high performance liquid chromatography to determine the effects of mixture composition and preparation during the evaluation of niclosamide-excipient compatibility. *J Pharm Biomed Anal* 1997;15:549–57.
161. Bernardi LS, Oliveira PR, Murakami FS, Silva MAS, Borgmann SHM, Cardoso SG. Characterization of venlafaxine hydrochloride and compatibility studies with pharmaceutical excipients. *J Therm Anal Calorim* 2009;97:729–33.
 162. Grimm M, Koziol M, Kühn JP, Weitschies W. Interindividual and intraindividual variability of fasted state gastric fluid volume and gastric emptying of water. *Eur J Pharm Biopharm* 2018;127:309–17.
 163. European Medicines Agency. Xaluprine (previously Mercaptopurine Nova Labs). Preuzeto s: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xaluprine> (pristupljeno: 22. veljače 2022.)
 164. Franklin SJ, Younis US, Myrdal PB. Estimating the Aqueous Solubility of Pharmaceutical Hydrates. *J Pharm Sci* 2016;105:1914–9.
 165. Kersten KM, Matzger AJ. Improved pharmacokinetics of mercaptopurine afforded by a thermally robust hemihydrate. *Chem Commun* 2016;52:5281–4.
 166. Wang Y, Luo YH, Zhao J, Sun BW. Selection of excipients for dispersible tablets of itraconazole through the application of thermal techniques and Raman spectroscopy. *J Therm Anal Calorim* 2014;115:2391–400.
 167. Council of Europe. European Pharmacopoeia 10.3. Preuzeto s: <https://pheur.edqm.eu/app/10-3/search/> (pristupljeno: 22. veljače 2022.)
 168. Yang M, Fazio S, Munch D, Drumm P. Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column. *J Chromatogr A* 2005;1097:124–9.
 169. Rana S, Shetake NG, Barick KC, Pandey BN, Salunke HG, Hassan PA. Folic acid conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Dalt Trans* 2016;45:17401–8.
 170. Büchele B, Zugmaier W, Simmet T. Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid

- chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2003;791:21–30.
171. Ganzera M, Khan IA. A reversed phase high performance liquid chromatography method for the analysis of boswellic acids in *Boswellia serrata*. *Planta Med* 2001;67:778–80.
172. United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopoeia 42 - National Formulary 37. Rockville, MD, USA, United States Pharmacopoeial Convention; 2018.
173. Skiba MB, Luis PB, Alfarara C, Billheimer D, Schneider C, Funk JL. Curcuminoid content and safety-related markers of quality of turmeric dietary supplements sold in an urban retail marketplace in the United States. *Mol Nutr Food Res* 2018;62:1800143.
174. Rafi M, Wulansari L, Heryanto R, Darusman LK, Lim LW, Takeuchi T. Curcuminoid's Content and Fingerprint Analysis for Authentication and Discrimination of *Curcuma xanthorrhiza* from *Curcuma longa* by High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector. *Food Anal Methods* 2015;8:2185–93.
175. Peram MR, Jalalpure SS, Joshi SA, Palkar MB, Diwan P V. A single robust RP-HPLC analytical method for quantification of curcuminoids in commercial turmeric products, Ayurvedic medicines, and nanovesicular systems. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2017;40:487–98.
176. Pharmaceutical and Medical Devices Agency. Japanese Pharmacopoeia. 16th Ed. Tokyo, Japan. Pharmaceutical and Medical Devices Agency; 2016.
177. Pholphana N, Rangkadilok N, Thongnest S, Ruchirawat S, Ruchirawat M, Satayavivad J. Determination and variation of three active diterpenoids in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. *Phytochem Anal* 2004;15:365–71.
178. Roy NK, Parama D, Banik K, Bordoloi D, Devi AK, Thakur KK, et al. An update on pharmacological potential of boswellic acids against chronic diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:4101.
179. Abdel-Tawab M, Werz O, Schubert-Zsilavecz M. *Boswellia serrata*: An overall assessment of in vitro, preclinical, pharmacokinetic and clinical data. *Clin Pharmacokinet* 2011;50:349–69.

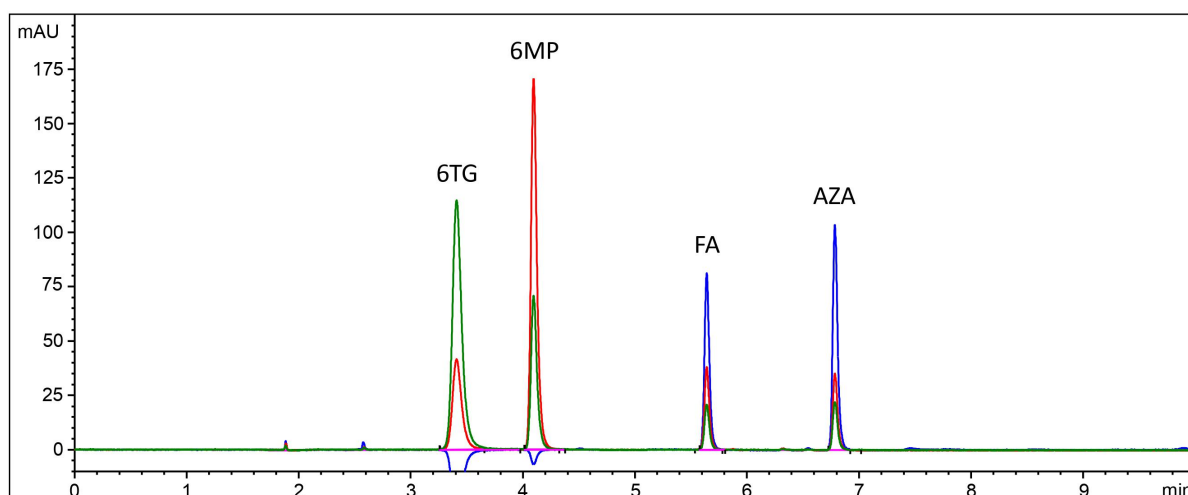
180. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. *AAPS J* 2013;15:195–218.
181. Gurley BJ, Fifer EK, Gardner Z. Pharmacokinetic herb-drug interactions (Part 2): Drug interactions involving popular botanical dietary supplements and their clinical relevance. *Planta Med* 2012;78:1490–514.
182. Coon JT, Ernst E. *Andrographis paniculata* in the treatment of upper respiratory tract infections: A systematic review of safety and efficacy. *Planta Med* 2004;70:293–8.
183. Sochacka J, Pawełczak B, Sobczak A. Application of molecular docking to study 6-Mercaptopurine-binding to human serum albumin. *Ann Acad Medicae Silesiensis* 2011;65:41–8.
184. Sochacka J, Baran W. The investigation of the binding of 6-mercaptopurine to site I on human serum albumin. *Protein J* 2012;31:689–702.
185. Yeggoni DP, Kuehne C, Rachamallu A, Subramanyam R. Elucidating the binding interaction of andrographolide with the plasma proteins: Biophysical and computational approach. *RSC Adv* 2017;7:5002–12.
186. Yeggoni DP, Rachamallu A, Kallubai M, Subramanyam R. Cytotoxicity and comparative binding mechanism of piperine with human serum albumin and α -1-acid glycoprotein. *J Biomol Struct Dyn* 2015;33:1336–51.
187. Mandeville JS, Froehlich E, Tajmir-Riahi HA. Study of curcumin and genistein interactions with human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal* 2009;49:468–74.
188. Panossian A, Hovhannisyan A, Mamikonyan G, Abrahamian H, Hambardzumyan E, Gabrielian E, et al. Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in rats and human. *Phytomedicine* 2000;7:351–64.
189. Sethi P, Dua VK, Mohanty S, Mishra SK, Jain R, Edwards G. Development and validation of a reversed phase HPLC method for simultaneous determination of curcumin and piperine in human plasma for application in clinical pharmacological studies. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2009;32:2961–74.
190. Kunati SR, Yang S, William BM, Xu Y. An LC–MS/MS method for simultaneous

- determination of curcumin, curcumin glucuronide and curcumin sulfate in a phase II clinical trial. *J Pharm Biomed Anal* 2018;156:189–98.
191. Oselin K, Anier K, Tamm R, Kallassalu K, Mäeorg U. Determination of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) activity by comparing various normalization factors: Reference values for Estonian population using HPLC-UV assay. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2006;834:77–83.
192. Menor C, Fueyo JA, Escribano O, Cara C, Fernández-Moreno MD, Román ID, et al. Determination of thiopurine methyltransferase activity in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography: Comparison with the radiochemical method. *Ther Drug Monit* 2001;23:536–41.
193. Indjova D, Shipkova M, Atanasova S, Niedmann PD, Armstrong VW, Svinarov D, et al. Determination of thiopurine methyltransferase phenotype in isolated human erythrocytes using a new simple nonradioactive HPLC method. *Ther Drug Monit* 2003;25:637–44.
194. Ford LT, Berg JD. Determination of thiopurine S-methyltransferase activity in erythrocytes using 6-thioguanine as substrate and a non-extraction liquid chromatographic technique. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2003;798:111–5.
195. Boulieu R, Sauviat M, Dervieux T, Bertocchi M, Mornex JF. Phenotype determination of thiopurine methyltransferase in erythrocytes by HPLC. *Clin Chem* 2001;47:956–8.
196. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1994;661:25–33.
197. Brooks HB, Geeganage S, Kahl SD, Montrose C, Sittampalam S, Smith MC, et al. Basics of Enzymatic Assays for HTS. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, editors. *Assay Guidance Manual* Bethesda: Eli Lilly & Company; 2012:1–12.
198. Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, Morris D, Lindsay J, Gilshenan K, et al. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:973–83.
199. Winter JW, Gaffney D, Shapiro D, Spooner RJ, Marinaki AM, Sanderson JD, et al.

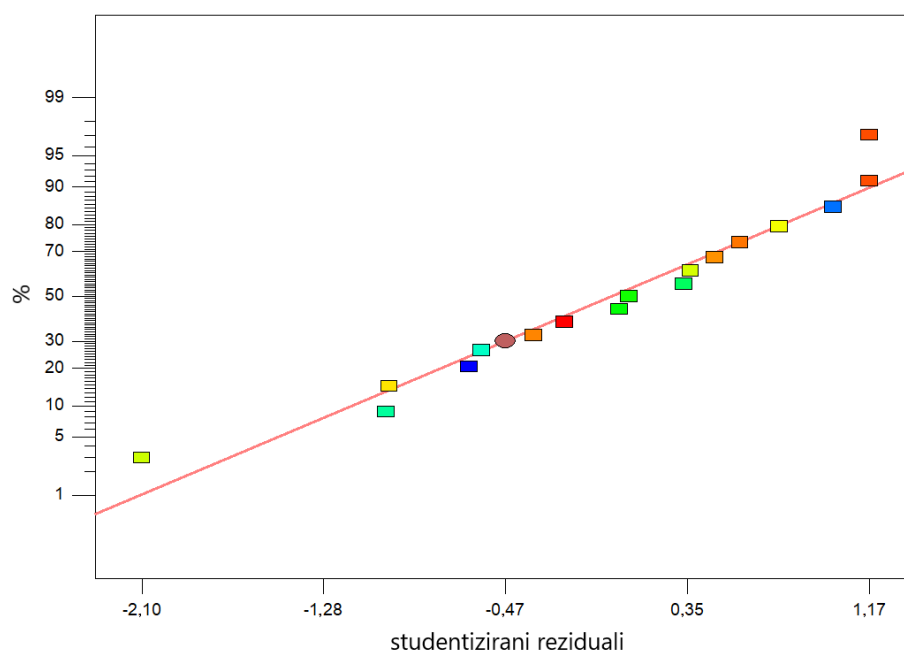
- Assessment of thiopurine methyltransferase enzyme activity is superior to genotype in predicting myelosuppression following azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:1069–77.
200. Iwase M, Kurata N, Ehana R, Nishimura Y, Masamoto T, Yasuhara H. Evaluation of the effects of hydrophilic organic solvents on CYP3A-mediated drug-drug interaction in vitro. *Hum Exp Toxicol* 2006;25:715–21.
 201. Misuri L, Cappiello M, Balestri F, Moschini R, Barracco V, Mura U, et al. The use of dimethylsulfoxide as a solvent in enzyme inhibition studies: the case of aldose reductase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017;32:1152–8.
 202. Gawlik-Dziki U. Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase, xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents. *LWT - Food Sci Technol* 2012;47:138–46.
 203. Lin FL, Wu SJ, Lee SC, Ng LT. Antioxidant, Antioedema and Analgesic Activities of *Andrographis paniculata* Extracts and their Active Constituent Andrographolide. *Phyther Res* 2009;23:958–64.
 204. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* 2015;59:1–41.
 205. Hans Bisswanger, editor. *Practical Enzymology*, 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2011.
 206. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA. The IC₅₀ Concept Revisited. *Curr Top Med Chem* 2012;12:1282–90.
 207. Cheng Y-C, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22:3099–108.
 208. Low M, Khoo CS, Münch G, Govindaraghavan S, Sucher NJ. An in vitro study of anti-inflammatory activity of standardised *Andrographis paniculata* extracts and pure andrographolide. *BMC Complement Altern Med* 2015;15:18.
 209. Chen LX, He H, Xia GY, Zhou KL, Qiu F. A new flavonoid from the aerial parts of *Andrographis paniculata*. *Nat Prod Res* 2014;28:138–43.
 210. Nessa F, Ismail Z, Mohamed N. Xanthine oxidase inhibitory activities of extracts and

- flavonoids of the leaves of *Blumea balsamifera*. *Pharm Biol* 2010;48:1405–12.
211. Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:1787–90.
212. Lin S, Zhang G, Liao Y, Pan J, Gong D. Dietary Flavonoids as Xanthine Oxidase Inhibitors: Structure-Affinity and Structure-Activity Relationships. *J Agric Food Chem* 2015;63:7784–94.
213. Lin C-M, Chen C-S, Chen C-T, Liang Y-C, Lin J-K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:167–72.
214. Bachmann K. Inhibition Constants, Inhibitor Concentrations and the Prediction of Inhibitory Drug Drug Interactions: Pitfalls, Progress and Promise. *Curr Drug Metab* 2006;7:1–14.
215. Bachmann KA, Lewis JD. Predicting inhibitory drug-drug interactions and evaluating drug interaction reports using inhibition constants. *Ann Pharmacother* 2005;39:1064–72.

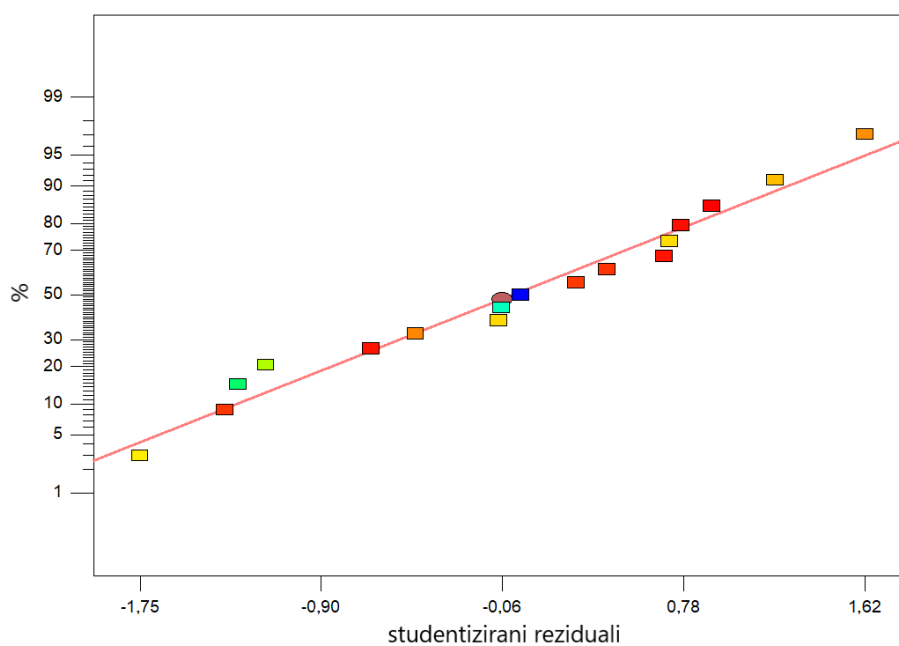
7. PRILOG



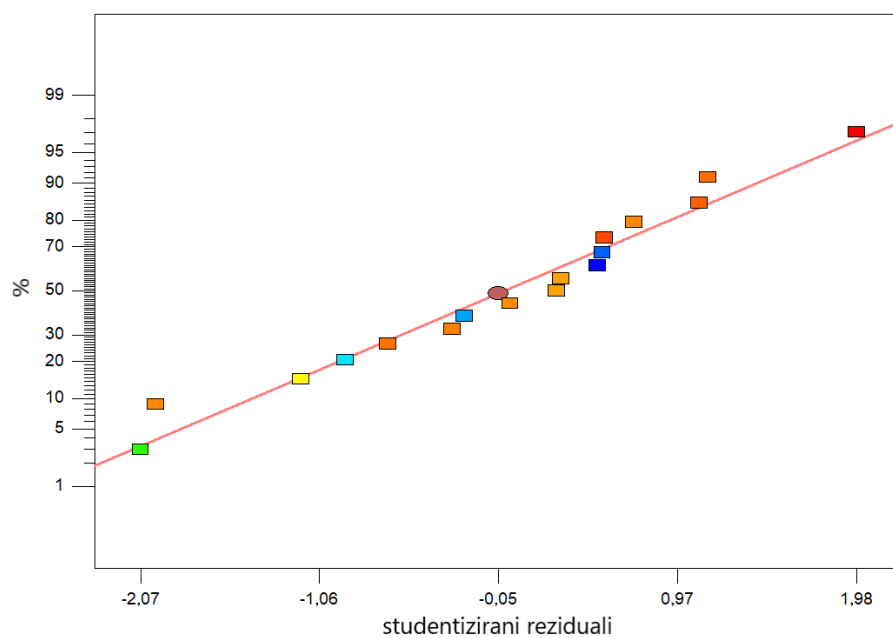
Slika P1. Kromatogram smjese standardnih otopina 6TG, 6MP, FA i AZA (10 $\mu\text{g/mL}$). Plavo: 280/360 nm, crveno: 320/400 nm, zeleno: 343/400 nm



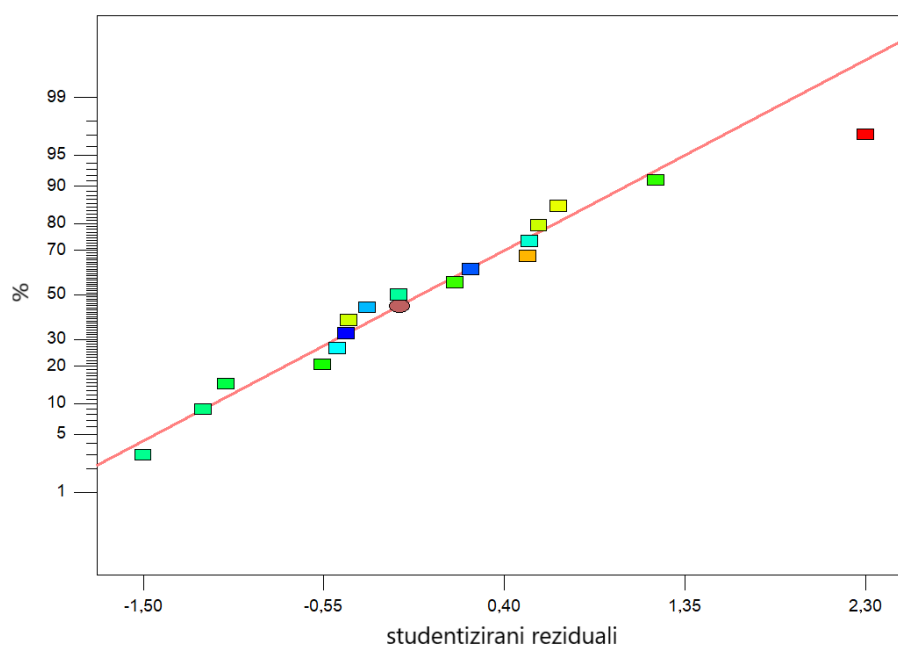
Slika P2. Normalizirani graf vjerojatnosti reziduala za model koji opisuje prinos kurkuminoida



Slika P3. Normalizirani graf vjerojatnosti reziduala za model koji opisuje prinos andrografolida



Slika P4. Normalizirani graf vjerojatnosti reziduala za model koji opisuje prinos bosveličnih kiselina



Slika P5. Normalizirani graf vjerojatnosti reziduala za model koji opisuje prinos piperina

Tablica P1. Validacijski podaci metode za istovremeno određivanje 6TG, 6MP, FA i AZA

analit	radno područje (µg/mL)	jednadžba pravca	koeficijent korelacije	ponovljivost RSD (% $n = 6$) ^a	srednja preciznost RSD (% $n = 9$) ^a	analitički prinos $\pm$ RSD ($n = 3$)		
						niska razina 20/20/2,5/20 µg/mL ^b	srednja razina 40/50/10/50 µg/mL ^b	visoka razina 80/100/20/100 µg/mL ^b
6TG	5,0–80,0	$y = 74,97 x - 39,84$	0,9998	0,4	0,4	99,3 $\pm$ 1,2	100,5 $\pm$ 0,6	99,2 $\pm$ 0,1
6MP	5,0–100,0	$y = 68,90 x - 10,61$	0,9998	0,6	0,9	99,9 $\pm$ 1,1	100,8 $\pm$ 0,8	99,4 $\pm$ 0,1
FA	0,2–20,0	$y = 25,71 x - 1,41$	0,9999	0,6	1,2	99,2 $\pm$ 1,2	97,2 $\pm$ 0,4	100,5 $\pm$ 0,8
AZA	5,0–80,0	$y = 30,41 x + 4,83$	0,9999	0,7	0,8	100,2 $\pm$ 0,2	100,2 $\pm$ 0,7	99,8 $\pm$ 0,2

^aispitana na 10 µg/mL za sve analite, ^bredom 6TG/6MP/FA/AZA

Tablica P2. Analiza varijance modela koji opisuje prinos kurkuminoida

izvor varijacije	suma kvadrata odstupanja	stupnjevi slobode	srednji kvadrat odstupanja	<i>F</i> -vrijednost	<i>p</i> -vrijednost
model	2,60	7	0,37	35,82	<0,0001 ^a
A-udio etanola	0,45	1	0,45	43,43	0,0001
B-temperatura	0,30	1	0,30	28,80	0,0005
C-vrijeme	0,40	1	0,40	38,80	0,0002
AC	0,035	1	0,035	3,36	0,1002
BC	0,047	1	0,047	4,56	0,0614
A ²	1,31	1	1,31	126,15	<0,0001
B ²	0,032	1	0,032	3,05	0,1145
ostatak	0,093	9	0,010		
odstupanje od modela	0,019	5	$3,89 \times 10^{-3}$	0,21	0,9408 ^b
čista pogreška	0,074	4	0,018		
ukupno	2,69	16			

^aznačajan, ^bnije značajno**Tablica P3.** Analiza varijance modela koji opisuje prinos andrografolida

izvor varijacije	suma kvadrata odstupanja	stupnjevi slobode	srednji kvadrat odstupanja	<i>F</i> -vrijednost	<i>p</i> -vrijednost
model	19,10	7	2,73	18,30	0,0001 ^a
A-udio etanola	6,48	1	6,48	43,47	0,0001
B-temperatura	2,97	1	2,97	19,93	0,0016
C-vrijeme	2,10	1	2,10	14,09	0,0045
AB	3,30	1	3,30	22,10	0,0011
AC	0,43	1	0,43	2,90	0,1225
A ²	2,01	1	2,01	13,50	0,0051
B ²	1,59	1	1,59	10,69	0,0097
ostatak	1,34	9	0,15		
odstupanje od modela	0,73	5	0,15	0,96	0,5303 ^b
čista pogreška	0,61	4	0,15		
ukupno	20,44	16			

^aznačajan, ^bnije značajno

Tablica P4. Analiza varijance modela koji opisuje prinos bosveličnih kiselina

izvor varijacije	suma kvadrata odstupanja	stupnjevi slobode	srednji kvadrat odstupanja	F-vrijednost	p-vrijednost
model	9854,06	6	1642,34	72,32	<0,0001 ^a
A-udio etanola	7056,43	1	7056,43	310,73	<0,0001
B-temperatura	122,08	1	122,08	5,38	0,0429
C-vrijeme	195,08	1	195,08	8,59	0,0150
AC	123,29	1	123,29	5,43	0,0420
BC	134,63	1	134,63	5,93	0,0352
A ²	2222,56	1	2222,56	97,87	<0,0001
ostatak	227,10	10	22,71		
odstupanje od modela	166,14	6	27,69	1,82	0,2932 ^b
čista pogreška	60,96	4	15,24		
ukupno	10081,16	16			

^aznačajan, ^bnije značajno**Tablica P5.** Analiza varijance modela koji opisuje prinos piperina

izvor varijacije	suma kvadrata odstupanja	stupnjevi slobode	srednji kvadrat odstupanja	F-vrijednost	p-vrijednost
model	0,25	5	0,050	5,09	0,0117 ^a
A-udio etanola	0,062	1	0,062	6,29	0,0291
B-temperatura	0,018	1	0,018	1,88	0,1977
C-vrijeme	0,015	1	0,015	1,58	0,2350
BC	0,025	1	0,025	2,60	0,1351
A ²	0,13	1	0,13	13,09	0,0040
ostatak	0,11	11	9,80×10 ⁻³		
odstupanje od modela	0,025	7	3,63×10 ⁻³	0,18	0,9767 ^b
čista pogreška	0,082	4	0,021		
ukupno	0,36	16			

^aznačajan, ^bnije značajno

Tablica P6. Plackett-Burmanov dizajn ispitivanja robustnosti

standard	A: vrijeme sonikacije (min)	B: indikatorska varijabla 1	C: temperatura ekstrakcije (°C)	D: indikatorska varijabla 2	E: udio etanola u ekstrakcijskom sredstvu (% <i>V/V</i>)	F: indikatorska varijabla 3	G: protok mobilne faze (mL/min)	H: temperatura kolone (°C)	I: indikatorska varijabla 4	J: promjena valne duljine detekcije (nm) ^a	K: promjena gradijenta (%) ^a
12	27	-1	55	-1	77,5	-1	0,95	38,0	-1	-2	-1
1	33	-1	65	-1	77,5	1	1,05	42,0	-1	2	-1
8	33	1	65	1	77,5	-1	0,95	38,0	1	2	-1
16	30	0	60	0	81,5	0	1,00	40,0	0	0	0
3	33	1	55	-1	85,5	-1	1,05	38,0	-1	2	1
7	33	1	55	-1	77,5	1	0,95	42,0	1	-2	1
9	33	-1	65	1	85,5	1	0,95	38,0	-1	-2	1
6	27	-1	55	1	77,5	1	1,05	38,0	1	2	1
5	27	1	55	1	85,5	1	0,95	42,0	-1	2	-1
2	27	-1	65	-1	85,5	-1	0,95	42,0	1	2	1
13	30	0	60	0	81,5	0	1,00	40,0	0	0	0
10	27	1	65	-1	85,5	1	1,05	38,0	1	-2	-1
11	33	-1	55	1	85,5	-1	1,05	42,0	1	-2	-1
4	27	1	65	1	77,5	-1	1,05	42,0	-1	-2	1
14	30	0	60	0	81,5	0	1,00	40,0	0	0	0
15	30	0	60	0	81,5	0	1,00	40,0	0	0	0

^a promjena (nm ili % B u mobilnoj fazi) u odnosu na standardne uvjete metode

Tablica P7. Odazivi (prinosi i razlučivanja) u ispitivanju robustnosti

standard	prinos (mg analita/g smjese)										
	ANDR	NANDR	14-DANDR	PIP	BDMC	DMC	CUR	KBA	AKBA	ABA	BBA
12	7,73	1,13	3,18	6,88	1,92	1,47	3,59	0,44	3,94	8,29	30,07
1	6,86	0,75	2,78	6,72	1,75	1,39	3,43	0,36	3,26	4,93	19,07
8	7,11	0,87	2,88	6,77	1,73	1,45	3,62	0,42	3,68	6,11	21,09
16	7,33	1,06	2,93	6,98	1,87	1,44	3,55	0,40	3,53	6,12	23,58
3	6,77	0,72	2,65	6,27	1,63	1,33	3,40	0,36	3,29	5,31	19,17
7	7,81	1,06	3,16	6,88	1,91	1,44	3,52	0,44	3,94	7,66	30,46
9	7,69	0,98	3,12	6,54	1,77	1,43	3,58	0,43	3,96	8,45	30,52
6	6,53	0,68	2,60	5,89	1,73	1,31	3,26	0,35	3,14	5,05	18,40
5	7,14	0,83	2,94	6,97	1,83	1,43	3,53	0,39	3,59	5,53	21,23
2	7,40	0,86	3,05	6,93	1,75	1,40	3,53	0,39	3,59	5,49	21,07
13	7,28	1,00	2,93	6,85	1,80	1,41	3,48	0,38	3,53	6,05	23,50
10	6,80	0,89	2,82	6,27	1,69	1,33	3,25	0,40	3,55	7,32	27,56
11	6,75	0,82	2,75	6,05	1,72	1,31	3,15	0,38	3,48	6,89	27,46
4	7,08	0,73	2,93	6,23	1,77	1,32	3,22	0,40	3,54	6,94	27,74
14	7,23	0,97	2,92	6,92	1,85	1,41	3,48	0,39	3,59	6,20	24,09
15	7,14	0,93	2,84	6,80	1,71	1,37	3,38	0,40	3,56	6,10	23,53
R_s											
standard	ANDR	NANDR	14-DANDR	PIP	BDMC	DMC	CUR	KBA	AKBA	ABA	BBA
12	2,31	4,52	5,08	2,38	3,69	1,95	1,95	1,27	1,74	2,54	0,97
1	2,51	3,83	4,56	2,34	3,42	2,11	2,11	2,52	1,91	2,35	0,79
8	2,42	4,52	5,11	2,37	4,74	1,94	1,94	1,31	1,72	2,52	0,97
16	1,54	3,81	4,65	2,27	4,06	2,03	2,03	2,09	1,82	2,47	0,89
3	1,51	4,09	4,65	2,03	4,36	1,87	1,90	1,43	1,71	2,50	0,94
7	1,69	3,89	4,66	2,16	2,83	2,06	2,10	2,38	1,94	2,41	0,82
9	1,53	4,10	4,74	2,08	4,46	1,89	1,91	1,23	1,72	2,52	0,96
6	1,53	4,04	4,73	2,12	2,18	1,90	1,92	1,45	1,70	2,48	0,94
5	2,57	3,68	4,70	2,30	3,81	2,12	2,12	2,42	1,93	2,42	0,82
2	1,61	3,98	4,45	2,08	3,78	2,04	2,07	2,35	1,92	2,41	0,82
13	1,27	3,79	4,67	2,26	4,56	2,03	2,03	2,10	1,82	2,47	0,88
10	2,08	4,15	4,82	2,32	4,65	1,93	1,92	1,45	1,71	2,48	0,94
11	1,67	3,68	4,50	2,32	3,51	2,12	2,12	2,56	1,91	2,33	0,78
4	1,62	3,82	4,49	2,10	3,10	2,05	2,08	2,52	1,91	2,32	0,77
14	1,81	2,55	4,64	2,21	3,10	2,02	2,02	2,11	1,82	2,46	0,89
15	1,30	3,84	4,63	2,20	4,50	2,02	2,02	2,14	1,82	2,47	0,88

Tablica P8. Doprinos faktora modelu i procijenjene $E_{critical}$ vrijednosti

odaziv	A: vrijeme sonikacije (min)	B: indikatorska varijabla 1	C: temperatura ekstrakcije (°C)	D: indikatorska varijabla 2	E: udio etanola u ekstrakcijskom sredstvu (% v/v)	F: indikatorska varijabla 3	G: protok mobilne faze (mL/min)	H: temperatura kolone (°C)	I: indikatorska varijabla 4	J: promjena valne duljine detekcije (nm)	K: promjena gradijenta (%)	$E_{critical} (\alpha = 0,05)$	$E_{critical} (\alpha = 0,01)$
ANDR _{prinos}	0,051	-0,042	-0,004	-0,180	-0,010	-0,003	-0,680	0,068	-0,150	-0,340	0,150	0,254	0,446
NANDR _{prinos}	-0,012	0,005	-0,006	-0,060	-0,043	-0,013	-0,170	-0,011	-0,017	-0,170	-0,019	0,068	0,120
14-DANDR _{prinos}	-0,030	-0,014	0,007	-0,070	-0,033	-0,003	-0,300	0,059	-0,058	-0,180	0,026	0,099	0,174
PIP _{prinos}	0,010	0,064	0,062	-0,250	-0,055	0,019	-0,590	0,190	-0,130	0,120	-0,150	0,309	0,543
BDMC _{prinos}	-0,032	-0,013	-0,014	-0,017	-0,072	0,027	-0,110	0,042	-0,022	-0,061	-0,012	0,044	0,077
DMC _{prinos}	0,016	-0,002	0,003	-0,019	-0,025	0,007	-0,100	-0,005	-0,023	0,003	-0,025	0,033	0,058
CUR _{prinos}	0,052	0,001	0,013	-0,057	-0,037	0,011	-0,270	-0,054	-0,070	0,079	-0,010	0,097	0,170
KBA _{prinos}	0,005	0,011	0,008	-0,004	-0,009	-0,003	-0,042	-0,006	-0,001	-0,040	-0,004	0,013	0,023
AKBA _{prinos}	0,043	0,038	0,027	-0,029	-0,004	-0,013	-0,410	-0,028	-0,032	-0,310	-0,007	0,063	0,110
ABA _{prinos}	0,120	-0,036	0,078	-0,005	-0,001	-0,019	-0,850	-0,520	-0,160	-2,190	-0,030	0,176	0,309
BBA _{prinos}	0,290	0,110	0,120	-0,160	0,027	0,110	-2,510	0,039	-0,290	-8,970	0,150	0,390	0,686
ANDR _{rs}	-0,065	0,120	0,160	-0,062	-0,190	0,130	-0,200	0,048	-0,180	0,210	-0,680	0,277	0,487
NANDR _{rs}	-0,013	0	-0,140	-0,100	-0,160	-0,150	-0,180	-0,420	0,037	-0,003	-0,077	0,196	0,345
14-DANDR _{rs}	-0,008	0,062	-0,025	0,008	-0,013	-0,012	-0,160	-0,300	0,008	-0,015	-0,180	0,068	0,120
PIP _{rs}	0	-0,007	-0,016	-0,003	-0,006	0,007	-0,023	0	0,023	-0,020	-0,240	0,027	0,047
BDMC _{rs}	0,350	0,410	-0,020	-0,160	0,770	-0,300	-0,350	-0,600	-0,190	0,008	-0,520	0,602	1,509
DMC _{rs}	0	-0,007	-0,007	0,010	-0,007	0,007	-0,003	0,170	0	-0,003	-0,060	0,015	0,026
CUR _{rs}	0,003	-0,003	-0,009	0,007	-0,009	0,003	-0,007	0,180	0	-0,003	-0,030	0,009	0,016
KBA _{rs}	-0,005	0,022	-0,004	0,015	-0,002	0,002	0,160	1,100	0,018	0,012	-0,028	0,034	0,060
AKBA _{rs}	0	0,003	-0,003	-0,007	-0,003	0	-0,200	0,200	-0,003	-0,007	-0,003	0,009	0,015
ABA _{rs}	-0,003	0,003	-0,007	-0,017	0,007	0,007	-0,060	-0,130	-0,003	0,013	0	0,020	0,035
BBA _{rs}	0	0	0,001	-0,007	0	0,003	-0,033	-0,150	0,003	0,007	-0,003	0,009	0,015

Tablica P9. Značajni faktori za pojedini odaziv

odaziv	značajni faktori iz usporedbe kritičnih i neznčajnih efekata ($\alpha = 0,05$)	značajni faktori iz usporedbe kritičnih i neznčajnih efekata ($\alpha = 0,01$)	značajni faktori iz Pareto dijagrama (iznad Bonferronijeve granice, $\alpha = 0,05$)	značajni faktori iz grafa polunormalne vjerojatnosti
ANDR _{prinos}	G+J	G	G+J	G+J
NANDR _{prinos}	G+J	G+J	G+J	D+E+G+J
14-DANDR _{prinos}	G+J	G+J	G+J	G+J
PIP _{prinos}	G	G	D+G	G
BDMC _{prinos}	E+G+J	G	/	G
DMC _{prinos}	G	G	/	G
CUR _{prinos}	G	G	G	G
KBA _{prinos}	G+J	G+J	B+C+E+G+H+J	G+J
AKBA _{prinos}	G+J	G+J	G+J	G+J
ABA _{prinos}	G+H+J	G+H+J	A+G+H+I+J	G+H+J
BBA _{prinos}	G+J	G+J	G+J	G+J
ANDR _{Rs}	K	K	K	K
NANDR _{Rs}	H	H	/	/
14-DANDR _{Rs}	G+H+K	G+H+K	B+E+G+H+K	B+E+G+H+K
PIP _{Rs}	K	K	E+K	E+K
BDMC _{Rs}	E	/	/	/
DMC _{Rs}	H+K	H+K	H+K	H+K
CUR _{Rs}	H+K	H+K	H+K	H+K
KBA _{Rs}	G+H	G+H	G+H	G+H
AKBA _{Rs}	G+H	G+H	G+H	G+H
ABA _{Rs}	G+H	G+H	D+G+H	G+H
BBA _{Rs}	G+H	G+H	G+H	G+H

8. POPIS POKRATA I OZNAKA

14-DANDR	14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid
6MMP	6-metilmerkaptopurin
6MMPR	6-metilmerkaptopurin ribozidi
6MP	6-merkaptopurin
6TG	6-tiogvanin
6TGN	6-tiogvaninski nukleotidi
6TU	6-tiourična kiselina
6TX	6-tioksantin (engl. <i>6-thioxanthine</i>)
AABA	3- <i>O</i> -acetil- α -bosvelična kiselina
ABA	α -bosvelična kiselina
ABBA	3- <i>O</i> -acetil- β -bosvelična kiselina
AKBA	3- <i>O</i> -acetil-11-keto- β -bosvelična kiselina
ANDR	andrografolid
ANOVA	analiza varijance (engl. <i>analysis of variance</i>)
ATR	atenuirana totalna refleksija
AZA	azatioprin
BBA	β -bosvelična kiselina
BDMC	bisdemetoksikurkumin
CA	klasterska analiza (engl. <i>cluster analysis</i>)
CD	Crohnova bolest (engl. <i>Crohn's disease</i>)
$C_{\max}$	maksimalna plazmatska koncentracija
CUR	kurkumin

DMC	demetoksikurkumin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. <i>differential scanning calorimetry</i>)
FA	folna kiselina (engl. <i>folic acid</i>)
FaSSIF	simulirana crijevna tekućina u stanju gladovanja (engl. <i>fasted state simulated intestinal fluid</i>)
FDA	Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FDC	fiksna kombinacija lijekova (engl. <i>fixed dose combination</i>)
FeSSIF	simulirana crijevna tekućina u stanju sitosti (engl. <i>fed state simulated intestinal fluid</i>)
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GIT	gastrointestinalni trakt
GMPS	GMP sintaza
GST	glutation-S-transferaza
Hb	hemoglobin
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPRT	hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaza
HSA	humani serumski albumin
HSA _{exp}	eksperimentalno određen obim vezanja na humani serumski albumin
HSA _{lit}	literaturne vrijednosti obima vezanja na humani serumski albumin

HX	hipoksantin
IBD	upalne bolesti crijeva (engl. <i>inflammatory bowel diseases</i>)
ICH	Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za humanu primjenu (engl. <i>International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
IL	interleukin
IMPD	inozin monofosfat dehidrogenaza
IST	izotermalni stres (engl. <i>isothermal stress testing</i>)
KBA	11-keto- β -bosvelična kiselina
k	faktor zadržavanja
K_i	konstanta inhibicije
K_m	Michaelisova konstanta
LOD	granica dokazivanja (engl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	granica određivanja (engl. <i>limit of quantification</i>)
m_{Lapp}	prividni molarni ekvivalent zasićenja kolone
MMR	mehanizam popravka pogrešno sparenih baza (engl. <i>mismatch repair</i>)
MNIA	1-metil-4-nitroimidazol-5-amin
MS	masena spektrometrija
NANDR	neoandrografolid
NF- κ B	nuklearni faktor κ B
PA	pteroinska kiselina (engl. <i>pteroic acid</i>)
pABA	<i>p</i> -aminobenzojeva kiselina (engl. <i>p-aminobenzoic acid</i>)
pABGA	<i>p</i> -aminobenzoilglutaminska kiselina (engl. <i>p-aminobenzoylglutamic acid</i>)
PC	glavna komponenta (engl. <i>principal component</i>)
PCA	analiza glavnih komponenata (engl. <i>principal component analysis</i>)

PIP	piperin
PRESS	predviđena ostatna suma kvadrata (engl. <i>predicted residual sum of squares</i>)
r	koeficijent korelacije
R^2	koeficijent determinacije
RRF	relativni faktor odaziva detektora (engl. <i>relative response factor</i>)
RRT	relativno vrijeme zadržavanja (engl. <i>relative retention time</i>)
RSD	relativno standardno odstupanje (engl. <i>relative standard deviation</i>)
SAM	S-(5'-adenozil)-L-metionin
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TAP	tiamiprin
TGA	termogravimetrijska analiza
TGMP	6-tiogvanozin monofosfat
TGTP	6-tiogvanozin trifosfat
TIMP	6-tioinozin monofosfat
TPMT	tiopurin metiltransferaza
t_M	mrtvo vrijeme
t_R	vrijeme zadržavanja
TXMP	6-tioksantozin monofosfat
UC	ulcerozni kolitis (engl. <i>ulcerative colitis</i>)
$V_{\max}$	maksimalna brzina enzimske reakcije
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
XO	ksantin oksidaza (engl. <i>xanthine oxidase</i>)

9. ŽIVOTOPIS

Edvin Brusač rođen je 4. kolovoza 1994. u Bjelovaru gdje je završio osnovnu i srednju školu. Tijekom srednje škole sudjelovao je na Državnim natjecanjima iz kemije. 2013. godine upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet na kojem diplomira 2018. godine s velikom pohvalom (*magna cum laude*). Dobitnik je dvije nagrade za izvrstan uspjeh tijekom studija (za ak. god. 2014./2015. te nakon završetka studija). Dobitnik je Rektorove nagrade za individualan znanstveni rad u ak. god. 2017./2018. pod vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk te nagrade za najbolje usmeno priopćenje na 7. Simpoziju studenata farmacije i medicinske biokemije 2018. godine. Od listopada 2018. godine zaposlen je kao doktorand na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva“ voditeljice prof. dr. sc. Ane Mornar Turk, na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Sudjeluje na Erasmus+ projektu PROMISE (Personalized Medicine Inquiry-Based Education). Sudjelovao je u radu organizacijskog odbora 9. Simpozija studenata farmacije i medicinske biokemije. Sudjelovao je na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima s posterskim priopćenjima i jednim usmenim izlaganjem. U koautorstvu je objavio 10 znanstvenih radova u časopisima zastupljenim u bazi Web of Science Core Collection, od kojih je na 4 rada prvi autor, te 2 stručna rada u ostalim časopisima.

Znanstveni radovi (WoSCC):

1. Brusač E, Jeličić M-L, Amidžić Klarić D, Nigović B, Turk N, Klarić I, Mornar A. Pharmacokinetic Profiling and Simultaneous Determination of Thiopurine Immunosuppressants and Folic Acid by Chromatographic Methods. *Molecules*, 2019, 24, 3469.
2. Nigović B, Mornar A, Brusač E, Jeličić M-L. Selective sensor for simultaneous determination of mesalazine and folic acid using chitosan coated carbon nanotubes functionalized with amino groups. *J Electroanal Chem*, 2019, 851, 113450.
3. Brusač E, Jeličić M-L, Amidžić Klarić D, Mornar A. Miniaturized shake-flask HPLC method for determination of distribution coefficient of drugs used in inflammatory bowel diseases. *Acta Pharm*, 2019, 69(4), 649–60.

4. Buhač T, Amidžić Klarić D, Klarić I, Nigović B, Brusač E, Jeličić M-L, Mornar A. Assessment of active ingredients and metal impurities in phytoestrogen-containing food and dietary supplements. *J Food Nutr Res*, 2020, 59(2), 87–97.
5. Jeličić M-L, Brusač E, Amidžić Klarić D, Nigović B, Keser S, Mornar A. Physicochemical Compatibility Investigation of Mesalazine and Folic Acid Using Chromatographic and Thermoanalytical Techniques. *Pharmaceutics*, 2020, 13(8), 187.
6. Jeličić M-L, Brusač E, Amidžić Klarić D, Nigović B, Turk N, Mornar A. A chromatographic approach to development of 5-aminosalicylate/folic acid fixed-dose combinations for treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Sci Rep*, 2020, 10(1), 20838.
7. Jeličić M-L, Brusač E, Kurajica S, Cvetnić M, Amidžić Klarić D, Nigović B, Mornar A. Drug-Drug Compatibility Evaluation of Sulfasalazine and Folic Acid for Fixed-Dose Combination Development Using Various Analytical Tools. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3), 400.
8. Brusač E, Jeličić M-L, Cvetnić M, Amidžić Klarić D, Nigović B, Mornar A. A Comprehensive Approach to Compatibility Testing Using Chromatographic, Thermal and Spectroscopic Techniques: Evaluation of Potential for a Monolayer Fixed-Dose Combination of 6-Mercaptopurine and Folic Acid. *Pharmaceutics*, 2021, 14(3), 274.
9. Brusač E, Jeličić M-L, Amidžić Klarić D, Nigović B, Keser S, Mornar A. Development of a HPLC-DAD stability-indicating method and compatibility study of azathioprine and folic acid as a prerequisite for a monolayer fixed-dose combination. *Anal Methods*, 2021, 13(11), 1422–31.
10. Jeličić M-L, Brusač E, Kurajica S, Cvetnić M, Amidžić Klarić D, Nigović B, Mornar A. Thermoanalytical, Spectroscopic and Chromatographic Approach to Physicochemical Compatibility Investigation of 5-Aminosalicylates and Folic Acid. *Croat Chem Acta*, 2021, 94(1), 3799.

Ostali radovi:

1. Brusač E, Jeličić M-L, Mornar A. Biomimetička kromatografija – novi pristup u razvoju lijekova. *Farm Glasnik*, 2019, 11, 793–817.
2. Mornar A, Nigović B, Amidžić Klarić D, Jeličić M-L, Brusač E. Ekstrakcija čvrstom fazom – primjena u bioanalitici. *Farm Glasnik*, 2020, 6, 353–94.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Doktorski rad

KOMPATIBILNOST TIOPURINSKIH IMUNOSUPRESIVA S FOLNOM KISELINOM I MOGUĆE INTERAKCIJE S PRIPRAVCIMA ODABRANIH BILJNIH VRSTA

Edvin Brusač

SAŽETAK

U terapiji upalnih bolesti crijeva, kao i svih kroničnih bolesti, česti su problemi poput neadherencije te konzumacije neprovjerenih dodataka prehrani koja može dovesti do interakcija s farmakoterapijom, što utječe na kvalitetu života bolesnika. Cilj ovog rada je bio steći uvid u navedene probleme i potencijalna rješenja: specifično za terapiju tiopurinskim imunosupresivima, ispitati kompatibilnost azatioprina, odnosno 6-merkaptopurina i folne kiseline u svrhu mogućnosti izrade fiksnih kombinacija lijekova i poboljšanja adherencije, ispitati sadržaj aktivnih tvari biljnih droga i njihovih pripravaka korištenih u komplementarnoj terapiji upalnih bolesti crijeva (podanka kurkume, lista justicije, smole indijskog tamjanovca i ploda crnog papra) u proizvodima dostupnima lokalno i putem interneta te ispitati interakciju pripravaka navedenih droga i tiopurinskih imunosupresiva u pogledu distribucije i metabolizma. U slučaju azatioprina i folne kiseline, ispitivanja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom uputila su na moguću nekompatibilnost, ali studijom izotermalnog stresa, studijama prisilne razgradnje i ispitivanjem oslobađanja u biorelevantnom mediju ova tvrdnja je opovrgnuta. U slučaju 6-merkaptopurina i folne kiseline, sva ispitivanja utvrdila su kompatibilnost, no oprez je potreban kod odabira pomoćnih tvari zbog drastične razgradnje 6-merkaptopurina u smjesi ljekovitih oblika u lužnatim uvjetima. Dakle, fiksne kombinacije lijekova mogu se izraditi korištenjem jedinstvene formulacijske smjese. Kod aktivnih tvari u biljnim drogama i njihovim pripravcima, velike razlike u sadržaju i diskrepancije između nađenog i deklariranog sadržaja pronađene su za većinu proizvoda kupljenih putem internetske trgovine, što signalizira da je potrebno povećati svijest korisnika o rizicima kupnje sličnih pripravaka iz neprovjerenih izvora. Naposljetku, aktivne sastavnice i/ili ekstrakti odabranih droga nisu pokazali interakciju s 6-merkaptopurinom u vezanju na humani serumski albumin niti fiziološki relevantnu inhibiciju tiopurin metiltransferaze, no inhibicija ksantin oksidaze ekstraktom lista justicije ($K_i \sim 55 \mu\text{g/mL}$) mogla bi dovesti do promjena u razinama aktivnih metabolita 6-merkaptopurina; navedeni rezultat potrebno je potvrditi *in vivo* ispitivanjima. Zaključno, saznanja ostvarena u ovom doktorskom radu rasvjetljuju problematiku fiksnih kombinacija lijekova, kakvoće dodataka prehrani i interakcije hrana-lijek u pogledu tiopurinskih imunosupresiva te mogu biti iskorištena za unaprjeđenje kvalitete života bolesnika koji boluju od upalnih bolesti crijeva.

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

Rad sadrži: 146 stranica, 34 slike, 35 tablica i 215 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: tiopurinski imunosupresivi, folna kiselina, kompatibilnost, biljni dodaci prehrani, interakcija

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

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

Dr. sc. Tomislav Bolanča, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije

Rad prihvaćen: travanj 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Doctoral thesis

COMPATIBILITY OF THIOPURINE IMMUNOSUPPRESSANTS WITH FOLIC ACID AND THEIR POTENTIAL INTERACTIONS WITH PREPARATIONS OF SELECTED HERBAL SPECIES

Edvin Brusač

SUMMARY

In inflammatory bowel disease therapy, non-adherence and use of various herbal supplements which could lead to interactions with therapy are common problems; this also affects the patients' quality of life. The aim of this work was to elucidate the said problematic and potential solutions: regarding thiopurine immunosuppressant therapy, to investigate the compatibility of azathioprine/6-mercaptopurine and folic acid for the means of fixed dose combination development, examine the content of active substances in herbal drugs and preparations used in inflammatory bowel disease therapy (turmeric rhizome, green chiretta leaf, Indian frankincense resin and black pepper fruit) in products available locally and online, as well as to examine the potential for interaction of said herbal preparations and thiopurine immunosuppressants in terms of distribution and metabolism. In the case of azathioprine and folic acid, differential scanning calorimetry measurements implied incompatibility, but through isothermal stress, forced degradation and dissolution studies this claim was disproved. As for 6-mercaptopurine and folic acid, all tests implied compatibility, but care should be taken when choosing the excipients because of the drastic degradation of 6-mercaptopurine in the dosage form blend under basic conditions. In conclusion, fixed dose combinations can be made by using a single formulation mixture. Regarding active substances in herbal drugs and preparations, major differences in content and discrepancies in found and declared contents were found for most of the products bought online, which signalizes increased consumer awareness regarding risks of buying similar products over the Internet is needed. Lastly, active substances and/or drug extracts did not ostensibly impact 6-mercaptopurine binding on human serum albumin or cause physiologically relevant thiopurine methyltransferase inhibition, but xanthine oxidase inhibition by green chiretta leaf extract ($K_i \sim 55 \mu\text{g/mL}$) could lead to changes in active thiopurine metabolites; this result needs to be confirmed through *in vivo* studies. In summary, the findings of this doctoral thesis elucidate the problematics of fixed dose combinations, herbal supplement quality and food-drug interactions in terms of thiopurine immunosuppressants and can be used to improve inflammatory bowel disease patients' quality of life.

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

Thesis includes: 146 pages, 34 figures, 35 tables and 215 references. Original is in Croatian language.

Keywords: thiopurine immunosuppressants, folic acid, compatibility, herbal supplements, interaction

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

Reviewers: **Biljana Nigović, PhD**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić, PhD, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tomislav Bolanča, PhD, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology

The thesis was accepted: April 2022