

Primjena bioloških metoda u farmakognoziji

Petričić, Jovan

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 1950, 6, 59 - 69**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:290677>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Primjena bioloških metoda u farmakognoziji

Farmakognozija je teorijska i primijenjena nauka. Za rješavanje svojih zadataka, koji sastoje u istraživanju droga u smislu podrijetla, čistoće i sadržaja, bilo u kvalitativnom ili u kvantitativnom smislu, ona se koristi svima onim metodama koje pridonose tom rješavanju. Potreba prakse zahtijeva da te metode budu što valjanije, kako bi farmakognozija mogla potpuno odgovoriti značajnoj zadaći liječenja ljudi i životinja.

Metode pomoću kojih se određuje vrijednost droge s obzirom na djelotvorne tvari predstavljaju bez sumnje jedno od najvažnijih područja rada ove nauke, jer one pokazuju kakvo će biti djelovanje droge i kako je valja dozirati.

Postupak oko doziranja jedne droge, njenog pripravka, ili uopće lijeka, može se u principu promatrati s dva različita gledišta: s gledišta liječnika koji propisuje veličinu doze i s gledišta farmaceuta koji priprema lijek. Liječnik će samo tada postići željeni uspjeh, ako kod točno ustanovljene bolesti propisuje lijek služeći se pravilima, koja postoje između doze i djelovanja, a s obzirom na individualni način aplikacije kod bolesnika. Farmaceut ima važnu zadaću da doziranje, i za bolesnika, i za liječnika učini pouzdanim i da se stara za stalno djelovanje doze.

Kemijski definirane čiste tvari mogu se najbolje ispitati u pogledu identiteta i stalnosti fizičkim, fizičko-kemijskim ili kemijskim postupcima. Zbog ovako povoljnih prilika doziranje se može lako provesti jednostavno vodom. Na veće teškoće nailazimo kod određivanja vrijednosti, a to znači i kod doziranja lijekova kao što su droge i njihovi galenski preparati, jer se ovdje u pravilu radi o kompliciranoj smjesi najrazličitijih organskih tvari, u kojih ukupnoj težini utječe ponekad na djelovanje samo neznatan dio. U pojmu »smjesa najrazličitijih tvari« leži težište teškoća u istraživanju droga općenito, a posebno u određivanju njihove vrijednosti. Ako je nosilac djelovanja poznat, određivanje vrijednosti je upravljeno na izoliranje te tvari i na njeno kvantitativno obuhvaćanje fizičkim ili kemijskim putem. Kad određujemo terapijsku vrijednost droge *Belladonnae folium* nas interesuje postotak hioscijamina, odnosno atropina. Ovaj je alkaloid kemijski točno poznat, a za njegovo izoliranje postoje dosta dobre metode, pa se može lako titrimetrijski odrediti. No to često nije jednostavno. Ponekad je put do djelotvorne tvari skopčan sa znatnim teškoćama, tako da dobivena vrijednost nije u skladu s vrijednošću djelovanja droge ili njenog galenskog pripravka. Za to ima niz primjera. A koliko je tek teškoća u metodama gdje je broj djelotvornih tvari u drogi veći, gdje su te tvari možda i suprotnog djelovanja, ako već i nijesu veoma različite u intenzitetu djelovanja, dok su po kemizmu inače veoma srodne, i gdje te tvari još uopće nijesu kemijski točno definirane! Tu često fizičke i kemijske metode ne uspijevaju. U *Chinae cortex* i u njenim galenskim pripravcima određujemo smjesu alkaloida kemijskim putem, ma da pojedine komponente ove smjese nijesu uvijek u najboljem odnosu, ali one ipak pokazuju djelovanje bar približno istog intenziteta, pa se tu mogu oprostiti eventualne griješke u paralelitetu između nađene vrijednosti i stvarnog učinka. Ali sličan ustupak ne može se dozvoliti kod droge *Filicis maris rhizoma*. Djelotvorne komponente ove droge toliko variraju u svom intenzitetu, da nam njihovo određivanje u obliku t. zv. sirovog filicina uopće ne daje slike o vrijednosti droge ili njenog ekstrakta. Može se desiti da jedna droga s niskim sadržajem sirova filicina ima veliku toksičnost, a da druga s visokim sadržajem bude

potpuno bez djelovanja. Kad se to desi, pa onda kad su nam djelotvorni principi nepoznati, ili su kolebljivog kemijskog sastava, ili ih je teško neoštećene izolirati, primjenjujemo za određivanje vrijednosti biološke metode. Moram odmah naglasiti, da su one u farmakognoziji zamjena za fizičke i kemijske metode, ali zamjena, koja je često prijeko potrebna.

Pored navedenih temeljnih razloga koji upućuju na primjenu bioloških metoda, važno je pomenuti i onaj, da je često djelovanje droge ili njenih galenskih pripravaka drukčije, ponekad u većoj mjeri, od pojedinih izoliranih aktivnih tvari. Balastne tvari djeluju općenito u smjeru paraliziranja ili usporavanja djelovanja, ali one često i potpomažu djelovanje aktivne tvari, a katkad su uzrok kvalitativno drukčijem efektu na živom organizmu. No imajući u vidu da su i biološke metode, gdje se primjenjuju, još uvijek krnje, moraće se ponekad upotrebiti jednostavnije kemijske metode.

Kod bioloških određivanja tvar koja se ispituje djeluje na životinjski ili biljni organizam, ili na jedan preživjeli organ. Prema intenzitetu određenih fizioloških reakcija, koje mogu prema vrsti lijeka i životinje biti veoma različite, zaključujemo na količinu djelotvorne tvari. Za ta se ispitivanja primjenjuju, bilo hladnokrvne, bilo toplokrvne životinje. Kod metoda tih ispitivanja traži se karakterističan efekt, koji se lako utvrđuje, a koji nastupa kod određene koncentracije djelotvorne tvari ili, što se rjeđe čini, koncentracija djelotvorne tvari određuje se prema vremenu, u kojem ima određeni fiziološki efekt nastupiti.

Jasno je, da kod ovih metoda moramo paziti na izvjesne činjenice važne za točnost pokusa, a na koje možemo utjecati. Starost, spol, stanje ishrane životinje, doba godine kad se pokus vrši, sredina u kojoj životinja živi od najvećeg su značaja za rezultat. No uza sve to dešavale su se prije veće, a danas manje pogreške. Velika kolebanja u pogledu osjetljivosti životinja razlogom su da ponekad postoji velika širina između najveće doze koja još ne izaziva smrt i najmanje koja je sigurno izaziva. Čitav je niz doza između ove dvije veličine koje mogu, ali ne moraju, uzrokovati smrt životinje. Dokazano je, da ova nepravilnost nestaje, ako se za svaku dozu primijeni dovoljno velik broj pokusnih životinja. Često se, međutim, prelazi preko ovog zahtjeva, koji je presudan za točnost neke biološke metode. S druge strane s obzirom na godišnje doba i pored pažnje, koja doduše sama po sebi ne može ovdje metodu popraviti, utvrdilo se da ima velikih razlika u vrijednosti rezultata, već prema tome kada se ispitivanje vršilo. Tako je na pr. vrijednost 1 g *Digitalis folium* istog uzorka kod ispitivanja na žabama varirala s obzirom na godišnje doba od 1310—3300 ž. j., dakle oko 250% (1).

Ova dva primjera, individualno kolebanje životinja u pogledu smrtnosti, kao i kolebanje zbog godišnjeg doba, pokazuju da biološka funkcija kao takva nije stalna, pa se i ne može doslovno primijeniti za određivanje djelotvornosti droge ili lijeka. Zato i jednostavno izražavanje vrijednosti nekog preparata za srce u t. zv. žabljim ili mačjim jedinicama ne daje sigurnosti za pouzdano doziranje. Isto tako izražavanje hemolitskog indeksa prema efektu hemolize kod neke saponinske droge ne predstavlja nikako egzaktnu ni apsolutnu veličinu, bar koliko je to kod ove metode moguće, ne uzmemo li u obzir činjenicu o velikoj varijabilnosti životinjskog materijala, čak možda samo i u dva uzastopna dana za istu životinju. Ovakve bismo veličine mogli uporediti sa starim jedinicama za mjeru kojima je temelj također biološki: stopa, palac, pedalj i t. d. Za različite ljude i te su mjere različite; isto tako fiziološki efekt, koji se traži, ne mora nastupiti kod različitih životinja u isto vrijeme ili s istom dozom. Jedno, stoga što životinje, čak iako žive unutar istih prostorijskih i pod istim uvjetima, vari-

raju, drugo, metode rada pojedinih ljudi, pa neka se i minimalno razlikuju, dovode opet do razlike u rezultatu. Iako je jasno, kolika je relativna vrijednost kad se za *Digitalis folium* jednostavno kaže da sadržava 2000 ž. j., ipak su se slične varijabilne veličine dugo zadržale, dok se nije uvidjelo, da se i u tome pogledu mora izvršiti korekcija.

Iz tih razloga nastoje se uvijek isključiti veličine koje predstavljaju biološke funkcije, a uvode se kao jedinice efekti određene količine djelotvorne tvari, koja je stalnog sastava. Tako se fiziološko doziranje vrši upoređivanjem nepoznate tvari sa standardom. Standardnim postupkom mi smo isto tako upućeni na biološku funkciju, ali nam kao mjerni sustav ne služi ona, već standard, odnosno njegov učinak u određenom biološkom postupku. Praktički se moraju uvijek istovremeno izvesti dva reda pokusa pod istim uvjetima, i to jedan s tvari nepoznate vrijednosti, a drugi sa standardom. Djelotvornost nekog preparata *Digitalis folium* sada se više ne izražava u žabljim jedinicama, ili se bar ne bi smjela tako izraziti, već u jedinicama učinka standarda. Tako je vrijednost preparata ujedno izražena bez obzira na vrstu životinje. No još ima mnogo droga, kod kojih za biološka ispitivanja nema prikladnog standarda.

Uvođenje jedinstvenih standardnih preparata značilo bi općenito velik napredak i na polju farmakognozijske, jer bi se tako omogućila uporedba rezultata u različitim zemljama, a podudaranje vrijednosti bioloških titracija omogućilo bi pouzdanije doziranje i veće povjerenje u droge kojih se vrijednost tako određuje.

Ne mogu ovdje iznositi detaljne postupke bioloških analiza, nego ću se samo pregledno osvrnuti na neke primjere ovih istraživanja iznoseći razloge, koji ovakav način ispitivanja diktiraju i opravdavaju, i osnovne principe tih bioloških postupaka.

Digitalis folium.

Ova droga, kao što je poznato, sadržava kardiotonične glikozide. Iz svježe biljke izolirani su genuini glikozidi purpurea-glikozid A i purpurea-glikozid B, koji su u biljci po svoj prilici vezani u formi tanoida za klorogensku kiselinu. U drogi se, međutim, nalaze niži stepeni ovih glikozida, njihovi progenini digitoksin, gitoksin i gitalin (za posljednji još nije utvrđeno da postoji kao primarni glikozid), i genini tih glikozida. Osim toga u drogi još ima velik broj spojeva, od kojih valja pomenuti kao značajnu sastojinu saponine. Na pitanje o stvarnoj količini djelotvornih komponenata u različitim vrstama te droge, i pored velikog značaja ove činjenice za određivanje vrijednosti i za terapeutsku primjenu, nije još odgovoreno. Još uvijek nedostaju u tom pogledu sistematska ispitivanja o utjecaju klime, edafskih faktora, egzistencije biotipa unutar vrste, starosti listova, kulture, metoda žetve, načina sušenja i čuvanja. Odnos pojedinih djelotvornih komponenata, koje su naročito po intenzitetu, a i kvalitativno, različite, nije isto tako još točno utvrđen, što je i nemoguće, jer je sigurno da nije stalan. Da bi se, međutim, liječnicima koji ordiniraju dao uvijek jednako djelotvoran lijek, trebalo je da sve droge koje djeluju na srce, kao i njihovi galenski preparati, budu usklađeni na jednu određenu vrijednost djelovanja. I pored mnogih napora još nije pošlo za rukom izraditi jednu besprijekornu fizičku ili kemijsku metodu koja bi zadovoljila ove zahtjeve. Kolorimetrijske metode, koje su dosada mnogi autori predlagali, a i danas predlažu, a koje se temelje na činjenici, da djelotvorne tvari ove droge daju obojeno reakcije s nekim reagensima, ne mogu se još uvijek smatrati sigurnim mjerilom vrijednosti droge.

Primjera radi pomenuću metode koje se osnivaju na Baljet-ovoj reakciji (2) sa alkalijskim pikratom; one se najčešće primjenjuju, ali o njihovoj pouzdanosti postoje velika razmimoilaženja. Knudson-Dresbach-ov kolorimetrijski postupak (3) primje-

njuje se i posljednjih godina. Koliko taj način određivanja vrijednosti *Digitalis folium* može biti vjerodostojan, neka nam kaže činjenica, da Baljet-ovu reakciju daje i dekstroza, a od glikozida u *Digitalis folium* najveći intenzitet boje daje nedjelotvorni glikozid diginin (4). Neke se metode temelje na reakciji Keller-Kiliani (5), koja se očituje u obojenju sa sumpornom kiselinom i željeznim trikloridom u octenoj kiselini. Ova se reakcija odnosi na digitoksozu i na genine. Soos (6) je primjenjivao kolorimetrijsku metodu, koja bazira na toj reakciji upoređujući rezultate s biološkim ispitivanjima na žabama. Autor smatra da se ovako mogu određivati glikozidi s digitoksozom, ako se ispitivanja vrše pod stalnim uvjetima.

Mislim da se kolorimetrijska određivanja za *Digitalis folium* ne mogu još vršiti sa sigurnošću. Temeljne pogreške ovih metoda sastoje u tome, što se obojenim reakcijama obuhvataju glikozidi, kojih je djelovanje različito po intenzitetu, zatim nedjelotvorni glikozidi, onda genini i druge tvari koje se nalaze u drogi. Genini na pr. mnogo slabije djeluju od glikozida, digitoksin je djelotvorniji od gitoksina i gitalina; razlike u intenzitetu djelovanja postoje i između primarnih i sekundarnih glikozida i primarnih glikozida među sobom. Kolorimetrijskom metodom obuhvaćen je u ovom varijabilnom kompleksu dio koji ulazi u reakciju, ali koji ne daje dokaza o terapeutskoj vrijednosti droge. Sličan odnos postoji i kod ostalih digitaloidnih droga. Stoga za određivanje vrijednosti ovih droga dolaze u obzir samo biološke metode.

Houghton (7) je 1898. g. [a iste godine i Jaquet (8)] prvi put određivao terapeutsku vrijednost *Digitalis purpureae folium* biološki na žabama. Od toga vremena postoji niz pokušaja da se ove metode usavrše, pojednostave i olakšaju. Tako se danas vrše pokusi osim na žabama također na mačkama, zamoreima i golubovima. Kod rada sa žabama najčešće se primjenjuje metoda pri kojoj se injicira propisno priređena iserpina u grudnu limfnu kesicu životinje i traži doza koja u roku određenog broja sati izaziva smrt polovine primijenjenih životinja. Kod mačke i zamore traži se doza, koja zaustavlja rad srca, a kod goluba ona doza, koja kod polovine grupe životinja izaziva povraćanje. Ali, kako je već pomenuto, budući da su životinje podvrgnute kolebanjima, koja zavise o različitim unutarnjim i izvanjskim faktorima, mora se kod svakog određivanja osjetljivost primijenjenih životinja baždariti sa standardnom drogom i vrijednost izraziti u internacionalnim jedinicama u odnosu na međunarodni standardni preparat. Jedna internacionalna jedinica *Digitalis folium* je djelovanje 0,08 g droge internacionalnog standarda ustanovljenog 1936. g.

Valja naglasiti potrebu stvaranja standarda za ostale digitaloidne droge, a prije svega za *Digitalis lanatae folium*. Nije opravdano da se za ovu drogu primjenjuje kao standard *Digitalis purpureae folium*, jer aktivni principi ovih dviju droga nijesu identični. Još se manje smije jedna kemijski čista supstancija primijeniti za ovu drogu kao standard. Pokazale su se, naime, velike razlike u rezultatima dobivenima ispitivanjem na različitim životinjama, ako se jedna tinktura, dakle sirov preparat, upoređuje s kemijski čistom tvari. Rothlin (9) je zabilježio da su kod ispitivanja *Tinct. Strophanthi* na različitim vrstama žaba i na nekim toplokrvnim životinjama uz standard uabain, razlike u rezultatima znale biti gotovo četverostruke. Nepoznata tinktura mora se upoređivati sa standardnom tinkturom, a ne s kemijski čistom tvari, jer, nije potrebno isticati, različite životinje različito reagiraju na tinkturu, a drukčije na čistu tvar. Pojedine čiste tvari mogu se na različitim životinjama veoma razlikovati po intenzitetu djelovanja. Tako je, na pr., digitoksin na mačkama sruu 1,44 puta jači od digitoksigenina, a na žabljem sruu 8,32 puta (10). Jasno je, da priroda droge kao standarda i kemijski čiste tvari nije ista.

Činjenica da se svakim danom javljaju novi prijedlozi za određivanje vrijednosti ove droge, dokazuje da još uvijek ne postoji ni kod bioloških ispitivanja ove droge (kao i ostalih digitaloidnih droga) rješenje koje bi potpuno zadovoljilo. Osvrnuću se na neke značajnije prigovore ovim metodama.

Postoji velika razlika u osjetljivosti između žaba različitog podrijetla i različnih vrsta. Tako su na pr. rezultati za digilanid na žabi *Rana temporaria* švajcarskog podrijetla oko 200% viši od rezultata na žabi *Rana hylirans* podrijetlom iz Madžarske (11). Dalje se opazilo, da je osjetljivost životinja veoma zavisna o starosti odnosno o težini. Mladi i lagani zamorci pokazali su se znatno rezistentniji, pa se može desiti da se za njih dobiju rezultati gotovo dvostruko viši. Tako je na pr. jedinica zamorca za digilanid 0,655 mg/kg za životinje srednje težine 470 g, a 1,081 mg/kg za životinje srednje težine 320 g (12). Ni kod te droge, a ni kod ostalih, ne postoji organski i funkcionalan odnos između biološkog standardiziranja i terapijske primjene, a da se i ne govori o istovjetnosti aplikacije kod pokusa za standardizaciju i u kliničkoj primjeni. Ispitujemo li na mačkama intravenozno Digitaline Nativelle i nečist sirov preparat droge *Digitalis folium*, naći ćemo da je drugi preparat 2,5 puta slabiji. Da bismo isti efekt postigli kod oralne primjene, treba drugog preparata najmanje 5 puta više (13). Za drogu bi bila potrebna vjerojatno još veća količina. Iz toga se može zaključiti da postoje velike razlike u djelotvornosti droge i njenih galenskih pripravaka, već prema tome, da li se daju oralno ili parenteralno. U drogi i u galenskim pripravcima sadržane su tvari koje djeluju intravenozno ili supkutano, a kod aplikacije »per os« ne djeluju. Koje su to tvari, nije još potpuno rasvijetljeno, ali je sigurno da tu znatno utječu saponini i teško topljivi glikozidi. Ova neslaganja zahtijevala bi i u standardizaciji oralnu primjenu, ali to je tehnički teže i dugotrajnije, jer su kolebanja životinja ovdje veća negoli kod parenteralne aplikacije.

Wasicky (14) je ispitivao mogućnost obuhvatanja biološkim putem najvažnijih djelotvornih tvari droge *Digitalis folium* digitoksina i purpurea-glikozida A. Ovi se glikozidi lagano fiksiraju, ali im je djelovanje dugotrajnije. Oni dolaze do jačeg izražaja kod sporijeg injiciranja, za razliku od gitoksina i gitalina koji bolje djeluju kod bržeg injiciranja. Pomenuti autor ispitivao je na mačkama, s obzirom na tu činjenicu, dva uzorka droge prema objema metodama. Jedan uzorak dao je kod sporijeg injiciranja manju vrijednost negoli kod bržeg. Drugi pak uzorak imao je gotovo istu vrijednost i kod sporijeg i kod bržeg injiciranja. Iz toga se može zaključiti da će se droge s različitim vrijednostima u ove dvije vrste pokusa, i u terapiji kvalitativno drukčije odnositi, pa ih ne valja primjenjivati. Ovako se, svakako, može postići istovrsnost različitih droga *Digitalis folium* i sigurnije doziranje.

Kao što se vidi, i biološke metode za određivanje vrijednosti ove droge imaju svojih nedostataka i još se moraju usavršavati. Ali jedno je tačno: kod biološkog određivanja nikad se neće desiti da se tvari jakog djelovanja upće ne obuhvate, dok kod kolorimetrijskih metoda to nije isključeno.

Secale cornutum

Djelovanje ove droge uvjetuju alkaloidi, amini i acetilholin. Glavni nosioci fiziološkog djelovanja su alkaloidi. Amini i acetilholin potpomažu djelovanje alkaloida samo kod parenteralne aplikacije, jer se u dodiru sa želučanim sokom brzo raspadaju. Alkaloidi, kojih je do danas izolirano dvanaest, a od kojih su po dva izomerna, podijeljeni su, s obzirom na kemizam, u dvije skupine: ergotoksin-ergotaminsku i ergobazinsku. Osnovno tijelo alkaloida je lizerginska kiselina, odnosno kod izomera izolizerginska kiselina. Alkaloidi u kojima je zastupana lizerginska kiselina mnogo su djelotvorniji od izomera.

Sadržaj alkaloida veoma varira, što zavisi o različitim faktorima: o podrijetlu i starosti droge, vremenu skupljanja i td. Tako će se naći droge, koje uopće nemaju alkaloida, a ima i takvih koje ih imaju i do 0,25%. S druge strane odnos pojedinih alkaloida među sobom veoma varira. Tako na pr. u nekim drogama uopće nije nađen najdjelotvorniji alkaloid na uterus, ergobazin. U svježoj drogi ima općenito više djelotvornih alkaloida s lizerginskom kiselinom, vremenom oni prelaze u slabije djelotvorne s izolizerginskom kiselinom. Kod prerade droge ova je preobrazba još brža.

Većinom dosadašnjih kemijskih metoda određuju se alkaloidi. Poznata je volumetrijska metoda od Küssnera (15), koja se temelji na mjerenju volumena taloga dobivenog pikrinskom kiselinom. Više pažnje zaslužuju, a i mnogo su razrađenije, kolorimetrijske metode. Princip određivanja bazira na obojenju, koje daju alkaloidi s aldehidima u nazočnosti sumporne kiseline. Prema van-Urk-ovoj (16) metodi alkaloidi se određuju prema intenzitetu obojenja, koje daju s p-dimetilaminobenzaldehidom u nazočnosti sumporne kiseline. Ovu metodu razrađuju Smith (17), Allport (18) i Coeking (19). Zadnja dvojica primjenjuju feri-klorid kao katalizator radi bržeg dobivanja maksimuma intenziteta boje. Freudweiller (20) dokazuje i kvantitativno određuje alkaloidne vanilinom, kao aldehidom s kojim se alkaloidi, kako to autor navodi, najjače oboje. Za određivanje minimalnog postotka alkaloida preporučuje se promatranje boja prostim okom, pri čemu se boja reakcije upoređuje s amonijačnom otopinom bakrenog sulfata (21) ili s otopinom tripanskog plavila (22). Među kemijske metode ubraja se i nefelometrijsko određivanje (23), koje se temelji na mutežu alkaloida s Mayerovim reagensom, zatim metoda određivanja alkaloida prema adsorpciji spektra, koju je izradio Schlemmer (24). Ipak su kolorimetrijske metode najobičajnije.

Nije još točno poznato, koji je dio alkaloidne molekule odgovoran za obojenja s aldehidima. Ako i pretpostavimo da u reakciju ulaze svi alkaloidi, postavlja se pitanje, da li se fiziološko djelovanje droge podudara s rezultatima dobivenima kolorimetrijski. Već je pomenuto da se alkaloidi po svom djelovanju razlikuju. Istraživanja, koja su u tom pogledu vršena, pokazuju da ergobazin djeluje dvostruko jače od ergotamina u povišenju tonusa i ritma na uterusu »in situ«, a levogiri alkaloidi ergotoksinske grupe u tom su pogledu dvaput slabiji od ergotamina; kod adrenalinskog kočenja na izoliranom uterusu ergobazin praktički ne djeluje, a ergotamin i ergotoksin otprilike su jednake vrijednosti. Jasne razlike postoje i u hipertermičkom efektu, a i u toksicitetu. Kod alkaloida s izolizerginskom kiselinom djelovanje je općenito mnogo slabije (25).

No i pored svega toga moglo bi se pribjeći bržim i jednostavnijim kolorimetrijskim metodama, kad bi odnos alkaloida u drogi bio stalan. Ali te stalnosti nema, a pogotovu je nema u galenskim preparatima. Vremenom se alkaloidi mijenjaju prelazeći iz djelotvornijih u slabije. Kolebanja u drogama različitog podrijetla mogu biti vrlo različna.

Jasno je, da kraj ovako različitog djelovanja pojedinih alkaloida i njihovog veoma varijabilnog odnosa, kolorimetrijske metode mogu dati samo orijentaciju o vrijednosti droge. Čak ako se i dobiva slika o količini alkaloida u drogi, time nije mnogo rečeno o njenoj terapijskoj vrijednosti.

Radi toga primjenjuju se pouzdanije biološke metode; one su ipak najbolji dokaz vrijednosti *Secale cornutum* i njenih galenskih pripravaka. Od tih metoda najviše se cijeni Broom-Clare-ova (26), koja se osniva na sposobnosti alkaloida da sprečavaju kontrakciju izoliranog uterusa kunića izazvanu adrenalinom. Pokusima na uterušnim traciama, na koje djeluje ekstrakt droge nepoznate jačine, nastojimo izmjenjivanjem koncentracija otopine postignuti isto kočenje adrenalinskog djelovanja koje izaziva i

standard, što znači da su alkaloidi nepoznatog ekstrakta jednaki po fiziološkom djelovanju određenoj količini alkaloida standarda. U tu svrhu služi kao standard ergotoksinetansulfonat. I ovdje treba upotrebiti u pokusu mnogo uterusnih trakova, inače pogreška može iznositi i 100%.

Houghton-ova metoda (27) određuje količinu alkaloida prema potamnjenju kreste pijetla, kojemu je u grudne mišiće uštrcana otopina alkaloida glavnice. Boja kreste uspoređuje se s bojom koju izaziva standard. Metodu je modificirao Crosbie (28), koji određuje intenzitet boje upoređivanjem fotografiranih pijetlovihi kresta. Tako se izbjegava subjektivni momenat kod procjene boje. Metoda se općenito smatra dosta pouzdanom.

Lieb (29) određuje alkaloide prema efektu povraćanja kod određenog broja golubova. Pominje se još niz metoda, od kojih se kod jedne utvrđuje povećanje arterijalnog pritiska izazvanog endovenoznom injekcijom preparata (30), kod druge se traži najmanja doza preparata, koja sprečava vazokonstriktorno djelovanje adrenalina na žabi (31), treća opet nastoji utvrditi dozu, koja u pokusu na izoliranom crijevu kunića ili zamorca pokazuje adrenalinsko-antagonističko djelovanje iste jačine kao i poznata količina standarda (32). Broom-Clare-ova i Houghton-ova metoda ipak su najjednostavnije i najviše se primjenjuju.

Kako je taložna metoda netočna, a kolorimetrijske premalo osjetljive da pruže vjernu sliku vrijednosti droge, to treba i pored teškoća u izvođenju, i pored izvjesne nepreciznosti, koristiti biološke metode, jer one ipak daju pouzdaniji temelj za ocjenu količine alkaloida i za egzaktnije doziranje.

Filicis maris rhizoma

Otrovanja koja često izaziva ova droga i njen ekstrakt, a koja su ponekad završila smrću, dešavala su se u prvom redu zbog varijabilnog sadržaja djelotvornih tvari u drogi, odnosno u ekstraktu, a ponekad je tome pridonijela i individualna dispozicija bolesnika. Borba protiv trakavice s galenskim preparatom ove droge vezana je za mnoge teškoće, koje i pored brojnih radova nijesu ni do danas svladane. Uska terapijska širina ekstrakta ove droge često je razlogom da se bolesniku pruži, ili premalena nedjelotvorna doza, ili prevelika, koja izaziva neželjene pojave, a katkad i smrt.

Extractum Filicis maris, koji propisuju mnoge farmakopeje, predstavlja smjesu tvari topljivih u eteru. Opaženo je, da taj ekstrakt kod dužeg čuvanja gubi na vrijednosti, a da i svježe priređeni ekstrakti iz različitih droga ne pokazuju konstantno djelovanje. Stamm i suradnici (33) utvrdili su da se tekući ekstrakti kod čuvanja osmele, a to nepovoljno utječe na njihovu djelotvornost. Osim toga sastav i djelovanje ekstrakta zavisi o podrijetlu droge, staništu, vremenu skupljanja, čuvanju i preradi.

Istraživanjem droge našlo se, da se djelovanje ima pripisati redu spojeva floriglucino-butirofena, od kojih je samo aspidinol po svojoj strukturi potpuno poznat. Za njega je osim toga utvrđeno, da najmanje djeluje. Čini se da je pravilo, da povećanjem broja floriglucinskih prstenova u ovim spojevima djelotvornost raste. Tako se filmaron, spoj sa četiri floriglucinska prstena, općenito smatra najdjelotvornijim. No i tu se mišljenja razilaze. Mühlemann (34) drži, da je najdjelotvorniji spoj flav-aspidinska kiselina, koja ima dva floriglucinska prstena. Poznato je, da spojevi sa većim brojem floriglucinskih prstenova pokazuju tendenciju da se lako dijele i postaju nedjelotvorni.

Jedina kemijska metoda osniva se na određivanju t. zv. sirova filicina pomoću baritne vode. U sirovu filicinu zastupani su svi fenolski spojevi, za koje se smatra da uvjetuju djelovanje droge. Pokazalo se, da je visok sadržaj sirova filicina, doduše,

najčešći uvjet za valjanost droge, ali njegovo određivanje još nije dovoljno da se do-
bije slika vrijednosti droge, jer ta veličina nije konstantna funkcija djelotvornosti
droge. U sirovu filicinu obuhvaćeni su svi spojevi floroglucinskog karaktera različite
vrijednosti, a njihov odnos je uvijek vrlo promjenljiv. Određivanje sirova filicina
može donekle poslužiti kao mjerilo vrijednosti kod svježe priređenog ekstrakta iz
svježe droge. Kod starih ekstrakata utvrđeno je da se osmoljavanjem povisuje sadržaj
sirova filicina, a opada djelovanje. Prema tome određivanje sirova filicina, jedne
prilično aproksimativne i nesigurne konstante, ne može služiti za određivanje vrije-
dnosti droge s toliko uskom terapijskom širinom. Jasno je da tu onda ne može biti
ni pravilnog doziranja.

U nedostatku pouzdane kemijske metode mnogi autori predlažu određivanje vri-
jednosti biološkim putem. Idealan test za biološko određivanje vrijednosti anthel-
mintskih droga predstavljali bi patogeni crvi, paraziti čovjeka. Ali kako se takvi
crvi ne mogu lako pribaviti, moramo ih zamijeniti drugim prikladnim životinjama.
Boem (35) je ispitivao anthelmintska sredstva na žabama, a Straub (36) primjenjuje
kišne crve za određivanje djelotvornosti droge *Filicis maris rhizoma*. U segment crva
injicira različite koncentracije ekstrakta i pri tome ustanovljuje onu koncentraciju,
koja na mjestu injiciranja izaziva mehanički i električki podražaj, a potom dovodi
do karakterističnog raspadanja. No ovo je samo kvalitativna reakcija, jer je vrlo
teško injicirati u segment točne doze bez gubitka. Yagi (37) izrađuje kvantitativnu
metodu na kišnim crvima, kojoj je već Semper (38) postavio temelje. Kako postoji
paralelnost između koncentracije otrova i vremena koje je potrebno da nastupi smrt,
daje nam vrijeme reakcije neposredno i intenzitet djelovanja preparata.

Wasicky (39) određuje vrijednost droge pomoću riba rodova *Gobio*, *Carassius*,
Phoxinus i *Scardinius* služeći se standardom florobutirofenonom. Kod te metode mora
se održavati konstantnost temperature, jer povećanje temperature od 10° na 20° dvo-
struko povećava vrijednost.

Schubiger (40) prvi primjenjuje *Tubifex*-crve kod ispitivanja nekih anthelmint-
skih droga. U novije vrijeme postigao je s istim pokusnim životinjama dobre rezul-
tate kod određivanja vrijednosti *Extractum rhizomatis Filicis maris* Käsermann (41),
nešto kasnije Ackermann (42). Käsermann primjenjuje za vezanje floroglucinskih
tvari iz ekstrakta magnezijev oksid, jer jako alkalni barijev hidroksid smanjuje dje-
lotvornost ekstrakta otprilike na polovinu. Ackermann upotrebljava za ispitivanje
suspenziju priređenu tako, da direktno otapa sirovi filicin u acetonu, a zatim otopinu
suspendira u vodi. Male količine acetona ne smetaju crvima. Temeljnu suspenziju
razrjeđuje vodovodnom vodom. U pokusu se utvrđuje srednja smrtna doza (L. D. 50) za
crve, koji su kod 20° C 35 minuta ostavljeni u posudama s različitim koncentracijama
ekstrakta. Kao standard služio je autoru svjež magnezijev sirovi filicin, kojega je
vrijednost po volji uzeta kao jedinica, pa se u odnosu na nju izračunava i vrijednost
nepoznate droge, odnosno ekstrakta. Ova bi se metoda mogla smatrati dobrom,
samo joj nedostaje prikladan standard. Sirovi magnezijev filicin ne može se sma-
trati ispravnim standardom, jer mu je stalnost veoma sumnjiva.

Droge sa saponinima

Nejasnoća u kemizmu saponina razlogom je da za kvantitativno određivanje sa-
poninskih droga nema egzaktnih kemijskih metoda. Baritna metoda (43) koja se
osniva na taloženju saponina barijevim hidroksidom ima tu griješku, što se ne zna,
koliko se saponina gubi kod taloženja, a kasnije kod ispiranja. Kod druge metode
određuje se aglukon saponina (44) i na temelju njegove količine zaključujemo na ko-

ličinu saponina. Aglukon se dobiva hidrolizom sa 3% sumpornom kiselinom. Metoda bi samo tada mogla biti točna, kad bišmo raspolagali dotičnim čistim saponinom, koji bi služio za uporedno određivanje.

Broj pjene (45), veličina koja bazira na davanju trajne pjene saponinske otopine, nije se pokazala kao funkcija količine saponina u drogi.

Od bioloških metoda dosada se veoma često primjenjivalo određivanje hemolitskog indeksa, koji označava najveće razrjeđenje saponina, u kojem ova tvar može, uz izvjesne uslove, izvršiti totalnu hemolizu. Kobert (46) je prvi upoznao značaj hemolize saponina za određivanje vrijednosti sadržaja saponinskih droga i izradio metodu, koja se primjenjivala sve do danas modificirana od različitih autora. Za ispitivanje se primjenjuje defibrinirana ili citratna krv toplokrvnih životinja. Krv se razrjeđuje izotoničnom otopinom, koja je ujedno i puferizirana na pH 7,4. Na određene količine krvne suspenzije u nizu epruveta djeluju različite količine saponina iz dekokta droge priredenog s pufer-izotoničnom otopinom i razrjeđivanog dalje istom otopinom. Poslije 12—20 sati traži se ona epruveta u kojoj je najmanja količina saponina izvršila potpunu hemolizu; recipročna vrijednost toga razrjeđenja je hemolitski indeks.

Kako krv različitih životinja, ili istih životinja u različito vrijeme, pokazuje raznoliku otpornost prema hemolizi, to se ovi pokusi moraju uvijek vršiti uporedo sa standardom i preračunati u odnosu na njegovu vrijednost. Za standard su predložene različite saponinske i nesaponinske tvari, ali sve one imaju svojih nedostataka. Saponini ne predstavljaju uvijek tvar jednakog hemolitskog djelovanja, a nesaponinske tvari, kemijski doduše jedinstvene i stalnog sastava, djeluju ipak drukčije od saponina, a time se udaljujemo od osnovnog principa da standard treba biti tvar po djelovanju slična tvari, koje se vrijednost određuje.

Saponini se mogu kvantitativno odrediti i pomoću ribljeg indeksa (47), jer djeluju otrovno na ribe, a Mühlemann i Scheidegger (48) su izradili metodu za određivanje saponinskih droga na temelju otrovnog djelovanja saponina na *Tubifex*-crve.

Nijedna od pomenutih metoda, bilo kemijskih, bilo bioloških ipak ne govori mnogo o terapeutskoj vrijednosti droge, na pr. kako djeluje kao ekspektorans. Da bi se dobila veličina, koja bi direktno davala sliku o ovom efektu droge, Perry i Boyd (49) su izradili metodu, koja sastoji u tome, da se uretaniziranim ili decerebriranim životinjama kroz sondu aplicira saponinska droga u želudac i iz povećanog lučenja služi autori zaključuju na vrijednost ekspektoracije. Čini se da se ova metoda, koju primjenjuju u Americi, još ne upotrebljava u većem opsegu u Evropi.

Hemolitski indeks, i pored nedostataka, još se za danas kod nas najčešće primjenjuje.

Antrahinonske droge

Za određivanje vrijednosti antrahinonskih droga fizičkim ili kemijskim putem postoje kolorimetrijske, gravimetrijske i titrimetrijske metode. Princip određivanja je takav, da se najprije odrede slobodni antrahinoni, a potom, nakon hidrolize, i glikozidno vezani. Griješke tih metoda su u tome, što se tako određuju i druge tvari slične po kemizmu, ili samo po grupi koja ulazi u reakciju, ali koje purgativno uopće ne djeluju. Osim toga različiti antrahinonski spojevi veoma se razlikuju po intenzitetu svoga djelovanja, a s druge strane njihov odnos u drogama može biti vrlo promjenljiv.

Kako dakle fizičke i kemijske metode nijesu pravo mjerilo vrijednosti antrahinonskih droga, to se za ova ispitivanja primjenjuju biološke metode, jer samo one daju točnu sliku o purgativnom djelovanju ovih droga. U tu svrhu najčešće se pri-

mjenjuju bijeli miševi, pa psi, mačke i štakori. Kod miševa se direktno ispituje purgativno djelovanje. Traži se ona količina droge koja može kod više od polovine serije od po 5 miševa izazvati purgativno djelovanje, ili se jednoj seriji od 10 miševa stalno povisuje doza dotle, dok se ne postigne izrazito purgativno djelovanje.

Viehoever (50) je ispitivao vrijednost nekih antrahinonskih droga na vodenim buhama. Pri tome se lupom promatra brzina i opseg ispražnjavanja crijeva ovih životinja, pošto je prethodno u posudice, u kojima se nalaze, usuta iscrpina droge. Pokus se vrši uz standard elaterin. Traži se ona doza koja uzrokuje isti stepen ispražnjenja crijeva kao i standard i po tome se zaključuje na vrijednost droge.

Prešlo bi opseg ovog predavanja kad bih još iznosio pojedina biološka ispitivanja za ostale skupine droga, kojih se vrijednost određuje biološki, ma bilo to samo i u općenitim potezima. Naglasioću samo da je na pr. kod gorkih droga jedino mjerilo vrijednosti biološko ispitivanje.

Ma da su sve te metode za standardizaciju nekog lijeka manje pouzdane, komplikiranije i skuplje od fizičkih i kemijskih metoda, mi se ipak njima moramo služiti ondje, gdje točnijih i jednostavnijih nema. Vidjeli smo da neke od njih imaju niz nedostataka (nedostatak prikladnog standarda, neslaganje bioloških aplikacija sa kliničkima ili čak promatranje fiziološkog efekta, na kojem se ne temelji terapijska primjena droge, na pr. hemolit. indeks kod saponin. droga i niz drugih nedostataka) i zbog toga ih treba usavršavati, a u tome će pomoć farmakologa biti prijeko potrebna. Danas kad se neke od tih metoda uvode u mnoge farmakopeje, moramo mi i u tom pogledu ići naprijed i proširiti svoje znanje, i u praktičnom i u teorijskom smislu. Pri tom treba da budemo svijesni činjenice: kao što su volumetrijske, gravimetrijske i kolorimetrijske metode u farmakognoziji potrebne za određivanje vrijednosti droga, tako se i biološke metode moraju smatrati potrebnima ondje, gdje se samo njima može kvantitativno odrediti djelotvorni sadržaj droge.

Literatura

- (1) E. Rothlin: Pharm. Acta Helv. 22, 418 (1947). — (2) H. Baljet: Pharm. Weekbl. 55, 457, 602 (1918). — (3) A. Knudson—M. Dresbach: Journ. Amer. Pharmacol. Ass. 12, 390 (1923). — (4) Hagemeyer: 1. c. iz F. K. Bell u. J. Krantz: Journ. Amer. Pharm. Ass. 37, 297 (1948). — (5) C. Keller: Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. 5, 275 (1895) i 7, 125 (1897). — M. Killiani: Arch. d. Pharm. 234, 273 (1896). — (6) E. Soos: Scient. Pharm. 16, 1 (1948). — (7) E. Houghton: Journ. Amer. Med. Assoc. 31, 959 (1898). — (8) Jaquet: Korr. Blatt f. Schweizer Ärzte 1898 — (9) Vidi br. 1. — (10) K. K. Chen, Robbins i Worth: Journ. Amer. Pharm. Ass. 27, 189 (1938). — (11), (12), (13). Vidi br. 1. — (14) R. Wasicky: Scient. Pharm. 15, 29 (1947). — (15) Küssner u. Wolf: Pharm. Ztg. 77, 342 (1932). — (16) Van Urk: Pharm. Weekbl. 66, 101 (1929). — (17) Smith: Publ. Health Reports 45, 1466 (1930). — (18) Allport u. Cocking: Quart. J. Pharm. Pharmacol. 5, 341 (1932). — (19). Vidi br. 18. — (20) Freudweiler: Pharm. Acta Helv. 7, 117 (1937). — (21) Labor. tvornice »Salus«, Ljubljana: Apot. vjesn. 21, 186, 254, 315 (1939). — (22) I. Corubolo—M. Grims: Farm. glasn. 5, 213 (1949) — (23) C. Tukats: Pharm. Mh. 14, 246 (1933). — (24) Schlemmer: Arch. Pharm. u. Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. 270, 15 (1932). — (25) E. Rothlin: Arch. f. exper. Path. 181, 154 (1936). — (26) Broom-Clare: J. of Pharmacol. 22, 59 (1923). — (27) E. Houghton: 1. c. iz I. H. Burn: Biologische Auswertungsmethoden, Berlin 1937, 187. — (28) Crosbie: J. Amer. Pharm. Ass. 33, 1110, (1934). — (29) C. C. Lieb-Mulinos: J. Pharmacol. exp. Therapeut. 51, 321 (1934). — (30) P. Pittenger—C. E. Vanderkleed: Journ. Amer. Physiol. 926 (1914). — (31) Masada—Edmunds—Hale: 1. c. iz G. Bucciardi: Valutazione Biologica dei Medicamenti, Firenze 1938, 406. — (32) Planches—Issekuts—Leinzinger: 1. c. iz G. Bucciardi: Valutazione Biologica dei Medica-

menti, Firenze 1938, 405. — (33) **Stamm u. Willner**: Pharmazia 1934, 169, 1937, 4. — (34) **H. Mühlemann**: Pharm. Acta Helv. 18, 494 (1943). — (35) **Boehm**: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 33, 35 (1897). — (36) **Straub**: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 48, 30 (1902). — (37) **Yagi**: Zeitschr. exp. Medizin 3, 64 (1914). — (38) **Semper**: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 63, 10 (1910). — (39) **R. Wasicky**: Leitfaden für die pharmakogn. Untersuchungen im Unterricht und in der Praxis, Leipzig u. Wien 1936, 237. — (40) **Schubiger**: Pharm. Archives Madison, Wis. U.S.A. 8, 67 (1937). — (41) **H. Mühlemann—H. Käsermann**: Pharm. Acta Helv. 17, 154 (1942). — (42) **M. Ackermann—H. Mühlemann**: Pharm. Acta Helv. 21, 158 (1946). — (43) **Christophson, Reuter, Dragendorff**: l. c. iz L. Kofler: Die Saponine, Wien 1927, 81. — (44) **M. Korsakov**: Compt. rend. de l'acad. de Science 155, 844 (1912). — (45) **L. Kofler**: Die Saponine, Wien 1927, 52. — (46) **R. Kobert**: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol. 23, 259 (1887). — (47) Vidi br. 39 str. 234. — (48) **H. Mühlemann—W. Scheidegger**: Pharm. Acta Helv. 22, 306 (1947). — (49) **Perry—Boyd**: l. c. iz Quart. J. Pharm. Pharmacol. 20, 164 (1947). — (50) **Viehoever**: J. Amer. Pharm. Ass. 25, 112 (1936) i 27, 632 (1938).

Za opći dio referata

E. Tabucchi: Lezioni di Technica Farmaceutica Biologica, Padova 1936. — **I. H. Burn**: Biologische Auswertungsmethoden, Berlin 1937. — **G. Bucciard**: Valutazione Biologica dei Medicamenti, Firenze 1938. — **R. Wasicky**: Leitfaden für die pharmakognostischen Untersuchungen im Unterricht und in der Praxis, Leipzig u. Wien 1936. — **H. Thoms**: Handbuch d. prakt. und wissenschaft. Pharmazie II, Berlin—Wien 1925, 646. — **Ther**: Pharmakologische Methoden, Stuttgart 1949.

Diskusija.

St. ph. **Porges** pita na koji se način može odrediti hemolitski indeks droga, koje sadržavaju i treslovine. — Prof. mr. **Jočmen** pita da li je predavač određivao broj gorčine kod *Gentianae radix* i da li su opažene velike razlike između provrele i neprovrele droge. — Mr. **Filipović** pita da li je predavaču poznato određivanje vrijednosti droge *Digitalis folium* na temelju klijavosti sjemenja.

Mr. **Petričić** odgovara, da se treslovine istražuju metodom aglutinacije, a to je postupak koji je protivan hemolizi. Za odjeljivanje treslovina od saponina ne opstojе prikladne metode, pa je otešćano i kvalitativno, a još više kvantitativno određivanje. — Što se tiče određivanja broja gorčine provrele i neprovrele droge, predavač u tom pogledu nije eksperimentalno radio, ali je poznato, da aglukoni, koji se oslobadaju iz glikozidnog veza poslije vrenja, pokazuju vrlo slabu gorčinu. Kako je druga komponenta gorkog glikozida šećer, to će se gorčina još manje osjetiti, ako su glikozidi raspadnuti, jer će tada djelovati i šećer. — Na vrstama roda *Lupinus* istraživali su djelovanje digitalisa u pogledu sprečavanja klijavosti sjemenja. Pri tom je dokazano da klijavost ne sprečavaju glikozidi, nego saponini. Na taj način mogli bi se saponini i kvantitativno određivati.