Nove kineske biljne droge (flores et fructus) u 9. izdanju Europske farmakopeje

Kovačević, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

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:163:551393

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ana Kovačević

Nove kineske biljne droge (flores et fructus) u 9. izdanju Europske farmakopeje

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen je na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Biljane Blažeković, mag. pharm.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Biljani Blažeković na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, prenesenom znanju i brojnim savjetima te potpori i strpljenju prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, posebice sestri Luciji, te prijateljima koji su mi sve vrijeme bili velika podrška.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. OBRAZLOŽENJE TEME 4
3. MATERIJALI I METODE 5
4. REZULTATI I RASPRAVA 6
4.1. Evodiae fructus (吴茱萸 , Wu Zhu Yu) 6
4.1.1. Opis biljne droge 7
4.1.2. Opis biljke 7
4.1.3. Fitokemijski sastav 8
4.1.4. Upotreba u TCM-u 8
4.1.5. Farmakološki učinci 9
4.1.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9 13
4.2. Gardeniae fructus (栀子, Zhi Zi) 16
4.2.1. Opis biljne droge 16
4.2.2. Opis biljke 17
4.2.3. Fitokemijski sastav 17
4.2.4. Upotreba u TCM-u 18
4.2.5. Farmakološki učinci 19
4.2.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9 22
4.3. Polygoni orientalis fructus (水红花子, Shui Hong Hua Zi) 24
4.3.1. Opis biljne droge 24
4.3.2. Opis biljke 24
4.3.3. Fitokemijski sastav 25
4.3.4. Upotreba u TCM-u 26
4.3.5. Farmakološki učinci 26
4.3.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9 27
4.4. Zanthoxyli bungeani pericarpium (花椒, Hua Jiao) 30
4.4.1. Opis biljne droge 30
4.4.2. Opis biljke 30
4.4.2. Fitokemijski sastav 31
4.4.4. Upotreba u TCM-u 32
4.4.4. Farmakološki učinci 33
4.4.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9 35
4.5. Magnoliae biondii flos immaturus (辛夷花, Xin Yi) 36

4.5.1. Opis biljne droge 36
4.5.2. Opis biljke 36
4.5.3. Fitokemijski sastav 37
4.5.4. Upotreba u TCM-u 39
4.5.5. Farmakološki i klinički učinci 39
4.5.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9 41
5. ZAKLJUČAK 45
6. LITERATURA 46
7. SAŽETAK / SUMMARY 54
Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card

1. UVOD

Prije više od 2000 godina, tradicionalna kineska medicina (*eng*. traditional Chinese medicine, TCM) je formirala jedinstveni sustav teorije za dijagnosticiranje i liječenje bolesti. TCM se razvio kao oblik neinvazivne terapijske intervencije (također opisane kao narodna medicina ili tradicionalna medicina) ukorijenjene u drevne sustave vjerovanja, uključujući tradicionalne vjerske koncepte. TCM je u osnovi holistička i vrlo različita od racionalne, zapadnjačke medicine. Bez obzira što je fenomen ljudskog tijela njihov zajednički subjekt, one se prilično razlikuju po akademskim pogledima, teorijskim okvirima, načinu razmišljanja, kliničkoj praksi, teoriji primjene lijekova i drugim pristupima (Li i Xu, 2011).

Za razliku od drugih oblika tradicionalne medicine koji su s vremenom uglavnom izgubili na važnosti, tradicionalna kineska medicina nastavlja se kao posebna grana moderne medicinske prakse, a u Kini je važan dio sustava javne zdravstvene zaštite. Posljednjih nekoliko desetljeća nastoji se integrirati sa zapadnjačkom, na znanstvenim dokazima utemeljenim medicinom. TCM se odlikuje se prepoznavanjem jedinstvenosti svakog ljudskog bića, potrebom za očuvanjem zdravlja i prevencijom bolesti, odnosno liječenjem usmjerenim na uklanjanje uzroka bolesti, koje je prilagođeno svakom pacijentu pojedinačno. Za razumijevanje samih načela dijagnostike i liječenja u TCM-u nužno je poznavanje temeljnih teorija na kojima se ona zasniva – Teorija o Yinu i Yangu, Teorija pet elemenata, Teorija o Qi energijii i Teorija o šest kanala. Temelje se na tome da je ljudsko tijelo mali svemir s nizom kompletnih i sofisticiranih, međusobno povezanih sustava koji obično rade u ravnoteži kako bi održali zdravu funkciju ljudskog tijela. TCM ima jedinstveni model tijela, koji se osobito bavi sustavom meridijana. Za razliku od zapadnog anatomskog modela, koji dijeli fizičko tijelo u dijelove, kineski se model više bavi funkcijom. Tijelo je sustav ravoteže s primarnom vitalnom energijom „qi“ koja mora pravilno cirkulirati tijelom duž tzv. „meridijana“. Zdravlje je rezultat sklada i ravnoteže, koji su u bolesnom organizmu narušeni, te je glavni cilj terapije njihova ponovna uspostava i očuvanje. Najčešće korišteni oblici liječenja obuhvaćaju akupunkturu i fitoterapiju, ali tu je i niz drugih metoda poput dijetoterapije, akupresure, Tui-Na masaže, te vježbi za duh i tijelo (Tai Chi i Qi Gong) (Zhangfu i sur., 2014; Bensky i sur., 2004).

Fitoterapija predstavlja okosnicu tradicionalne kineske medicine pri čemu je svaka biljna droga, u skladu s TCM načelima, okarakterizirana specifičnim svojstvima kao što su temperatura, okus, način djelovanja i kanalskim tropizmom. Priroda tvari najčešće se opisuje

izrazima koji se odnose na temperaturna obilježja droge pri čemu vruće, hladno, toplo, prohladno i neutralno predstavljaju pet glavnih pojmova. Sama karakterizacija temperaturnih obilježja od izuzetne je važnosti jer se ovisno o njima, droge koriste u različite svrhe. Štoviše, prema TCM teoriji „vruće bolesti treba hladiti, a hladne bolesti grijati". Ponekad postoji potreba i za dodatnim izrazima poput „blago hladno" kako bi se priroda tvari što detaljnije okarakterizirala (Zhangfu i sur., 2014; Bensky i sur., 2004). Okus predstavlja drugo bitno svojstvo kineskih ljekovitih droga. Postoji pet različitih okusa: oštar, sladak, gorak, kiseo i slan, a tvari koje se ne svrstavaju ni u jednu od navedenih kategorija smatraju se blagima. U Yang svojstva se ubrajaju sladak, oštar i neutralan okus, a kiseo, gorak i slani okus pripadaju Yin svojstvima. Poput prirode tvari, terapijsko djelovanje droge prema TCM-u određeno je i okusom biljke. Svaki okus ima neko svojstvo, pa tako oštre tvari raspršuju, slatke usklađuju, a mogu se koristiti i za vlaženje, gorke tvari suše dok kisele tvari stežu i sprečavaju curenje tekućina, slane tvari omekšavaju i pročišćuju dok blage tvari odvlažuju te potiču mokrenje. Prema TCM teoriji smatra se da droge ovisno o okusu kojeg imaju odlaze u pojedine organe i tamo djeluju. U skladu s tim kisele odlaze u jetru, oštre u pluća, gorke u srce, slane u bubreg i slatke u slezenu. Ako se povežu svojstvo okusa i temperature biljne droge, može se spoznati njezino terapijsko djelovanje. Takav koncept zaslužan je za razvoj osam terapijskih metoda koje po prvi put spominje liječnik Cheng Zhong-Lingu u svom djelu Medical Revelations, a uključuju poticanje znojenja, izazivanje povraćanja, pročišćavanje, usklađivanje, zagrijavanje, čišćenje, tonificiranje i smanjivanje (Bensky i sur., 2004).

Jedna od teorija TCM-a je teorija kanala, koja je važna za shvaćanje djelovanja biljnih droga. Prema toj teoriji u ljudskom tijelu se nalazi 12 glavnih i 8 pomoćnih kanala. Oni predstavljaju poveznicu između vanjskih i unutarnjih dijelova tijela kao i između gornjih i donjih organa. Svaka biljna droga ovisno o svojstvima koje posjeduje (temperatura, okus) ulazi u neki kanal. Tako na primjer, biljne droge slatkog okusa ulaze u slezenu (Zhangfu i sur., 2014).

Kineske ljekovite droge uglavnom susrećemo u višekomponentnim smjesama koje se nazivaju formule i najčešće sadrže od 6 do 16 biljnih droga. Određena bolest, čiji je uzrok nastanka različit, može se liječiti različitim formulama. Postoji hijerarhija prema kojoj se određuje recept za formulu. *Jun* ili vođa je glavna komponenta formule koja liječi uzrok bolesti. *Chen* ili ministri pomažu, odnosno pojačavaju djelovanje glavne komponente, a *Zuo ili* asistenti imaju ulogu da ublaže nuspojave i toksičnost glavnih komponenti. S*hi (glasnici)* služe kao „nosači" te olakšavaju prodor glavnih komponenti do ciljnih organa. U slučaju da jedna komponenta hijerarhije može obaviti funkciju neke druge komponente, nije nužno da

formula sadrži sve tipove hijerarhije. Međutim, kombiniranjem svih komponenti postigao bi se, bolji učinak, temeljen na sinergijskom djelovanju, te bi se mogla primijeniti i manja doza komponenti, a samim time bio bi smanjen profil nuspojava kao i mogućnost pojave toksičnosti (Bensky i sur., 2004).

Priprema biljne droge za primjenu u liječenju u tradicionalnoj kineskoj medicini često je puno zahtjevnija i složenija nego što je to slučaj kod zapadnjačke fitoterapije. Posebnost predstavlja obrada sirove ljekovite droge i priprema tzv. *dekokcijskih komadića*. Svi procesi kojima droga biva podvrgnuta nakon sakupljanja, poput sušenja, prženja, kalciniranja, obrade parom, kuhanja i dr., podrazumijevaju obradu droge čiji je krajnji korak priprema kineske *materia medica* koja se koristi u medicinske svrhe. Najčešći ljekoviti oblik za primjenu TCM droga odnosno formula je dekokt, no zastupljeni su i popularni i drugi oblici poput granula, tableta, kapsula i injekcija (Zhao i sur., 2006).

S obzirom da tradicionalna kineska medicina već stoljećima igra vrlo važnu ulogu u zaštiti zdravlja i kontroli bolesti ne samo u Kini već i u drugim azijskim zemaljama te se očuvala do danas i čini važan segment kineskog zdravstvenog sustava, u novije je vrijeme sve češća tema znanstvenih istraživanja. Znanstvenici širom svijeta, koji su u potrazi za novim lijekovima, prepoznali su potencijal kineskih ljekovitih droga pa danas pronalazimo sve više rezultata znanstvenih studija objavljenih u međunarodnim časopisima i na svima razumljivom engleskom jeziku. Posebnu potvrdu TCM-u i kineskim biljnim drogama kao bogatom izvoru novih molekula predstavlja dodjela Nobelove nagrade za medicinu 2015. godine kineskoj znanstvenici Youyou Tu za otkriće artemizinina, novog lijeka čijim je pronalaskom značajno unaprijeđeno liječenje malarije u svijetu, a za što su zaslužne upravo spoznaje o tradicionalnoj primjeni biljke *Artemisia annua* iz koje je spoj izoliran.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Poznato je da se TCM uvelike temelji na fitoterapiji. U svakodnevnoj praksi koristi se nekoliko stotina ljekovitih biljaka i biljnih pripravaka. U ovom radu teorijski je istraženo pet odabranih ljekovitih biljnih droga koje imaju dugu tradiciju primjene u kineskoj medicini. Cilj rada bio je da se na temelju stručnih i znanstvenih podataka pruži uvid u njihovu tradicionalnu primjenu te prikažu najnovije spoznaje o fitokemijskom sastavu kao i neklinički i klinički dokazi o djelovanju i sigurnoj primjeni. Istražene su nove biljne droge dobivene od plodova i cvjetnih pupova kineskih biljaka za koje su uspostavljene norme kakvoće u vidu monografija u važećem devetom izdanju Europske farmakopeje. Zbog njihove važnosti za sva područja farmacije, monografije istraživanih biljnih droga prevedene su na hrvatski jezik kako bi se omogućila njihova primjena u svakodnevnoj praksi. Rad je izrađen sa svrhom usvajanja novih znanja u području etnofarmakognozije i omogućavanja procjene znanstvene utemeljenosti primjene pojedinih droga tradicionalne kineske medicine u suvremenoj fitoterapiji.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu provedeno je teorijsko istaživanje biljnih droga s dugom primjenom u sustavu tradicionalne kineske medicine. Odabrano je pet ljekovitih biljnih droga koje se dobivaju od plodova i cvjetnih pupova kineskih biljaka i za koje su utemeljene norme kakvoće u Europskoj farmakopeji:

1. Evodiae fructus (吴茱萸 , Wu Zhu Yu)
2. Gardeniae fructus (栀子, Zhi Zi)
3. Polygoni orientalis fructus (水红花子, Shui Hong Hua Zi)
4. Zanthoxyli bungeani pericarpium (花椒, Hua Jiao)
5. Magnoliae biondii flos immaturus (辛夷花, Xin Yi)

Rad je nastao pregledom stručne literature i pretraživanjem znanstvenih i drugih baza podataka (PubMed, ScienceDirect, Scopus, Cochrane Library, Google znalac). Kao ključne riječi u pretraživanju su korišteni latinski nazivi biljnih droga i odgovarajućih biljnih vrsta: Evodiae fructus, *Evodiae rutaecarpa*, Gardeniae fructus, *Gardenia jasminoides*, Polygoni orientalis fructus, *Polygonum orientale*, Zanthoxyli bungeani pericarpium, *Zanthoxylum bungeanum*, Magnoliae biondii flos immaturus, *Magnolia biondii*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljednja dva desetljeća u Europi je znatno porastao interes za fitoterapiju te se u skladu s tim na tržištu svakodnevno pojavljuje sve veći broj novih, ne-europskih biljnih vrsta s privlačnim ljekovitim svojstvima. Znatan broj njih čine upravo biljne droge koje se koriste u tradicionalnoj kineskoj medicini. Stoga je usvajanje novih znanja iz područja etnofarmakognozije prepoznato kao važan i neophodan korak u praćenju suvremenih trendova u fitofarmaciji. Na temelju rezultata sustavnog pretraživanja i proučavanja relevantne stručne i znanstvene literature, u nastavku je dan pregled biljnih izvora, tradicionalne primjene, rezultata dosadašnjih fitokemijskih istraživanja te pretkliničkih i kliničkih studija za pet odabranih kineskih biljnih droga: Evodiae fructus, Gardeniae fructus, Polygoni orientalis fructus, Zanthoxyli bungeani pericarpium i Magnoliae biondii flos immaturus.

4.1. Evodiae fructus (吴茱萸 , Wu Zhu Yu)

Evodiae fructus (engl. Evodia fruit) je kineska ljekovita droga dobivena od biljne vrste *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. iz porodice Rutaceae (Slika 1.).



Slika 1. Evodiae fructus

(preuzeto s http://tcmwiki.com/wiki/fructus-evodiae)

4.1.1. Opis biljne droge

Cijeli plod je peterokutan do sferoidan, plosnat na vrhu, oko 2-5 mm u promjeru. Sastoji se od 5 režnjeva više ili manje povezanih zajedno, s tamnom zeleno-smeđom ili smeđom vanjskom površinom, hrapavom, s brojnim izbočenjima zbog prisutnosti uljnih šupljina; plosnati gornji dio je više ili manje zvjezdast dok stožasti donji dio nosi dlakave ostatke lapova i stapke. Tekstura je gruba. Poprečni presjek ploda pokazuje pet šupljina, od kojih svaka sadrži sitnu žućkastu sjemenku (EDQM, 2018).

4.1.2. Opis biljke

Evodia rutaecarpa (Juss.) Benth. (Rutaceae) je malo listopadno stablo, visine 3-10 metara (Slika 2.). Listovi su perasti, složeni jedan nasuprot drugom, osim vršnog neparnog lista. Sastoje se od 5 ili 7 tamnozelenih, ovalnih liski, zaobljenih pri bazi, koje s donje strane imaju dlake i mnogo žlijezda. Ljeti, u srpnju i kolovozu, cvjetaju brojni mali bijeli cvjetići tvoreći cvat u obliku gronje. U jesen nose male zeleno-crveno-smeđe plodove, okrugle tobolce koji su plosnati na vrhu, promjera 3-5mm. Na vrhu tobolca nalaze se dva pretinca. Plod je neobičnog aromatičnog mirisa te gorkog i ljutog okusa. Biljka je rasprostranjena u Kini, Indiji i Japanu. Raste na padinama i u šumama. Danas se uglavnom uzgaja (WHO, 1989).



Slika 2. *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth

(preuzeto s http://www.plantea.com.hr/evodija)

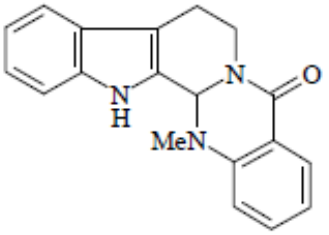
4.1.3. Fitokemijski sastav

Glavne bioaktivne sastavnice droge Evodiae fructus su (Slika 3):

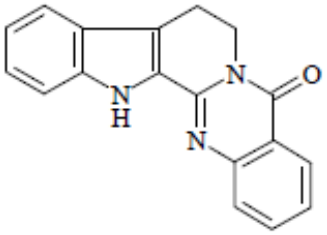
- **indolpiridokinazolinski alkaloidi:** evodiamin i rutekarpin, dihidrorutekarpin, 14-formilrutekarpin, 7-karboksievodiamin i retizinin
- **kinolonski alkaloidi i drugi spojevi koji sadrže dušik:** evokarpin, dihidroevokarpin, 1-metil-2-pentadecil-4(1H)-kinolon, 1-metil-2-undecil-4(1H)-kinolon, sinefrin
- **limonoidi:** evodin, evodol (limonin diosfenol), evodinon (rutevin), obakunon, jangomolid, rutaevin acetat, graucin A, 12α-hidroksilimonin, 12α-hidroksievodol, 6α-acetoksi-5-epilimonin i 6β-acetoksi-5-epilimonin
- **flavonoidi:** 4', 5,7-trihidroksi-6(ili 8)-(3-metilbut-2enil)flavanon, 7,4'-di-O-β-D-glukopiranozid
- **monoterpeni/fenilpropeni (eterično ulje):** mircen, β-felandern, limonen, α-terpineol, linalol, β-elemen, trans-kariofilen, metileugenol
- **triptaminski derivati** (Wagner i sur., 2011).

4.1.4. Upotreba u TCM-u

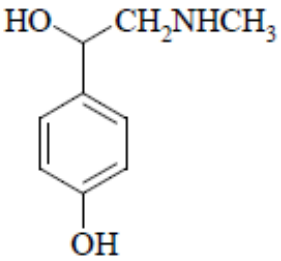
U tradicionalnoj kineskoj medicini se plodovi biljne vrste *Evodia rutaecarpa* koriste kod hladno-vrućih poremećaja organa. Droga zagrijava organe, raspršuje hladnoću, potiče pokretanje „qi“ energije te ublažava bol. Prvenstveno djeluje na jetru i želudac kako bi spriječila mučninu i povraćanje, no sprječava i dijareju povezanu s deficijencijom slezene i bubrega. Kako bi se postiglo efikasnije djelovanje može se kombinirati s drugim drogama. U kombinaciji s drogama Artemisiae argyi folium i Cyperi rhizoma koristi se za dismenoreju uzrokovanu hladnoćom u maternici. Zajedno s drogama Zingiberis rhizoma i Pinelliae rhizoma preparatum koristi se kod bolova u trbuhu, povraćanja i regurgitacije kiseline zbog hladnoće u želucu (Bensky i sur., 2004).



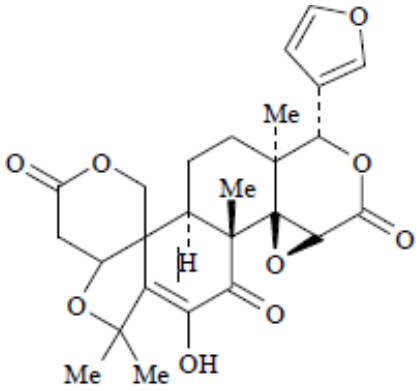
Evodiamin



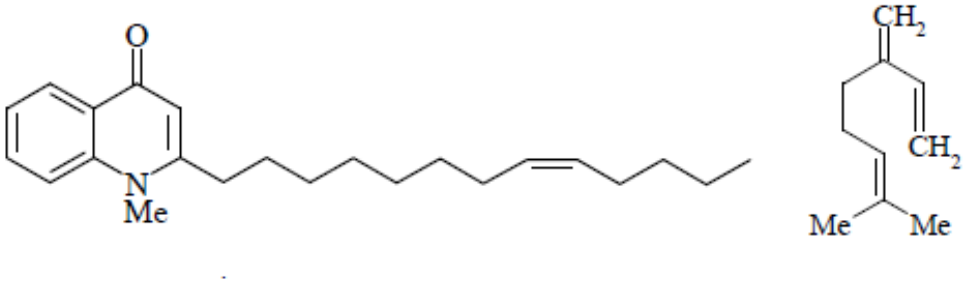
Rutekarpin



Sinefrin



Evodol



Evokarpin

Mircen

Slika 3. Bioaktivne sastavnice droge Evodiae fructus

4.1.5. Farmakološki učinci

Pregledom stručne i znanstvene literature nađen je veći broj pretkiničkih studija o farmakološkim učincima biljne droge Evodiae fructus, dok kontrolirane kliničke studije koje bi sa sigurnošću potvrdile djelotvornost i sigurnost primjene u ljudi dosad nisu provedene.

Protutumorsko djelovanje

Alkaloid evodiamin izoliran iz biljne vrste *E. rutaecarpa* pokazao se kao učinkovito sredstvo protiv tumora. Djelovanje se temelji na inhibiciji enzima topoizomeraze I, stabilizacijom kovalentnog kompleksa između topoizomeraze I i DNA, što rezultira blokadom replikacije i

transkripcije DNA (Lin i sur., 2010). Naknadno su otkriveni derivati evodiamina koji iako strukturno različiti (acilacija ili alkilacija na N13 poziciji evodiamina) djeluju na isti način. 13-(4-klorobenzoil)-10-hidroksievodiamin. Primjenom MTT testa ustanovljeno je da su 3-metoksievodiamin i 3-fluoro-10-metoksievodiamin djelotvorni protiv A549stanica humanog karcinoma pluća, HCT116 stanica humanog karcinoma kolona i MDA MB 435 stanica humanog karcinoma dojke (Sheng i sur., 2012). Oksaevodiamin ili tiaevodiamin pokazuju 50%-tnu inhibiciju rasta tumorskih stanica u koncentraciji od 2,4 μg/ml – 3,13 μg/ml (Sheng i sur., 2014).

Antitumorsko djelovanje evodiamina se povećava kad se primjenjuje u kombinaciji s drugim inhibitorima, poput antagonista receptora za epidermalni faktor rasta (EFGR) i Bcl-2 inhibitora. Evodiamin primijenjen istovremeno u kombinaciji s inhibitorom Bcl-2, kao što su Navitoclax (ABT-263) i ABT-737, pokazao je sinergističko djelovanje na stanice humanog karcinoma jetre (HepG2 i HuH-7) i karcinoma pluća ne-malih stanica (A549) (Zhao, 2012; Zhao, 2014).

Biljne formulacije koje sadrže kombinaciju berberina, evodiamina i rutekarpina u omjeru 6:3:1 pokazale su se djelotvornima protiv raka debelog crijeva. Pokazala su to istraživanja dobivena na modelu štakora kojima je rak crijeva uzrokovan dimetilhidrazinom (Tao i sur., 2011). Istraživanje farmakokinetičkog profila evodiamina kod štakora ukazalo je na njegovu slabu bioraspoloživost zbog njegove slabo topljivosti (Kornatsu i sur, 1993). Stoga su istraživanja usmjerena na poboljšanje bioraspoloživosti, topljivosti i stabilnosti alkaloida ili njegovih derivata. Ovi parametri su povećani bilo pripremom nano-emulzije, nanočestice, pripremom novih derivata evodiamina ili kombinacijom alkaloida s drugim bioaktivnim tvarima.

Protuupalni učinak

Topikalna primjena pripravka koji sadrži evodiamin pokazala je protuupalni učinak inhibicijom artritisa na modelu štakora kod kojeg je artritis uzrokovan kolagenom tipa II. Ova formulacija je bila učinkovita kada se primjenjivala na edem tijekom 10 dana u dozi od 0,1 g dnevno (Mineo, 1994).

Formulacija koja sadrži indolkvinazolin alkaloid poput evodiamina, butilirani hidroksitoluen (0,4-0,6 mg/ml) i butilenglikol kao nosač, inhibira COX-2 receptore te otpuštanje UV-induciranih prostaglandina E-2 (PGE2) u stanicama kože. Na taj način inhibira upalne procese u ciljnim stanicama (Yarosh i sur., 2006).

Učinak na metaboličke bolesti

Detaljna analiza farmakoloških učinaka opisanih u patentnim dokumentima pokazala je da se evodiamin i njegovi derivati uglavnom koriste u dodacima prehrani ili terapijskim formulacijama korisnim u prevenciji ili liječenju poremećaja metabolizma kao što su pretilost, dijabetes, hiperuricemija i giht.

Za evodiamin kao sredstvo protiv pretilosti, u kombinaciji s glukagon sličnim peptidom-2 (GLP-2), pokazano je da smanjuje pretilost i da se koristi za prevenciju poremećaja prehrane (Henriksen, 2004).

Dodaci prehrani koji sadrže eviodamin, cimet i ekstrakt cimeta potakli su gubitak tjelesne mase snižavanjem razine glukoze u krvi nakon oralne primjene jedan do tri puta dnevno u dozi od 100 i 500 mg (Fehre i sur., 2006; Romero i sur., 2006). Dodatak prehrani koji sadrži evodia ekstrakt standardiziran na 10% evodiamina u kombinaciji s *Polygonum multiflorum*, parazitskom biljkom Loranthus i zelenim čajem inhibira sintezu masnih kiselina (Romero, 2006). Nadalje, proizvod koji sadrži *Evodia rutaecarpia* extract standardiziran na sadržaj od 0,05 mg do oko 0,50 mg evodiamina, kao i johimbin i L-karnitina, smanjuje tjelesnu masu kod pojedinca pojačanjem termogeneze i oksidacije lipida (Heuer i sur., 2008). Za pripravke koji sadrže 7 do 13 dijelova evodiamina u obliku disperzibilne tablete, smatra se da su učinkoviti u liječenju hiperuricemije i gihta budući da je poboljšana topljivost evodiamina, a time i veća njegova apsorpcija u ljudskom tijelu (Ying i sur., 2012).

Učinak na središnji živčani sustav

Studije sugeriraju da bi droga Evodiae fructus mogla biti korisna u liječenju moždanog udara, degenerativnih demencija poput Alzheimerove bolesti (AB) ili migrene. Primjerice, oralna formulacija koja sadrži evodiamin pokazala se učinkovitom u liječenju moždanog infarkta ili demencije kada se primjenjivala u dozi od 1-10 mg tri puta dnevno (Joji i sur., 1988). Derivat evodiamina, dehidroevodiamin, smatra se korisnim u liječenju AB, vaskularne demencije, senilne demencije, presenilne demencije, učenja i oslabljenog pamćenja, mentalne retardacije kod djece, moždanog udara i apopleksije. *In vivo* pokus u kojem je dehidroevodiamin hidroklorid primijenjen štakorima kojima je amnezija inducirana skopolaminom, pokazao je da doza od 6,25 mg/kg dehidroevodiamina poboljšava pamćenje. Dehidroevodiamin djelovao je kao inhibitor acetilkolinesteraze. Drugi mehanizmi djelovanja ovog derivata uključuju inhibiciju pretjerane aktivacije mikroglija u tkivu mozga, snižavajući prekomjernu ekspresiju citokina interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) i čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF-

alfa); snižavajući ekspresiju ciklooksigenaze-2 i inhibirajući upalnu reakciju središnjeg živčanog sustava (Wang, 2008).

Zhang i suradnici (2018) su *in vitro* i *in vivo* istraživanjima dokazali da evodiamin djeluje neuroprotektivno. Na modelu l-glutamatom-potaknute apoptoze HT22 stanica, evodiamin je značajno povećao vijabilnost stanica, spriječio prekomjerno nakupljanje reaktivnih kisiskovih spojeva, poboljšao mitohondrijsku funkciju te povećao sadržaj B-limfoma-2 proteina i inhibirao visoke razine ekspresije Bax, Bad i cijepane kaspaze-3 i -8 u l-Glu-tretiranim stanicama. Također je pojačao ekspresiju p-Akt i p-mTOR proteina pa se smatra da je neuroprotektivno djelovanje evodiamina barem djelomično povezano s njegovom sposobnošću reguliranjem Akt/mTOR signalnog puta i povezanih proteina, posebice jer je poznato da taj signalni put ima središnju ulogu u regulaciji staničnih procesa i to osobito kod neuroloških bolesti. Na animalnom modelu AB je izazvana kombinacijom D-gal i $AlCl_3$, s obzirom da je poznato da dugotrajni unos $AlCl_3$ hranom može povećati razinu amiloid-β peptida Aβ42 i ubrzati taloženje plaka, što je upravo jedno od glavnih obilježja bolesti (Pratico i sur., 2002). Aβ42 je manje topljiv od Aβ40 i lakše se nakuplja tvoreći anti-paralelne β-nabrane ploče, a također može djelovati i kao pokretač agregacije Aβ40. Studija je pokazala da evodiamin bitno poboljšava kognitivne sposobnosti miševa jer je smanjio njihove besciljne i kaotične pokrete, vrijeme provedeno na središnjem području u testu otvorenog polja i vrijeme latencije u Morisovom vodenom labirintu. Dokazano je da evodiamin smanjuje taloženje Aβ42 u mozgu i povećao njegovu razinu u serumu, ali nije pokazao značajne učinke na Aβ40. Pored toga, šestotjedna primjena evodiamina značajno je potisnulo oksidativni stres moduliranjem razina povezanih enzima. U središnjem kolinergičkom sustavu AD miševa, evodiamin je značajno povećao razine serumskog acetilkolina i acetilkolintransferaze te smanjio razinu acetilkolinesteraze u serumu, hipotalamusu i mozgu. Dobiveni eksperimentalni dokazi govore u prilog evodiaminu kao neuroprotektivnom kandidatu za prevenciju i/ili liječenje neurodegenerativnih bolesti.

Utvrđeno je da evodiamin blokira kalijeve kanale pa se koristi za liječenje migrene ili glavobolja. Smanjuje ili inhibira dilataciju arterija, osobito unutar mozga (Olesen i sur., 2007). Evodiamin aktivira TRPV1 kanale te se može koristiti za liječenje ili ublažavanje grčeva mišića i za oporavak od neuromuskularne razdražljivosti i umora zbog fizičkog napora. Produljena izloženost TRPV1 receptora evodiaminu posljedično uzrokuje povećanje razine unutarstaničnog kalcija koja vodi desenzitizaciji tih receptora i rezultira analgetskim učinkom evodiamina (Bean i sur., 2012).

Učinak na kardiovaskularni sustav

Na animalnom modelu je dokazano da evodiamin ima sposobnost snižavanja krvnog tlaka (Xu i sur., 2012). Primjenjen parenteralno u dozi od 0,1-1 mg/kg/dan i oralno u dozi od 10 mg/kg/dan evodiamin je pojačao kontrakcije srčanog mišića te se stoga smatra korisnim u prevenciji različitih kardijalnih abnormalnosti.

Kozmetički učinci

Ekstrakti koji sadrže evodiamin ili njegove derivate ne samo da su poznati po svom preventivnom i terapijskom djelovanju, već imaju ulogu i u kozmetici, posebno u njezi kože. Pripravci koji sadrže evodiamin ili njegove derivate koriste se za izbjeljivanje kože, protiv starenja kože i također posjeduju UV-zaštitni učinak. Ekstrakt *E. rutaecarpa*, evodiamin i njegov derivat dehidroevodiamin, inhibiraju stvaranje melanina i stoga su uključeni u formulacije za izbjeljivanje kože. Na B16F10 kulturi stanica melanoma utvrđeno je da evodiamin u koncentraciji od 21 μM inhibira melanogenezu za 75%. Dugotrajna primjena ne dovodi do iritacije kože (Ho i sur., 2010).

Evodiamin i njegovi derivati mogu se naći u pripravcima za UV-zaštitu, poput krema za sunčanje i sredstava protiv starenja. Dokazano je da evodiamin ima sposobnost adsorpcije UV zraka. Patentirana je formulacija koja sadrži 0,1-1,0% w/w derivata evodiamina, i jednu ili više komponenata ekscipijensa iz uljne faze, emulgatora, vode, antioksidansa, konzervansa, pH puferirajućeg agensa i/ili humektansa. Animalne studije provedene s ciljem da se karakterizira stupanj starenja kože ukazale su na viši omjer hidroksiprolina/ukupnih proteina što je rezultiralo jače izraženim učinkom pripravka s UV-zaštitnim sastavom u odnosu na negativnu kontrolu (Zhu Dan, 2013a; Zhu Dan, 2013b; Zhu Dan, 2013c; Zhu Dan, 2013d; Zhu Dan, 2013e; Zhu Dan, 2013f).

4.1.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9

07/2017:2718

EVODIJIN PLOD

Evodiae fructus

DEFINICIJA

Osušeni, cijeli neotvoreni plod vrste *Tetradium ruticarpum* (A.Juss.) T.G.Hartley (sin. *Evodia ruticarpa* (A.Juss.) Hook.f. &Thomson), sakupljen neposredno prije zrenja.

Sadržaj: najmanje 0,15 % zbroja evodiamina i rutekarpina, izraženo kao evodiamin ($C_{19}H_{17}N_3O$; Mr 303,4) (suha droga).

IDENTIFIKACIJA

A. Makroskopska obilježja

B. Mikroskopska obilježja

C. Tankoslojna kromatografija

ISPITIVANJA

Gubitak sušenjem (2.2.32): najviše 12,0%, određeno na 1,000 g praška biljne droge (355) (2.9.12) sušenjem u sušioniku na 105˚C 2 sata.

Ukupni ostatak (2.2.29): najviše 9,0%

Ostatak netopljiv u klorovodičnoj kiselini (2.8.1): najviše 1,0%

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Tekućinska kromatografija (2.2.29).

*Ispitivana otopina.*U 0,200 g praška biljne droge (355) (2.9.12) doda se 10,0 ml etanola (50% V/V) R i ostavi 1 sat da se macerira. Sonicira se 30 minuta, centrifugira 5 minuta i supernatant se prenese u odmjernu tikvicu od 50,0 ml. Doda se 10,0 ml etanola (50% V/V) R ostatku i opet sonicira 30 min, centrifugira 5 minuta te se supernatant prenese u istu odmjernu tikvicu. Isti postupak se ponovi još jedanput. Sjedinjene frakcije supernatanta razrijede se u odmjernoj tikvici od 50,0 ml s etanolom (50% V/V) R i filtriraju kroz membranski filter (nominalna veličina pora 0,45 μm).

Poredbena otopina (a): Otopi se 5,0 mg evodiamin CRS u bezvodnom etanolu R i razrijedi do 100,0 ml s istim otapalom.

Poredbena otopina (b): Razrijedi se 10,0 ml poredbene otopine (a) do 100,0 ml s bezvodnim etanolom R.

Poredbena otopina (c): Otopi se 2,5 mg rutekarpina R u 50,0 ml referentne otopine (a) i razrijedi do 100,0 ml s bezvodnim etanolom R.

Kolona

- *veličina:* l = 0,25 m, Ø = 4,6 mm

- *stacionarna faza:* modificirani oktadecilsilil silikagel za kromatografiju R (5 µm).

Mobilna faza:

- *mobilna faza A:* voda za kromatografiju R;
- *mobilna faza B:* acetonitril R1;

Vrijeme (min)	Mobilna faza A (postotak V/V)	Mobilna faza B (postotak V/V)
0 – 15	45	55
15 – 17	45 → 10	55 → 90
17 – 30	10	90
30 – 32	10 → 45	90 → 55
32 – 45	45	55

Brzina protoka: 1,0 ml/min

Detekcija: spektrofotometar na 225 nm

Injektiranje: 10 µl

Vrijeme zadržavanja: evodiamin = oko 8 min; rutekarpin = oko10 min

Prikladnost sustava: poredbena otopina (c):

- *rezolucija:* najmanje 5,0 između pikova evodiamina i rutekarpina

Izračuna se postotak sadržaja evodiamina i rutekarpina prema izrazu:

$$\frac{[A_1 + (A_3 \, x \, 4)] \, x \, m_2 \, x \, p}{A_2 \, x \, m_1 \, x \, 20}$$

A_1 = površina pika evodiamina u kromatogramu dobivenom s ispitivanom otopinom

A_2 = površina pika evodiamina u kromatogramu dobivenom s poredbenom otopinom (b)

A_3 = površina pika rutekarpina u kromatogramu dobivenom s ispitivanom otopinom

m_1 = masa ispitivane biljne droge koja se koristi za pripremu ispitivane otopine, u gramima

m_2 = masa evodiamina CRS koja se koristi za pripremu refernetne otopine (a), u gramima

(EDQM, 2018).

4.2. Gardeniae fructus (栀子, Zhi Zi)

Gardeniae fructus (engl. Cape jasmine fruit) je kineska ljekovita droga dobivena od biljne vrste *Gardenia jasminoides* Ellis. iz porodice Rubiaceae (Slika 4).



Slika 4. Gardeniae fructus

(preuzeto s https://tcmwiki.com/wiki/fructus-gardeniae)

4.2.1. Opis biljne droge

Cijela droga. Plod je ovalan ili eliptičan i može biti produžen ili više zaobljen; dužine 1-5 cm (uključujući i ostatke lapova) i 0,8 – 1,7 u promjeru. Vanjska površina je žućkasta, crveno-žuta ili smeđe-crvena, glatka ili pomalo gruba te obično ima 6 uzdužnih rebara; između rebara uočava se uzdužna i ponekad razgranata žila. Ostatci bazalnih lapova čaške vidljivi su na gornjem kraju ploda. Na donjem kraju ploda, 6 uzdužnih rebara združuju se zajedno u stabljiku. Poprečni presjek ploda pokazuje zasebnu šupljinu koja je rezultat nepotpune fuzije tučaka. Šupljina sadrži brojne sjemenke povezane u masu. Sjemenke su različitih oblika, mogu biti okrugle, trokutaste ili nepravilnih kutova; plosnate su, smeđe-crvene ili žuto-crvene, 0,5 cm duge, vanjska površina im je prekrivena gustim i sitnim ispupčenjima. Usplođe je krhko s glatkom, sjajnom, blijedom i žutom ili smeđe-žutom unutarnjom površinom (EDQM, 2018).

4.2.2. Opis biljke

Gardenia jasminoides Ellis. (Rubiaceae) je zimzelen grm, visine do 2 m (Slika 5). Listovi su tamnozeleni, nasuprotni, mogu se naći i u pršljenu po tri. Imaju kratku peteljku, lancetastog su oblika, kožasti i sjajni, dugi i do 14 cm. Cvjetovi su pojedinačni, vršni ili aksilarni. Široki su, bijeli i vrlo mirisni. Cjevastu čašku čini 6 dijelova. Latice mogu biti u jednom ili u dva reda. Prašnika najčešće ima 6. Plod je crvenkasto-žuta ili smeđe-crvena komuška, elipsoidnog oblika, 2,5–4,5 cm duga, promjera 1,5 cm. Na površini se nalazi 6 uzdužnih rebara, između kojih se nazire žila. Baza ploda je sužena. Usplođe je tanko, lomljivo i sjajno. Unutrašnjost ploda je blijeda te ima 2-3 pregrade. Sjemenke su brojne, plosnate i duguljaste s gustim bradavicama na površini. Miris je blag, a okus gorak. Vrsta raste u toplim predijelima na padinama u Kini, Japanu i Indiji (WHO, 1989; Wagner, 2011).

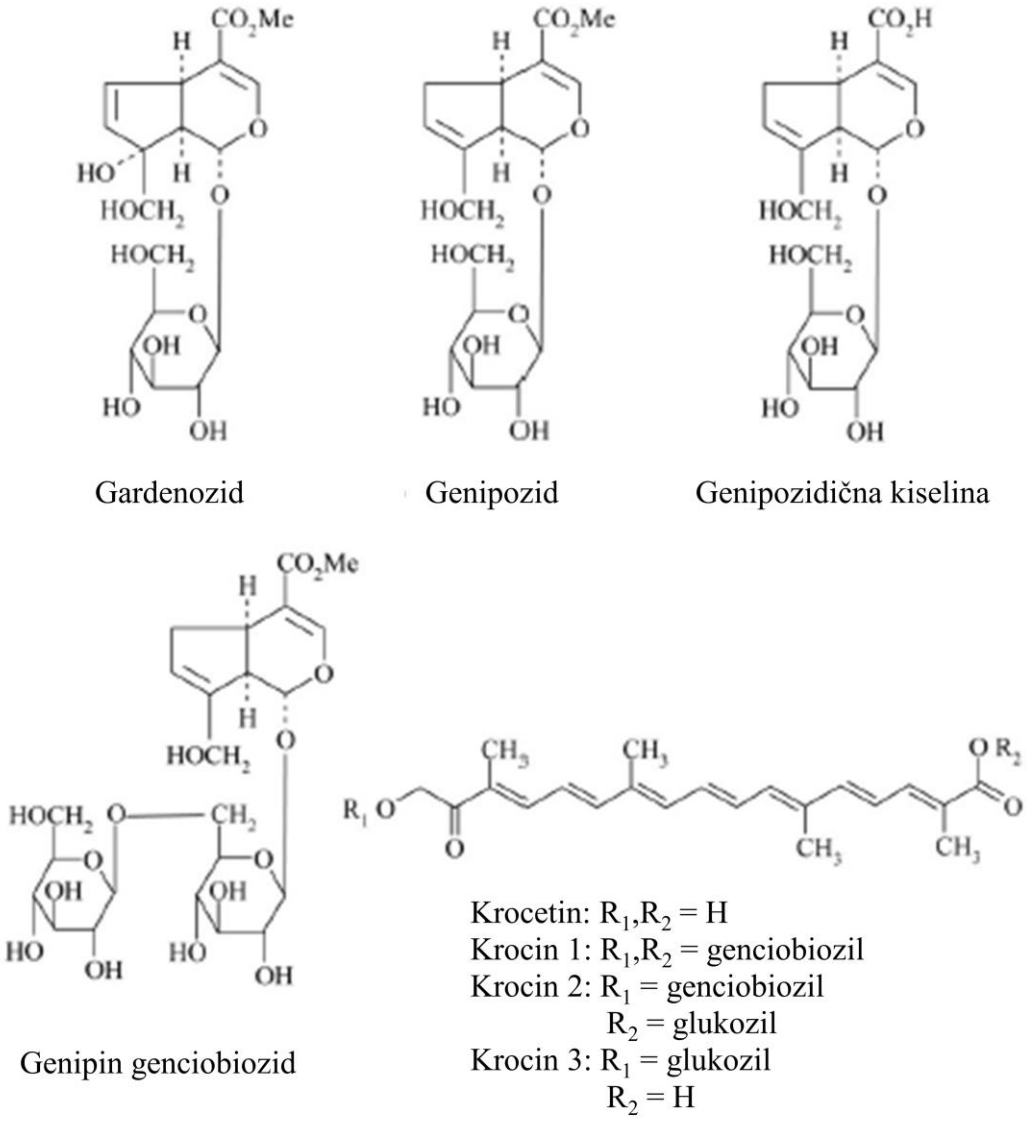


Slika 5. *Gardenia jasminoides* Ellis.
(preuzeto s http://www.plantsrescue.com/tag/cape-jasmine/)

4.2.3. Fitokemijski sastav

Glavne bioaktivne sastavnice droge Gardeniae fructus su (Slika 6) :

- **iridoidi:** genipozid, genipin-genciobiozid, gardenozid i njegov aglikon gardenogenin A, shanzisid, gardozid, skandozid, genipozidična kiselina, skandozid metil ester, metilni ester deacetilasperulozidične kiseline
- **pigmenti:** krocetin, krocin, pikrokrocinična kiselina
- **fenolne kiseline**: 3,4,-dikafeoil-5-(3-hidroksi-3-metilglutaroil) kinična kiselina i 3-kafeoil-4-sinapoilkinična kiselina (Wagner i sur., 2011)



Slika 6. Bioaktivne sastavnice droge Gardeniae fructus

4.2.4. Upotreba u TCM-u

U tradicionalnoj kineskoj medicini, plodovi biljne vrste *Gardenia jasminoides* Ellis. koriste se za odvođenje topline i uklanjanje iritacija kod groznica različitih uzroka, nemira, keratokonjuktivitisa i nesanice. Uslijed traume smanjuje oticanje i potiče prokrvljenost. Za toplinu u krvi kod simptoma kao što su krvarenje iz nosa, pojava krvi u povraćanju te krv u stolici i urinu, djeluje na način da hladi krv i uklanja toksičnost. Droga se koristi kod žutice i mokraćnih tegoba jer je učinkovita kod izlučivanja vlažne topline iz organizma urinom (Bensky i sur., 2004).

4.2.5. Farmakološki učinci

Pregledom stručne i znanstvene literature nađen je veći broj pretkiničkih studija o farmakološkim učincima biljne droge Gardeniae fructus, međutim manjka kliničkih studija, koje su nužne da bi se sa sigurnošću utvrdila djelotvornost i učinak droge kod ljudi.

Protuupalni i neuroprotektivan učinak

Gardenijin plod se već dugo vremena koristi za liječenje upale. Genipin ima izvanredan antioksidativni i protuupalni učinak koji se temelji na inhibiciji lipidne peroksidacije i proizvodnje dušikovog oksida. Protuupalno djelovanje dokazano je *in vivo* na modelu krotonovim uljem-potaknutog edema uške miševa (Koo i sur., 2004). Na kultiviranim mikroglija stanicama mozga štakora nakon primjene genipina došlo je do potiskivanja aktivacije tih stanica. Mikroglija stanice glavni su efektori imunološkog i upalnog odgovora središnjeg živčanog sustava (CNS). Genipin je djelotvoran u inhibiciji LPS-induciranog oslobađanja dušikovog oksida (NO) iz mikroglija, ali uz to je smanjio i LPS-stimuliranu proizvodnju faktora alfa, interleukin-1 beta, prostaglandina E2, intracelularne reaktivne kisikove vrste i NF-kB faktora koji predstavljaju glavne proupalne čimbenike (Nam i sur., 2010)

Istraživanje učinka genipina na PC12 stanice rezultiralo je poticanjem ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2, koji inhibira apoptozu u PC12 stanicama koje su tretirane s H_2O_2. Dokazano je da Bcl-2 ima ključnu ulogu u sprječavanju oksidacijskih oštećenja stanica, induciranih visoko reaktivnim hidroksilnim radikalima iz H_2O_2. Broj apoptotskih stanica se smanjio s 43% na 163%. Taj učinak može biti inhibiran predinkubacijom s LY294002, selektivnim inhibitorom PI3K. PI3K signalni put pokazao se učinkovit u neuroprotektivnom djelovanju genipozida na PC12 stanice. Genipozid potiče fosforilaciju Akt308, Akt473, GSK-3β i PDK1 u uvjetima oksidativnog stresa. Koristeći MTT metodu, pokazao se utjecaj genipozida na preživljavanje PC12 stanica tretiranih s H_2O_2 u prisutnosti ili odsutnosti LY294002. Rezultati su pokazali da genipozid povećava vitalnost stanica od 52% do 78% (Longoni i sur., 1999; Liu i sur., 2009)

Antidijabetički učinak

Danas se smatra da je osnovna predispozicija za inzulinsku rezistenciju nakupljanje masnog tkiva (Abel i sur., 2001). Visoka razina slobodnih masnih kiselina inhibira inzulinsku signalizaciju i suprimira sekreciju inzulina (Bays i sur., 2004). Ispitivanja koja su se provodila na miševima s dijabetesom pokazala su da je genipozid, kao agonist receptrora za GLP-1,

smanjio koncentraciju šećera u krvi te inhibirao aktivnost jetrene glikogen fosforilaze i glukoza-6-fosfataze (Wu i sur., 2009; Liu i sur., 2007). Način na koji krocetin poboljšava toleranciju na inzulin razlikuje se od načina na koji to radi genipozid. Krocetin obnavlja disfunkcije metabolizma slobodnih masnih kiselina (Xi i sur., 2007).

Nasuprot brojnijim istraživanjima na animalnim modelima dijebetesa, provedeno je i istraživanje na zdravim štakorima kako bi se utvrdilo koje sastavnice djeluju na smanjenje koncentracije šećera u krvi bez obzira na prisutan poremećaj. Od svih sastavnica gardenije, metilni ester deacetilasperulozidične kiseline izrazito smanjuje razinu šećera u krvi, zbog prisustva OH skupine na C6 položaju, koja ima bitnu ulogu u smanjenju glukoze u krvi, dok druge sastavnice nemaju utjecaja na smanjenje razine šećera u krvi (Miura i sur., 1996). U laboratorijma se, za ispitivanje funkcije i patologije endotelnih stanica, koriste pupčane endotelne stanice, HUVEC. Kod hiperglikemije inducira se proizvodnja staničnih adhezivnih molekula u HUVEC. Genipozid može potisnuti adheziju monocita na HUVEC. Hiperglikemija je odgovorna za nastanak velike količine slobodnih kisikovih radikala (ROS), poput hidroksilnog iona ili vodikovog peroksida, koji uzrokuju oštećenje endotela krvnih žila u dijabetesu. U dozi od 5 mg/ml genipin je pokazao je značajnu inhibiciju ekspresije ROS. Sprečavanjem prekomjerne proizvodnje ROS i aktivacije signalnog puta NF-kB, genipozid je također učinkovito spriječio ozljedu krvnih žila uzrokovanih dijabetesom. S obzirom na jači hipoglikemični učinak od genipozida, genipin je prihvaćen za liječenje dijabetesa tip II (Zhang i sur., 2006).

Antiaterosklerotski učinak

Glavnim faktorom upale smatra se ekspresija COX-2 receptora. U aktiviranim endoletnim stanicama i stanicama glatkih mišića njihova ekspresija je povećana (Schonbeck i sur., 1999; Stemme i sur., 2000). Stoga, COX inhibitori kao što su nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) imaju dobar učinak na kardiovaskularne bolesti pa čak i smanjenu stopu aterogeneze zbog njihovog protuupalnog djelovanja (Chenevard i sur., 2003). COX-2 selektivni inhibitori su učinkovitiji od COX-1 inhibitora. Krocetin i krocin pokazali su se djelotvorni kod inhibicije nastanka ateroskleroze i zaštite epitelnih stanica (Zheng i sur., 2005).

Istraživanja su pokazala da uz inhibitore COX receptora i antioksidansi mogu biti učinkoviti u sprječavanju nastanka ateroskleroze. U *in vitro* ispitivanju, sastavnice ekstrakta vrste *Gardenia jasminoides* Ellis.(GJE) koje su pokazale antioksidativni učinak i uklonile slobodne radikale, bile su dikafeoilkinična kiselina i klorogene kiseline, odnosno fenoli. Genipozid i

krocin imaju slabo antioksidativno djelovanje. Genipozid i genipin su učinkoviti u zaštiti endotelnih stanica od ozljeda, inhibicijom signalnog put NF-kB, koji je odgovoran za apoptozu endotelnih stanica te posljedično vaskularna oštećenja (He i sur., 2010). Krocin djeluje tako da smanjuje sadržaj kolesteril estera, smanjuje oksidaciju LDL-a *in vivo* te sprječava oštećenje endotela i nastanak ateroskleroze. Oksidirani LDL često doprinosi angio-celularnim disfunkcijama (He i sur., 2005; Zhou i sur., 2006). Zbog inhibicije COX-2 receptora genipin bi se mogao svrstati u NSAID. Ima povoljni učinak na vaskularni sustav poput endotelne hiperplazije i obnove krvni žila što ga razlikuje od drugih lijekova iz te skupine.

Antidepresivni učinak

Yueju-Wan (YJ), tradicionalna kineska ljekovita formula, u Kini se obično koristi za liječenje sindroma povezanih s depresijom, podešavanjem „qi" energije (Wei i sur., 2008). U TCM-u, „qi" stagnacija smatra se jednim od glavnih uzroka depresije, blokiran protok „qi" i krvi, staza u arterijama i ugrušaka u venama. Kako „qi" cirkulira zajedno s krvlju, smatra se da stagnacija „qi" energije uzrokuje stazu krvi (Liu i sur., 2013).

Genipozid i krocin su glavni dijelovi ljekovite formule YJ. Kod štakora, kod kojih je izazvan anksiolitički efekt, genipozid i GJE ekstrakt povećali su vrijeme socijalne komunikacije (Toriizuka i sur., 2005). Uz to krocin je pokazao djelovanje slično antidepresivima, reducirajući vrijeme nepokretnosti. Mehanizam genipina dijelom se pripisuje središnjem monoaminergijskom sustavu neurotransmitera (Liu i sur., 2013).

Antihipertenzivni učinak

S visokim ukupnim fenolima i flavonoidima, GJE ekstrakt potiskuje lipidnu peroksidaciju, smanjuje masnoće u krvi i visoki krvni tlak te sprečava i liječi kardiovaskularne poremećaje (Debanth i sur., 2011).

ET-1, kao najučinkovitiji endogeni vazokonstrikcijski agens, proizvodi se u endotelnim stanicama.Uzrokuje konstrikciju glatkih mišića. Snaga konstrikcije proporcionalno raste s koncentracijom agensa u krvi (Reid i sur., 1995). Genipozid djeluje tako da suprimira ekspresiju ET-1 u plazmi (Xu i sur., 2012). Na taj način učinkovito ublažava vazokonstrikciju i spazam glatkih mišića. Na animalnom modelu, nakon primjene intravenske injekcije koja je kao djelatnu tvar sadržavala genipozid, krvni tlak se vrlo brzo smanjio, ali je učinak kratko trajao. Smatra se da je vazodilatacija mehanizam odgovoran za antihipertenzivi učinak.

4.2.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9

01/2017:2565

GARDENIJIN PLOD

Gardeniae fructus

DEFINICIJA

Cijeli ili usitnjeni, zreli plod vrste *Gardenia jasminoides* Ellis, kojem je uklonjena stapka, obrađen parom ili kipućom vodom i zatim osušen.
Sadržaj: najmanje 2,0% genipozida ($C_{17}H_{24}O_{10}$; Mr 388,4) (suha droga)

IDENTIFIKACIJA

A. Makroskopska obilježja
B. Mikroskopska obilježja
C. Tankoslojna kromatografija

ISPITIVANJA

Gubitak sušenjem (2.2.32): najviše 8,5%, određeno na 1,000 g praška biljne droge (355) (2.9.12) sušenjem u sušioniku na 105˚C 2 sata.
Ukupni pepeo (2.4.16): najviše 6,0%.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Tekućinska kromatografija (2.2.29).

Ispitivana otopina. Dispergira se 0,500 g praška biljne droge (355) (2.9.12) u 50 ml 50%-tne (V/V) otopine metanola R i sonicira 40 min. Centrifugira se te se supernatant prenese u odmjernu tikvicu od 200 ml. Postpak se ponovi, zatim se razrijedi do 200,0 ml s 50%-tnom (V/V) otopinom metanola R.

Poredbena otopina (a): Otopi se 5,0 mg genipozida CRS u metanolu R i razrijedi do 25,0 ml s istim otapalom.

Poredbena otopina (b): Dispergira se 0,250 g gardenijinog ploda za prikladnost sustava HRS u 25 ml 50%-tne (V/V) otopine metanola R i sonicira 40 min. Zatim se centrifugira i supernatant se prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml. Postupak se ponovi i razrijedi se do 100,0 ml s 50%-tnom (V/V) otopinom metanola R.

Kolona:

- *veličina:* l = 0,25 m, Ø = 4,6 mm;
- *stacionarna faza:* modificirani oktadecilsilil silikagel za kromatografiju R (5 µm).

Mobilna faza:

- *mobilna faza A:* voda R prilagođena na pH 3,2 s bezvodnom formijatnom kiselinom R
- *mobilna faza B:* metanol R

Vrijeme (min)	Mobilna faza A (postotak (V/V)	Mobilna faza B (postotak (V/V)
0 – 4	80	20
4 – 40	80 → 20	20 → 80

Brzina protoka: 1,0 ml/min

Detekcija: spektrofotometar na 240 nm

Injektiranje: 20 µl

Identifikacija pikova: koristi se kromatogram koji sadrži poredbenu otopinu (a) kako bi identificirali pik genopozida; koristi se kromatogram kojeg daje gardenijin plod za prikladnost sustava HRS i kromatogram koji sadrži poredbenu otopinu (b) za identificiranje pika genipin genciobiozida.

Vrijeme zadržavaja: genipin genciobiozid = oko 14 min ; genipozid = oko 16 min.

Prikladnost sustava: poredbena otopina (b):

- *rezolucija:* minimalno 5,0 između pikova genipin genciobiozida i genipozida

Izračunati postotak sadržaja genipozida koristeći sljedeću jednadžbu:

$$\frac{A_1 \; x \; m_2 \; x \; p \; x \; 8}{A_2 \; x \; m_1}$$

A_1 = površina pika genipozida u kromatogramu koji je dobiven s ispitivanom otopinom
A_2 = površina pika genipozida u kromatogramu koji je dobiven s referentnom otopinom (a)
m_1 = masa ispitivane biljne droge koja se koristi za pripremu ispitivane otopine, u gramima
m_2 = masa genipozida CRS koja se koristi za pripremu poredbene otopine (a), u gramima
p = postotak sadržaja genipozida u genipozid CRS

(EDQM, 2018).

4.3. Polygoni orientalis fructus (水红花子, Shui Hong Hua Zi)

Polygoni orientalis fructus (engl. Prince's-Feather Fruit) je kineska ljekovita droga dobivena od biljne vrste *Polygonum orientale* L. iz porodice Polygonaceae (Slika 7).



Slika 7. Polygoni orientalis fructus
(preuzeto s http://tcmwiki.com/wiki/fructus-polygoni-orientalis i
http://www.stuartxchange.org/OrientalPepper)

4.3.1. Opis biljne droge

Plod je okruglast i obli, spljoštene straneblago konkavne, promjera oko 2-3,5 mm, debljine 1-1,5 mm. Površina je sjajna, smeđkasto crna ili crvenkasto smeđa. Na bazi je svijetlo smeđa i malo izbočena cvjetna stapka s ostatcima ocvijeća. Čvrste je teksture (EDQM, 2018).

4.3.2. Opis biljke

Polygonum orientale L. (Polygonaceae) je jednogodišnja biljka, visoka od 6-25 cm (Slika 8). Stabljika je uspravna ili distalno razgranata, prekrivena slabim do oštrim dlakama. Ova biljna vrsta ima karakterističnu ovojnicu od palistića, iz koje izlazi peteljka s listom. Sva tri dijela su gusto obrasla dlakama. Listovi su zeleni, ovalnog oblika, dužine do 25 cm. Baza lista je srcolikog oblika, a vrh je šiljasti. Cvatovi se uglavnom nalaze terminalno, uspravni ili savijeni, duguljasti, čine ih cvjetovi u klasastim nakupinama. Uz svaku brakteji nalazi se 2-5

ružičasto-crvenih cvjetova. Svaki cvijet ima 5 latica, te 6-8 prašnika. Plod je tamnosmeđi do crni, sjajni i glatki oraščić, oblika diska (najširi u sredini), 2,5-3,5mm visine i 3-3,5 mm širine.

Biljka raste na osunčanim, srednje vlažnim područjima, na livadama ili uz cestu. Rasprostranjena je u zemljama južne Azije (http://www.efloras.org).

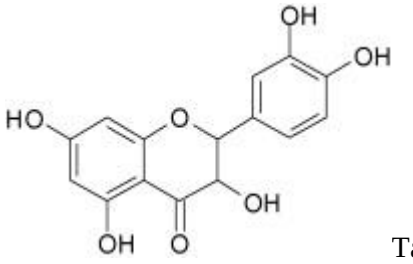


Slika 8. *Polygonum orientale* L.
(preuzeto s http://www.selectseeds.com/)

4.3.3. Fitokemijski sastav

Plodovi biljne vrste *Polygonum orientale* sadrže:

- **flavonoide**: taksifolin, naringenin; cijela biljka – kvercitrin, cinarozid, orientin, izoorientin,
- fenolne kiseline – protokatehinska kiselina
- **triterpenske saponine** (Yang i sur., 2008; Wei i sur., 2009; Shin i sur., 2018)



Taksifolin

Slika 9. Bioaktivna sastavnica droge Polygoni orientalis fructus

4.3.4. Upotreba u TCM-u

Plodovi vrste *Polygonum orientale* tradicionalno se koriste protiv bolova, kao stomahik, u liječenju jetrenih bolesti (ciroze, hepatitisa, raka) te topikalno kod čireva (Tang i Eisenbrand, 1992).

4.3.5. Farmakološki učinci

Biljna droga Polygoni orientalis fructus bila je predmetom manjeg broja pretkliničkih istraživanja koja su uglavnom provodili kineski znanstvenici i dobivene rezultate objavili u kineskim časopisima. Dostupi podaci su vrlo ograničeni, jer sažetci radova koji postoje na engleskom jeziku pružaju malo podataka o njenom farmakološkom djelovanju.

Qing i Yiceng (2009) izvjestili su o **protutumorskom djelovanju** etilacetatnog ekstrakta plodova na CaCO-2 stanice kolorektalnog karcinoma. Na mišjem modelu D-galaktozom potaknutog starenja dokazano je da etanolni ekstrakt plodova posjeduje **antioksidativna svojstva** te da ima sposobnost hvatanja slobodnih radikala i sprječavanja lipidne peroksidacije *in vivo* (Zhang i sur., 2005).

U literaturi se spominje studija koja navodno govori u prilog djelovanju plodova **protiv probavnih tegoba i bolova** (Zhai i sur., 2006). *In vivo* je utvrđeno je i da dekokt plodova djeluje **imunosupresivno** (Hongmei i sur., 2010).

Biljna droga Polygoni orientalis fructus povoljno djeluje na jetru. Du i suradnici (2011) su izvjestili o **antifibrotičkom djelovanju** *in vivo*. Studija provedena na modelu tetraklorougljikom-potaknutog oštećenja jetre u miševa je pokazala da etanolni ekstrakt plodova vrste *Polygonum orientale* djeluje **hepatoprotektivno** te da se učinak temelji na njegovim antioksidativnim i protuupalnim svojstvima. Tretiranje životinja tijekom 5 dana ekstraktom u dozama 0,1-1 g/kg rezultiralo je povećanjem aktivnosti obrambenih antioksidativnih enzima u jetri (SOD, GPx, GRd), sprječavanjem lipidne peroksidacije i smanjenjem razine proupalnih medijatora (TNF-α, IL-1β, IL-6). Opaženi učinci mogu se barem djelomično pripisati sadržaju taksifolina, kverecetina i protokatehinske kiseline u ekstraktu (Chiu i sur., 2018).

Tiao He Yi Wei granule (DHYW) tradicionalan su kineski lijek koji sadrži 11 biljnih droga, između ostalom i plodove vrste *Polygonum orientale*. Formula se pokazala djelotvornom u zaštiti želuca od stvaranja ulkusa čije je stvaranje u miševa potaknuto etanolom.

Gastroprotektivni učinak temelji se na antioksidativnim i protuupalnim svojstvima, djelovanjem na NF-κB signalni put (Yao, 2015).

Taksifolin, glavna sastavnica droge je pokazala protutumorsko djelovanje *in vitro* (Zhai i sur., 2011). Na HeLa staničnoj liniji uočena je inhibicija proliferacije stanica humanog karcinoma grlića maternice i sposobnost poticanja apoptoze regulacijom nagore P53 mRNA i P21 mRNA, neovisno o transkripciji Bcl-2 mRNA/Bax mRNA proteina apoptoze. Protutumorsko djelovanje dokazano je i na MGC, HepG-2 i Hce-8693 staničnim linijama (Zhai i sur., 2012).

4.3.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9

01/2017:2726

PLOD ORIJENTALNOG DVORNIKA

Polygoni orientalis fructus

DEFINICIJA

Osušeni zreli plod vrste *Persicaria orientalis* (L.) Spach (sin. *Polygonum orientale* L.)

Sadržaj: najmanje 0,15% taksifolina ($C_{15}H_{12}O_7$; Mr 304,3) (suha droga).

IDENTIFIKACIJA

A. Makroskopska obilježja

B. Mikroskopska obilježja

C. Tankoslojna kromatografija

ISPITIVANJA

Gubitak sušenjem (2.2.29): najviše 12,0 %, određeno na 1,000 g praška biljne droge (355) (2.9.12) sušenjem u sušioniku na 105˚C, 2 sata.

Ukupni ostatak (2.4.16): najviše 3,0%.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Tekućinska kromatografija (2.2.29).

Ispitivana otopina. 0,500 g praška biljne droge (355) (2.9.12) stavi se u tikvicu s okruglim dnom, doda se 25 ml 55%-tne (V/V) otopine metanola R. Potom se zagrijava pod povratnim hladilom u vodenoj kupelji na 90˚C 1 sat. Ostavi se da se ohladi i filtrira. Filter se ispire s 5,0 ml klorovodične kiseline R1. Provede se filtriranje i ispiranje u odmjernu tikvicu te razrijedi

do 50,0 ml s 55%-tnom (V/V) otopinom metanola R. Filtrira se kroz membranski filter (nominalna veličina pora 0,45μm).

Poredbena otopina (a). Otopi se 5,0 mg taksifolina CRS u 55%-tnoj (V/V) otopini metanola R. Doda se 2,5 ml klorovodične kiseline R1 i razrijedi do 25,0 ml s 55%-tnom (V/V) otopinom metanola R. U 10,0 ml ove otopine dodamo 4,0 ml klorovodične kiseline R1 i razrijedimo do 50,0 ml s 55%-tnom (V/V) otopinom metanola R.

Poredbena otopina (b). 0,500 g ploda orijentalnog dvornika za prikladnost sustava HRS stavi se u tikvicu s okruglim dnom, te se doda 25,0 ml 55%-tne (V/V) otopine metanola R. Potom se zagrijava pod povratnim hladilom u vodenoj kupelji na 90˚C 1 sat. Ostavi se da se ohladi i filtrira. Filter se ispire s 5,0 ml klorovodične kiseline R1. Provede se filtriranje i ispiranje u odmjernu tikvicu te razrijedi do 50,0 ml s 55%-tnom (V/V) otopinom metanola R. Filtrira se kroz membranski filter (nominalna veličina pora 0,45μm).

Kolona:
- *veličina:* l = 0,150 m, Ø = 4,0 mm;
- *stacionarna faza:* oktadecilsilil silikagel za kromatografiju R (5μm)

Mobilna faza:
- *mobilna faza A:* fosforna kiselina R, voda za kromatografiju R (0,1:99,9 V/V);
- *mobilna faza B:* acetonitril za kromatografiju R

Vrijeme (min)	Mobilna faza A (postotak V/V)	Mobilna faza B (postotak V/V)
0 – 20	85	15
20 – 21	85 → 0	15 → 100
21 – 30	0	100

Brzina protoka: 1,0 ml/min

Detekcija: spektrofotometar na 290 nm

Injektiranje: 10 μl

Identifikacija pikova: koristi se kromatogram koji sadrži plod orijentalnog dvornika za prikladnost sustava HRS i kromatogram koji je dobiven s poredbenom otopinom (b) za identifikaciju epitaksifolina.

Vrijeme zadržavanja: taksifolin = oko 14 min, epitaksifolin = oko 16 min

Prikladnost sustava: poredbena otopina (b):

- *rezolucija:* najmanje 2,0 između pikova taksifolina i epitaksifolina

Izračuna se postotak sadržaja taksifolina koristeći slijedeći izraz:

$$\frac{A_1 \; x \; m_2 \; x \; 0{,}4 \; x \; p}{A_2 \; x \; m_1}$$

A_1 = površina pika taksifolina u kromatogramu dobivenom s ispitivanom otopinom;

A_2 = površina pika taksifolina u kromatogramu dobivenom s poredbenom otopinom (a);

m_1 = masa ispitivane biljne droge koja se koristi za pripremu ispitivane otopine, u gramima;

m_2 = masa taksifolina CRS koja se koristi za pripremu poredbene otopine (a), u gramima;

p = postotak sadržaja taksifolina u taksifolinu CRS

(EDQM, 2018)

4.4. Zanthoxyli bungeani pericarpium (花椒, Hua Jiao)

Zanthoxyli pericarpium (engl. Prickly ash) je kineska ljekovita droga koja se dobiva od biljne vrste *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. iz porodice Rutaceae (Slika 10).



Slika 10. Zanthoxyli pericarpium
(preuzeto s https://tcmwiki.com/wiki/pericarpium-zanthoxyli)

4.4.1. Opis biljne droge

Pojedinačni, tvrdi, kuglasti tobolci, podijeljeni duž trbušne spojne linije, promjera 4-5 mm; vanjska površina je tamnorcvena ili smeđecrvena, s brojnim ispupčenim, prozirnim bradavičastim uljnim točkama; unutarnja površina je svijetlo žuta i glatka; endokarp je u bazi uglavnom odvojen od mezokarpa i zavrnut (EDQM, 2018).

4.4.2. Opis biljke

Zanthoxylum bungeanum Maxim. (Rutaceae) je listopadno stablo visoko 3-7 m (Slika 11). Stabljike i grane prekrivene su trnjem dok su mlade grane prekrivene dlakama. Listovi se sastoje od 5-13 manjih listova koji su ovalnog, eliptičnog oblika, sjedeći, poredani nasuprot jedan drugome, osim vršnog neparnog lista. Obje strane lista su prekrivene dlakama, a uljne žlijezde nalaze se samo uz rub lista. Cvatovi se razvijaju na stabljikama, i to u pazušcima

listova ili terminalno na bočnim granama. Cvjeta u svibnju i lipnju. Ocvijeće se sastoji od jednog ili dva sloja žuto-zelenih latica kojih je najčešće 6-8. Muški cvjetovi imaju 5-8 pršnika, a ženski 2-5 tučaka. Plod je ljubičasto-crveni mali dvodijelni tobolac ili hesperidij, promjera 4-5 mm, koji se dijeli na sredini. Unutar ploda nalaze se crne, sjajne sjmenke promjera 3,5 – 4,5 mm. Miris je sličan ulju limuna, no kod *Z. bungeanum* je snažniji, i ulje uzrokuje utrnuće jezika. Raste na mnogim područjima u Kini te se posebno po kvaliteti ističe onaj koji raste u pokrajini Sichuan (http://www.efloras.org).



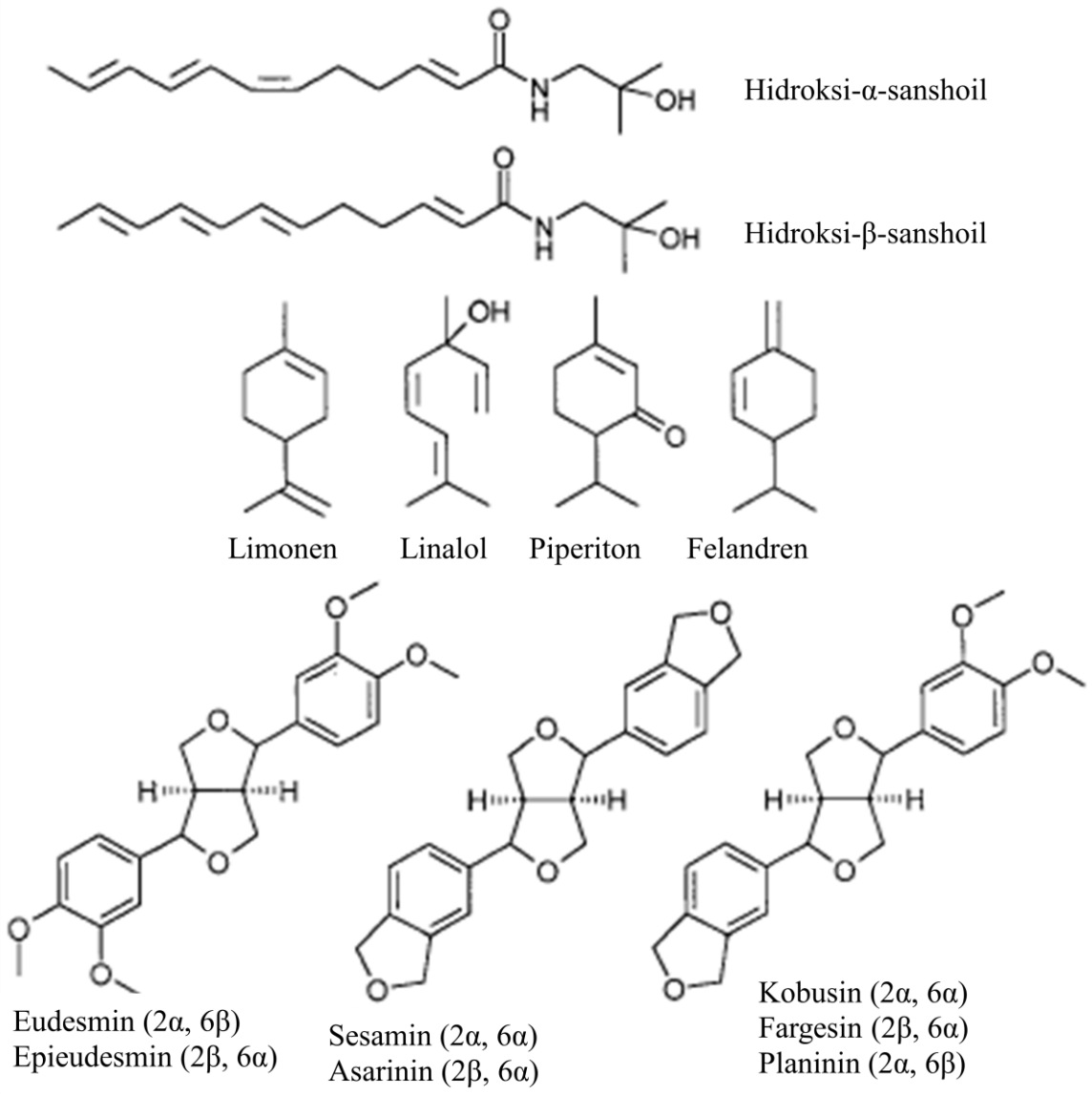
Slika 11. *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.

(preuzeto s https://i0.wp.com/lejardindepices.wordpress-hebergement.fr)

4.4.2. Fitokemijski sastav

Glavne bioaktivne sastavnice droge Zanthoxyli pericarpium su (Slika 12):

- **eterično ulje** (limonen (27%), β-mircen (17%), β-oksimen X (10%), β-felandren (6%), α-pinen (5%), 3-tujanol (5%), piperiton (4%), linalol (3%)
- **alkilamidi**: hidroksi-α-sanshoil (0,3%), hidroksi-β-sanshoil (0,15%), hidroksi-γ-sanshoil (0,13%)
- **flavonoidi:** aglikoni tambulin, tambuletin i nevadensin, kvercetin-glikozidi (npr. hiperozid, izokvercitrin), luteolin- i kemferol-glikozidi
- **masne kiseline:** cis-9-heksadekanska kiselina, eikozanoična kiselina, palmitinska kiselina, hidroksialk-4Z-enoična kiselina u masnom ulju sjemenki
- **lignani:** kobusin, planinin, fargesin, eudesmin, epieudesmin, sezamin i asarinin
- ostale sastavnice: derivati cimetne kiseline, kumarin umbeliferon, sveprisutne komponente poput β-sitosterola i njegov β-D-glukozid (Wagner i sur., 2011)



Slika 12. Bioaktivne sastavnice droge Zanthoxyli pericarpium

4.4.4. Upotreba u TCM-u

U tradicionalnoj kineskoj medicini droga Zanthoxyli bungeani pericarpium koristi u obliku dekokta uglavnom za liječenje bolova u trbuhu praćenih osjećajem hladnoće i vlažnosti, kod povraćanja, probavnih poremećaja, dijareje, infekcija izazvanih oblićima kao i reumatske upale zglobova. Droga se nanosi izvana, na modrice, ekceme i ugrize zmija (Wagner i sur., 2011).

4.4.4. Farmakološki učinci

Pregledom stručne i znanstvene literature nađen je veći broj pretkiničkih studija o farmakološkim učincima biljne droge Zanthoxyli bungeani pericarpium, međutim manjka kliničkih studija, koje su nužne da bi se sa sigurnošću utvrdila djelotvornost i učinak droge kod ljudi.

Protuupalno i analgetsko djelovanje

Istraživanje je pokazalo da alkaloidi iz droge *Z. bungeanum* (ZB) mogu inhibirati bol u životinja na modelu vruće ploče te svrbež i ogrebotine uzrokovane dekstranom-40 (Shi i sur., 2011). Osim toga, neki spojevi izolirani iz usplođa ZB pokazuju značajan protuupalni učinak supresijom proizvodnje dušikovog oksida. Metanolni ekstrakt usplođa ZB u koncentraciji od 200 μM pokazao je inhibicijski učinak na LPS-stimulirane J774.1 makrofage i na makrofage peritonealnog mišjeg eksudata stimuliranog LPS/IFNγ, na način da je doveo do inhibicije ekspresije inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) mRNA (Tezuka i sur., 2001). Heksanski ekstrakt usplođa također pokazuje dobar protuupalni učinak temeljen na inhibiciji 5-lipoksigenaze, za koji su zaslužni furofuranolignani kobusin, asarinin i sezamin. Ekstrakt također inhibira prostaglandin sintetazu-1 *in vitro* što pripisujemo β-sitosterolu i masnim kiselinama (Wagner i sur., 2011).

Antibakterijski i antifungalni učinak

Dokazano je da vodeni ekstrakt ZB inhibira rast bakterijskih sojeva *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, djelujući snažnije na *S. aureus* (Lu i Lu, 1995). Zbog svog antimikrobnog djelovanja eterično ulje ZB moglo bi se koristiti kao konzervans u prehrambenoj industriji. Bakterije koje se razvijaju u hrani kao što su *S. aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus* i *E. coli* eterično ulje ZB inhibiraj s minimalnim inhibitorskim koncentracijama (MIC) od 5,0; 1,25; 2,5; 2,5 mg/ml (MBC 20; 2,5; 10; 5,0 mg/ml) (Zhu i sur., 2011). Također je ustanovljeno da eterično ulje ZB inhibira rast micelija vrsta *Rhizoctonia solani* i *R. cerealis* s MFK vrijednostima od 0,95 i 1,22 mg/ml, a učinkovito je i u inhibiciji rasta vrsta *Aspergillus flavus, Aspergillus niger* i *Saccharomyces cerevisiae* (Tang i sur., 2013) kao i soja *Fusarium sulphureum* (Li i Xue, 2014).

Antihelmintički učinak

Eterično ulje usplođa vrste ZB pokazalo se učinkovitim protiv parazita. U koncentracijskom rasponu od 0,1% - 0,4% *in vitro* djelotvornost protiv dječje gliste (rod *Ascaris*) može se

usporediti sa onom piperazin fosfata, dok je učinak na trakavicu (rod *Taenia*) upola manji od onog piperazin fosfata (Wagner i sur., 2011).

Učinak na kožu

Topikalno primjenjeni sanshoili, izolirani iz usploda ZB, pokazali su se kao učinkovita sredstva za podizanje bora. Njihova djelotvornost temelji se na sposobnosti opuštanja subkutanih mišića (Artaria i sur., 2011).

Jedno od bitnih karakteristika eteričnog ulja ZB (3%) je da može značajno pojačati perkutanu apsorpciju lijekova s različitom lipofilnošću. Limonen je pokazao najveći utjecaj na povećanje propusnosti kože za lijekove u usporedbi s terpin-4-olom i 1,8-cineolom. Djelovanje tih sastavnica eteričnog ulja koje povećavaju permeabilnost kože za lijekove može se povezati s utjecajem na lipide sloja stratum corneuma (Lan i sur., 2014).

Djelovanje na adipocite

U studiji je ispitano djelovanje ekstrakta Pericarpium Zanthoxyli (PZE) na adipocitnu diferencijaciju OP9 stanica, mjerenjem nakupljanja lipida i procjenom razine ekspresije proteina markera i njihovih ciljnih gena. Utvrđeno je da PZE sprječava nakupljanje masti i inhibira diferencijaciju preadipocita OP9 u zrele adipocite. Tretiranje s PZE također je smanjilo ekspresiju ključnih regulatora diferencijacije adipocita, uključujući C/EBPp i PPARy (Kim i sur., 2014).

Učinak na stanični transport

Ispitani su inhibicijski učinci ekstrakata različitih citrusnih biljaka i monoterpenskih sastavnica eteričnog ulja Zanthoxyli fructus na P-gp posredovani transport. Utvrđeno je da sokovi od citrusa, kao što su sok od grejpa i sok od naranče, inhibiraju P-gp-posredovani transport (Takanaga i sur., 1998; Takanaga i sur., 2000). Kako bi procjenili utjecaj PZE na transport posredovan s P-gp, Yoshida i sur. (2005) su promatrali intracelularno nakupljanje [3H] digoksina izmjereno u LLC-GA5-COL150 staničnoj liniji koja je uspostavljena transfekcijom humanog MDR1 cDNA, koja kodira P-gp u LLC-PK1 epitelnim stanicama svinjskog bubrega. Omjer [3H] digoksina u stanici u odnosu na medij značajno se povećavao u prisutnosti dekokta Zanthoxyli fructus. Etilacetatna frakcija ekstrakta Zanthoxyli fructus pokazala je najjaču sposobnost inhibicije P-gp među testiranim citrusnim plodovima s IC50 vrijednosti od 166 ± 7 μg/ml, što upućuje na to da ovaj ekstrakt sadrži aktivne sastojke koji značajno inhibiraju P-gp. Monoterpeni, posebice oni s relativno niskom molekularnom masom od oko 150 kao što je R-citronelal, pokazali se se kao potentni P-gp inhibitori. Srčani

glikozid digoksin je lijek s uskim terapijskim indeksom. Koncentracije u plazmi iznad ili ispod terapijskog indeksa mogu dovesti do toksičnosti ili terapijskog neupjeha. U kliničkoj praksi potrebno je praćenje terapijskog tijeka tih lijekova. Ova studija pokazala je da prirodni sastojci u ekstraktu Zanthoxyli fructus, kao i drugim citrusnim plodovima mogu inhibirati P-gp-posredovani transport digoksina (Yoshida i sur., 2005).

4.4.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9

01/2017:2656

USPLOĐE SEČUANSKOG PAPRA

Zanthoxyli bunegeani pericarpium

DEFINICIJA

Osušeno usplođe zrelog ploda, s uklonjenim sjemenkama, vrste *Zanthoxylum buneganum* Maxim.

Sadržaj: najmanje 15 ml/kg eteričnog ulja (bezvodna droga).

IDENTIFIKACIJA

A. Makroskopska obilježja

B. Mikroskopska obilježja

C. Tankoslojna kromatografija

ISPITIVANJA

Strane tvari (2.8.2): najviše 5% sjemenki i najviše 2% drugih stranih tvari.

Voda (2.2.13): najviše 100 ml/kg, određeno na 20,0 g praška biljne droge (710) (2.9.12).

Ukupni pepeo (2.4.16): najviše 8%.

Pepeo netopljiv u klorovodičnoj kiselini (2.8.1): najviše 1,5%.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Eterično ulje (2.8.12). Stavi se 15,0 g svježe praškasto usitnjene biljne droge (710) (2.9.12), u tikvicu od 500 ml s okruglim dnom, zatim doda 250 ml vode R kao tekućine za destilaciju i 0,50 ml ksilena R u graduiranu cijev. Destilira se brzinom od 2-3 ml/min, 2 sata

(EDQM, 2018).

4.5. Magnoliae biondii flos immaturus (辛夷花, Xin Yi)

Magnoliae biondii flos immaturus (eng. Magnolia biondii flower) je kineska ljekovita droga dobivena od biljne vrste *Magnolia biondii* Pamp. iz porodice Magnoliaceae (Slika 13).



Slika 13. Magnoliae biondii flos immaturus
(preuzeto s https://tcmwiki.com/wiki/flos-magnoliae)

4.5.1. Opis biljne droge

Cvjetni pupoljak, čija je tekstura lagana i krhka, ovalnog do izduženo-ovalnog oblika, bjelkastosive, žućkastosive ili zelenkastosive boje, svilenkast, dlakav sa šiljastim vrhom; dugačak 1,2-3,0 cm i promjera 8-16 mm. Odrvenjela, kratka peteljka, prekrivena bijelim lenticelama, obično prisutna u dnu cvjetnog pupoljka. Cvjetni pupoljak je okružen s 2-3 pršljena brakteja; svaka brakteja ima vanjsku površinu gusto prekrivenu svilenkastim dlakama i unutarnju površinu koja je glatka i smeđa. Ocvijeće se sastoji od 9 svijetložutih ili smeđih latica poslaganih u 3 pršljena; vanjski pršljen sadrži 3 latice više nalik lapovima, linearne, čija je dužina i do četiri puta veća od ostalih latica. Svaki od dva unutarnja pršljena sastoji se od 3 latice. Prašnici i tučci su brojni, poredani spiralno (EDQM, 2018).

4.5.2. Opis biljke

Magnolia biondii Pamp (Magnoliaceae) je stablo visine do 12 m (Slika 14). Kora je blijedo siva i glatka. Terminalno se nalaze sivozeleni pupoljci, jajolikog oblika, dužine 1,7-3 cm i

promjera 3-4 mm. Pupoljci su gusto prekriveni blijedo žutim dlakama. Listovi su usko eliptični, dužine 10-18 cm i širine 3,5-6,5 cm. Lice im je svijetlozeleno, a naličje tamnije, vrh je zašiljen. Glavna žila nalazi se u sredini, od baze prema vrhu lista, te se iz nje na obje strane granaju po 10-15 sekundarnih žila. Cvjetovi se pojavljuju prije listova, u kasnu zimu ili rano proljeće, i to na stapkama dugim oko 1 cm. Promjera su od 6-8 cm i vrlo su mirisni. Cvijet se sastoji od 3 lapa i 6 latica, koji su u bazi ružičastocrveni, a pri vrhu bijeli. Latice su duge 4-5 cm i usko ovalne. Prašnika ima 8-10, a tučci čine ginecej od 1,5-2 cm. U jesen se pojavljuju vrlo dekorativni plodovi, nalik češeru sa crvenkasto obojenim sjemenim ljuskama. Cilindričnog su oblika, dužine do 14 cm. Plodovi su najprije crveni, a kad sazriju postanu smeđi. Biljna vrsta je široko rasprostranjena u Kini, raste u šumama na planinama (www.efloras.org).



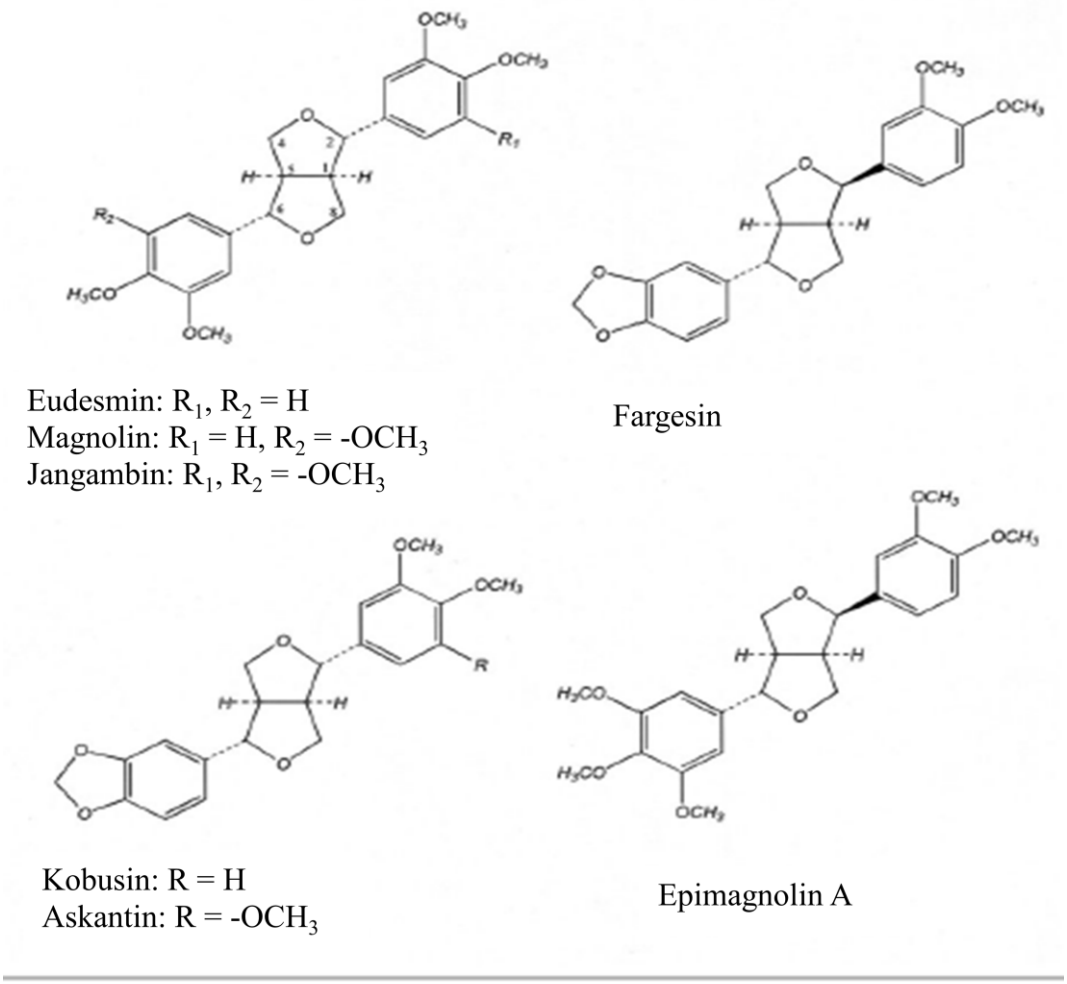
Slika 14. *Magnolia biondii* Pamp.
(preuzeto s https://www.empowering-medicine.com/)

4.5.3. Fitokemijski sastav

Glavne bioaktivne sastavnice droge Magnoliae biondii flos immaturus su (Slika 15):

- **eterično ulje:** monoterpeni (1,8 cineol, farnezol, α-terpineol, linalol, sabinen, α,β-pinen, kamfor, biondin C/D) i seskviterpeni **(**partenolid, oplodiol)
- **tetrahidrofurofuran-tip lignana:** magnolin, eudesmin, jangambin, fargesin, kobusin, askantin, epimagnolin A
- **tetrahidrofuran-tip lignana:** biondin B/ E
- **neolignani:** biondin A

- **alkaloidi:** magnokurarin, magnoflorin, salicifolin, magnosprengerin (Wagner i sur., 2011)



Slika 15. Bioaktivne sastavnice droge Magnolia biondii flos immaturus

4.5.4. Upotreba u TCM-u

U tradicionalnoj kineskoj medicini droga Magnoliae biondii flos immaturus se koristi kao nazalni dekongestiv i analgetik. Primjenjuje se u liječenju alergijskog i akutnog rinitisa, gubitka osjeta mirisa, problema sa sinusima, glavobolje i zubobolje (Wagner i sur., 2011).

4.5.5. Farmakološki i klinički učinci

Istraživanja su pokazala širok spektar farmakoloških djelovanja droge Magnoliae flos (FM), uključujući protuupalno, antialergijsko, antiangiogeno, antiproliferacijsko te antimikrobno djelovanje. Sva navedena djelovanja mogu pridonijeti kliničkoj primjeni droge kod alergijskog rinitisa, sinusitisa i glavobolje. Kako je upala u centru svih navedenih bolesti, dosta je istraživanja bilo usmjereno upravo u smjeru protuupalnog djelovanja.

Protuupalni i antialergijski učinak

Ekstrakti droge Magnolii flos, u koncentracijskom rasponu od 0,5 mg/kg - 1 mg/kg, znatno smanjuju kapilarnu propusnost i inhibiraju degranulaciju mastocita odgovornih za nastanak upale. Smatra se da hlapljive sastavnice droge inhibiraju proizvodnju prostaglandina E (PGE2), ali i drugih upalnih medijatora poput faktora aktiviranja trombocita (PAF), fosfolipaze A, interleukina 1 (IL-1), dušikovog oksida (NO) i TNF-α. Također, lignan magnolin inhibira proizvodnju TNF-a u LPS-stimuliranoj makrofagnoj staničnoj liniji. Među glavnim hlapljivim sastavnicama koje pokazuju protuupalno djelovanje su monoterpeni 1,8-cineol te α- i β-pinen (Shen i sur., 2008).

Protuupalni učinak eteričnog ulja dokazan je u Wistar štakora kod kojih je izazvan edem stopala. U jednoj od studija testirano je nekoliko životinjskih modela miševa sa akutno izazvanom alergijskom reakcijom te je praćeno antialergijsko djelovanje droge FM. Kako je histamin jedan od najvažnijih posrednika koji doprinose mnogim procesima razvoja preosjetljivosti, istraživanje se temeljilo na pronalasku aktivne tvari koja će inhibirati otpuštanje histamina iz upalnog područja u miševa. Dokazano je da sastavnice eteričnog ulja droge djeluju tako da inhibiraju otpuštanje histamina, što može dodatno uzrokovati smanjenje propusnosti kapilara (Shen i sur., 2008).

Istraživanje provedeno na animalnom modelu kojem je akutna upala izazvana subkutanim injektiranjem karagenana pokazalo je da prethodni tretman eteričnim uljem vrste *Magnolia biondii* znatno mijenja metabolički profil životinja. Protuupalna aktivnost eteričnog ulja se

zasniva na utjecaju na metabolizam masnih kiselina kao i biosintezu i transport kolesterola u životinja. Promjena profila masnih kiselina u skupini životinja s akutnom upalom može se djelomično objasniti povećanom sinteza eikozanoida u akutnoj upali. Nakon primjene *Magnolia biondii* eteričnog ulja, razina arahidonske kiseline je značajno smanjena, tako da se može očekivati da su razine proupalnih eikozanoida smanjene što rezultira smanjenjem upale. Istovremeno, tretitranje eteričnim uljem dovodi do povećanja razine kolesterola, što ukazuje na obnovu sinteze i transporta kolesterola koji se može povezati s oporavljenim povratnim transportom kolesterola (Qi i sur., 2011).

Postoje klinička izvješća koja podupiru djelotvornost TCM formula koje sadrže drogu Magoliae flos u različitim kliničkim uvjetima, međutim to se i dalje smatra niskom razinom dokaza. Do danas je objavljenih sedam randomiziranih kliničkih ispitivanja u kojima uspoređena djelotvornost TCM formula s kontrolom u kliničkim uvjetima. Tri su pokusa uključivala formulu za sezonski alregijski rinitis ili infantilni alergijski rinitis, jedan za astmu i jedan za sinusitis. Šest ispitivanja provedeno je u Kini i jedno u Australiji. Placebo kontrolna grupa bila je uključena u samo jedno ispitivanje. Dosadašnji klinički rezultati pokazuju da se, u usporedbi s kontrolnom grupom, smanjila učestalost pojave upale u usnoj šupljini kod osoba sa ozostomijom, smanjila se ozbiljnost nazalnih i ne-nazalnih simptoma kod osoba sa sezonskim alergijskim rinitisom te se poboljšala plućna funkcija kod osoba sa astmom. Kvalitetna, dobro dizajnirana, randomizirana, dvostruko slijepa, kontrolirana i multi-centrična klinička ispitivanja drohe Magnoliae flos nužna su za daljnju procjenu njene kliničke djelotvornosti (Shen i sur., 2008).

Antifungalno i antibakterijsko djelovanje

Studije su pokazale da dekokt droge Magnoliae flos *in vitro* inhibira rast patogenih gljivica koje obično uzrokuju dermatofitoze. Za vrbolisnu kinesku magnoliju dokazano je da djeluje antibakterijski na sojeve *Staphylococcus aureus,* beta hemolitički *Streptococcus i Diplococcus pneumoniae* (Shen i sur., 2008).

Antiangiogeno i antitrombotsko djelovanje

Istraživanje je pokazalo da nakon što je adjuvansom inducirana angiogeneza i stvaranje granuloma kod miševa, primjena formule koja sadrži drogu FM sprječava proliferaciju endotelnih stanica. U drugoj je studiji proučeno djelovanje šest lignana, uključujući magnolin, fargesin i askantin, na vezanje [^{3}H] faktora aktiviranja trombocita (PAF) u izoliranim membranama trombocita zečeva. Promatrao se utjecaj strukturnih skupina koje posjeduju

navedene supstance na inhibiciju faktora aktiviranja trombocita uspoređujući njihovu polovinu maksimalno efektivne koncentracije (EC_{50}), što predstavlja potentnost lijeka. S obzirom da metilacija ma položaju C5 supstanci smanjuje antagonističku aktivnost PAF , fargesin koji nema metilnu skupinu na tom položaju pokazao se kao najpotentniji agens (Shen i sur., 2008).

Nefroprotektivno djelovanje

Istraživanje je provedeno na modelu štakora kod kojih je dijabetička nefropatija bila uzrokovana intraperitonealnom injekcijom 1% streptozocina. Dokazano je da eterično ulje vrste *Magnolia biondii* djeluje protektivno na bubrežno tkivo kod dijabetičke nefropatije mehanizmom inhibicije ekspresije proteina P-selektina u serumu i bubrežnom tkivu (Wang i sur., 2008).

4.5.6. Monografija droge u Ph. Eur. 9

01/2018:2742

CVJETNI PUPOLJAK KINESKE VRBOLISNE MAGNOLIJE

Magnoliae biondii flos immaturus

DEFINICIJA

Cijeli, osušeni cvjetni pupoljak vrste *Magnolia biondii* Pamp. (sin. *Yulania biondii* (Pamp.) D.L.Fu.).

Sadržaj:- etrično ulje: najmanje 14,0 ml/kg (bezvodna droga).

- magnolin ($C_{23}H_{28}O_7$; Mr 416,5): najmanje 3% (bezvodna droga)

IDENTIFIKACIJA

A. Makroskopska obilježja

B. Mikroskopska obilježja

C. Tankoslojna kromatografija

ISPITIVANJA

Magnolia officinalis Rehder & E.H.Wilson.

Tankoslojna kromatografija (2.2.27).

Ispitivana otopina. Usitniti biljnu drogu do praška koristeći stroj za mljevenje kako bi spriječili zagrijavanje. U 0,5 g praška biljne droge doda se 3,0 ml metanola R. Sonicira se 15 min, zatim centrifugira 15 min. Supernatant se prenese u tikvicu od 5 ml. Doda se 2 ml metanola R ostatku, sonicira se 15 min te centrifugira. Supernatant se prenese u istu tikvicu od 5 ml. Supernatanti se do oznake razrijede s metanolom R. Potom se otopina filtrira kroz membranski filter (nominalna veličina pora 0,45 μm) ukoliko je potrebno.

Poredbena otopina. Otopi se 2,0 mg fargezina R i 2,0 mg magnolina R u metanolu R te razrijedi do 5,0 ml istim otapalom.

Ploča: TLC silikagel F_{254} ploča R (2-10 μm)
Mobilna faza: metanol R, etilacetat R, toluen R (1:5:30 V/V/V)
Nanošenje uzorka: 5μl, mrlja od 8mm
Razvoj kromatografije: duž puta od 7 cm
Sušenje: na zraku
Detekcija: s vanilin reagensom R, zagrijati na 100-105˚C 5-7 minuta, promatrati pod dnevnim svijetlom
Rezultati: kromatogram dobiven s ispitivanom otopinom ne prikazuje rozu mrlju (magnolol) ispod zone fargezina u kromatogramu dobivenom s poredbenom otopinom.

Voda (2.2.13): najviše 100 ml/kg, određeno na 25,0 g fino usitnjene biljne droge.

Ukupni pepeo (2.4.16): najviše 4%.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Eterično ulje (2.8.12). Doda se 15,0 g svježe, fino usitnjene biljne droge u tikvicu s okruglim dnom od 1l, potom 300 ml vode R kao tekućine za destilaciju i 0,50 ml ksilena R u graduiranu cijev. Destilira se brzinom 2-3 ml/min, 3 sata.

Magnolin. *Tekućinska kromatografija* (2.2.29)

Ispitivana otopina. Usitni se biljna droga u prašak koristeći stroj za mljevenje kako bi spriječili zagrijavanje. U 0,250 g praška biljne droge doda se 35 ml metanola R. Sonicira se 1 sat, uz promjenu vode u ultrazvučnoj kupelji nakon 30 min soniciranja kako bi se spriječilo zagrijavanje. Zatim se centrifugira 15 min. Supernatant se prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml. Ekstrakcija se ponovi dva puta, na način da se prvi put ostatku doda 35 ml metanola R, odnosno drugi put 20 ml metanola R. Sjedinjeni supernatanti se ohlade i razrijede do 100,0 ml

s metanolom R. 1 ml otopine razrijedi se do 2,0 ml s mješavinom otapala acetonitril R i voda za kromatografiju R u omjeru 10:90 (V/V). Potom se otopina filtrira kroz membranski filter (nominalna veličina pora 0,45 μm).

Poredbena otopina (a). Otopi se 5,0 mg magnolina CRS u metanolu R i razrijedi do 10,0 ml s istim otapalom. 1 ml otopine razrijedi se do 5,0 ml s mješavinom otapala acetonitril R i voda za kromatografiju R u omjeru 10:90.

Poredbena otopina (b): U 0,250 g cvjetnog pupoljka vrbolisne magnolije za prikladnost sustava HRS doda se 35 ml metanola R. Sonicira se 1 sat, uz promjenu vode u ultrazvučnoj kupelji nakon 30 min soniciranja kako bi se spriječilo zagrijavanje. Zatim se centrifugira 15 min. Supernatant se prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml. Ekstrakcija se ponovi dva puta, na način da se prvi put ostatku doda 35 ml metanola R, odnosno drugi put 20 ml metanola R. Sjedinjeni supernatanti se ohlade i razrijede do 100,0 ml s metanolom R. 1 ml otopine razrijedi se do 2,0 ml s mješavinom otapala acetonitril R i voda za kromatografiju R u omjeru 10:90 (V/V). Potom se otopina filtrira kroz membranski filter (nominalna veličina pora 0,45 μm).

Kolona:
- *veličina:* l = 0,15 m, Ø = 4,6 mm;
- *stacionarna faza:* modificirani oktadecilsilikagel za kromatografiju R (5 μm);
-*temeratura:* 30˚C.

Mobilna faza:
- *mobilna faza A:* bezvodna octena kiselina R, acetonitril R, voda za kromatografiju R (0,1:14:85,9 V/V/V)
- *mobilna faza B:* bezvodna octena kiselina R, voda za kromatografiju R, acetonitril R (0,1:4,9:95 V/V/V);

Vrijeme (min)	Mobilna faza A (postotak V/V)	Mobilna faza B (postotak V/V)
0 – 12	68	32
12 – 20	68 → 0	32 → 100
20 – 28	0	100

Brzina protoka: 1,0 ml / min
Detekcija: spektrofotometar na 278 nm.
Injektiranje: 20 µl.
Identifikacija pikova: koristi se kromatogram dobiven s cvjetnim pupoljkom vrbolisne magnolije za prikladnost sustava HRS i kromatogram dobiven s poredbenom otopinom (b) za identifikaciju pika eudesmina; kosristi se kromatogram dobiven s poredbenom otopinom (a) za identifikaciju pika magnolina.
Vrijeme zadržavanja: eudesmin = oko 12 min, magnolin = oko 13 min.
Prikladnost sustava: poredbena otopina (b):
- *rezolucija:* najmanje 1,8 između pikova eudesmina i magnolina.

Ako je potrebno, razrijediti ispitivanu otopinu mješavinom otapala acetonitril R: voda za kromatografiju R u omjeru 10:90 (V/V) da se dobije pik magnolina s visinom koja je slična ili manja od visine odgovarajućeg pika u kormatogramu dobivenom s poredbenom otopinom (a). Uzeti u račun dodatni dilucijski faktor d.

Izračunati postotak sadržaja magnolina koristeći slijedeći izraz:

$$\frac{A_1 \; x \; m_2 \;\; x \; p \; x \; 4 \; x \; d}{A_2 \; x \; m_1}$$

A_1 = površina pika magnolina u kromatogramu dobivenom s ispitivanom otopinom;
A_2 = površina pika magnolina u kromatogramu dobivenom s poredbenom otopinom (a);
m_1 = masa ispitivane biljne droge koja se koristi za pripremu ispitivane otopine, u gramima;
m_2 = masa magnolina CRS koji se koristi za pripremu poredbene otopine (a), u gramima;
p = postotak sadržaja magnolina u magnolinu CRS;
d = dodatni dilucijski faktor

(EDQM, 2018).

5. ZAKLJUČAK

S obzirom da fitoterapija predstavlja okosnicu liječenja u okviru sustava tradicionalne kineske medicine, kineske biljne droge dobivaju sve veći značaj u medicinskoj primjeni u zapadnim zemljama, a privlače i znanstvenike širom svijeta. Na temelju sustavnog pretraživanja i proučavanja stručne i znanstvene literature u ovom radu dan je detaljan prikaz recentnih spoznaja za pet kineskih ljekovitih droga koje se već stoljećima primjenjuju u kineskoj medicini. Iako se početak njihove primjene veže uglavnom uz samouko narodno liječenje, istraživane biljne droge danas se primjenjuju i u službenoj ljekarničkoj praksi i to ne samo u azijskim zemljama, već su sve prisutnije i u Europi. Dosad provedena, pretežito pretklinička istraživanja upućuju na to da bi tradicionalna primjena pojedinih droga u prevenciji i liječenju mogla imati znanstveno uporište, međutim kliničkih dokaza koji bi potvrdili njihovu djelotvornost i sigurnu primjenu u ljudi uvelike nedostaje. Značajan problem predstavlja i nedostupnost cjelovitih znanstvenih radova s obzirom da je najveći broj studija proveden u Kini i objavljen u nacionalnim časopisima na kineskom jeziku. Dobiveni podaci također pokazuju da su kineske biljne droge bogati izvori prirodnih molekula te ukazuju na potrebu za daljnjim i opsežnijim znanstvenim istraživanjima s ciljem otkrivanja novih lijekova.

6. LITERATURA

Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 2001, 409 (6821), 729-733.

Artaria C, Maramaldi G, Bonfigli A, Rigano L, Appendino G. Lifting properties of the alkamide fraction from the fruit husks of *Zanthoxylum bungeanum*. *Int J Cosmet Sci*, 2011, 33, 328–333.

Bays H, Mandarino L, Defronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89 (2), 463-478.

Bean BP, MacKinnon D, MacKinnon R. Methods and compositions for preventing and relieving muscle cramps and for recovery from neuromuscular irritability and fatigue following exercise. 2012. W.O. Patent 2012015882 A1.

Bensky D, Clavey S, Stöger E. Chinese Herbal Medicine: Materia Medica. Seatle, Eastland Press, 2004, str. xiv-xx, 42-43, 95-97, 687-689, 690-693.

Chenevard R, Hurlimann D, Be chir M, Enseleit F, Spieker L, Hermann M, Riesen W, Gay S, Gay RE, Neidhart M, Michel B, Lu¨scher TF, Noll G, Ruschitzka F. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery. *Circulation*, 2003, 107 (3), 405-409.

Chiu YJ, Chou SC, Chiu SC, Kao CP, Wu KC i sur. Hepatoprotective effect of the ethanol extract of Polygonum orientale on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(1), 369-379.

Debanth T, Park PJ, Deb Nath NC, Samad NB, Park HW, Lim BO. Antioxidant activity of *Gardenia jasminodes* Ellis fruit extracts. *Food Chem*, 2011, 128 (3), 697-703.

Du Y, Zhao H, Zhang Q, i sur. Effect of fructus polygoni orientalis on the liver function and serum liver fibrosis markers of immune liver fibrosis rats. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, 2011, 9.

EDQM, European Pharmacopoeia. The Ninth Edition (Ph. Eur. 9.5.), Council of Europe, Strasbourg, 2018.

Evodia fructus, http://tcmwiki.com/wiki/fructus-evodiae, pristupljeno 10.06.2018.

Evodia rutaecarpa, http://www.plantea.com.hr/evodija, pristupljeno 10.06.2018.

Fehre J, Granz B, Mertelmeier T. Method for measurement of the threedimensional density distribution in bones. 2006. U.S. Patent 20060013361 A1.

Gardenia jasminoides, http://www.plantsrescue.com/tag/cape-jasmine/, pristupljeno 10.06.2018.

Gardeniae fructus, https://tcmwiki.com/wiki/fructus-gardeniae, pristupljeno 10.06.2018.

He SY, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu GL, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. *Life Sci*, 2005, 77 (8), 907-921.

He W , Liu X, Xu H, Gong Y, Yuan F, Gao Y. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts. *Food Chem*, 2010, 123 (2), 521-528.

Henriksen DB, Holst JJ. Use of GLP for the treatment, prevention, diagnosis, and prognosis of bone-related and nutrition-related disorders. 2004. U.S. Patent 2004052862 A1.

Heuer MA, Chaudhuri S, Clement K. Composition for promoting weight loss comprising yohimbine, *Evodia rutaecarpia* extract and L-carnitine. 2008. W.O. Patent 2008067639 A1.

Ho KC, U SJ, Hwa LR. Skin whitening composition containing indole alkaloid compound. 2010. K.R. Patent 2010049240.

Hongmei W, Hao M, Juan Z. Effects of fructus polygoni orentalis on the immune function of mice. *Henan Traditional Chinese Medicine*, 2010, 7.

Joji Y, Kazunori Y, Masanao I, Mamoru S. Cerebral function improver. 1988. J.P. Patent 63287724 A.

Kim HR, Kim JM, Kim MS,Hwang JK, Yang SH, Kim HJ, Lee DS, Oh H, Kim YC, Ryu DG, Lee YR, Kwon KB. Inhibitory effects of Pericarpium zanthoxyli extract on adipocyte differentiation. *Int J Mol Med*, 2014, 33 (5), 1140-1146.

Koo HJ, Song YS, Kim HJ, Lee YH, Hong SM, Kim SJ, Kim BC, Jin C, Lim CJ, Park EH. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol*, 2004, 495 (2-3), 201-208.

Komatsu K, Wakame K, Kano Y. Pharmacological properties of galenical preparation. XVI. Pharmacokinetics of evodiamine and the metabolite in rats. *Biol Pharm Bull*, 1993, 16 (9), 935-938.

Lan Y, Li H, Chen YY, Zhang YW, Liu N, Zhang Q, Wu Q. Essential oil from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. and its main components used as transdermal penetration enhancers: A comparative study. *J Zhejiang Univ Sci*, 2014,15, 940–952.

Li Z, Xu C. The fundamental theory of traditional Chinese medicine and the consideration in its research strategy. *Front Med*, 2011, 208-211.

Li XD, Xue HL. Antifungal activity of the essential oil of *Zanthoxylum bungeanum*, and its major constituent on *Fusarium sulphureum*, and dry rot of potato tubers. *Phytoparasitica*, 2014, 42, 509–517.

Lin CM, Shih CM, Wu JY. Pharmaceutical composition forinhibiting topoisomerase I and method for exploiting drug. 2010. U.S. Patent 20100144763 A1.

Liu J, Yin F, Zheng X, Jing J, Hu Y. Geniposide, a novel agonist for GLP-1 receptor, prevents PC12 cells from oxidative damage via MAP kinase pathway. *Neurochem Int*, 2007, 51 (6-7), 361-369.

Liu H, Chen YF, Li F, Zhang HY. Fructus Gardenia (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) phytochemistry, pharmacology of cardiovascular, and safety with the perspective of new drugs development. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15 (1), 94-110.

Liu JH, Yin F, Guo LX, Deng XH, Hu YH. Neuroprotection of geniposide against hydrogen peroxide induced PC12 cells injury: involvement of PI3 kinase signal pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30 (2), 159-165.

Longoni B, Boschi E, Demontis GC, Marchiafava PL, Mosca F. Regulation of Bcl-2 protein expression during oxidative stress in neuronal and in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260, 522–526.

Lu CQ, Lu XY. Study on antioxidant and antibacterial effects of different kinds of *Zanthoxylum bungeanum*. *J Chin Mater Med*, 1995, 20, 752-753.

Magnolia biondii Pamp., https://www.empowering-medicine.com/xin-yi-hua-%E8%BE%9B%E5%A4%B7-magnolia-flower/, pristupljeno 11.06.2018.

Magnolia biondii Pamp., www.efloras.org, pristupljeno 11.06.2018.

Magnoliae biondii bud, https://tcmwiki.com/wiki/flos-magnoliae, pristupljeno 11.06.2018.

Mineo S. External anti-inflammatory preparation. 1994. J.P. Patent 06312932 A.

Miura T, Nishiyama Y, Ichimaru M, Moriyasu M, Kato A. Hypoglycemic activity and structure-activity relationship of iridoidal glycosides. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19 (1), 160-161.

Nam KN, Choi YS, Jung HJ, Park GH, Park JM, Moon SK, Cho KH, Kang C, Kang I, Oh MS, Lee EH. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10 (4), 493-499.

Olesen IJ, Olesen J. Treatment of migraine and headaches. 2007. W.O. Patent 2007009462 A2.

Polygoni orientalis fructus, http://tcmwiki.com/wiki/fructus-polygoni-orientalis, pristupljeno 11.06.2018.

Polygonum orientale L., http://www.selectseeds.com/, pristupljeno 11.06.2018.

Polygonum orientale L., http://www.efloras.org, pristupljeno 11.06.2018.

Praticò D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VM. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. FASEB J, 2002, 16 (9), 1138-1140.

Qi Y, Qu L, Wu Y, Fan G. A plasma metabonomic investigation into the intervention of volatile oil of *Magnolia biondii* Pamp on rat model of acute inflammation. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137 (1), 487-494.

Qing S, Yiceng L. Research on anti-cancer effect of *Polygonum orientale* L., *China Pharmacist*, 2009, 10.

Reid JL, Dawson D, Macrae IM. Endothelin, cerebral ischaemia and infarction. *Clin Exp Hypertens*, 1995, 17 (1-2), 399-407.

Romero T, Miller P. Dietary supplements containing extracts of cinnamon and methods of using same to promote weight loss. 2006. U.S. Patent 20060013903 A1.

Romero T. Dietary supplement including He Shou Wu, parasitic Loranthus and green tea to promote weight loss. 2006. U.S. Patent 20060233828 A1.

Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1999, 155 (4), 1281-1291.

Shen Y, Li CG, Zhou SF, Pang EC, Story DF, Xue CC. Chemistry and bioactivity of Flos Magnoliae, a Chinese herb for rhinitis and sinusitis. *Curr Med Chem*, 2008, 15 (16), 1616-1627.

Sheng C, Zhang W, Dong G, Wang S, Miao Z, Yao J, Zhang Y, Zhu L, Zhuang C. Evodiamine compounds, preparation method thereof and application thereof. 2012. C.N. Patent 102311434 B.

Sheng C, Zhang W, Wang S, Fang K, Dong G, Miao Z, Yao J, Li Z, He S, Chen W, Jiang Y. Oxa- or thio-evodiamine anti-tumor derivatives and preparation method thereof. 2014. C.N. Patent 103992336 A.

Shi XP, Zhang WM, Zhang MZ, Guan RQ. Analgesic, anti-inflammatory and anti-pruritic effects of the total alkaloids isolated from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Chin Wild Plant Resour*, 2011, 30, 46-49.

Shin H, Park Y, Jeon YH, Yan XT, Lee KY. Identification of *Polygonum orientale* constituents using high-performance liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry. Biosci Biotechnol Biochem, 2018, 82(1), 15–21.

Stemme V, Swedenborg J, Claesson H, Hansson GK. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2000, 20 (2), 146-152.

Sun XP, Wang NS, Xue Q, Wang F. Volatile oil of *Magnolia biondii* inhibits expressions of P-selectin protein in serum and renal tissue of rats with diabetic nephropathy. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2008, 6 (5), 524-529.

Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, Sawada Y. Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21, 1062–1066.

Takanaga H, Ohnishi A, Yamada S, Matsuo H, Morimoto S, Shoyama Y, Ohtani H, Sawada Y. Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293 (1), 230-236.

Tang W, Eisenbrand G. *Polygonum* spp.. In: Chinese Drugs of Plant Origin. 1992, Springer, Berlin, Heidelberg, str. 787-791.

Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (1), 44-49.

Tang YF, Tang XH, Zhang ML, Yang QQ, Hu T. Composition and antimicrobial activity of essential oil extracted from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Nat Sci J Xiangtan Univ*, 2013, 35, 64-69.

Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, Komano T, Hori R. Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther*, 1992, 263 (2), 840-845.

Tao X, Chen P, Chen R, Pang W, Wang J. Medicinal composition for colon cancer and method for preparing effective monomers thereof. 2011. C.N. Patent 101978962 A.

Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadotaet S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum. J Ethnopharmacol*, 2001, 77, 209-217.

Toriizuka K, Kamiki H, Ohmura NY, Fujii M, Hori Y, Fukumura M, Hirai Y, Isoda S, Nemoto Y, Ida Y. Anxiolytic effect of Gardeniae Fructus-extract containing active

ingredient from Kamishoyosan (KSS), a Japanese traditional Kampo medicine. *Life Sci*, 2005, 77 (24), 3010-3020.

Wagner H, Bauer R, Melchart D, Xiao PG, Staudinger A. Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines. Wien, Springer-Verlag, 2011, str. 191-193, 245-247, 391-394, 719-721.

Wang J. Medicine for treating alzheimer's disease. 2008. C.N. Patent 101120946 A.

Wei Y, Chen X, Jiang X, Ma Z, Xiao J. Determination of taxifolin in *Polygonum orientale* and study on its antioxidant activity. J Food Compositi Anal, 2009, 22(2), 154-157.

Wei XH, Cheng XM, Shen JS, Wang ZT. Antidepressant effect of Yueju-Wan ethanol extract and its fractions in mice models of despair. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117 (2), 339-344.

World Health Organization. Medicinal plants in China: a selection of 150 commonly used species. WHO Regional Publications Western Pacific Series No. 2, Manila, 1989, str. 131, 137.

Wu SY, Wang GF, Liu ZQ, Rao JJ, Lu L, Xu W, Wu SG, Zhang JJ. Effect of geniposide, a hypoglycemic glucoside, on hepatic regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30 (2), 202-208.

Xi L, Qian Z, Xu G, Zheng S, Sun S, Wen N, Sheng L, Shi Y, Zhang Y. *J Nutr Biochem*, 2007, 18 (1), 64-72.

Xu J, Bian X, Zhao G, Zhou H, Wang M. Related ingredient combination with function of relaxing vessels in traditional Chinese medicine for reducing blood pressure. 2012. C.N. Patent 102727762 A.

Yao J. Tiao He Yi Wei granule, a traditional Chinese medicine, against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, Article ID 647283, 8 stranica.

Yang ZY, Qian SH, Qin MJ. A new triterpenoid saponin from the fruits of *Polygonum orienta*le. *Yao xue xue bao*, 2008, 43(4), 388-391.

Yarosh DB, Galvin JW, Nay SL, Peña AV, Canning MT, Brown DA. Anti-inflammatory activity in skin by biomimetic of *Evodia rutaecarpa* extract from traditional Chinese medicine. *J Dermatol Sci*, 2006, 42 (1), 13-21.

Ying S, Rong S, Jing T, Yan Y, Juan L, Li L, Jia C. Evodiamine dispersion tablets and preparation method thereof. 2012. C.N. Patent 102727454 A.

Yokoo Y, Kobayashi Y, Nakano Y. Lipid metabolism ameliorants 1997. W.O. Patent 9747209 A1.

Yoshida N, Takagi A, Kitazawa H, Kawakami J, Adachi I. Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by extracts of and monoterpenoids contained in Zanthoxyli fructus. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 209 (2), 167-173.

Zanthoxyli bungeani pericarpium, https://tcmwiki.com/wiki/pericarpium-zanthoxyli**,** pristupljeno 11.06.2018.

Zanthoxylum bungeanum Maxim., http://www.efloras.org/, pristupljeno 11.06.2018.

Zanthoxylum bungeanum Maxim., https://i0.wp.com/lejardindepices.wordpress-hebergement.fr//wp-content/uploads/sites/1079/2017/04/Zanthoxylum-piperitum.jpg, pristupljeno 11.06.2018.

Zhai Y, Cheng F, Wang T, Chu Z, Li N. *In vitro* anticancer activity of taxifolin on human cervical cancer Hela cells and its mechanism. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2011, 12.

Zhai YJ, Chu ZY, Cheng JY. Experimental study on eliminating indigestion and relieving pain of Fructus polygoni orientalis. *Chin Herb Med*, 2006, 29, 1345–1346.

Zhai Y, Tong M, Cheng F, Zhu Q. Anticancer activity of taxifolin and 3,3′-dimethyl ellagic acid-4-O-β-D-glucopyranoside on cancer cells in vitro. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2012, 2.

Zhang ZM, Lei XY, Xu AX, Gao X, Ge B. Effects of alcohol extract from Fructus Polygoni Orientalis on antilipoperoxidation. *Chung Kuo Yao Hsueh Tsa Chih*, 2005, 13, 991-993.

Zhang CY, Parton LE, Ye CP, Krauss S, Shen R, Lin CT, Porco JA Jr, Lowell BB. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab*, 2006, 3 (6), 417-427.

Zhang Y, Wang J, Wang C, Li Z, Liu X, Zhang J, Lu J, Wang D. Pharmacological basis for the use of evodiamine in Alzheimer's disease: antioxidation and antiapoptosis. *Int J Mol Sci*, 2018, 19, 1527.

Zhang M, Wang J, Zhu L, Li T, Jiang W, Zhou J, Peng W. *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (Rutaceae): A systematic review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10), 2172.

Zhangfu C, Dexian J, Bare J. Chinese Materia Medica. Beijing, People's Medical Publishing House, 2014, str. 12-13.

Zhao L. Pharmaceutical composition containing evodiamine and evodiamine derivative and bcl-2 inhibitor and use thereof. 2014. W.O. Patent 2014047779 A1.

Zhao L. Pharmaceutical composition containing evodiamine, evodiamine derivative and Bc1-2 inhibitor, and the application. 2012. C.N. Patent 102688490 A.

Zhao Z, Hu Y Liang Z, Yuen JP, Jiang Z, Leung KS. Authentication is fundamental for standardization of Chinese medicines. *Planta Med*, 2006, 865-874.

Zheng S, Qian Z, Tang F, Sheng L. Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70 (8), 1192-1198.

Zhou CH, Qian ZY, Zheng SG, Xiang M. ERK1/2 pathway is involved in the inhibitory effect of crocetin on angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol*, 2006, 535 (1-3), 61-68.

Zhu D. Application of evodiamine to preparation of anti-ultraviolet composition. 2013. C.N. Patent 102885701 A.

Zhu D. Application of evodiamine to preparation of anti-ultraviolet composition. 2013. C.N. Patent 102885702 A.

Zhu D. Application of evodiamine to preparation of anti-ultraviolet composition. 2013. C.N. Patent 102885703 A.

Zhu D. Application of evodiamine to preparation of anti-ultraviolet composition. 2013. C.N. Patent 102885704 A.

Zhu D. Application of evodiamine to preparation of anti-ultraviolet composition. 2013. C.N. Patent 102885705 A.

Zhu D. Application of evodiamine to preparation of anti-ultraviolet composition. 2013. C.N. Patent 102885819 A.

Zhu RX, Zhong K, Zeng WC, He XY, Gu XQ, Zhao ZF, Gao H. Essential oil composition and antibacterial activity of *Zanthoxylum bungeanum*. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5, 4631-4637.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Kineske biljne droge već se stoljećima koriste u liječenju u okviru sustava tradicionalne kineske medicine, a u novije vrijeme sve veću pozornost dobivaju i u zapadnim zemljama. Na temelju rezultata sustavnog pretraživanja i proučavanja relevantne stručne i znanstvene literature, u radu je dan pregled biljnih izvora, tradicionalne primjene, rezultata dosadašnjih fitokemijskih istraživanja te pretkliničkih i kliničkih studija za pet kineskih biljnih droga: Evodiae fructus, Gardeniae fructus, Polygoni orientalis fructus, Zanthoxyli bungeani pericarpium i Magnoliae biondii flos immaturus. Za odabrane droge, dobivene od plodova i cvjetova kineskih biljnih vrsta, po prvi puta su utvrđene norme kakvoće u obliku suvremenih monografija u važećem devetom izdanju Europske farmakopeje te su sastavni dio rada i hrvatski prijevodi tih monografija. Ovako objedinjeni podaci omogućuju farmaceutima stjecanje novih znanja i širenje kompetencija u području fitofarmacije.

Chinese herbal drugs have been used for centuries in traditional Chinese medicine, and lately they are recieving more and more attention among patients, but also scientists in western countries. Based on the results of systematic research and study of relevant scientific and professional literature, an overview of plant sources, traditional uses, results of previous phytochemical research and preclinical and clinical studies was made for five Chinese herbal drugs: Evodiae fructus, Gardeniae fructus, Polygoni orientalis fructus, Zanthoxli bungeani pericarpium and Magnoliae biondii flos imaturus. For selected drugs, obtained from fruits and flowers of Chinese plant species, quality standards have been established for the first time in the form of modern monographs in the ninth edition of the European Pharmacopoeia, so the Croatian translations of these monographs are also an integral part of this thesis. All this data enables pharmacists to gain new knowledge and improve their competencies in the field of phytopharmacy.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

NOVE KINESKE BILJNE DROGE (FLORES ET FRUCTUS) U 9. IZDANJU EUROPSKE FARMAKOPEJE

Ana Kovačević

SAŽETAK

Kineske biljne droge već se stoljećima koriste u liječenju u okviru sustava tradicionalne kineske medicine, a u novije vrijeme sve veću pozornost dobivaju i među pacijentima, ali i znanstvenicima zapadnih zemalja. Na temelju rezultata sustavnog pretraživanja i proučavanja relevantne stručne i znanstvene literature, u radu je dan pregled biljnih izvora, tradicionalne primjene, rezultata dosadašnjih fitokemijskih istraživanja te pretkliničkih i kliničkih studija za pet kineskih biljnih droga: Evodiae fructus, Gardeniae fructus, Polygoni orientalis fructus, Zanthoxyli bungeani pericarpium i Magnoliae biondii flos immaturus. Za odabrane droge, dobivene od plodova i cvjetova kineskih biljnih vrsta, po prvi puta su utvrđene norme kakvoće u obliku suvremenih monografija u važećem devetom izdanju Europske farmakopeje pa su sastavni dio rada i hrvatski prijevodi tih monografija. Ovako objedinjeni podaci omogućuju farmaceutima stjecanje novih znanja i širenje kompetencija u području fitofarmacije.

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

Rad sadrži: 54 stranice, 15 grafičkih prikaza i 104 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Tradicionalna kineska medicina, biljne droge, Europska farmakopeja, znanstveni dokazi

Mentor: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc., **Marija Kindl***, viša asistentica - poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Željka Vanić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

NEW CHINESE HERBAL DRUGS (FLORES ET FRUCTUS) IN THE NINTH EDITION OF THE EUROPEAN PHARMACOPOEIA

Ana Kovačević

SUMMARY

Chinese herbal drugs have been used for centuries in traditional Chinese medicine, and lately they are recieving more and more attention among patients, but also scientists in western countries. Based on the results of systematic research and study of relevant scientific and professional literature, an overview of plant sources, traditional uses, results of previous phytochemical research and preclinical and clinical studies was made for five Chinese herbal drugs: Evodiae fructus, Gardeniae fructus, Polygoni orientalis fructus, Zanthoxli bungeani pericarpium and Magnoliae biondii flos imaturus. For selected drugs, obtained from fruits and flowers of Chinese plant species, quality standards have been established for the first time in the form of modern monographs in the ninth edition of the European Pharmacopoeia, so the Croatian translations of these monographs are also an integral part of this thesis. All this data enables pharmacists to gain new knowledge and improve their competencies in the field of phytopharmacy.

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

Thesis includes: 54 pages, 15 figures and 104 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Traditional Chinese medicine, herbal drugs, European Pharmacopoeia, scientific evidence

Mentor: **Biljana Blažeković**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Blažeković**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Kindl, **Ph.D.** *Senior Assistant-Postdoktorand,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vanić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018