

Kemijski fingerprint u kontroli kakvoće biljnih droga i pripravaka

Janeković Petras, Kristina; Jurišić Grubešić, Renata

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2020, 76, 395 - 414**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:795085>

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](#)



Kemijski fingerprint u kontroli kakvoće biljnih droga i pripravaka

KRISTINA JANEKOVIĆ PETRAS¹, RENATA JURISIĆ GRUBEŠIĆ²

¹Belupo d.d., Danica 5, 48000 Koprivnica, Hrvatska

²Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Uvod

Biljne tvari i proizvodi već tisućljećima nalaze široku primjenu u različitim sustavima tradicionalne medicine. S obzirom na njihovu široku rasprostranjenost i dostupnost, neškodljivost takvih proizvoda od iznimne je važnosti, a ona je uvelike određena kakvoćom biljne sirovine. Razvoj biljnih terapeutika zahtijeva sveobuhvatno razumijevanje složenih biljnih sustava, uključujući biološki, kemijski, genetički i agronomski aspekt.

Općenito se vjeruje da je rizik primjene biljnih tvari i proizvoda nizak, ali brojna izvješća o ozbiljnim neželjenim reakcijama povezanim s njihovom primjenom upućuju na potrebu razvoja djelotvornih sustava njihove standardizacije i kontrole kakvoće. Zabilježeni su brojni slučajevi kada su biljni proizvodi bili dostupni na tržištu, a da prethodno nisu ispitani na prikladan način, odnosno, njihova je kakvoća bila upitna, često i neodgovarajuća. Uočena je kontaminacija biljnih proizvoda različitim pesticidima, neki su uzorci bili neodgovarajuće mikrobiološke čistoće, zabilježene su i nedopuštene razine teških metala te drugih onečišćenja, kao i prisutnost nekih kemijskih djelatnih tvari koje se koriste i odobrene su za proizvodnju lijekova (1, 2). Uzroci prisutnosti pesticida, teških metala i neodgovarajuće mikrobiološke čistoće mogu biti povezani s izvorom i podrijetlom biljnog materijala (rast u onečišćenom okolišu ili onečišćenje prilikom sabiranja biljnog materijala), dok ostala onečišćenja mogu nastati tijekom neprikladnog čuvanja biljnog materijala ili neodgovarajućom obradom (3).

Biokemijski profil biljnog materijala ovisi o brojnim morfološkim i ekološkim čimbenicima, a odabir optimalnog analitičkog postupka ima važnu ulogu u karakterizaciji složenog biljnog uzorka (droge, biljni pripravci, biljni lijekovi i drugi biljni proizvodi), što predstavlja značajan korak prema globalnoj standardizaciji i sigurnoj primjeni tvari i proizvoda biljnog podrijetla. Osim toga, razvoj zakonskih okvira za pojedine skupine proizvoda omogućava njihovu bolju kvalitetu na tržištu pregledom registracijske dokumentacije, uključujući provjeru prikladnosti označavanja proizvoda i upute za korisnika od strane nadležnih regulatornih tijela te kroz postmarketinško praćenje i prijavu nuspojava.

Budući da su biljni sustavi iznimno kompleksni, a sadržaj bioaktivnih sastavnica često promjenjiv i ovisan o brojnim i raznolikim čimbenicima, očita je potreba uvođenja novih pristupa identifikaciji i kontroli kakvoće takvih kompleksnih uzoraka; oni mogu biti usmjereni ili prema pojedinačnom, specifičnom spoju (analiza temeljena na biljnim biljezima) (4) ili pak obuhvaćaju čitav uzorak (*fingerprint* analiza), što je i temeljni predmet ovog rada.

Materijali i metode

Predstavljeno istraživanje obuhvaća detaljan pregled dostupne stručne i znanstvene literature čija je tematika vezana za područje analitike i kontrole kakvoće biljnih droga i gotovih biljnih proizvoda uz pomoć kemijskog *fingerprinta*. Također su prikupljeni podatci o razvoju regulatornih normi za biljne proizvode. Pretražene su bibliografske baze podataka, kao što su Medline/PubMed, Toxnet, Scopus, ScienceDirect, Elsevier biobase – Current Awareness in Biological Sciences (CABS), EMBASE, EBSCO i druge, uz primjenu ključnih riječi poput: *chemical fingerprint*, *chromatographic fingerprint*, *quality control of herbal drugs*, *qualitative and quantitative analysis of herbal drugs*, *herbal medicines*, *identification and determination of active components in herbal medicines*, *phytoequivalence*, *herbal extracts*, *regulatory requirements for herbal medicines*, *herbal drug regulation* i sl. Prikupljeni članci kritički su proučeni, s naglaskom na literaturu koja obrađuje kemijski *fingerprint* u svrhu identifikacije i kontrole kakvoće složenih biljnih uzoraka: biljnih droga, biljnih pripravaka, različitih skupina biljnih proizvoda te biljnih lijekova.

Rezultati i rasprava

Biljni se lijekovi svojim karakteristikama uvelike razlikuju od konvencionalnih lijekova. Oni često sadrže više djelatnih tvari kojima nije u potpunosti poznat mehanizam djelovanja. Kemijski profil biljnog materijala ovisi o uvjetima kojima je biljka bila izložena tijekom kultivacije, postupka izrade biljnog

proizvoda, njegova skladištenja i distribucije. Kontrola kemijske konzistentnosti tijekom svih stupnjeva proizvodnog postupka i kontrola stabilnosti u roku valjanosti od iznimne su važnosti za osiguravanje djelotvornosti i sigurnosti biljnog proizvoda. Zbog velike varijabilnosti biljnog materijala koji ulazi u sastav biljnog proizvoda, potrebna je odgovarajuća metoda identifikacije i kontrole kakvoće, kako bi se razlikovali slični biljni materijali lošije kvalitete, oni koji sadrže nižu koncentraciju djelatne tvari, kao i oni s više onečišćenja (primjerice pesticida). Uobičajeni pristup identifikaciji biljnog materijala uključuje vizualnu inspekciju cijele biljke, odnosno, biljne droge, što nije primjenjivo pri identifikaciji biljne vrste u kompleksnom biljnom uzorku (droge složena sastava, biljni pripravci ili drugi biljni proizvodi). Osim toga, zbog velike sličnosti pojedinih ljekovitih biljaka ili biljnih droga, često dolazi i do slučajnih zamjena nekom drugom, sličnom biljkom/biljnom drogom, što može imati čak i kobne posljedice. Ne postoje jedinstvene službene metode identifikacije pojedine biljne vrste ili droge prisutne u različitim biljnim proizvodima, kao ni jedinstvene metode njihove kontrole kakvoće. Regulatorna donosi monografije i smjernice (farmakopejske i druge službene metode ispitivanja) kojima se nastoji osigurati kakvoća takvih proizvoda, a što se uglavnom primjenjuje na biljne proizvode registrirane kao biljni lijekovi (tradicionalni biljni lijekovi). U farmakopejskim monografijama, osim makroskopske i mikroskopske identifikacije, često se propisuje određivanje odgovarajućeg biljega (markera) u svrhu identifikacije i kontrole kakvoće biljnog materijala.

Analiza temeljena na biljnim biljezima

Za identifikaciju sastavnica kompleksnih biljnih uzoraka u primjeni su različiti biljezi, kao što su taksonomski, kemijski, genetički i dr. Kontrola pomoću biljnih biljega obuhvaća metode morfološke identifikacije (makroskopska), anatomske identifikacije (mikroskopska), kemijske analize, što uključuje primjenu kromatografije, npr. tankoslojne (TLC) i tekućinske (LC), potom kapilarne elektroforeze (CE) te spregnutih sustava (npr. LC/MS), potom ispitivanje proteina te primjenu molekularnih biljega. Europska agencija za lijekove (EMA) definira kemijske biljege kao kemijski definirane sastavnice ili grupe sastavnica biljnog uzorka koje se ispituju prilikom analize, bez obzira nose li terapijsku aktivnost ili ne. Kemijski se biljezi dijele na analitičke biljege (služe isključivo u analitičke svrhe) i biljege koji su nosioci terapijske djelotvornosti (aktivni biljezi). Nedostatak prikladnog kemijskog biljega predstavlja veliku prepreku u osiguravanju odgovarajuće kontrole kakvoće biljnog materijala/proizvoda.

U ispitivanju biljnog materijala također se često primjenjuju DNA biljezi koji su specifični za pojedinu biljnu vrstu i nisu podložni vanjskim utjecajima (okoliš, fiziološki uvjeti, starost biljke). Primjenom citogenetičkih metoda ispitivanja, koje uključuju brojanje kromosoma i kariotipizaciju, može se pouzdano razlikovati biljni materijal, međutim, nedostatak predstavlja nemogućnost određivanja sastavnica prisutnih u biljnom materijalu. Dakle, navedeni pristupi nisu uvijek prikladni za karakterizaciju biljnih uzoraka, s obzirom na njihovu kompleksnost i često nepoznat sastav, kao i na nedostatak jedinstvenih biljega.

Općenito se može reći da se ograničenja analize temeljene na biljezima zasnivaju na činjenici da biljezi obično ne podrazumijevaju pojedinačne sastavnice te je stoga vrlo često potrebna kombinacija različitih analitičkih metoda ispitivanja kako bi se detektirale različite biljne komponente (5). Stoga se identifikacija koja je temeljena na ograničenom broju biljega ne može uvijek smatrati dostatnom, nego se javlja potreba analize čitavog biljnog uzorka (karakterističnog profila određene biljne vrste/droge/biljnog proizvoda), tzv. *fingerprint* analiza (6).

Fingerprint analiza

Literatura navodi podjelu na biološki i kemijski *fingerprint* (7).

Biološki *fingerprint* podrazumijeva genomsku analizu. S obzirom na činjenicu da je genetski materijal jedinstven za svaku pojedinu biljnu vrstu, metode koje se zasnivaju na DNA analizi manje su podložne promjenama koje se kod biljaka događaju njihovim starenjem, okolišnim uvjetima, sabiranjem, čuvanjem i obradom. Iako se biološki *fingerprint* uspješno primjenjuje u identifikaciji biljnih vrsta, takvim se ispitivanjem ne mogu otkriti razlike u kakvoći biljnog materijala koje nastaju radi vanjskih čimbenika. Stoga se spomenuti analitički pristup uglavnom koristi kao nadopuna kemijskom *fingerprintu* koji je usmjeren na prosudbu kakvoće biljnog materijala.

Kemijski (većinom kromatografski) *fingerprint* biljnog uzorka u praksi predstavlja kromatografski profil sirovog biljnog materijala, biljne droge ili biljnog pripravka koji se može uspoređivati s kromatografskim profilom referentnog uzorka ili standarda (2). Sadrži karakteristične sastavnice koje su nositelji farmakološke aktivnosti i/ili su samo analitički značajne (nisu nužno bioaktivni spojevi, već imaju prikladna analitička svojstva koja su korisna u analitičke svrhe). Kako sastav iste biljne droge može varirati u koncentracijama pojedinih sastavnica ovisno o geografskom podrijetlu biljke, vremenskim prilikama uzgoja, sabiranju, obradi i sl., za identifikaciju je najpouzdanije koristiti upravo

kemijski *fingerprint* kojim se razmatraju i evaluiraju sve sastavnice, a ne samo one koje su prisutne u najvišim koncentracijama.

Za analizu kemijskog sastava biljnih uzoraka primjenjuju se najčešće kromatografske i spektroskopske tehnike: plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), spektrofotometrija u ultraljubičastom (UV) i infracrvenom (IR) području, Raman i NMR spektroskopija, masena spektrometrija (MS) i dr. Primjenom spregnutih sustava (npr. HPLC-MS i GC-MS), dobivaju se dodatne analitičke informacije, primjerice, omogućeno je učinkovito detektiranje srodnih spojeva koji zajedno eluiraju te imaju slična vremena zadržavanja.

Kemijskim se *fingerprintom* mogu zabilježiti varijabilnosti u djelatnim tvarima i njihovim koncentracijama koje mogu nastati unutar iste biljne vrste, ovisno o uvjetima u kojima je biljka kultivirana i sabirana te metodama obrade i čuvanja biljnog materijala. Zadovoljavajuća identifikacija mora potvrditi da uzorak potječe od određene biljne vrste i isključiti mogućnost drugih izvora. Obično se radi usporedba *fingerprinta* ispitivanog uzorka i ekstrakta biljnog referentnog standarda. S obzirom na to da kompleksni biljni uzorci, kao što su biljni ekstrakti, mogu sadržavati velik broj komponenata u niskim koncentracijama, vizualna evaluacija kemijskih *fingerprinta* ne može uvijek biti dovoljna za prepoznavanje razlika između pojedinih profila. Upravo se iz toga razloga često primjenjuju matematičko-statistički modeli kao pomoć u procjeni i usporedbi takvih kompleksnih profila (kemometrijski pristup). Dakle, za razvoj *fingerprint* metode važne su dvije stavke: kako dobiti učinkovitije i stabilnije analitičke podatke te na koji način procijeniti sličnosti i razlike između dobivenih *fingerprinta* pomoću kemometrijske metodologije (1).

Načelo *fingerprint* analize obuhvaća nekoliko pristupa:

- »pristup temeljen na određenoj sastavnici/sastavnicama« – određuje se koncentracija jedne ili nekoliko sastavnica koje su karakteristične za ispitivanu biljnu drogu/pripravak, primjerice efedrin ili paklitaksel – takav pristup identifikaciji smatra se najjednostavnijom *fingerprint* analizom koja je daleko od zadovoljavajućeg ispitivanja složenog sastava biljne droge/pripravka;
- »pristup temeljen na informacijama koje pruža većina sastavnica ili sve identificirane sastavnice« – takav pristup primjenjuje se i kod drugih kompleksnih sustava, osim biljnih uzoraka; tako je, primjerice, u studiji autora Cotte i sur. (8) uspješno identificiran krivotvoreni med, u koji je dodan komercijalni zaslađivač, od čistog izvornog meda;
- »pristup temeljen na uzorcima/šablonama« – pristup uzima u obzir kompletan *fingerprint*, cijeli profil kao jednu cjelinu; prednost primjene takvog pristupa

je činjenica da se kod kompleksnih uzoraka na taj način izbjegava subjektivan odabir parametara/sastavnica za interpretaciju i njihova pojedinačna integracija; kako bi se potvrdio identitet i procijenila kakvoća uzorka, koristi se kompletan kemijski *fingerprint* koji se uspoređuje sa standardom. Primjenjuje se u slučajevima kada pojedinačna sastavnica ne može predstavljati učinkovitost biljnog proizvoda. Regulatorne agencije brojnih zemalja prihvaćaju i preporučuju upotrebu kemijskog *fingerprinta* u nekoj fazi registracije biljnih lijekova, kao i u završnoj provjeri kakvoće svake serije, npr. FDA (9), EMA (10) i dr.

Danas se najviše primjenjuje pristup temeljen na uzorcima, s obzirom na činjenicu da biljni proizvodi sadrže brojne komponente i da se u većini slučajeva ne može odrediti koja od njih ima terapijski učinak. Kromatografski se *fingerprint* sve više prihvaća kao učinkovit pristup procjeni kakvoće biljnih proizvoda na međunarodnoj razini. Pri tome je najučinkovitije u analizi primijeniti kombinaciju dobivanja kvalitativnih profila *fingerprinta* i kvantitativnog određivanja sastavnica kompleksnog biljnog uzorka.

Standardizacija biljnog materijala

Do standardne i ponovljive kakvoće određenog proizvoda dolazi se standardizacijom koja podrazumijeva provođenje određenih mjera tijekom proizvodnog postupka i kontrole kakvoće. Standardizacija biljnih droga/pripravaka predstavlja velik izazov, s obzirom na to da se oni uvelike razlikuju od sintetičkih tvari koje imaju strogo definirani sastav, te su za njih dostupni i referentni standardi koji se koriste prilikom određivanja različitih parametara (primjerice, sadržaja, onečišćenja i sl.). Najvažniji dio standardizacije i kontrole kakvoće biljnih droga i pripravaka predstavlja identifikacija, određivanje čistoće i sadržaja, za što se prvenstveno primjenjuje kemijska analiza. U svrhu osiguranja kakvoće biljnih proizvoda provode se sljedeća ispitivanja: identifikacija, određivanje sadržaja vode, sadržaja djelatnih sastavnica, određivanje anorganskih onečišćenja (teški metali), ispitivanje mikrobiološke čistoće, ispitivanje mikotoksina, pesticida i dr. Za različite farmaceutske oblike provode se i drugi testovi propisani Europskom farmakopejom, primjerice raspadljivost, oslobađanje djelatne tvari, čvrstoća/rastrošljivost, ujednačenost sadržaja i dr.

Kakvoća biljnih lijekova ima izravan utjecaj na njihovu učinkovitost i sigurnost primjene. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) objavila je nekoliko smjernica koje bi trebale pridonijeti boljoj kakvoći proizvoda biljnog podrijetla. Dokument *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials* (7) predstavlja skup preporučenih metoda identifikacije biljnog materijala, ispitivanja čistoće i određivanja sadržaja biljnih sastavnica kao pomoć laboratorijima koji se bave

kontrolom kakvoće biljnih proizvoda. WHO je objavila i dokument koji ima za cilj uspostavljanje standardiziranog uzgoja, sakupljanja i obrade biljnog materijala (*Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices*) (11), te *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues* (12). Vidljivo je da se regulatorna tijela sve više bave kakvoćom biljnih proizvoda.

S obzirom na varijacije u sastavnicama unutar iste biljne vrste, konvencionalna kontrola kakvoće je često nedostatna da bi se odgovarajuće analizirala biljna droga ili proizvod. Upravo iz tog razloga, najčešće se koristi tzv. »multi-technique« pristup kako bi se mogla odrediti poveznica između sastavnica i djelovanja. Radi navedenog, uveden je koncept »fitoekvivalencije« kojim se nastoji osigurati konzistentna kakvoća biljnih proizvoda prisutnih na tržištu, na način da se oni kod kojih je poznat kromatografski *finger print* uspoređuju s kromatografskim profilom referentnog proizvoda za koji postoje kliničke studije. Podudarni kemijski profil ispitivanog pripravka s kemijskim profilom referentnog pripravka u provedenoj studiji daje pretpostavku da će primjena ispitivanog proizvoda ostvariti željeni učinak (13).

Fitoekvivalencija

Koncept fitoekvivalencije uključuje »instrumentalnu inspekciju« biljnih uzoraka primjenom različitih kromatografskih i elektroforetskih metoda, a dobiveni kemijski profil (*finger print*) predstavlja prikaz kemijskog integriteta biljnog uzorka i služi za potvrdu njegove autentičnosti te u kontroli kakvoće.

Koncept fitoekvivalencije koristi se u praksi kako bi se osigurala konzistentnost i učinkovitost biljnih proizvoda (14). Za biljnu drogu/biljni proizvod, za koji je dokazana djelotvornost, priprema se kemijski *finger print*, profil koji dalje služi kao referentni standard u kontroli kakvoće srodnih biljnih uzoraka. Upravo stoga, veliki analitički izazov predstavlja razvoj odgovarajućih metoda analize kompletnog fitokemijskog profila te određivanja sadržaja biološki aktivnih tvari, analitičkih biljega i ostalih relevantnih komponenata biljnog uzorka. Najčešće se primjenjuju kromatografske tehnike pomoću kojih se dobiva relativno potpuna slika (*finger print*) ispitivanog kompleksnog biljnog uzorka koji se potom uspoređuje s referentnim *finger printom* (potječe od izvora kojemu je dokazana farmakološka djelotvornost) (2).

Priprema odgovarajućeg kromatografskog *finger printa* koji će moći poslužiti kao dokaz fitoekvivalencije ovisi o raznim čimbenicima: metodi ekstrakcije biljnog materijala, analitičkim uređajima, uvjetima tijekom analize i dr. Za dobar kromatografski *finger print*, koji će dati najviše informacija o biljnoj drogi/

proizvodu, potrebno je razviti odgovarajuću metodu ekstrakcije pomoću koje se iz biljnog materijala mogu ekstrahirati sve sastavnice koje predstavljaju integritet određenog biljnog uzorka. Nadalje, potrebno je dobiti kromatogram s dobrim odjeljivanjem sastavnica i koncentracijskim profilom detektiranih komponenata pomoću optimalnog detektora. Iz svega navedenoga može se zaključiti kako je upravo dobivanje kromatografskog *fingerprinta* visoke kvalitete sa što više informacija ključan zadatak analitičara, nakon čega se može procjenjivati je li biljni uzorak fitoekvivalentan referentnom proizvodu.

Australsko regulatorno tijelo (*Therapeutic Goods Administration*, TGA) donosi dokument *Guidance on equivalence of herbal extracts in Complementary Medicines* (15) u kojemu opisuje pod kojim se uvjetima biljni ekstrakt može smatrati ekvivalentnim ekstraktu koji se trenutno koristi u odobrenom proizvodu na tržištu. S obzirom na to da se razlike u biljnim pripravcima mogu pojaviti radi korištenja različitih otapala, različitih koncentracija istog otapala te različite metode ekstrakcije, ekstrakt u konačnici može rezultirati različitim profilom učinkovitosti i sigurnosti. Radi navedenoga, postavlja se pitanje koje se varijacije smiju dozvoliti, ako se uopće dozvoljavaju, kod pripreme ekstrakta iz iste biljne droge.

Glavni čimbenici koji utječu na raspon sastavnica ekstrahiranih iz biljne droge su:

- **Biljni materijal** – predstavlja osnovni čimbenik o kojemu ovisi broj komponenta koje se ekstrahiraju tijekom pripreme biljnog ekstrakta. Važno je dobro odabrati biljnu vrstu, kao i biljni organ/dio biljke iz kojega se želi dobiti biljni pripravak. S obzirom na poznatu varijabilnost u sastavnicama biljnog materijala, ovisno o podneblju uzgoja, vremenu sakupljanja i sl., ipak se dozvoljavaju određene varijacije u omjeru sastavnica. Potrebno je proizvesti dovoljan broj ekstrakata tijekom određenog vremenskog perioda (koristeći definirano ekstrakcijsko otapalo i validiranu proceduru ekstrakcije) te samim time dokazati kolika je maksimalna varijacija u koncentracijama ekstrahiranih sastavnica.
- **Ekstrakcijsko otapalo** – tip, koncentracija i količina ekstrakcijskog otapala značajno utječe na raspon sastavnica u konačnom ekstraktu. U dokumentaciji za registraciju biljnog lijeka obvezno se navode sve gore spomenute informacije (osim same količine korištenog otapala). Stav je regulatora kako različita vrsta otapala u konačnici rezultira i različitim sastavom konačnog ekstrakta. Dozvoljene su jedino manje varijacije u koncentraciji korištenog otapala za koje se smatra da neće značajno promijeniti sastav ekstrahiranih sastavnica iz biljnog materijala.

- **Proizvodni postupak** – tip ekstrakcijskog postupka koji se koristi za proizvodnju ekstrakta, što uključuje i veličinu serije, temperaturne uvjete i tlak, prepoznati su kao čimbenici koji mogu utjecati na spektar ekstrahiranih sastavnica. Definirani parametri proizvodnog postupka ne utječu samo na količinu dobivenog ekstrakta, već i na sastav ekstrahiranih komponenata.

Kada se određuje jesu li dva ekstrakta u suštini ista, uspoređuju se kromatografski profili nativnih ekstrakata, bez dodanih inaktivnih tvari. Zbog varijabilnosti u sastavnicama biljnog uzorka, kromatografski profili moraju reflektirati moguće varijacije za pojedinu vrstu materijala. Upravo zato je potrebno uzeti u obzir profile materijala koji potječu iz različitih izvora, odnosno utjecaj sezonskih varijacija na same sastavnice. Kromatografski profil obvezno mora uključivati sve prisutne sastavnice u biljnom materijalu, a ne samo one koje su odgovorne za farmakološku aktivnost.

Pri razvoju kromatografskog profila, potrebno je izabrati prikladnu tehniku i ekstrakcijsko otapalo, kao i uvjete eluiranja, odgovarajuću stacionarnu fazu te najprikladniji detektor. Tehnika i uvjeti u kojima se razvija kromatografski profil moraju biti optimirani kako bi dali maksimalnu količinu informacija. Također je moguće kombinirati različite analitičke tehnike u svrhu dobivanja što više informacija iz kromatografskog profila.

Općenito se može reći da tehnike i metode dobivanja kromatografskog *fingerprinta* moraju biti:

- reproducibilne,
- podešene da najbolje odgovaraju karakteristikama sastavnica koje se razvijaju u kromatografskom profilu,
- dovoljno selektivne da razdvoje sastavnice koje su karakteristične za pojedinu biljnu drogu/biljni pripravak,
- takve da se može detektirati maksimalan broj sastavnica,
- dovoljno otporne kako bi omogućile identifikaciju osjetljivih i nestabilnih sastavnica,
- primjenjive u ispitivanju stabilnosti (stabilitetno indikativne),
- optimizirane na način da daju kromatografske profile visoke kakvoće.

Interpretacija kromatografskih profila uključuje:

- definiranje specifikacije za kromatografski profil dobiven iz materijala prihvatljive kakvoće,
- usporedbu veličine, oblika i rasporeda određenih pikova ili zona u uzorku i standardu (referentnom kromatogramu),
- obradu razlika i sličnosti prema specifikaciji kako bi se utvrdilo odgovara li materijal postavljenim zahtjevima.

Jedan od ključnih koraka u interpretaciji upravo je određivanje ključnih identifikacijskih pikova/zona i definiranje tolerancije, a što se onda dalje koristi u procjeni pojedinačnih uzoraka. Taj je postupak potrebno provesti na nekoliko relevantnih valnih duljina kako bi se osiguralo identificiranje svih sastavnica.

U postupku definiranja tolerancije, potrebno je također sagledati sljedeće kromatografske profile:

- kromatografske profile materijala loše kakvoće (navedeno će pokazati tendenciju razgradnje pojedinih sastavnica ili promjene u sastavu),
- kromatografske profile materijala kojima je namjerno dodan krivotvoreni materijal (ili materijal koji se obično nalazi na tržištu kao zamjena) te se na taj način određuje specifičnost same metode dobivanja profila.

Ključnim pikovima/zonama smatraju se oni koji su podložni razgradnji ili mogu biti indikativni kada se procjenjuje radi li se o krivotvorini. Pri određivanju ključnih pikova, ne smije se usredotočiti samo na određene skupine spojeva, primjerice flavonoide. Raspored, veličina i oblik dobivenih pikova koristi se pri izradi specifikacije za pojedini kromatografski *finger print*. Potrebno je uzeti u obzir omjer između pojedinih sastavnica prilikom postavljanja zahtjeva u specifikaciji, a ne se samo usredotočiti na koncentracije pojedinačnih sastavnica. Navedeni omjeri često predstavljaju bolje indikatore kakvoće biljnog ekstrakta/droge, a to je posebno značajno ako je utvrđeno da više sastavnica pokazuje terapijsku aktivnost.

Dozvoljene razlike između pojedinih kromatografskih profila određuju se od slučaja do slučaja. Primjerice, male varijacije mogu biti velik pokazatelj razlike u kakvoći između dva ekstrakta ili biljnih droga, a iste mogu upućivati na prisutnost jedne ili više toksičnih komponenata.

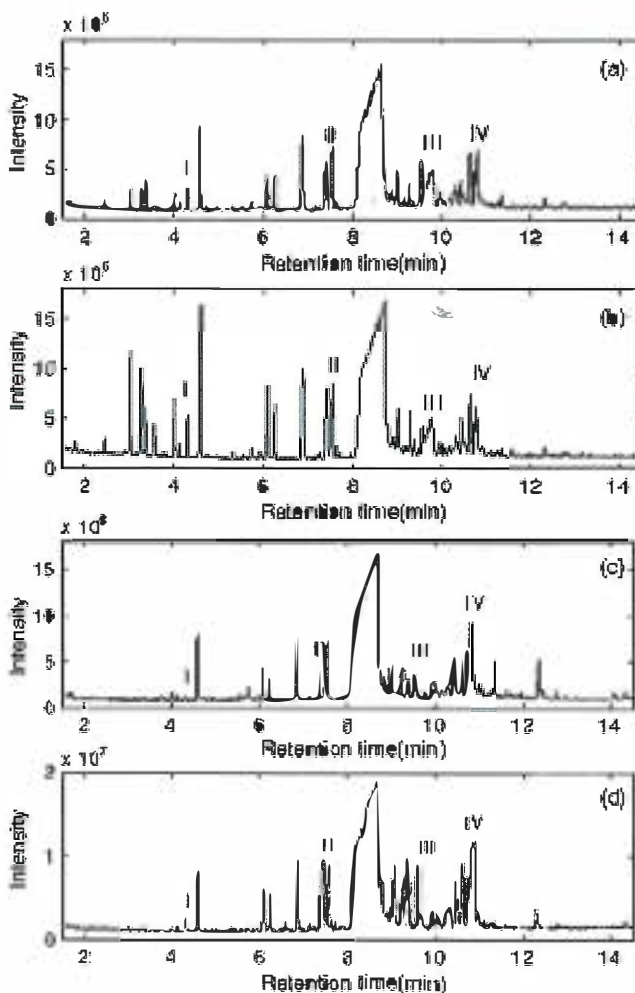
Preporučuje se postavljanje sljedećih granica prilikom pripreme specifikacije:

- za sastavnice s poznatom terapijskom aktivnošću, maksimalne dozvoljene razlike između dva profila su $\pm 10\%$,
- za sastavnice nepoznate strukture ili sastavnice koje nisu nositelji terapijske aktivnosti, maksimalne dozvoljene razlike između dva profila su $\pm 20\%$.

Ukoliko postoji obrazloženje, mogu se prihvatiti i šire granice za pojedinačne sastavnice. Analitičar treba zabilježiti svaku uočenu razliku između kromatografskog profila ispitivanog i referentnog uzorka, posebice vezano uz sastavnice koje su identificirane u specifikaciji. Posebna se pozornost obraća na razlike u sastavnicama koje su nositelji terapijske aktivnosti, ili pak mogu upućivati na krivotvorine ili toksične komponente. Ukoliko se u gotovom proizvodu planira prihvatiti ekstrakt koji se razlikuje za više od postavljenih limita u specifikaciji, takvu je odluku potrebno odgovarajuće obrazložiti.

U nastavku je prikazan primjer fitoekvivalentnih uzoraka (2) (slika 1.). Iako između pojedinih prikazanih *fingerprinta* postoje manje razlike, može se zaključiti da su uzorci izvorni i može se potvrditi fitoekvivalencija svih analiziranih uzoraka droge *Cinnamomi cortex*.

Slika 1. ► Ukupni ionski kromatogrami (TIC) eteričnog ulja iz kore cimeta (*Cortex cinnamomi*); lokaliteti (a) Zhaoqing, pokrajina Guangdong, Kina, (b) Yulin, pokrajina Guangxi, Kina, (c) pokrajina Yunnan, Kina i (d) Vijetnam. Preuzeto iz (2).



Kako je rasprostranjenost biljnih proizvoda iznimno visoka diljem svijeta, provjera njihove kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti primjene predstavljaju veliki izazov (3). U posljednjem desetljeću uložen je ogroman trud kako bi se kakvoća biljnih proizvoda podigla na višu razinu, kao i u razvoj prikladnih

metoda koje osiguravaju njihovu kvalitetu. Danas se kromatografski *fingerprint* smatra općeprihvaćenom tehnikom za provjeru kakvoće polaznih biljnih tvari i gotovih biljnih proizvoda. Kako bi se lakše interpretirali i obradili podatci dobiveni takvim ispitivanjem, koriste se kemometrijske metode koje predstavljaju koristan alat za obradu, razumijevanje i tumačenje velike količine dobivenih analitičkih podataka.

Općenito se može reći da se kontrola kakvoće biljnog uzorka zasniva na tri farmakopejska zahtjeva (16):

- Identifikacija: radi li se o ispravnoj biljnoj vrsti?
- Čistoća: postoji li neki oblik kontaminacije, npr. podmiješana druga biljna vrsta?
- Sadržaj: je li sadržaj djelatnih sastavnica unutar propisanih zahtjeva?

Sadržaj bioaktivnih komponenata vrlo se teško zadovoljavajuće određuje u biljnom materijalu, s obzirom na to da fitoterapijski učinci često proizlaze iz kompleksnih kombinacija različitih tvari. Stoga se u tu svrhu često primjenjuju odgovarajući kemijski biljezi, bez obzira na njihovu biološku aktivnost (17).

U mnogim slučajevima, pojedini biljni biljezi ili grupa sastavnica nisu jedinstveni za određenu biljnu vrstu. Iz navedenog razloga, kao i zbog činjenice da se zanemaruje utjecaj ostalih komponenata na sigurnost i učinkovitost biljnog proizvoda, takav se pristup provjeri kakvoće ne smatra najprikladnijim. Štoviše, djelotvornost nekih biljnih droga ne pripisuje se samo jednoj sastavnici, već specifičnoj kombinaciji više njih. Najpoznatiji primjeri su vrste *Echinacea purpurea* (L.) Moench. (18) i *Hypericum perforatum* L. (19). Dakle, kompletan kemijski profil određenog biljnog pripravka/proizvoda potreban je kako bi se osigurala njegova kakvoća, djelotvornost i sigurnost primjene koje se dokazuju farmaceutskim ispitivanjima i kliničkim studijama.

Brojni radovi bave se izazovima kontrole kakvoće biljnih droga, pripravaka i gotovih proizvoda. S obzirom na složeni sastav biljnog materijala, ogroman se trud ulaže u razvoj analitičkih metoda kojima će se moći odrediti sastav biljnih droga i pripravaka, kao i razviti jedinstveni identifikator – *fingerprint* koji će omogućiti viši stupanj sigurnosti u izvornost i djelotvornost proizvoda na tržištu.

Xiao-na i sur. razvili su učinkovitu metodu kontrole kakvoće biljne droge *Aurantii fructus immaturi* koja se primjenjuje u tradicionalnoj kineskoj medicini (TCM) (20). Najvažnije bioaktivne sastavnice spomenute biljne droge su flavonoidi (hesperidin i naringin) te alkaloidi i eterična ulja (21, 22). Hesperidin, naringin i sinefrin često se koriste kao kemijski biljezi za procjenu kakvoće (23, 24). Razvijena je jednostavna HPLC-DAD metoda ispitivanja kojom je dobiven

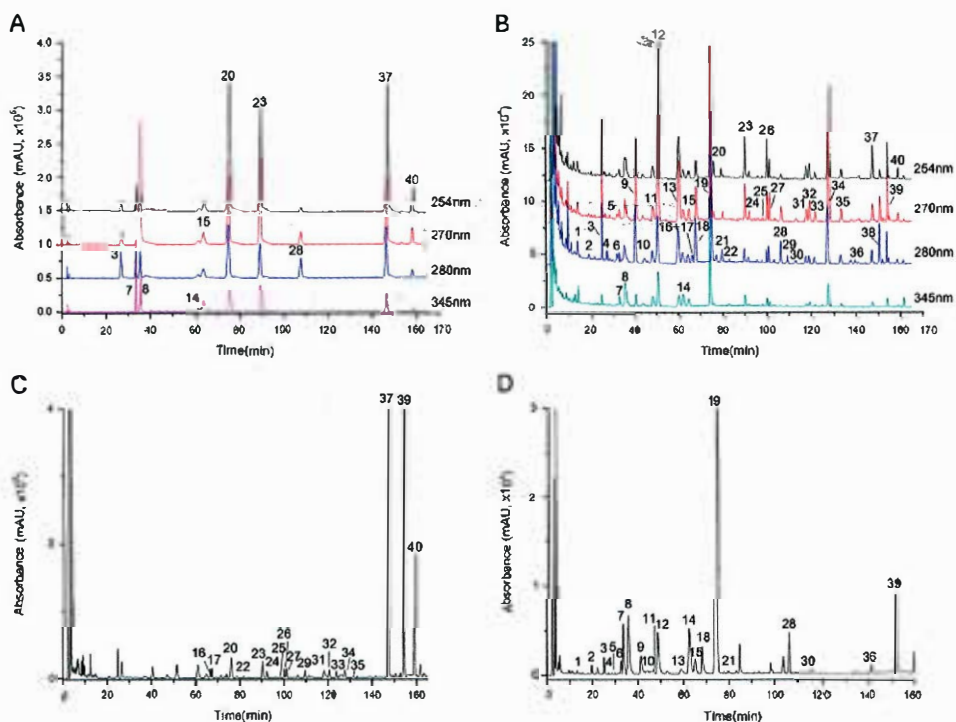
kromatografski *fingerprint* s 28 karakterističnih pikova te je omogućena uspješna kvalitativna i kvantitativna analiza spomenute biljne droge.

U studiji koju su proveli He i sur. (25) razvijena je i validirana HPLC *fingerprint* metoda za provjeru kakvoće i identifikaciju Ziyang zelenog čaja čiji kemijski sastav uključuje polifenole, alkaloide (kofein, teofilin i teobromin), aminokiseline, ugljikohidrate, proteine, klorofil, hlapljive komponente, minerale i dr. (26). Unatoč složenom sastavu, polifenoli predstavljaju najzanimljiviju skupinu spojeva i glavni su nosioci biološke aktivnosti zelenog čaja (27). Razvijen je kromatografski *fingerprint* za 10 serija uzoraka zelenog čaja s različitih lokaliteta te su međusobno uspoređeni koristeći komercijalni analitički softver. Sličnost među pojedinim *fingerprint* profilima bila je veća od 0,981. Dodatno je kvantificirano 10 glavnih bioaktivnih sastavnica u uzorcima zelenog čaja kako bi se potvrdila njegova kakvoća. Zaključeno je kako je predmetna metoda kromatografskog *fingerprinta*, u kombinaciji s analizom sličnosti i kvantitativnim određivanjem bioaktivnih sastavnica, uspješan pristup identifikaciji i kontroli kakvoće Ziyang zelenog čaja.

Metoda kemijskog *fingerprinta* ne koristi se samo za identifikaciju i provjeru kakvoće pojedinih biljnih droga i jednostavnih uzoraka, već je taj pristup iznimno koristan i u provjeri kakvoće složenih biljnih proizvoda (biljnih lijekova, dodataka prehrani i sl.) koji mogu sadržavati više od jedne biljne vrste u svom sastavu i samim time je njihova provjera kakvoće još veći izazov.

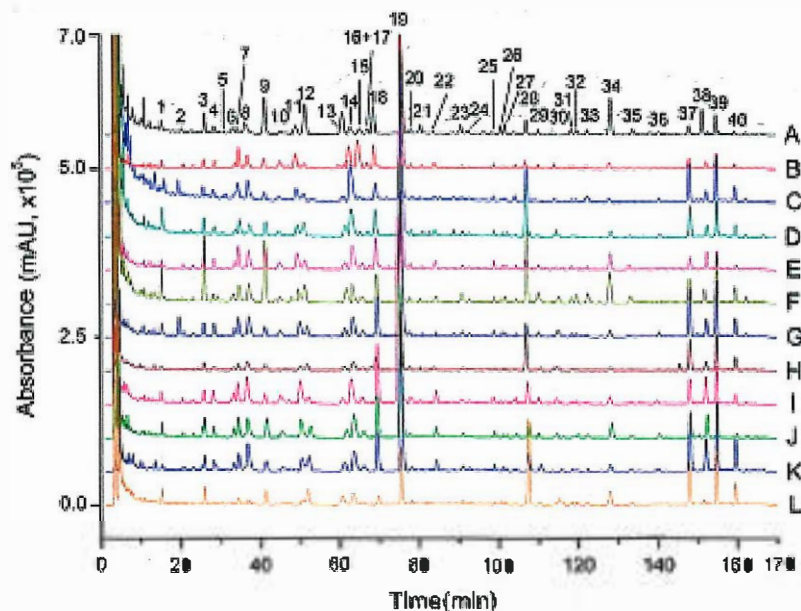
Studija koju su proveli Wang i sur. (28) pokazuje kako je pomoću kromatografskog *fingerprinta*, u kombinaciji s kvantitativnim određivanjem glavnih bioaktivnih sastavnica, moguće napraviti provjeru kakvoće gotovog biljnog TCM proizvoda – Huaijiao pilula. One se primjenjuju za tretiranje hematohezije, edema kod hemeroida, hipertenzije, kroničnog faringitisa, akni i dr. (29, 30). Razvijena je HPLC-DAD metoda ispitivanja kojom je analizirano 17 uzoraka različitih serija od triju proizvođača. U dobivenim kromatografskim *fingerprintima* selektirano je 16 karakterističnih pikova za predmetni proizvod na temelju kojih je procijenjena sličnost pojedinih uzoraka. Sličnosti među pojedinim uzorcima bile su više od 0,966 što znači da su bili uglavnom konzistentni, bez obzira na različite serije i različite proizvođače. Dodatno je provedena kvantifikacija 7 bioaktivnih sastavnica (soforikozida, bajkalina, naringina, genisteina, rutina, kvercetina, i 5-o-metilvizamiozida) te je utvrđena ujednačenost koncentracije većine sastavnica između pojedinih serija istog proizvođača (osim 5-o-metilvizamiozida), ali su se koncentracije navedenih sastavnica značajno razlikovale između različitih proizvođača gotovog proizvoda. Metoda je prihvaćena kao učinkovit alat za provjeru kakvoće spomenutog TCM terapeutika.

Još jedan primjer učinkovite primjene kemijskog *finger*printa u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi kompleksnih biljnih uzoraka obuhvaća razvoj *finger*print strategije za kontrolu kakvoće Yuanhu Zhitong tableta (YZT) pomoću spregnutih tehnika HPLC-DAD-MS/MS (31). Upravo je za TCM proizvode poznato da do njihove terapijske učinkovitosti dolazi uslijed sinergističkog djelovanja velikog broja sastavnica, ali to uvelike otežava odgovarajuću kontrolu kvalitete takvih proizvoda. Stoga je najzastupljeniji pristup ispitivanja TCM proizvoda upravo *finger*print analiza, kojom se može potvrditi sličnost izračunata prema relativnoj vrijednosti unaprijed odabranih biljega (referentne sastavnice) (32), dok se na isti način ne može provesti kvantifikacija. YZT spada u klasični TCM primjer, a proizvod sadrži 223 g biljne droge *Angelicae dahuricae radix*



Slika 2. ► Reprezentativni HPLC-DAD kromatogrami smjese standarda (A) pri 254 nm, 270 nm, 280 nm i 345 nm, YZT (B) pri 254 nm (ksantoksin, bergapten, imperatorin i izoimperatorin), 270 nm (berberin), 280 nm (protopin i tetrahidropalmatin) i 345 nm (jatorizin, koptizin i palmatin); neg. kontrola bez droge *Corydalis radix* (C) i neg. kontr. bez droge *Angelicae dahuricae rhizoma* (D) pri 280 nm. Protopin (3); jatorizin (7); koptizin (8); palmatin (14); berberin (15); ksantoksin (20); bergapten (23); tetrahidropalmatin (28); imperatorin (37); izoimperatorin (40). Razvoj kemijskog *finger*printa proveden pri valnoj duljini od 280 nm. Preuzeto iz (31)

(ADR) i 445 g droge *Corydalis rhizoma* (CR) te se koristi za liječenje glavobolje, bolova u gastrointestinalnom sustavu i dismenoreje (33). Kao djelatne sastavnice u biljnim drogama ADR i CR, prepoznati su alkaloidi i kumarini (34, 35). Postoji nekoliko studija koje opisuju kvantitativnu analizu nekoliko sastavnica s biološkom aktivnošću u YZT (36, 37). No, sve se fokusiraju na određivanje jedne ili nekoliko sastavnica, umjesto na cjelokupni sastav, kakvoću i, posljedično, učinkovitost biljnog proizvoda. Upravo se u navedenoj studiji po prvi puta opisuje upotreba HPLC tehnike s DAD detektorom za razvoj kemijskog *fingerprinta* za YZT od 12 različitih proizvođača. Prosjek svih dobivenih kromatograma predstavljao je standarni kromatogram YZT tableta. U dobivenom kemijskom *fingerprintu* (slike 2. i 3.), 40 je pikova označeno kao »karakteristični pikovi« za YZT (>90 % od ukupne površine); 10 sastavnica je kvantificirano (protopin, jatrorizin, koptizin, palmatin, berberin, ksantotoksin, bergapten, tetrahidropalmitin, imperatorin i izoimperatorin), dok je za ukupno 33 komponente (uključujući 10 kvantificiranih) provedena identifikacija pomoću tehnike ESI-MS/MS. Razvijena HPLC-DAD metoda pokazala je zadovoljavajuću otpornost i reproducibilnost za YZT *fingerprint* analizu. Koeficijenti sličnosti za 12 uzoraka bili su veći od 0,90 što upućuje na to da uzorci različitih proizvođača imaju isti kromatografski profil.



Slika 3. ► HPLC-DAD *fingerprint* kromatogrami za 12 YZT uzoraka. Preuzeto iz (31).

Dobiveni rezultati za analitički prinos (*recovery*, R) izraženi su kao postotak sadržaja pojedine sastavnice i iznosili su 98,9–102,3 %, uz sve RSD vrijednosti manje od 2,5 %, što pokazuje visoku točnost razvijene metode za simultanu analizu deset ispitivanih sastavnica. No, uočena je znatna varijabilnost sadržaja pojedinih ispitanih komponenata, što bi moglo biti uzrok varijacija u terapijskoj djelotvornosti spomenutog TCM terapeutika. Iz svega navedenog može se zaključiti kako se ispitivanjem jedne ili nekoliko sastavnica u biljnom proizvodu ne može provesti odgovarajuća kontrola kakvoće, dok *finger print* pristup osigurava potpuniju i kvalitetniju analizu kompleksnih biljnih uzoraka. To potvrđuje i opisana YZT studija kojom je razvijena i validirana pouzdana i učinkovita spretna HPLC-DAD-ESI-MS/MS metoda kao moćan alat za kontrolu kakvoće kompleksnog TCM biljnog terapeutika.

Zaključak

U ovom je radu opisana i istaknuta važnost odgovarajuće kontrole kakvoće biljnih uzoraka, s obzirom na činjenicu da se velik broj pacijenata oslanja upravo na biljne proizvode kao prvi izbor u samoliječenju. Potrebno je uspostaviti odgovarajuće mjere osiguravanja kakvoće, od samog uzgoja ljekovitog bilja, njegovog sakupljanja, obrade, distribucije i skladištenja, kao i učinkovite sustave kontrole svih faza proizvodnog postupka. Metoda kemijskog *finger printa* suvremen je i prikladan alat za identifikaciju i kontrolu kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka. Za razvoj kemijskog *finger printa* najčešće se koristi kombinacija kromatografskih i spektroskopskih tehnika. Ispravna identifikacija mora potvrditi da uzorak potječe od određene biljne vrste i isključiti mogućnost drugih izvora, te se stoga provodi usporedba *finger printa* ispitivanog uzorka i *finger printa* ekstrakta referentnog biljnog standarda. Kombinacijom kvalitativnog *finger print* profila i kvantitativne analize fitokemijskih sastavnica, može se provesti učinkovita kontrola kakvoće kompleksnog biljnog materijala ili proizvoda.

Treba također naglasiti važnost uspostave zakonskih okvira za sve regulatorne skupine proizvoda koji sadrže ljekovito bilje ili biljne pripravke. Kroz primjenu zakonskih odredbi za biljne lijekove, osigurava se potrebna kakvoća, djelotvornost i sigurnost njihove primjene, čime je osigurana zaštita korisnika. Za slabije regulirane biljne proizvode (npr. TCM terapeutici), važno je ukazati na potrebu znatnog pooštavanja zakonskih propisa. Upravo to potvrđuju i rezultati

recentnih komparativnih znanstvenih studija koje uključuju suvremene analitičke i kemometrijske pristupe u ispitivanju i kontroli kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka.

S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti da kemijski *fingerprint* predstavlja značajan korak naprijed u ispitivanju i kontroli kakvoće biljnih proizvoda u kategorijama koje nisu strogo zakonski regulirane. Budućnost donosi razvoj kombinacije metoda *fingerprint* profila s ispitivanjem terapijske učinkovitosti biljnog proizvoda. Time će se uspostaviti novi standardi u kontroli kakvoće i postići tržišna dostupnost kompleksnih biljnih proizvoda odgovarajuće kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti primjene.



Chemical fingerprint in quality control of herbal drugs and preparations

K. Janeković Petras, R. Jurišić Grubešić

Abstract The aim of the paper is to emphasize the importance of proper identification and quality control of herbal material to ensure the quality, efficacy and safety of related herbal medicinal product. Research in this paper includes a detailed overview of the available professional and scientific literature. Themes are related to the field of analytical and quality control of herbal material and herbal medicinal products with the help of a chemical fingerprints. A detailed description of the field of application of chemical fingerprints in the pharmaceutical analysis provides an insight into the significance of this analytical approach and highlights its importance in the establishment of new standards for the quality control of herbal products. The widespread use of chemical fingerprints in the analysis of complex plant specimens accelerates and facilitates the characterization of such products and contributes to the standardization of their quality on the market. Overview brings systematized information on the role of chemical fingerprint in the characterization of complex herbal samples.

1. Yongyu Z, Shujun S, Jianye D, Wenyu W, Huijuan C, Jianbing W i sur. Quality Control Method for Herbal Medicine – Chemical Fingerprint Analysis. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. Prof. Shoyama Y (Ed.). InTech., 2011; DOI: 10.5772/23962.
2. Kamboj A. Analytical Evaluation of Herbal Drugs. Drug Discovery Research in Pharmacognosy. Prof. Vallisuta O (Ed.). InTech., 2012; DOI: 10.5772/26109.
3. Ravikanth K, Kanaujia A, Thakur D, Sharma AK, Singh P. Establishing the phytoequivalence of an antidiarrhoeal and function modulator feed additive – Salcochek. *Int J Adv Res.* 2013; 1(10):119–128.
4. Bakrač Posavec K. Analiza temeljena na bilježima u kontroli kakvoće biljnih lijekova. Završni specijalistički rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 2012.
5. Kulkarni KM, Patil LS, Khanvilkar VV, Kadam VJ. Fingerprinting techniques in herbal standardization. *IAJPS* 2014; 4(2):1049–1062.
6. Shinde VM, Dhalwal K. Application of quality control principles to herbal drugs. *Int J Phytomedicine.* 2009; 1:4–8.
7. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Pharmaceuticals Unit. Geneva WHO, 1992.
8. Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lherietier J, Grenier-Loustalot MF. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *J Chromatogr A.* 2003; 1021(1–2):145–155.
9. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: Botanical drug Products. FDA, 2004.
10. The Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). CPMP/QWP/2820/00 Rev. 2, Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products /traditional herbal medicinal products. HMPC, 2011.
11. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva WHO, 2003.
12. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. World Health Organization. Dept. of Technical Cooperation for Essential Drugs and Traditional Medicine. Geneva WHO, 2007.
13. Tyler VE. Phytomedicines: Back to the Future. *J Nat Prod.* 1999; 62:1589–1592.
14. Mahajan VM, Kulkarni GB, Deshpande SD, Karte AG, Deshpande AR, Ravikanth K. Therapeutic evaluation of Salochek: a polyherbal bactericidal feed additive against induced colibacillosis in broilers. *Animal Science Reporter (e-edition).* 2011; 5(4):128–134.
15. Therapeutic Goods Administration. Guidance on equivalence of herbal extracts in Complementary Medicines. TGA, 2011.
16. Dey A, Singh GN, Easwari TS, Pandey MK. Analytical techniques in quality evaluation of herbal drugs. *Asian J Pharm Res.* 2014; 4(3):112–117.

17. Sharma PP. How to practice GMPs, 7th edition. Vandana publications, 2015.
18. Foster S, Tyler VE. Tyler's Honest Herbal. Haworth Herbal Press. New York, 1999.
19. Murray MT. Common questions about St. John's wort extract. *Am J Nat Med.* 1997; 4(2):14–19.
20. Xiao-na X, Jun-hui J, Yi-zeng L, Xiao-ru L, Lun-zhao Y. Chromatographic fingerprint analysis of Fructus Aurantii Immaturus by HPLC-DAD and chemometrics methods. *J Cent South Univ T.* 2011; 18(2):353–360.
21. Jian Y. The modern study and clinical application of Chinese medicine. Publishing House of Xueyuan, Beijing 1993.
22. Wenkai W, Xiaolan G. The study progress of immature bitter orange. *Hunan Guiding Journal of TCM.* 2003; 9(12): 55–56.
23. Yu-ting C, Rong-liang Z, Zhong-jian J, Yong J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants [J]. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9(1):19–21.
24. Carpenne C, Galitzky J, Fontana E, Atgie C, Lafontan M. Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: Comparative studies in mammalian fat cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 359(4):310–321.
25. He X, Li J, Zhao W, Liu R, Zhang L, Kong X. Chemical fingerprint analysis for quality control and identification of Ziyang green tea by HPLC. *Food Chem.* 2015; 171:405–411.
26. Karori SM, Ngure RM, Wachira FN, Wanyoko JK., Mwangi J. Different types of tea products attenuate inflammation induced in *Trypanosoma brucei* infected mice. *Parasitol Int.* 2008; 57:325–333.
27. Cabrera C, Giménez R, López MC. Determination of tea components with antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2003; 51:4427–4435.
28. Wang S, Zhang J, Guangsheng JL, Fu QC. Quality evaluation of Huaijiao pill by chromatographic fingerprint and simultaneous determination of its major bioactive components. *JPA.* 2016; 6(4):249–255.
29. Dong YX, Wang W. 63 cases of Huaijiao pill on hypertension. *Shaanxi J Tradit Chin Med.* 2001; 22:604.
30. Lu ZL, Liu YH. Decoction of Huaijiao to treat 175 cases of chronic pharyngitis. *China Naturop.* 1997; 6:28.
31. Tang DQ, Zheng XX, Chen X, Yang DZ, Du Q. Quantitative and qualitative analysis of common peaks in chemical fingerprint of Yuanhu Zhitong tablet by HPLC-DAD-MS/MS. *JPA.* 2014; 4(2):96–106.
32. Xu CJ, Liang YZ, Chau FT et al. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. *J Chromatogr A.* 2006; 1134(1–2):253–259.
33. National Commission of Chinese Pharmacopoeia: Pharmacopoeia of Peoples Republic of China. Chemical Industry Press. Beijing, 2010.
34. Wang KT, Liu HT, Chen XG et al. Identification and determination of active components in *Angelica dahurica* Benth and its medicinal preparation by capillary electrophoresis. *Talanta.* 2001; 54(4):753–761.

35. Zhang J, Jin Y, Dong J, et al. Systematic screening and characterization of tertiary and quaternary alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*. 2009; 78(2):513–522.
36. Wang GF, Liao ZG, Liang XL, et al. Determination of three active components in Yuanhu Zhitong tablet by HPLC. *China Pharm*. 2009; 20(9):672–674.
37. Zhang Y, Xu H, Chen X, et al. Simultaneous quantification of 17 constituents from Yuanhu Zhitong tablet using rapid resolution liquid chromatography coupled with a triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2011; 56(3):497–504.

Primljeno 3. ožujka 2020.