Kemijski fingerprint u identifikaciji i kontroli kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka

Janeković Petras, Kristina

Professional thesis / Završni specijalistički

2018

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:163:905960

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

Kristina Janeković Petras

KEMIJSKI *FINGERPRINT* U IDENTIFIKACIJI I KONTROLI KAKVOĆE KOMPLEKSNIH BILJNIH UZORAKA

Specijalistički rad

Zagreb, 2017.

Rad je predan na ocjenu Vijeću specijalističkih studija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja akademskog stupnja sveučilišnog magistra iz područja „Razvoja lijekova“.

Mentor rada: prof. dr. sc. Renata Jurišić Grubešić

Specijalistički rad obranjen je dana_____ na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1.

2.

3.

Rad ima _____ listova.

Rad je izrađen u okviru poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Veliko hvala prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić na nesebičnoj pomoći, usmjeravanju, savjetima i vremenu koje mi je pružila tijekom pripreme ovog rada.

Posebna zahvala ide mojoj obitelji na podršci i pomoći za vrijeme mog školovanja.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj je rada pregled recentne znanstvene i stručne literature o primjeni kemijskog *fingerprinta* u identifikaciji i kontroli kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka (droge, biljni pripravci, biljni proizvodi iz skupine dodataka prehrani i kozmetičkih proizvoda, biljni lijekovi) te detaljna studija i kritička rasprava o vrijednosti primjene takvog analitičkog pristupa na odabranim literaturnim primjerima. Cilj je također istaknuti važnost prikladne identifikacije i kontrole kakvoće biljnog materijala koji ulazi u sastav biljnog lijeka kako bi se osigurala njegova kakvoća, djelotvornost i sigurnost primjene.

Materijali i metode

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

kemijski *fingerprint* u svrhu identifikacije i kontrole kakvoće složenih biljnih uzoraka: biljnih droga, biljnih pripravaka, različitih skupina biljnih proizvoda te biljnih lijekova.

Rezultati

Rezultati su prikazani kroz analitički i regulatorni aspekt. Detaljan prikaz područja primjene kemijskog *fingerprinta* u farmaceutskoj analizi daje uvid u značaj spomenutog analitičkog pristupa te ističe njegovu važnost u uspostavi novih standarda kontrole kakvoće biljnih proizvoda. Šira primjena kemijskog *fingerprinta* u analizi kompleksnih biljnih uzoraka ubrzava i olakšava karakterizaciju takvih proizvoda te pridonosi standardizaciji njihove kvalitete na tržištu. Također, iz predstavljene materije dobiva se kvalitetan uvid u zahtjeve i izazove koji se postavljaju farmaceutskoj analizi biljnih uzoraka, posebice gotovih biljnih proizvoda kompleksnog sastava, kao i u regulativu spomenute skupine proizvoda.

Zaključak

Pregled provedenih istraživanja donosi sistematizirane informacije o ulozi kemijskog *fingerprinta* u karakterizaciji složenih biljnih uzoraka. Obradom odabranih studija prikazane su prednosti, ali i nedostatci primjene kemijskog *fingerprinta* u identifikaciji i kontroli kakvoće različitih biljnih uzoraka te predstavljena nova saznanja o vrijednosti i značaju spomenutog analitičkog pristupa za kompleksne biljne uzorke koji ulaze u sastav različitih skupina biljnih proizvoda prisutnih na svjetskom tržištu. Također, prikaz postojećeg stanja regulative u tom području omogućuje uvid u nedostatke aktualnih službenih propisa i ukazuje na potrebne mjere i poboljšanja.

SUMMARY

Objectives

The aim of the paper is to review the recent scientific and professional literature on the application of the chemical fingerprints in the identification and quality control of complex plant samples (drugs, herbal preparations, herbal products – dietary supplements and cosmetic products, herbal medicinal products), as well as the detailed study and critical discussion on the value of applying such analytical approach to selected literature examples. The aim is also to emphasize the importance of proper identification and quality control of the plant material to ensure the quality, efficacy and safety of the related herbal medicinal product.

Materials and methods

Research in this paper is a theoretical one and includes a detailed overview of the available professional and scientific literature. Themes are related to the field of analytical and quality control of herbal material and herbal medicinal products with the help of a chemical fingerprints. Data on the development of regulatory standards for herbal products were also collected. Bibliographic databases such as Medline/PubMed, Toxnet, Scopus, ScienceDirect, Elsevier biobase - Current Awareness in Biological Sciences (CABS), EMBASE, EBSCO and others are searched with key words such as: *chemical fingerprint, chromatographic fingerprint, quality control of herbal drugs, qualitative and quantitative analysis of herbal drugs, herbal medicines, identification and determination of active components in herbal medicines, phytoequivalence, herbal extracts, regulatory requirements for herbal medicines, herbal drug regulation* etc. The collected articles were critically examined, focusing on the literature that

deals with chemical fingerprint for the purpose of identification and quality control of the of complex plant samples i.e. drugs, herbal preparations, and various herbal medicinal products.

Results

The results are presented through an analytical and regulatory aspect. A detailed description of the field of application of chemical fingerprints in the pharmaceutical analysis provides an insight into the significance of this analytical approach and highlights its importance in the establishment of new standards for the quality control of herbal products. The widespread use of chemical fingerprints in the analysis of complex plant specimens accelerates and facilitates the characterization of such products and contributes to the standardization of their quality on the market. Also, the presented study provides a good insight into the demands and challenges posed by the pharmaceutical analysis of plant specimens, particularly various plant products with complex composition, as well as in the regulation of the mentioned group of products.

Conclusion

Overview of the research brings systematized information on the role of chemical fingerprint in the characterization of complex plant samples. The selected studies show the advantages and disadvantages of a chemical fingerprint in the identification and quality control of different plant samples and present new findings about the value and importance of such an analytical approach to complex plant material present in different groups of herbal products. Also, an overview of the current regulatory situation in this area provides insight into the shortcomings of current official regulations and points to the necessary measures and improvements.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

1.1. Uvod 2

1.2. Pregled područja istraživanja 6

1.2.1. Zahtjevi Europske farmakopeje (Ph. Eur.) 8

1.2.2. Kontrola kakvoće polaznog biljnog materijala 10

1.2.3. Kontrola kakvoće biljnih lijekova 11

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 13

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI 15

3.1. Standardizacija biljnog materijala 18

3.2. Kemijski fingerprint 20

3.3. Fitoekvivalencija 25

3.4. Kemometrijski pristup kontroli kakvoće 33

4. RASPRAVA 36

4.1. Primjeri ispitivanja kakvoće biljnih proizvoda pomoću kromatografskog *fingerprinta* 43

4.1.1. Uloga kemijskog *fingerprinta*: primjena na vrstama roda *Ephedra* 43

4.1.2. Analiza biljnih droga Gentianae Radix et Rhizoma pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) 53

4.1.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza karakterističnih pikova u kemijskom *fingerprintu* Yuanhu Zhitong tableta pomoću spregnutih tehnika HPLC-DAD-MS/MS 63

5. ZAKLJUČAK 81

6. LITERATURA 85

7. ŽIVOTOPIS 92

POPIS SKRAĆENICA

CE	Capillary Electrophoresis	Kapilarna elektroforeza
DAD	Diode Array Detector	Detektor s nizom dioda
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Deoksiribonukleinska kiselina
EC	European Commission	Europska komisija
EMA	European Medicines Agency	Europska agencija za lijekove
ESI	Electrospray Ionization	Elektrosprej ionizacija
EU	European Union	Europska unija
EZ		Europska zajednica
FID	Flame Ionization Detector	Plameno-ionizacijski detektor
GAP	Good Agricultural Practice	Dobra agrikulturalna (poljoprivredna) praksa
GC	Gas Chromatography	Plinska kromatografija
GCP	Good Collecting Practice	Dobra sakupljačka praksa
GLP	Good Laboratory Practice	Dobra laboratorijska praksa
GMP	Good Manufacturing Practice	Dobra proizvođačka praksa
GSP	Good Supply Practice	Dobra dobavljačka praksa
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography	Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti
IR	Infrared	Infracrveno područje
LC	Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija
LOD	Limit of Detection	Limit detekcije
LOQ	Limit of Quantification	Limit kvantifikacije/određivanja
MS	Mass Spectrometry	Masena spektrometrija
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Nuklearna magnetska rezonancija
PDA	Photodiode Array Detector	Detektor s nizom fotodioda

Ph. Eur.	European Pharmacopoeia	Europska farmakopeja
RPA	Relative Peak Area	Relativna površina ispod pika
RSD	Relative Standard Deviation	Relativno standardno odstupanje
RRT	Relative Retention Time	Relativno retencijsko vrijeme
S/N	Signal to Noise Ratio	Omjer signala i šuma
TCM	Traditional Chinese Medicine	Tradicionalna kineska medicina
TGA	Therapeutic Goods Administration	Australsko regulatorno tijelo
TIC	Total Ion Chromatogram	Ukupni ionski kromatogram
TLC	Thin-Layer Chromatography	Tankoslojna kromatografija
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija (ultra) visoke djelotvornosti
UV	Ultraviolet	Ultraljubičasto područje
WEU	Well-Established Use	Provjerena medicinska uporaba
YZT	Yuanhu Zhitong tablets	Yuanhu Zhitong tablete

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA



1.1. UVOD

Biljne tvari i proizvodi već tisućljećima nalaze široku primjenu u različitim sustavima tradicionalne medicine. S obzirom na njihovu široku rasprostranjenost i dostupnost, neškodljivost takvih proizvoda od iznimne je važnosti, a ona je uvelike određena kakvoćom biljne sirovine. Razvoj biljnih terapeutika zahtijeva obuhvatno razumijevanje složenih biljnih sustava, uključujući biološki, kemijski, genetički i agronomski aspekt. Općenito se vjeruje da je rizik primjene biljnih tvari i proizvoda nizak, ali brojna izvješća o ozbiljnim neželjenim reakcijama povezanim s njihovom primjenom upućuju na potrebu razvoja djelotvornih sustava njihove standardizacije i kontrole kakvoće. Također valja istaknuti važnost pooštravanja regulatornih zahtjeva u području biljnih tvari kako bi se osigurala prisutnost samo kvalitetnih, djelotvornih i sigurnih proizvoda na tržištu.

Iako je malo vjerojatno da će ljudi odustati od blagodati konvencionalne medicine, primjena biljnih proizvoda u funkciji održavanja zdravlja i prevenciji bolesti u stalnom je porastu. Prakticiranje nekonvencionalne medicine posebno je izraženo u istočnim zemljama, kao što su Kina i Indija, ali se trend porasta takve prakse bilježi također u zapadnim razvijenim zemljama. Proizvodi koji se pritom koriste uglavnom potječu iz biljnih izvora, a njihova primjena posebno se ističe pri samoliječenju i samopomoći. S obzirom na trend "zdravog života" i konzumiranja organski uzgojene hrane, sve je izraženije vjerovanje kako je liječenje proizvodima na biljnoj osnovi zdravo i sigurno. Takav trend povlači za sobom pitanja i strahove vezane uz kakvoću biljnih proizvoda, njihovu učinkovitost i sigurnost primjene. Sve su učestalije informacije koje ukazuju na to da biljni proizvodi mogu prouzročiti različite nuspojave, od kojih neke nisu ni najmanje bezazlene. Također se javlja pitanje sigurnosti njihove primjene kada se uzimaju zajedno s konvencionalnom terapijom.

Zabilježeni su brojni slučajevi kada su biljni proizvodi bili dostupni na tržištu, a da prethodno nisu ispitani na prikladan način, odnosno, njihova je kakvoća bila upitna, često i neodgovarajuća. Uočena je također kontaminacija biljnih proizvoda različitim pesticidima, neki su uzorci bili neodgovarajuće mikrobiološke čistoće, zabilježene su i nedopuštene razine teških metala te drugih onečišćenja, kao i prisutnost nekih kemijskih djelatnih tvari koje se koriste i odobrene su za proizvodnju lijekova [1, 2]. Uzroci prisutnosti pesticida, teških metala i neodgovarajuće mikrobiološke čistoće mogu biti povezani s izvorom i podrijetlom biljnog materijala (rast u onečišćenom okolišu ili onečišćenje prilikom sabiranja biljnog materijala), dok ostala onečišćenja mogu nastati tijekom neprikladnog čuvanja biljnog materijala ili neodgovarajućom obradom [3]. Neki od navedenih nepovoljnih čimbenika mogu se izbjeći implementacijom standardnih operativnih postupaka (SOP) i prihvaćanjem smjernica Dobre prakse: poljoprivredne (GAP), sakupljačke (GCP), laboratorijske (GLP), dobavljačke (GSP), te Dobre proizvođačke prakse u proizvodnji biljnih proizvoda (GMP) [4, 5]. Biokemijski profil biljnog materijala ovisi o brojnim morfološkim i ekološkim čimbenicima, a odabir optimalnog analitičkog postupka ima važnu ulogu u karakterizaciji složenog biljnog uzorka (droge, pripravci, biljni lijekovi i drugi biljni proizvodi), što predstavlja značajan korak prema globalnoj standardizaciji i sigurnoj primjeni tvari i proizvoda biljnog podrijetla.

Dakle, rastuća se potrošnja biljnih proizvoda nikako ne smije ignorirati te je potrebno posvetiti više pozornosti ispitivanjima njihove kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti primjene.

Ovisno o načinu prikazivanja proizvoda i vezanim tvrdnjama (u skladu sa zakonskim okvirima), biljni proizvodi na tržištu mogu biti svrstani u skupinu lijekova, hrane ili kozmetike.

Europsko je tržište do nedavno bilo slabo regulirano glede biljnih proizvoda zbog mnogih razloga, a osobito zbog manjka usklađenih zakonskih okvira. Neke su europske zemlje uvele

nacionalne postupke za registraciju biljnih proizvoda, dok se u većini zemalja nije primjenjivala posebna regulativa pa su se biljni proizvodi na tržištu mogli pronaći u različitim skupinama kod kojih se ne primjenjuju strogi regulatorni zahtjevi kao za lijekove. Stoga su i danas, zbog različitih gledišta država članica EU, prisutne teškoće prilikom razvrstavanja pojedinih biljnih proizvoda kao dodataka prehrani, tradicionalnog biljnog lijeka, biljnog lijeka provjerene medicinske uporabe (WEU) ili druge dodirne skupine proizvoda.

Usvajanjem novih direktiva na području lijekova i dodataka prehrani, napravljen je pomak glede razvrstavanja i registracije biljnih proizvoda. Primjer je Direktiva 2004/24/EC [6] koja uvodi skupinu tradicionalnog biljnog lijeka te daje prijelazni period od 7 godina od njenog donošenja 2004. godine, u svrhu prilagodbe proizvođača zahtjevima za registraciju biljnih proizvoda u skupini lijeka. Iste godine, Direktiva 2004/27/EC detaljnije opisuje definiciju lijeka te ističe da, kada je određeni proizvod istovremeno moguće svrstati u skupinu lijeka i neku drugu kategoriju, za takav je proizvod, s ciljem zaštite javnog zdravstva, potrebno primijeniti strože odredbe važeće za lijekove [7]. Direktiva 2002/46/EC [8], koja se odnosi na dodatke prehrani, vrlo dobro razrađuje zahtjeve za minerale i vitamine (dozvoljeni kemijski oblici, preporučeni dnevni unos, i dr.), dok su ostali sastojci koji imaju nutritivni ili fiziološki učinak (uključujući i biljne tvari) uglavnom prepušteni nacionalom zakonodavstvu.

Ipak, razvoj zakonskih okvira za pojedine skupine proizvoda omogućava njihovu bolju kvalitetu na tržištu pregledom registracijske dokumentacije, uključujući provjeru prikladnosti označavanja proizvoda i upute za korisnika od strane nadležnih regulatornih tijela te kroz postmarketinško praćenje i prijavu nuspojava.

Budući da su biljni sustavi iznimno kompleksni, a sadržaj bioaktivnih sastavnica često promjenjiv i ovisan o brojnim i raznolikim čimbenicima, očita je potreba uvođenja novih pristupa identifikaciji i kontroli kakvoće takvih kompleksnih uzoraka; oni mogu biti usmjereni

ili prema pojedinačnom, specifičnom spoju (analiza temeljena na biljezima) [9] ili obuhvaćaju čitav uzorak (*fingerprint* analiza), što je i temeljni predmet istraživanja ovoga specijalističkog rada.

1.2. PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Zbog velike varijabilnosti biljnog materijala, potrebna je odgovarajuća metoda identifikacije i provjere kakvoće, kako bi se razlikovali slični biljni materijali lošije kvalitete, oni koji sadrže nižu koncentraciju djelatne tvari, kao i oni s više onečišćenja (primjerice pesticida). Iz svega navedenog, vidljivo je da je upravo identifikacija, kao dio provjere kakvoće biljnog materijala, nužna za sigurnost potrošača [10]. Tradicionalan pristup identifikaciji biljnog materijala uključuje vizualnu inspekciju cijele biljke, odnosno, biljne droge, što nije primjenjivo pri identifikaciji biljne vrste u kompleksnom biljnom uzorku (droge složena sastava, biljni pripravci ili drugi biljni proizvodi). Također, zbog velike sličnosti pojedinih ljekovitih biljaka/biljnih droga, često dolazi i do slučajnih zamjena nekom drugom (sličnom) biljkom/biljnom drogom, što može imati čak i kobne posljedice. Ne postoje jedinstvene službene metode identifikacije pojedine biljne vrste ili droge prisutne u različitim biljnim proizvodima, kao ni jedinstvene metode njihove kontrole kakvoće. Regulativa donosi monografije i smjernice (farmakopejske i druge službene metode ispitivanja), kojima se nastoji osigurati kakvoća takvih proizvoda, a što se uglavnom primjenjuje na biljne proizvode registrirane kao biljni lijekovi (tradicionalni biljni lijekovi). U farmakopejskim monografijama, osim makroskopske i mikroskopske identifikacije, često se propisuje određivanje odgovarajućeg biljega (markera) u svrhu identifikacije i kontrole kakvoće biljnog materijala. Osim toga, primjenom citogenetičkih metoda ispitivanja, koje uključuju brojanje kromosoma i kariotipizaciju, može se pouzdano razlikovati biljni materijal s obzirom na to da DNA molekule spadaju u pouzdane biljege koji su manje podložni vanjskim utjecajima (starost biljke, fiziološki uvjeti i utjecaji okoliša). No, nedostatak DNA *fingerprintinga* je nemogućnost određivanja sastavnica prisutnih u biljnom materijalu. Dakle, navedeni pristupi nisu uvijek prikladni za karakterizaciju određenog biljnog uzorka, s obzirom na njegovu kompleksnost i često nepoznat sastav, kao i na nedostatak jedinstvenih markera. Stoga se

identifikacija koja je temeljena na ograničenom broju biljega ne može uvijek smatrati dostatnom, nego se javlja potreba analize kompletnog složenog uzorka (karakterističnog profila određene biljne vrste/droge/biljnog proizvoda) – *fingerprint* analiza [11]. Kemijski (većinom kromatografski) *fingerprint* biljnog uzorka u praksi predstavlja kromatografski profil s karakterističnim sastavnicama koje su nositelji farmakološke aktivnosti i/ili su samo analitički biljezi (nisu nužno bioaktivni spojevi, već imaju prikladna analitička svojstva koja su korisna u analitičke svrhe). Kako sastav iste biljne droge može varirati u koncentracijama pojedinih sastavnica ovisno o geografskom podrijetlu biljke, vremenskim prilikama uzgoja, sabiranju, obradi i sl., za identifikaciju je najpouzdanije koristiti upravo kemijski *fingerprint* kojim se razmatraju i evaluiraju sve sastavnice, a ne samo one koje su prisutne u najvišim koncentracijama. Za određivanje kemijskog sastava biljnih uzoraka primjenjuju se najčešće spektroskopske i kromatografske tehnike: plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), spektrofotometrija u ultraljubičastom (UV) i infracrvenom (IR) području, Raman i NMR spektroskopija, masena spektrometrija (MS) i dr. Primjenom spregnutih sustava, HPLC ili GC s nekom drugom analitičkom tehnikom (npr. GC-MS i HPLC-MS), dobivaju se dodatne analitičke informacije, primjerice, omogućeno je učinkovito detektiranje srodnih spojeva koji zajedno eluiraju te imaju slična vremena zadržavanja.

Kemijskim se *fingerprintom* mogu zabilježiti varijabilnosti u djelatnim tvarima i njihovim koncentracijama koje mogu nastati unutar iste biljne vrste, ovisno o uvjetima u kojima je biljka kultivirana i sabirana te metodama obrade i čuvanja biljnog materijala. Zadovoljavajuća identifikacija mora potvrditi da uzorak potječe od određene biljne vrste i isključiti mogućnost drugih izvora. Obično se radi usporedba *fingerprinta* ispitivanog uzorka i biljnog referentnog standarda. S obzirom da biljni ekstrakti mogu sadržavati velik broj komponenata u niskim koncentracijama, vizualna evaluacija kemijskih *fingerprinteva* ne može uvijek biti dovoljna za

prepoznavanje razlika između profila te se iz tog razloga preporučuje primjena matematičko-statističkih modela kao pomoć u njihovoj procjeni i usporedbi.

1.2.1. Zahtjevi Europske farmakopeje (Ph. Eur.) [12]

Europska farmakopeja donosi opće monografije u kojima opisuje zahtjeve za polazne biljne materijale.

- **1. Biljne droge**

Biljne tvari (droge) jesu cijele ili narezane biljke, biljni dijelovi, alge, lišajevi, gljive, u osušenom ili svježem obliku te neobrađene izlučevine biljaka; biljne tvari označavaju se korištenim dijelom biljke i botaničkim nazivom biljke, u skladu s binomnom nomenklaturom.

Identifikacija biljnih droga provodi se makroskopskim i mikroskopskim ispitivanjem, a može se zahtijevati i dodatno ispitivanje (primjerice TLC).

Od ostalih ispitivanja, Ph. Eur. propisuje ispitivanje gubitka sušenjem, određivanje sadržaja vode, ostataka pesticida, teških metala, ukupnog pepela, pepela netopljivog u klorovodičnoj kiselini, aflatoksin B1, okratoksin A, mikrobiološku čistoću i dr. Ph. Eur. također propisuje i određivanje sadržaja biljne droge prikladnom metodom.

- **2. Biljni pripravci**

Biljni pripravci su homogeni pripravci dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (usitnjavanje, ekstrakcija, fermentacija, destilacija, pročišćavanje, koncentriranje, tiještenje) te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučevine biljaka.

- Ekstrakti

Ekstrakti po definiciji mogu biti tekući (tekući ekstrakti i tinkture), polučvrsti (meki ekstrakti) ili čvrsti (suhi ekstrakti), a dobivaju se iz biljnih droga. Ekstrakti se proizvode definiranim metodama koristeći etanol ili druga prikladna otapala. Biljne droge i organska otapala koje se koriste u postupku proizvodnje ekstrakta moraju odgovarati određenoj farmakopejskoj monografiji. Moguće je dodati i prikladne inaktivne tvari u različitim stupnjevima proizvodnog postupka kako bi se poboljšala tehnološka kakvoća samog ekstrakta (primjerice, homogenost ili konzistencija). Također je dozvoljeno dodavati prikladne stabilizatore, kao i konzervanse. Identifikacija se provodi primjenom prikladnih metoda. Ispituje se mikrobiološka čistoća, teški metali, aflatoksini, ostatci pesticida te određuje sadržaj biološki aktivnih tvari.

Označavanje biljnih ekstrakata mora sadržavati:

- biljnu drogu;
- vrstu ekstrakta (tekući, polučvrsti, suhi…);
- za standardizirane ekstrakte – sadržaj sastavnica koje nose terapijsku aktivnost;
- za kvantificirane ekstrakte – sadržaj biljega koji se koriste za kvantifikacije;
- omjer polaznog materijala prema izvornom ekstraktu (ekstrakt bez inaktivnih tvari) (DER);
- otapalo/otapala koja su korištena za ekstrakciju;
- tamo gdje je primjenjivo, navesti koja se svježa biljna droga koristila;
- tamo gdje je primjenjivo, navesti da je ekstrakt rafiniran;
- ime i količina bilo koje inaktivne tvari, uključujući stabilizatore i konzervanse;
- tamo gdje je primjenjivo, postotak suhog ostatka.

- Biljni čajevi

Biljni čajevi sadrže jednu ili više biljnih droga namijenjenih za pripremu vodenih poripravaka postupcima dekokcije, infuza ili maceracije. Pripravci se pripremaju neposredno prije primjene.

Biljne droge koje se koriste za ovu namjenu odgovaraju pojedinačnim monografijama Europske farmakopeje ili, u slučaju da pojedinačna monografija nije dostupna, biljna droga mora odgovarati općoj monografiji *Biljne droge*.

Ispitivanje obuhvaća identifikaciju (botanički pregled i/ili kromatografski profil), mikrobiološku čistoću i dr.

1.2.2. Kontrola kakvoće polaznog biljnog materijala

S obzirom na raznolikost skupina biljnih proizvoda koji se nalaze na tržištu i različite zahtjeve za registraciju pojedine skupine proizvoda (o čemu uvelike ovisi kakvoća proizvoda), opisat će se zahtjev za "najstrožu" skupinu biljnih proizvoda – biljne lijekove. Tijekom postupka registracije biljnog lijeka, potrebno je dostaviti opsežnu specifikaciju (zahtjev kakvoće) za svaku biljnu tvar. Ukoliko se kao polazni materijal koristi biljni pripravak (primjerice masna ili eterična ulja), potrebno je priložiti specifikaciju biljne tvari (biljne droge). Navodi se binomni znanstveni naziv biljke (rod, vrsta, podvrsta i autor), kemotip (gdje je primjenjivo) i dijelovi biljke. Za biljne droge za koje ne postoji monografija u Ph. Eur., potrebno je pripremiti opsežnu specifikaciju. Ukoliko biljne droge sadrže sastavnice poznate terapijske aktivnosti, potrebno je postaviti zahtjev za određivanje njihovog sadržaja (zajedno s metodama ispitivanja). Sadržaj se mora navesti kao raspon vrijednosti (%). U slučaju biljnih droga u kojima nisu poznate sastavnice koje nose terapijsku aktivnost, potrebno je navesti zahtjeve za sadržaj markerskih sastavnica (zajedno s metodama ispitivanja). Odabir biljega potrebno je obrazložiti.

Općenito je pravilo da biljne droge trebaju biti ispitane na sljedeće parametre: mikrobiološku čistoću, prisutnost mikotoksina (aflatoksini, okratoksin A), ostatke pesticida i fumiganata, toksičnih metala, različitih onečišćenja, kao što je prisutnost nekog drugog biljnog materijala i sl. Metode ispitivanja koje nisu preuzete iz Ph. Eur. moraju biti validirane te moraju biti dostupni referentni standardi biljnih droga, kako bi se mogla provesti ispitivanja poput makro- i mikroskopskog pregleda, kromatografske analize i sl.

Ukoliko biljni lijek sadrži biljni pripravak, zasebno ili uz određenu biljnu drogu, zahtjev kakvoće za biljne droge mora pratiti također opis i validacija postupka proizvodnje biljnog pripravka. Navedeni podatci moraju se priložiti kao dio registracijskog dosjea. Također je potreban opsežan zahtjev kakvoće (specifikacija) za biljni pripravak koji obvezno mora sadržavati karakteristike pripravka, identifikaciju te ispitivanja čistoće. Ukoliko biljni pripravak sadrži sastavnice poznate terapijske aktivnosti/djelovanja, potrebno ih je kvantificirati (odrediti sadržaj bioaktivnih tvari).

1.2.3. Kontrola kakvoće biljnih lijekova

Metode koje se koriste za kontrolu kakvoće gotovih proizvoda moraju omogućiti kvalitativnu i kvantitativnu analizu djelatne(ih) tvari. Potrebno je pripremiti zahtjev kakvoće (specifikaciju) prema kojemu se određuju analitički biljezi za proizvode kod kojih nisu poznate sastavnice s terapijskom aktivnošću. Ako je u proizvod ugrađena biljna droga kod koje su poznate bioaktivne sastavnice, one se moraju specificirati i kvantitativno odrediti. U slučaju registracije tradicionalnog biljnog lijeka koji može sadržavati vitamine i/ili minerale, njih je također potrebno specificirati i kvantificirati.

U slučaju da gotov proizvod sadrži kombinaciju više biljnih droga ili pripravaka nekoliko biljnih droga, te stoga nije moguće provesti kvantitativno određivanje svake djelatne

sastavnice, moguće je primijeniti zajedničko određivanje nekoliko djelatnih sastavnica. Svaki takav slučaj mora se detaljno obrazložiti.

- **Testovi stabilnosti**

S obzirom da se pod djelatnom tvari u biljnom lijeku podrazumijeva kompletna biljna droga ili biljni pripravak, nije dovoljno samo ispitivanje stabilnosti sastavnica poznate terapijske aktivnosti. Potrebno je pratiti i stabilnost ostalih sastavnica koje su prisutne u biljnoj drogi/biljnom pripravku, za što je osobito prikladan kromatografski *fingerprint*. Primjenom kromatografskog *fingerprinta* evaluira se proporcionalnost sadržaja sastavnica u određenim vremenskih intervalima sa sadržajem koji je dobiven inicijalnim *fingerprintom*.

Ukoliko biljni lijek sadrži kombinaciju nekoliko biljnih droga ili biljnih pripravaka, te nije moguće određivati stabilnost svake pojedinačne djelatne tvari, stabilnost lijeka potrebno je pratiti pomoću odgovarajućih kromatografskih *fingerprinteva,* prikladnih metoda za određivanje sadržaja, te ispitivanja fizikalnih svojstava proizvoda, kao i drugih prikladnih ispitivanja koja podnositelj zahtjeva mora odgovarajuće obrazložiti.

U slučaju da biljni lijek sadrži biljne droge ili biljne pripravke sa sastavnicama poznate terapijske aktivnosti, dozvoljene granice za sadržaj u predloženom roku valjanosti lijeka ne smiju prelaziti ±5% od deklarirane vrijednosti.

Ako biljni lijek sadrži biljne droge ili biljne pripravke u kojima nisu poznate sastavnice koje su nosioci terapijske aktivnosti, dozvoljene granice za sadržaj analitičkih biljega u predloženom roku valjanosti lijeka ne smiju prelaziti ±10% od inicijalno dobivenih vrijednosti [10].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA



U ovom je radu cilj istaknuti važnost prikladne kontrole kakvoće svih biljnih materijala koji ulaze u sastav gotovog biljnog proizvoda kako bi se proizveo djelotvoran i kvalitetan proizvod koji je siguran za primjenu jer na kvalitativan i kvantitativan sastav biljnog uzorka utječu različiti čimbenici. Zbog kompleksnosti biljnog materijala, kontrola kakvoće i osiguranje stabilnosti biljnih proizvoda predstavljaju velik izazov njihovim proizvođačima. Kako bi se povećala kvaliteta biljnih proizvoda, a samim time i njihova djelotvornost i sigurnost primjene, potrebno je uvesti odgovarajuće mjere osiguranja kakvoće od samog uzgoja ljekovitog bilja, njegovog sakupljanja, obrade, distribucije i skladištenja. Također je potrebno uvesti sustave kontrole u svim fazama proizvodnog postupka gotovog proizvoda.

Cilj je rada, kroz pregled recentne znanstvene i stručne literature, prikazati ulogu kemijskog *fingerprinta* u kontroli kakvoće složenih biljnih uzoraka (droge, pripravci, biljni lijekovi i drugi biljni proizvodi), posebice u ispravnoj identifikaciji, koja jamči da uzorak potječe od određene biljne vrste i time isključuje mogućnost drugih izvora, te je kao dio provjere kakvoće biljnog materijala nužna za sigurnost potrošača takvih proizvoda. Cilj je također kritički raspraviti primjenu modela kemijskog *fingerprinta* u identifikaciji i kontroli kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka na odabranim primjerima biljnih tvari i proizvoda koji se primjenjuju u prevenciji bolesti, kao pomoć u liječenju ili kao registrirani biljni lijekovi.

3. MATERIJALI I METODE –

Sustavni pregled saznanja o temi



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

Na koncentracije aktivnih sastavnica u biljnom materijalu i biljnim proizvodima utječu različiti faktori. Upravo iz kompleksnosti navedenog, kontrola kakvoće i osiguranje stabilnosti biljnih proizvoda predstavljaju veliki izazov. Jedna od mogućnosti smanjenja unutarnih čimbenika jest ujednačavanje koncentracije aktivnih sastavnica na način da se združi više serija istog biljnog materijala koje sadrže različite količine željenih aktivnih komponenata. Na taj se način mogu djelomično smanjiti varijacije.

Druga je mogućnost proizvodnja biljnih proizvoda iz standardiziranih biljnih pripravaka. Navedeni pristup predstavlja prekretnicu između tradicionalnih biljnih pripravaka i modernih lijekova. Ključno je uspostaviti standarde ili biljege (markere), što nam danas omogućuje razvoj suvremenih analitičkih metoda ispitivanja, te modernih postupaka proizvodnje.

Najvažniji dio standardizacije i kontrole kakvoće biljnih droga/pripravaka predstavljaju identifikacija, određivanje čistoće i sadržaja. Upravo iz tog razloga, provjera kakvoće započinje identifikacijom biljne droge [11]. Određena biljka može se imenovati na različite načine. Pogrešna identifikacija/zamjena biljne vrste uglavnom se događa u slučajevima kada se ne primjenjuje binomno nazivlje. Primjerice, znanstveni naziv kineske biljke u narodu nazivane "dong quai", "dong guai" i "tang kuei" jest *Angelica polymorpha* Maxim. Uobičajeni engleski naziv "Angelica" i latinski naziv droge "Radix angelicae" može se odnositi na dvije vrste – gore navedenu (Australija) ili vrstu *Angelica archangelica* L. (Europa).

Kemijska analiza trenutno predstavlja najbolji pristup standardizaciji, kontroli onečišćenja te identifikaciji biljne vrste. Kao komplementarne tehnike mogu se još koristiti i tehnologije molekularne biologije za identifikaciju ljekovite biljke/biljne droge.

Važno je istaknuti kako različiti dijelovi biljaka/biljni organi (primjerice korijen, stabljika ili listovi) sadržavaju različite koncentracije kemijskih sastavnica. Godišnje doba u koje se biljka sakuplja, kao i vremenske prilike, također uzrokuju varijabilnost unutar iste ljekovite biljke (primjerice, paklitaksel te alkaloidi opijuma) [12]. Vidljivo je da nije moguće kontrolirati sve faktore koji utječu na kemijski sastav pojedine biljne droge, a upravo su konzistentnost u sastavu i biološka aktivnost najvažniji čimbenici za sigurnu primjenu i učinkovitost. S obzirom da svaka biljka sadrži velik broj različitih sastavnica, nije moguće odrediti prisutnost ili odsutnost svih komponenata. Moderne kromatografske tehnike primjenjuju kemijske biljege koji možda i nisu nosioci terapijskog djelovanja. Za mnoge biljke nisu poznate djelatne sastavnice te se takve biljne droge mogu standardizirati na sadržaj određenih kemijskih sastavnica koje su karakteristične za navedenu biljnu vrstu ili koje su prisutne u visokim koncentracijama.

3.1. STANDARDIZACIJA BILJNOG MATERIJALA

1. Ispitivanje biljnih droga temeljeno na biljezima

Biljni se lijekovi svojim karakteristikama uvelike razlikuju od konvencionalnih lijekova. Oni sadrže više od jedne djelatne sastavnice i često nemaju poznat mehanizam djelovanja. Kemijski sastav/profil ljekovitog bilja ovisi o uvjetima kojima je biljka bila izložena tijekom kultivacije, postupka proizvodnje, skladištenja i distribucije. Razvoj biljnih lijekova iznimno je zahtjevan i potrebno je razumijevanje biološkog, kemijskog, genetičkog i agronomskog aspekta same biljke/biljnog materijala. Kontrola kemijske konzistentnosti tijekom svih stupnjeva proizvodnog postupka (uključujući ekstrakciju) te stabilnosti (u roku valjanosti) od iznimne je važnosti za osiguravanje djelotvornosti i sigurnosti biljnog lijeka.

Za identifikaciju sastavnica biljnih uzoraka koriste se različiti biljezi, kao što su taksonomski, kemijski, genetički i dr. Kontrola putem spomenutih markera uključuje metode morfološke identifikacije (makroskopska identifikacija), anatomske identifikacije (mikroskopska identifikacija), kemijske analize, kao što su primjena kromatografije (npr. TLC, HPLC), kapilarne elektroforeze (CE) te spregnutih sustava (npr. LC/MS, HPLC/MS), potom ispitivanje proteina te primjena molekularnih biljega. EMA definira **kemijske biljege** kao kemijski definirane sastavnice ili grupe sastavnica biljnog lijeka koje se ispituju prilikom analize biljnog uzorka, bez obzira nose li terapijsku aktivnost ili ne. Kemijski biljezi dijele se na **analitičke biljege** i markere koji su nosioci terapijske djelotvornosti (**aktivni biljezi**). Analitički biljezi su sastavnice ili skupine sastavnica koje služe isključivo u analitičke svrhe, dok su aktivni biljezi sastavnice ili skupine sastavnica koje pridonose terapijskoj djelotvornosti. Manjak kemijskih biljega predstavlja veliku prepreku u osiguravanju odgovarajuće kontrole kakvoće biljnog materijala/proizvoda.

U kontroli kakvoće i standardizaciji biljnog materijala često se koriste i **sekundarni metaboliti**. Sekundarni metaboliti su molekule koje nisu esencijalne za rast i razvoj biljnog

organizma. Sekundarni metaboliti nazivaju se još i biljne bioaktivne molekule ili fitokemikalije te imaju važne uloge u molekularnoj regulaciji razvioja i prilagodbe biljaka na okolišne čimbenike. Najveća skupina sekundarnih biljnih metabolita su polifenolne tvari.

U ispitivanju se često koriste i **DNA biljezi** koji su specifični za pojedinu biljnu vrstu i nisu podložni vanjskim utjecajima.

Ograničenja analiza zasnovanih na biljezima temelje se na činjenici da pod markerima obično ne podrazumijevamo pojedinačne sastavnice te je stoga vrlo često potrebna kombinacija različitih analitičkih metoda ispitivanja kako bi se detektirale različite biljne komponente [13].

2. Kontrola kakvoće biljnih droga

Ispitivanje kakvoće biljnih lijekova ima izravan utjecaj na njihovu sigurnost i učinkovitost. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) objavila je nekoliko smjernica koje bi trebale pridonijeti boljoj kakvoći proizvoda biljnog podrijetla. Dokument "Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials" [14] predstavlja skup preporučenih metoda ispitivanja za identifikaciju biljnog materijala, određivanje čistoće i sadržaja biljnih sastavnica, a cilj dokumenta je pomoći laboratorijima koji se bave ispitivanjem kakvoće biljnih proizvoda. WHO je objavila i dokument koji ima za cilj uspostavljanje standardiziranog uzgoja, sakupljanja i obrade biljnog materijala ("Guildelines on Good Agricultural and collection Practices") [4], te "WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues" [5]. Vidljivo je da se regulatorna tijela sve više bave kakvoćom biljnih proizvoda.

U svrhu osiguranja odgovarajuće kakvoće biljnih lijekova/proizvoda provode se sljedeća ispitivanja: identifikacija, određivanje sadržaja vode, sadržaja djelatnih sastavnica, određivanje anorganskih onečišćenja (teški metali), mikrobiološka čistoća, ispitivanje mikotoksina, pesticida i dr. Za različite farmaceutske oblike pripravaka provode se i drugi

testovi propisani Ph. Eur., ovisno o vrsti oblika, primjerice raspadljivost, oslobađanje djelatne tvari, čvrstoća/rastrošljivost, ujednačenost sadržaja i dr.

S obzirom na varijacije u sastavnicama unutar iste biljne vrste, konvencionalna kontrola kakvoće je često nedostatna da bi se odgovarajuće analizirala biljna droga/proizvod. Upravo iz tog razloga, najčešće se koristi tzv. "*multi-technique*" pristup kako bi se mogla odrediti poveznica između sastavnica i djelovanja. Radi navedenog, uveden je koncept "fitoekvivalencije" kojemu je cilj osiguranje konzistencije biljnih proizvoda/lijekova na način da se oni kod kojih je poznat kromatografski *fingerprint* uspoređuju s kromatografskim profilom referentnog proizvoda za koji postoje kliničke studije.

Do standardne i ponovljive kakvoće određenog proizvoda dolazi se standardizacijom koja podrazumijeva provođenje određenih mjera tijekom proizvodnog postupka i kontrole kakvoće. Standardizacija biljnih droga/pripravaka predstavlja veliki izazov s obzirom na to da se oni uvelike razlikuju od sintetičkih tvari koje imaju definiranu strukturnu formulu, te su za njih dostupni i referentni standardi koji se koriste prilikom određivanja različitih parametara (primjerice sadržaja, onečišćenja i sl.). Najvažniji dio standardizacije i kontrole kakvoće biljnih droga/pripravaka predstavljaju identifikacija, određivanje čistoće i sadržaja, za što se prvenstveno primjenjuje kemijska analiza.

3.2. KEMIJSKI *FINGERPRINT*

Kemijski (većinom kromatografski) *fingerprint* biljne droge u praksi predstavlja kromatografski uzorak (obrazac) ekstrakta s karakterističnim sastavnicama koje su nositelji farmakološke aktivnosti i/ili su samo analitički biljezi [2]. Kako sastav iste biljne droge može varirati u koncentracijama pojedinih sastavnica ovisno o geografskom podrijetlu biljke, vremenskim prilikama uzgoja, sabiranju, obradi i sl., za identifikaciju je najpouzdanije

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

Za određivanje kemijskog sastava biljnih droga primjenjuju se najčešće spektroskopske i kromatografske tehnike: plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), spektroskopija u ultraljubičastom području (UV), infracrvena spektroskopija (IR), Raman spektroskopija, NMR spektroskopija, masena spektroskopija (MS), difrakcija X-zraka. Primjenom spregnutih sustava, npr. HPLC ili GC s nekom drugom analitičkom tehnikom (GC/MS i HPLC/MS), postiže se povećana osjetljivost. Primjerice, kombinacijom LC i MS omogućuje se učinkovita identifikacija srodnih spojeva koji zajedno eluiraju te imaju slična retencijska vremena.

Za biljni je materijal općenito poznato da postoji velika varijabilnost u sastavu djelatnih tvari kao i njihovim koncentracijama. One variraju unutar iste biljne vrste ovisno o regiji na kojoj je biljka kultivirana, klimatskim uvjetima i vremenu sabiranja biljnog materijala. Razlike se također javljaju s obzirom na metode sušenja, pranja, usitnjavanja te čuvanja biljnog materijala. Stoga je potrebna dobra metoda identifikacije i provjere kakvoće kako bi se razlikovali slični pripravci koji imaju lošiju kvalitetu, sadrže nižu koncentraciju djelatne tvari te imaju više onečišćenja (primjerice pesticida). Iz svega navedenog vidljivo je da je upravo identifikacija, kao dio provjere kakvoće biljnog materijala, nužna za sigurnost potrošača.

Regulativa donosi monografije i smjernice kojima se pokušava osigurati kakvoća lijekova. U monografijama službenih farmakopeja, osim makroskopske i mikroskopske identifikacije, često se propisuje određivanje markera u svrhu identifikacije i kontrole kakvoće biljnog materijala. No, taj pristup nije uvijek prikladan za identifikaciju i provjeru kakvoće određenog biljnog uzorka, s obzirom na kompleksnost i često nepoznati sastav, kao i nedostatak jedinstvenih biljega. Stoga se identifikacija koja je temeljena na ograničenom broju markera

ne može uvijek smatrati dostatnom i može se dopuniti/zamijeniti informacijama koje potječu od kompletnog *fingerprinta* (karakterističnog kemijskog profila određene biljne vrste). *Fingerprintovi* se mogu dobiti uz pomoć spektroskopskih ili razdjelnih (uglavnom kromatografskih) tehnika.

Zadovoljavajuća identifikacija mora potvrditi da uzorak potječe od određene biljne vrste i isključiti mogućnost drugih izvora. Obično se radi usporedba *fingerprinta* uzorka i ekstrakta biljnog referentnog standarda. Kromatografski *fingerprint* složenih uzoraka, kao što su biljni ekstrakti, može sadržavati velik broj komponenata u niskim koncentracijama pa stoga vizualna evaluacija ne može uvijek biti dovoljna za prepoznavanje razlika između profila. Upravo se iz toga razloga preporučuje primjena matematičkih modela za procjenu i usporedbu profila (kemometrijski pristup).

Za razvoj *fingerprint* metode ispitivanja važne su dvije stavke: kako dobiti učinkovitije i stabilnije podatke te na koji način procijeniti sličnosti i razlike između dobivenih *fingerprinta* pomoću kemometrijske metodologije [1]. Jedna od značajnih podjela identifikacije i kontrole kakvoće kromatografskim *fingerprintom* je **pristup temeljen na sastavnicama** i **pristup temeljen na uzorcima**. Pristup temeljen na sastavnicama koristi se kada je identificirana djelatna sastavnica (tvar), primjerice efedrin ili paklitaksel, dok se pristup zasnovan na uzorcima primjenjuje u slučajevima kada pojedinačna sastavnica ne može predstavljati učinkovitost biljnog proizvoda. Danas se najviše primjenjuje pristup temeljen na uzorcima (*patterns*) s obzirom da je za biljne proizvode poznato da se sastoje od mnogih sastavnica te da se u većini slučajeva ne može odrediti koja od njih posjeduje terapijski učinak. Najučinkovitije je kod analize primijeniti kombinaciju kvalitativnih profila *fingerprinta* i kvantitativnog određivanja sastavnica. Kromatografski *fingerprint* prihvaćen je kao učinkovita metoda za ispitivanje kakvoće biljnih proizvoda na međunarodnoj razini.

Literatura navodi podjelu na **kemijski** i **biološki *fingerprint*** [14]. Kemijskim fingerprintom određuju se kemijske sastavnice biljnog proizvoda/lijeka/ljekovite biljke, a dobiven je primjenom TLC, HPLC, GC, CE, te spektralnih tehnika, primjerice UV, IR, MS i sl. Biološki *fingerprint* podrazumijeva genomsku analizu. S obzirom da je genetski materijal jedinstven za svaku pojedinu biljnu vrstu, metode koje se zasnivaju na analizi DNA manje su podložne promjenama koje se kod biljaka događaju s njihovim starenjem, okolišnim uvjetima, sabiranjem, čuvanjem i obradom. Iako se određivanje bioloških *fingerprinta* koristi pri određivanju identiteta biljne vrste, takvom vrstom ispitivanja ne mogu se otkriti razlike u kakvoći biljnog materijala koje nastaju radi vanjskih čimbenika. Stoga se ta tehnika uglavnom koristi kao nadopuna određivanju kemijskih *fingerprinta* koji su orijentirani na kakvoću.

Analitičke tehnike za dobivanje kemijskih *fingerprinta*

- Tankoslojna kromatografija – TLC - predstavlja uobičajenu tehniku za dobivanje *fingerprinta* s obzirom na njezinu jednostavnost, brzinu i ekonomičnost. Nedostatci su loša rezolucija, niska osjetljivost i poteškoće prilikom detektiranja komponenata u tragovima.
- Plinska kromatografija - GC - samostalno i kao spregnuta tehnika (GC/MS) koja se odlikuje visokom specifičnošću, osjetljivošću, te mogućnošću ispitivanja malih količina uzorka, opće je prihvaćena za ispitivanje hlapljivih sastavnica u biljnom materijalu. S pomoću GC mogu se s visokom osjetljivošću detektirati gotovo svi hlapljivi sastojci, što je osobito izraženo uz primjenu FID detektora te spregnute tehnike GC/MS. Važno je istaknuti kako je pomoću kapilarnih kolona visoke selektivnosti moguće razdvojiti velik broj hlapljivih sastavnica istovremeno i u vrlo kratkom vremenskom razdoblju. GC nije pogodna za određivanje polarnih, nehlapljivih i termolabilnih spojeva. Većina biljnih sastavnica predstavlja

visokopolarne spojeve, što ograničava primjenu plinske kromatografije kao tehnike za identifikaciju biljnog proizvoda/biljne droge.

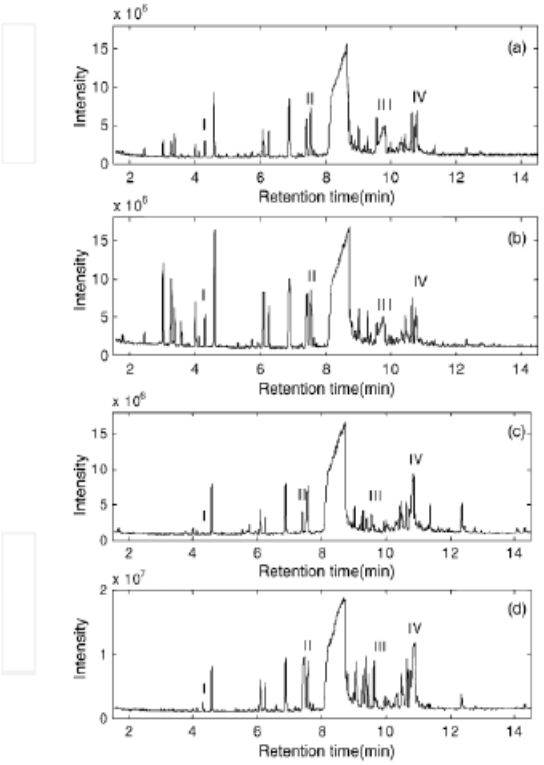
- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - HPLC - učestala je tehnika za dobivanje kemijskog *fingerprinta* jer je jednostavna za primjenu i nije ograničena na hlapljive sastavnice, niti s obzirom na njihovu stabilnost. Upravo iz navedenih razloga, HPLC ima raširenu primjenu od GC tehnike. Osobita prednost primjene HPLC je činjenica da ju je moguće kombinirati s brojnim detektorima (UV, DAD, MS, NMR i dr.), čak i nekoliko njih, što daje prednost pri otkrivanju različitih sastavnica. Osobito je u porastu primjena UPLC tehnike s obzirom na bolju analitičku učinkovitost i postizanje bolje separacije u kraćem vremenu. UPLC se također može kombinirati s različitim detektorima.
- Kapilarna elektroforeza – CE - predstavlja kombinaciju klasične elektroforeze i modernih separacijskih tehnika pomoću mikrokolona/kapilara, te je posljednjih godina njezina primjena u porastu radi visokog razlučivanja, male količine uzorka potrebnog za analizu te male potrošnje otapala. Usporedbe su pokazale kako je vrijeme potrebno za ispitivanje CE tehnikom dva i više puta kraće od ispitivanja HPLC tehnikom, a količina potrebnih otapala je do 100 puta manja. CE ima širok raspon primjene te je navedenom tehnikom moguće ispitivati organske, anorganske, biološke makromolekule, neutralne molekule i dr. U novije se vrijeme prakticira i kombinacija CE tehnike s različitim detektorima (CE/DAD, CE/MS, CE/NMR).

3.3. FITOEKVIVALENCIJA

Koncept fitoekvivalencije uključuje „instrumentalnu inspekciju“ biljnih uzoraka primjenom različitih kromatografskih i elektroforetskih metoda, a dobiveni kemijski profil (*fingerprint*) predstavlja prikaz kemijskog integriteta fitoterapeutika te služi za potvrdu autentičnosti i u kontroli kakvoće.

Koncept fitoekvivalencije koristi se u praksi kako bi se osigurala konzistentnost i učinkovitost biljnih proizvoda [15]. Za biljnu drogu/gotov biljni proizvod, za koji je dokazana djelotvornost, priprema se kemijski *fingerprint*, profil koji dalje služi kao referentni *fingerprint* za kontrolu kakvoće srodnih pripravaka/proizvoda. Upravo stoga, razvoj odgovarajućih analitičkih metoda za određivanje kompletnog profila fitokemijskih sastavnica te kvantitativnu analizu biološki aktivnih tvari, kemijskih biljega i ostalih važnijih komponenata, predstavlja velik izazov današnjice. Bez dosljednog sastava određene biljne droge/proizvoda, farmakološki se učinak ne može niti očekivati. Najčešće se koriste kromatografske tehnike pomoću kojih se dobiva relativno kompletna slika (*fingerprint*) određenog kompleksnog biljnog uzorka i potom uspoređuje s referentnim *fingerprintom* koji potječe od izvora za koji je dokazana farmakološka učinkovitost [2].

Niže je prikazan primjer fitoekvivalentih uzoraka [2] (Slika 1).



Slika 1: Ukupni ionski kromatogrami (TIC) eteričnog ulja iz kore cimeta (Cortex cinnamomi) sa četiri lokaliteta: (a) Zhaoqing, pokrajina Guangdong, Kina, (b) Yulin, pokrajina Guangxi, Kina, (c) pokrajina Yunnan, Kina i (d) Vijetnam.

Slika 1. prikazuje ukupne ionske kromatograme (TIC) eteričnog ulja iz kore cimeta (Cortex cinnamomi) sa četiri lokaliteta: (a) Zhaoqing, pokrajina Guangdong, Kina, (b) Yulin, pokrajina Guangxi, Kina, (c) pokrajina Yunnan, Kina i (d) Vijetnam. Iako između pojedinih *fingerprinta* postoje manje razlike, može se zaključiti da su uzorci izvorni i može se ustanoviti fitoekvivalencija za sve uzorke droge Cortex cinnamomi.

Priprema odgovarajućeg kromatografskog *fingerprinta* koji će moći poslužiti kao dokaz fitoekvivalencije ovisi o nekoliko čimbenika: metodi ekstrakcije, uređajima na kojima se provodi analiza, uvjetima tijekom analize i dr. Za dobar kromatografski *fingerprint*, koji će dati maksimum informacija o biljnoj drogi/proizvodu, potrebno je razviti odgovarajuću metodu ekstrakcije pomoću koje se iz biljnog materijala mogu "izvući" sve sastavnice koje predstavljaju kompletan integritet određene biljne droge/proizvoda. Nadalje, potrebno je

dobiti kromatogram s dobrim odjeljivanjem sastavnica i koncentracijskim profilom detektiranih komponenata pomoću optimalnog detektora. Iz svega navedenoga može se zaključiti kako je upravo dobivanje kromatografskog *fingerprinta* visoke kvalitete, sa što više informacija, ključni zadatak analitičara, nakon čega se može procjenjivati je li biljni uzorak fitoekvivalentan referentnom proizvodu.

Australsko regulatorno tijelo (Therapeutic Goods Administration, TGA) donosi dokument "Guidance on equivalence of herbal extracts in Complementary Medicines" [16] u kojemu opisuje pod kojim se uvjetima biljni ekstrakt može smatrati ekvivalentnim ekstraktu koji se trenutno koristi u proizvodu na tržištu. S obzirom da se razlike u biljnim pripravcima mogu pojaviti radi korištenja različitih otapala, različitih koncentracija istog otapala te različite metode ekstrakcije, ekstrakt u konačnici može rezultirati različitim profilom učinkovitosti i sigurnosti. Radi navedenog se postavlja pitanje koje varijacije (ako uopće) se smiju dozvoliti kod pripreme ekstrakta iz iste biljne droge.

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

- Biljni materijal – predstavlja primaran čimbenik o kojemu ovisi broj komponenata koje se ekstrahiraju tijekom pripreme biljnog ekstrakta. Važno je dobro odabrati biljnu vrstu, kao i biljni organ (dio biljke) iz kojega se želi dobiti biljni pripravak.

  S obzirom na poznatu varijabilnost u sastavnicama biljnog materijala, ovisno o podneblju uzgoja, vremenu sakupljanja i sl., određene varijacije u omjeru sastavnica ipak se smatraju dozvoljenima. Potrebno je proizvesti dovoljan broj ekstrakata tijekom određenog vremenskog perioda (koristeći definirano ekstrakcijsko otapalo i validiranu proceduru ekstrakcije) te samim time dokazati kolika je maksimalna varijacija u koncentracijama ekstrahiranih sastavnica.

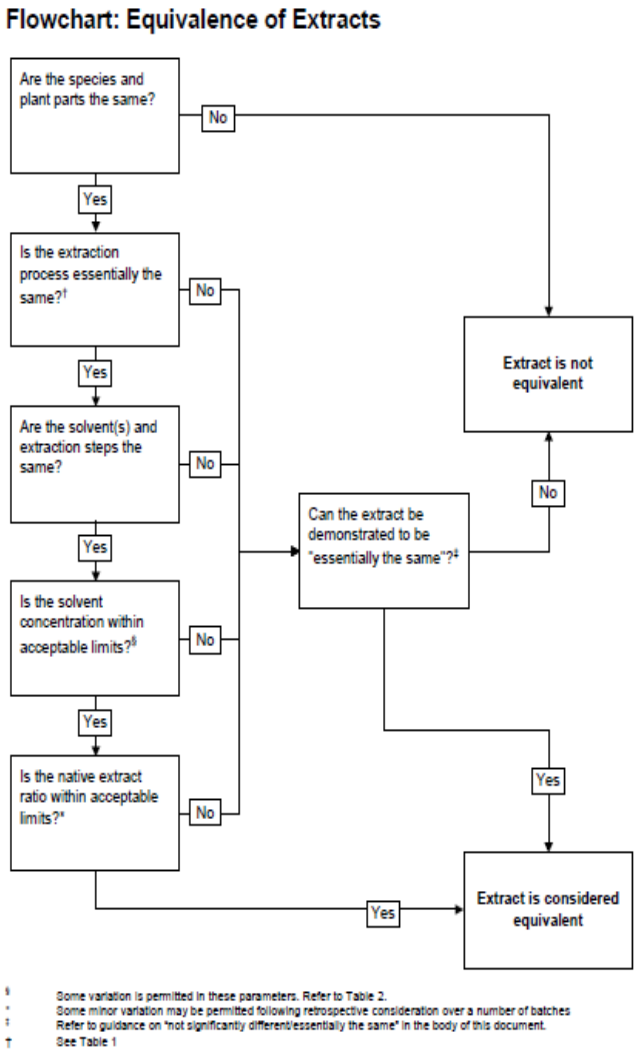
- Ekstrakcijsko otapalo – tip, koncentracija i količina ekstrakcijskog otapala značajno utječe na raspon sastavnica u konačnom ekstraktu. U dokumentaciji za registraciju biljnog lijeka obvezno se navode sve gore spomenute informacije (osim same količine korištenog otapala). Stav je regulatora kako različita vrsta otapala u konačnici rezultira i različitim sastavom konačnog ekstrakta. Dozvoljene su jedino manje varijacije u koncentraciji korištenog otapala za koje se smatra da neće značajno promijeniti sastav ekstrahiranih sastavnica iz biljnog materijala.
- Proizvodni postupak – tip ekstracijskog postupka koji se koristi za proizvodnju ekstrakta, što uključuje i veličinu serije, temperaturne uvjete i tlak, prepoznati su kao čimbenici koji mogu utjecati na spektar ekstrahiranih sastavnica.

  Definirani parametri proizvodnog postupka ne utječu samo na količinu dobivenog ekstrakta, već i na sastav ekstrahiranih komponenata.

Značenje izraza "ne razlikuje se značajno" i "u suštini isto"

Kako bi se odredilo da se dva ekstrakta ne razlikuju značajno ili su u suštini ista, najprije je potrebno uspostaviti temeljne vrijednosti od kojih se dalje procjenjuje stupanj varijacije. Obvezno se uzima u obzir stupanj razrjeđenja nativnog (izvornog) ekstrakta. Nativni ekstrakt predstavlja materijal koji se sastoji samo iz sastavnica koje su prisutne u izvornom biljnom materijalu ili koje se stvaraju tijekom postupka ekstrakcije, što isključuje bilo kakvu inaktivnu tvar ili bilo koju drugu dodanu sastavnicu. Pojam se odnosi na tekući ekstrakt ili polučvrsti ekstrakt iz kojega je odstranjeno dodano otapalo, ili pak na čvrsti ekstrakt koji se sastoji samo od sastavnica izvorne biljke.

U svrhu procjene sličnosti dvaju ekstrakata (izvornog/referentnog i ekstrakta koji je razmatran kao istovjetan), ukoliko je moguće i primjenjivo, koristi se klasičan pristup provjere ekvivalencije ekstrakata koji prikazuje shema na Slici 2.



Slika 2: Shematski prikaz – određivanje istovjetnosti dvaju ekstrakata [16].

Ukoliko nije primjenjiv spomenuti klasični pristup provjere ekvivalencije ekstrakata, usporedba dvaju ekstrakta u svrhu određivanja stupnja sličnosti mora uključiti kvalitativnu i kvantitativnu procjenu kromatografskih profila [16].

Kromatografskim *fingerprintom* smatra se kromatografski profil sirovog biljnog materijala, biljne droge ili biljnog pripravka koji se može uspoređivati s kromatografskim profilom referentnog uzorka ili standarda.

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

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

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

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

Interpretacija kromatografskih profila uključuje:

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

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

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

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

Ključnim pikovima/mrljama smatraju se oni koji su podložni degradaciji ili mogu biti indikativni kada se procjenjuje radi li se o krivotvorini. Pri određivanju ključnih pikova, ne smije se usredotočiti samo na određene skupine spojeva, primjerice flavonoide. Raspored, veličina i oblik dobivenih pikova koristi se za određivanje specifikacije za pojedini kromatografski *fingerprint*. Potrebno je uzeti u obzir omjer između pojedinih sastavnica prilikom postavljanja zahtjeva u specifikaciji, a ne se samo usredotočiti na koncentracije

pojedinačnih sastavnica. Predmetni omjeri često predstavljaju bolje indikatore kakvoće biljnog ekstrakta/droge, a navedeno je posebno značajno ukoliko je utvrđeno da više od jedne sastavnice nosi terapijsku aktivnost.

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

Preporučuje se postavljanje sljedećih granica prilikom pripreme specifikacije:

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

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

Iz svega navedenog može se zaključiti kako kromatografski *fingerprint* omogućuju korisne kvalitativne i kvantitativne informacije vezane uz specifične sastavnice ispitivanog biljnog materijala/proizvoda i samim time predstavljaju prikladan alat za kontrolu kakvoće biljnih proizvoda [13].

3.4. KEMOMETRIJSKI PRISTUP KONTROLI KAKVOĆE

Evaluacija *fingerprinta* ključan je dio procjene kakvoće biljnog materijala/proizvoda. Postoji mogućnost pojave pomaka retencijskih vremena između *fingerprinta* uslijed varijacija tijekom samog ispitivanja ili pak starenjem kromatografske kolone. Upravo zato je potrebna procjena kako bi se kod istih varijabli održale sinkronizirane informacije unutar svakog *fingerprinta*. Kada se dobiju *fingerprintovi*, primjenjuje se tehnika poravnanja pikova ili "warping" tehnika kojom se kompenziraju mali pomaci u retencijskim vremenima dobivenih pikova. Nakon toga, dobiveni podatci kemijskih *fingerprinta* trebaju biti standardizirani organizacijom u matrice podataka. Cilj je ovoga koraka postizanje relativnih proporcija podataka dobivenih *fingerprintom* (odabire se ili visina pika, ili površina ispod pika kako bi se izrazio intenzitet pika). Kromatografski pikovi koji su svojstveni svakom profilu obrađuju se kao referentni, a omjer visine pika/površine ispod pika ostalih pikova i referentnih pikova računa se za svaki uzorak. Nadalje se primjenjuju različite kemometrijske metode, kao što su analiza sličnosti, klasteriranje podataka i sl. Postupak evaluacije kemijskih *fingerprinta* biljnog materijala/proizvoda prikazan je na Slici 3.



Slika 3: Postupak evaluacije kemijskih *fingerprinta* biljnog materijala/proizvoda.

Sve se više kemometrijskih metoda primjenjuje kod procjene kakvoće biljnih proizvoda, s obzirom na to da se radi o vrlo kompleksnom materijalu za analizu, a dobiveni *fingerprintovi* sadrže složene informacije, uz mogućnost malih razlika koje se javljaju uslijed razlike u koncentracijama i sl. Analiza sličnosti jedna je od najstarijih metoda kojom se procjenjuje ekvivalencija (istovjetnost) biljnih *fingerprinta*, a temelji se na pristupu procjene pika prema piku. Na taj se način procjenjuje veza dobivenog *fingerprinta* prema *fingerprintu* određenog referentnog standarda. Sličnost *fingerprinta* može se procijeniti pomoću mnogih metoda, uključujući koeficijent podudarnosti, koeficijent korelacije, koeficijent udaljenosti i dr. Za procjenu sličnosti potreban je referentni *fingerprint*, no u mnogim slučajevima problem

predstavlja činjenica da biljni uzorci koji se odabiru za snimanje referentnog *fingerprinta* nemaju dokazanu najveću djelotvornost (koristi se dostupan materijal) te se kao dodatan problem pojavljuje i često postavljani subjektivan prag za prosudbu kakvoće.

4. RASPRAVA



Kako je rasprostranjenost biljnih proizvoda iznimno visoka diljem svijeta, provjera njihove kakvoće, djelotvornosti i sigurnost primjene predstavljaju veliki izazov [3]. U posljednjem desetljeću uložen je ogroman trud kako bi se kakvoća biljnih proizvoda podigla na višu razinu, kao i u razvoj prikladnih metoda koje osiguravaju njihovu kvalitetu. Danas se kromatografski *fingerprint* smatra općeprihvaćenom tehnikom za provjeru kakvoće polaznih biljnih tvari i gotovih biljnih proizvoda. Kako bi se lakše interpretirali i obradili podatci dobiveni takvim ispitivanjem, koriste se kemometrijske metode koje predstavljaju koristan alat za obradu i razumijevanje velike količine dobivenih podataka. Zapadne zemlje oslanjaju se na biljne izvore radi njihove dostupnosti i isplativosti, a biljke koriste kao izvore novih farmakološki aktivnih tvari [17, 18] i koriste ih za izolaciju sastavnica, primjerice digoksina, morfina, taksola, atropina i vinblastina, koji se danas koriste u alopatskoj medicini [19-23]. Kako djelotvornost i sama kakvoća biljnog proizvoda ovise o koncentraciji biološki aktivnih sastavnica, prikladna kontrola kakvoće je od iznimne važnosti. Varijabilnost u sastavnicama biljnog materijala ovisi o brojnim čimbenicima (klima, uvjeti kultivacije biljke, vrijeme sabiranja, sušenje, čuvanje i sl.) i posljedično može predstavljati rizik za zdravlje i sigurnost pacijenta [24-28].

Brojne farmakopeje donose monografije polaznih biljnih materijala, primjerice Ph. Eur., Američka farmakopeja (USP), Kineska farmakopeja (ChP), koje omogućavaju kontrolu kakvoće provedenu temeljem makroskopskih i mikroskopskih karakteristika te ispitivanjem prikladnih biljega. No, kontrola kakvoće temeljena samo na ispitivanju kemijskih biljega nije uvijek stvaran odraz kakvoće biljnog proizvoda. Iz navedenog razloga, WHO je prihvatila *fingerprint* kao metodologiju provjere kakvoće kompleksnih biljnih uzoraka [5]. *Fingerprint* predstavlja karakterističan profil koji je odraz složenog kemijskog sastava ispitivanog uzorka, a dobiva se pomoću spektroskopskih, kromatografskih ili elektroforetskih tehnika. Prilikom interpretacije dobivenog kemijskog *fingerprinta* koriste se različiti pristupi – "pristup temeljen

na određenoj sastavnici/sastavnicama" i "pristup koji se temelji na informacijama koje pruža kompletan fingerprint" [29].

Općenito možemo reći da se kontrola kakvoće biljnog uzorka zasniva na tri farmakopejska zahtjeva [27]:

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

Sadržaj je parametar koji se vrlo teško određuje kod biljnog materijala s obzirom na to da većina biljnih droga nema poznate sastavnice koje su nositelji terapijske aktivnosti. Iz tog se razloga često koriste kemijski markeri bez obzira jesu li oni nositelji biološke aktivnosti u organizmu ili ne. Najvažniji korak u ispitivanju kakvoće biljnih droga jest ispravna identifikacija [28].

Do nedugo se provjera kakvoće biljnih ekstrakata temeljila na određivanju koncentracije jedne ili nekoliko farmakološki aktivnih sastavnica ili pak kemijskih biljega. U mnogim slučajevima, određeni markeri ili sastavnice nisu jedinstveni za određenu biljnu vrstu. Primjerice, Z-lingustilid predstavlja djelatnu komponentu korijena vrste *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels i koristi se kao biljeg za identifikaciju te biljne droge [30]. No, ta je sastavnica prisutna i kod drugih biljnih droga, npr. Radix Ligustici chuanxiong [31]. Iz navedenog razloga, kao i činjenice da se kod takvog pristupa zanemaruje učinak ostalih komponenata na sigurnost i učinkovitost biljnih pripravaka, takav se pristup provjeri kakvoće ne smatra najprikladnijim. Štoviše, djelotvornost nekih biljnih droga ne pripisuje se samo jednoj sastavnici, već specifičnoj kombinaciji više njih. Najpoznatiji primjeri su vrste *Echinacea purpurea* (L.)Moench. [32] i *Hypericum perforatum* L. [33]. Kompletan kemijski profil određenog biljnog pripravka potreban je kako bi se osigurala pouzdanost i ponovljivost

djelovanja koje je dokazano kroz provedene kliničke i farmakološke studije. Podudarni kemijski profil ispitivanog pripravka s kemijskim profilom referentnog pripravka u provedenoj studiji daje pretpostavku da će primjena ispitivanog pripravka ostvariti željeni učinak. Na opisanom načelu temelji se koncept fitoekvivalencije kojim se nastoji osigurati konzistentna kakvoća biljnih proizvoda prisutnih na tržištu [34].

Sam princip *fingerprint* analize obuhvaća nekoliko pristupa:

- "pristup temeljen na određenoj sastavnici/sastavnicama" – određuje se koncentracija jedne ili nekoliko sastavnica koje su karakteristične za određenu biljnu drogu/pripravak – takav pristup identifikaciji smatra se najjednostavnijom *fingerprint* analizom koja je daleko od zadovoljavajućeg ispitivanja složenog sastava biljne droge/pripravka.
- "pristup temeljen na informacijama koje pruža većina sastavnica ili sve identificirane sastavnice" – takav pristup primjenjuje se i kod drugih kompleksnih sustava, osim biljnih uzoraka; tako je, primjerice, u studiji autora Cotte i sur. [35] uspješno identificiran krivotvoreni med, u koji je dodan komercijalni zaslađivač, od čistog izvornog meda.
- "pristup temeljen na uzorcima/šablonama" – pristup uzima u obzir kompletan *fingerprint*, cijeli spektar kao jednu cjelinu; prednost primjene takvog pristupa je činjenica da se kod kompleksnih uzoraka na taj način izbjegava subjektivan odabir parametara/sastavnica za interpretaciju i njihova pojedinačna integracija; kako bi se potvrdila identifikacija i odredila kakvoća, koristi se kompletan kemijski *fingerprint* koji se uspoređuje sa standardom. Kina nije jedina država koja je prihvatila spomenuti pristup u određivanju kakvoće biljnih proizvoda; također, regulatorne agencije drugih zemalja prihvaćaju i preporučuju upotrebu kemijskog *fingerprinta* u nekoj fazi

registracije biljnih lijekova, kao i u završnoj provjeri kakvoće svake serije – FDA [36], EMA [37] i dr.

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

Jiao He, Xiaoxue Wu i Yali Kuang [38] u istraživanju iz 2016. Opisuju postupak provjere kakvoće biljne droge cvijeta vrste *Chrysanthemum indicum* L. određivanjem koncentracije 6 glavnih sastavnica pomoću HPLC *fingerprint* analize. Kvantitativno je određeno šest glavnih sastavnica spomenute biljne droge (dva flavonoida i četiri fenolne kiseline) pomoću linarina kao unutarnjeg referentnog standarda. Metoda ispitivanja kompletno je validirana; određivane su sljedeće validacijske značajke: linernost, preciznost, točnost, robustnost i stabilnost. Spomenutom su metodom analizirane 33 serije uzoraka biljne droge. Pod istim kromatografskim uvjetima provedena je i *fingerprint* analiza te su upotrijebljene kemometrijske metode (analiza sličnosti) kako bi se identificirali uzorci koji potječu iz različitih regija. Sama biljna droga koristi se u svrhu podizanja imuniteta, kod hipertenzije, različitih infekcija i sl. Sadrži nekoliko različitih skupina bioaktivnih tvari – eterična ulja, terpenoide, flavonoide i fenolne kiseline [39, 40].

Xu Xiao-na i Jiang Jun-hui razvili su učinkovitu metodu ispitivanja kakvoće biljne droge – Fructus Aurantii immaturus koji se primjenjuje u tradicionalnoj kineskoj medicini (TCM) [41]. Razvijena je jednostavna HPLC-DAD metoda ispitivanja kojom je dobiven kromatografski *fingerprint* te je omogućena kvalitativna i kvantitativna analiza. Određene su dvije bioaktivne sastavnice – hesperidin i naringin. Iz dobivenog *fingerprinta*, podatci su

obrađeni primjenom korelacijskih koeficijenata za kvantitativno izražavanje njihovih sličnosti ili razlika. Razvijena metoda ispitivanja može se koristiti za procjenu kakvoće predmetne biljne droge. Najvažnije bioaktivne sastavnice koje se nalaze u spomenutoj drogi su flavonoidi (hesperidin i naringin koji su i kvantitativno određivani) te alkaloidi i eterična ulja [42, 43]. Hesperidin, naringin i sinefrin često se koriste kao kemijski biljezi za procjenu kakvoće [44, 45]. U studiji je ispitano 12 uzoraka. Dobiveni *fingerprint* pokazuje 28 karakterističnih pikova, a pomoću analize sličnosti procijenjeno je kako između njih postoji korelacija, odnosno svi potječu od iste biljne droge (odgovarajuća identifikacija).

U studiji provedenoj od strane Xiaoye He i Jianke Li [46] razvijena je i validirana pouzdana HPLC *fingerprint* metoda za provjeru kakvoće i identifikaciju Ziyang zelenog čaja. Kemijski sastav spomenutog čaja uključuje polifenole, alkaloide (kofein, teofilin i teobromin), aminokiseline, ugljikohidrate, proteine, klorofil, hlapljive komponente, minerale i druge spojeve [47]. Unatoč složenom sastavu, polifenoli predstavljaju najzanimljiviju skupinu spojeva i glavni su nosioci biološke aktivnosti zelenog čaja [48]. Skupljeno je 10 serija zelenog čaja s različitih plantaža i na uzorcima su razvijeni kromatografski *fingerprintovi*. Oni su međusobno uspoređeni koristeći profesionalni analitički softver. Sličnost za svaki od *fingerprinta* bila je viša od 0,981. Dodatno je kvantificirano 10 glavnih bioaktivnih sastavnica u uzorcima zelenog čaja kako bi se potvrdila njegova kakvoća. Utvrđeno je kako svi uzorci predstavljaju zeleni čaj, međutim, postoje manje razlike u količinama sastavnica, ovisno o plantaži na kojoj je pojedini uzorak kultiviran. Zaključeno je kako je predmetna metoda kromatografskog *fingerprinta* u kombinaciji s analizom sličnosti i kvantitativnim određivanjem bioaktivnih sastavnica uspješan pristup za identifikaciju i provjeru kakvoće Ziyang zelenog čaja.

Metoda kemijskog *fingerprinta* ne koristi se samo za identifikaciju i provjeru kakvoće pojedinih biljnih droga i jednostavnih uzoraka, već je taj pristup iznimno koristan i u provjeri

kakvoće složenih biljnih proizvoda (biljnih lijekova, dodataka prehrani i sl.) koji mogu sadržavati više od jedne biljne vrste u svom sastavu i samim time je njihova provjera kakvoće još veći izazov.

Studija koju su proveli Shuangqin Wang i Jingjing Zhang [49] pokazuje kako je pomoću kromatografskog *fingerprinta*, u kombinaciji s kvantitativnim određivanjem glavnih bioaktivnih sastavnica, moguće napraviti provjeru kakvoće gotovog biljnog proizvoda – Huaijiao pilula. Proizvod spada u TCM i koristi se za tretiranje hemotohezije, edema kod hemeroida, hipertenzije, kroničnog faringitisa, akni i dr. [50, 51]. Razvijena je HPLC-DAD metoda ispitivanja, kojom je analizirano 17 uzoraka različitih serija triju proizvođača. U dobivenim kromatografskim *fingerprintima* selektirano je 16 karakterističnih pikova za predmetni proizvod na temelju kojih je procjenjivana sličnost pojedinih uzoraka. Sličnosti za pojedinačne uzorke bile su više od 0,966, što upućuje da su oni uglavnom konzistentni, bez obzira na različite serije i različite proizvođače. Dodatno je provedena kvantifikacija 7 bioaktivnih sastavnica (soforikozida, bajkalina, naringina, genisteina, rutina, kvercetina, i 5-o-metilvizamiozida). Ovo je studija pokazala kako je koncentracija 6 sastavnica ujednačena između pojedinih serija istog proizvođača (osim 5-o-metilvizamiozida), ali su se koncentracije navedenih sastavnica značajno razlikovale između različitih proizvođača gotovog proizvoda. Metoda je prihvaćena kao dobar alat za provjeru kakvoće predmetnog proizvoda.

U nastavku je detaljniji prikaz triju studija (polazni biljni materijali i složeni, gotov biljni proizvod) na kojima je moguće vidjeti način i metodologiju razvoja metode kemijskog *fingerprinta*, kombinaciju kvantitativnog određivanja pojedinih sastavnica i kemijskog *fingerprinta* te korištenje kemometrijskih metoda za tumačenje dobivenih rezultata.

4.1. PRIMJERI ISPITIVANJA KAKVOĆE BILJNIH PROIZVODA POMOĆU KROMATOGRAFSKOG *FINGERPRINTA*

4.1.1. Uloga kemijskog *fingerprinta*: primjena na vrstama roda *Ephedra* [52]

Ephedra sinica Stapf., također poznata i po nazivu *Ma Huang*, spada u jednu od najstarijih biljaka koje se koriste u tradicionalnoj kineskoj medicini (TCM). Uglavnom se primjenjuje u obliku čajeva kao stimulans i antiastmatik [53]. U zapadnjačkoj se medicini koriste ekstrakti vrsta *E. sinica*, *E. intermedia* Schrenk. ex C. A. Mey i *E. equisetina* Bunge., najčešće u obliku dodataka prehrani u svrhu smanjenja težine te radi njihova stimulativnog djelovanja (Slika 4)



Slika 4: Biljna vrsta *Ephedra sinica* Stapf., *Ephedraceae*.

Važno je napomenuti kako su zabilježeni brojni slučajevi ozbiljnih nuspojava povezani s primjenom proizvoda koji su sadržavali efedrin, od kojih su neki uključivali i smrtni ishod (srčani udar). Radi navedenoga, u Europskoj uniji zaključeno je Uredbom Komisije (EU) 2015/403 od 11. ožujka 2015. o izmjeni Priloga III. Uredbi (EZ) br. 1925/2006 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu vrste *Ephedra sinica*, kako s obzirom na znatnu zabrinutost za sigurnost u vezi s uporabom te biljne vrste i njezinih pripravaka u hrani (pogotovo vezano na izlaganje *Ephedra* alkaloidima koji su prisutni u dodacima prehrani), i s obzirom na to da se

ne može odrediti dnevni unos *Ephedra* pripravaka koji ne bi izazivao zabrinutost za zdravlje ljudi, potrebno je zabraniti njihovu uporabu u hrani. Stoga je vrsta *E. sinica* uključena u Prilog III. dio A Uredbe (EZ) br. 1925/2006. Prilog III. predstavlja Listu biljnih vrsta koje su zabranjene u hrani i dodacima prehrani [54].

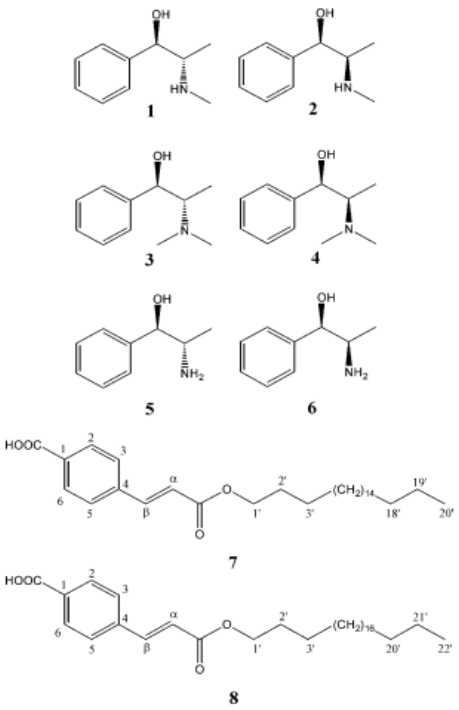
No, kako se predmetna droga još uvijek koristi, posebno na istoku u obliku čajeva, obrađena studija imala je za cilj pokazati na koji se način provodi identifikacija i procjena kakvoće biljnog materijala. Za razvoj kemijskog *fingerprinta* u predmetnoj studiji [52] korištena je metoda reverzno-fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (RpHPLC) s PDA detektorom. Na dobivenim kromatogramima, pri valnoj duljini od 320 nm, određena su dva područja koja su korištena za usporedbu različitih kromatograma. Serija razvijenih pikova između 52. i 64. minute potvrđuje kako se radi o vrsti *E. sinica*. Prema razvijenim pikovima također se može utvrditi podneblje na kojem je biljka kultivirana (Sjeverna Amerika, Južna Amerika, Europa ili Azija). Utvrđeno je kako je metoda kemijskog *fingerprinta* odgovarajuća metoda za identifikaciju predmetne biljne droge.

Studija

Za kontrolu kakvoće biljnih proizvoda često se kao indikator koriste analitički biljezi, bez obzira što oni u većini slučajeva nisu nosioci terapijske djelotvornosti. Iako je navedena praksa uglavnom prihvatljiva, radi kompleksnosti biljnih proizvoda i, u većini slučajeva, nepoznavanja točnog nosioca terapijske djelotvornosti kao ni mehanizma djelovanja, važno je napomenuti kako prisutnost analitičkih biljega nije uvijek jamstvo da se u pripravku nalazi specificirana biljna droga. Proizvodi i pripravci često puta mogu biti krivotvoreni namjernim dodavanjem određenih kemijskih tvari. Kvantitativne metode određivanja specificiranih kemijskih biljega mogu potvrditi da su oni prisutni u biljnom materijalu, no nisu nužno garancija da se radi o biljnoj vrsti koja je deklarirana na pripravku/proizvodu.

Upravo je identifikacija/autentifikacija deklarirane biljne vrste/droge najvažniji čimbenik u procjeni radi li se o krivotvorini i općenito je važan čimbenik u prosudbi kakvoće biljnog materijala. Iz navedenog razloga, kemijski je *fingerprint* potrebno uključiti u procjenu kakvoće biljnog materijala koji se koristi u proizvodnji gotovog proizvoda kako bi se potvrdilo radi li se o izvornom biljnom materijalu ili patvorini.

Rod *Ephedra* ima preko 50 različitih vrsta koji spadaju u porodicu Ephedraceae [55]. Ozbiljne nuspojave koje su zabilježene vezane su uz optički aktivne alkaloide koje sadrže spomenute biljne vrste. Aktivni alkaloidi vrste *E. sinica (Ma Huang)* prikazani su na Slici 5.



Slika 5: Strukturne formule *Ephedra* alkaloida (1-6) i dviju novih tvari (7 i 8) izoliranih iz vrste *E. sinica*.

Koncentracija predmetnih alkaloida može varirati od 0,02 do 3,40% u nadzemnim dijelovima vrste *E. sinica*. Najviše je izomera (-)-efedrina (1). Ostali alkaloidi uključuju (+)-pseudoefedrin (2), (-)-metilefedrin (3), (+)-metilpseudoefedrin (4), (-)-norefedrin (5) i (+)-norpseudoefedrin (6). Farmakološke studije pokazale su kako (-)-efedrin djeluje

simpatomimetički (agonistički na α- i β-adrenergičke receptore, prilikom čega dolazi do ubrzanog srčanog pulsa, periferne vazokonstrikcije, bronhodilatacije i stimulacije središnjeg živčanog sustava (CNS) [56]. Upravo je iz navedenog razloga potreban oprez kod osoba koje pate od hipertenzije, kao i ostalih kardiovaskularnih bolesti.

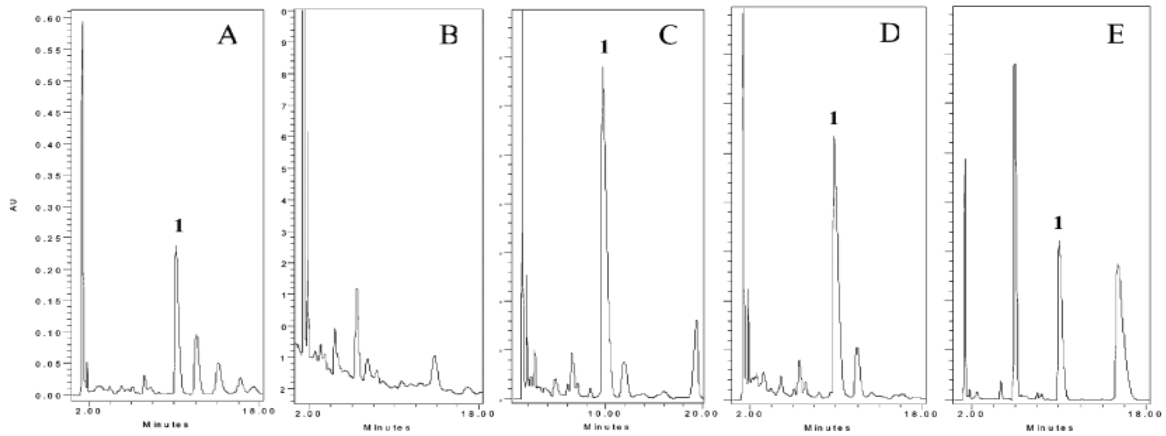
Iako je primarni izvor *Ephedra* alkaloida upravo *E. sinica*, i druge *Ephedra* vrste također sadrže te aktivne sastavnice (*E. equisetina, E. intermedia*, *E. gerardiana*, *E. fragilis, E. major, E. minuta, E. monosperma* i dr.).

Glavni problem opasnih nuspojava upravo je patvorenje biljnog materijala namjernim dodavanjem sintetičkih stimulansa ili pak sintetičkih *Ephedra* alkaloida. Upravo se metamfetamin vrlo lako sintetizira iz efedrina i često ga se može naći u proizvodima koji deklariraju u sadržaju vrstu *E. sinica* [57].

Sve metode kojima se danas određuje koncentracija *Ephedra* alkaloida prisutnih u pojedinim biljnim drogama vrsta roda *Ephedra* (plinska kromatografija [58], kapilarna elektroforeza [59], HPLC s UV detektorom [60] i dr.) limitirane su u pogledu potvrde identiteta biljne droge. Upravo je iz navedenog razloga razvijena HPLC metoda za razvoj kemijskog *fingerprinta* vrsta roda *Ephedra*.

Eksperimentalni dio

Uz pomoć metode kvantitativnog određivanja *Ephedra* alkaloida, analizirano je pet različitih biljnih uzoraka: vrsta *E. sinica* (A), vrsta *E. aspera* (B), dodatak prehrani za koji je deklarirano da sadrži samo vrstu *E. sinica* (C), dodatak prehrani za koji je deklarirano da sadrži vrstu *E. sinica* u sklopu smjese (D) i dodatak prehrani koji sadrži vrstu *Ginkgo biloba* u koji je dodan (-)-efedrin (E) (Slika 6).



Slika 6: HPLC kromatogrami dobiveni metodom za kvantitativnu analizu *Ephedra* alkaloida: ekstrakt vrste *E. sinica* (A), ekstrakt vrste *E. aspera* (B), dodatak prehrani za koji je deklarirano da sadrži samo vrstu *E. sinica* (C), dodatak prehrani za koji je deklarirano da sadrži vrstu *E. sinica* u sklopu smjese (D) i dodatak prehrani koji sadrži vrstu *Ginkgo biloba* u koji je dodan (-)-efedrin (E).

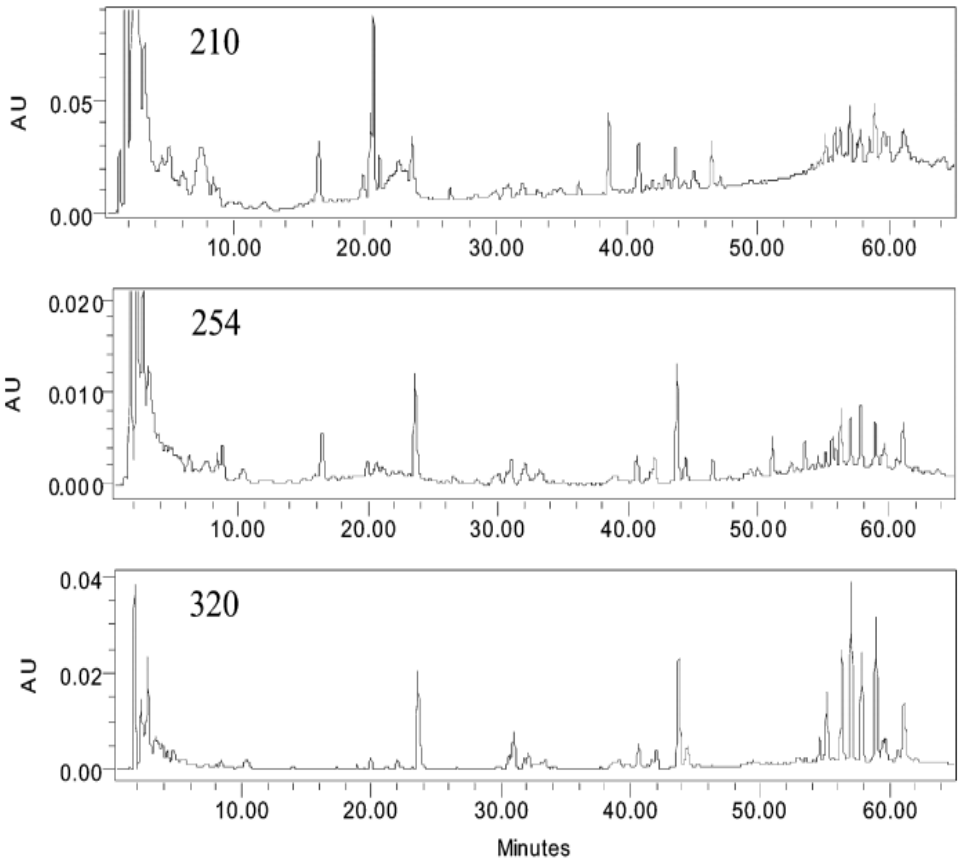
Na Slici 6. teško je raspoznati koji je uzorak zapravo pripada vrsti *Ginkgo biloba*, s obzirom na to da je u uzorak dodan (-)-efedrin i spomenuti je alkaloid vidljiv na kromatogramu. Isto tako, iz dobivenih kromatograma nije moguće zaključiti da kromatogram B pripada vrsti roda *Ephedra* s obzirom na to da na kromatogramu nedostaje pik efedrina.

Iako je predmetna metoda vrlo korisna za potrebe standardizacije *Ephedra* alkaloida u biljnim pripravcima, kako bi se osigurala njihova stalna kakvoća i potrebna koncentracija *Ephedra* alkaloida u preporučenoj dnevnoj dozi, metoda nije dostatna kako bi se njome potvrdila identifikacija same biljne vrste.

Proizvođači gotovih proizvoda uglavnom kupuju od dobavljača biljnu drogu, a nemaju metodu ispitivanja kojom bi se potvrdio identitet. Iako provode određivanje sadržaja *Ephedra* alkaloida, navedeno nije potvrda da se ne radi o patvorini.

Upravo se prikladnom metodom identifikacije može utvrditi radi li se zaista o vrsti roda *Ephedra* ili o nekom drugom biljnom materijalu kojemu je dodan sintetički efedrin, a predmetnom se metodom također mogu identificirati i različite vrste roda *Ephedra*.

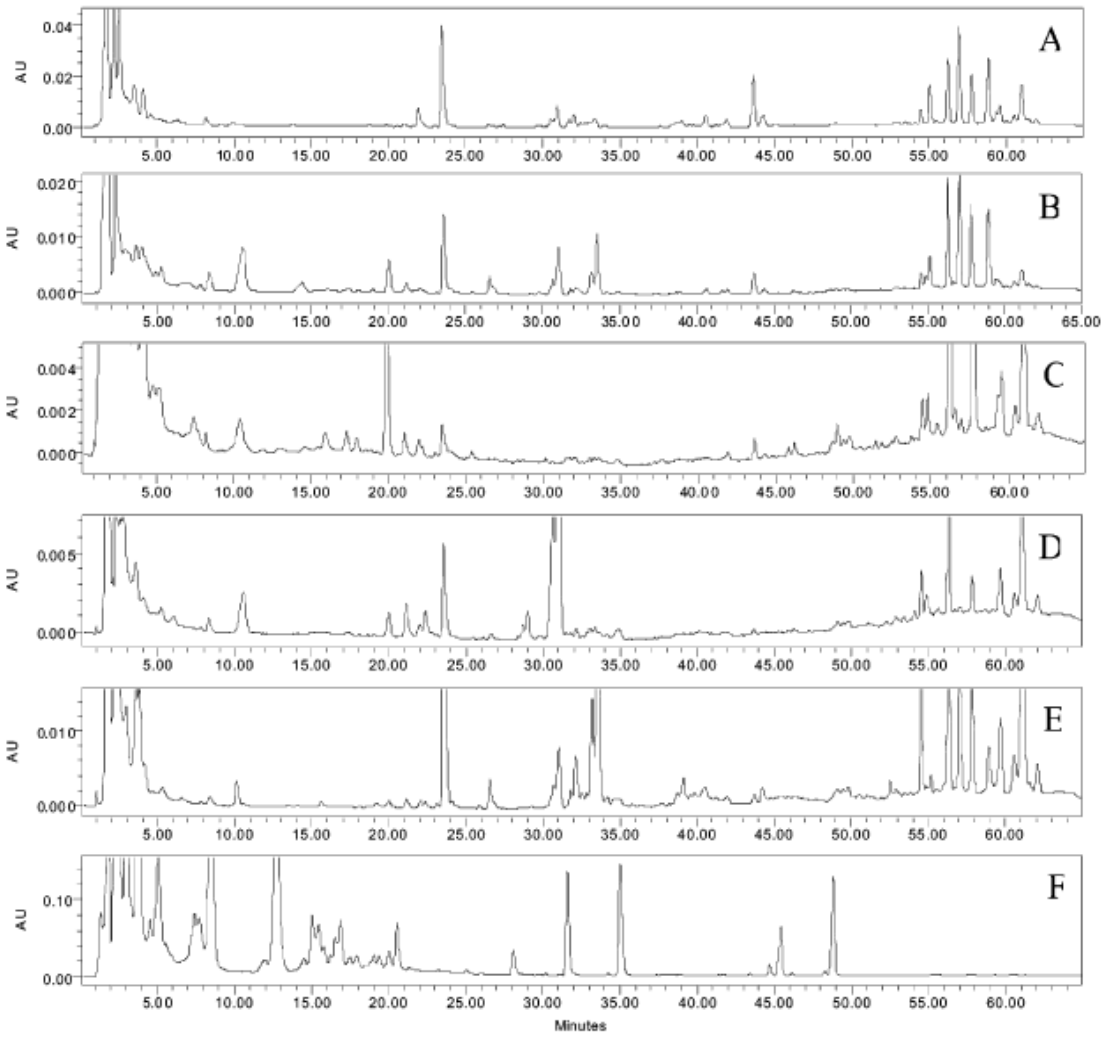
Razvoj kemijskog *fingerprinta* započet je ekstrakcijom izvorne biljne droge vrste *E. sinica* pomoću etanola. Dobiveni ekstrakt analiziran je na nekoliko stacionarnih faza gradijentnom metodom (95% voda/5% acetonitril do 100% acetonitril) u periodu od 1 sat. Detekcija je provedena na tri valne duljine: 210 nm, 254 nm i 320 nm. Bez obzira na isprobane stacionarne faze, nije bilo moguće postići razinu bazne linije. Problem je i dalje ostao i nakon što se varirao gradijent mobilnih faza. S obzirom na navedeni problem, odlučeno je da se ekstrakcija ponovi drugim otapalom te je u tu svrhu korišten aceton kao ekstrakcijsko otapalo i postignuti su optimalni HPLC uvjeti. Acetonski ekstrakt analiziran je na koloni Waters XTerra RP_{18} i postignuta je bazna linija te je postavljen optimalni gradijent mobilne faze. Utvrđeno je kako je najbolja detekcija postignuta pri valnoj duljini od 320 nm (Slika 7).



Slika 7: HPLC kromatogrami vrste *E. sinica* na valnim duljinama od 210 nm, 254 nm i 320 nm.

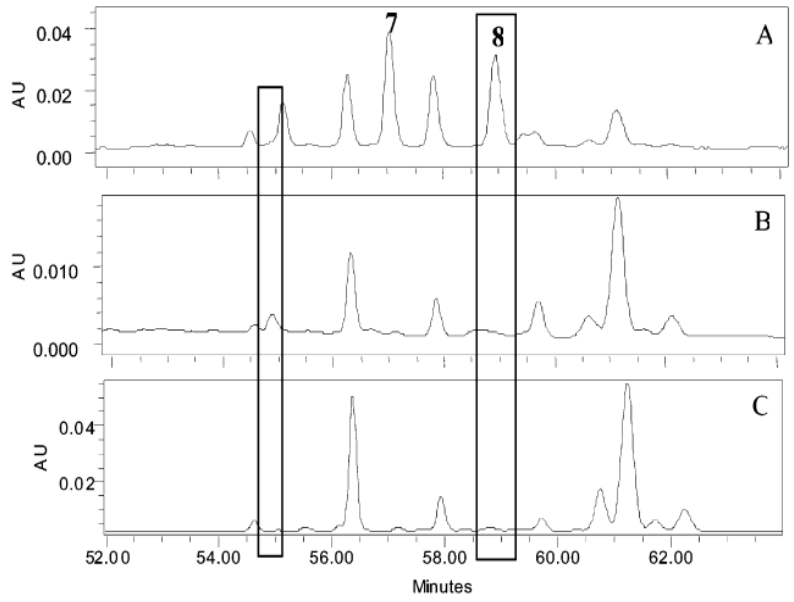
Nakon što je razvijena metoda kemijskog *fingerprinta* primjenom autentičnog uzorka biljne vrste *E. sinica,* bilo je potrebno ispitati i njenu primjenu u ostalih vrsta roda *Ephedra*. Za navedenu svrhu korišteni su uzorci sljedećih svojti: *E. antisyphilitica, E. aspera, E. californica, E. foeminea, E. coryi, E. cutleri, E. equisetina, E. fasciculata, E. nevadensis, E. pendunculata, E. torreyana ssp. powelliorum, E. torreyana, E. trifurca, E. distachya, E. distachya spp. helvetica, E. gerardiana, E. intermedia, E. major, E. ochreata, E. sinica i E. triandra*.

Na Slici 8 prikazani su kemijski *fingerprintovi* različitih *Ephedra* vrsta i kao 6. uzorak prikazan je uzorak ekstrakta vrste *Ginkgo biloba* u koji je dodan efedrin.



Slika 8: Usporedba HPLC kromatograma dobivenih detekcijom na valnoj duljini od 320 nm sljedećih uzoraka: *E. sinica* (A), *E. geradiana* (B), *E. nevadensis* (C), *E. fominea* (D), *E. distachya ssp. helvetica* (E), *G. biloba* s efedrinom (F).

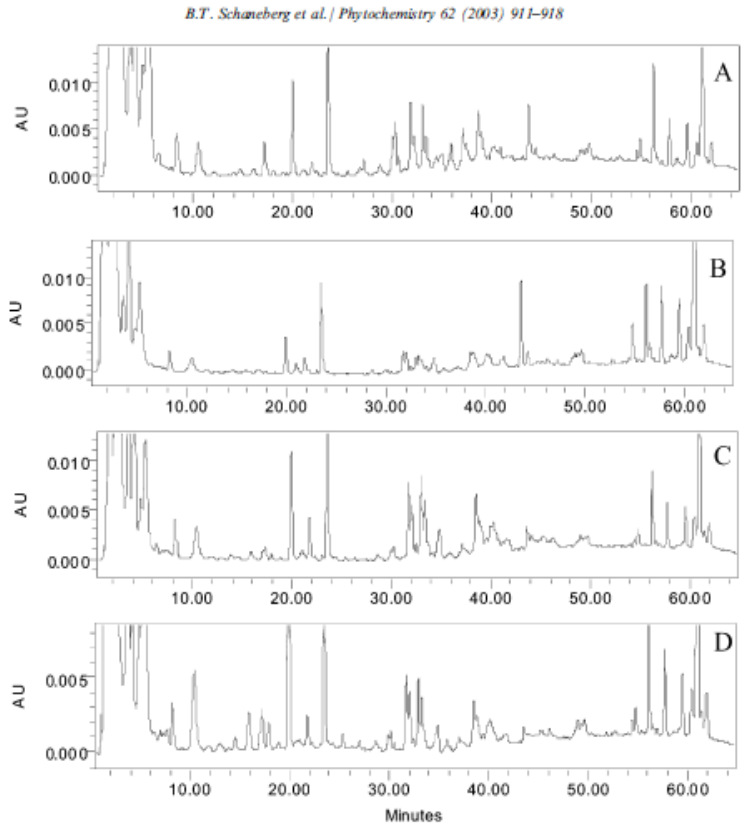
Tijekom identifikacije, fokus je bio na nizu pikova koji se razvijaju između 52. i 64. minute. Svi uzorci vrsta roda *Ephedra* pokazuju iste pikove u spomenutom vremenskom intervalu, uz manje varijacije. Predmetni pikovi nisu uočeni u uzorku broj 6. Navedeno upućuje kako se razvijenom metodom dobivaju *fingerprinti* kojima je moguće provesti identifikaciju vrsta roda *Ephedra*. Iz dobivenih *fingerprinta* također je moguće zaključiti potječe li biljni materijal iz Amerike, Europe ili Azije. Razlike su vidljive na Slici 9.



Slika 9: Usporedba HPLC kromatograma (područje u rasponu 52.-64. minute) sljedećih uzoraka: *E. sinica* s područja Euroazije (A), *E. trifurca* iz Sjeverne Amerike (B) i *E. ochreata* iz Južne Amerike (C).

Prikladnost razvijene *fingerprint* metode ispitana je na nekoliko uzoraka vrste *E. trifurca*. Područje identifikacije bilo je prisutno kod svakog uzorka (Slika 10).

Potrebno je također napomenuti kako su razvojem metode kemijskog HPLC *fingerprinta* izolirane dvije nove sastavnice iz biljne vrste *E. sinica* (Slika 5., supstancije 7 i 8).



Slika 10: HPLC kromatogrami uzoraka vrste *E. trifurca*.

Zaključak

Kako bi se osigurala odgovarajuća kakvoća biljnih proizvoda, ključno je imati prikladne analitičke metode za ispitivanje polaznog biljnog materijala. Prilikom nabave biljnih droga ili biljnih pripravaka od proizvođača, često ne postoji odgovarajuća dokumentacija koja bi bila dokaz autentičnosti biljnog materijala i time služila kao potvrda identifikacije. Poseban problem javlja se ako se kupuje usitnjena biljna droga ili biljni pripravak. Upravo je metoda kemijskog *fingerprinta* odgovarajući način ispitivanja kojim je moguće potvrditi autentičnost biljnog materijala i time osigurati prvi korak u osiguranju kakvoće biljnih proizvoda. Navedeno osigurava da na tržište ne dolaze proizvodi koji sadrže nedeklarirani biljni materijal u koji je dodana sintetička tvar, kao ni biljni materijal neprikladne kakvoće.

4.1.2. Analiza biljnih droga Gentianae Radix et Rhizoma pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) [61]

Biljna droga Gentianae Radix et Rhizoma (u Kini također nazivana i "Longdan" [62]) (Slika 11) uobičajeno se u tradicionalnoj kineskoj medicini (TCM) primjenjuje za suzbijanje i ublažavanje valova vrućine, te osjećaja žarenja u jetri i žućnom mjehuru.



Slika 11: Biljna droga *Gentianae Radix et Rhizoma*.

U ovoj je studiji prikazan razvoj HPLC metode koja se može koristiti za kvantitativno određivanje četiriju bioaktivnih sastavnica (loganska kiselina, svertiamarin, gentiopikrozid i sverozid), kao i za potrebe identifikacije same droge kemijskim *fingerprintom*.

U Kineskoj farmakopeji navodi se korijen i podanak (rizom) četiriju biljnih vrsta kao biljna droga pod nazivom "Longdan" (*Gentiana manshurica* Kitag., *G. scabra* Bge., *G. triflora* Pall. i *G. rigescens* Franch.). Prve se tri vrste uglavnom mogu pronaći na sjeveroistoku Kine pod nazivom "Guanlongdan", dok se četvrta uglavnom koristi na području jugozapadne Kine pod nazivom "Jianlongdan". Danas je poznato nekoliko sastavnica predmetne biljne droge koje mogu varirati unutar pojedinih uzoraka, ovisno o različitom podneblju na kojemu je sama biljka kultivirana, različitim klimatskim uvjetima te drugim faktorima [63]. Upravo je radi navedenih razlika teško održati konzistentnu kakvoću biljnog materijala/biljne droge.

Potrebna je dobra analitička metoda kojom se može osigurati odgovarajuća provjera kakvoće predmetne biljne droge. Razvijene su metode kemijskog *fingerprinta* koristeći različite tehnike – HPLC, HPTLC, GC i CE i sve su prepoznate kao brze, pouzdane i osjetljive za dobivanje željenih informacija u identifikaciji biljne droge [64, 65]. Najpopularnija i najraširenija je upravo HPLC tehnika za razvijanje različitih metoda dobivanja kemijskog *fingerprinta*.

U ovoj je studiji razvijena analitička metoda za potrebe kvantitativnog određivanja bioaktivnih sastavica kao i razvoja kemijskog *fingerprinta* biljne droge *Gentianae Radix et Rhizoma*. Ispitano je 20 uzoraka kako bi se provjerila njihova konzistentnost i kakvoća.

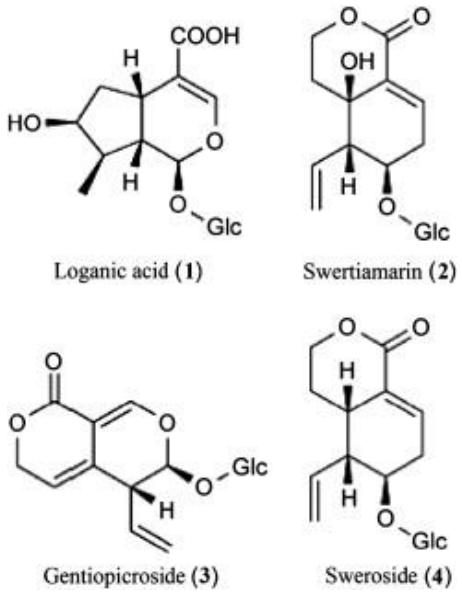
Matrijali i kemikalije

Tablica 1 prikazuje 20 ispitivanih uzoraka predmetne biljne droge iz različitih biljnih izvora i s različitih lokaliteta.

Tablica 1. Biljni materijal korišten u ispitivanju biljne droge *Gentianae Radix et Rhizoma*.

No.	Biljna vrsta	Izvor uzorka	Broj serije	Vrijeme sakupljanja	Podrijetlo
S1	*Gentiana rigescens*	Lufeng, Yunnan	070901	rujan, 2007.	samonikla
S2	*G. rigescens*	Dali, Yunnan	071001	listopad, 2007.	samonikla
S3	*G. rigescens*	Dali, Yunnan	111001	listopad, 2011.	samonikla
S4	*G. rigescens*	Dali, Yunnan	111002	listopad, 2011.	samonikla
S5	*G. rigescens*	Weishan, Yunnan	070902	rujan, 2007.	samonikla
S6	*G. rigescens*	Heqing, Yunnan	100901	rujan, 2010.	samonikla
S7	*G. rigescens*	Eryuan, Yunnan	100902	rujan, 2010.	samonikla
S8	*G. rigescens*	nepoznat	101001	listopad, 2010.	nepoznato
S9	*G. rigescens*	Yangbi, Yunnan	111003	listopad, 2011.	samonikla
S10	*G. rigescens*	Yangbi, Yunnan	111004	listopad, 2011.	samonikla
S11	*G. rigescens*	Longyang, Yunnan	111005	listopad, 2011.	samonikla
S12	*G. rigescens*	Luliang, Yunnan	111006	listopad, 2011.	samonikla
S13	*G. rigescens*	Tonghai, Yunan	070903	rujan, 2007.	samonikla
S14	*G. rigescens*	Yingjiang, Yunnan	111007	listopad, 2011.	samonikla
S15	*G. rigescens*	Xichang, Sichuan	111008	listopad, 2011.	samonikla
S16	*G. rigescens*	Lincang, Yunnan	111009	listopad, 2011.	uzgojena
S17	*G. rigescens*	Yunxian, Yunnan	111010	listopad, 2011.	uzgojena
S18	*G. scabra*	nepoznat	111011	listopad, 2011.	uzgojena
S19	*G. scabra*	Qingyuan, Liaoning	111012	listopad, 2011.	uzgojena
S20	*G. scabra*	Qingyuan, Liaoning	111013	listopad, 2011.	uzgojena

Korišteni su standardi loganske kiseline, svertiamarina, gentiopikrozida i sverozida stupnja čistoće 98%, određeno HPLC metodom (Slika 12).



Slika 12: Kemijske strukture ispitivanih sastavnica.

Ispitivanje je provedeno na HPLC uređaju Agilent 1200, DAD detekcija, kolona Agilent Zorbax SB C_{18} (4,6 mm×250 mmx, 5 μm) na 25˚C. Primijenjena je gradijentna metoda – uz mobilne faze A (metanol) i B (0,1%-tna fosfatna kiselina). Gradijentni program bio je sljedeći: 0.-4. min (25% A), 4.-10. min (25-35% A) i 10.-20. min (35-40% A). Mjerena je apsorbancija na UV-238 nm, uz protok otapala 1,0 mL/min i volumen injektiranja od 5 μL.

Uzorci su pripremljeni na način da je sirova droga usitnjena u praškasti oblik i sušena na 30˚C do konstantne mase. Odvagano je po 0,5 g od svakog usitnjenog uzorka, dodano 15 mL 50%-tnog metanola (*V/V*). Napravljene su točne odvage svakog, na opisani način pripremljenog uzorka, i stavljeni u ultrazvučnu kupelj na 60˚C 60 minuta. Po hlađenju uzoraka, dodano im je po 50 mL metanola, kako bi se nadoknadio gubitak tijekom postupka ekstrakcije, te je otopina

filtrirana. Filtrat je ponovo filtriran kroz 0,45 μm membranski filtar i postavljen na injektiranje u HPLC uređaj.

Metanolne otopine standarda sadržavale su četiri sastavnice: logansku kiselinu, svertiamarin, gentiopikrozid i sverozid. Otopine su pripremljene u 8 različitih koncentracija kako bi se mogle pripremiti kalibracijske krivulje u različitom rasponima. Sve pripremljene otopine standarda čuvane su u hladnjaku na temperaturi od 4˚C i temperirane na sobnu temperaturu prije provođenja analize.

Statistička analiza dobivenih podataka provedena je primjenom analize sličnosti ("similarity analyis", SA) uz pomoć posebnog softvera (version 2004 A), razvijenog i odobrenog od strane Povjerenstva kineske farmakopeje (Chinese Pharmacopoeia Committtee). Izračunati su koeficijenti korelacije za kompletne kromatografske profile svakog uzorka te je izračunat i prikazan kromatogram koji simulira dobivene prosječne vrijednosti.

Validacija

Prilikom validacije razvijene analitičke metode određivani su sljedeći parametri: linearnost, limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), preciznost, ponovljivost i obnovljivost. Linearnost je određena upotrebom otopina standarda (loganska kiselina, svertiamarin, gentiopikrozid i sverozid). Pripremljene su različite koncentracije otopina standarda, a kalibracijska krivulja pripremljena je na način da su u graf unošene točke koje su predstavljale odnos površine ispod dobivenog pika (y) i koncentracije pripremljene otopine standarda (x, mg/mL). Koncentracije su izražene pomoću formule koja je prikazana u Tablici 2.

Tablica 2: Validacijske značajke razvijene metode.

Kemijski biljeg	Kalibracijska krivulja[a]	R^2	Linearni raspon (µg/mL)	LOQ[b] (µg/mL)	LOD[c] (µg/mL)
Loganska kiselina	y=7109,0x−10,724	0,9999	24,82–1135,00	12,40	3,72
Svertiamarin	y=6778,7x−3,9429	0,9998	11,81–540,00	7,09	3,60
Gentiopikrozid	y=3993,1x−63,738	0,9987	49,00–5160,00	14,70	2,45
Sverozid	y=5792,5x−10,813	0,9999	14,11–645,00	8,47	2,11

a Kalibracijska krivulja dobivena je iz odnosa površine ispod dobivenog pika (y) i koncentracije svakog analita (x, mg/mL);
b LOQ – limit kvantifikacije;
c LOD – limit detekcije.

Sve dobivene kalibracijske krivulje pokazale su dobru linearnu regresiju unutar ispitivanog područja ($R^2 \geq 0,9987$). Limiti detekcije i kvantifikacije određeni su na način da su injektirane otopine standarda (referentne otopine) dok se nije postigao odgovarajući omjer signala i šuma ("signal-to-noise ratio", S/N) za svaku ispitivanu sastavnicu – vrijednost 3 za LOD i vrijednost 10 za LOQ (manje od 3,72, odnosno 14,70 µg/mL).

Preciznost metode ispitivanja određena je na način da su određivane varijacije unutar jednog dana i unutar nekoliko dana (*intra-day* i *inter-day*). Analiziran je isti uzorak 6 puta unutar istog dana u periodu od tri uzastopna dana. RSD vrijednosti retencijskih vremena i površina ispod pikova za četiri ispitivane sastavnice u promatranim *intra-day* i *inter-day* varijacijama bile su manje od 2,99%.

Kako bi se potvrdila ponovljivost metode ispitivanja, analizirano je 6 zasebno pripremljenih otopina istog uzorka. Dobivene RSD vrijednosti za retencijsko vrijeme i površine ispod pikova bile su manje od 0,42% i 2,48%.

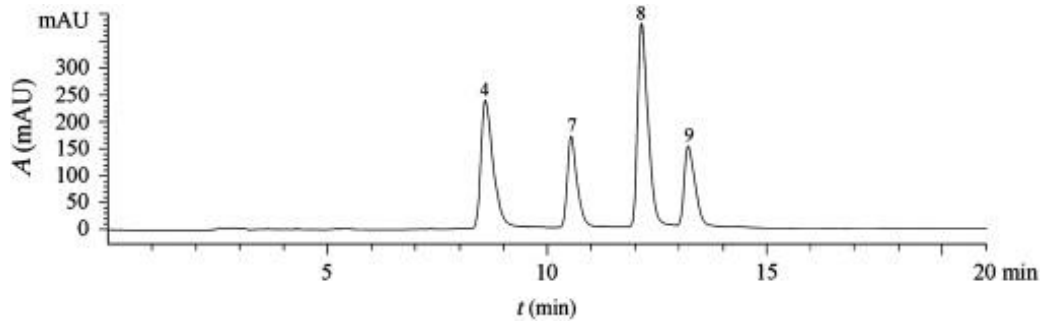
Određena je i stabilnost otopina uzorka – 48 sati. Navedeno je određeno ispitivanjem čuvanja otopina uzoraka na sobnoj temperaturi u intervalima od 0, 2, 4, 8, 12, 24 i 48 sati. Dobiveni RSD bio je manji od 1,34%.

Kako bi se odredila točnost metode, korišten je *recovery* test (analitički prinos, R). Uzorcima su dodani standardi četiriju sastavnica (*spiking*), te je nakon toga provedena ekstrakcija, obrada i kvantifikacija u skladu s razvijenom metodom ispitivanja. Prosječni analitički prinos za četiri ispitivane sastavnice iznosio je 97,61-102,49%, s RSD manjim od 2,63%.

Svi provedeni parametri validacije pokazali su kako je metoda ispitivanja i uvjeti koji su u njoj propisani prikladna za kvantitativno određivanje ispitivanih sastavnica.

Analiza biljnih uzoraka

Razvijena metoda ispitivanja korištena je za određivanje četiriju bioaktivnih sastavnica (loganska kiselina, svertiamarin, gentiopikrozid i sverozid) u 20 uzoraka ispitivanog biljnog materijala. Analizirane sastavnice određene su na načine da su uspoređena retencijska vremena i UV-spektri s onima koji su dobiveni za referentne standarde. Reprezentativni HPLC kromatogram otopine standarda prikazan je na Slici 13.



Slika 13: HPLC profil za četiri ispitivane sastavnice (standarda); pikovi označeni brojevima 4, 7, 8 i 9 označavaju redom logansku kiselinu, svertiamarin, gentiopikrozid i sverozid.

U Tablici 3 prikazane su izračunate srednje vrijednosti dobivene trostrukom analizom za svaki uzorak. Ukupna koncentracija četiriju ispitivanih sastavnica varirala je od 0,84% do 15,69%. Najviše su bile zastupljene loganska kiselina i gentiopikrozid.

Tablica 3: Sadržaj (%) četiri ispitivane sastavnice biljne droge *Gentianae Radix et Rhizoma* (dvadeset serija) i sličnost *fingerprinta*.

No.	Sadržaj (%)				Ukupni sadržaj (%)	Sličnost
	Loganska kiselina	Svertiamarin	Gentiopikrozid	Sverozid		
S1	0,69	0,08	2,80	0,13	3,70	0,971
S2	0,51	0,09	3,51	0,06	4,18	0,989
S3	1,41	0,29	13,72	0,27	15,69	0,997
S4	0,74	0,26	10,81	0,18	12,00	0,994
S5	0,53	0,13	3,89	0,16	4,71	0,996
S6	0,78	0,12	4,03	1,16	6,10	0,990
S7	0,71	0,25	7,48	0,19	8,62	0,999
S8	0,28	ND	2,71	ND	2,99	0,945
S9	0,60	0,24	9,80	0,28	10,91	0,990
S10	0,20	0,14	5,66	0,13	6,13	0,989
S11	1,16	0,32	13,08	0,26	14,81	0,996
S12	0,64	0,17	3,41	0,15	4,37	0,980
S13	0,14	0,06	2,82	0,09	3,11	0,980
S14	0,60	0,14	4,97	0,13	5,84	0,997
S15	0,25	0,04	0,55	ND	0,84	0,735
S16	0,38	0,12	2,79	0,11	3,40	0,979
S17	0,66	0,14	4,62	0,10	5,52	0,996
S18	1,02	0,31	5,91	0,23	7,46	0,988
S19	0,18	ND	1,12	0,05	1,35	0,908
S20	0,22	0,03	2,29	0,09	2,63	0,920

ND: nije detektirano.

Analizom su ustanovljene očigledne varijacije koncentracija svake ispitivane sastavnice u 20 analiziranih biljnih uzoraka. Usporedbom dobivenih koncentracija s koncentracijama ispitivanih sastavnica koje su propisane za predmetnu biljnu drogu prema Kineskoj farmakopeji (izdanje iz 2010., *G. rigescens*: 1,5%; *G. scabra*: 3,0%, w/w sadržaj

gentiopikrozida), ustanovljena su tri nezadovoljavajuća uzorka (15% od ukupnog broja uzoraka): S15, S19 i S20 spadaju u uzorke koji ne udovoljavaju zahtjevima Kineske farmakopeje. Na razlike u sadržaju kemijskih sastavnica utječe podrijetlo biljnog materijala (različite biljne vrste istog roda) te varijacije u okolišnim uvjetima u kojima su biljke samoniklo rasle ili kultivirane (npr. geografska lokacija i klima). Kako bi se postigla ujednačena kakvoća u sastavu biljnih droga, potrebno je provoditi odgovarajuću kontrolu kakvoće, kao i samu kultivaciju ljekovitog bilja u skladu sa smjernicama dobre agronomske i sakupljačke prakse. Na dva uzorka (S16 i S17) moguće je vidjeti kako je sadržaj gentiopikrozida >1,5%, što je postignuto dobrom kultivacijom biljne vrste *G. rigescens* u pokrajini Yunnan, čime su se uspjeli zadovoljiti zahtjevi Kineske farmakopeje (izdanje iz 2010.).

Validacija metode za razvoj *fingerprinta*

U svrhu razvoja referentnog *fingerprinta*, provedeno je ispitivanje dvadeset serija biljne droge *Gentianae Radix et Rhizoma* s različitih područja. Nakon toga, svi dobiveni rezultati obrađeni su pomoću posebnog softvera (The Unscrambler X 10.1 od Camo AS, Trondheim, Norveška).

Kako bi se odredila preciznost uređaja, isti je uzorak (S7) injektiran šest puta uzastopno te su izračunati koeficijenti korelacije između referentnog HPLC *fingerprinta* i *fingerprinta* dobivenih analizom odabranog uzorka. Redom su dobivene sljedeće vrijednosti: 0,999; 1; 1; 0,999; 1 i 1. Navedeni rezultati upućuju na zadovoljavajuću preciznost uređaja.

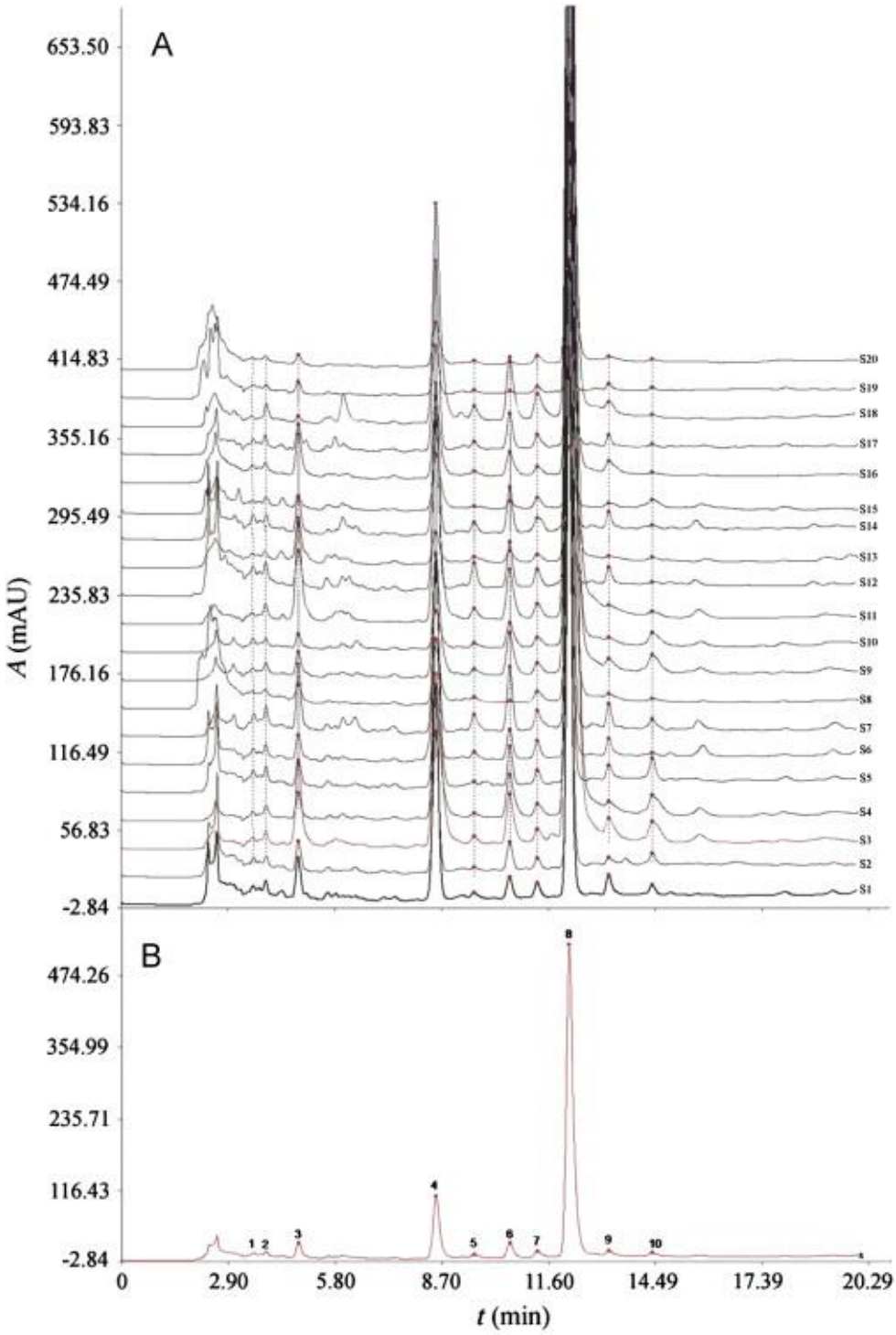
U svrhu određivanja stabilnosti otopine uzorka, sedam je puta injektiran uzorak u različitim intervalima čuvanja (0, 2, 4, 8, 12, 24 i 48 sati). Dobivene su sljedeće vrijednosti koeficijenta korelacije: 1; 0,999; 1; 1; 1; 0,999 i 1, što upućuje na to da je otopina uzorka stabilna u ispitivanim intervalima.

Ponovljivost metode ispitana je na način da je pripremljeno 6 otopina istog uzorka i pojedinačno injektirano. Dobivene su sljedeće vrijednosti koeficijenta korelacije: 1; 1; 0,999; 1; 0,999 i 1, što upućuje na odgovarajuću ponovljivost analitičke metode.

HPLC fingerprint biljne droge Gentianae Radix et Rhizoma i analiza sličnosti

U svrhu dobivanja referentnog HPLC *fingerprinta*, analizirano je 20 serija uzoraka predmetne biljne droge. Dobiveni kromatogrami za pojedinačne uzorke prikazani su na Slici 14(A), a referentni *fingerprint* biljne droge *Gentianae Radix et Rhizoma* prikazan je na Slici 14(B).

Svi pikovi koji su zamijećeni u 20 ispitanih uzoraka u zamjetnoj količini i s dobrim razlučivanjem, proglašeni su "karakterističnim pikovima" za identifikaciju biljne vrste. Deset karakterističnih pikova koji se pojavljuju unutar prvih 20 minuta eluacije prikazani su na Slici 14(B). Sličnost dobivenih kromatograma za svaki od dvadeset analiziranih uzoraka uspoređena je s referentnim *fingerprintom* (Tablica 3). Što su vrijednosti bliže broju 1, to su dva kromatograma sličnija. Ukoliko se određena vrijednost postavi kao prag za identifikaciju biljne vrste (primjerice 0,95), vrlo se lako mogu identificirati izvorni uzorci biljnog materijala na temelju dobivenih *fingerprinta*. Dobivene vrijednosti koeficijenata za 17 uzoraka više su od 0,950, osim za uzorke S15, S19 i S20. Iz dobivenih se rezultata može zaključiti kako izvor uzoraka može imati velik utjecaj na kakvoću biljne droge.



Slika 14: HPLC *fingerprintovi* dobiveni analizom dvadeset uzoraka biljne droge Gentianae Radix et Rhizoma (A) i simulacijom dobiven referentni kromatogram sa srednjim vrijednostima pojedinih sastavnica (softver – "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine software") (B). Kromatogrami označeni sa S1-S20 predstavljaju 20 ispitanih biljnih uzoraka, a R predstavlja simulacijski reprezentativni kromatogram. Pikovi označeni brojevima 1-10 na R kromatogramu predstavljaju deset karakterističnih pikova.

Zaključak

Studija je pokazala razvoj i validaciju jednostavne metode za istovremeno određivanje četiriju glavnih kemijskih sastavnica u biljnoj drogi Gentianae Radix et Rhizoma. Predmetnom metodom također je razvijen HPLC *fingerprint* za 20 analiziranih uzoraka (20 serija) prikupljenih s različitih izvora. Na taj je način moguće provesti odgovarajuću identifikaciju biljne droge, kao i kvantitativno određivanje kemijskih sastavnica te dobiti više pouzdanih podataka nego drugim zasebnim metodama ispitivanja.

4.1.3. Kvantitativna i kvalitativna analiza karakterističnih pikova u kemijskom fingerprintu Yuanhu Zhitong tableta pomoću spregnutih tehnika HPLC-DAD-MS/MS [66]

U ovoj je studiji razvijena strategija za kvalitativnu i kvantitativnu analizu karakterističnih pikova koji se pojavljuju na kemijskom *fingerprintu* Yuanhu Zhitong tableta (YZT) (Slika 15) pomoću spregnutih tehnika HPLC-DAD-MS/MS. U dobivenom kemijskom *fingerprintu*, 40 je pikova prepoznato kao "karakteristični pikovi" za predmetne tablete. Za njihovu kvantifikaciju provedena je detekcija pri valnim duljinama od 254 nm, 270 nm, 280 nm i 345 nm. Metoda ispitivanja je validirana i potvrđeno je pouzdano određivanje 10 sastavnica (protopina, jatrorizina, koptizina, palmatina, berberina, ksantotoksina, bergaptena, tetrahidropalmatina, imperatorina i izoimperatorina). Pomoću razvijene metode kvalitativno su analizirane 33 sastavnice (karakteristični pikovi), uključujući 10 sastavnica koje su ujedno i kvantificirane. Razvijena metoda prepoznata je kao moćan alat za provedbu analize kompleksnog biljnog proizvoda.



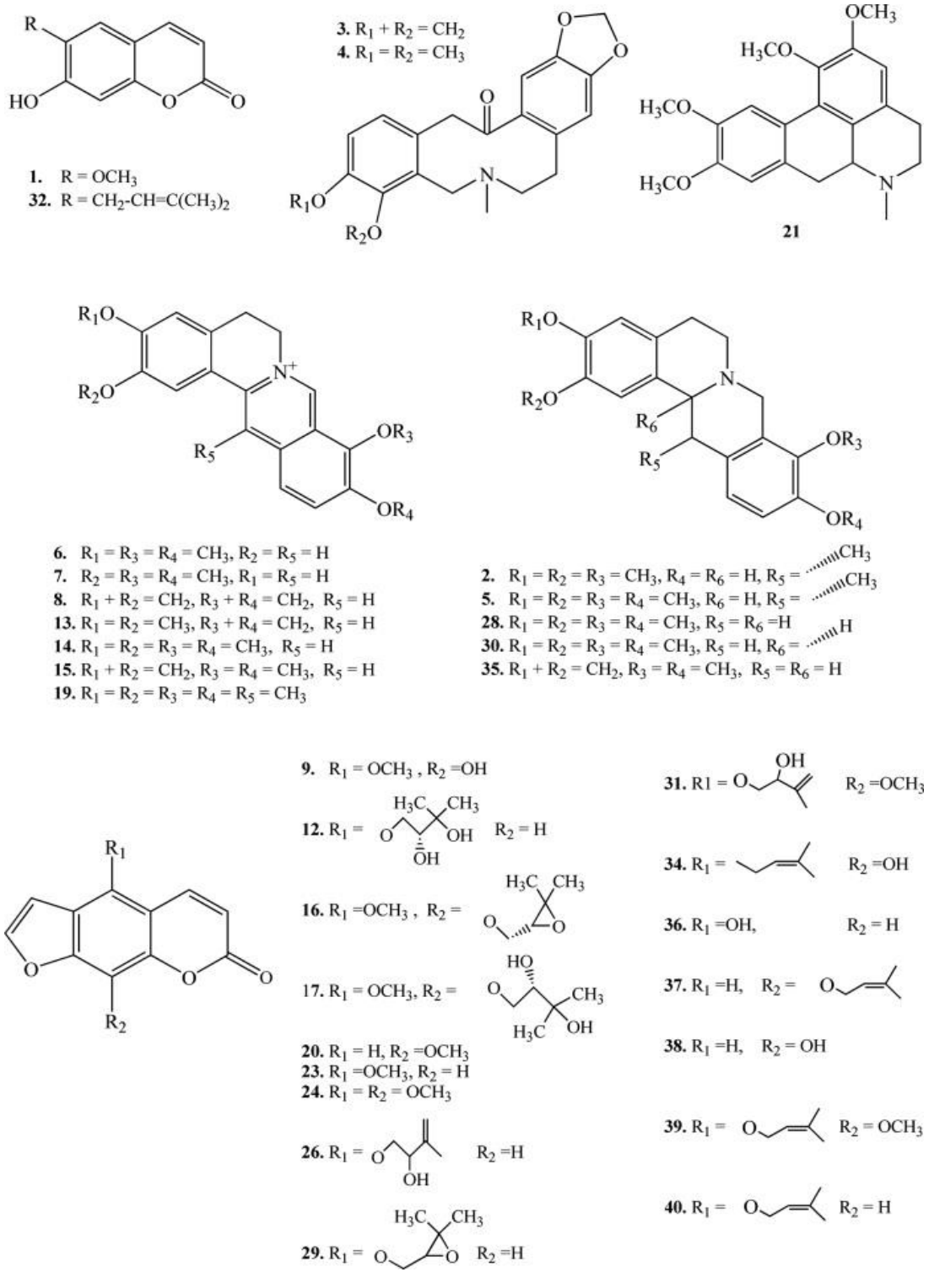
Slika 15: Pakiranje Yuanhu Zhitong tableta.

Upravo je za proizvode koji spadaju u tradicionalnu kinesku medicinu (TCM) poznato da do njihove terapijske učinkovitosti dolazi uslijed sinergističkog djelovanja velikog broja sastavnica. Navedena činjenica uvelike otežava odgovarajuću kontrolu kvalitete takvih proizvoda. Najzastupljeniji pristup ispitivanju proizvoda koji se koriste kao TCM je određivanje i potvrđivanje većeg broja sastavnica. Zato se najčešće koristi *fingerprint* analiza, kojom se može potvrditi sličnost izračunata naspram relativnoj vrijednosti unaprijed odabranih biljega (kao referentnim sastavnicama) [67], dok se na isti način ne može odrediti točan sadržaj djelatnih sastavnica (provesti kvantifikacija). Razlike u kvaliteti biljnog materijala (biljnih droga) koje posljedično utječu na kvalitetu konačnog biljnog proizvoda mogu varirati, ovisno o različitim čimbenicima (npr. mjestu uzgoja, vremenu sakupljanja), ali činjenica je da se prisutnost karakterističnih pikova povezuje s konzistencijom u kvaliteti, stabilnosti i, u konačnici, s terapijskim djelovanjem. Upravo je zato važno provesti prikladnu identifikaciju i kvantifikaciju karakterističnih pikova.

YZT spada u klasični TCM primjer, a proizvod se sastoji od 223 g biljne droge Radix Angelicae dahuricae i 445 g droge Rhizoma Corydalis te se koristi za liječenje glavobolje, bolova u gastrointestinalnom sustavu i dismenoreje [68]. Kao djelatne sastavnice u biljnim drogama Rhizoma Corydalis i Radix Angelicae dahuricae, prepoznati su alkaloidi i kumarini

[69, 70]. Postoji nekoliko studija koje opisuju kvantitativnu analizu nekoliko sastavnica s biološkom aktivnošću u predmetnom biljnom proizvodu (YZT) [71, 72]. No, sve se fokusiraju na određivanje jedne ili nekoliko sastavnica, umjesto na cjelokupni sastav, kakvoću i, posljedično, učinkovitost biljnog proizvoda. Osim toga, do predmetnog rada nije postojala niti jedna studija u kojoj se provodila kvalitativnu i kvantitativnu analizu YZT pomoću kemijskog *fingerprinta* s fokusom na karakterističnim pikovima.

Upravo se u predmetnoj studiji po prvi puta opisuje upotreba HPLC tehnike s DAD detektorom za razvoj kemijskog *fingerprinta* proizvoda YZT, na kojemu je vidljivo 40 karakterističnih pikova. Od tih je pikova, za njih 10 (protopin, jatrorizin, koptizin, palmatin, berberin, ksantotoksin, bergapten, tetrahidropalmatin, imperatorin i izoimperatorin) provedena je kvantitativna analiza (Slika 16), a za 33 sastavnice (uključujući 10 kvantificiranih) također identifikacija ili djelomična identifikacija pomoću tehnike ESI-MS/MS.



Slika 16: Kemijske formule 33 identificirane sastavnice u Yuanhu Zhitong tabletama (YZT).

Materijali i metode

- *Korišteni materijali i kemikalije*

U predmetnoj su studiji primijenjeni referentni standardi za svih 10 kvantificiranih sastavnica, pribavljeni od *National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products* (Beijing, China), a njihova čistoća određena je HPLC tehnikom i za svaki od njih bila je veća od 98%. Gotov proizvod YZT prikupljen je od 12 farmaceutskih kompanija u Kini (Tablica 4). Za optimizaciju uvjeta i validaciju HPLC-DAD-ESI-MS/MS metode korišten je uzorak YZT proizvođača A.

Tablica 4: Popis ispitivanih uzoraka YZT tableta.

Uzorak	Proizvođač	Br. serije
A	Guangxi Tiantianle Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	100801
B	Foshan Dezhong Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	10012
C	Guangxi Shibiao Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	080901
D	Sichuan Hebang Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	100901
E	Henan Wanxi Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	110502
F	Jiangxi Jiulianshan Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	20101104
G	Shandong Kongfu Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	100301
H	Shandong Lukang Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	20110506
I	Nantong Jinghua Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	090701
J	Shanxi Wanglong Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	20101001
K	Sichuan Shuzhong Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	100906
L	Guangxi Banmu Tianlong Pharmaceutical Co., Ltd., Kina	101001

- *HPLC-DAD-ESI-MS/MS analiza*

Za provedbu kromatografske analize, korišten je aparat Agilent 1260, kolona Agilent Eclipse plus C18 (250 mm×4,6 mm, 5 μm). Postupak odjeljivanja sastavnica proveden je gradijentnom metodom, pri čemu su primijenjene sljedeće mobilne faze: A (0,4%-tna otopina amonijevog acetata; pH 6,0 podešen je pomoću ledene octene kiseline) i B (acetonitril). Omjeri mobilnih faza bili su sljedeći: 0.-25. min, 17-19% B; 25.-55. min, 19% B; 55.-70. min, 19-25% B; 70.-80. min, 25-28% B; 80.-95. min, 28-34% B; 95.-120. min, 34-35% B; 120.-140. min, 35-42% B; 140.-160. min, 42-50% B. Protok: 1,0 mL/min, volumen injektiranja 5 μL i temperatura kolone 30°C. Valne duljine za detekciju i kvantitativno određivanje pojedinih sastavnica bile su sljedeće: 254 nm (ksantoksin, bergapten, imperatorin i izoimperatorin), 270 nm (berberin), 280 nm (protopin i tetrahidropalmatin) i 345 nm (jatrorizin, koptizin i palmatin), dok je sam razvoj kemijskog *fingerprinta* proveden pri valnoj duljini od 280 nm.

Tako pripremljen HPLC sustav spregnut je s Agilent 6460 Triple Quadrupole masenim spektrometrom (Agilent Technologies, MA, USA). Uvjeti tijekom elektrosprej ionizacije (ESI) bili su sljedeći: 3000 V; plin za sušenje (N_2), protok 10,0 L/min; temperatura plina za sušenje 320°C; nebulizator – tlak 25 psi.

- *Priprema uzoraka*

S površine uzoraka tableta u potpunosti je uklonjena film-ovojnica, a jezgre su usitnjene u fini prašak. Izvagano je točno 1,0 g usitnjenog uzorka i ekstrahirano u 35 mL metanola, koristeći ultrazvučnu kupelj u vremenu od 30 minuta. Nakon toga, uzorak je profiltriran, a otopina zatim uparena na vodenoj kupelji (70˚C). Ostatak nakon uparavanja nadopunjen je metanolom do 5 mL i otopina je centrifugirana na 15000 rpm u vremenu od 10 minuta. Supernatant iznad

otopine filtriran je kroz 0,45 μm membranski filter i prenesen u bočicu za provedbu ispitivanja.

Također su pripremljena dva uzorka negativne kontrole bez droge Radix Angelicae dahuricae ili Rhizoma Corydalis, u svrhu provedbe validacije metode ispitivanja (određivanje specifičnosti). Biljne su droge usitnjene u prašak (40-60 *mesha*) i pripremljene su negativne kontrole prema gore opisanoj metodi.

- *Priprema otopina standarda*

Precizno je odvagnuto 10 referentnih standarda. Jatrorizin, palmatin, koptizin i berberin otopljeni su u smjesi metanol-voda (50:50, *V/V*), dok su ostali standardi otopljeni u čistom metanolu. Otopine su zatim razrijeđene na prikladne koncentracije kako bi se dobile koncentracijske krivulje. Do provedbe ispitivanja sve su otopine čuvane u hladnjaku.

- *Kvantitativna i kvalitativna analiza pomoću HPLC fingerprinta*
  - ✓ *Potvrđivanje karakterističnih pikova i analiza sličnosti*

Za analizu sličnosti korišten je softver *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (Version 2004A)*. Da bi se kvantitativno izrazila kemijska svojstva prisutna u kromatografskom uzorku YZT tableta, izračunata su relativna retencijska vremena (RRT) i relativne površine ispod pikova (RPA) za svaki karakterističan pik u odnosu na referentni pik. Na temelju dobivenih vrijednosti, izračunati su koeficijenti korelacije za cijele kromatografske profile svakog uzorka, a također je generiran i simulacijski kromatogram koji prikazuje srednje vrijednosti.

✓ *Validacija metode za kvantitativno ispitivanje karakterističnih pikova*

Kako bi se provela validacija predmetne metode ispitivanja, određeni su sljedeći parametri: linearnost, ponovljivost, stabilnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, preciznost i točnost.

✓ *Kvalitativna analiza karakterističnih pikova*

Identifikacija uobičajenih pikova u YZT tabletama provedena je pomoću LC–ESI-MS/MS analize.

- *Rezultati*

Kako bi se odredila kakvoća YZT tableta, već je ranije provedeno nekoliko studija. U jednoj je studiji kvantificirano 17 sastavnica unutar 9 minuta, koristeći tekućinsku kromatografiju brze rezolucije spregnutu s MS-om [72]. Spomenuta se studija usredotočila samo na kvantifikaciju određenih sastavnica i nije uzela u obzir sve sastavnice koje su prisutne u lijeku i vjerojatno pridonose njegovoj djelotvornosti. U drugoj je studiji [73] korištena UPLC tehnika spregnuta s MS-om i dobiven je kromatografski *fingerprint* na kojemu je identificirano 18 karakterističnih pikova. Ta je studija dala pregled svih sastavnica u tabletama, međutim, nije se osvrnula na kvantitativne varijacije među njima.

U predmetnoj je studiji korišten HPLC-DAD kako bi se razvio kemijski *fingerprint* i kvantificiralo 10 karakterističnih pikova u YZT tabletama te pomoću ESI-MS/MS identificirala 33 karakteristična pika. Takva kombinacija kemijskog *fingerprinta* s kvantitativnom i kvalitativnom analizom karakterističnih pikova u YZT tabletama može biti iznimno vrijedan alat za kontrolu kakvoće predmetnog biljnog proizvoda.

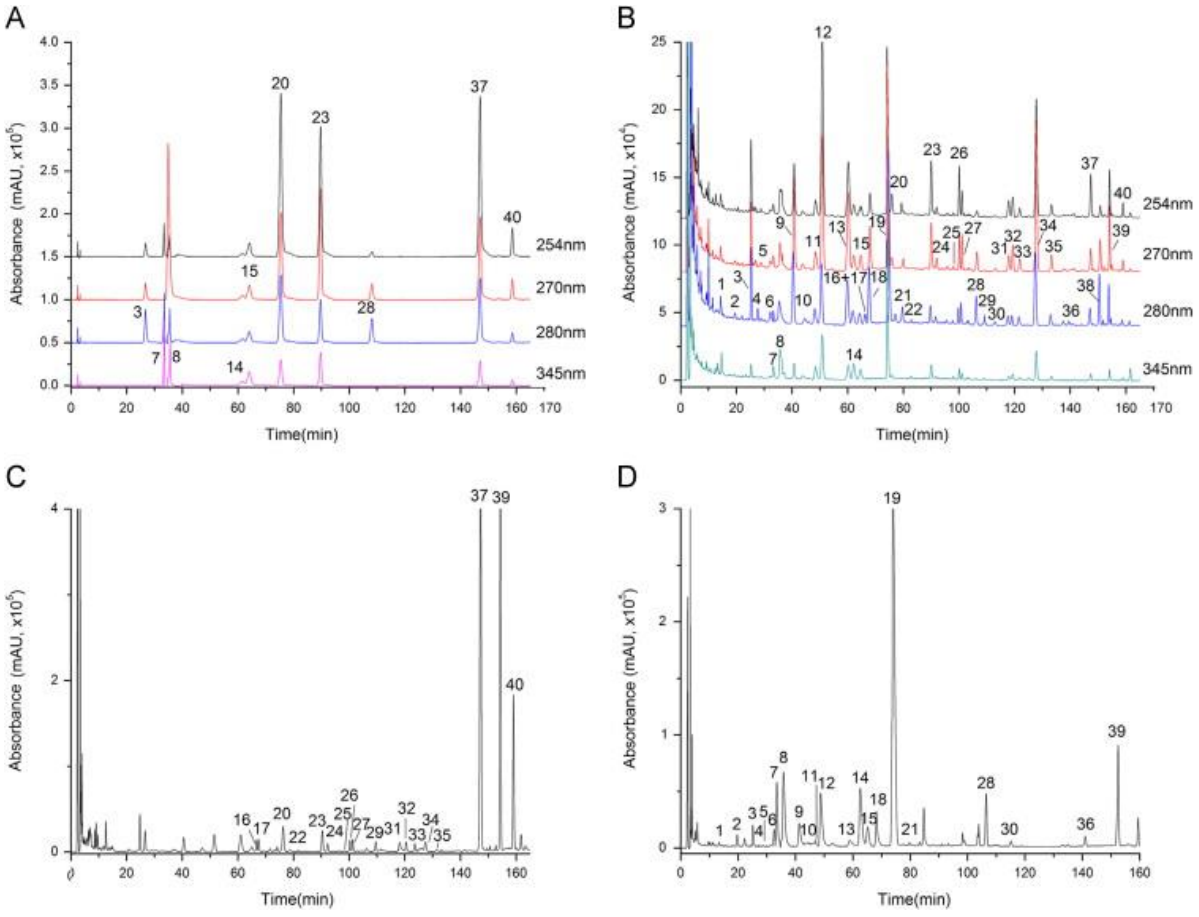
- ✓ *Optimizacija uvjeta ekstrakcije*

Kako bi se postigla optimalna ekstrakcija, ispitivane su različite metode ekstrakcije, otapala i njihov volumen te vrijeme ekstrakcije. Pokazalo se kako je metanol najučinkovitije ekstrakcijsko sredstvo, kako je ultrazvučna ekstrakcija bolja od refluksne i dr.

- ✓ *Optimizacija kromatografskih uvjeta te uvjeta za masenu spektrometriju*

U predmetnoj su studiji ispitivane različite mobilne faze – acetonitril ili metanol i voda s amonijevim acetatom, mravljom ili octenom kiselinom. Utvrđeno je kako je acetonitril i vodena otopina amonijevog acetata najbolja za provođenje spomenute analize te se pri tome detektira više pikova uz kraće trajanje samog ispitivanja. Također je ispitivan i optimalan pH vodene otopine amonijevog acetata kod kojega se dobivaju pikovi najboljeg oblika. Ispitivana su i četiri tipa kromatografskih kolona: Sepax GP-C18, Agilent Zorbax SB-C18, Kromasil C18 i Agilent Eclipse plus C18. Najbolje razdvajanje postignuto je na Agilent Eclipse plus C18 koloni.

Kvantifikacija pikova provedena je za ksantoksin, bergapten, imperatorin te izoimperatorin na valnoj duljini od 254 nm, berberin na 270 nm, protopin i tetrahidropalmatin na 280 nm, te jatrorizin, koptizin i palmatin na 345 nm. Na spomenutim je valnim duljinama izmjerena maksimalna apsorbancija i dobiven najbolji odgovor s najmanje interferencija (Slika 17A i B).



Slika 17: Reprezentativni HPLC-DAD kromatogrami smjese standarda (A) pri 254 nm, 270 nm, 280 nm i 345 nm; YZT (B) pri 254 nm, 270 nm, 280 nm i 345 nm; negativna kontrola bez droge Radix Corydalis (C) pri 280 nm; negativna kontrola bez droge Rhizoma Angelicae dahuricae (D) pri 280 nm. Protopin (3); jatrorizin (7); koptizin (8); palmatin (14); berberin (15); ksantoksin (20); bergapten (23); tetrahidropalmatin (28); imperatorin (37); izoimperatorin (40).

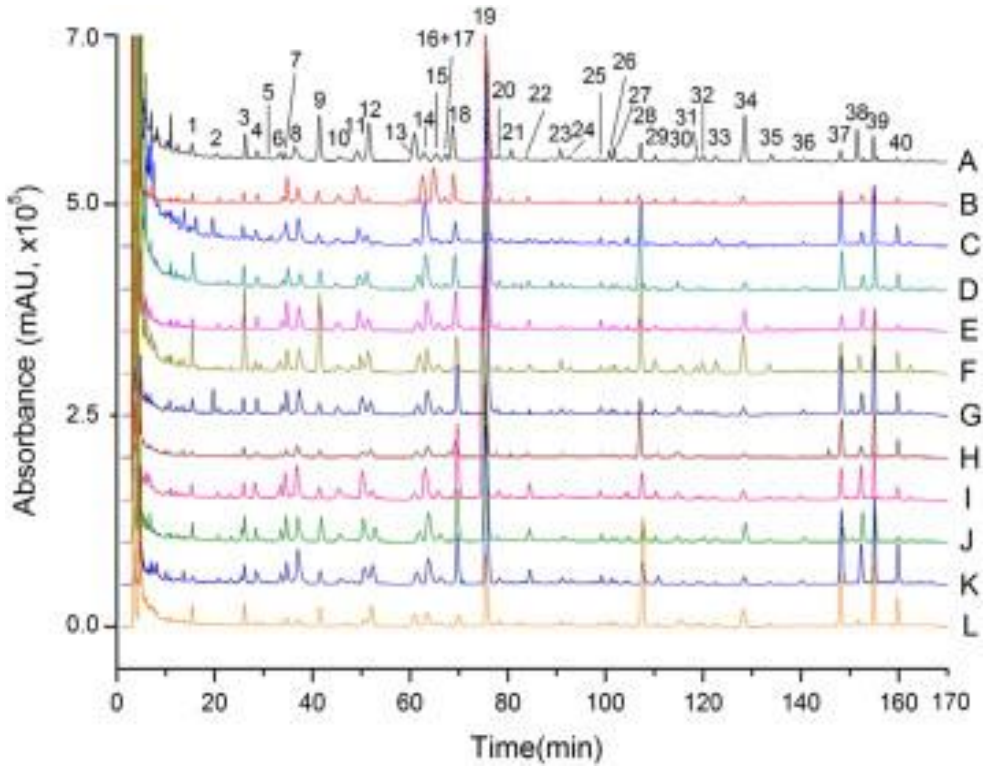
Pri provedbi *fingerprint* analize, valna duljina je postavljena na 280 nm jer se na toj valnoj duljini može detektirati većina pikova (Slika 17B).

- ✓ *Potvrda karakterističnih pikova i analiza sličnosti*

U skladu s preporukama dokumenta *Drug Administration Bureau of China, 2000,* ukoliko se pikovi pojavljuju na svakom kromatogramu te su njihove RSD i RRT vrijednosti za svih 10 uzoraka manje od 1%, može se smatrati da predmetni pikovi potječu od istih sastavnica te se mogu smatrati "karakterističnim pikovima"; također, ukupna površina ispod karakterističnih pikova mora iznositi više od 90% ukupne površine svih pikova u dobivenom kromatogramu.

U predmetnoj je studiji analizirano 12 uzoraka YZT tableta od različitih proizvođača metodom ispitivanja pomoću HPLC-DAD tehnike i dobiveni su *fingerprint* kromatogrami (Slika 18). Prosjek svih dobivenih kromatograma uzet je kao standarni kromatogram YZT tableta. Vidljivo je kako je za 40 pikova procijenjeno da se radi o karakterističnim pikovima (>90% od ukupne površine).

Piku označenom brojem 19 odgovara najveći sadržaj i upravo je radi toga odabran kao referentni pik prema kojemu su izračunate RRT i RPA vrijednosti karakterističnih pikova. Dobivene vrijednosti RSD za RRT bile su manje od 2,1%, što upućuje na dobru stabilnost i reproducibilnost metode za *fingerpint* analizu pomoću HPLC-DAD tehnike. Koeficijenti sličnosti za 12 uzoraka bili su veći od 0,90, što upućuje na činjenicu da uzorci različitih proizvođača imaju isti kromatografski profil. No, kako su RSD vrijednosti za RPA bile prilično visoke (23,5-130,91%), procjenjuje se kako su materijali različitog podrijetla, različiti su postupci proizvodnje, uvjeti čuvanja i sl.



Slika 18: HPLC-DAD *fingerprint* kromatogrami za 12 YZT uzoraka.

✓ *Kvantitativno određivanje karakterističnih pikova*

Za kvantitativne markerske sastavnice odabrano je 10 karakterističnih pikova za koje je procijenjeno da se nalaze u odgovarajućim koncentracijama i da imaju dobru razlučivost. Na Slici 17A i 17B prikazani su kromatografski profili YZT tableta i poredbenih tvari dobiveni pri valnim duljinama od 254 nm, 270 nm, 280 nm i 345 nm.

Kako bi se ispitala specifičnost razvijene metode, pripremljeni su različiti negativni uzorci i njihovi kromatogrami prikazani su na Slikama 17C i 17D. Na taj se način potvrdilo kako nema interferencija za 10 ispitivanih sastavnica.

Za ispitivanje linearnosti pripremljene su različite koncentracije poredbenih otopina 10 ispitivanih sastavnica. Kalibracijske krivulje za 10 sastavnica (Tablica 5) dobivene su iscrtavanjem odnosa između površine ispod pika i pripremljene koncentracije za pojedinu

sastavnicu. Površine ispod pikova izražene su kao srednja vrijednost tri uzastopna injektiranja. Linerarnost tako dobivenih kalibracijskih krivulja procijenjena je preko posebnog softvera (SPSS 16.0). U Tablici 5 vidljivo je kako su korelacijski koeficijenti viši od 0,999 za sve sastavnice kod kojih je Q vrijednost manja od 3%. Raspon LOD za sve sastavnice bio je od 0,03 do 0,11 μg/mL, a raspon LOQ od 0,09 do 0,32 μg/mL.

Tablica 5: Valna duljina detekcije, podatci linearne regresije, LOD i LOQ za 10 ispitivanih sastavnica u YZT tabletama.

Sastavnica	***λ*** (nm)	**Raspon linearnosti** (μg/mL)	**Kalibracijska jednadžba** ($y=ax+b$)[a]	**Faktor korelacije (*R*)**	***Q*** (%)[b]	***P*** [c]	**LOD**[d] (μg/mL)	**LOQ**[e] (μg/mL)
Protopin	280	1,02–101,60	y=21,104x−36,099	0,9990	1,03	0,218	0,06	0,19
Jatrorizin	345	6,17–267,00	y=10,661x−59,612	0,9996	1,20	0,114	0,11	0,32
Koptizin	345	7,70–246,25	y=21,514x–12,671	0,9995	1,67	0,157	0,08	0,24
Palmatin	345	1,01–84,00	y=85,389x−74,742	0,9997	1,23	0,133	0,03	0,11
Berberin	270	1,00–83,50	y=51,399x−69,414	0,9997	1,88	0,055	0,05	0,16
Ksanto-toksin	254	1,01–84,67	y=53,658x−56,538	0,9996	2,03	0,154	0,04	0,15
Bergapten	254	1,01–84,00	y=37,976x−43,638	0,9995	0,87	0,093	0,07	0,20
Tetrahidro-palmatin	280	20,00–300,00	y=13,534x+18,267	0,9991	1,73	0,223	0,09	0,29
Imperatorin	254	1,01–84,67	y=40,762x−36,436	0,9997	0,56	0,078	0,03	0,11
Izoimpera-torin	254	1,01–84,67	y=26,478x−28,165	0,9996	1,95	0,098	0,05	0,16

a - u jednadžbi linearne regresije $y=ax+b$, x predstavlja koncentraciju sastavnice (μg/mL), y površinu ispod pika, a R je korelacijski koeficijent;
b - označava koeficijent kakvoće samog regresijskog modela;
c - P vrijednost (razina pouzdanosti 95%);
d - LOD je definiran kao koncentracija kod koje je omjer signala i šuma 3 (S/N=3);
e - LOQ je koncentracija kod koje je omjer signala i šuma 10 (S/N=10).

Provedeno je također ispitivanje *inter- i intra-day* preciznosti iz vrijednosti RSD-a za retencijska vremena i površina ispod pikova. Razdoblja za ispitivanje predmetnog parametra bila su unutar jednog dana i u 5 dana. RSD vrijednosti za *intra-* i *inter-day* preciznosti bile su niže od 2,0% za površine ispod pikova i manje od 0,9% za retencijska vremena (Tablica 6).

Tablica 6: Preciznost, ponovljivost i podatci o stabilnosti za 10 ispitanih sastavnica (RSD%, n=6).

Sastavnice	**Preciznost**				**Ponovljivost**		**Stabilnost**	
	Inter-day		***Intra-day***					
	Retenc. vrijeme, R_t	**Površina ispod pika**	**Retenc. vrijeme, R_t**	**Površina ispod pika**	**Retenc. vrijeme, R_t**	**Sadržaj**	**Retenc. vrijeme, R_t**	**Površina ispod pika**
Protopin	0,4	1,9	0,5	1,2	0,7	1,8	0,4	0,8
Jatrorizin	0,5	1,1	0,8	0,7	1,1	1,6	0,5	1,2
Koptizin	0,7	1,7	0,9	1,4	0,9	1,5	0,4	0,9
Palmatin	0,6	1,7	0,7	1,0	1,4	1,7	0,6	1,3
Berberin	0,5	2,0	0,5	1,4	1,6	2,1	0,3	1,4
Ksanto-toksin	0,6	1,9	0,4	1,3	1,5	1,7	0,6	1,2
Bergapten	0,5	0,9	0,3	1,0	0,6	2,0	0,5	0,9
Tetrahidro-palmatin	0,4	1,3	0,5	1,6	1,2	2,2	0,7	0,8
Impera-torin	0,4	1,1	0,4	0,9	0,8	1,9	0,4	1,5
Izoimpera-torin	0,3	1,0	0,6	0,7	1,1	1,6	0,6	1,1

Analitička ponovljivost određena je injektiranjem 6 različitih uzoraka koji su pripremljeni u skladu s istim postupkom. Kako bi se procijenila ponovljivost, korištene su RSD vrijednosti retencijskih vremena te sadržaja za svaku pojedinu od 10 ispitivanih sastavnica. Dobivene RSD vrijednosti bile su manje od 2,2%, što pokazuje da je metoda zadovoljavajuća za provedbu kvantitativnog određivanja.

Za ispitivanje stabilnosti, analizirana su retencijska vremena i površine ispod pikova za svih 10 ispitivanih sastavnica u vremenskim intervalima od 8 sati, u ukupnom periodu od 2 dana.

Ispitivanja su pokazala kako je otopina uzorka stabilna unutar 48 sati (RSD≤0,7% za retencijska vremena i RSD≤1,5% za površine ispod pikova).

Točnost metode ispitana je na način da su u uzorak koji je ranije analiziran, i za koji su poznate koncentracije sastavnice, dodane tri različite količine standarda. Smjese su ekstrahirane i analizirane optimiziranom metodom ispitivanja. Koncentracija svake sastavnice određena je koristeći kalibracijske krivulje. Svaki je uzorak injektiran 3 puta. Dobiveni rezultati za analitički prinos (*recovery,* R) izraženi su kao postotak sadržaja sastavnice i iznosili su 98,9%-102,3%, uz sve RSD vrijednosti manje od 2,5% (Tablica 7). Navedeni rezultati indiciraju kako primijenjena metoda ispitivanja osigurava visoku točnost za simultanu analizu deset ispitivanih sastavnica.

- ✓ *Kvantitativno određivanje sastavnica u uzorcima YZT tableta*

Razvijena metoda ispitivanja upotrijebljena je za kvantitativno određivanje 10 sastavnica u 12 uzoraka YZT tableta. Svaka je analiza ponovljena 3 puta. Identifikacija pikova u kromatogramima provedena je na način da su uspoređivana retencijska vremena za svaki pik, UV-spektar i podatci MS analize s podatcima koji su dobiveni za standarde.

HPLC-DAD kromatografski profili za sve uzorke YZT tableta prikazani su na Slici 18, dok su sadržaji svih 10 sastavnica prikazani u Tablici 8.

Tablica 7: Analitički prinos (R) za svaku sastavnicu, određen pomoću metode standardnog dodatka (n=3).

Sastavnica	Izvorna količina (µg)	"Spikana" količina (µg)	Određena količina (µg)	R (%)	Prosječni R (%)	RSD (%)
Protopin	93,53	46,77	139,46	99,4	101,3	1,6
		93,53	190,80	102,0		
		140,00	239,13	102,4		
Jatrorizin	6,80	3,40	9,99	97,9	100,7	2,5
		6,80	14,00	102,9		
		10,00	17,00	101,2		
Koptisin	74,00	37,50	112,76	101,1	102,3	1,0
		74,00	152,58	103,1		
		112,00	191,12	102,8		
Palmatin	105,23	52,62	156,82	99,4	98,9	0,4
		105,00	207,78	98,8		
		157,62	259,05	98,6		
Berberin	55,50	27,75	82,98	99,9	100,8	1,0
		55,50	112,27	101,1		
		83,00	140,61	101,5		
Ksantotoksin	4,62	2,32	6,89	99,3	99,9	0,9
		4,70	9,28	99,6		
		7,00	11,73	101,0		
Bergapten	48,84	24,42	72,72	99,3	99,9	0,8
		50,00	99,62	100,8		
		74,42	122,90	99,7		
Tetrahidro-palmatin	186,75	93,38	281,74	100,6	101,2	0,5
		187,00	378,71	101,3		
		280,00	474,20	101,6		
Imperatorin	79,83	39,92	119,24	99,6	100,4	0,9
		80,00	161,95	101,3		
		120,00	200,48	100,3		
Izoimperatorin	93,06	46,53	140,82	100,9	101,0	0,1
		93,00	187,99	101,0		
		140,00	235,50	101,1		

Tablica 8: Količina svake od 10 ispitivanih sastavnica u YZT tabletama različitih proizvođača.

Uzorak	**Sadržaj** (μg/g, srednja vrijednost±SD, *n*=3)									
	Protopin	Jatrorizin	Koptisin	Palmatin	Berberin	Ksantotoksin	Bergapten	Tetrahidropalmatin	Imperatorin	Izoimperatorin
A	104,25±0,30	42,75±0,06	327,95±0,04	48,15±0,005	60,25±0,24	35,40±0,03	89,75±0,05	319,45±0,15	75,35±0,06	32,30±0,003
B	112,85±0,22	95,05±0,07	293,10±0,06	139,70±0,008	331,00±0,15	−*	31,80±0,007	346,00±0,26	80,10±0,05	47,80±0,004
C	141,40±0,06	77,20±0,004	369,40±0,005	212,35±0,002	47,30±0,07	−	26,05±0,003	627,50±0,09	240,20±0,17	126,25±0,07
D	121,75±0,54	68,50±0,07	219,35±0,007	148,35±0,07	34,90±0,05	6,55±0,006	32,05±0,04	977,25±0,13	197,65±0,04	1013,50±0,09
E	120,00±0,38	89,80±0,003	376,00±0,04	149,05±0,03	57,60±0,03	8,60±0,009	29,55±0,06	418,05±0,09	82,80±0,003	46,80±0,006
F	83,75±0,08	76,50±0,005	361,95±0,005	141,65±0,06	53,75±0,009	10,40±0,14	81,40±0,12	1297,25±0,06	191,05±0,005	137,45±0,007
G	148,60±0,07	73,45±0,01	361,50±0,006	103,70±0,21	52,95±0,004	6,75±0,05	33,60±0,04	431,06±0,002	294,25±0,02	141,95±0,004
H	35,90±0,03	44,30±0,002	207,55±0,007	46,40±0,04	19,95±0,06	12,25±0,07	23,35±0,07	702,10±0,04	195,50±0,006	121,25±0,09
I	170,25±0,06	80,30±0,004	512,15±0,008	140,05±0,009	59,40±0,08	6,90±0,04	26,70±0,06	382,85±0,03	160,35±0,007	83,50±0,08
J	141,40±0,07	86,05±0,14	477,70±0,02	153,70±0,04	68,90±0,002	11,35±0,06	38,60±0,10	360,90±0,03	96,90±0,003	46,40±0,001
K	145,10±0,09	76,70±0,01	573,65±0,09	117,40±0,10	53,20±0,07	8,40±0,08	42,90±0,25	322,35±0,04	372,05±0,002	271,75±0,02
L	33,30±0,06	45,40±0,05	140,00±0,01	58,95±0,08	27,15±0,003	21,40±0,43	54,75±0,09	1159,00±0,09	401,65±0,004	295,90±0,06
RSD%	38,2	25,1	36,3	40,8	114,6	90,0	51,5	71,5	56,1	137,5

* − niže od LOQ;

RSD% – varijacija srednjih vrijednosti sadržaja za pojedinu sastavnicu.

Vidljivo je da sastav za svaku pojedinačnu sastavnicu varira među ispitivanim uzorcima. Prema *National Commission of Chinese Pharmacopoeia* [68], sadržaj tetrahidropalmatina ne bi smio biti niži od 300 μg/g. Iako svi ispitivani uzorci zadovoljavaju navedeni zahtjev, sadržaj tetrahidropalmatina jako varira i kreće se u rasponu od 319,45 μg/g do 1159 μg/g (RSD%=71,5). Jednake varijacije u sadržaju zamijećene su i kod ostalih sastavnica, primjerice berberina, ksantotoksina, bergaptena, imperatorina i izoimperatorina. Sve navedene varijacije u ispitivanim sastavnicama mogle bi biti uzrok varijacija u terapijskoj djelotvornosti predmetnog lijeka. Iz svega navodenog može se zaključiti kako se ispitivanjem jedne ili nekoliko sastavnica u biljnom proizvodu ne može provesti odgovarajuća kontrola kakvoće.

- ✓ *Kvantitativno određivanje sastavnica u uzorcima YZT tableta*

Nadalje, provedena je karakterizacija ili djelomična identifikacija 33 karakteristična pika koji su dobiveni kemijskim *fingerprintom*, uključujući 10 kvantificiranih sastavnica pomoću ESI-MS/MS metode.

Zaključak

U ovoj je studiji razvijena i validirana pouzdana i učinkovita HPLC-DAD-ESI-MS/MS metoda ispitivanja za provedbu kontrole kakvoće YZT tableta. Predmetnom metodom provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza "karakterističnih" pikova u dobivenom kemijskom *fingerprintu*; 10 je sastavnica kvantitativno određeno, a 33 sastavnice (uključujući i 10 kvantificiranih) identificirano su na temelju njihovih retencijskih vremena i MS/MS spektara, nakon usporedbe sa standardima.

5, ZAKLJUČAK



U ovom je radu opisana i istaknuta važnost odgovarajuće kontrole kakvoće biljnih proizvoda s obzirom na činjenicu da se velik broj pacijenata oslanja upravo na biljne proizvode kao prvi izbor u samoliječenju. Budući da neki proizvodi biljnog podrijetla ne podliježu rigoroznoj zakonskoj regulativi, niti za njih postoje strogi zahtjevi za kakvoću, sve se više pojavljuje pitanje sigurnosti primjene takvih proizvoda. Kroz primjenu zakonskih odredbi za biljne lijekove, osigurava se potrebna kakvoća i sigurnost njihove primjene (uključujući i tradicionalne biljne lijekove), čime je osigurana zaštita pacijenta, dok je za slabije regulirane biljne proizvode potrebno ukazati na potrebu znatnog pooštravanja zakonskih propisa. To bi se moglo postići temeljem rezultata komparativnih studija koje se provode posljednjih godina, a uključuju suvremene analitičke pristupe u ispitivanju i kontroli kakvoće takvih kompleksnih biljnih uzoraka (primjerice, *fingerprint* analiza) .

Ljekovito bilje i biljni proizvodi tisućljećima nalaze široku primjenu u različitim sustavima tradicionalnog liječenja. Upravo zato je njihova neškodljivost od iznimne važnosti za javno zdravstvo. Neškodljivost je prvenstveno određena kakvoćom biljne sirovine. Od mogućih čimbenika koji utječu na kakvoću ljekovitog bilja i biljnih proizvoda najčešće su prisutna biološka onečišćenja (mikroorganizmi) te kemijska onečišćenja (npr. mikotoksini, toksični elementi poput teških metala, ostatci pesticida). Sve se češće u medijima pojavljuju slučajevi trovanja različitim biljnim proizvodima koji su ili sadržavali nedopuštene razine nekog onečišćenja, ili su pak bili namjerno krivotvoreni na način da im je dodana određena kemijski aktivna tvar. Osim toga, zbog velike sličnosti pojedinih ljekovitih biljaka/biljnih droga, često dolazi i do slučajnih zamjena biljnog materijala nekom drugom (sličnom) biljkom, a što može imati kobne posljedice.

Upravo radi navedenoga, a u svrhu uspostavljanja standarda visoke kakvoće, vrlo je važno postaviti zakonske okvire koji bi se primjenjivali za sve regulatorne skupine proizvoda koji sadrže ljekovito bilje/biljne pripravke.

Prvenstveno je potrebno uspostaviti odgovarajuće mjere osiguravanja kakvoće, od samog uzgoja ljekovitog bilja, njegovog sakupljanja, obrade, distribucije i skladištenja, kao i sustave kontrole u svim fazama proizvodnog postupka gotovog proizvoda. Navedeno se postiže implementacijom pravila Dobre poljoprivredne i sakupljačke prakse (GACP), Dobre proizvođačke prakse (GMP) te daljnjom prodajom i distribucijom proizvoda u skladu s Dobrom dobavljačkom praksom (GSP).

Trenutno ne postoji propisana najprikladnija metoda za identifikaciju biljne vrste prisutne u biljnim proizvodima. Ukoliko se radi o proizvodima registriranim u skupini lijeka, koriste se dostupne farmakopejske metode ispitivanja. Tradicionalan pristup obuhvaća identifikaciju biljaka vizualnim pregledom cijele biljke, što nije primjenjivo kada je potrebno identificirati biljnu vrstu u obrađenom biljnom materijalu. Primjenom citogenetičkih metoda ispitivanja, koje uključuju brojanje kromosoma i kariotipizaciju, možemo pouzdano razlikovati biljni materijal s obzirom da DNA molekule spadaju u pouzdane biljege koji su manje podložni vanjskim utjecajima (starost biljke, fiziološki uvjeti i utjecaji okoliša). Prednosti navedene tehnologije su i mala količina uzorka potrebna za analizu te činjenica da fizički oblik uzorka za analizu nema utjecaja na mogućnost identifikacije, a DNA materijal je moguće ekstrahirati iz svih dijelova biljke. Nedostatak DNA *fingerprintinga* je nemogućnost određivanja sastavnica prisutnih u biljnom materijalu. Za navedeno se primjenjuju metode kromatografskog *fingerprinta* kao alat za identifikaciju i kontrolu kakvoće. Kromatografskim *fingerprintom* mogu se detektirati varijabilnosti u sastavu djelatnih tvari, kao i u njihovim koncentracijama, a koje mogu nastati unutar iste biljne vrste, ovisno o uvjetima u kojima je biljka kultivirana, uvjetima sakupljanja biljnog materijala te metodama njegove obrade i čuvanja. Stoga se javlja potreba uvođenja i primjene prikladnih metoda identifikacije i provjere kakvoće kako bi se razlikovalo slične pripravke koji imaju lošiju kvalitetu, koji sadrže nižu koncentraciju djelatnih tvari, te imaju više

onečišćenja (primjerice pesticida). Vidljivo je da je upravo identifikacija, kao dio provjere kakvoće biljnog materijala, nužna za sigurnost potrošača.

Za razvoj kemijskog *fingerprinta* koriste se spektroskopske i razdjelne (uglavnom kromatografske) tehnike. Ispravna identifikacija mora potvrditi da uzorak potječe od određene biljne vrste i isključiti mogućnost drugih izvora, te se stoga provodi usporedba *fingerprinta* ispitivanog uzorka i *fingerprinta* ekstrakta referentnog biljnog standarda. S obzirom na činjenicu da biljni ekstrakti mogu sadržavati velik broj komponenata u niskim koncentracijama, vizualna evaluacija kromatografskih *fingerprinta* ne može uvijek biti dovoljna za prepoznavanje razlika između profila te se iz tog razloga dodatno preporučuje primjena matematičkih modela za procjenu i usporedbu razvijenih kromatografskih profila.

Kombinacijom metoda određivanja kvalitativnog *fingerprint* profila i kvantitativne analize prisutnih sastavnica u biljnom materijalu, može se učinkovito ispitati kakvoća biljnog materijala/proizvoda.

Odgovarajući standardi za kontrolu kakvoće mogu se uspostaviti samo ukoliko je zadovoljena specifičnost, reproducibilnost i stabilnost u metodi kojom se razvija kromatografski *fingerprint*. S obzirom na činjenicu da navedeno nije jednostavno postići zbog raznolikosti izvora biljnog materijala, različitih načina obrade i pripreme materijala, razlike u eksperimentalnim uvjetima (primjerice, kromatografske kolone, otapala, tipa opreme), metode za dobivanje kromatografskog *fingerprinta* ne može se u potpunosti standardizirati. Ipak, kromatografski *fingerprint* predstavlja značajan korak naprijed u ispitivanju i kontroli kakvoće biljnih proizvoda u kategorijama koje nisu strogo zakonski regulirane. Budućnost donosi razvoj kombinacije metoda *fingerprint* profila s ispitivanjem terapijske učinkovitosti biljnog proizvoda, čime će se uspostaviti novi standard u kontroli njihove kakvoće i time postići tržišna dostupnost biljnih proizvoda odgovarajuće kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti primjene.

6. LITERATURA



[1] Yongyu Z, Shujun S, Jianye D, Wenyu W, Huijuan C, Jianbing W i sur. Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. Prof. Shoyama Y (Ed.). InTech. 2011; DOI: 10.5772/23962.

[2] Kamboj A. Analytical Evaluation of Herbal Drugs. Drug Discovery Research in Pharmacognosy. Prof. Vallisuta O (Ed.). InTech. 2012; DOI: 10.5772/26109.

[3] International Journal of Advanced Reasearch. Volume 1. Issue 10. Establishing the phytoequivalence of an antidiarrhoeal and function modulator feed additive – Salcochek. 2013; 119-128.

[4] WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Publisher: Geneva WHO. Issue Date: 2003.

[5] WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. World Health Organization. Dept. of Technical Cooperation for Essential Drugs and Traditional Medicine. Publisher: Geneva WHO. Issue Date: 2007.

[6] 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. L136/36. Official Journal of the European Union, 2004.

[7] Official Journal of the European Union: Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. L136/34. Official Journal of the European Union, 2004.

[8] Official Journal of the European Union: Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. L183/51. Official Journal of the European Union, 2002.

[9] Bakrač Posavec K. Analiza temeljena na biljezima u kontroli kakvoće biljnih lijekova. Završni specijalistički rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb; 2012.

[10] Committee For Medicinal Products For Human Use (CHMP) Committee For Medicinal Products For Veterinary Use (CVMP): Guideline On Quality Of Herbal Medicinal Products / Traditional Herbal Medicinal Products. CPMP/QWP/2819/00 Rev 1, 30 March 2006.

[11] Shinde VM, Dhalwal K. Application of quality control principles to herbal drugs. International Journal of Phytomedicine 2009;1:4-8.

[12] Council of Europe. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg. Council of Europe; 2016.

[13] Kulkarni KM, Patil LS, Khanvilkar VV, Kadam VJ. Fingerprinting Techniques in Herbal Standardization. Indo American Journal of Pharmaceutical Research 2014; 4(02): 1049-1062.

[14] Quality control methods for medicinal plant materials. Authors: World Health Organization. Pharmaceuticals Unit. Publisher: Geneva WHO. Issue Date: 1992.

[15] Mahajan VM, Kulkarni GB, Deshpande SD, Karte AG, Deshpande AR, Ravikanth K. Therapeutic evaluation of Salochek: a polyherbal bactericidal feed additive against induced colibacillosis in broilers. Animal Science Reporter. 5 (4) (2011); 128-134.

[16] Guidance on equivalence of herbal extracts in Complementary Medicines. Authors: TGA. Issue Date: February 2011.

[17] Mander L, Liu HW. Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology. Elsevier. The Nederlands; 2010; 132 (28).

[18] Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. J.Nat. Prod. 70 (2007); 461-477.

[19] Fujii Y, Fujii H, Yamazaki M. Separation and determination of cardiac glycosides in Digitalis purpurea leaves by micro highperformance liquid chromatography. Journal of Chromatography 1983; 258, 147–153.

[20] Miller RJ, Jolles C, Rapoport H. Morphine metabolism and normorphine in Papaver sornniferum. Phytochemistry 12 1973; 597-603.

[21] Strobel G, Stierle A, Hess WM. The stimulation of taxol production in Taxus brevifolia by various growth retardants. Plant Sci. 101 1994;115-124.

[22] Phillipson JD, Handa SS. Hyoscyamine N-oxide in Atropa belladonna. Phytochemistry 15 1976; 605-608.

[23] Datta A, Srivastava PS. Variation in vinblastine production by Catharanthus roseus during in vivo and in vitro differentiation. Phytochemistry 46 1997; 135-137.

[24] Shin Y, Liu RH, Nock JF, Hollyday D, Watkins CB. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoids concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharv.Biol.Tecnol. 45 2007; 349-357.

[25] Tan X, Chen QLiX, Wang Z, Shi Z, Bi K, Jia Y. Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in Herba Artemisiae Scopariae (Yin Chen) from different harvest seasons by HPLC–DAD. J Pharm Biomed Anal 47 2008; 847-853.

[26] Chena H, Li X, Chen J et al. Simultaneous determination of eleven bioactive compounds in Saururus chinensis from different harvesting seasons by HPLC-DAD. J Pharm Biomed Anal 51 2010;1142–1146.

[27] Dey A, Singh GN, Easwari TS, Pandey MK. Analytical techniques in quality evaluation of herbal drugs. Asian J Pharm Res. Vol 4. Issue 3. 2014;112-117.

[28] Sharma PP. How to practice GMPs Vandana publications. 1995.

[29] Mok DKW, Chau FT. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. Volume 82. Issues 1–2. 2006;210-217.

[30] Zschocke S, Classen-Houben D, Bauer R. Radix *Angelicae sinensis*: Danggui. Verlag fur Ganzheitliche Medizin. Wald (Germany). 2001.

[31] Zschocke S, Classen-Houben D, Bauer R. Radix *Ligustici chuanxiong*: Chuanxiong. Verlag fur Ganzheitliche Medizin. Wald (Germany). 2001.

[32] Foster S, Tyler VE. Tyler's Honest Herbal. Haworth Herbal Press. New York. 1999.

[33] Murray MT, Am J Nat Med.4. 1997;14-19.

[34] Tyler VE. Phytomedicines: Back to the Future. J Nat Prod 62. 1999;1589-1592.

[35] Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lherietier J, Grenier-Loustalot MF. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. J Chromatogr, A 1021. 2003;145-155.

[36] Center for Drog Evaluation and Research. Guidance for Industry: Botanical drug Products. Food and Drug Administration. 2004.

[37] The Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC): CPMP/QWP/2820/00 Rev. 2, Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances , herbal preparations and herbal medicinal products /traditional herbal medicinal products, 31 March 2011.

[38] He J, Wu X, Kuang Y, Wang T, Bi K, Li Q. Quality assessment of Chrysanthemum indicum Flower by simultaneous quantification of six major ingredients using a single reference standard combined with HPLC fingerprint analysis. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 11. Issue 2. April 2016; 265-272.

[39] Yoshikawa M, Yoshikawa T, Murakami T, et al. Medicinal flowers. I. Aldose reductase inhibitors and three new eudesmane-type sesquiterpenes, kikkanols A, B, and C, from the flowers of Chrysanthemum indicum L.Chem Pharmaceut Bullt. 3 1999;340-345.

[40] Shen S, Sha YF, Deng CH, et al. Quality assessment of flos chrysanthemi indici from different growing areas in China by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogra A, 1047. 2004;281-287.

[41] Xiao-na X, Jun-hui J, Yi-zeng L, Xiao-ru L, Lun-zhao Y. Chromatographic fingerprint analysis of Fructus Aurantii Immaturus by HPLC-DAD and chemometrics methods. Journal of Central South University of Technology. Volume 18. Issue 2. April 2011;353–360.

[42] Jian Y. The modern study and clinical application of Chinese medicine [M]. Beijing: Publishing House of Xueyuan. 1993; 468.

[43] Wen-kai W, Xiao-lan G. The study progress of immature bitter orange [J]. Hunan Guiding Journal of TCM. 2003; 9(12): 55–56.

[44] Yu-ting C, Rong-liang Z, Zhong-jian J, Yong J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1990; 9(1): 19–21.

[45] Carpene C, Galitzky J, Fontana E, Atgie C, Lafontan M. Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: Comparative studies in mammalian fat cells [J]. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology. 1999; 359(4): 310–321.

[46] He X, Li J, Zhao W, Liu R, Zhang L, Kong X. Chemical fingerprint analysis for quality control and identification of Ziyang green tea by HPLC. Food Chemistry 171. 2015; 405–411.

[47] Karori SM, Ngure RM, Wachira FN, Wanyoko JK., Mwangi J. Different types of tea products attenuate inflammation induced in Trypanosoma brucei infected mice. Parasitology International 57, (2008); 325–333.

[48] Cabrera C, Giménez R, López MC. Determination of tea components with antioxidant activity. Journal of Agricultural Food Chemistry 51. 2003;4427–4435.

[49] Wang S, Zhang J, Guangsheng JL, Fu QC. Quality evaluation of Huaijiao pill by chromatographic fingerprint and simultaneous determination of its major bioactive components. Journal of Pharmaceutical Analysis. Volume 6. Issue 4. August 2016; 249-255.

[50] Dong YX, Wang W. 63 cases of Huaijiao pill on hypertension. Shaanxi J. Tradit Chin Med. 22 2001; 604.

[51] Lu ZL, Liu YH. Decoction of Huaijiao to treat 175 cases of chronic pharyngitis. China Naturop 6. 1997; 28.

[52] Schaneberg BT, Crockett S, Bedir E, Khan IA. The role of chemical fingerprinting: applicattion to *Ephedra*. Science Direct. Phytochemistry 62 (2003); 911-918.

[53] Bensky D, Gamble A. Chinese Herbal Medicine: Materia Medica. Eastland Press. Seattle 1993.

[54] Narodne novine: Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje zabranjeno ili ograničeno. Broj 160/13. Narodne novine, 2013.

[55] Caveney S, Charlet DA, Freitag H, Maier-Stolte M, Strarratt AN. New observations of the secondary chemistry of world. Ephedra (Ephedraceae). Am J Bot. 88 2001; 1199–1208.

[56] Fouad-Tarazi FM, Okabe M, Goren H. Alpha sympathomimetic treatment of autonomic insufficiency with orthostatic hypotension. Am J Med. 99 1995; 604–610.

[57] Skinner HF. Methamphetamine synthesis via hydriodic acid/red phosphorus reduction of ephedrine. Forensic Sci Int 48 1990; 123–134.

[58] Betz, JM, Gay, ML, Mossoba MM, Adams S. Chiral gas chromatographic determination of ephedrine-type alkaloids in dietary supplements containing Ma huang. J AOAC Int. 80 1997; 303–315.

[59] Chinaka S, Tanaka S, Takayama N, Komai K, Ohshima T, Ueda K. Simultaneous chiral analysis of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis. J Chrom B 2000; 749, 111–118.

[60] Gurley BJ, Wang P, Gardner SF. Ephedrine-type alkaloid content of nutritional supplements containing Ephedra sinica (mahuang) as determined by high performeance liquid chromatography. J Pharm Sci 87. 1998;1547–1553.

[61] Baozhong D, Jianyong H, Linfang H, Xianying Y, Fuying C. Chemical fingerprint analysis of Gentianae Radix et Rhizoma by high-performance liquid chromatography. Acta Pharmaceutica Sinica B. Institute of Materia Medica. Chinese Academy of Medical Sciences. Chinese Pharmaceutical Association 2012; 2(1):46-52.

[62] The State Pharmacopoeia Committee of China. The pharmacopoeia of the People's Republic of China. China Medical and Technology Press. Beijing 2010; 34.

[63] Duan BZ, Wang LZ, Dai XH, Huang LF, Yang MR, Chen SL. Identification and quantitative analysis of nucleosides and nucleobases in aqueous extracts of Fritillaria Cirrhosa D. Don. using HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. Anal Lett. 44 (2011); 2491–2502.

[64] Xie PS. Chromatography fingerprint of traditional Chinese medicine. People's Medical Publishing House. Beijing 2005;18–104.

[65] Chen SB, Liu HP, Tian RT, Yang DJ, Chen SL, Xu HX et al. High-performance thin-layer chromatographic fingerprints of isoflavonoids for distinguishing between Radix Puerariae Lobate and Radix Puerariae Thomsonii. J Chromatogr A. 1121 (2006); 114–119.

[66] Tang DQ, Zheng XX, Chen X, Yang DZ, Du Q. Quantitative and qualitative analysis of common peaks in chemical fingerprint of Yuanhu Zhitong tablet by HPLC-DAD–MS/MS. Journal of Pharmaceutical Analysis. Volume 4. Issue 2. April 2014; 96–106.

[67] Xu CJ, Liang YZ, Chau FT et al. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. J Chromatogr A. 1134 (1–2) (2006); 253–259.

[68] National Commission of Chinese Pharmacopoeia: Pharmacopoeia of Peoples Republic of China. Chemical Industry Press. Beijing. 2010; 525–526.

[69] Wang KT, Liu HT, Chen XG et al. Identification and determination of active components in Angelica dahurica Benth and its medicinal preparation by capillary electrophoresis. Talanta. 54 (4) (2001); 753–761.

[70] Zhang J, Jin Y, Dong J, et al. Systematic screening and characterization of tertiary and quaternary alkaloids from corydalis yanhusuo W.T. Wang using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. Talanta. 78 (2) (2009); 513–522.

[71] Wang GF, Liao ZG, Liang XL, et al. Determination of three active components in Yuanhu Zhitong tablet by HPLC. China Pharm. 20 (9) (2009); 672–674.

[72] Zhang Y, Xu H, Chen X, et al. Simultaneous quantification of 17 constituents from Yuanhu Zhitong tablet using rapid resolution liquid chromatography coupled with a triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 56 (3) (2011); 497–504.

[73] Xu H, Zhang Y, Tao Y, et al. Study of chemical fingerprint for yuanhu zhitong tablet by UPLC/Q–TOF–MS. J Liq Chromatogr Relat Technol. 36 (6) (2013); 807–820.