Antracenski derivati u pripravcima sene i krkavine na hrvatskom tržištu

Horvacki Zivalov, Tea

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

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:163:374912

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tea Horvacki Zivalov

ANTRACENSKI DERIVATI U PRIPRAVCIMA SENE I KRKAVINE NA HRVATSKOM TRŽIŠTU

Specijalistički rad

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tea Horvacki Zivalov

ANTRACENSKI DERIVATI U PRIPRAVCIMA SENE I KRKAVINE NA HRVATSKOM TRŽIŠTU

Specijalistički rad

Zagreb, 2015.

PSS studij: RAZVOJ LIJEKOVA

Mentor rada: doc. dr. sc. Biljana Blažeković, mag. pharm.

Specijalistički rad obranjen je dana 9. veljače 2015. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

   Sveučilište u Zagrebu
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. Doc. dr. sc. Biljana Blažeković

   Sveučilište u Zagrebu
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. Dr. sc. Ivana Čepelak, professor emerita

   Sveučilište u Zagrebu
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Rad ima 91 list.

PREDGOVOR

Specijalistički rad izrađen je pod stručnim mentorstvom doc. dr. sc. Biljane Blažeković, mag. pharm. sa Zavoda za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Eksperimentalni dio rada proveden je na istoimenom Zavodu.

Posebno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Biljani Blažeković, mag. pharm. na trudu i pomoći od izbora teme rada, pa sve do njegova završnog oblikovanja.

SAŽETAK

Antracenski derivati skupina su farmakološki aktivnih prirodnih spojeva izraženog laksativnog djelovanja i glavne su djelatne sastavnice biljnih droga i pripravaka sene i krkavine. U okviru rada dat je pregled najnovijih saznanja o primjeni droga Sennae folium, Sennae fructus i Frangulae cortex kao laksativa, njihovom fitokemijskom sastavu, mehanizmima djelovanja, te kliničkim dokazima njihove učinkovitosti. S ciljem usporednog vrjednovanja kakvoće fitopreparata sene i krkavine dostupnih u Republici Hrvatskoj, u radu su provedena fitokemijska ispitivanja propisana u relevantnim monografijama Europske farmakopeje (Ph. Eur. 7). Provedena je identifikacija biljnih droga i pripravaka sene i krkavine, temeljena na dokazivanju prisutnosti djelatnih senozida i glukofrangulina. Poseban naglasak u radu stavljen je na određivanje sadržaja antracenskih derivata, kao najznačajnijeg pokazatelja njihove kakvoće odnosno terapijske djelotvornosti. Utvrđeno je da svi uzorci koji su u prometu kao biljni lijekovi zadovoljavaju zahtjeve propisane Farmakopejom, dok oni iz ostalih regulatornih skupina imaju dosta širok raspon sadržaja djelatnih tvari. Farmakopejske metode primijenjene su i za kvantifikaciju antracenskih derivata u višekomponentnim fitopreparatima sene i krkavine. Razlike u sadržaju određivanih markera upućuju na potrebu standardizacije biljnog materijala i ekstrakata s ciljem osiguravanja kakvoće gotovog pripravka, a time i njegove učinkovite i sigurne primjene. Uočena je i potreba za razvojem i implementacijom novih, suvremenijih i bržih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih antracenskih sastavnica, posebice u sve zastupljenijim kombiniranim pripravcima. Rezultati rada ukazuju i na potrebu usklađivanja i unaprjeđivanja legislative u području biljnih pripravaka, sa svrhom zaštite zdravlja pacijenata.

SUMMARY

Anthracene derivatives are class of the pharmacologically active natural compounds with laxative activity, and known to be the main constituents of senna and frangula. Within this study, knowledge on the medicinal properties of the *Cassia* and *Frangula* plants is enlarged by recent scientific reports on their phytochemical composition, *in vitro* and *in vivo* studies on the mechanisms of their activity and toxicity as well as the clinical proof of their efficiency. Comparative phytochemical analyses of senna- and *frangula*- containing medicinal products were performed according to appropriate European Pharmacopoeia monographs, with a goal to evaluate and compare the quality of all anthracen laxatives available on the Croatian market. Identification of studied herbal drugs and their preparations was based on detection of active sennosides and glucofrangulins. Special emphasis was given to determination of total anthracene derivatives contents, as the most important indicator of the herbal medicine quality and therapeutic effectiveness. All products registered as herbal drugs complied with prescribed requirements, while phytotherapeutics belonging to other regulatory categories showed a wide variation in anthracene derivatives content. Pharmacopoeial methods were also applied for quality control of multi-component herbal preparations containing senna- or frangula-herbal drugs. Considerable differences in contents of marker compounds suggested that standardization of raw plant material and extracts may be necessary for quality assurance of herbal medicines and also for their effective and safety use. There is a need for development and implementation of new, modern and faster methods for identification and quantification of anthracene constituents, especially for analyses of polyherbal preparations. The results indicated the need for harmonisation and improvement of legislation in the field of herbal preparations, in order to protect the health of patients.

SADRŽAJ

PREDGOVOR..... I

SAŽETAK II

SUMMARY..... III

SADRŽAJ IV

1. UVOD..... 1

1.1 Fitoterapija i fitopreparati..... 1

1.1.1 Kakvoća fitopreparata..... 3

1.1.2 Sigurnost primjene fitopreparata..... 5

1.1.3 Regulatorni status fitopreparata..... 7

1.2 Opstipacija i laksativi 10

1.2.1 Opstipacija..... 10

1.2.2 Laksativi..... 11

1.2.2.1. Antracenski laksativi 12

1.3 Antracenski spojevi u ljekovitim drogama sene i krkavine..... 15

1.3.1 Senin list (Sennae folium) i senin plod (Sennae fructus) 15

1.3.2 Krkavinina kora (Frangulae cortex)..... 19

1.3.3 Klinička učinkovitost fitopreparata sene i krkavine..... 22

1.3.4 Farmakopejske monografije biljnih droga sene i krkavine 23

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 31

3. MATERIJAL I METODE..... 32

3.1 Fitopreparati sene i krkavine 32

3.2 Kemikalije, standardi, instrumenti i pribor 35

3.3 Metode 37

3.3.1 Kvalitativna analiza antracenskih derivata u fitopreparatima sene i krkavine tankoslojnom kromatografijom..... 37

3.3.2 Kvantitativna analiza antracenskih derivata u fitopreparatima sene i krkavine 38

4. REZULTATI I RASPRAVA 43

4.1 Raspodjela ispitivanih fitopreparata sene i krkavine prema sastavu, farmaceutskom obliku i regulatornom statusu 43

4.2 Kvalitativna analiza antracenskih derivata u fitopreparatima sene i krkavine 46

4.2.1 Tankoslojna kromatografija fitopreparata sene 46

4.2.2 Tankoslojna kromatografija fitopreparata krkavine..... 52

4.3 Kvantitativna analiza antracenskih derivata u fitopreparatima sene i krkavine 55

4.3.1 Sadržaj senozida u fitopreparatima sene..... 57

4.3.2 Sadržaj glukofrangulina u fitopreparatima krkavine 63

5. ZAKLJUČCI..... 71

6. LITERATURA 75

POPIS SKRAĆENICA I KRATICA..... 82

7. ŽIVOTOPIS..... 83

1. UVOD

1.1 Fitoterapija i fitopreparati

Korištenje biljaka u liječenju različitih bolesti datira još iz najranijih razdoblja ljudske civilizacije pa se fitoterapija smatra najdrevnijim oblikom liječenja koji je i danas vrlo popularan u svijetu i važan je dio suvremene medicine. Razvoj fitoterapije temelji se na empirijskim spoznajama prikupljanim i prenošenim s generacije na generaciju tijekom niza stoljeća, te utkanim u tradicionalne sustave liječenja koji su sastavni dio kulturne baštine brojnih naroda. Najpoznatiji svjetski tradicionalni medicinski sustavi, kineska medicina, tibetanska medicina, indijska Ajurveda i Unani medicina, uvelike se oslanjaju na biljnu medicinu koja se danas, jednako uspješno kao i tijekom povijesti, prakticira u prevenciji i liječenju različitih zdravstvenih problema te je sastavni dio nacionalnih zdravstvenih sustava [1, 2, 3]. Suprotno tradicionalnom konceptu primjene ljekovitih biljaka, temeljenom prvenstveno na iskustvu iz dugotrajne uporabe, u europskim je zemljama razvijen i široko prihvaćen suvremeni koncept primjene biljnih lijekova poznat kao racionalna fitoterapija. Nastala je radi potrebe za razvojem i unaprjeđenjem fitoterapije, kako bi biljni preparati bili učinkovitiji, njihova primjena sigurnija i temeljena na znanstvenim, prvenstveno kliničkim dokazima [4, 5]. Naime, iako je u razvijenim zapadnim zemljama liječenje biljkama imalo veliku važnost sve do kraja 19. stoljeća, s napretkom u farmaceutskim i medicinskim znanostima, njihovu su dominaciju postepeno potisnuli moderniji sintetski lijekovi. Međutim, u novije vrijeme na globalnoj je razini ponovo sve izraženiji porast zanimanja za fitoterapiju i fitopreparate. Posljedica je to jačanja opće svijesti o važnosti očuvanja zdravlja i rastuće popularnosti prirodnih lijekova, ali i nezadovoljstva konvencionalnom terapijom uslijed nedostatne djelotvornosti i sve

brojnijih nuspojava [6]. Upravo fitoterapeutici vrlo često predstavljaju prvi izbor u samoliječenju, a pacijenti ih odabiru bilo u svrhu prevencije razvoja različitih oboljenja ili liječenje blažih stanja bolesti, odnosno kao dodatnu terapiju kod kroničnih oboljenja. Razlog tomu leži u činjenici da su pripravci biljnog porijekla široko dostupni, relativno jeftini, često s privlačnim zdravstvenim tvrdnjama, a prije svega zbog općeprihvaćenog mišljenja da su prirodni i zbog toga potpuno sigurni i bez neželjenih djelovanja [7]. Biljni preparati koji se koriste u racionalnoj fitoterapiji sadrže standardizirane biljne droge i ekstrakte, dakle poznatog su kemijskog sastava i sadržaja djelatnih tvari i propisane farmaceutske kakvoće, te pokazuju o dozi ovisan terapijski učinak, a poznata su i njihova neželjena djelovanja, kontraindikacije i interakcije, pa su kao takvi sastavni dio suvremene medicine.

Prema definiciji Europske agencije za lijekove (*engl.* European Medicines Agency, EMA) biljni ljekoviti proizvodi (fitopreparati) su oni ljekoviti proizvodi koji isključivo sadrže djelatne tvari biljnog porijekla, tj. jednu ili više biljnih droga/tvari, jedan ili više biljnih pripravaka ili njihovu mješavinu. Biljne droge/tvari su cjelovite ili usitnjene biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi ili gljive u osušenom (rjeđe svježem) obliku i neobrađene izlučine biljaka. Biljni pripravci se dobivaju iz biljnih droga usitnjavanjem, ekstrakcijom, destilacijom, frakcioniranjem, pročišćavanjem, ukoncentriravanjem, ili fermentacijom. Obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne droge, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka [6]. Pod djelatnim tvarima u fitopreparatima ne podrazumijevaju se čisti kemijski spojevi prisutni u biljci jer različite tvari prisutne u biljnoj drogi/pripravku mogu međusobno imati sinergistički odnos po pitanju djelotvornosti i neškodljivosti te često biljna droga odnosno njen pripravak pokazuje bolje djelovanje i ima manji rizik od neželjenih učinaka u odnosu na ekvivalentnu količinu izolirane sastavnice [7].

1.1.1 Kakvoća fitopreparata

Fitopreparati imaju osobita obilježja po kojima se uvelike razlikuju od sintetskih lijekova: sadrže više od jedne bioaktivne sastavnice i mehanizam djelovanja im vrlo često nije potpuno razjašnjen [9]. Ishodni biljni materijal koji se koristi za njihovu proizvodnju potječe iz uzgoja ili se dobiva sakupljanjem samoniklih biljaka iz prirode. Kemijski sastav ljekovitih biljaka stoga može biti vrlo promjenjiv jer na njega utječe niz različitih čimbenika, od onih genetskih pa do geografskog položaja i uvjeta rasta (pedološki uvjeti, godišnje varijacije temperature i vlažnosti, količina oborina, dužina dana, vrijeme sijanja, upotreba pesticida i gnojiva, gustoću nasada i dr.). Osim navedenih unutarnjih, na kakvoću fitopreparata utječu i vanjski čimbenici među koje ubrajamo kontaminaciju (teškim metalima, pesticidima, mikroorganizmima ili mikotoksinima), patvorenje (dodavanje kemijskih tvari, zamjena biljkama slabije kakvoće, dodatak drugih biljnih dijelova) i zamjenu uslijed pogrešne identifikacija biljaka [9, 10]. Razlike u kemijskom sastavu ishodnog biljnog materijala zajedno s različitim postupcima proizvodnje među proizvođačima mogu rezultirati značajnim razlikama u kakvoći fitopreparata. Kako bi se osigurala njihova farmaceutska kakvoća, u proizvodnji polaznih biljnih sirovina potrebno je slijediti smjernice Dobre poljoprivredne i sakupljačke prakse (*engl.* Good agricultural and collection practices, GACP) [11], a u proizvodnji biljnog preparata primijeniti smjernice Dobre proizvođačke prakse (*engl*. Good manufacturing practice, GMP) [12] koje su donijele Europske agencije za lijekove (*engl*. European Medicines Agency, EMA) i Svjetska zdravstvene organizacije (*engl*. World Health Organization, WHO). Ujednačena i dosljedna kakvoća fitopripravaka postiže se standardizacijom ili kvantifikacijom biljne sirovine jer se time dobiva proizvod s određenom količinom djelatnih sastavnica, dok

se istovremeno neke neželjene bioaktivne tvari mogu ukloniti. U tu svrhu EMA je definirala markere koji se prema analitičkoj i terapijskoj namjeni mogu podijeliti na:

1. djelatne tvari – kemijski definirana sastavnica ili skupina sastavnica poznate kliničke djelotvornosti, čiji sadržaj određuje vrijednost biljne droge/pripravka;
2. djelatni markeri – kemijski definirane sastavnice ili skupina sastavnica s farmakološkim svojstvom, koje zajedno s drugim prisutnim tvarima doprinose djelotvornosti biljne droge/pripravka (ne postoji dokaz da su same odgovorne za kliničku djelotvornost);
3. negativni markeri – neželjene sastavnice biljne droge/pripravka (npr. alergeni, toksini)
4. analitički (nedjelatni) markeri – glavne sastavnice biljne droge/pripravka koje se koriste samo u analitičke svrhe (npr. za „fingerprint“ analizu, izražavanje količine biljne droge/pripravka u gotovom lijeku ukoliko je određen sadržaj prisutnog analitičkog markera) [13].

Neki od izazova koji se javljaju tijekom standardizacije fitopreparata su problematična identifikacija biljnog materijala, namjerna patvorenja, te problemi kontaminacije tijekom skladištenja i transporta [14]. S obzirom na kompleksnost njihove kakvoće, upravo su nedostatci u profilima standardne kontrole fitopreparata jedna od glavnih prepreka njihovom općem prihvaćanju u razvijenijim dijelovima svijeta. Naime, velik broj biljnih formulacija sadrži desetak ili više bioaktivnih sastavnica, pa je za te preparate teško definirati parametre kontrole kvalitete. Isto tako često nisu dostupni ni referentni standardi djelatnih tvari ili drugih važnih markera. Provjeru kakvoće fitopreparata znatno otežava podatak da je često riječ o višekomponentnim preparatima tijekom čije proizvodnje dolazi do miješanja pojedinačnih droga u kompleksnu mješavinu iz koje je ponekad vrlo teško izdvojiti, identificirati i analizirati svaku od sastavnica [14].

Iz navedenog je razvidno da je osiguranje propisane kakvoće fitopreparata vrlo zahtjevan proces, te je stoga važno slijediti GACP i GMP smjernice tijekom cijelog procesa proizvodnje kako bi se dobio proizvod prihvatljive kakvoće. Provjera kakvoće mora pratiti razvoj ljekovitog biljnog proizvoda od samih polaznih biljnih sirovina do gotovog preparata koji dolazi na tržište, jer samo fitopreparat farmaceutske kakvoće može osigurati očekivani terapijski učinak i siguran je za primjenu.

1.1.2 Sigurnost primjene fitopreparata

Unosom u ljudski organizam ljekovite tvari mogu osim poželjnog, terapeutskog učinka, izazvati i neželjene, za organizam štetne učinke. Biljni ljekoviti preparati sadrže više od jedne bioaktivne tvari, a povećanjem broja aktivnih tvari povećava se i mogućnost pojave interakcija i nuspojava [15, 16].

Niz je različitih razloga zbog kojih se pri primjeni fitopreparata mogu javiti štetne reakcije. Kao najčešće se navode zamjena sa štetnim/otrovnim biljnim vrstama ili korištenje neodgovarajućih biljnih dijelova, pogreške u doziranju ili načinu primjene preparata, interakcije s drugim lijekovima, kontaminacija biljnog materijala teškim metalima, pesticidima ili patogenim mikroorganizmima ili pak krivotvorenje dodatkom nedeklariranih sintetskih farmakološki aktivnih tvari [17]. Zamjena s drugom biljnom vrstom najčešće se događa zbog pogrešne identifikacije biljnog materijala, uglavnom pri sakupljanju biljaka iz prirodnog staništa, i najčešće je posljedica nedovoljne educiranosti samih sakupljača. Problem identifikacije javlja se i zbog korištenja neodgovarajućeg nazivlja, najčešće stranih narodnih imena biljaka, i sve je učestaliji na globalnom tržištu ljekovitih biljaka. U praksi su česti primjeri zamjene biljnih droga tradicionalne kineske medicine gdje pojedini isti ili vrlo slični kineski nazivi

označavaju više potpuno različitih biljnih vrsta. Zbog toga se uvijek preporuča korištenje latinskih binomnih naziva (rod, vrsta, podvrsta i autor) kako bi označavanje biljaka bilo jednoznačno svugdje u svijetu [7, 17].

Ujednačenost fitokemijskog sastava i farmaceutska kakvoća preduvjet su ostvarivanju sigurne i učinkovite primjene fitopreparata, no njihovo ispunjavanje nije nimalo jednostavno. Posljedica je to niza čimbenika koji na njih utječu, od problema identifikacije, genetičke varijabilnosti, raznolikih uzgojnih uvjeta, procesa skupljanja i prerade biljnog materijala, do isto tako značajnog nedostatka znanstvenih podataka o djelatnim tvarima te farmakološkom i toksikološkom djelovanju. Pripravci različitih proizvođača mogu se značajno razlikovati jer je gotovo nemoguće kontrolirati sve faktore koji utječu na kemijski sastav biljne droge i gotovog pripravka. Stoga je i s aspekta sigurnosti važno standardizirati biljne droge i njihove pripravke kako bi se osigurao ujednačen sadržaj i sastav sastavnica i tako zajamčila učinkovita i sigurna primjena [7].

Veliki broj ljekovitih biljaka, kao i sintetski lijekovi, pokazuje ljekovito djelovanje u jednoj dozi, a u drugoj višoj dozi djeluje toksično. Interakcije između više biljaka ili biljaka i lijekova mogu povećati ili smanjiti farmakološki ili toksikološki učinak pojedinih sastavnica. Sinergijski ili antagonistički terapijski učinci mogu komplicirati doziranje kod dugotrajnog liječenja. Primjer su često korišteni fitopreparati čije sastavnice inhibiraju metabolizam lijekova inhibicijom enzima citokroma P450 (ginkgo, kava, noćurak, gospina trava, češnjak) [7, 16]. U novije se vrijeme zbog sve većeg trenda istodobne primjene intenzivno proučavaju interakcije konvencionalnih lijekova i biljnih preparata [18].

Budući da pacijenti fitopreparate najčešće koriste u preveciji ili samoliječenju te ih smatraju potpuno prirodnim i sigurnim, pojavu neželjenih učinaka često niti ne povezuju s njihovom primjenom. Isto tako njihovo korištenje u velikom broju slučajeva ne spominju svojemu liječniku, koji tako ne može povezati nuspojavu s uzimanjem određenog biljnog preparata. Navedeni razlozi glavni su uzrok dosadašnjeg malog broja prijavljenih nuspojava. Međutim, značajni porast upotrebe biljnih preparata kao i trgovina biljnim sirovinama na globalnoj razini smatraju se najzaslužnijim za pojavu sve većeg broja nuspojava. Posljednjih nekoliko godina regulatorna su tijela intenzivirala svoje aktivnosti vezane uz poticanje korisnika lijekova i zdravstvenih djelatnika na prijavu nuspojava na fitopreparate [19].

1.1.3 Regulatorni status fitopreparata

Zakonska regulativa biljnih proizvoda je vrlo kompleksno područje, karakterizirano značajnim razlikama i podložno čestim promjenama. U Republici Hrvatskoj biljne droge i njihovi pripravci na tržište dolaze u četiri različite skupine: kao hrana i dodaci prehrani koji podliježu Zakonu o hrani [20] te biljni lijekovi i galenski pripravci koji podliježu Zakonu o lijekovima [21]. Sam problem nadzora i kontrole kakvoće fitopreparata usko je povezan s njihovim regulatornim statusom.

Hrana je zakonski definirana kao "svaka tvar ili proizvod prerađen, djelomično prerađen ili neprerađen, a namijenjen je konzumaciji ili se može opravdano očekivati da će ga ljudi konzumirati" i pri tom "nije dopušteno stavljati na tržište zdravstveno neispravnu hranu" [20] te se mora osigurati sljedivost u njenoj proizvodnji i prodaji. Dodacima prehrani "smatraju se pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu

dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja“. Pod „drugim tvarima“ podrazumijevaju se biljne vrste i ekstrakti biljnih vrsta, kao i aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom. Njihovo je stavljanje na tržište Republike Hrvatske dodatno regulirano Pravilnikom o dodacima prehrani [22]. Temelji se na pismenom obaviještavanju Ministarstva zdravlja o stavljanju u promet dodatka prehrani. Prethodno ishođenje odobrenja od strane Povjerenstva za dodatke prehrani pri Ministarstvu zdravlja potrebno je samo ako se na tržište želi staviti preparat s navedenom još neodobrenom zdravstvenom tvrdnjom, ili ako sadrži neodobrenu biljnu vrstu. Provjera kakvoće prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani vrši se na zahtjev sanitarne inspekcije, no pri tome se najčešće ne vrši potpuna kontrola kakvoće pripravka već se samo provjerava zdravstvena ispravnost koja obuhvaća određivanje teških metala i mikrobiološku čistoću, što ukazuje na to da njihova kakvoća nije rutinski regulirana. S ciljem usklađivanja sa zakonskom regulativom Europske unije u području dodataka prehrani i zdravstvenih tvrdnji u novije je vrijeme doneseno još nekoliko zakonskih propisa kojima se regulira njihov sastav, označavanje i stavljanje na tržište [23, 24, 25].

Prema Zakonu o lijekovima, lijekom se smatra „svaka tvar ili mješavina tvari namijenjena liječenju ili sprječavanju bolesti kod ljudi odnosno svaka tvar ili mješavina tvari koja se može primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili postavljanja medicinske dijagnoze“. „Tvar“ može biti kemijska ili pak ljudskoga, životinjskog ili biljnog podrijetla (npr. mikroorganizmi, biljke, dijelovi biljaka, izlučine biljaka, biljni ekstrakti). Biljni lijek definiran je kao lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više biljnih tvari ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili

više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka. Kao zasebna skupina izdvaja se tradicionalni biljni lijek čiju je sigurnost primjene i djelotvornost moguće prepoznati na temelju njegove tradicionalne uporabe od najmanje 30 godina, od toga najmanje 15 godina u Europskoj uniji. Registracija tradicionalnog biljnog lijeka odvija se po pojednostavljenom postupku, s obzirom na sadržaj dokumentacije o sigurnosti primjene i djelotvornosti lijeka, no farmaceutska kakvoća mora biti propisano dokazana. Zakonom o lijekovima utvrđeni su postupak ispitivanja i stavljanja u promet, proizvodnja, označavanje, klasifikacija, promet, farmakovigilancija, oglašavanje i informiranje, nadzor nad lijekovima te provjera njihove kakvoće [21]. Odobrenje za stavljanje lijekova u promet u Republici Hrvatskoj izdaje Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), na temelju dostavljenih rezultata farmaceutskih ispitivanja (fizikalno-kemijskih, bioloških i mikrobioloških ispitivanja) te izvješća o nekliničkim i kliničkim ispitivanjima. U postupku davanja i obnove odobrenja za stavljanje lijeka u promet Agencija kontrolira njegovu kakvoću, te se naknadno također provjerava kakvoća lijekova iz prometa, najmanje jednom u razdoblju važeće registracije od pet godina. Sam proizvođač lijeka zakonski je obvezan obavljati redovitu provjeru kakvoće svake serije lijeka.

Galenski pripravak je "lijek izrađen u laboratoriju ljekarne ili u galenskom laboratoriju prema postupku izrade u važećoj farmakopeji ili prema standardnoj recepturi iz stručnih farmaceutskih priručnika te normama dobre prakse za galenske laboratorije". Prema zakonskim propisima, njegovo stavljanje u promet ne zahjeva odobrenje HALMED-a čime je znatno olakšan njihov dolazak na police ljekarni. Od svih odredbi Zakona o lijekovima, na galenske pripravke se odnose samo one o provjeri kakvoće, prema kojima je sama zdravstvena ustanova ili ljekarna koja je proizvela galenski pripravak dužna voditi očevidnik o obavljenoj provjeri njegove

kakvoće [21]. Provjeru kakvoće lijekova i galenskih pripravaka iz prometa obavlja HALMED na zahtjev farmaceutske inspekcije Ministarstva zdravlja. Zbog znakova neuobičajenih pojava ili sumnji u kakvoću odnosno krivotvorinu lijeka ili galenskog pripravka, na zahtjev Ministarstva ili Agencije obavlja se izvanredna provjera kakvoće [26].

1.2 Opstipacija i laksativi

1.2.1 Opstipacija

Uspostavljanje normalne dinamike pražnjenja crijeva važan je čimbenik zdravlja. Nakon što se iskoriste hranjive tvari hrane, neiskorištene tvari dolaze u debelo crijevo, te se za 18 do 24 sata izlučuju iz organizma. Ukoliko u tom vremenu ne dođe do pražnjenja, štetne tvari nagomilavaju se uz razvijanje različitih simptoma (nelagoda, osjećaj nadutosti, bolovi u trbuhu, glavobolja, kožni problemi), pa je stoga normalno i redovito pražnjenje crijeva važan doprinos cjelokupnom zdravlju.

Zatvor se ne smatra bolešću, već simptomom kojeg karakterizira otežano ili neučestalo pražnjenje crijeva, koje može biti praćeno tvrdom i suhom stolicom i osjećajem nepotpunog pražnjenja. O opstipaciji govorimo ako je stolica rjeđa od tri puta tjedno i ako to stanje traje duže od dva tjedna. Kronična opstipacija dijagnosticira se kada stanje traje duže od šest tjedana [27]. Svakako da u obzir treba uzeti i postojanje individualnih razlika među pojedincima, pa se u slučaju odsutnosti nelagode ili drugih smetnji opstipacija ne dijagnosticira u svim slučajevima. Najčešćim uzrocima zatvora smatraju se prehrana siromašna vlaknima, nedovoljan unos tekućine i nedovoljna tjelesna aktivnost. Ostali čimbenici koji mogu uzrokovati opstipaciju su primjena pojedinih skupina lijekova (opioidni analgetici,

antacidi s aluminijem i kalcijem, antiparkinsonici, antidepresivi, nadomjesci željeza, diuretici i antikonvulzivi), mlijeko i mliječni proizvodi, određena patološka stanja (sindrom iritabilnog crijeva, parkinsonizam, multipla skleroza, moždani udar, hipotireoza, dijabetes, divertikuli ili tumor kolona), trudnoća i putovanja. Epidemiološki podaci govore da se češće javlja kod žena, osoba starijih od 65 godina i u nebjelačkoj populaciji [28].

Opstipacija je najčešća probavna smetnja i prepoznata je kao značajan javnozdravstveni problem. Pretpostavlja se da trećina populacije zapadnih industrijaliziranih zemalja barem povremeno pati od nje [29]. Ukoliko se ne liječi, kronična opstipacija može dovesti do nastanka hemoroida, analne fisure, opstrukcije crijeva, a rjeđe i do perforacije kolona i sterkoralnog peritonitisa te prolapsa organa [30]. Budući da uzroci opstipacije nisu jednaki kod svih pacijenata, i njeno je liječenje individualno. Obično se liječi simptomatski, iako bi ispravniji pristup bio utvrditi uzrok njena nastanka, pa su s tim ciljem u novije vrijeme i razvijeni različiti fiziološki testovi kolorektalne funkcije [31]. Prvi korak u liječenju opstipacije obuhvaća povećanje tjelesne aktivnosti, promjenu prehrane s većim unosom vlakana te povećanjem unosa tekućine. Tek ukoliko taj pristup nije učinkovit pristupa se farmakoterapiji laksativima.

1.2.2 Laksativi

Laksativi su sredstva koja olakšavaju defekaciju te se koriste kod akutne i kronične opstipacije. Njihova primjena indicirana je i kod pripreme crijeva za dijagnostičke postupke, u preoperativnom i postoperativnom liječenju kao i kod stanja koja zahtjevaju olakšano pražnjenje crijeva.

Najčešća podjela laksativa je na [29]:

1. Laksativi koji bubre - vežući vodu ovi laksativi povećavaju masu crijevnog sadržaja i time potiču rad crijeva i refleks defekacije; npr. ljuskice indijskog trpuca, metilceluloza i kalcijev polikarbofil

2. Osmotski laksativi - potiču apsorpciju vode u crijeva te tako povećavaju masu crijevnog sadržaja i ujedno ga omekšavaju; npr. magnezijev ili natrijev sulfat, laktuloza, sorbitol i polietilenglikol

3. Stimulirajući laksativi - djeluju većinom u debelom crijevu tako da povećavaju motilitet i intestinalnu sekreciju; npr. antrakinonske biljne droge, derivati difenilmetana (bisakodil, natrijev pikosulfat), ricinusovo ulje, natrijev dokusat i klizme

4. Neuromuskularne tvari – novija heterogena skupina laksativa koji djeluju na različite načine, npr. tegaserod, prukaloprid, misoprostol i nalokson

1.2.2.1 Antracenski laksativi

Antracenski laksativi su prirodni laksativi biljnog podrijetla. Najznačajnije biljne vrste koje sadrže antracenske derivate su: sena (*Cassia senna* L. i *C. angustifolia* Vahl), krkavina (*Rhamnus frangula* L.), američka krkavina (*Rhamnus purshianus* D.C.), aloj (*Aloe barbadensis* Mill.) i rabarbara (*Rheum palmatum* L. i *R. officinale* Baill.) [32]. Ljekovite droge, ekstrakti droga, te rjeđe i čisti izolirani spojevi koji se dobivaju iz ovih biljaka na tržištu su prisutni u različitim farmaceutskim oblicima, uglavnom kao čajevi, tablete, kapsule i sirupi.

Znanstveno je utvrđeno da antracenski derivati sene i krkavine djeluju kao stimulirajući laksativi, te da je mehanizam njihova djelovanja dvojak. Nakon oralne primjene, antracenski glikozidi prolaze kroz želudac i tanko crijevo te nepromijenjeni dolaze u debelo crijevo, gdje se pod utjecajem crjevnih bakterija metaboliziraju. Farmakološki aktivni metaboliti djelomično se apsorbiraju i djeluju na dva načina. Prvo, pojačavaju peristaltičke kontrakcije debelog crijeva, a time i osiguravaju brži prolazak sadržaja kroz njega što smanjuje apsorbciju tekućine. Drugo, povećana je paracelularna propusnost kroz sluznicu debelog crijeva zbog inhibicije Na/K adenozintrifosfataze i inhibicije kalijevih kanala, što također rezultira većim zadržavanjem vode i povećanjem mase i mekoće stolice. Najnovija istraživanja pokazuju da senozid A, odnosno njegov aktivni metabolit rein, inhibira spontanu pokretljivost proksimalnog dijela kolona, ali je ubrzava u distalnom dijelu [33]. Laksativno djelovanje povezuje se i s luminalnom razinom prostaglandina, a djelomično je i posredovano kolinergičnim živcima. Na primjeru emodina utvrđena je povezanost laksativnog učinka i povećane ekspresije akvaporina 3 koji djeluje kao pozitivni regulator PKA/p-CREB signalnog puta. AQP3 protein ima značajnu ulogu u regulaciji izlučivanja vode u debelo crijevo [34, 35]. Zbog vremena potrebnog za transport do debelog crijeva i nastanak aktivnih metabolita, antracenski laksativi ispoljavaju djelovanje tek 6-10 sati nakon primjene [3, 5, 18].

Na temelju rezultata nekliničkih i kliničkih istraživanja te mišljenja stručnjaka utvrđena je dnevna doza od 15 do 30 mg hidroksiantracenskih derivata koja se preporuča za postizanje laksativnog učinka. Primijenjena doza preparata mora biti ekvivalentna propisanoj količini djelatnih tvari i uzima se jednom dnevno, uveče prije spavanja [36, 37, 38]. Korištenje antracenskih laksativa dozvoljena je kod osoba starijih od 12 godina, ali se ne preporuča trudnicama i dojiljama. Indicirani su za kratkotrajnu

primjenu, mogu se koristiti dva do tri puta tjedno najduže kroz 1 do 2 tjedna [36, 37, 39, 40]. Stoga je njihovo uzimanje opravdano kod povremenih opstipacija, dok se kod dugotrajnog zatvora ne preporučuje, osim u iznimnim slučajevima i to kao sastavnica mješavine s osmotskim laksativima ili onima koji bubre [41, 42]. Primjena antracenskih laksativa kontraindicirana je kod niza gastrointestinalnih poremećaja kao što su opstrukcija, stenoza ili atonija crijeva, apendicitis, upalne bolesti debelog crijeva (Crohnova, ulcerozni kolitis) i abdominalni bolovi nepoznatog porijekla te kod raznih stanja dehidracije uzrokovanih nedostatkom vode ili elektrolita [36, 37].

Neželjeni učinci i eventualno štetno djelovanje antracenskih glikozida sene i krkavine bila su tema značajnog broja znanstvenih istraživanja. Budući da ovu skupinu laksativa pacijenti često odabiru u samoliječenju i bez stručnog savjetovanja te zbog dobre učinkovitosti koriste duže nego što je to preporučeno, pojava neželjenih učinaka nije rijetkost. Primjena antracenskih laksativa može uzrokovati bolove u trbuhu praćene grčevima, reakcije preosjetljivosti te dijareju, posebice u slučajevima uzimanja prevelikih doza. Kronična primjena i/ili zlouporaba može uzrokovati poremećaj koncentracije elektrolita te dovesti do albuminurije i hematurije. Kao posljedica dugotrajne upotrebe može se javiti hipokalijemija, koja može uzrokovati srčane poremećaje i asteniju mišića, posebice kod istovremene primjene srčanih glikozida, diuretika, kortikosteroida ili korijena sladića. Joo i sur. [43] ustvrdili su da su lijena crijeva, koje karakterizira smanjen broj haustralnih nabora i smanjena kontrakcija, posljedica oštećenja neurona i muskulature kolona uzrokovanih dugotrajnom primjenom stimulirajućih laksativa. Kao česta nuspojava navodi se i pseudomelanoma coli, pigmentacija crijeva nastala zbog prebrze apoptoze stanica sluznice kolona pri čemu nastaje fuscin koji sluznicu boji u tamno smeđe. Ta je pojava reverzibilna, te prestankom uzimanja antracenskih laksativa nakon nekog

vremena nestaje [44,45]. Među nizom istraživanja u tom području, vrlo je zanimljivo ono Willemsa i sur. [46] koji su na temelju pronađenih sesilnih polipodnih lezija debelog crijeva, čija je histološka analiza ukazala na vilotubularni adenom s displazijom niskog stupnja, zaključili da se ne bi smjela poticati primjena antracenskih laksativa. Do ovog su zaključka došli na temelju jednog slučaja - pacijenta s transplatiranom jetrom, a u obzir su uzeli i prethodna izvješća o mogućoj ulozi laksativa s antracenskim derivatima u razvoju kolorektalnog adenoma i karcinoma. Dugotrajna primjena antracenskih laksativa kao i unos visokih doza u nekoliko se istraživanja dovodilo u vezu s povećanim rizikom pojave kolorektalnog tumora [42, 47, 48]. Međutim, najnovija istraživanja [49, 50, 51] nisu potvrdila povezanost antracenskih laksativa i tumora debelog crijeva niti kod životinja niti kod ljudi. Primjena laksativa s antracenskim derivatima, u preporučenim dozama i vremenu uzimanja, smatra se općenito sigurnom [36, 37, 39, 40].

1.3 Antracenski spojevi u ljekovitim drogama sene i krkavine

1.3.1 Senin list (Sennae folium) i senin plod (Sennae fructus)

Rod *Cassia* pripada biljnoj porodici Caesalpiniaceae i obuhvaća oko 700 biljnih vrsta pretežito rasprostranjenih u subtropskim i tropskim područjima [52]. Farmaceutski su značajne samo dvije vrste tog roda: *Cassia angustifolia* Vahl, poznata kao tinevelška sena, i *Cassia senna* L. (sin. *C. acutifolia* Delile), poznata kao aleksandrijska ili Khartoum sena (Slika 1). Vrsta *C. angustifolia* potječe iz Arabije, ali se danas kultivira u Indiji (pokrajina Tinnevelly) i Pakistanu, dok vrsta *C. senna* potječe iz sjeverne i sjeveroistočne Afrike, a uzgaja se u dolini Nila, najviše u Egiptu i Sudanu [43]. Za dobivanje ljekovitih biljnih droga sabiru se listovi i plodovi koji na tržište dolaze pod

ljekarničkim nazivima Sennae folium i Sennae fructus (Slika 1). Biljna droga Sennae folium sastoji se od osušenih liski vrste *Cassia senna* ili *C. angustifolia*, ili mješavine obiju vrsta. Osušeni plodovi tinvelške i aleksandrijske sene na tržište dolaze odvojeno pod ljekarničkim nazivima Sennae fructus angustifoliae i Sennae fructus acutifoliae.

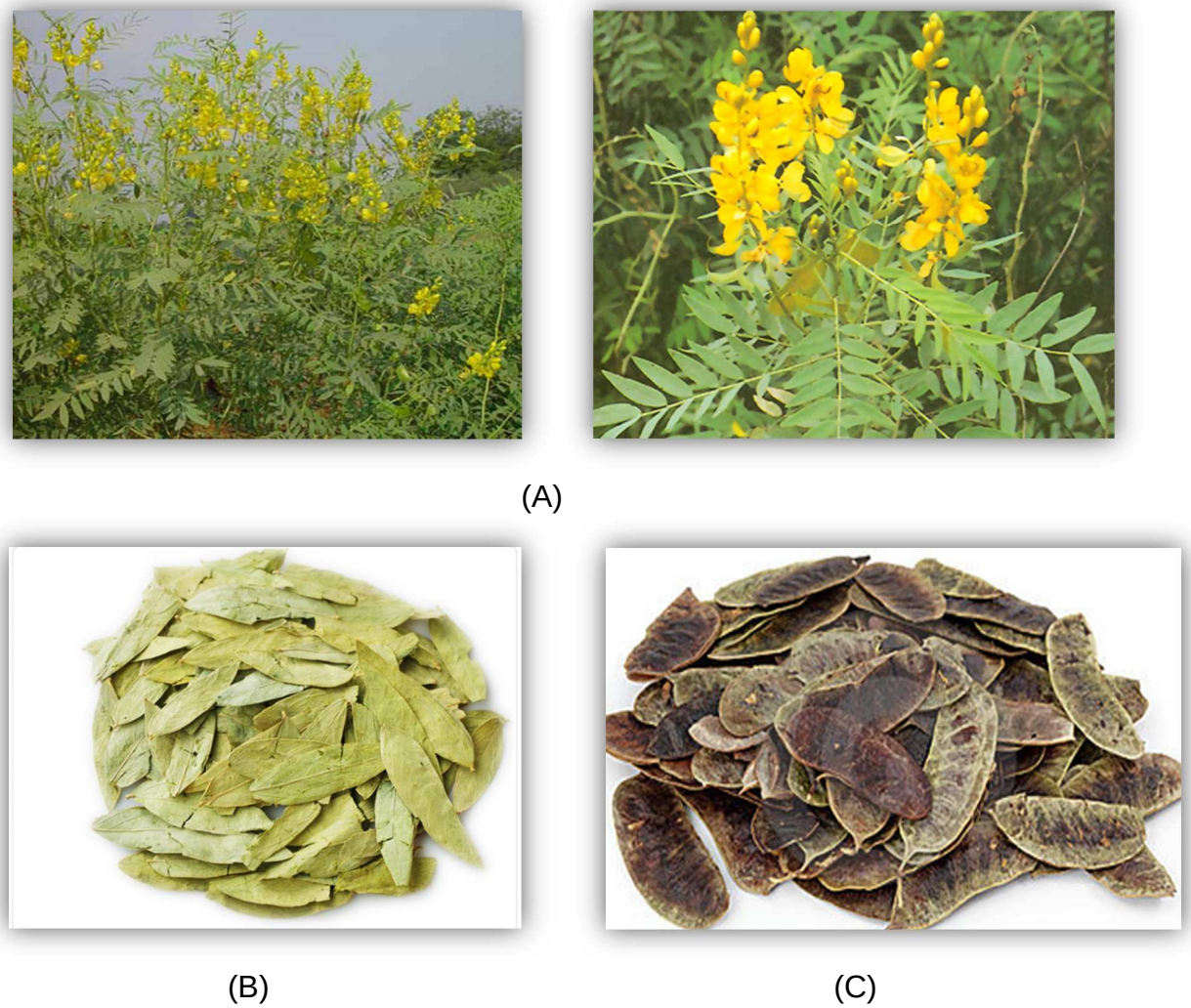
Izgled biljke

Sena raste kao grm, polugrm ili višegodišnja zelen s parno perastim listovima i grozdastim cvatovima koji se sastoje od žutih zigomorfnih cvjetova (Slika 1). Tinevelška sena naraste i do 2 m, liske su joj na perastim listovima uske i produžene, 2-5 cm duge, 6-15 mm široke, kratkih peteljki, list je razdjeljen na 5-9 pari liski blago žućkastozelene do svijetlomaslinaste boje. Aleksandrijska sena je polugrm visine do 60 cm, listovi su razdijeljeni na 4-5 pari liski koje su 1,5-3,5 cm duge, 5-10 mm široke, sivozelene do svijetlomaslinaste. Plod (mahuna) je pljosnat, više ili manje zakrivljen, kožnat, dug 15-18 mm (tinevelška) odnosno 20-25 mm (aleksandrijska) inosi 5-7 (tinevelška) tj. 7-10 (aleksandrijska) sjemenki smeđe-zelene boje, a površina mu je rupičasta i mrežasto izbrazdana [53, 54, 55].

Fitokemijski sastav

Dosadašnja istraživanja pokazala su složenost kemijskog sastava sene. Nositelji laksativnog djelovanja biljnih droga Sennae folium i Sennae fructus su antracenski derivati antronske strukture (reducirani antracenski derivati) čiji ukupni udio iznosi oko 3%. Glavne djelatne tvari su diantronski glikozidi senozidi A i B (rein-diantronski glikozidi), a u manjoj količini prisutni su i senozidi C i D (rein-aloj-emodin-heterodiantronski glikozidi). Uz antronske spojeve, detektirani su i slobodni te glikozidno vezani antrakinoni rein i aloj-emodin, posebice rein-8-glukozid i rein-8-

soforozid (Slika 2). Od ostalih spojeva sena sadrži 2-3% sluzi, flavonoide (uglavnom derivate kemferola) te 0,05% eteričnog ulja u čiji sastav ulaze mono- i seskviterpenski spojevi, fenilpropani, palmitinska kiselina i dr. Iz listova i plodova izolirana su dva naftalenska derivata koja nemaju farmakološko značenje, ali su važni za identifikaciju odnosno razlikovanje dviju oficinalnih vrsta sene: tinevelin-8-glukozid nalazimo samo u vrsti *C.angustifolia*, dok 6-hidroksimuzicin glukozid samo kod vrste *C. senna* [54]. U novije vrijeme iz sene su izolirana i dva nova karboksilirana benzofenonska glikozida [55].



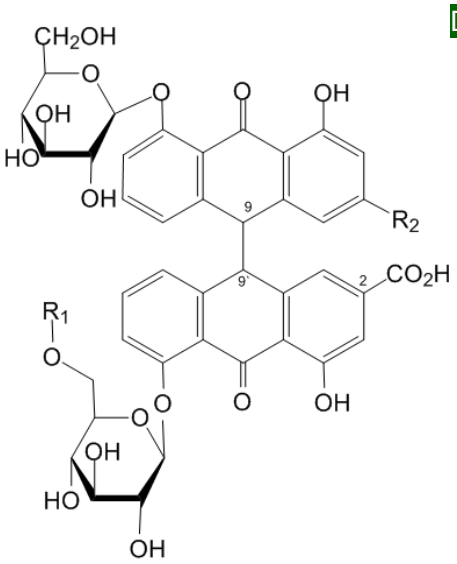
(A)

(B) (C)

Slika 1. Biljna vrsta *Cassia acutifolia* L. – sena (A) i ljekovite droge Sennae folium – senin list (B) i Sennae fructus – senin plod (C)

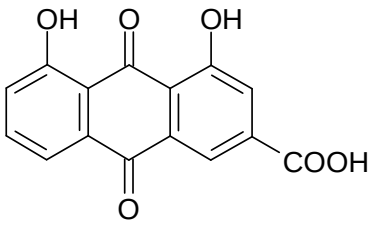
Znanstvena istraživanja pokazala su da se pojedini biljni dijelovi sene razlikuju sadržajem i sastavom antracenskih derivata te da plod sadrži manje antracenskih derivata od lista [54], a razlike su uočene i između dviju oficinalnih *Cassia* vrsta [33, 56]. Varijabilnost u sadržaju antracenskih derivata ustanovljena je i u biljnom materijalu različitog geografsko-klimatskog podrijetla [57]. Utvrđeno je da na sadržaj i sastav djelatnih tvari u listu sene utječe i starost listova te vrijeme njihova sabiranja [58]. U jednom od novijih istraživanja [46] istraživači su proveli DNK karakterizaciju četiriju vrsta sene i tako omogućili razlikovanje tih morfološko-anatomskih vrlo sličnih vrsta te time doprinijeli unaprijeđenju identifikacije oficinalnih droga i razlikovanju od patvorina i/ili zamjena.

Diantronski glikozidi

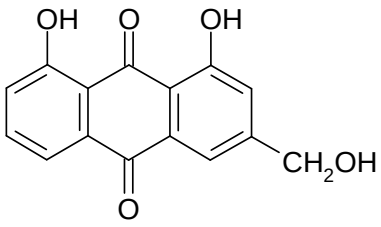


	R_1	R_2	9-9´
senozid A	H	CO_2H	R*,R* (treo)
senozid B	H	CO_2H	R*,S* (eritro)
senozid C	H	CH_2OH	R*,R* (treo)
senozid D	H	CH_2OH	R*,S* (eritro)
senozid E	CO-CO_2H	CO_2H	R*,R* (treo)
senozid F	CO-CO_2H	CO_2H	R*,S* (eritro)

Antrakinoni



rein



aloj-emodin

Slika 2. Antracenski derivati u biljnim drogama Sennae folium i Sennae fructus

1.3.2 Krkavinina kora (Frangulae cortex)

Krkavina (*Rhamnus frangula* L. ili *Frangula alnus* Mill.) je ljekovita biljka koja pripada porodici Rhamnaceae. Široko je rasprostranjena po cijeloj Europi, nalazimo je i u sjevernoj Africi, sjeverozapadnoj Aziji te u Sjevernoj Americi, a u Hrvatskoj raste u području uz Dravu i Dunav. U ljekarništvu se koristi kora sakupljena s mladih stabala i grana krkavine koja se potom suši i na tržište dolazi pod ljekarničkim nazivom Frangulae cortex (Slika 3). Droga na tržištu uglavnom potječe iz Europe, prvenstveno iz Poljske [54].



(A)



(B)



(C)

Slika 3. Biljna vrsta *Rhamnus frangula* L. – krkavina (A i B) i ljekovita droga Frangulae cortex – krkavinina kora (C)

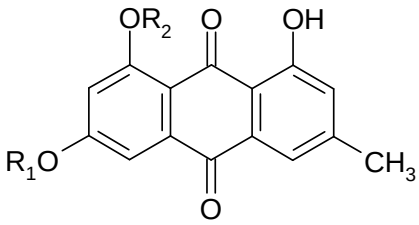
Izgled biljke

Krkavina je 1-3 m visok grm ili do 7 m visoko stablo. Listovi su tanki, široko ovalni, s peteljkom, pri vrhu šiljasti i cjelovita ruba. Cvjetovi se razvijaju po 2-10 u paštitcima. Oblik im je ljevkast, s čaškom od 5 lapova i vjenčićem s 5 latica. Cvjetovi su dvospolni, bijele ili zelenkastobijele boje. Biljka cvate od svibnja do lipnja. Plodovi su malene koštunice crnoljubičaste boje, a javljaju se u rujnu. Kora je crvenosmeđa do sivosmeđa, glatka i sjajna, s mnogobrojnim poprečnim, bjeličastim lenticelama [50, 51].

Fitokemijski sastav

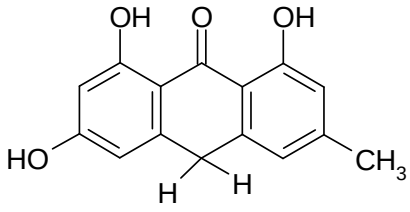
Za terapijski učinak krkavinine kore odgovorni su antracenski derivati koji se s obzirom na strukturna obilježja ubrajaju u antrakinonske O-glikozide. Glavne djelatne tvari su diglikozidi glukofrangulin A (emodin-6-0-α-L-ramnozil-8-0-β-D-glukozid) i glukofrangulin B (emodin-6-0-β-L-apiozil-8-0-β-D-glukozid) te monoglikozidi frangulin A, B i C (emodin-6-0-α-L-ramnozid, emodin-6-0-β-L-apiozid i emodin-6-0-β-L-ksilozid). Droga sadrži još i manje količine slobodnih antrakinonskih aglikona frangula-emodina, emodin-9-antrona i dr. antrakinonske glikozide i antrone [40, 58] (Slika 4). Trjeslovine i peptidni alkaloidi (frangulanin, franganin) također su prisutni u drogi. U svježoj krkavininoj kori glukofrangulini se nalaze u reduciranom obliku, a u uskladištenoj u oksidiranom. Budući da se antron O-glikozidi (reducirani oblici) smatraju odgovornim za ozbiljne gastrointestinalne nuspojave, kora krkavine smije se koristiti tek nakon jednogodišnjeg uskladištenja tijekom kojeg dolazi do spontane oksidacije i nastanka oksidiranih antracenskih derivata. Danas se to vrijeme skraćuje „ubrzanim starenjem“ pri povišenoj temperaturi (80-100 °C) i uz dovod zraka [40].

Antrakinoni



	R_1	R_2
frangulin A	α-L-ramnoza	H
frangulin B	β-D-apioza	H
glukofrangulin A	α-L-ramnoza	β-D-glukoza
glukofrangulin B	β-D-apioza	β-D-glukoza
frangula emodin	H	H
fiscion	CH_3	H
krizofanol	(nesupstituiran)	H

Dihidroantraceni



frangula-emodin antron

Slika 4. Antracenski derivati u biljnoj drogi Frangulae cortex

1.3.3 Klinička učinkovitost fitopreparata sene i krkavine

Učinkovitost antracenskih laksativa klinički je dokazana te uspoređivana s drugim skupinama laksativa [36, 37, 40, 41]. Pripravci sene klinički su vrjednovani u liječenju opstipacije i čišćenja crijeva prije radioloških pretraga ili kolonoskopije. Međutim, u većini istraživanja primjenjivani su u kombinaciji s prehrambenim vlaknima. U istraživanju provedenom na starijim pacijentima s kroničnom opstipacijom, u kojoj je usporedno istraženo djelovanje kombiniranog preparata vlakana i seninog ploda (Agiolax) i osmotskog laksativa laktuloze, učinkovitijim se pokazao preparat koji je sadržavao senu [36]. Novija istraživanja govore u prilog učinkovitoj primjeni visokih doza fitopripravaka sene u čišćenju debelog crijeva kao pripremi za kolonoskopiju [42].

Jedini rezultati koji potvrđuju kliničku učinkovitosti krkavinine kore dobiveni su istraživanjem kombiniranih fitopreparata i starijeg su datuma. Dvije nekontrolirane studije, provedene 1970-tih godina na konstipiranim pacijentima, dokazale su djelotvornost fitopreparata Laxaristona® koji je u 3 g sadržavao 0,9 g metil celuloze, 0,3 g krkavinine kore (13,5 mg hidroksiantracenskih derivata), 0,3 g senina lista (7,5 mg hidroksiantracenskih derivata), 0,15 g rabarbarina korijena (6,75 mg hidroksiantracenskih derivata) i 0,015 g ekstrakta stolisnika, te je primjenjivan u dnevnoj dozi od 3 do 7,6 g. Obzirom da od ukupno 27,75 mg hidroksiantracenskih derivata sadržanih u 3 g preparata oko 50% njih potječe iz krkavinine kore, može se pretpostaviti njen značajan doprinos učinkovitosti [40].

Sveobuhvatan pregled znanstvene literature pokazuje nedostatak novijih kontroliranih kliničkih istraživanja u kojima bi se vrjednovao učinak samih droga ili pripravaka krkavine i sene na reprezentativnom uzorku populacije.

1.3.4 Farmakopejske monografije biljnih droga sene i krkavine

Republika Hrvatska kao članica Europske unije prihvatila je i primjenjuje sve norme kakvoće za biljne lijekove i pripravke koji se objavljuju u Europskoj farmakopeji (Ph. Eur.). Zakonom o lijekovima propisano je da kakvoća lijeka i sirovina za proizvodnju lijeka mora biti u skladu s Hrvatskom farmakopejom, odnosno lijek mora biti proizveden i provjerene kakvoće u skladu s postupcima i zahtjevima važeće Europske farmakopeje [21]. Na taj se način, primjenom priznatih farmakopejskih normi osigurava i unapređuje kakvoća i sigurnost lijekova, a sve u svrhu zaštite zdravlja pacijenata. U Europskoj farmakopeji nalazimo više monografija biljnih droga i pripravaka sene i krkavine, u kojima su utvrđeni zahtjevi za izradu i kakvoću, kao i postupci za provjeru kakvoće za svakog od njih [65]. U nastavku je dan potpuni prijevod s engleskog na hrvatski jezik nekoliko za rad relevantnih monografija, budući da iste nisu u potpunosti prevedene i prikazane u 2. izdanju Hrvatske farmakopeje.

U 7. izdanju Europske farmakopeje nalazimo monografiju biljne droge **Sennae folium** - senin list (prijevod u nastavku) koja uz opis droge i njene značajke donosi i propise za identifikaciju droge, ispitivanje stupnja čistoće i određivanje sadržaja djelatnih tvari. Osim monografije same biljne droge, u Ph. Eur. nalazimo i monografiju sa zahtjevima kakvoće standardiziranog suhog ekstrakta seninog lista (**Sennae folii extractum siccum normatum**), pripravljenog iz seninog lista odgovarajućim postupkom ekstrakcije pomoću etanola (50 - 80% V/V). Prema farmakopejskom zahtjevu, taj senin preparat mora sadržavati najmanje 5,5% i najviše 8,0% hidroksiantracenskih glikozida, izraženih kao senozid B u odnosu na suhi ekstrakt, a određeni sadržaj ne smije se razlikovati za više od ±10% u odnosu na deklarirani. Dijelovi monografije koji opisuju zahtjeve za potvrdu identiteta tankoslojnom kromatografijom te određivanje sadržaja djelatnih antracenskih derivata gotovo su

istovjetni u obje monografije, a provjera kakvoće ekstrakta dodatno zahtjeva još i ispitivanje mikrobiološke čistoće. U Ph. Eur nalazimo odvojene monografije seninog ploda, **Sennae fructus acutifoliae** (prijevod u nastavku) i **Sennae fructus angustifoliae**. Propisani postupci za provjeru kakvoće tih dviju droga su istovjetni, a njihovo je razlikovanje, osim manjih razlika u morfološkim obilježjim, uglavnom temeljeno na različitim zahtjevima za sadržaj djelatnih tvari: dok plod aleksandrijske sene mora sadržavati najmanje 3,4% hidroksiantracenskih glikozida, zahtjev za plod tinvelške sene je niži i iznosi najmanje 2,2% hidroksiantracenskih glikozida, izračunano kao senozid B i izraženo u odnosu na suhu drogu.

Monografija **Frangulae cortex** – krkavinina kora (prijevod u nastavku) uz opis droge i njene značajke donosi i propise za identifikaciju droge, ispitivanje stupnja čistoće i određivanje sadržaja djelatnih glukofrangulina. Pored monografije same biljne droge, u Ph. Eur. nalazimo i monografiju standardiziranog suhog ekstrakta krkavinine kore (**Frangulae corticis extractum siccum normatum**), dobivenog iz krkavinine kore odgovarajućim postupkom ekstrakcije pomoću etanola (50-80% *V/V*). Ekstrakt farmakopejske kakvoće mora sadržavati najmanje 15,0% i najviše 30,0% glukofrangulina, izraženo kao glukofrangulin A u odnosu na suhi ekstrakt, a određeni sadržaj se ne smije razlikovati za više od ±10 % u odnosu na deklarirani. Propisane metode identifikacije ljekovitih tvari i određivanja njihova sadržaja kao i ostali zahtjevi kakvoće jednake su u obje monografije, a jedina razlika odnosi se na dodatni zahtjev ispitivanja mikrobiološke čistoće ekstrakta.

SENIN LIST

Sennae folium

odgovara monografiji Ph. Eur. 7.0 01/2008:0206, Senna leaf

DEFINICIJA

Senin list sastoji se od osušenih liski vrste *Cassia senna* L. (*C. acutifolia* Delile), poznate kao aleksandrijska ili Khartoum sena, ili vrste *Cassia angustifolia* Vahl, poznate kao tinevelška sena, ili mješavine tih dviju vrsta.

Sadrži najmanje 2,5% hidroksiantracenskih glikozida, izraženih kao senozid B ($C_{42}H_{38}O_{20}$; M_r 863) u odnosu na suhu drogu.

ZNAČAJKE

Senin list ima blagi karakterističnu miris. Makroskopska i mikroskopska obilježja opisana su pod identifikacijskim testovima A i B.

IDENTIFIKACIJA

A. *C. senna* dolazi u obliku sivozelenih ili smeđezelenih, tankih, lako lomljivih liski koje su ovalne, asimetrične na bazi, obično 15-40 mm duge, 5-15 mm široke, najšire u donjoj polovici; površina je blago hrapava, s obje strane prekrivena finim kratkim dlačicama. Perasto raspoređene žilice vidljive su većinom na donjoj strani, bočni ogranci su pod kutem od 60º u odnosu na centralnu žilu i zadebljale tako da tvore greben blizu ruba.

Stomatalni indeks (2.8.3): 10-12,5-15.

C.angustifolia dolazi u obliku žutozelenih ili smeđezelenih liski koje su izdužene i ovalne, blago asimetrične na bazi, obično 20-50 mm duge, 7-20 mm široke, najšire u sredini. Površine na obje strane lista su glatke, s malim brojem kratkih dlačica i često obilježene poprečnim ili kosim linijama.

Stomatalni indeks (2.8.3): 14-17.5-20

B. Usitniti drogu u prašak (355) (*2.9.12).* Prašak je svjetlozelen ili zelenožut. Promatrati pod mikroskopom uz otopinu *kloralhidrata R.* Prašak pokazuje slijedeće osobine: poligonalne epidermalne stanice s međustaničnim pučima *(2.8.3);* jednostanične dlake, koničnog oblika, bradavičaste kutikule, izolirane ili usađene između epidermalnih stanica; sklerenhimska vlakna prekrivena prizmatičnim kristalima kalcijeva oksalata; spužvasti parenhim sadrži ružice kalcijeva oksalata.

C. Tankoslojna kromatografija *(2.2.27)*.

Ispitivana otopina. U 0,5 g praškaste droge (180) *(2.9.12)* doda se 5 mL smjese jednakih volumena *etanola (96%-tni) R* i *vode R* te zagrije do vrenja. Ekstrakt se centrifugira i za daljnju analizu koristi supernatant.
Poredbena otopina. Otopi se 10 mg *senina ekstrakta CRS* u 1 mL smjese jednakih volumena *etanola R* i *vode R* (ostaje blagi talog).
Ploča: TLC silikagel G ploča R
Mobilna otopina: ledena octena kiselina R, voda R, etil acetat R, propanol R (1:30:40:40 V/V/V/V)
Nanošenje: 10 µL, u vrpci 20x2 mm
Razvijanje: na dužini od 10 cm
Sušenje: na zraku.
Detekcija: prska se s 20% V/V otopinom *nitratne kiseline R* te zagrijava 10 min na 120 °C. Ostavi se ohladiti te prska otopinom 50 g/L *kalijevog hidroksida R* u *etanolu (50% V/V),* sve dok se ne pojave zone.
Rezultati: Glavne zone u kromatogramu ispitivane otopine (senozidi B, A, D i C po redosljedu rastuće R_f vrijednosti) su položajem, bojom i veličinom jednake glavnim

zonama u kromatogramu poredbene otopine. Izmedu zona koje odgovaraju senozidima D i C može se vidjeti crvena zona koja odgovara rein-8-glukozidu.

D. U tikvicu okruglog dna stavi se oko 25 mg droge u prašku (180) i doda 50 mL *vode R* i 2 mL *kloridne kiseline R.* Zagrijava se u vodenoj kupelji 15 min, ohladi te ekstrahira s 40 mL *etera R.* Eterski sloj se odvoji i posuši preko *bezvodnog natrijevog sulfata R.* Zatim se 5 mL upari do suha te se ohlađenom ostatku doda 5 mL *razrijeđenog amonijaka R1.* Razvije se žuta ili narančasta boja. Zagrijavanjem 2 min u vodenoj kupelji razvije se crvenkastoljubičasta boja.

ISPITIVANJA

Strane primjese (2.8.2). Najviše 3% stranih organa i najviše 1% stranih elemenata.

Gubitak sušenjem (2.2.32). Najviše 12,0%, određeno na 1,000 g droge u prašku (355) sušenjem 2 sata u sušioniku na 105 °C.

Ukupni pepeo (2.4.16). Najviše 12,0%.

Pepeo netopljiv u kloridnoj kiselini (2.8.1). Najviše 2,5%

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Postupak se provodi uz zaštitu od svijetlosti.

U tikvicu od 100 mL stavi se 0,150 g droge u prašku (180). Doda se 30,0 mL *vode R,* promiješa se, vagne te stavi u vodenu kupelj. Zagrijava se 15 min uz povratno hladilo. Ostavi se ohladiti, vagne te dopuni *vodom R* do početne mase. Centrifugira se i 20,0 mL supernatanta prenese u lijevak za odjeljivanje od 150 mL. Doda se 0,1 mL *razrijeđene kloridne kiseline R* te ekstrahira tri puta s po 15 mL *kloroforma R.* Kad se slojevi odijele, sloj kloroforma se odbaci. Doda se 0,10 g *natrijevog hidrogenkarbonata R* te mućka 3 min. Centrifugira se i 10,0 mL supernatanta prenese u tikvicu okruglog dna od 100 mL s ubrušenim grlom. Doda se 20 mL *otopine željezovog klorida R1* te promiješa. Zagrijava se 20 min, uz povratno hladilo, u vodenoj kupelji s razinom vode iznad razine tekućine u tikvici. Doda se 1 mL *kloridne kiseline R te* nastavi grijati 20 min, uz često protresivanje sve dok se talog ne otopi. Ostavi se ohladiti, prenese u lijevak za odjeljivanje i ekstrahira tri puta s po 25 mL *etera R* s kojim se prethodno ispere tikica. Sjedinjeni eterski slojevi isperu se dva puta s 15 mL *vode R.* Eterski sloj prenese se u odmjernu tikvicu i razrijedi do 100,0 mL *eterom R.* Pažljivo se upari 10,0 mL do suha te ostatak otopi u 10,0 mL otopine 5 g/L *magnezijevog acetata R* u *metanolu R.* Izmjeri se apsorbancija *(2.2.25)* na 515 nm, koristeći *metanol R* kao poredbenu otopinu.

Izračuna se udio senozida B u postocima prema izrazu:

$(A \times 1{,}25) / m$

uzimajući da je specifična apsorbancija senozida B 240.

A = apsorbancija na 515 nm,

M = masa ispitivane tvari u gramima.

ČUVANJE

Čuva se zaštićeno od vlage.

PLOD ALEKSANDRIJSKE SENE

Sennae fructus acutifoliae

odgovara monografiji Ph. Eur. 7.0 01/2008:0207, Senna pods, alexandrian

DEFINICIJA

Osušeni plod vrste *Cassia senna* L. *(C. acutifolia* Delile).

Sadržaj*:* najmanje 3,4% hidroksiantracenskih glikozida, izračunano kao senozid B ($C_{42}H_{38}O_{20}$; M_r 863) u odnosu na suhu drogu.

ZNAČAJKE

Plod aleksandrijske sene ima blag miris.

IDENTIFIKACIJA

A. Spljošteni plod bubrežastog oblika, zeleni ili zeleno smeđi sa smeđim mrljama na mjestima gdje su sjemenke, obično 10-50 mm dug i najmanje 20 mm širok. Na jednom kraju je zašiljen a na drugom ima kratku peteljku. Plod sadrži 6-7 spljoštenih jajolikih sjemenki koje su zelene ili svijetlosmeđe, s neprekinutom mrežom uočljivih nabora na opni.

B. Usitniti drogu u prah (355) *(2.912)*. Prašak je smeđ. Ispitati pod mikroskopom uz otopinu *kloralhidrata R*. Vide se slijedeće karakteristike: epikarp sastavljen od poligonalnih stanica s malim brojem koničnih bradavičavih dlaka i često s anomo- i paracitičnim pučima *(2.8.3)*; sklerenhimska vlakna u dva isprepletena sloja, prekrivena prizmatičnim kristalima kalcijeva oksalata; karakteristične palisadne stanice sjemenki i slojevite stanice endosperma; ružice i prizme kalcijeva oksalata.

C. Tankoslojna kromatografija *(2.2.27)*
Ispitivana otopina. U 0,5 g droge u prašku (180) doda se 5 mL smjese jednakih volumena *etanola R* i *vode R* te zagrije do vrenja. Centrifugira se i za ispitivanje koristi supernatant.
Poredbena otopina. Otopi se 10 mg *senina ekstrakta CRS* u 1 mL smjese jednakih volumena *etanola R* i *vode R* (ostaje neznatan talog).
Ploča: TLC silikagel G ploča R
Mobilna otopina: ledena octena kiselina R, voda R, etil acetat R, propanol R (1:30:40:40 V/V/V/V).
Nanošenje: 10 µL, u vrpci 20x2 mm.
Razvijanje: na dužini od 10 cm.
Sušenje: na zraku.
Detekcija: prska se s 20 % *VIV* otopinom *nitratne kiseline R* te zagrijava 10 min na 120 °C. Ostavi se ohladiti te prska otopinom 50 g/L *kalijevog hidroksida R* u *alkoholu (50 % V7V),* sve dok se ne pojave zone.
Rezultati: Glavne zone u kromatogramu ispitivane otopine su položajem, bojom i veličinom jednake glavnim zonama u kromatogramu poredbene otopine (senozidi B, A, D i C po redosljedu rastuće R_f vrijednosti). lzmeđu zona koje odgovaraju senozidima D i C može se vidjeti crvena zona koja odgovara rein-8-glukozidu. Zone koje odgovaraju senozidima D i C su slabog intenziteta u kromatogramu ispitivane otopine.

D. U konusnu tikvicu stavi se oko 25 mg droge u prašku (180) te doda 50 mL *vode R* i 2 mL *kloridne kiseline R.* Zagrijava se u vodenoj kupelji 15 min, ohladi te ekstrahira s 40 mL *etera R.* Eterski sloj se odijeli i posuši preko *bezvodnog natrijevog sulfata R.* Zatim se 5 mL upari do suha te se ohlađenom ostatku doda 5 mL *razrijedenog amonijaka R1.* Razvije se žuta ili narančasta boja. Zagrijavanjern 2 min u vodenoj kupelji razvije se crvenkastoljubičasta boja.

ISPITIVANJA

Strane primjese (2.8.2). Najviše 1%.

Gubitak sušenjem (2.2.32). Najviše 12,0 %, odredeno na 1,000 g droge u prašku (355) sušenjem 2 sata u sušioniku na 105 °C .

Ukupni pepeo (2.4.16). Najviše 9,0%.

Pepeo netopljiv u kloridnoj kiselini (2.8.1). Najviše 2,0%.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Postupak se provodi uz zaštitu od svijetlosti.

U tikvicu od 100 mL stavi se 0,150 g droge u prašku (180). Doda se 30,0 mL *vode R,* promiješa, vagne te stavi u vodenu kupelj. Zagrijava se 15 min uz povratno hladilo. Ostavi se ohladiti, vagne i nadopuni do početne mase *vodom R.* Centrifugira se i 20,0 mL supernatanta prenese u lijevak za odjeljivanje od 150 mL. Doda se 0,1 mL *razrijeđene kloridne kiseline R* i ekstrahira tri puta s po 15 mL *kloroforma R.* Kad se slojevi odijele, sloj kloroforma se odbaci. Doda se 0,10 g *natrijevog hidrogenkarbonata R* te mućka 3 min. Centrifugira se i 10,0 mL supernatanta prenese u tikvicu okruglog dna od 100 mL s ubrušenim grlom. Doda se 20 mL *otopine željezovog klorida R1* te promiješa. Zagrijava se 20 min, uz povratno hladilo, u vodenoj kupelji s razinom vode iznad razine tekućine u tikvici. Doda se 1 mL *kloridne kiseline R* te nastavi zagrijavati 20 min, uz često protresivanje sve dok se talog ne otopi. Ostavi se ohladiti, prenese u lijevak za odjeljivanje i ekstrahira tri puta s po 25 mL *etera R,* s kojim se prethodno ispere tikvica. Sjedinjeni eterski ekstrakti isperu se dva puta s 15 mL *vode R.* Eterski sloj prenese se u odmjernu tikvicu i razrijedi do 100,0 mL *eterom R.* Pažijivo se upari 10,0 mL do suha te ostatak otopi u 10,0 mL otopine 5 g/L *magnezijevog acetata R* u *metanolu R.* Izmjeri se apsorbancija *(2.2.25)* na 515 nm koristeći *metanol R* kao poredbenu otopinu.

Izračuna se udio senozida B u postocima prema izrazu:

$$(A \times 1{,}25) / m$$

tj. uzimajući da je specifična apsorbancija senozida B 240.

A = apsorbancija na 515 nm,

m = masa ispitivane tvari u gramima.

ČUVANJE

Čuva se zaštićeno od vlage.

KRKAVININA KORA

Frangulae cortex

odgovara monografiji Ph. Eur. 7.0 04/2011:0025, Frangula bark

DEFINICIJA

Osušena, cijela kora ili dijelovi kore stabljika i grana vrste *Rhamnus frangula* L. (*Frangula alnus* Miller).

Sadržaj: najmanje 7,0% glukofrangulina, izraženo kao glukofrangulin A ($C_{27}H_{30}0_{14}$; *M,* 578,5) i izračunano u odnosu na suhu drogu.

IDENTIFIKACIJA

A. Iskrivljeni, gotovo spljošteni ili svinuti, jednostruko ili dvostruko namotani komadi kore obično 0,5-2 mm debeli, različite dužine i širine. Sivosmeđa ili tamnosmeđa vanjska površina je longitudinalno izbrazdana i prekrivena brojnim sivkastim, poprečnim lenticelama; ispod gornjeg vanjskog sloja vidi se tamnocrveni sloj. Narančastosmeđa ili crvenosmeđa unutrašnja površina je glatka i ima fine longitudinalne nabore; u dodiru s lužinom pocrveni. Površina prijeloma je nepravilna i vlaknasta s unutrašnje strane.

B. Mikroskopsko ispitivanje (*2.8.23).* Prašak je žuto- ili crvenosmeđ. Ispitati pod mikroskopom uz otopinu *kloralhidrata R*. Vide se slijedeće karakteristike: brojne likovnice u tangencijalnom ili longitudinalnom području, djelomično lignificirana, okružena stanicama s prizmama kalcijeva oksalata, ponekad sadrže srčikine zrake; crvenosmeđi fragmenti pluta; fragmenti likastog parenhima, u longituginalnom području sadrži ružice kalcijeva oksalata ili u tangencijalnom području sadrži srčikine zrake i ružice kalcijeva oksalata; nekoliko dijelova kolenhima; izolirane ružice i prizme kalcijeva oksalata.

C. Ispitati kromatograme koji su dobiveni u ispitivanju B za druge vrste roda *Rhamnus;* antroni na UV svjetlu na 365 nm.
Rezultati: Kromatogram ispitivane otopine u donjoj trećini pokazuje dvije narančastosmeđe zone (glukofrangulini) te u gornjoj trećini dvije do č etiri crvene zone (frangulini koji nisu uvijek jasno odvojeni te frangula-emodin iznad njih).

D. U oko 50 mg droge u prašku (180) doda se 25 mL *razrijeđene kloridne kiseline R* i zagrijava u vodenoj kupelji 15 min. Ohladi se i ekstrahira s 20 mL *etera R* te vodeni sloj odbaci. Promućka se eterski sloj s 10 mL *razrijeđenog amonijaka R1.* Vodeni sloj postaje crvenkastoljubičast.

ISPITIVANJA

Druge vrste roda Rhamnus; antroni. Tankoslojna kromatografija *(2.2.7).*

Ispitivana otopina: U 0,5 g droge u prašku (180) doda se 5 mL *etanola (70% VIV) R* i zagrijava do vrenja. Ostavi se ohladiti i centrifugira. Supernatant se odmah odlije i koristi za ispitivanje unutar 30 min.

Poredbena otopina. Otopi se 20 mg *barbaloina R* u *etanolu (70% VIV) R i* razrijedi s istim otapalom do 10 mL.

Ploča: TLC silikagel G ploča R

Mobilna otopina: voda R,metanol R, etil acetat R, (13:17:100 V/V/V).

A. Nanošenje: 10 µL, u vrpci
Razvijanje: na dužini od 10 cm.
Sušenje: na zraku, najviše 5 minuta
Detekcija: prska se odmah s 50 g/L otopinom *kalijeva hidroksida R* u *alkoholu R* (50% V/*V)* te zagrijava 15 min na 100-105; gleda se pri UV svjetlu na 365 nm.
Rezultati: Kromatogram poredbene otopine pokazuje u središnjem dijelu smeđežutu zonu barbaloina. U kromatogramu ispitivane otopine nema intenzivne žuto fluorescirajuće zone niti narančasto do crveno fluorescirajuće zone koja položajem odgovara

zoni barbaloina u kromatogramu poredbene otopine.

B. *Nanošenje:* 10 µL, u vrpci
Razvijanje: na dužini od 10 cm.
Sušenje: na zraku, najviše 5 minuta
Detekcija odmah se prska otopinom 5 g/L *nitrotetrazolium modrila R* u *metanolu R.* Kromatogram se odmah ispita.
Rezultati: Ne pojavljuju se ljubičaste ni sivkastoplave zone.

Strane primjese (28.2). Najviše 1%.

Gubitak sušenjem (2.2.32). Najviše 10,0% određeno na 1,000 g droge u prašku (355) sušenjem 2 sata u sušioniku na 105 °C.

Ukupni pepeo (2.4.16). Najviše 6,0%.

ODREDIVANJE SADRŽAJA

Provede se postupak uz zaštitu od svijetiosti

U tariranu tikvicu okruglog dna s ubrušenim grlom vagne se 0,250 g droge u prašku (180). Doda se 25,0 mL otopine 70 % *V/V metanola R* promiješa i ponovno vagne. Zagrijava se 15 min u vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Ostavi se ohladiti, vagne i nadopuni do početne mase sa 70 %-tnim V/V *metanolom R.* Filtrira se i 5,0 mL filtrata prenese u lijevak za odjeljivanje. Doda se 50 mL *vode R* te 0,1 mL *kloridne kiseline R.* Ekstrahira se pet puta s po 20 mL *laganog petroleja R.* Kad se slojevi odijele, vodeni sloj se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL. Sjedinjeni slojevi laganog petroleja isperu se dva puta s 15 mL *vode R* s kojom se prethodno ispere lijevak za odjeljivanje. Sloj laganog petroleja se odbaci, a vodeni sloj združi s vodenom otopinom u odmjernoj tikvici. Doda se 5 mL otopine 50 g/L *natrijevog karbonata R* i razrijedi do 100,0 mL *vodom R.* Stavi se 40,0 mL vodene otopine u tikvicu okruglog dna od 200 mL s ubrušenim grlom. Doda se 20 mL otopine 200 g/L *željezovog klorida R* i zagrijava 20 min, uz povratno hladilo, u vodenoj kupelji s razinorn vode iznad razine tekućine u tikvici. Doda se 2 mL *kloridne kiseline R* te nastavi zagrijavati 20 min, uz često protresivanje sve dok se talog ne otopi. Ostavi se ohladiti, prenese u lijevak za odjeljivanje i ekstrahira tri puta s po 25 mL *etera R,* s kojim se prethodno ispere tikvica. Sjedinjeni eterski ekstrakti isperu se dva puta s 15 mL *vode R.* Eterski sloj se prenese u odmjernu tikvicu i razrijediti do 100,0 mL *eterom R.* Pažijivo se upari 20,0 mL do suha te ostatak otopi u 10,0 mL otopine 5 g/L *magnezijevog acetata R* u *metanolu R.* Izmjeri se apsorbancija *(2.2.25)* na 515 nm, koristeći *metanol R* kao poredbenu otopinu.

Izračuna se udio glukofrangulina u postocima, izražen kao glukofrangulin A, prema izrazu:

$$(A \times 3{,}06) / m$$

tj. uzimajući specifičnu apsorbanciju glukofrangulina A koja je 204.

A = apsorbancija na 515 nm,
m = masa ispitivane tvari u gramima.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U novije vrijeme sve je izraženiji porast zanimanja za fitoterapiju i primjenu ljekovitih biljnih pripravaka u svrhu očuvanja zdravlja te liječenje različitih zdravstvenih problema. U skupini biljnih laksativa najpopularnije su biljne droge sene (Sennae folium i Sennae fructus) i krkavine (Frangulae cortex) te njihovi pripravci koji vrlo često predstavljaju prvi izbor u samoliječenju problema usporene probave i opstipacije. Za terapijsko djelovanje odgovorni su antracenski derivati koji su snažni stimulirajući laksativi, pa je kod odabira te skupine fitopreparata vrlo značajan stručni savjet ljekarnika ili liječnika s naglaskom na način djelovanja, važnost pravilnog doziranja, duljinu primjene, kontraindikacije, moguće neželjene nuspojave i interakcije s drugim lijekovima, a sve kako bi se osigurala djelotvorna i sigurna primjena. Detaljnim pregledom znanstvene literature provedenim u okviru ovog rada proširena su i sistematizirana saznanja o primjeni biljnih vrsta roda *Cassia* i *Frangula* kao laksativa. Budući da su na hrvatskom tržištu dostupni brojni ljekoviti preparati sene i krkavine te da se oni znatno razlikuju s obzirom na sastav, farmaceutski oblik i regulatorni status, glavni cilj istraživanja bio je provjeriti kakvoću svih pacijentima dostupnih fitopreparata primjenom relevantnih farmakopejskih propisa. U tu je svrhu provedena identifikacija i usporedna fitokemijska karakterizacija istraživanih fitopreparata sene i krkavine, te je određen sadržaj djelatnih antracenskih derivata koji je najznačajniji pokazatelj njihove djelotvornosti i farmaceutske kakvoće.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Fitopreparati sene i krkavine

U istraživanju su korišteni uzorci biljnih droga sene (Sennae folium i Sennae fructus) i krkavine (Frangulae cortex) te njihovi pripravci koji su u periodu istraživanja, tijekom prve polovice 2013. godine, bili u prometu u Republici Hrvatskoj. Sakupljena su ukupno dvadeset i tri fitopreparata dostupna u ljekarnama, biljnim ljekarnama, prodavaonicama zdrave hrane i na sajmovima domaćih proizvoda. Struktura istraživanih proizvoda bila je vrlo kompleksna uzevši u obzir njihov sastav, farmaceutski oblik te način na koji su stavljeni u promet (biljni lijek, galenski pripravak, dodatak prehrani, hrana). Detaljan popis svih uzoraka fitopreparata i njihove najvažnije karakteristike prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Popis istraživanih fitopreparata sene i krkavine

Broj	Naziv	Proizvođač	Sastav (%)			Ljekoviti oblik	Regulatorni status	Registracijski broj	Ser. br. i rok valjanosti
			Sennae folium	Sennae fructus	Frangulae cortex				
1	Holyplant sena čaj	JGL, Rijeka	100			čaj	lijek	UP/I-530-09/09-02/356	0012 10. 2013.
2	Sena list	Suban, Samobor	100			čaj	hrana		L15315 31. 01. 2014.
3	Sena list	Agristar, Višnjevac	100			čaj	hrana		L 1013 04. 2013.
4	Sena list	ZU Farmacia, Zagreb	100			čaj	galenski pripravak		947 13. 02. 2014.
5	Sena list	Travar MB, Bjelovar	100			čaj	hrana		43/12 10. 2013.
6	Sena list	Galenski laboratorij Ljekarne splitsko-dalmatinske županije, Split	100			čaj	galenski pripravak		12-1737 02. 2014.
7	Sena list	Pampa tea, Koprivnica	100			čaj	hrana		nepoznat
8	Bekunis biljni čaj	Roha Arzneimittel, Bremen, Njemačka	75	25		čaj	lijek	UP/I-530-09/05-01/62	210492 01. 03. 2015.
9	Bekunis instant	Roha Arzneimittel, Bremen, Njemačka		100		čaj (instant)	lijek	UP/I-530-09/05-01/61	102457 09. 2014.
10	Bekunis obložene tablete	Roha Arzneimittel, Bremen, Njemačka		100		tablete	lijek	UP/I-530-09/05-01/60	210454 01. 2015.
11	Planinski čaj za čišćenje	Trešnjevka laboratorij, Zagreb	40		20	čaj (rinfuza)	lijek	UP/I-530-09/05-01/13	2205 06. 2014
12	Čaj za čišćenje	Galenski laboratorij Ljekarne splitsko-dalmatinske županije, Split	15		20	čaj	galenski pripravak		12-1549 01. 2014.

Broj	Naziv	Proizvođač	Sastav (%)			Ljekoviti oblik	Regulatorni status	Registracijski broj	Ser.br. i rok valjanosti
			Sennae folium	Sennae fructus	Frangulae cortex				
13	Čaj za regulaciju probave	Fitosan, Zagreb	10		10	čaj	dodatak prehrani	MZ 08146621210	10. 2013.
14	Senaeka čaj	Suban, Samobor	10		20	čaj	dodatak prehrani	MZ 0812400610	L04017 30. 04. 2013.
15	Laksamix čaj	Biofarm. Lučko	10		20	čaj u filter vrećicama	dodatak prehrani	MZ 0813970909	L33C1201 03. 2014.
16	Holyplant Purgal	JGL, Rijeka	60		40	tablete	lijek	UP/I-530-09/10-02/242	46T12 06. 2013.
17	Alofran	Galenski laboratorij Gradske ljekarne Zagreb, Zagreb	8		85	tablete	galenski pripravak		260312 02. 2014.
18	Herbalaks	Galenski laboratorij Ljekarne splitsko-dalmatinske županije, Split	29		37	tablete	galenski pripravak		12-1014 04. 2014.
19	Frangula kora	Suban, Samobor			100	čaj	hrana		L08718 31. 01. 2014.
20	Kora krkavine	Pampa tea, Koprivnica			100	čaj	hrana		nepoznat
21	Krkovina	Travar MB, Bjelovar			100	čaj	hrana		43/12 10. 2013.
22	Plantalaks čaj	Suban, Samobor			30	čaj	dodatak prehrani	MZ 0810900410	L03911 31. 05. 2013.
23	Čaj za čišćenje	ZU Farmacia, Zagreb			30	čaj	galenski pripravak		959 14. 02. 2014.

3.2 Kemikalije, standardi, instrumenti i pribor

Za potrebe svih istraživanja korištene su kemikalije analitičke čistoće. Sve otopine reagenasa i uzoraka svježe su pripremljene neposredno prije uporabe.

Kemikalije

- Dietileter (Panreac, Barcelona, Španjolska)
- Etanol 96% (Lach-Ner, Neratorice, Češka)
- Etil acetat (POCH, Gliwice, Poljska)
- Kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kloridna kiselina min. 37% (POCH, Gliwice, Poljska)
- Kloroform (Lach-Ner, Neratorice, Češka)
- Magnezijev acetat tetrahidrat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat dekahidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Nitratna kiselina 65% (CarloErba reagents, Val de Reuil, Francuska)
- Octena kiselina min. 99,5% (POCH, Gliwice, Poljska)
- Petroleter (60-70°C) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 1-propanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Željezov(III) klorid heksahidrat (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)

Standardne supstancije

- Senozid A (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- Senozid B (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)

Instrumenti i pribor

- Analitičke vage EL 602, EL 303 i AB54-S (Mettler Toledo, Švicarska-SAD)
- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Centrifuga EBA (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)
- Filter papir crna vrpca Munktell 110mm/388 (Filtrak Brandt, Thermalbad Wiesenbad , Njemačka)
- Kapilare za tankoslojnu kromatografiju (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Njemačka)
- Komora za tankoslojnu kromatografiju
- Mlin za biljne droge (U D Corporation, Boulder, SAD)
- Ploče za tankoslojnu kromatografiju TLC Kieselgel staklene ploče (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- UV kabinet s UV lampom s dvije valne duljine (Camag, Muttenz, Švicarska)
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- Ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV/VIS spektrofotometar *Helios γ* (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- Vakuum uparivač s kupelji (Büchi Labortechnik, Flawil, Švicarska)
- Vodena kupelj VK_0ER (IN-KO, Zagreb, Hrvatska)

3.3 Metode

Eksperimentalni dio rada obuhvaćao je provjeru kakvoće komercijalnih fitopreparata sene i krkavine i bio je usmjeren na kvalitativnu i kvantitativnu analizu antracenskih derivata kao terapijski najznačajnijih sastavnica. U istraživanju su primijenjene metode propisane u odgovarajućim monografijama biljnih droga i pripravaka Europske farmakopeje (Ph. Eur. 7).

3.3.1 Kvalitativna analiza antracenskih derivata u fitopreparatima sene i krkavine tankoslojnom kromatografijom

Identifikacija i usporedna fitokemijska karakterizacija pripravaka sene i krkavine provedena je metodom tankoslojne kromatografije prema postupku opisanom u Europskoj farmakopeji [60], uz manje modifikacije. Modifikacija je provedena prvenstveno zbog nezadovoljavajućeg odjeljivanja pojedinih sastavnica etanolno-vodenih ekstrakata fitopreparata, pa je za ekstrakciju korišten metanol, dok su za usporedbu korišteni standardi djelatnih tvari, sukladno propisima u relevantnoj farmakognoškoj literaturi [61].

Istraživanju su podvrgnuti ekstrakti analiziranih uzoraka pripravljeni tako da je praškasto usitnjeni biljni materijal (1 g čaja monodroge odnosno 2 g čajne mješavine) ili tableta (masa prilagođena sadržaju ekstrakta) ekstrahirani s 10 mL metanola 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Bistri filtrat, nakon hlađenja, služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje. Kao poredbene supstancije uporabljene su 0,05%-tne metanolne otopine senozida A i B. Za odjeljivanje antracenskih sastavnica seninog lista i seninog ploda korištena je smjesa octene kiseline, vode,

etil acetata i propanola u propisanim volumnim omjerima 1:30:40:40. Detekcija je provedena prskanjem ploče s 20 %-tnom otopinom nitratne kiseline te zagrijavanjem 10 min na 120 °C; nakon hlađenja ploča je dodatno prskana otopinom 50 g/L kalijevog hidroksida u 50 %-tnom etanolu te ponovo zagrijana do pojave obojanih zona.

Dokazivanje prisutnosti antracenskih derivata u kori krkavine provedeno je na tankom sloju Kieselgel 60 F_{254} korištenjem pokretne faze voda – metanol – etil acetat 13:17:100 (V/V/V). Detekcija odjeljenih antracenskih spojeva provedena je prskanjem ploče otopinom kalijeva hidroksida i zagrijavanjem na 105 °C do pojave obojenih zona.

Identifikacija odjeljenih antracenskih sastavnica provedena je na temelju usporedbe s referentnim spojevima i literaturnim podacima.

3.3.2 Kvantitativna analiza antracenskih derivata u fitopreparatima sene i krkavine

Za određivanje sadržaja djelatnih tvari u istraživanim fitopreparatima sene i krkavine korištene su spektrofotometrijske metode opisane u relevantnim monografijama Ph. Eur. 7: Sennae folium, Sennae folii extractum siccum normatum, Sennae fructus acutifoliae, Frangulae cortex i Frangulae corticis extractum siccum normatum. Svi postupci provedeni su uz zaštitu od svijetlosti kao što je propisano.

3.3.2.1 Određivanja sadržaja senozida u seninom listu i seninom plodu

U tikvicu od 100 mL stavljeno je 0,150 g droge u prašku. Dodano je 30,0 mL vode, sadržaj promiješan, vagnut te stavljen u vodenu kupelj. Smjesa je zagrijavana 15 minuta uz povratno hladilo. Nakon hlađenja, sadržaj je vagnut te dopunjen vodom do

početne rnase. Smjesa je potom centrifugirana i 20,0 mL supernatanta preneseno u lijevak za odjeljivanje od 150 mL. Dodano je 0,1 mL razrijeđene kloridne kiseline i sadržaj u lijevku mućkan je tri puta s po 15 mL kloroforma. Nakon odjeljivanja slojeva, kloroformski sloj je odbačen. U lijevak je dodano 0,10 g natrijevog hidrogenkarbonata te sadržaj mućkan 3 minute. Nakon centrifugiranja, 10,0 mL supernatanta preneseno je u tikvicu okruglog dna od 100 mL s ubrušenim grlom. Dodano je 20 mL otopine željezovog klorida te sadržaj promiješan. Sadržaj tikvice zagrijavan je 20 minuta, uz povratno hladilo, u vodenoj kupelji s razinom vode iznad razine tekućine u tikvici. Nakon dodavanja 1 mL konc. kloridne kiseline grijanje smjese nastavljeno je još 20 minuta, uz često protresivanje sve dok se talog nije otopio. Sadržaj tikvice je nakon hlađenja prenesen u lijevak za odjeljivanje i ekstrahiran tri puta s po 25 mL etera s kojim je prethodno isprana tikvica. Sjedinjeni eterski slojevi isprani su dva puta s 15 mL vode. Eterski sloj prenesen je u odmjernu tikvicu i razrijeđen do 100,0 mL eterom. Potom je pažljivo upareno 10,0 mL otopine, a suhi ostatak otopljen u 10,0 mL otopine 5 g/L magnezijevog acetata u metanolu. Apsorbancija je mjerena na 515 nm, koristeći metanol kao poredbenu otopinu.

Izračunat je udio senozida B u postocima prema izrazu:

$(A \times 1{,}25) / m$

uzimajući da je specifična apsorbancija senozida B 240.

A = apsorbancija na 515 nm,

m = masa uzorka u gramima.

3.3.2.2 Određivanje sadržaja senozida u suhom ekstraktu seninog lista

U tikvicu od 100 mL stavljeno je 0,150 g analiziranog ekstrakta, otopljeno u vodi i razrijeđeno vodom do 100,00 mL. Otopina je filtrirana i prvih 10 mL filtrata odbačeno. Potom je 20,0 mL filtrata preneseno u lijevak za odjeljivanje od 150 mL. Dodano je 0,1 mL razrijeđene kloridne kiseline te ekstrahirano tri puta s po 15 mL etera. Kad su se slojevi odijelili, eterski sloj je odbačen. Vodenom sloju dodano je 0,10 g natrijevog hidrogenkarbonata te smjesa mućkana 3 minute. Nakon centrifugiranja, 10,0 mL supernatanta preneseno je u tikvicu okruglog dna od 100 mL s ubrušenim grlom. Dodano je 20 mL otopine željezovog klorida te promiješano. Sadržaj tikvice zagrijavan je 20 minuta, uz povratno hladilo, u vodenoj kupelji s razinom vode iznad razine tekućine. Nakon dodavanja 3 mL koncentrirane kloridne kiseline, nastavljeno je zagrijavanje još slijedećih 30 minuta, uz često protresivanje sve dok se talog nije otopio. Sadržaj je ohlađen, prenesen u lijevak za odjeljivanje i ekstrahiran tri puta s po 25 mL etera, s kojim je prethodno isprana tikvica. Sjedinjeni eterski slojevi isprani su potom dva puta s 15 mL vode. Eterski sloj prenesen je u odmjernu tikvicu i razrijeđen do 100,0 mL eterom. Pažljivo je upareno 10,0 mL do suha te ostatak otopljen u 10,0 mL otopine 5 g/L magnezijevog acetata u metanolu. Izmjerena je apsorbancija na 515 nm, uz metanol kao poredbenu otopinu.

Izračunat je udio senozida B u postocima prema izrazu:

$$(A \times 4{,}167) / m$$

uzimajući da je specifična apsorbancija senozida B 240.

A = apsorbancija na 515 nm,

m = masa uzorka u gramima.

3.3.2.3 Određivanje sadržaja glukofrangulina u krkavininoj kori i suhom ekstraktu krkavinine kore

U tariranu tikvicu okruglog dna s ubrušenim grlom vagnuto je 0,250 g droge u prašku, odnosno 0,100 g analiziranog suhog ekstrakta. Nakon dodavanja 25,0 mL 70 %-tnog metanola, sadržaj je promiješan i ponovno vagnut. Ekstrakcija droge provedena je zagrijavanjem 15 min u vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja, sadržaj je izvagan i nadopunjen do početne mase sa 70 %-tnim metanolom. Ekstrakt je potom filtriran i 5,0 mL filtrata preneseno je u lijevak za odjeljivanje. Dodano je 50 mL vode te 0,1 mL koncentrirane kloridne kiseline. Sadržaj je u lijevku izmućkan pet puta s po 20 mL laganog petroleja. Po odjeljivanju slojeva, vodeni sloj je prenijet u odmjernu tikvicu od 100 mL. Sjedinjeni slojevi laganog petroleja isprani su dva puta s 15 mL vode kojom je prethodno ispran lijevak za odjeljivanje. Sloj laganog petroleja je odbačen, a vodeni sloj združen s vodenom otopinom u odmjernoj tikvici. U tikvicu je dodano 5 mL otopine 50 g/L natrijevog karbonata i sadržaj razrijeđen do 100,0 mL vodom. Potom je 40,0 mL vodene otopine preneseno u tikvicu okruglog dna od 200 mL s ubrušenim grlom. Dodano je 20 mL otopine 200 g/L željezovog klorida i smjesa zagrijavana 20 minuta, uz povratno hladilo, u vodenoj kupelji s razinorn vode iznad razine tekućine u tikvici. Nakon dodavanja 2 mL konc. kloridne kiseline, nastavljeno je zagrijavanje još 20 minuta, uz česta protresivanja sve dok se talog nije otopio. Sadržaj je potom ohlađen, prenesen u lijevak za odjeljivanje i ekstrahiran tri puta s po 25 mL etera, s kojim je prethodno isprana tikvica. Sjedinjeni eterski ekstrakti isprani su dva puta s 15 mL vode. Eterski sloj je prenesen u odmjernu tikvicu i razrijeđen do 100,0 mL eterom. Pažijivo je upareno 20,0 mL do suha te ostatak otopljen u 10,0 mL otopine 5 g/L magnezijevog acetata u metanolu. Apsorbancija je izmjerena na 515 nm, koristeći metanol kao poredbenu otopinu.

Izračunat je udio glukofrangulina u postocima, izražen kao glukofrangulin A, prema izrazu:

$$(A \times 3{,}06) / m$$

uzimajući da je specifična apsorbancija glukofrangulina A 204, izračunato na temelju specifične apsorbancije barbaloina.

A = apsorbancija na 515 nm,

m = masa uzorka u gramima.

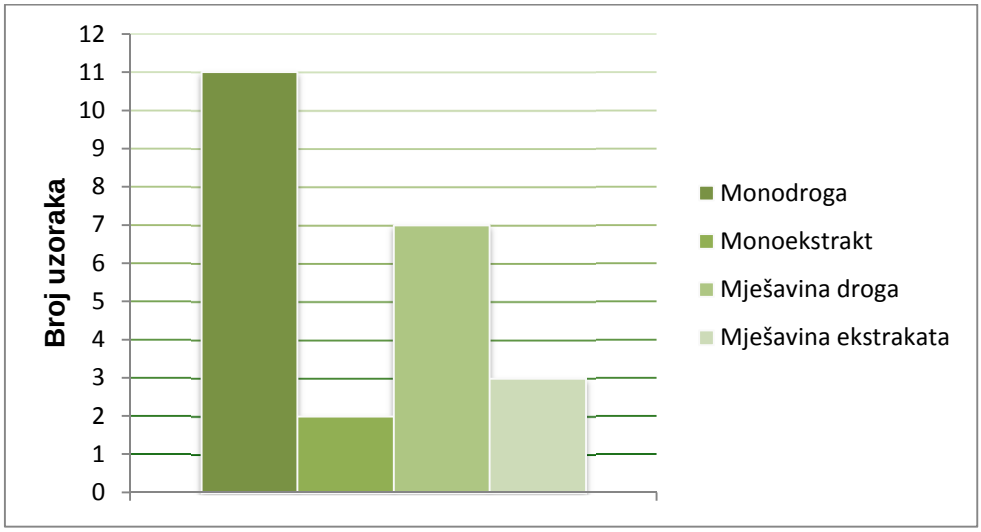
4. REZULTATI I RASPRAVA

Fitopreparati sene i krkavine, s antracenskim derivatima kao djelatnim tvarima, smatraju se najčešće korištenim prirodnim laksativima. Ljekovito djelovanje tih biljnih droga prepoznato je u narodnoj medicini, a posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno su istražena njihova fitokemijska i farmakološka svojstva, te u manjem obimu i klinička djelotvornost, pa je njihova primjena u suvremenoj fitoterapiji utemeljena na znanstvenim dokazima. Djelotvornost i sigurnost primjene biljnih lijekova je, jednako kao kod svakog drugog lijeka, uvjetovana kakvoćom, no postavljanje zahtjeva i razvoj metoda za provjeru njihove kakvoće daleko je složenije u odnosu na konvencionalne lijekove. Razlog tome leži u kompleksnosti njihova kemijskog sastava odnosno velikom broju sastavnica koje uvjetuje složenost postupka identifikacije, kao i kvantitativne analize sadržaja djelatnih tvari. Korištenjem validiranih farmakopejskih metoda, u okviru ovog rada provjerena je kakvoća biljnih droga i pripravaka sene i krkavine dostupnih na hrvatskom tržištu. U tu je svrhu provedena identifikacija i kemijska karakterizacija istraživanih fitopreparata te je kvantitativno određen sadržaj antracenskih derivata kao glavnih nositelja njihovog farmakološkog djelovanja.

4.1 Raspodjela ispitivanih fitopreparata sene i krkavine prema sastavu, farmaceutskom obliku i regulatornom statusu

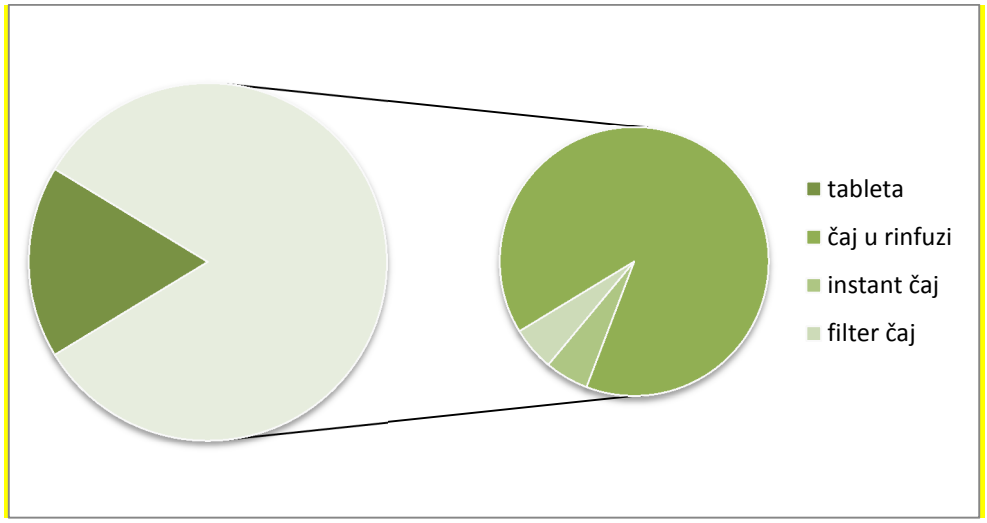
Kvalitativnim i kvantitativnim fitokemijskim istraživanjima obuhvaćena su dvadeset i tri komercijalno dostupna fitopreparata koji sadrže biljne droge i/ili ekstrakte sene i/ili krkavine. Pregledom njihovog sastava, farmaceutskog oblika te načina na koji su stavljeni u promet ustanovljena je vrlo kompleksna struktura ispitivanih proizvoda.

Iz prikaza na Slici 5 vidljivo je da sena i krkavine u promet najviše dolaze kao monodroge, a prisutan je i veliki broj mješavina u čiji sastav ulaze ljekovite droge sene i/ili krkavine. Znatno manji udio na tržištu zauzimaju fitopreparati sa suhim ekstraktima sene i krkakvine. Njihova slaba zastupljenost nije u skladu s preporukama EMA-e i FDA jer one promiču korištenje standardiziranih ekstrakata biljnih droga sa ciljem osiguranja propisane, ujednačene i dosljedne kakvoća fitopreparata kao temelja njihove kvalitete, učinkovitosti i sigurnosti [5]. Od pet analiziranih preparata njih četiri sadrže normirane ekstrakte, a samo na deklaraciji njih triju, registriranih kao lijekovi, navedene su količine antracenskih derivata koje navodno sadrže.



Slika 5. Podjela istraživanih fitopreparata sene i krkavine prema sastavu

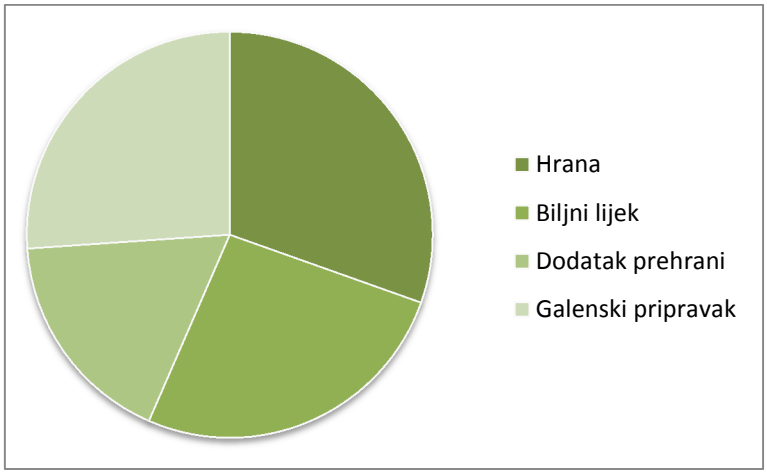
Slika 6 prikazuje podjelu istraživanih fitopreparata prema farmaceutskom obliku u kojem se nalaze na tržištu. Iz dijagrama je vidljivo da ljekoviti preparati sene i krkavine uglavnom dolaze u obliku čajeva, a u znatno manjem broju prisutni su i u



Slika 6. Udio pojedinih farmaceutskih oblika istraživanih fitopreparata sene i krkavine

obliku tableta. Među čajevima prevladavaju oni u rinfuzi, dok instant čajevi i čajevi u filter vrećicama zauzimaju vrlo mali udio. U obliku čaja na tržištu su podjednako zastupljene monodroge (Sennae folium i Frangulae cortex) te čajne mješavine koje osim biljnih droga sene i/ili krkavine sadrže i druge ljekovite biljne droge.

Na Slici 7 prikazana je podjela istraživanih fitopreparata prema načinu stavljanja u promet u Republici Hrvatskoj. Vidljivo je da je samo manji dio svih ljekovitih preparata sene i krkavine registriran kao biljni lijek. Iako je postupak njihova dolaska na tržište najskuplji i najdugotrajniji, jedino su biljni lijekovi proizvodi najstrože regulirane i redovito praćene farmaceutske kakvoće koja jamči djelotvornu i sigurnu primjenu. Podjednak udio zauzimaju i galenski preparati, koji iako su lijekovi ne zahtjevaju registraciju ni provjeru kakvoće regulatorne agencije pri stavljanju u promet. Znatan broj preparata prisutan je kao dodatak prehrani, što podrazumijeva njihovu zdravstvenu ispravnost, ali ne jamči njihovu djelotvornost. Najveći broj analiziranih fitopreparata dostupan je u slobodnoj prodaji kao hrana te se od njih kao takvih očekuje samo da su neštetni za ljude.



Slika 7. Podjela istraživanih fitopreparata sene i krkavine s obzirom na način stavljanja u promet u Republici Hrvatskoj

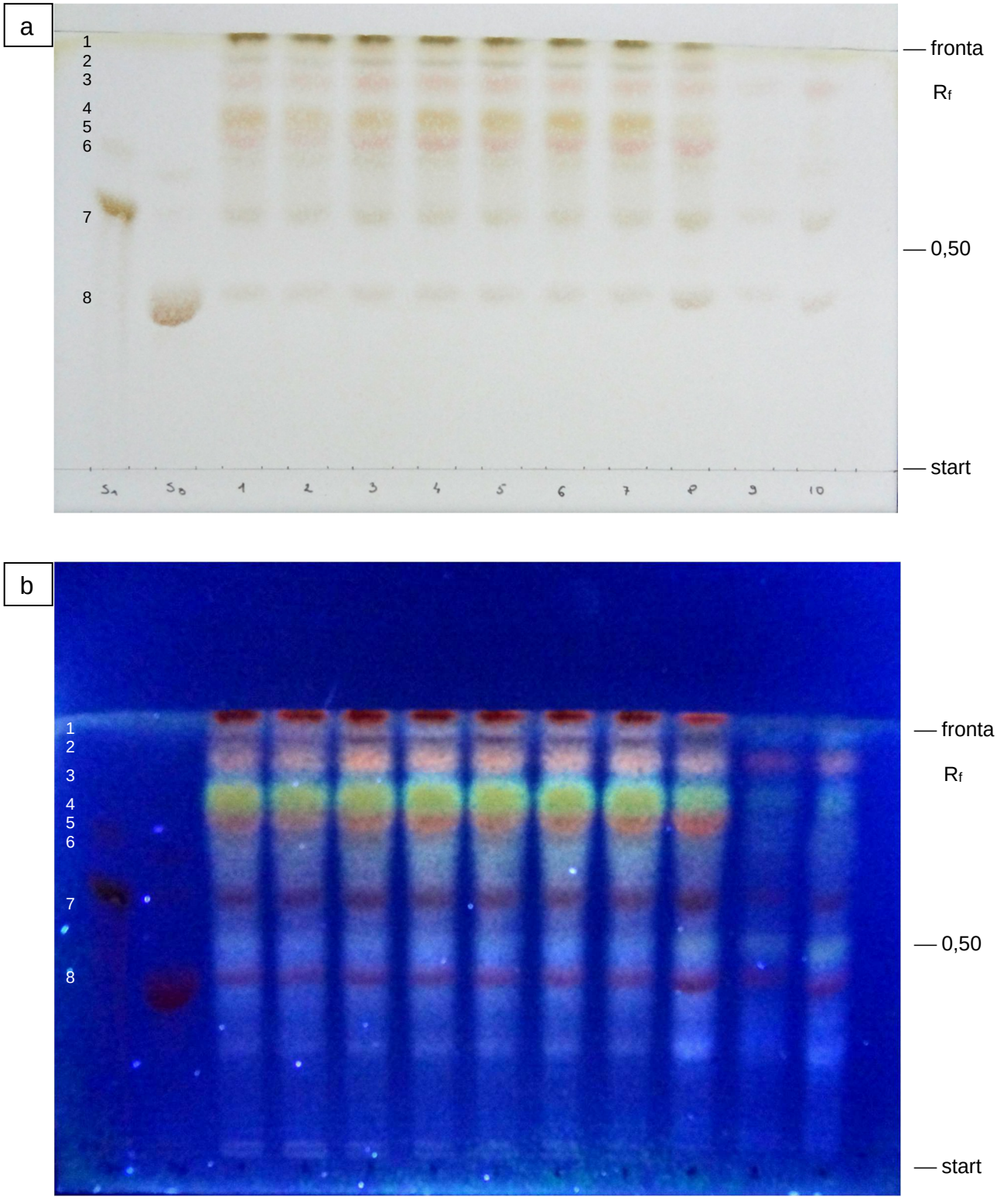
4.2 Kvalitativna analiza antracenskih derivata u fitopreparatima sene i krkavine

Zbog svoje jednostavnosti i ekonomske prihvatljivosti metode tankoslojne kromatografije često se primjenjuju u analitici biljnih droga i sastavni su dio farmakopejskih propisa koji se provode u svrhu potvrde njihova identiteta. Identifikacija biljnih droga i suhih ekstrakata sene i krkavine temeljena je na dokazivanju antracenskih spojeva na tankom sloju adsorbensa. Budući da se kemijske strukture djelatnih sastavnica tih droga značajno razlikuju, u kvalitativnoj analizi korištene su dvije različite farmakopejske metode.

4.2.1 Tankoslojna kromatografija fitopreparata sene

Prisutnost antracenskih spojeva u uzorcima fitopreparata u čiji sastav ulaze biljne droge sene i njihovi ekstrakti dokazana je kromatografijom na tankom sloju silikagela. S obzirom na razlike u sastavu analiziranih preparata (monodroge Sennae folium i Sennae fructus, čajne mješavine s različitim udjelom droga Sennae folium i/ili Sennae fructus, suhi ekstrakti Sennae folii extractum siccum normatum i Sennae

fructi extractum siccum) provedena su preliminarna ispitivanja te je zadovoljavajuća osjetljivost i razlučivost zona postignuta pri nanošenju 10 µL uzoraka monodroge i standarda, odnosno 20 µL uzorka čajne mješavine. Analizirane sastavnice odijeljene su pomoću mobilne faze sastavljene od octene kiseline, vode, etil acetata i propanola u volumnim omjerima 1:30:40:40. Detekcija je provedena prskanjem ploče nitratnom kiselinom uz zagrijavanje na 120°C te potom prskanjem otopinom kalijeva hidroksida i ponovnim zagrijavanjem do pojave vidljivih zona. Dobiveni kromatogram promatran je pri vidljivom i UV svjetlu te je prikazan na Slici 8. Na kromatogramu metanolnih ekstrakata fitopreparata sene pri vidljivom je svjetlu uočeno osam jasno odijeljenih zona smještenih u R_f području od 0,3 do 1 (Slika 8a). Zone diantronskih glikozida senozida obojane su u nijansama smeđe boje, dok crvenoljubičaste zone pripadaju antrakinonskim aglikonima i njihovim glikozidima. Na temelju boje, položaje i R_f vrijednosti odijeljenih zona, usporedbom s poredbenim spojevima te pomoću literaturnih podataka [65, 66], identificiran je veći broj detektiranih zona (Tablica 2). Zone koje bojom i R_f vrijednostima odgovaraju poredbenim senozidima B (R_f=0,41) i A (R_f=0,58) detektirane su u svim uzorcima droge Sennae folium (uzorci 1-7). Iznad slabe smeđe zone R_f vrijednosti 0,71, koja je literaturno identificirana kao senozidi D, na kromatogramima svih uzoraka seninog lista vidljiva je intenzivna crvenoljubičasta zona rein-8-glukozida (R_f = 0,75), dok zona slabijeg intenziteta obojenja s R_f vrijednosti 0,90 pripada aglikonu reinu. Usporedna analiza fitopreparata sene ukazala je na podjednak sastav i količinu antracenskih spojeva u svim uzorcima monodroge seninog lista (uzorci 1-7), dok je u uzorcima seninog ploda (uzorci 9 i 10)



Slika 8. Kromatogrami antracenskih spojeva u fitopreparatima koji sadrže senu kao monodrogu. A) detekcija pri vidljivom svjetlu; B) detekcija pod UV svjetlom na 365 nm

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254} TLC ploča
Pokretna faza: octena kiselina – voda – etil acetat – propanol 1:30:40:40 (V/V/V/V)
Detekcija: HNO_3; 120 °C; KOH; 120 °C; Vis i UV-365 nm
Referentni spojevi: **S_A** – senozid A (R_f =0,56), **S_B** – senozid B (R_f =0,34)

Tablica 2. Antracenske sastavnice fitopreparata sene detektirane na tankoslojnom kromatogramu

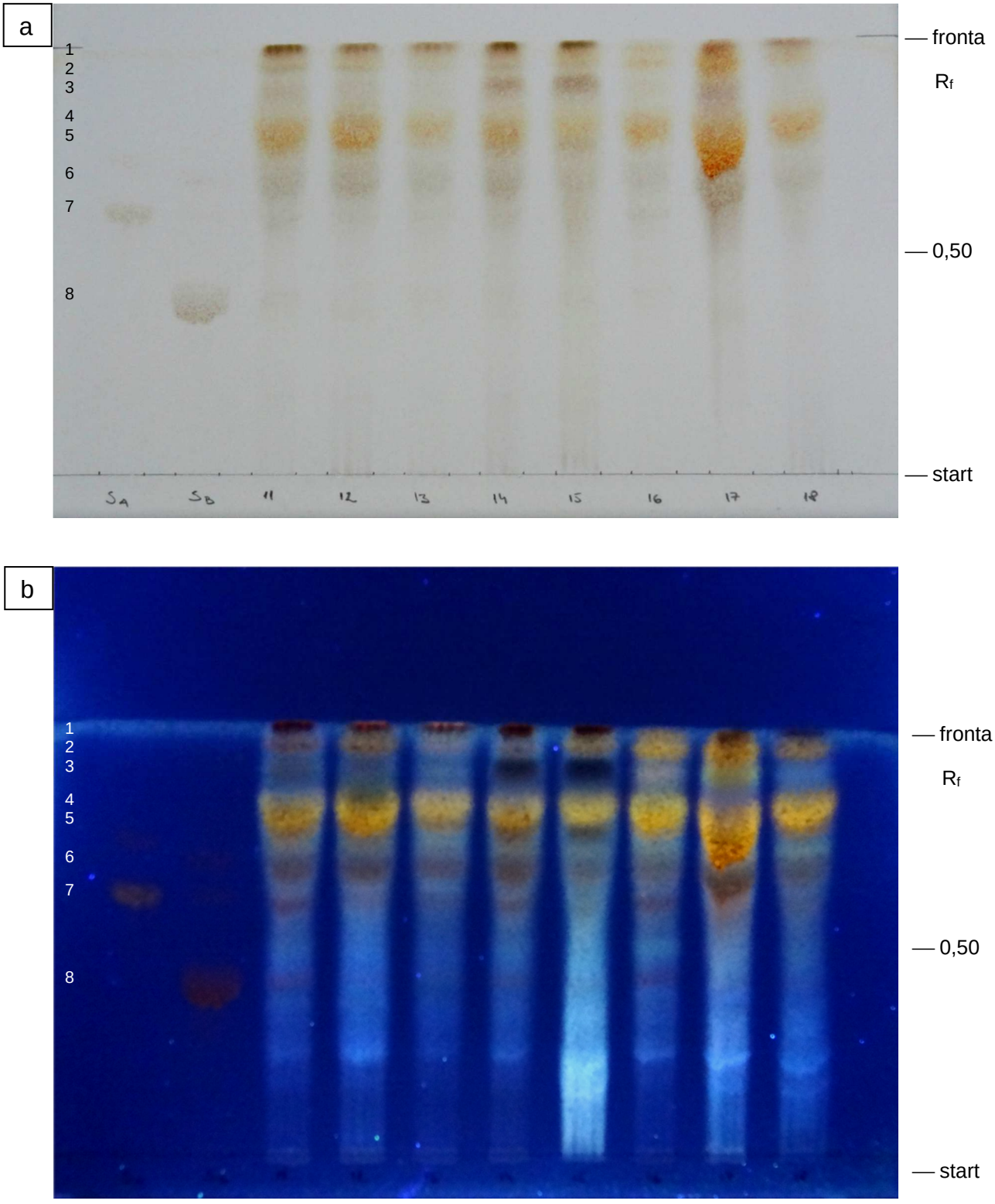
Zona	R_f	Boja	Sastavnica	Identifikacija
1	1,00	zelenosmeđa	Klorofil	[66]
2	0,94	smeđa	neidentificirani spoj	-
3	0,90	crvenoljubičasta	Rein	[66]
4	0,81	žutosmeđa	neidentificirani spoj	-
5	0,75	crvenoljubičasta	Rein-8-O-glukozid	[66]
6	0,71	smeđa	Senozid D	[66]
7	0,58	smeđa	Senozid A	[66]
8	0,41	smeđa	Senozid B	[66]

detektiran manji broj zona slabijeg intenziteta obojenja. Na kromatogramima uzoraka Sennae fructus uočene su zone senozida B i A te reina. Na Slici 8b, koja donosi prikaz kromatograma promatranog pod UV lampom (365 nm), uočljive su tamne zona diantronskih senozida B, A i D, dok su antrakinon reina i njegov glikozidni derivat vidljivi kao zone narančaste fluorescencije. Kod svih je uzoraka droge Sennae folium u gornjoj trećini kromatograma uočena široka žutosmeđa zona (R_f = 0,81) koja u UV svjetlu pokazuje intenzivnu žutozelenu fluorescenciju (flavonoidni spojevi) i koja najvjerojatnije prekriva slabu zonu senozida C koji se nalazi u tom području. Na samoj fronti mobilne faze prisutna je zelena zona klorofila, pod UV svjetlom vidljiva kao zona intenzivne crvene fluorescencije. Prisutnost tih dviju zona predstavlja razvidna razlikovna kromatografska obilježja droge Sennae folium u odnosu na drogu Sennae fructus.

Slika 9 prikazuje kromatograme kombiniranih fitopreparata koji pored droga ili ekstrakata Sennae folium i Sennae fructus sadrže i druge biljne droge. Uzevši u obzir vrlo kompleksan kemijski sastav analiziranih preparata, primjenjenom pokretnom fazom postignuto je relativno dobro odjeljivanje glavnih antracenskih spojeva. Na kromatogramima uzoraka čajnih mješavina i tableta detektiran je veći broj zona, ali je

uočeno i njihovo preklapanje u gornjoj trećini kromatograma. Unatoč ograničenoj razlučivosti kod većine uzoraka je, s obzirom na boju i položaj odijeljenih zona, moguće potvrditi prisutnost diantronskih glikozida senozida A, B i D, dok je u uzorcma 14 i 15 detektiran i senozid C. Značajne razlike u veličini i intenzitetu obojenja zona senozida najvećim su dijelom uzrokovane različitim masenim udjelima seninih droga i ekstrakata u analiziranim fitopreparatima.

U radu je primjenom tankoslojne kromatografije potvrđen identitet svih uzoraka droga Sennae folium i Sennae fructus koje na tržište dolaze kao monodroge, te je u njima dokazana prisutnost djelatnih senozida A-D. Svi analizirani uzorci monodroga sene udovoljavaju monografskim zahtjevima Ph. Eur. 7. Dobiveni kromatogrami upućuju na ograničenu mogućnost primjene tankoslojne kromatografije u identifikaciji i dokazivanju djelatnih tvari seninih droga u sastavu višekomponentnih preparata, posebice kada ti preparati sadrže još i druge droge s antracenskim spojevima.

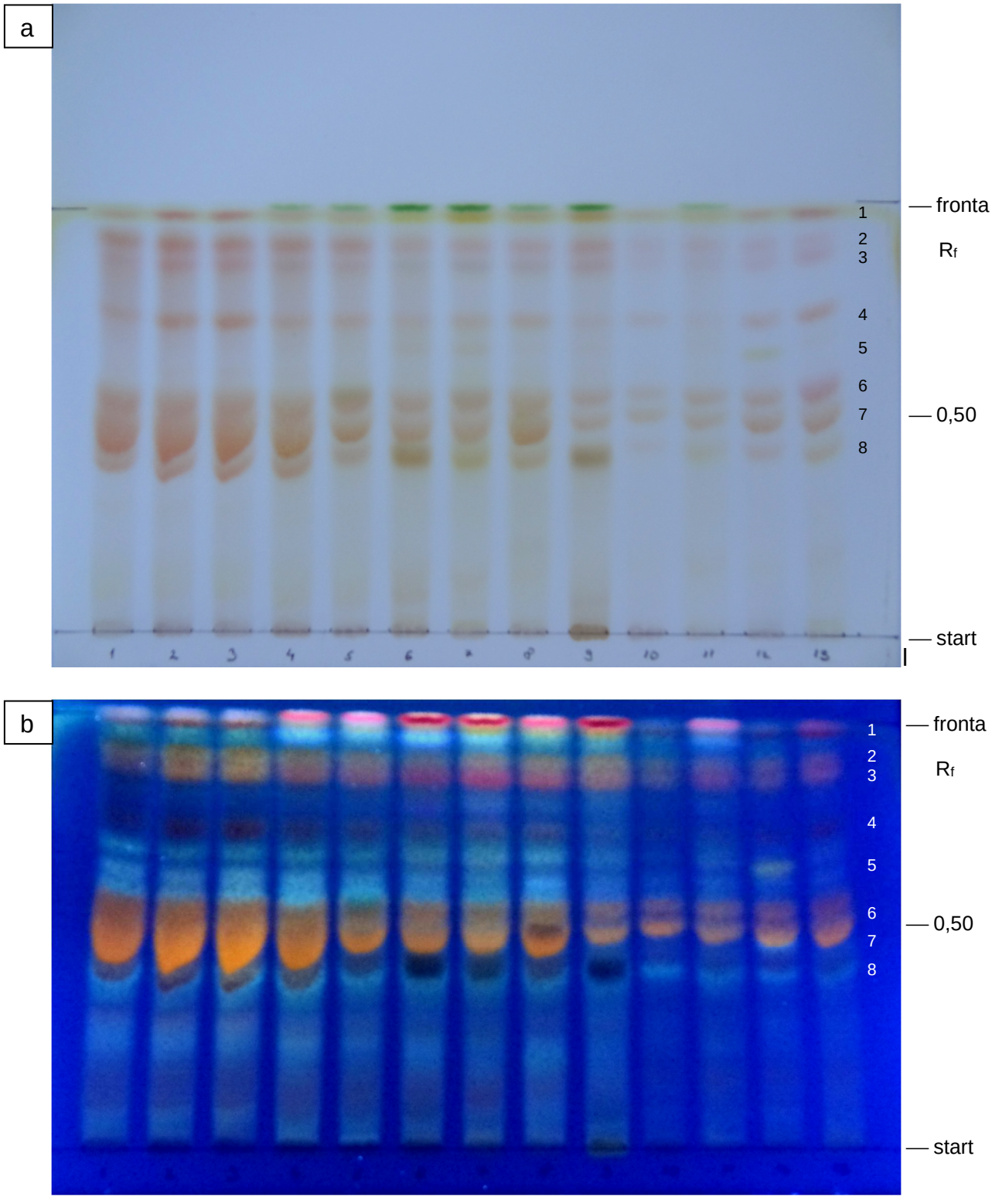


Slika 9. Kromatogrami antracenskih spojeva u kombiniranim fitopreparatima koji sadrže droge Sennae folium i/ili Sennae fructus. A) detekcija pri vidljivom svjetlu; B) detekcija pod UV svjetlom na 365 nm

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254} TLC ploča
Pokretna faza: octena kiselina – voda – etil acetat – propanol 1:30:40:40 (V/V/V/V)
Detekcija: HNO_3; 120 °C; KOH; 120 °C; Vis i UV-365 nm
Referentni spojevi: **S_A** – senozid A (R_f =0,56), **S_B** – senozid B (R_f =0,34)

4.2.2 Tankoslojna kromatografija fitopreparata krkavine

Prisutnost antracenskih derivata u komercijalnim fitopreparatima droge Frangulae cortex dokazana je kromatografijom na tankom sloju silikagela. Odjeljivanje sastavnica analiziranih ekstrakata provedeno je korištenjem pokretne faze sastavljene od vode, metanola i etil acetata (13:17:100, V/V/V). Nakon prskanja razvijene ploče etanolnom otopinom kalijeva hidroksida i zagrijavanjem na 105°C dobiveni su kromatogrami prikazani na Slici 10. Budući da glavne sastavnice krkavine nisu komercijalno dostupne u čistom obliku, odjeljene zone su na temelju boje i položaja identificirane korištenjem literaturnih podataka, kao što je prikazano u Tablici 3. Pri vidljivom je svjetlu (slika 10a) na kromatogramima svih analiziranih fitopreparata uočeno sedam jasno odijeljenih zona obojanih u nijansama narančaste, crvene i smeđe boje. Donju polovicu kromatograma karakterizira prisutnost triju crvenosmeđih zona, od kojih dvije šire i intenzivnije zone u R_f području oko 0,50 pripadaju glukofrangulinima A (R_f=0,50) i B (R_f=0,55). U gornjem dijelu kromatograma karakteristične su zone u R_f području oko 0,9 koje predstavljaju franguline A i B. Slika 10b prikazuje kromatograme promatrane pod UV svjetlom na 365 nm pod kojim su frangulini i glukofrangulini vidljivi kao intenzivno narančasto fluorescirajuće zone. Pored navedenih zona, u središnjem dijelu kromatograma uočljiva je i zona emodin glukozida (R_f=0,73), te na samoj fronti pokretne faze zona frangula emodina, obje posebno izražene u uzorcima monodroga (uzorci 1-3). Važno je istaknuti da je jedino u analiziranom uzorku 12 u središnjem dijelu kromatograma, ispod zona frangulina A i B, prisutna zona intenzivne žute fluorescencije (R_f=0,61).



Slika 10. Kromatogrami antracenskih spojeva u fitopreparatima koji sadrže drogu Frangulae cortex. A) detekcija pri vidljivom svjetlu; B) detekcija pod UV svjetlom na 365 nm

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254} TLC ploča
Pokretna faza: voda – metanol - etil acetat 13:17:100 (V/V/V)
Detekcija: KOH; 105 °C; Vis i UV-365 nm

Tablica 3. Antracenske sastavnice fitopreparata krkavine detektirane na tankoslojnom kromatogramu

Zona	R_f	Boja	Sastavnica	Identifikacija
1	1,00	crvenonarančasta	Frangula emodin	[65, 66]
2	0,90	crvenonarančasta	Frangulin B	[65, 66]
3	0,86	crvenonarančasta	Frangulin A	[65, 66]
4	0,73	narančasta	Frangula emodin glikozid	[66]
5	0,61	žuta	neidentificirani spoj	-
6	0,55	crvenosmeđa	Glukofrangulin B	[65, 66]
7	0,5	crvenosmeđa	Glukofrangulin A	[65, 66]
8	0,41	smeđa	Flavonidni glikozid	[66]

Dobiveni rezultati usporedne fitokemijske analize ukazuju na podjednak sastav i količinu antracenskih spojeva u svim uzorcima monodroge Frangulae cortex (uzorci 1, 2 i 3). Kromatografiranjem višekomponentnih fitopreparata koji sadrže drogu ili ekstrakt krkavine (uzorci 4-13) pri istim su uvjetima dobivene vrlo slične kromatografske slike kao i kod monodroga. Bitne razlike u veličini te intenzitetu obojenja/fluorescencije odjeljenih zona upućuju na različiti sadržaj antracenskih sastavnica u ispitanim uzorcima, što je i razumljivo s obzirom na različite udjele krkavinine kore u pojedinim mješavinama.

Primijenjena metoda tankoslojne kromatografije pokazala se prikladnom za brzu identifikaciju droge Frangulae cortex i dokazivanje prisutnosti djelatnih antracenskih derivata, ne samo u uzorcima monodroga već i u višekomponentnim fitopreparatima koji tu drogu sadrže. Svi komercijalni uzorci krkavinine kore - monodroge zadovoljavaju monografski propis iz Ph. Eur. 7. Droga koja ulazi u sastav glavnine analiziranih kombiniranih preparata, s obzirom na utvrđeni kemijski profil, također je identificirana kao oficinalna. Međutim, pripravak krkavine u jednom uzorku tableta (uzorak 12) ne odgovara farmakopejskom zahtjevu, budući da je na kromatogramu ustanovljena prisutnost zone koja ukazuje na zamjenu, odnosno patvorinu droge korom neke druge *Rhamnus* vrste. Uzevši u obzir da 85% antracenskih derivata u

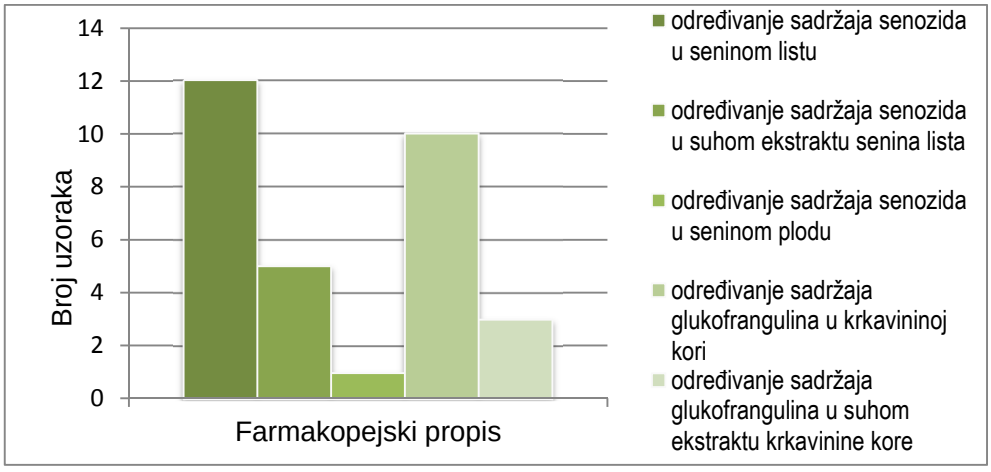
analiziranom fitopreparatu potječe iz ekstrakta krkavinine kore, postoji velika opravdanost sumnje u identitet te droge, no obzirom da je riječ o preparatu u čiji sastav ulaze i druge antrakinonske droge (8% ekstrakt aloja i 8% ekstrakt seninog lista) potrebna je dodatna analiza za donošenje krajnjeg zaključka.

4.3 Kvantitativna analiza antracenskih derivata u fitopreparatima sene i krkavine

Antracenski derivati glavne su djelatne sastavnice biljnih droga i ekstrakata sene i krkavine, a ujedno predstavljaju i kemijske markere čijim se kvantitativnim određivanjem pruža najbolji uvid u kakvoću preparata koji te droge sadrže. U istraživanim fitopreparatima je udio antracenskih derivata određen spektrofotometrijskim metodama propisanim u relevatnim monografijama u Ph. Eur. 7 [65]. Primijenjene metode zasnivaju se na modificiranoj Bornträgerovoj reakciji, reakciji boje koja se najčešće koristi za dokazivanje antrakinona. Modifikacija metode temelji se na uvođenju magnezijeva acetata koji je, u odnosu na lužine koje se koriste u klasičnoj Bornträgerovoj reakciji, osjetljiviji reagens, manje podložan utjecaju interferirajućih tvari i dnevnog svjetla [67]. Prvi korak analize podrazumijevao je ekstrakciju antracena iz biljnog materijala (biljna droga, ekstrakt) korištenjem polarnog otapala (voda, 70% metanol). Ekstrahirani antrakinonski aglikoni potom su se odjeljivali izmućkavanjem s nepolarnim sredstvom (kloroform, petroleter). Diantronski glikozidi zaostali u vodenom ekstraktu, zagrijavanjem u prisutnosti željezovog (III) klorida uz prikladan pH prevedeni su u oksidirane monomerne oblike antrakinonskih glikozida. U sljedećem koraku glikozidni spojevi cijepani su postupkom kisele hidrolize provedene dodatkom koncentrirane kloridne kiseline, a oslobađeni aglikoni potom odijeljeni izmućkavanjem s organskim otapalom (eter).

Izdvojeni antrakinonski aglikoni reagirali su s magnezijevim acetatom formirajući ljubičastocrveni kompleksni spoj čiji je intenzitet obojenja direktno proporcionalan količini analiziranog spoja i određen je spektrofotometrijski na 515 nm. Zbog složenosti i dugotrajnosti primijenjenog postupaka kvantitativne analize su provedene vrlo oprezno zbog velikog broja koraka i višekratnih mogućnosti gubitka analita. Iako načelno slični, primijenjeni postupci koji su propisani u monografijama relevatnih droga razlikovali su se u pojedinim koracima izvođenja te u krajnjem izračunu sadržaja. Fitopreparati koji su sadržavali mješavinu biljnih droga ili ekstrakata sene i krkavine analizirani su dva puta, odnosno prema monografskim propisima svake od sastavnih droga/ekstrakata. Sva istraživanja provedena su u triplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao količina antracenskih derivata (postotak ili miligrami) ± standardna devijacija.

Slika 11 donosi prikaz broja uzoraka analiziranih pojedinom farmakopejskom metodom. Iz grafa je vidljivo da je za najveći broj uzoraka primijenjen propis iz monografija biljnih droga Sennae folium i Frangulae cortex, dok je manji broj uzoraka sadržavao suhi ekstrakt tih droga pa je određivanje antracenskih derivata provedeno prema propisima navedenim u odgovarajućim monografijama.



Slika 11. Broj uzoraka analiziranih pojedinom farmakopejskom metodom

4.3.1 Sadržaj senozida u fitopreparatima sene

Primjenom farmakopejskih metoda propisanih u monografijama biljnih droga Sennae folium i Senne fructus ili njihovih suhih ekstrakata, u istraživanim komercijalnim fitopreparatima sene određen je sadržaj ukupnih antracenskih derivata i izražen kao senozid B. Zbog značajnih razlika u sastavu i farmaceutskom obliku velikog broja analiziranih fitopreparata, dobivene rezultate nije bilo moguće jednoznačno izraziti, pa su stoga grupirani u četiri skupine i prikazani kako slijedi: .

- sadržaj senozida u čajevima koji sadrže monodrogu Sennae folium (većina biljnih preparata) ili Sennae fructus (jedan pripravak) ili monoekstrakt droge Sennae fructus prikazan je u Tablici 4
- sadržaj senozida u fitopreparatima monoekstrakta seninog ploda dan je u Tablici 5
- sadržaj senozida u tabletama koje sadrže suhi ekstrakt seninog lista dan je u Tablici 6
- sadržaj senozida u čajnim mješavinama u čiji sastav ulazi droga Sennae folium prikazan je u Tablici 7.

Farmakopejski zahtjev za sadržajem antracenskih derivata u drogi Sennae folium iznosi najmanje 2,5%, dok droga Sennae fructus mora sadržavati najmanje 3,4% senozida. Farmakopejska kakvoća suhog ekstrakta seninog lista uvjetovana je sadržajem 5,5-8,0% antracenskih glikozida. Iako se navedeni farmakopejski zahtjevi za kakvoćom odnose na same monodroge/monoekstrakte, iz većeg broja preparata dostupnih u obliku tableta i čajeva u filter vrečicama nije bilo moguće izdvojiti čistu drogu. Stoga su svi kombinirani fitopreparati analizirani na jednak način kao i monopreparati, sve u cilju provođenja usporednog vrednovanja svih na tržištu dostupnih fitopreparata te skupine.

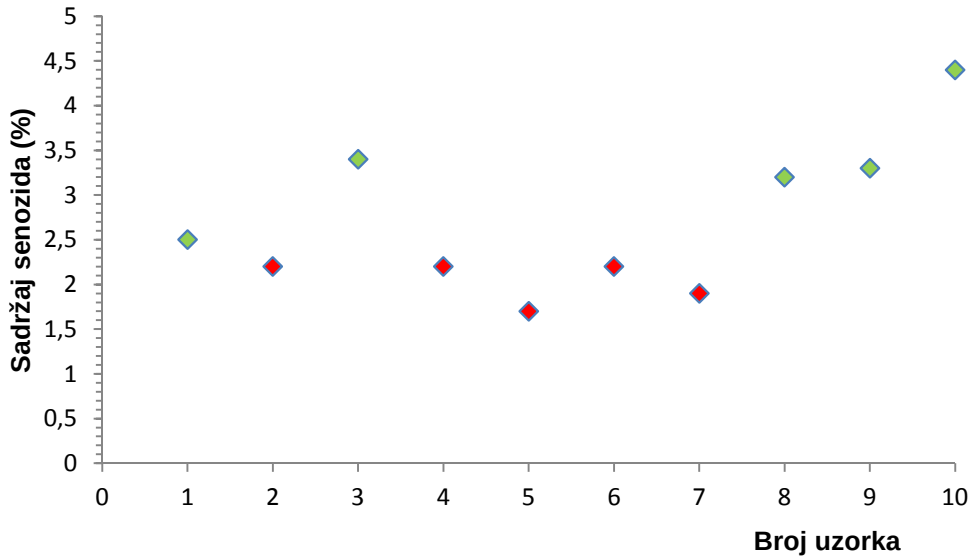
Tablica 4. Sadržaj antracenskih derivata u uzorcima seninog lista kao monodroge

Uzorak	Apsorbancija	Sadržaj senozida [%]			Zahtjev Ph. Eur. [%]
1	0,302 0,316	2,49 2,60	2,55	2,5 ± 0,1	≥ 2,5
	0,299 0,291	2,46 2,42	2,44		
	0,291 0,288	2,42 2,40	2,41		
2	0,253 0,248	2,09 2,05	2,07	2,2 ± 0,1	≥ 2,5
	0,272 0,281	2,25 2,33	2,29		
	0,276 0,280	2,29 2,33	2,31		
3	0,363 0,372	3,01 3,09	3,05	3,4 ± 0,3	≥ 2,5
	0,378 0,438	3,14 3,61	3,38		
	0,400 0,439	3,00 3,61	3,64		
4	0,254 0,257	2,12 2,14	2,13	2,2 ± 0,0	≥ 2,5
	0,256 0,261	2,13 2,17	2,15		
	0,259 0,263	2,16 2,19	2,18		
5	0,206 0,173	1,70 1,43	1,57	1,7 ± 0,1	≥ 2,5
	0,203 0,206	1,68 1,72	1,70		
	0,218 0,214	1,82 1,78	1,80		
6	0,322 0,252	2,67 2,09	2,38	2,2 ± 0,2	≥ 2,5
	0,245 0,248	2,03 2,07	2,05		
	0,248 0,245	2,07 2,05	2,06		
7	0,227 0,235	1,89 1,96	1,93	1,9 ± 0,1	≥ 2,5
	0,226 0,234	1,88 1,94	1,91		
	0,214 0,216	1,77 1,79	1,78		
8	0,370 0,369	3,08 3,07	3,07	3,2 ± 0,2	≥ 2,5
	0,369 0,395	3,07 3,31	3,19		
	0,397 0,395	3,29 3,29	3,29		

Tablica 5. Sadržaj antracenskih derivata u fitopreparatima koji sadrže suhi ekstrakt seninog ploda kao monoekstrakt

Uzorak	A	Sadržaj senozida [%]			Zahtjev [%]	Sadržaj senozida [mg]			Zahtjev [mg]
9	0,123 0,142	3,41 3,94	3,68	3,4 ± 0,3	≥ 3,4	22,18 25,61	23,90	21,7 ± 2,1/ žličica	≥ 20/žličica
	0,122 0,114	3,38 3,15	3,27			22,00 20,48	21,24		
	0,113 0,111	3,12 3,07	3,09			20,30 19,94	20,12		
10	0,457 0,467	4,17 4,26	4,22	4,4 ± 0,2		19,07 19,49	19,28	20,1 ± 0,7/ tbl	≥ 20/tbl
	0,473 0,491	4,31 4,48	4,40			19,74 20,50	20,12		
	0,498 0,499	4,54 4,55	4,55			20,79 20,83	20,81		

Slika 12 donosi grafički prikaz rezultata određivanja antracenskih derivata u monodrogama (Tablica 4) i monoekstraktima sene (Tablica 5). Naime, od osamnaest komercijalnih preparata sene obuhvaćenih ovim istraživanjem, deset njih sadržavalo je monodrogu Sennae folium (7) ili Sennae fructus (1), odnosno suhi ekstrakt ploda sene (2). S obzirom na regulatorni status, samo su četiri od tih proizvoda stavljena u promet kao lijekovi (uzorci 1, 8, 9 i 10), dva se na tržištu nalaze kao galenski pripravci (uzorci 4 i 6), a preostala četiri dostupna su kao hrana (uzorci 2, 3, 5 i 7). Iz rezultata (Tablice 4 i 5 te Slika 12) je vidljivo da svi biljni lijekovi zadovoljavaju farmakopejski zahtjeve za sadržajem djelatnih tvari (≥ 2,5% hidroksiantracenskih glikozida za list sene, tj. 3,4% za ekstrakt senina ploda). Farmaceutska kakvoća utvrđena je i za još jedan uzorak seninog lista dostupan kao hrana (uzorak 3). Međutim, najveći broj uzoraka droge Sennae folium, u promet stavljeni kao galenski pripravci i hrana, ne udovoljavaju zahtjevu propisanom Ph. Eur. 7 jer sadrže znatno niži udio (1,7%-2,2%) antracenskih derivata [66].



Slika 12. Grafički prikaz sadržaja hidroksiantracenskih glikozida određenih u uzorcima monodroge/monoekstrakta sene. Zeleno: zadovoljava farmakopejski zahtjev, crveno: ne zadovoljava farmakopejski zahtjev

Dobiveni rezultati najvjerojatnije su posljedica loše kakvoće polaznog biljnog materijala, čiji je kemijski sastav uvjetovan brojnim čimbenicima [11]. Također, na njih može utjecati i podatak da su dobiveni vrlo složenim i dugotrajnim analitičkim postupcima pa zbog velikog broja koraka tijekom izvedbe analize postoji realna mogućnost određenog gubitka analita. Velik broj uzoraka seninog lista iz prometa koji ne zadovoljavaju monografski zahtjev za sadržajem antracenskih derivata također povlači pitanje opravdanosti postavljenog minimalnog postotka odnosno prikladnosti propisane spektrofotometrijske metode za njihovu kvantifikaciju.

Na dobivene rezultate zasigurno utječe i regulatorni status samih fitopreparata. Kakvoća polaznog biljnog materijala koji se koristi u proizvodnji biljnih lijekova strogo je kontrolirana i propisana GACP smjernicama [11], a također se prati i kakvoća preparata, od proizvodnje preko skladištenja do distribucije. Za galenske pripravke, dodatake prehrani i hranu nisu propisani takvi zahtjevi, te je na samom proizvođaču odluka o kakvoći proizvoda i načinu njezine kontrole.

Tablica 6. Sadržaj antracenskih derivata u tabletama koje sadrže suhi ekstrakt seninog lista

Uzorak	Udio ekstrakta [%]	A	Sadržaj antracenskih derivata [mg/tbl]			Deklarirano [mg/tbl]
16	60	0,540 0,547	22,50 22,82	22,66	23,7 ± 1,1	10,8
		0,544 0,585	22,67 24,38	23,53		
		0,597 0,596	24,88 24,84	24,86		
17	8	1,175 1,180	24,48 24,59	24,53	24,3 ± 0,2	≥ 18
		1,168 1,160	24,34 24,17	24,25		
		1,164 1,159	24,25 24,15	24,20		
18	29	0,658 0,649	27,42 27,04	27,23	25,8 ± 1,5	-
		0,647 0,588	26,96 24,50	25,73		
		0,581 0,587	24,21 24,46	24,34		

Tablica 7. Sadržaj antracenskih derivata u čajnim mješavinama koje sadrže drogu Sennae folium

Uzorak	Udio droge [%]	Apsorbancija	Sadržaj senozida u drogi [%]			Zahtjev Ph. Eur.[%]	Sadržaj senozida u fitopreparatu [%]		
11	40	0,499 0,493	4,17 4,12	4,15	4,4 ± 0,2	≥ 2,5	1,67 1,65	1,66	1,7 ± 0,1
		0,500 0,545	4,18 4,54	4,36			1,67 1,81	1,74	
		0,546 0,548	4,55 4,56	4,56			1,82 1,82	1,82	
12	15	1,301 1,299	10,94 10,92	10,93	11,0 ± 0,1		1,64 1,64	1,64	1,6 ± 0,0
		1,312 1,317	11,03 10,91	10,97			1,65 1,64	1,65	
		1,333 1,318	11,04 10,92	10,98			1,66 1,64	1,65	
13	10	0,518 0,509	4,31 4,23	4,27	4,3 ± 0,0		0,43 0,42	0,43	0,4 ± 0,0
		0,523 0,523	4,35 4,35	4,35			0,44 0,43	0,43	
		0,513 0,525	4,27 4,36	4,32			0,43 0,44	0,43	
14	10	1,124 1,124	9,34 9,34	9,34	10,2 ± 1,5		0,93 0,93	0,93	1,0 ± 0,1
		1,289 1,313	10,75 10,95	10,85			1,08 1,10	1,09	
		1,342 1,348	11,19 11,24	11,22			1,12 1,12	1,12	
15	10	0,644 0,651	5,36 5,42	5,39	5,3 ± 0,2		0,54 0,50	0,54	0,5 ± 0,2
		0,655 0,668	5,46 5,56	5,51			0,55 0,50	0,55	
		0,620 0,607	5,16 5,05	5,10			0,52 0,51	0,51	

4.3.2 Sadržaj glukofrangulina u fitopreparatima krkavine

Kakvoća komercijalnih fitopreparata krkavine ispitana je primjenom farmakopejskih metoda za određivanje antracenskih derivata, prema propisima u monografijama droge Frangulae cortex i monografijama suhog ekstrakta droge, a ukupni sadržaj izražen je u postotcima, kao glukofrangulin A. Uzevši u obzir značajne razlike u sastavu i farmaceutskom obliku istraživanih fitopreparata, analizirani uzorci su grupirani i dobiveni rezultati prikazani su kako slijedi:

- Tablica 8 prikazuje postotke glukofrangulina određene u čajevima koji sadrže krkavininu koru kao monodrogu
- Tablica 9 prikazuje rezultate određivanja glukofrangulina u tabletama koje sadrže ekstrakt krkavinine kore
- Tablica 10 donosi sadržaje glukofrangulina u čajnim mješavinama u čiji sastav ulazi krkavinina kora

Prema zahtjevu Ph. Eur. 7, krkavinina kora farmaceutske kakvoće mora sadržavati najmanje 7,0% glukofrangulina, dok je farmakopejska kakvoća suhog ekstrakta krkavinine kore uvjetovana sadržajem od 15 do 30% glukofrangulina. Iako se navedeni farmakopejski zahtjevi za kakvoćom odnose na same monodroge/monoekstrakte, iz većeg broja preparata dostupnih u obliku tableta i čajeva u filter vrećicama nije bilo moguće izdvojiti samu drogu. Stoga su svi kombinirani fitopreparati analizirani na jednak način kao i monopreparati, a sve u cilju usporednog vrednovanja svih na tržištu dostupnih fitopreparata te skupine.

Iz tablice 8 vidljivo je da sva tri uzorka kore krkavine, koja je u prometu kao monodroga, udovoljavaju farmakopejskom zahtjevu jer sadrže više od 7,0% antracenskih derivata. Zanimljivo je da su ti prozvodi na tržištu dostupni kao hrana.

Tablica 8. Sadržaj antracenskih derivata u uzorcima krkavinine kore kao monodroge

Uzorak	A	Sadržaj glukofrangulina [%]			Zahtjev Ph. Eur. [%]
19	0,629 0,632	7,70 7,73	7,7	7,4 ± 0,3	≥ 7,0
	0,590 0,628	7,20 7,68	7,44		
	0,584 0,586	7,13 7,15	7,14		
20	0,605 0,603	7,38 7,36	7,37	7,5 ± 0,1	
	0,611 0,616	7,45 7,52	7,49		
	0,618 0,621	7,55 7,59	7,57		
21	0,635 0,642	7,77 7,86	7,82	7,2 ± 0,9	
	0,638 0,624	7,81 7,64	7,72		
	0,486 0,487	5,95 5,96	6,95		

Budući da istraživani fitopreparatii koji dolaze u obliku tableta sadrže i suhi ekstrakt seninog lista i suhi ekstrakt krkavinine kore, udio antracenskih derivata određivan je primjenom dviju farmakopejskih metoda, propisanih za svaki od ekstrakta. Deklarirani sadržaji antracenskih derivata u analiziranim tabletama razlikovali su se od proizvođača do proizvođača, jer i sami preparati pripadaju različitim regulatornim skupinama.

Dobiveni rezultati izraženi kao sadržaj senozida prikazani su u Tablici 6, dok Tablica 9 prikazuje sadržaje antracenskih derivata određene kao glukofrangulin. Iako iz Tablice 7 proizlazi da tri analizirana proizvoda imaju ujednačen sadržaj antracenskih spojeva, koji izražen na senozid iznosi 24-26 mg po tableti, dobivene rezultate potrebno je tumačiti za svaki fitopreparat pojedinačno, s obzirom na njihove bitno različite deklarirane sastave. Općenito, primjenom postupka za određivanje glukofrangulina dobivene su veće vrijednosti sadržaja antracenskih spojeva u kombiniranim preparatima (Tablica 9). U uzorku 16, koji sadrži 118,8 mg normiranog suhog

ekstrakta krkavinine kore i 180 mg normiranog suhog ekstrakta seninog lista, određene su količine senozida B (23,7 mg/tbl) i glukofrangulina A (40,5 mg/tbl) dvostruko veće od deklariranih (23,76 mg glukofrangulina odnosno 10,8 mg senozida) [68], što je i očekivano budući da su korištene metode neselektivne i omogućuju kvantificiranje svih strukturno sličnih antracenskih spojeva. Uzorak 17 definiran je sadržajem 220 mg suhog ekstrakta krkavinine kore, 20 mg suhog alojevog ekstrakta i 20 mg suhog ekstrakta seninog lista te navodno sadrži najmanje 18 mg ukupnih hidroksiantracenskih derivata izraženo kao glukofrangulin A, budući da u najvećem postotku sadrži krkavinu [69]. Rezultati dobiveni objema metodama potvrđuju deklarirani sadržaj, ali relevantnijima možemo smatrati sadržaj od 31 mg antracenskih derivata/tableti, određen prema propisu iz monografije ekstrakta krkavinine kore. Analiza uzorka 18, koji sadrži usporedive udjele ekstrakata sene i krkavine, pokazala je da se primjenom oba farmakopejska postupka dobivaju slični sadržaji antracenskih derivata, 26 mg senozida, odnosno 31 mg glukofrangulina u jednoj tableti [70].

Dobiveni rezultati pokazuju da količina djelatnih tvari sadržana u jednoj tableti svakog od analiziranih preparata udovoljava pozologiju propisanu u znanstvenim monografijama međunarodnih regulatornih tijela (EMA, ESCOP, WHO, Komisija E), koje kao maksimalnu dnevnu dozu navode 30 mg hidroksiantracenskih glikozida. Međutim, gledajući pojedinačno istraživane fitopreparate, uspoređujući njihov sastav i deklarirane sadržaje antracenskih derivata nameće se potreba za isticanjem nedovoljno jasnih i preciznih podataka u uputama za primijenu antracenskih laksativa. Naime, prema uputama za doziranje uzoraka 17 i 18 (galenski pripravci) pacijentima se preporuča uzimanje i više od jedne tablete odjednom (1-4 odnosno 1-

3) čime se višestruko prekoračuje dozvoljena dnevna doza, a time i povećava vjerojatnost pojave neželjenih učinaka.

Tablica 9. Sadržaj antracenskih derivata u tabletama koje sadrže suhi ekstrakt krkavinine kore

Uzorak	Udio ekstrakta [%]	A	Sadržaj glukofrangulina [mg/tbl]			Zahtjev [mg/tbl]
16	40	1,324 1,324	40,51 40,51	40,51	40,5 ± 0,1	23,76
		1,324 1,330	40,51 40,70	40,61		
		1,322 1,321	40,45 40,42	40,44		
17	85	0,968 0,971	29,62 29,71	29,67	30,4 ± 0,8	≥ 18
		0,982 1,004	30,05 30,72	30,39		
		1,010 1,017	30,91 31,12	31,01		
18	37	1,027 1,029	31,43 31,49	31,46	31,0 ± 0,4	-
		1,017 1,005	31,12 30,75	30,94		
		1,000 1,002	30,60 30,66	30,63		

Tablica 10. Sadržaj antracenskih derivata u čajnim mješavinama koje sadrže drogu Frangulae cortex

Uzorak	Udio droge [%]	A	Sadržaj glukofrangulina u drogi [%]			Zahtjev Ph. Eur. [%]	Sadržaj glukofrangulina u fitopripravku [%]		
22	30	1,046 1,046	12,82 12,82	12,82	11,9 ± 1,0	≥ 7,0	3,84 3,84	3,84	3,6 ± 0,3
		1,035 0,895	12,68 10,96	11,82			3,80 3,29	3,55	
		0,903 0,900	11,05 11,02	11,04			3,32 3,31	3,31	
23	30	0,503 0,502	6,84 6,83	6,84	6,8 ± 0,1		2,05 2,05	2,05	2,0 ± 0,0
		0,499 0,496	6,79 6,71	6,75			2,04 2,01	2,03	
		0,495 0,493	6,69 6,67	6,68			2,01 2,00	2,01	
14	20	1,135 1,132	13,90 13,86	13,88	13,5 ± 0,3		2,78 2,77	2,78	2,7 ± 0,1
		1,103 1,093	13,51 13,37	13,44			2,70 2,67	2,69	
		1,089 1,086	13,32 13,29	13,30			2,66 2,66	2,66	
11	20	1,191 1,192	14,57 14,58	14,58	14,5 ± 0,1		2,91 2,92	2,92	2,9 ± 0,0
		1,184 1,183	14,49 14,48	14,48			2,90 2,90	2,90	
		1,179 1,174	14,43 14,37	14,40			2,89 2,87	2,88	
12	20	0,766 0,794	9,38 9,72	9,55	9,3 ± 0,2		1,88 1,94	1,91	1,9 ± 0,0
		0,757 0,756	9,27 9,26	9,26			1,85 1,85	1,85	
		0,752 0,748	9,21 9,16	9,18			1,84 1,83	1,84	

Uzorak	Udio droge [%]	A	Sadržaj glukofrangulina u drogi [%]			Zahtjev Ph. Eur. [%]	Sadržaj glukofrangulina u fitopripravku [%]		
15	20	0,572 0,572	7,00 7,00	7,00	7,2 ± 0,2	≥ 7,0	1,40 1,40	1,40	1,4 ± 0,0
		0,584 0,592	7,15 7,24	7,20			1,43 1,45	1,44	
		0,599 0,599	7,33 7,33	7,33			1,47 1,47	1,47	
13	10	0,678 0,676	8,47 8,44	8,46	8,8 ± 0,3		0,85 0,84	0,85	0,9 ± 0,0
		0,685 0,736	8,56 9,01	8,78			0,86 0,90	0,88	
		0,742 0,740	9,08 9,06	9,07			0,91 0,91	0,91	

U prilog tome da se biljne droge sene i krkavine vrlo često kombiniraju, govori podataka da je najveći broj istraživanih višekomponentnih fitopreparata s tržišta (8/9), u različitim udjelima, sadržavao obje droge. Stoga je osim u tabletama udio antracenskih derivata u još više zastupljenim čajnim mješavinama (uzorci 11-15) također određivan primjenom dviju različitih farmakopejskih metoda, te su dobiveni rezultati izraženi kao sadržaj senozida (Tablici 6), odnosno sadržaj glukofrangulina (Tablica 10). Od svih analiziranih kombiniranih fitopreparata samo su dva stavljena u promet kao lijekovi (uzorci 11 i 16), dok su po četiri dodatak prehrani odnosno galenski pripravak. Dobiveni rezultati pokazuju da količine djelatnih antracenskih derivata u čajnim mješavinama laksativnog djelovanja ne prelaze dnevno preporučene doze, ako se uzme u obzir sadržaj izražen na ukupnu masu preparata (0,4-1,7% senozida B odnosno 1,9-3,6% glukofrangulina A). S obzirom na niske udjele svake od droga u analiziranim mješavinama, dobiveni rezultati ne mogu se smatrati pouzdanim za procjenu kakvoće seninog lista (4,3%-11,0% senozida B) i krkavinine kore (6,8%-14,5% glukofrangulina A) u tim fitopreparatima, jer se ne može pretpostaviti utjecaj ostalih sastavnica na njih.

S obzirom na veliki broj ljekovitih preparata koji sadrže kombinacije droga s antracenskim derivatima, uviđa se potreba za razvojem službeno priznatih analitičkih metoda koje bi omogućile odjeljivanje i kvantitativno određivanje različitih antracenskih spojeva u smjesi. Metoda bi trebala biti selektivna i brza, poput već nekih postojećih HPLC metoda za određivanje antrakinonskih spojeva koje susrećemo u znanstvenoj literaturi [71, 72, 73, 74, 75].

Rezultati određivanja antracenskih derivata, provedenih u okviru usporednog vrjednovanja svih fitopreparata sene i krkavine s hrvatskog tržišta, potvrdili su da su svi preparati registrirani kao biljni lijekovi farmakopejske kakvoće. Od ostalih ljekovitih

preparata, koji sukladno zakonskim mogućnostima u promet dolaze u okviru drugih regulatornih skupina (galenski pripravci, dodaci prehrani, hrana), tek mali postotak onih koji sadrže senu udovoljava farmakopejski zahtjev za sadržajem djelatnih tvari, dok su uzorci krkavinine kore svi bili farmaceutske kakvoće. Dobiveni podaci odnose se samo na preparate s monodrogama, za čiju su provjeru kakvoće i primarno propisane farmakopejske spektrofotometrijske metode. Iz tog je razloga vrlo teško pouzdano tumačiti rezultate dobivene analizom preparata mješovitog sastava. Utvrđeni rezultati upućuju na preporuku da bi fitopreparate sene i krkavine trebalo registrirati kao biljne lijekove, jer se samo na taj jamačno osigurava farmaceutska kakvoća, a time i željena djelotvornost i sigurna primjena. Biljni lijekovi imaju jasno deklarirani sastav i sadržaj djelatnih tvari i sadrže standardizirane biljne ekstrakte čime se osigurana ujednačena i definirana kakvoća svakog preparata iz bilo koje proizvodne serije. Kako bi se olakšala registracija fitopreparata kao biljnih lijekova, na razini Europske unije donesena je direktiva kojom se pojednostavljuje cijeli postupak, a primjenjiva je za tradicionalne biljne lijekove koji su u upotrebi više od 30 godina, a barem 15 godina u zemljama EU [76]. S obzirom da se ta uredba odnosi i na biljnu drogu i preparate sene i krkavine, poželjno bi bilo da regulatorna tijela zahtjevaju od proizvođača fitopreparata sene i krkavine da pokrenu postupke registracije svojih pripravaka kao biljnog lijeka. Time bi se ujedno značajno doprinijelo i zaštiti zdravlja pacijenata i povećalo njihovo povjerenje u kvalitetu fitopreparata općenito.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju opsežnog pregleda relevantne znanstvene i stručne literature, provedenih kvalitativnih i kvantitativnih fitokemijskih ispitivanja, dobivenih rezultata analiza i prateće rasprave u ovom radu mogu se izvesti slijedeći zaključci o ljekovitim preparatima sene i krkavine:

- Biljne droge Sennae folim i Sennae fructus koje se dobivaju od vrsta *Cassia senna* L. i/ili *C. angustifolia* Vahl te droga Frangulae cortex koja se dobiva iz vrste *Rhamnus frangula* ljekovite su droge s dugom tradicijom primjene kao biljni laksativi, a njihova primjena u suvremenoj racionalnoj terapiji je sigurna i utemeljena na dokazima. Za postizanje optimalnog učinka, znanstveno je utvrđena važnost točne identifikacije te standardizacija tih biljnih droga i njihovih pripravaka korištenih u proizvodnji komercijalnih fitopreparata. Istraživanja su pokazala da antracenski derivati kao glavne terapijski aktivne tvari pored željenog posjeduju i niz neželjenih i štetnih djelovanja, posebice ukoliko se primjenuju/zlouporabljuju u većim dozama i dužem periodu od preporučenog. Stoga je pri korištenju fitopreparata sene i krkavine vrlo važno da budu farmaceutske kakvoće te da se uzimaju uz stručni savjet liječnika ili ljekarnika.

- Budući da su za laksativni učinak sene i krkavine odgovorni antracenski derivati, u svrhu identifikacije i dokazivanja prisutnosti djelatnih tvari provedena je usporedna fitokemijska karakterizacija fitopreparata iz prometa metodom tankoslojne kromatografije. Svi analizirani uzorci monodroga i monoekstrakata sene bili su u skladu s monografskim zahtjevima Ph. Eur. 7., no mogućnost primjene tankoslojne kromatografije za identifikaciju i dokazivanju djelatnih tvari

seninih droga koje dolaze u sastavu kombiniranih fitopreparata bila je ograničena. Za razliku od sene, farmakopejska metoda za identifikaciju droge Frangulae cortex pokazala se prikladnom za dokazivanje djelatnih antracenskih derivata u svim uzorcima, kako u monodrogama/monoekstraktima, tako i u višekomponentnim fitopreparatima koji ih sadrže. Od 13 istraženih biljnih preparata krkavine, jedan ne udovoljava farmakopejskom zahtjevu što upućuje na prisutnu zamjenu odnosno patvorinu droge.

- UV/VIS spektrofotometrijskim metodama propisanim u relavantnim farmakopejskim monografijama određen je sadržaj antracenskih derivata u komercijalnim monodrogama i monoekstraktima sene i krkavine. Samo pet od deset ljekovitih preparata sa čistom senom (tri monodroge, dva monoekstrakta) zadovoljavali su farmakopejski zahtjev za sadržajem antracenskih derivata. U slučaju krkavine, svi uzorci s tržišta bili su farmaceutske kakvoće. Propisana farmakopejska metoda primjenjena je i za kvantifikaciju antracenskih derivata u višekomponentnim fitopreparatima laksativnog djelovanja koji sadrže senu i/ili krkavinu, no dobivene rezultate treba s oprezom tumačiti jer nisu jednoznačni i pouzdani s obzirom da je nemoguće utvrditi utjecaj svih ostalih sastavnica iz mješavine.

- Svi kombinirani fitopreparati analizirani su na jednak način kao i monopreparati, u svrhu usporednog vrednovanja svih na tržištu dostupnih antracenskih laksativa. Uzevši u obzir da je iz prometa uzorkovana samo po jedna serija svakog istraživanog fitopreparata sene i krkavine, dobiveni rezultati usporedne analize značajno doprinose stvaranju predodžbe o kakvoći jedne skupine biljnih preparata dostupnih na hrvatskom tržištu, ali se na temelju njih ne može se

donijeti opći zaključak o kakvoći pojedinog preparata, već samo o ispitivanoj seriji istog.

- Primjenjene spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja antracenskih derivata koje su sastavni dio farmakopejskih monografija biljnih droga i pripravaka sene i krkavine su složene i dugotrajne te nisu prikladne za rutinsku analizu većeg broja uzoraka u relativno kratkom vremenu. Osim toga pogodne su samo za određivanje antracenskih derivata u preparatima monodroga ili monoekstrakata, dok se analizom kompleksnijih kombiniranih fitopreparata ne dobivaju jednoznačni podaci. Zbog toga postoji realna potreba za razvojem i validacijom te implementacijom u farmakopejske monografije novih, suvremenijih, bržih, jednostavnijih i selektivnijih metoda, npr. HPLC tehnikom, koje bi omogućile istovremenu identifikaciju i određivanje sadržaja pojedinih antracenskih sastavnica, posebice u kombiniranim pripravcima koji osim biljnih droga i ekstrakata sene i krkavine sadrže i druge droge [71, 72, 73, 74, 75]. Nužnost za razvojem novih metoda je tim veća što prema najnovijim zakonskim propisima, donesenim nakon ovdje provedenih istraživanja, više nije dozvoljeno stavljanje u promet monodroga sene i krkavine kao dodatke prehrani, već one smiju biti samo dio kombiniranih fitopreparata s najvećim dopuštenim udjelom u smjesi glavnih sastojaka 30% m/m (do 20 mg ukupnih hidroksiantracenskih spojeva u dnevnoj dozi).

- Biljne droge i ekstrakti koji se koriste kao polazna sirovina za proizvodnju ljekovitih preparata sene i/ili krkavine, odnosno općenito svih fitopreparata, morali bi biti standardizirani. Samo se korištenjem standardiziranih biljnih droga i pripravaka s definiranim sastavom i sadržajem djelatnih tvari jamačno osigurava

propisana i ujednačena kakvoća ljekovitog preparata, čemu u prilog govore i rezultati ovog rada.

- Rezultati dobiveni u ovom radu upućuju na zaključak da kvaliteta istraživanih komercijalnih fitopreparata sene i krkavine s hrvatskog tržišta uvelike ovisi o njihovom regulatornom statusu, tj. o tome temeljem kojih su zakonskih propisa stavljeni u promet. Kvalitativni i kvantitativni sastav svih uzoraka fitopreparata registriranih kao biljni lijekovi u skladu su s deklariranim i zadovoljavaju farmakopejske zahtjeve. Od preparataa koji u promet dolaze kao dodaci prehrani, galenski pripravci ili hrana samo manji broj je farmaceutske kakvoće. Stoga bi u cilju zaštite zdravlja pacijenta bilo poželjno uvesti strože kontrole svih fitopreparata dostupnih na tržištu i ustrajati u nastojanjima da se postrože propisi za stavljanje u promet svih biljnih preparata sene i/ili krkavine, jer istraživanje upućuje na to da su jedino zakonski propisi koje moraju zadovoljiti biljni lijekovi garancija farmaceutske kvalitete, a time i učinkovite i sigurne primjene.

6. LITERATURA

[1] Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med 2006; 27:1-93.

[2] Conway P. The Consultation in Phytotherapy. Churchill Livingstone; 2011, str. 1-38.

[3] Blumental M. ur. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide To Herbal Medicines. American Botanical Council; 1998, str. 8-21.

[4] Schulz V, Hänsel R, Blumenthal M, Tyler VE. Rational phytotherapy: A reference guide for physicians and pharmacists (5th ed.). Springer-Verlag; 2004.

[5] Planta M, Gundersen B, Petitt JC. Prevalence of the use of herbal products in a low-income population. Fam Med 2000;32(4):252-7.

[6] Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation. Fitoterapia 2010;81(6):462-71.

[7] Official Journal of the European Union: Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending, as regards traditional herbal medicinal products, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use, Strasbourg, 30.04.2004. *Available at: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:136:0085:0090:en:PDF Accessed April 5, 2013.*

[8] European Medicines Agency. Human regulatory: Herbal products. *Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000208.jsp&mid=WC0b01ac05800240cf Accessed January 10, 2013.*

[9] Zhang J, Wider B, Shang H, Li X, Ernst E. Quality od herbal medicines: Challenges and solutions. Complement Ther Med 2012;20:100-6.

[10] Zhang AL, Xue CC, Fong HHS. Integration of herbal medicine into evidence-based clinical practice. U: Benzie IFF, Wachstel-Galor S. Herbal medicine: Biomolecular clinical aspects. CRC Press 2011;22:453-62.

[11] EMEA/HMPC: Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin. *Available at*: *http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003362.pdf* . *Accessed April 5, 2013.*

[12] World Health Organization: WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14215e/s14215e.pdf *Accessed April 5, 2013*

[13] EMEA/HMPC: Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. *Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003211.pdf Accessed April 5, 2013.*

[14] Jordan SA, Cunningham DG, Marles RJ. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. Toxicol Appl Pharmacol 2010;243(2):198-216.

[15] Hussain S. Patient counseling about herbal-drug interactions. Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(5S):152-63.

[16] P Wal, A Wal, S Gupta, G Sharma, AK Rai. Pharmacovigilance of herbal products in India. J Young Pharm. 2011;3(3):256-58.

[17] Shinde VM, Dhalwal K, Potdar M, Mahadik KR. Application of quality control principles to herbal drugs. Int J Phytomed 2009;1:4-8.

[18] Gohil KJ, Patel JA. Herb-drug interactions: A review and study based on assessment of clinical case reports in literature. Indian J Pharmacol 2007;39(3):129-39.

[19] HALMED: Poziv na prijavu nuspojava na dodatke prehrani. Available at: *http://www.almp.hr/?ln=hr&w=novosti&d=2012&id=673&p=3* Accessed April 5, 2013.

[20] Zakon o hrani. Narodne novine 81/2013, 14/2014.

[21] Zakon o lijekovima. Narodne novine 76/2013.

[22] Pravilnik o dodacima prehrani. Narodne novine 126/2013.

[23] Zakonom o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima. Narodne novine 39/13.

[24] Pravilnikom o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno. Narodne novine 160/13.

[25] Pravilnikom o uvjetima za uvrštavanje u program monitoringa i provođenje programa monitoringa dodataka prehrani, hrane kojoj su dodani vitamini, minerali i druge tvari i hrane s prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama. Narodne novine 83/13.

[26] Pravilnik o provjeri kakvoće lijeka. Narodne novine 60/2014.

[27] Bharucha AE, Pemberton JH, Locke GR. American Gastroenterological Association technical review on constipation. Gastroenterology 2013;144(1):218-38.

[28] Portalatin M, Winstead N. Medical management of constipation. Clin Colon Rectal Surg 2012;25:12-19.

[29] Klaschik E, Nauck F, Ostgathe C. Constipation-modern laxative therapy. Support Care Cancer 2003;11:679-85.

[30] Leung L, Riutta T, Kotecha J, Rosser W. Chronic constipation: An evidence-based review. J Am Board Fam Med 2011;24:436–51.

[31] Rao SSC, Meduri K. What is necessary to diagnose constipation? Best PractRes Clin Gastroenterol 2011;25(1):127-40.

[32] Bruneton J. Pharmacognosy. Phytochemistry of medicinal plants. 2nd edition. Lavoisier Publishing; 1999.

[33] Kobayashi M, Yamaguchi T, Odaka T, Nakamura T, Tsuchiya S, Yokosuka O, Yano S. Regionally differential effects of sennoside A on spontaneous contractions of colon in mice. Basic Clinic Pharmacol Toxicol 2007;101(2):121-26.

[34] Kon R i sur. Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of rhubarb extract. J Ethnopharmacol 2014;152(1):190-200.

[35] Zheng YF, Liu CF, Lai WF, Xiang Q, Li ZF, Wang H, Lin N. The laxative effect of emodin is attributable to increased aquaporin 3 expression in the colon of mice and HT-29 cells. Fitoterapia 2014;96:25-32.

[36] EMEA/HMPC: Assessment report on *Cassia senna* L. and *Cassia angustifolia* Vahl, folium. *Available at:* *http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-*

_HMPC_assessment_report/2009/12/WC500018219.pdf *Accessed January 15, 2013.*

[37] EMEA/HMPC*:* Assessment report on *Rhamnus frangula* L.*,* cortex*. .Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2009/12/WC500018613.pdf Accessed January 15, 2013.*

[38] Lemli J. Mechanism of action of sennosides. Bull Acad Natl Med 1995;179(8):1605-11.

[39] EMEA/HMPC: Community herbal monograph on senna leaf (sennae folium)*. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018210.pdf Accessed January 15, 2013.*

[40] EMEA/HMPC: Community herbal monograph on frangula bark (frangulae cortex) . *Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018606.pdf Accessed January 15, 2013.*

[41] Fleming V, Wade WE. A review of laxative therapies for treatment of chronic constipation in older adults. Am Geriat Pharmacoth 2010; 8(6):514-50.

[42] Perkin JM. Constipation in childhood: a controlled comparison between lactulose and standardized senna. Curr Med Res Opin 1977;4(8):540-3.

[43] Joo J, Ehrenpreis ED, Gonzales L i sur. Alteration in colonic anathomy induced by chronic stimulant laxatives: the cathartic colon revisited. J Clin Gastroenterol 1998;26(4):28328-36.

[44] Abendroth A, Klein R, Schlaak J, Metz KA, Dobos GJ, Langhorst J. [Impressive picture of a melanosis coli after chronic anthraquinone laxative use--is there an increased risk for colorectal cancer?]. Z Gastroenterol 2009;47:579-82.

[45] Chen JY, Pan F, Zhang T, Xia J, Li YJ. Experimental study on the molecular mechanism of anthraquinone cathartics in inducing melanosis coli. Chin J Integr Med 2011;17:525-30.

[46] Willems M, van Buuren HR, de Krijger R. Anthranoid self-medication causing rapid development of melanosis coli. Neth J Med 2003;61:22-4.

[47] van Gorkom BA, de Vries EG, Karrenbeld A, Kleibeuker JH. Anthranoid laxatives and their carcinogenic effects. Aliment Pharmacol Ther 1999;13(4):443-52.

[48] Siegers CP, von Hertzberg-Lottin E, Otte M, Schneider B. Anthranoid laxative abuse--a risk for colorectal cancer? Gut 1993;34:1099-101.

[49] Nusko G, Schneider B, Schneider I, Wittekind C, Hahn EG. Anthranoid laxative use is not a risk factor for colorectal neoplasia: results of a prospective case control study. Gut 2000;46:651–55.

[50] Nascimbeni R, Donato F, Ghirardi M, Mariani P, Villanacci V, Salerni B. Constipation, anthranoid laxatives, melanosis coli, and colon cancer: a risk assessment using aberrant crypt foci. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002;11:753–7.

[51] Morales MA, Hernandez D, Bustamante S, Bachiller I, Rojas A. Is senna laxative use associated to cathartic colon, genotoxicity, or carcinogenicity? J Toxicol 2009;2009:287247.

[52] Royal Botanic Gardens, Kew: Cassieae. *Available at:* http://www.kew.org/science-conservation/research-data/resources/legumes-of-the-world/tribe/cassieae *Accessed May 17, 2013.*

[53] U.S.Pharmacopoeia Convention and U.S.Pharmacopoeia: U.S:Pharmacopoeia 24, 2000.

[54] Kuštrak D. Farmakognozija: Fitofarmacija. Golden marketing-Tehnička knjiga; 2005, str. 454-65.

[55] Franz G. The senna drug and its chemistry. Pharmacology 1993;47(1):2-6.

[56] Terreaux C, Wang Q, Ioset JR, Ndjoko K, Grimminger W, Hostettmann K. Complete LC/MS analysis of a Tinnevelli senna pod extract and subsequent isolation and identification of two new benzophenone glucosides. Planta Med 2002;68(4):349-54.

[57] Salkupanich A, Gritsanapan W. Determination of antraquinone glycoside content in Cassia fistula leaf extracts for alternative source of laxative drug. Inter J Biomed Pharm Sci 2009;3(1):42-3.

[58] Ratnayaka HH, Meurer-Grimes B, Kincaid D. Sennoside yields in Tinnevelly Senna affected by deflowering and leaf maturity. HortScience 2002;37:768-72.

[59] Khan S, Mirza KJ, Al-Qurainy F, Abdin MZ. Authentication of the medicinal plant Senna angustifolia by RAPD profiling. Saudi J Biol Sci 2011;18:287-92.

[60] Connolly P, Hughes IW, Ryan G. Comparison of "Duphalac" and "irritant" laxatives during and after treatment of chronic constipation: a preliminary study. Curr Med Res Opin 1974-1975;2(10):620-5.

[61] Rameshb PR, Kumara KS, Rajagopala MR, Balachandranb P, Warrier PK. Managing Morphine-Induced Constipation: A controlled comparison of an Ayurvedic formulation and senna. J Pain Symptom Manage 1998;16(4):240-4.

[62] Kositchaiwat S, Suwanthanmma W, Suvikapakornkul R, Tiewthanom V, Rerkpatanakit P, Tinkornrusmee C. Comparative study of two bowel preparation regimens for colonoscopy: senna tablets vs sodium phosphate solution. World J Gastroenterol 2006;12(34):5536-9.

[63] Passmore AP, Davies KW, Flanagan PG, Stoker C, Scott MG. A comparison of Agiolax and lactulose in erderly patients with chronic constipation. Pharmacology 1993;47(1):249-52.

[64] Shavakhi A, Kianinia M, Torabi G I sur. High dose Senna or Poly Ethylene Glycol (PEG) for elective colonoscopy preparation: a prospective randomized investigator-blinded clinical trial. J Res Med Sci 2011;16(2):149-55.

[65] EDQM. European Pharmacopoeia, 7. izd., Council of Europe; 2007.

[66] Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis. Springer; 1996, str. 53-71.

[67] Bruneton J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Lavoisier; 1995.

[68] Uputa o lijeku. *Available at:* http://www.jgl.hr/media/924823/holyplant_purgal_tablete_pil__odobreno.pdf *Accessed January 15, 2013.*

[69] Uputa o lijeku *Available at:* http://www.gljz.hr/userfiles/upload/documents/upute/uputa-alofran/uputa_alofran.pdf *Accessed January 15, 2013.*

[70] Uputa o pripravku *Available at:* http://www.ljekarnasdz.hr/Galenskilab/Galenskipripravci/tabid/76/agentType/View/PropertyID/83/Herbalaks-tablete-za-ciscenje.aspx *Accessed January 15, 2013.*

[71] He D, Chen B, Tian Q, Yao S. Simultaneous determination of five anthraquinones in medicinal plants and pharmaceutical preparations by HPLC with fluorescence detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2009;49(4):1123-7.

[72] Locatelli N, Genovese S, Carlucci G, Kremer D, Randic M, Epifano F. Development and application of high-performance liquid chromatography for the study of two new oxyprenylated anthraquinones produced by Rhamnus species. Journal of Chromatography A 2012;1225:113-20.

[73] Hemmateenejad B, Shamsipur M, Safavi A, Sharghi H, Amiri AA. Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) characteristics of some 9,10-anthraquinone derivatives using binary acetonitrile–water mixtures as mobile phase. Talanta 2008;77(1):351-9.

[74] Fan XH, Cheng YY, Ye ZL, Lin RC, Qian ZZ. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. Analytica Chimica Acta 2006;555(2):217-24.

[75] Li Y, Wu T, Zhu J, Wan L, Yu Q, Li X, Cheng Z, Guo C. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010;52(4):597-602.

[76] Commission of the European Communities, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Report on the experience acquired as a result of the application of the provisions of chapter 2a of Directive 2001/83/EC (Introduced by Directive 2004/24/EC) on specific provisions applicable to traditional herbal medicinal products, Brussels 2008. *Available at: http://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Feur-lex.europa.eu%2FLexUriServ%2FLexUriServ.do%3Furi%3DCOM%3A2008%3A0584%3AFIN%3Aen%3APDF&ei=90OAVNPxOaqgywOJr4HABQ&usg=AFQjCNGJ7dcBurOlXzfIii4woyCgRL5SiQ&sig2=cadAviBjk4RlLgCgcLHVxQ : Accessed January 15, 2013.*

POPIS SKRAĆENICA I KRATICA

EMA - European Medicines Agency (Europska agencija za lijekove)

EU - Europska unija

FDA - Food and Drug Administration

GACP - Good agricultural and collection practices

GMP - Good manufacturing practice

HALMED - Agencija za lijekove i medicinske proizvode

Ph. Eur. - Europska farmakopeja

R_f - faktor zaostajanja

WHO - World Health Organization (Svjetska zdravstvena organizacija)