Regulatorni status i kontrola kakvoće fitopreparata s ginkom

Jagić, Ružica

Professional thesis / Završni specijalistički

2017

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:163:916637

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ružica Jagić

REGULATORNI STATUS I KONTROLA KAKVOĆE FITOPREPARATA S GINKOM

Specijalistički rad

Zagreb, 2017.

POSLIJEDIPLOMSKI SPECIJALISTIČKI STUDIJ: RAZVOJ LIJEKOVA

Mentor rada: prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Specijalistički rad obranjen je dana 3. ožujka 2017. u Zavodu za farmakognoziju, Marulićev trg 20/II, Zagreb, pred povjerenstvom u sastavu:

1. dr. sc. Maja Bival Štefan, viša asistentica - poslijedoktorandica
2. prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević
3. doc. dr. sc. Donatella Verbanac

Rad ima 65 listova.

Predgovor

Specijalistički rad je izrađen pod vodstvom prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević., na Zavodu za farmakognoziju, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

SAŽETAK

REGULATORNI STATUS I KONTROLA KAKVOĆE FITOPREPARATA S GINKOM

Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je dati sveobuhvatan pregled stručnih i znanstvenih spoznaja o kontroli kakvoće i regulatornim zahtjevima za komercijalne pripravke koji sadrže ginko.

Materijal i metode

Istraživanje u okviru ovog rada je teorijskog karaktera i uključuje pregled dostupne literature o predloženoj temi. U pretraživanju su korištene dostupne elektronske bibliografske baze podataka (Current Contents, ScienceDirect, Scopus, PubMed) te mrežne stranice relevantnih hrvatskih i europskih institucija (Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Ministarstvo zdravstva, Europska Agencija za lijekove i medicinske proizvode i Europska agencije za sigurnost hrane).

Rezultati

Fitopreparati s ginkom se široko primjenjuju za ublažavanje simptoma oslabljenih kognitivnih funkcija povezanim sa starenjem, od blagog gubitka pamćenja i cerebralne insuficijencije do demencije. Da bi se osigurala učinkovitost i sigurnost primjene, za izradu fitopreparata koriste se standardizirani ginkovi ekstrakti. Postoji značajna razlika u regulatornim zahtjevima komercijalnih pripravaka koji sadrže ginko u statusu lijeka i dodatka prehrani. Biljni lijekovi koji sadrže ginko mogu se registrirati kao lijekovi za kojeg je dostupna cjelovita dokumentacija, lijekovi s provjerenom medicinskom uporabom ili tradicionalni biljni lijekovi. Nadležno tijelo za lijekove u Republici Hrvatskoj je Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dodaci prehrani su regulirani zakonodavstvom o hrani, a u nadležnosti su Ministarstva zdravstva.

Zaključci

Iako nije propisano zakonskom regulativom, dodatke prehrane s ginkom trebalo bi, po uzoru na biljne lijekove, podvrgavati zahtjevnijim ispitivanjima kakvoće prije stavljanja u promet, postrožiti nadzor i prijavljivati neželjene učinke u praksi.

SUMMARY

REGULATORY STATUS AND QUALITY CONTROL OF GINKGO PREPARATIONS

Objectives

The aim of this work was to give a comprehensive overview of professional-related and scientific aspects of quality control and regulatory requirements for commercial products containing ginkgo.

Material and methods

This work is a theoretical investigation of the available literature on the topic. Targeted literature search was conducted using online scientific databases (Current Contents, ScienceDirect, Scopus, PubMed) and web pages of the relevant Croatian and European institutions (Agency for Medicinal Products and Medical Devices, Ministry of Health, European Agency for Medicinal Products and European Food Safety Authority).

Results

Ginkgo biloba products are widely used to ameliorate the symptoms of age-related cognitive decline in conditions ranging from mild memory impairment and cerebral insufficiency to dementia. In order to ensure the efficiency and safety of ginkgo preparations, standardized extracts are used. There are significant differences in the regulatory requirements between dietary supplements and medicinal products of commercial preparations containing ginkgo. Ginkgo medicinal products can be regulated as a traditional herbal medicinal product or a herbal medicinal product with a well-established use. The Agency for Medicinal Products and Medical Devices is the competent Croatian authority for medicinal products. Dietary supplements are regulated by food legislation under the responsibility of the Ministry of Health.

Conclusion

Although not required by legislation, *Ginkgo biloba* dietary supplements should be subjected to demanding quality and safety tests before they are marketed. Furthermore, monitoring of dietary supplements must be tightened up and side effects should be reported.

SADRŽAJ

1. Uvod i pregled područja istraživanja 1
1.1. Botanički podaci o vrsti *Ginkgo biloba* L. 2
1.2. Fitokemijski sastav ginka 3
1.3. Podaci o nekliničkim istraživanjima ginka 5
1.4. Podaci o toksikološkim ispitivanjima ginka 7
1.5. Podaci o mehanizmima djelovanja i kliničkim istraživanjima ginka 8
1.6. Terapijska primjena ginka 11
1.7. Sigurnosni profil ginka 12
2. Cilj istraživanja 13
3. Materijali i metode 14
4. Rezultati i rasprava 15
4.1. Ginko u komercijalnim fitopreparatima 15
4.1.1. Razlika između bezreceptnih lijekova i dodataka prehrani 15
4.1.2. Stavljanje u promet lijeka koji sadrži ginko 15
4.1.3. Zakonska osnova za registraciju lijeka koji sadrži ginko 18
4.1.4. Monografija *Ginkgo biloba* L., folium 23
4.1.5. Stavljanje u promet dodatka prehrani koji sadrži ginko 30
4.1.6. Zdravstvene tvrdnje o dodacima prehrani koji sadrže ginko 33
4.1.7. Farmakovigilancija i nutrivigilancija 36
4.1.8. Izražavanje sastava fitopreparata s ginkom 37
4.2. Kakvoća fitopreparata s ginkom 40
4.2.1. Farmakopejska monografija droge Ginkov list 41
4.2.2. Farmakopejska monografija droge Ginkov suhi ekstrakt, rafiniran i kvantificiran 46
4.2.3. HPLC metoda određivanja flavonoida u biljnom materijalu i fitopreparatima ginka (AOAC 2006.07) 52
4.2.5. Usporedba farmakopejske i AOAC 2006.07 metode određivanja flavonoida ginka 56
4.2.6. Krivotvorenje fitopreparata s ginkom 57
4.2.7. Nadzor dodataka prehrani s ginkom u Republici Hrvatskoj 58
5. Zaključci 60
6. Literatura 61
7. Životopis 64

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Ginkgo biloba L. je najstarija biljka na Zemlji koja ne pokazuje taksonomsku srodnost s ostalim danas živućim biljnim vrstama i jedina je preživjela vrsta iz porodice Ginkgoaceae. Prema fosilnim ostacima (slika 1) ustanovljeno je da ginko potječe iz razdoblja prije 250-260 milijuna godina, a pradomovinom se smatra današnje područje Kine i Japana. Ginko je dugovječna biljka, što dokazuju stabla stara 1000 ili više godina. Obilježavaju ga jedinstveni lepezasti listovi na dugim stapkama te koštuničavi plodovi prema kojima je ginko i dobio ime. Na kineskom jeziku *gin* znači srebro, a *kyo* plod. Dugovječnost ginka posljedica je njegove izuzetne otpornosti na najrazličitije klimatske i druge promjene te štetna djelovanja iz okoliša, na što ukazuje i činjenica da je drvo preživjelo atomsku eksploziju u Hirošimi.

Najstariji pronađeni podaci koji svjedoče o ljekovitom djelovanju ginka i njegovoj primjeni zapisani su u kineskoj farmakopeji staroj oko 5000 godina. Kao dio tradicionalne kineske medicine koristi se kroz cijelu povijest i to prvenstveno za olakšavanje simptoma astme, kašlja te za liječenje bronhitisa i impotencije. U 18. stoljeću ginko se počeo uzgajati u Europi i Amerci kao ukrasna biljka, ali je prošlo puno vremena do njegove medicinske primjene. Sustavna istraživanja ginka započela su 30-tih godina prošloga stoljeća, a traju i danas. Proizvodnja pripravaka na bazi ginka počela je dobivati ozbiljnije razmjere nakon 1994. godine, kada su Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Savezna komisija za monografije droga SR Njemačke (*The German Commission E*) donijele monografiju za ginkov ekstrakt. Time je i formalno odobrena primjena ginka za poboljšanje periferne i cerebralne cirkulacije. (1-3). Fitopreparati s ginkom danas se registriraju kao biljni lijekovi ili dodaci prehrani te se smatraju najprodavanijim i najpopularnijim fitopreparatima u posljednjih 20-tak godina.



Slika 1. Fosilni ostatak vrste *Ginko biloba* L. porijeklom iz Kanade (http://www.wikiwand.com/en/Ginkgo_biloba)

1.1. Botanički podaci o vrsti *Ginkgo biloba* L.

Carstvo: Plantae
Odjeljak: Gymnospermae
Razred: Ginkgoopsida
Red: Ginkgoales
Porodica: Ginkgoaceae
Rod: Ginko
Vrsta: *Ginko biloba* L.

Ginko je do 30 m visoko listopadno drvo, većinom s čunjasto oblikovanom krošnjom. Pripada golosjemenjačama, a jedini je predstavnik roda koji je u davnoj Zemljinoj prošlosti bio zastupljen s mnogo vrsta. Ima sivu do tamnosmeđu, ispucanu i duboko izbrazdanu koru te uglavnom uspravne grane. Dvodomno je drvo koje cvjeta nakon 20 godina, s muškm i ženskim cvjetovima na zasebnim biljkama. Istovremeno s listovima razvijaju se prašnici u dugim resama, a na ženskim jedinkama goli sjemeni zametci, po dva (rijetko 1 ili 3) na vrhu zajedničke stapke. Biljka se oprašuje u svibnju i lipnju. Listovi su lepezasti, dvorežnjasti, s plojkom širokom 6-10 cm i peteljkom do 9 cm i naizgled paralelnom nervaturom (slika 2). U jesen listovi požute. Plodovi su najprije bijelozelene, a kasnije žute koštuničave bobe promjera oko 2,5 cm, mesnate i sočne, neugodna mirisa, s velikom i tvrdom košticom u kojoj se nalazi sjemenka (2, 4).

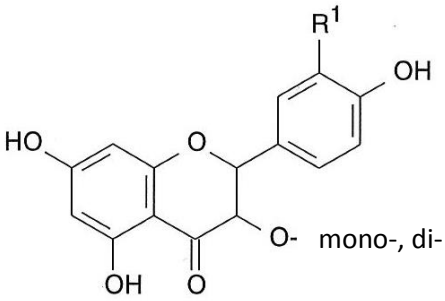


Slika 2. *Ginkgo biloba* L. (Ginkoaceae)

1.2. Fitokemijski sastav ginka

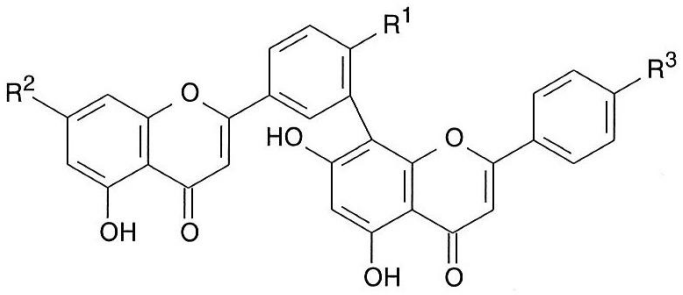
Ginkov list sadrži različite bioaktivne tvari, među kojima su najvažniji polifenoli i terpeni. Polifenoli su prisutni u obliku mono-, di- i triglikozida te acilglikozida flavonola kvercetina, kemferola i izoramnetina (0,5-2%), a prisutni su i neglikozidni biflavoni (amentoflavon, bilobetin i gingetin) te proantocijanidini. Od terpenskih sastavnica posebice se ističu diterpenski laktoni (ginkolidi), te seskviterpenski lakton bilobalid (slika 3). Udjeli ginkolida u listovima su između 0,02% do 0,2%, dok je bilobalid prisutan u količini 0,02-0,06%.

Među ostalim sastavnicama važno je spomenuti ginkolne kiseline (alkil i alkenil fenoli) koje pokazuju toksična svojstva i uzrokuju alergijske reakcije, pa ih se uklanja tijekom izrade ekstrakata. Njihov udio u listovima iznosi 1,7%, dok ih ekstrakti ne smiju sadržavati više od 5 ppm. „Ginkotoksin“ (4’-*O*-metilpiridoksin) je još jedan toksičan spoj s dušikom uglavnom prisutan u plodovima, dok ga u listovima ima samo u tragovima (2, 5, 6).

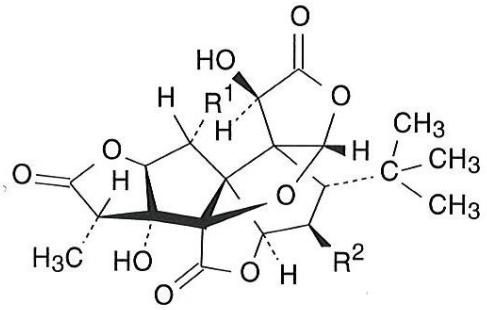


mono-, di- ili triglikozid

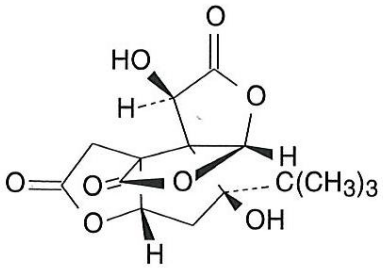
Flavonoli	R^1
Kemferol	H
Kvercetin	OH
Izoramnetin	OCH_3



Biflavoni	R^1	R^2	R^3
Amentoflavon	OH	OH	OH
Bilobetin	OCH_3	OH	OH
Gingetin	OCH_3	OCH_3	OH



Ginkolidi	R^1	R^2
A	H—	H—
B	OH—	H—
C	OH—	OH—
J	H—	OH—



Bilobalidi

Slika 3. Strukture glavnih sastavnica u ginkovom listu (6)

1.3. Podaci o nekliničkim istraživanjima ginka

Provedena su brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja ginka i njegovih sastavnica kojima su ustanovljeni različiti farmakološki učinci. Dokazano je da ginko djeluje antioksidativno, opušta stijenke krvnih žila, poboljšava protok krvi ili mikrocirkulaciju, antagonistički djeluje na faktor aktivacije trombocita (*platelet activated factor*, PAF) i stimulira neurotransmitere.

Ustanovljeno je da ginkov standardizirani ekstrakt EGb 761* (10-100 μg/mL) te njegova flavonoidna frakcija (25 μg/mL), za razliku od terpenskih laktona, štiti stanice hipokampusa štakora od nagomilavanja slobodnih radikala i povoljno djeluje na njihovo preživljenje. Eksperimenti na izoliranoj aorti i veni zeca pokazali su sposobnost fenolnih sastavnica da potiču oslobađanje NO iz endotela, što dovodi do vazodilatacije. Nadalje, istraživanja na izoliranom srcu štakora ukazala su da ginkov ekstrakt može imati važnu ulogu u zaštiti od ishemijsko-reperfuzijske ozljede miokarda i smanjenju pojavnosti reperfuzijskih aritmija, a najveća odgovornost pripisuje se prisutnim ginkolidima. Dokazan je i potencijalni zaštitni učinak terpenskih sastavnica, posebice bilobalida, na štetne učinke hipoksije na *in vitro* modelu vaskularnih endotelnih stanica. Ginkolidima se pripisuje i važna uloga u antagonističkom učinku ginkovog ekstrakta na faktor aktivacije trombocita (1, 7).

In vivo studije su pokazale da oralna primjena ginkovog ekstrakta štiti štakore od inducirane cerebralne ishemije. Primijenjen intravenski, ginkov ekstrakt je također spriječio razvoj višestrukog cerebralnog infarkta u pasa kojima su ubrizgani ugrušci u karotidnu arteriju. Navedeni podaci ukazali su na moguće pozitivno djelovanje ginkovog ekstrakta nakon akutnog moždanog udara ili ishemije uzrokovane embolijom. Nadalje, dokazano je dulje preživljenje pokusnih životinja u hipoksičnim uvjetima koje su dobivale ginkov ekstrakt u odnosu na kontrolnu skupinu. Ekstrakt ginka je također bio učinkovit u *in vivo* tretmanu cerebralnog edema, a značajni antiendemski učinak pripisuje se bilobalidu. U miševa tretiranih standardiziranim ekstraktom ginka (100 mg/kg, oralno, 4-8 tjedana) zapaženo je poboljšanje pamćenja i učenja (1, 2). Pokazalo se da ginkov ekstrakt kod oštećenja sušnog živca u zamoraca povećava ukupni akcijski potencijal slušnog živca te smanjuje metaboličke promjene u pužnici. Oralna ili parenteralna primjena ginkovog ekstrakta (2 mg/kg) pozitivno je djelovala u miševa na ultrastrukturu stanica vesitibularnog epitela kao posljedica djelovanja na kapilarnu permeabilnost i mikrocirkulaciju. Pozitivni učinci ginkovog ekstrakta (50 mg/kg intraperitonealno) na vestibularnu kompenzaciju opaženi su u štakora i mačaka nakon vestibularne neurektomije (2).

* sadrži 24% flavonolskih glikozida i 6% terpenskih laktona

PAF je snažni induktor agregacije trombocita, neutrofilne degranulacije i proizvodnje kisikovih slobodnih radikala, što dovodi do povećane kardiovaskularne permeabilnosti i bronhokonstrikcije. Intravenskom primjenom PAF-a uzrokovana je prolazna tombocitopenija u zamoraca, popraćena bronhospazmom neovisnom o histaminu. Ginkolid B je, kao poznati inhibitor PAF-a, smanjio trobmocitopeniju i bronhokonstrikciju. Nadalje, dokazano je da suzbija bronhokonstrikciju u zamoraca ako se intravenski aplicira (1-3 mg/kg) prije indukcije PAF-om ili ovalbuminom (2, 8).

1.4. Podaci o toksikološkim ispitivanjima ginka

Pri jednokratnoj oralnoj, intravenoznoj i intraperitonealnoj primjeni standardiziranog ginkovog ekstrakta EGb 761, ustanovljena akutna toksičnost (LD_{50}) u miševa iznosi 7,73, 1,1 i 1,9 g/kg, a za štakore > 10, 1,1 i 2,1 g/kg. Nadalje, nema dokaza oštećenja organa, jetrene i bubrežne funkcije u štakora, miševa i pasa, a relevantne doze kod akutne i kronične toksičnosti bile su mnogo veće od onih koje se klinički primjenjuju.

Dosadašnja ispitivanja nisu pokazala mutagene (Amesov test, mikronukleusni test, test aberacije kromosoma) niti kancerogene učinke (ispitivanje kancerogenosti tijekom 104 tjedna u štakora), što upućuje na zaključak da uzimanje ekstrakta ginkova lista u odobrenoj dozi ne predstavlja rizik od nastanka tumora.

Rezultati ispitivanja reproduktivne i razvojne toksičnosti ginkovog ekstrakta su kontradiktorni. Ustanovljen je o dozi ovisan toksični učinak ekstrakta EGb 761 na jajnike štakora pri dnevnoj dozi 20-80 mg, što je suprotno rezultatima starijih studija kojima nisu dokazani teratogeni učinci niti reproduktivna toksičnost kod oralne primjene EGb 761 u štakora (100, 400 ili 1600 mg/kg/dan) i u zečeva (100, 300 ili 900 mg/kg/dan). Istraživanja provedena s ginkolidima A i B (dnevna doza 29-55 μg/kg) rezultirala su smanjenjem sazrijevanja oocita, fertilizacije i razvoja blastocista u pokusnih životinja. No, suprotne rezultate pokazala su druga istraživanja učinka ginkovog ekstrakta na embrionalni razvoj. Visoka doza ginkovog ekstrakta EGb 761 (1935 mg/kg/dan) nije uzrokovala toksične učinke, dok su niske dnevne doze jednog nespecificiranog ekstrakta (417 i 535 mg/kg) uzrokovale povećanu učestalost strukturnih malformacija (40-48%). Pored činjenice da su provedene toksikološke studije napravljene s ginkovim ekstraktima bez definiranog fitokemijskog sastava te su korištene značajno veće doze od onih koje se primjenjuju u kliničkoj praksi, ne treba zanemariti i moguće negativne učinke ginkolnih kiselina kojih u ekstraktima ne bi smjelo biti više od 5 ppm (1).

1.5. Podaci o mehanizmima djelovanja i kliničkim istraživanjima ginka

Ekstrakti ginkovih listova pokazali su djelotvornost u liječenju neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova bolest), zatim oboljenja kardiovaskularnog sustava, karcinoma, stresa, gubitka pamćenja, tinitusa, gerijatrijskih tegoba kao što je vertigo, makularna degeneracija povezana sa starenjem, te kod psihijatrijskih bolesti (shizofrenija). Predloženi su mehanizmi koji uključuju antioksidativni te antitrombotički učinak povezan s inhibicijom PAF-a kod kardiovaskularnih i cerebralnih bolesti, inhibiciju stvaranja β-amiloidnog peptida (Aβ) kod Alzheimerove bolesti te smanjenje ekspresije perifernog benzodiazepinskog receptora (PBR) važno za poboljšanje cirkulacije (1, 9, 10).

Antioksidativni učinak

Smatra se da je antioksidativno djelovanje ginka, kroz inhibiciju i uklanjanje slobodnih radikala, ključno u prevenciji karcinoma te neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti. Ustanovljeno je da ginko pokazuje učinak na različite reaktivne kisikove i dušikove radikale kao što su hidroksilni, peroksilni i superoksidni radikal, vodikov peroksid i dušikov monoksid. Nadalje, može pojačati aktivnost antioksidativnih enizima superoksid dismutaze, glutation perokisidaze, katalaze, i/ili hem-okisigenaze-1. Postoje naznake da ginkov ekstrakti smanjuju ekspresiju mitohondrijskih enzima poput NADH dehidrogenaze, koja ima utjecaj na stvaranje reaktivnih kisikovih radikala u mitohondrijima. Flavonoidi i terpenski laktoni se smatraju glavnim bioaktivnim sastavnicama koji najviše doprinose navedenim učincima (1, 10).

Prevencija neurodegenerativnih bolesti

Alzheimerova bolest je oblik progresivne demencije ili gubitka pamćenja uzrokovanih propadanjem živčanih stanica koje dovodi do moždane atrofije, a pogađa oko 4% populacije iznad 65 godina i 20% iznad 80 godina starosti. Pronađena je veza između Alzheimerove bolesti i povećanog nakupljanja amilodinog β peptida (Aβ) u oboljelih osoba. Ustanovljeno je da ginkov ekstrakt inhibira stvaranje Aβ iz njegova prekursora, što je ključan proces u patogenezi ove bolesti. Nadalje, ekstrakt ginkova lista, posebice flavonoid kvercetin, inhibira akumulaciju slobodnih radikala čije stvaranje inducira Aβ, te tako umanjuje apoptozu neurona. Ginkolid B i bilobalid inhibiraju apoptozu tako što induciraju staurosporin. Bilobalid prevenira fragmentaciju DNA uzrokovanu slobodnim radikalima. Dodatno, ginko poboljšava protok krvi u mozgu tako što stimulira sekreciju norepinefrina te povećava životni vijek stanica. Pozitivno djelovanje ginka na kognitivne sposobnosti, pamćenje i cirkulaciju koje bi moglo biti korisno kod neurodegenerativnih bolesti dokazano je u velikom broju kliničkih studija (1, 9).

Kardiprotektivni učinak

Ishemija, smanjen protok krvi, često je prisutna kod kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih oboljenja. Za vrijeme ishemijskog napada, povećana je količina slobodnih radikala i lipidne peroksidaze, što uzrokuje oštećenje tkiva i rezultira kroničnim bolestima. Kardioprotektivna svojstva ginka temelje se na antioksidativnom i antitrombotičkom djelovanju te poboljšanju cirkulacije. Ispitivanja su pokazala da uzimanje fitopreparata s ginkom prije operacija ima pozitivne učinke na cirkulaciju, nekrozu tkiva te da smanjuje kardiovaskularnu disfunkciju. Ustanovljeno je također da ginkolid B za 50-60% smanjuje postishemijsku produkciju slobodnih radikala. Poboljšanju koronarne cirkulacije doprinosi antitrombotički učinak ginkolida te jačanje kontraktilne funkcije, čemu njaviše doprinose flavonoidi (9).

Antitumorski učinak

Karcinom je bolest koju obilježava nekontrolirana dioba stanica i njihova sposobnosti da invadiraju u druga tkiva. Posljedica je različitih čimbenika koji uključuju promjene u ekspresiji gena i poremećaje u staničnoj signalizaciji. Antitumorski učinak ginka se povezuje s povećanjem tolerancije na oksidacijski stres u stanicama, smanjivanjem angiogeneze i učinkom na sintezu dušikovog oksida koji je uključen u progresiju tumora. Nadalje, u studiji s osobama koje boluju od karcinoma dojke i mokraćnog mjehura pokazalo se da ginko utječe na ekspresiju gena djelujujući na staničnu proliferaciju, diferencijaciju stanica i apoptozu (1, 10).

Učinci na stres, raspoloženje i pamćenje

Pojavnost anksioznih poremećaja kao što su stres, nelagoda i depresija sve su češći u modernom svijetu, a komplementarna i alternativna medicina sve popularnija u profilaksi i liječenju. Stanje stresa može uključivati povišenu razinu glukortikoida, naknadni gubitak pamćenja, pojačanu anksioznost, smanjenje imuniteta, probavne poremećaje, srčani infarkt i povećanu budnost. Budući da su raspoloženje i emocije povezane sa stresom, pozitivni učinci ginka mogu rezultirati i boljim raspoloženjem (1).

Učinci na tinnitus, gerijatrijske i psihijatrijske poremećaje

Zujanje u ušima (tinitus) se pojavljuje u približno 10% populacije, a jedan od čestih uzroka je nedovoljna opskrba unutarnjeg uha krvlju. Iako su provedene brojne studije, još uvijek nema pozdanih kliničkih dokaza o pozitivnom učinku ginka na tinitus jer su u istraživanjima korišteni različitii komercijalni fitopreparati i doze te nema jednoznačne procjene rezulatata. Makularna degeneracija je jedan od vodećih uzroka gubitka vida povezanog sa starenjem, a degenerativni procesi se povezuju s oksidacijskim stresom i slobodnim radikalima. Osim u

navedenom slučaju, ginko je pokazao učinak kod poremećaja orijentacije u prostoru (vertiga). Shizofrenija je mentalna bolest koja uključe poremećaj percepcije stvarnosti te značajnu socijalnu ili profesionalnu disfunkciju. Tu bolest obilježava povećano stvaranje slobodnih radikala u mozgu, a neke su kliničke studije pokazale pozitivne učinke ginka kod shizofrenije jer povećava razinu antioksidativnih enzima (1, 9).

1.6. Terapijska primjena ginka

Prema literaturi, najčešća primjena fitopreparata koji sadrže ginko može se podijeliti u tri indikacijske skupine: cerebrovaskularna, periferna vaskularna ili tkivna oštećenja. U literaturi se najčešće spominje simptomatsko liječenje blage do umjerene moždane insuficijencije (demencija sindroma primarne degenerativne demencije, vaskularne demencije, te mješoviti oblici ili oboje) sa sljedećim simptomima: deficit memorije, smetnje koncentracije, depresivna stanja, vrtoglavica, tinitus i glavobolje. Ekstrakti se koriste za povećanje udaljenosti hodanja bez boli u osoba s perifernom arterijskom okluzivnom bolešću u stanjima kao što su intermitentna klaudikacija, Raynaudova bolest, akrocijanoza i sindrom upale vena, te za liječenje poremećaja vezanih za unutarnje uho kao što su vertigo i tinitus (2, 6, 7).

S obzirom da se fitokemijski sastav ginkova lista mijenja ovisno o geografskim i ekološkim čimbenicima, neophodno je standardizirati biljni materijal da bi se osigurala ujednačena učinkovitost i sigurnost primjene fitopreparata koji sadrže ginko. Većina ekstrakata korištena u provedenim istraživanjima su suhi ekstrakti osušenog lista dobiveni ekstrakcijom s acetonom i vodom, s omjerom droge i ekstrakta 35-67:1, a sadrže 22-27% flavonolskih glikozida i 5-7% terpenskih laktona, među kojima je 2,8-3.4% ginkolide A, B, C te 2,6-3,2% bilobalida. Ginkolatnih kiselina je manje od 5mg/kg (2).

1.7. Sigurnosni profil ginka

Ispitivanja pokazuju relativno malen rizik pri korištenju fitopreparata koji sadrže ginko. Oprez je potreban u slučaju istodobne primjene s inhibitorima monoaminoksidaze jer ginko pokazuje sposobnost inhibicije monoamin oksidaze, što bi moglo rezultirati sinergističkim učinkom. S obzirom da ginko inhibira PAF, nužan je oprez kada se kombinira s antikoagulansima.

U rijetkom slučajevima zabilježeni su sljedeće nuspojave: kožne reakcije, glavobolja i blage gastrointestinalne smetnje. U meta analizi (10) rađenoj na 25 kontroliranih studija koja je uključivala 739 pacijenata 4,4% pacijenata je iskusilo neželjene učinke. Gastrointestinalne smetnje je prijavilo 2,6% pacijenata, 0,9% glavobolju, 0,4% poremećaje sna/vrtoglavicu i 0,3% kožne probleme. Zabilježeni su pojedinačni slučajevi pojačanog krvarenja kod uzimanja ginka. Iako povezanost nije dokazana, ti pojedinačni slučajevi ukazuju na potreban oprez u pacijenata koji uzimaju antikoagulanse.

Nadalje, zabilježen je slučaj povraćanja i konvulzija u 36-godišnje žene koja je uzimala plodove ginka. Prema nekim tvrdnjama, uzrok bi mogao biti povezan sa sadržajem toksina 4´-O-metilpiridoksina u plodovima koji indirektno utječe na enzim glutamat dekarboksilazu, što rezultira povećanjem gama amino maslačne kiseline u mozgu. Temeljem navedenog, preporučuje se oprez u pacijenata s epilepsijom.

U dodacima prehrani koji ne sadrže standardizirani ekstrakt postoji mogućnost prisutnosti toksičnih sastavnica (bilobol, kardanol, kardol i ginkogol) za koje je poznato da uzrokuju gastrointestinalne tegobe i alergijske reakcije. Stoga je njihov udio u komercijalnim pripravcima ograničen na manje od 5 ppm da bi se minimalizirao rizik nastanka neželjenih učinaka (9).

Ekstrakt lista ginka može utjecati na sposobnost agregacije trombocita, što bi moglo uzrokovati pojačano krvarenje kod poroda, pa se ginko ne bi trebao koristiti u vrijeme trudnoće. Rizik za dojenčad se ne može isključiti budući da nije poznato izlučuju li se metaboliti ginka u majčino mlijeko. Odluka o prestanku dojenja za vrijeme terapije ginkom ili o prestanku uzimanja ginka treba biti donesena na temelju odnosa rizika i koristi u pojedinačnom slučaju.

U prilog sigurnosti uzimanja ginka ide duga povijest njegove primjene te veliki broj provedenih nekliničkih i kliničkih istraživanja, no potrebne su daljnje kontrolirane studije sa standardiziranim pripravcima kako bi se dobili nedvojbeni zaključci (1, 2, 7).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je dati sveobuhvatan pregled stručnih i znanstvenih spoznaja o kontroli kakvoće i regulatornim zahtjevima za fitopreparate koji sadrže ginko, a koji imaju status lijeka ili dodatka prehrani u Republici Hrvatskoj.

U okviru ovog rada, detaljno će se prikazat razlike u regulatornim zahtjevima za biljne lijekove i dodatke prehrani koje se bitno razlikuju između ove dvije skupine. Svrha predloženog istraživanja je ukazati na važnost adekvatne kontrole kakvoće kao garancije sigurne i učinkovite primjene tih biljnih pripravaka.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje u okviru ovog rada je teorijskog karaktera i uključuju pregled dostupne literature o predloženoj temi. U pretraživanju su korištene dostupne elektronske bibliografske baze podataka kao što su: *Current Contents*, *ScienceDirect*, *Scopus*, *PubMed*, *Medline* i dr. Prikupljeni podaci su proučeni i sistematično prikazani, a obuhvaćaju ginkov fitokemijski profil, farmakološke učinke, rezultate predkliničkih i kliničkih studija te sigurnosni aspekt, kao i regulatorni status te kontrolu kakvoće fitopreparata s ginkom. Zahtjevi i zakonski okviri za stavljanje na tržište komercijalnih proizvoda koji sadrže ginko bit će pretraživani elektronskim putem: Agencija za lijekove i medicniske proizvode, Ministarstvo zdravstva, Europska Agencija za lijekove i medicinske proizvode i Europska agencije za sigurnost hrane. Također će biti razmatrana odgovarajuća poglavlja i monografije Europske farmakopeje kao i važeća monografija Europske Agencije za lijekove za biljne lijekove te smjernice obvezujuće za lijekove.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ginko u komercijalnim fitopreparatima

Preparati koji sadrže ginkov ekstrakt su među najprodavanijim i najpopularnijim biljnim lijekovima i dodacima prehrani posljednjih 20-tak godina. Na tržištu Republike Hrvatske (RH) dostupni su fitopreparati za oralnu primjenu koji se prema važećem zakonodavstvu klasificiraju kao biljni lijekovi ili dodaci prehrani.

Nadležno tijelo za lijekove u RH i Europskoj uniji (EU) su Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) i Europska agencija za lijekove (EMA), a za dodatke prehrani Ministarstvo zdravstva RH te Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA). Dodaci prehrani, za razliku od biljnih lijekova, ne služe liječenju već samo pomažu u održavanju zdravlja. Stoga ove dvije skupine ne podliježu istom postupku odobravanja za stavljanje u promet.

Na mrežnoj stranici HALMED-a objavljena je baza svih lijekova registriranih u RH (11), dok registar dodataka prehrani nije javno objavljen na mrežnoj stranici Ministarstva zdravstva.

Lijekovi su regulirani Zakonom o lijekovima (12), dok su dodaci prehrani regulirani zakonodavstvom o hrani te se kontrola njihove kvalitete prvenstveno odnosi na analizu zdravstvene (sanitarne) ispravnosti. Nije uključeno dokazivanje djelotvornosti, kao što je to slučaj za lijekove. Nadalje, praćenje nuspojava za dodatke prehrani nakon njihova stavljanja na tržište nije obvezno, dok je za lijekove razvijen sustav obveznog prijavljivanja i praćenja nuspojava da bi sigurnost njihove primjene bila pod stalnim stručnim nadzorom.

4.1.2. Stavljanje u promet lijeka koji sadrži ginko

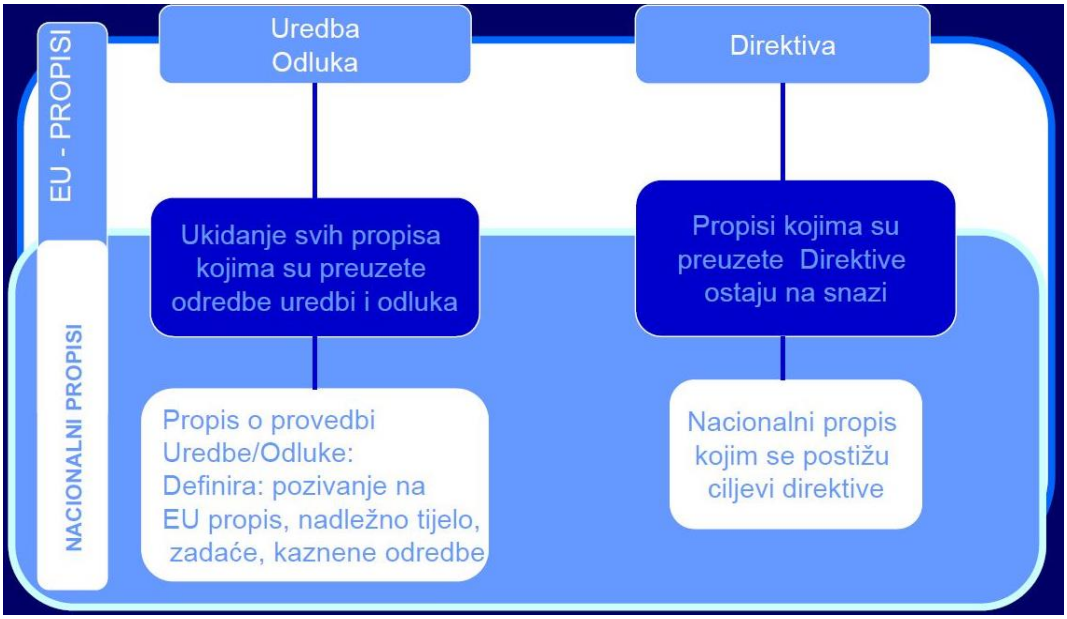
U RH Zakonom o lijekovima utvrđuje se postupak ispitivanja i stavljanja u promet, proizvodnju, označavanje, klasifikaciju, promet, farmakovigilanciju, provjeru kakvoće, oglašavanje, opskrbu hrvatskog tržišta lijekovima te nadzor nad lijekovima i ispitivanim lijekovima, djelatnim i pomoćnim tvarima (12, 13).

HALMED je pravna osoba s javnim ovlastima osnovana Zakonom o lijekovima i medicinskim proizvodima, a čiji se djelokrug u području lijekova i medicinskih proizvoda utvrđuje Zakonom o lijekovima. Na tržištu RH nalaze se lijekovi koji su odobreni nacionalnim postupkom (NP), postupkom međusobnog priznavanja (MRP), decentraliziranim postupkom (DCP) u kojem HALMED izdaje odobrenje za stavljanje lijeka u promet te centraliziranim postupkom (CP) kada odobrenje izdaje Europska Komisija. EMA je decentralizirano tijelo EU sa sjedištem u Londonu. Njezina je glavna zadaća štititi i promicati javno zdravlje i zdravlje životinja na

temelju ocjena i nadzora lijekova u humanoj i veterinarskoj medicini. Temeljem znanstvenih spoznaja, EMA ocjenjuje zahtjeve za odobrenje za stavljanje medicinskih proizvoda na europsko tržište (centralizirani postupak). U okviru tog centraliziranog postupka poduzeća podnose samo jedan zahtjev za odobrenje za stavljanje na tržište.

Pravilnikom o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet (13) utvrđuje se način, uvjeti i potrebna dokumentacija za davanje, obnovu, ukidanje i prijenos odobrenja te odobrenje izmjene u dokumentaciji o lijeku za stavljanje lijeka u promet u RH, sadržaj sažetka opisa svojstava lijeka, upute o lijeku i označavanju lijeka, registraciju, oblik i sadržaj dokumentacije, dokazi o tradicionalnoj uporabi i pravila označavanja za tradicionalne biljne lijekove te registracija i sadržaj dokumentacije za registraciju homeopatskog lijeka.

Zakonom o lijekovima se u pravni poredak RH prenosi 15 odgovarajućih direktiva te se uređuje provedba 10 odgovarajućih uredbi o lijekovima na području EU (slika 4).



Slika 4. Uredba je obvezujući zakonodavni akt koji se mora u cijelosti primjenjivati u Europskoj uniji. Direktiva je zakonodavni akt kojim se utvrđuje cilj koji sve države članice EU moraju ostvariti, međutim, svaka država samostalno odlučuje o načinu. Odluka je obvezujuća za one kojima je upućena (14).

Prema Članku 3. Zakona o lijekovima (12) pojedini pojmovi imaju sljedeće značenje:

Lijek je:

- svaka tvar ili kombinacija tvari prikazana sa svojstvima liječenja ili sprječavanja bolesti u ljudi ili
- svaka tvar ili kombinacija tvari koja se može upotrijebiti ili primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili za postavljanje medicinske dijagnoze.

Tvar može biti:

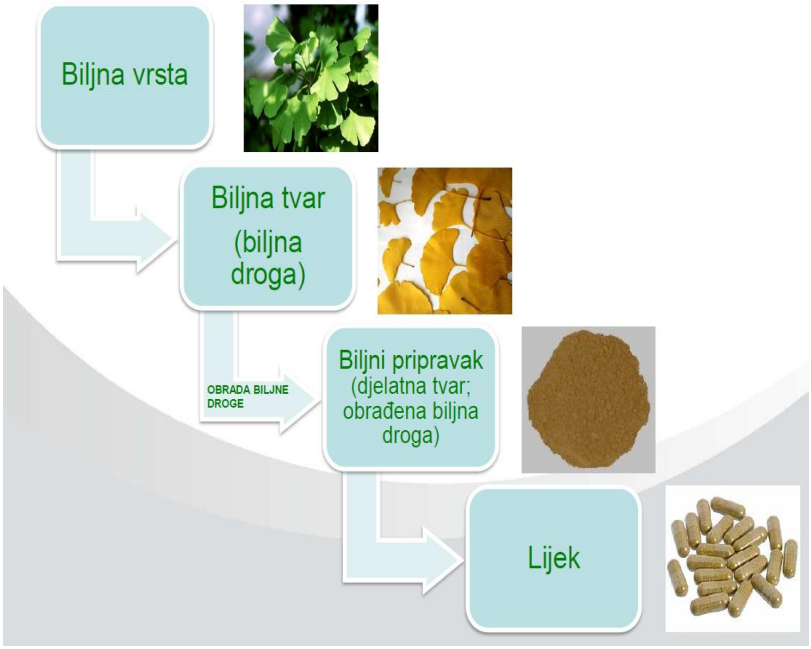
- ljudskoga podrijetla, npr. ljudska krv i proizvodi iz ljudske krvi;
- životinjskog podrijetla, npr. mikroorganizmi, životinje, dijelovi organa, izlučine životinja, toksini, ekstrakti, proizvodi iz krvi;
- biljnog podrijetla, npr. mikroorganizmi, biljke, dijelovi biljaka, izlučine biljaka, biljni ekstrakti;
- kemijskog podrijetla, npr. kemijski elementi, kemijske tvari prirodnog podrijetla i kemijski proizvodi dobiveni sintezom.

Biljni lijek je lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više biljnih tvari ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka.

Tradicionalni biljni lijek je biljni lijek čiju je sigurnost primjene i djelotvornost moguće prepoznati na temelju njegove tradicionalne uporabe i koji ispunjava uvjete određene ovim Zakonom.

Biljne tvari jesu cijele ili narezane biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi, gljive, u osušenom ili svježem obliku te neobrađene izlučine biljaka; biljne tvari označavaju se korištenim dijelom biljke i botaničkim nazivom biljke u skladu s binomnim sustavom (rod, vrsta, podvrsta i autor).

Biljni pripravci jesu pripravci dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (usitnjavanje, ekstrakcija, fermentacija, destilacija, pročišćavanje, koncentriranje, tiještenje) te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka (slika 5).



Slika 5. Biljna vrsta, biljna tvar, biljni pripravak i lijek

4.1.3. Zakonska osnova za registraciju lijeka koji sadrži ginko

U tablici 1 navedeni su biljni lijekovi s ginkom registrirani u RH prema propisanoj zakonskoj osnovi koja uključuje Zakon o lijekovima i Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet (12, 13).

Tablica 1. Popis biljnih lijekova registriranih u Republici Hrvatskoj koji sadrže ekstrakt ginka

Naziv lijeka	Djelatna tvar	Broj rješenja
Bilobil 40 mg kapsule	Ginkgonis extractum siccum normatum	UP/I-530-09/09-02/303
Bilobil forte 80 mg kapsule	Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum	UP/I-530-09/11-02/161
Bilobil Intense 120 mg kapsule, tvrde	Ginkgo bilobae folii extractum siccum	UP/I-530-09/13-02/322
Ginkgo 40 mg filmom obložene tablete	Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum	UP/I-530-09/09-02/376
Tebokan 40 mg filmom obložene tablete	Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum	UP/I-530-09/12-01/395
Tebokan forte 120 mg filmom obložene tablete	Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum	UP/I-530-09/12-01/396

Ukoliko tvrtka koja želi registrirati biljni lijek ne raspolaže vlastitim nekliničkim i/ili kliničkim ispitivanjima kako se navodi u članku 26. stavku 1. Zakona (odgovara članku 8(3) Direktive 2001/20/EZ) (15), postoji druga zakonska osnova za registraciju lijeka s ginkom. Opravdanost medicinske uporabe može biti dokazana prema članku 34. Zakona i članku 21. Pravilnika (odgovara članku 10(a) Direktive 2001/20/EZ) ili se proizvod može registrirati kao tradicionalni biljni lijek (slika 6) prema članku 63. Zakona (odgovara članku 16d (1) Direktive 2001/20/EZ). Moguće je također kombinirati vlastite podatke o sigurnosti i učinkovitosti s podacima iz literature prema članku 26. Zakona o lijekovima i članku 17. Pravilnika o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet (12, 13).

Zahtjev za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet može podnijeti fizička ili pravna osoba sa sjedištem u EU uključujući i Europski gospodarski prostor. Fizička osoba je osoba koja samostalno trajno obavlja djelatnost sukladno posebnom propisu, odnosno osoba sa sjedištem u EU koja u skladu s propisima države članice samostalno obavlja djelatnost. U nastavku su navedeni dijelovi Zakona o lijekovima koji su važni u kontekstu registracije biljnih lijekova (12).

Članak 34.

(1) Podnositelj zahtjeva za davanje odobrenja iz članka 26. stavka 1. ovoga Zakona, ne dovodeći u pitanje propise o pravu industrijskog i intelektualnog vlasništva, nije obvezan priložiti rezultate nekliničkih ili kliničkih ispitivanja sukladno članku 26. stavku 3. točki k) ovoga Zakona, ako može dokazati da djelatna/e tvar/i lijeka imaju provjerenu medicinsku uporabu u EU najmanje deset godina, poznatu djelotvornost i prihvatljivu sigurnost primjene u skladu s uvjetima navedenim u Pravilniku iz članka 26. stavka 7. ovoga Zakona.

(2) U slučaju iz stavka 1. ovoga članka podnositelj zahtjeva obvezan je umjesto rezultata kliničkih i nekliničkih ispitivanja iz članka 26. stavka 3. točke k) ovoga Zakona dostaviti odgovarajuće iscrpne znanstvene podatke iz literature.

Članak 63.

(1) Postupak davanja odobrenja za stavljanje tradicionalnog biljnog lijeka u promet jest pojednostavnjeni postupak, odnosno postupak registracije tradicionalnog biljnog lijeka.

(2) Postupak registracije tradicionalnoga biljnog lijeka provodi se za lijekove koji ispunjavaju sljedeće uvjete:

– imaju indikacije isključivo primjerene za tradicionalne biljne lijekove koji se zbog svog sastava i namjene primjenjuju bez nadzora liječnika;

– namijenjeni su isključivo za primjenu u skladu s određenom jačinom i doziranjem lijeka;

– namijenjeni su za vanjsku ili peroralnu primjenu ili za inhaliranje;

– razdoblje tradicionalne uporabe lijeka ili njemu podudarnog lijeka je najmanje 30 godina do dana podnošenja zahtjeva, od toga najmanje 15 godina u EU;

– postoji dovoljno podataka o tradicionalnoj uporabi lijeka, osobito dokaza o sigurnosti primjene lijeka u naznačenim uvjetima primjene te dokaza da su farmakološki učinci ili djelotvornost lijeka vjerojatni na temelju dugotrajne uporabe i iskustva.

(3) Podudaran lijek iz stavka 2. podstavka 4. ovoga članka jest lijek koji sadrži iste djelatne tvari bez obzira na sastav pomoćnih tvari, ima jednaku ili sličnu namjenu, jednake je jačine i doziranja te ima jednak ili sličan put primjene kao i tradicionalni biljni lijek za koji se podnosi zahtjev za registraciju.

(4) Tradicionalni biljni lijekovi mogu sadržavati i vitamine i minerale, dobro poznate sigurnosti primjene, čije djelovanje potpomaže djelovanju sadržanih biljnih djelatnih tvari s obzirom na naznačenu indikaciju.

(5) Ako u postupku registracije tradicionalnog biljnog lijeka Agencija utvrdi da lijek ispunjava uvjete za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet ili za registraciju homeopatskog lijeka, odredbe ovoga Zakona koje se odnose na tradicionalne biljne lijekove neće se primjenjivati.

(6) Registraciju, oblik i sadržaj dokumentacije koja se prilaže u svrhu dobivanja rješenja o registraciji, potrebni dokazi o tradicionalnoj uporabi te pravila označivanja i oglašavanja za tradicionalne biljne lijekove pravilnikom će propisati ministar.

(7) Troškove u postupku davanja, uskraćivanja, obnove, izmjene, prijenosa i ukidanja rješenja o registraciji tradicionalnog biljnog lijeka odredit će uz suglasnost ministra Agencija, a snosi ih podnositelj zahtjeva.

Članak 64.

(1) Registracija tradicionalnog biljnog lijeka uskratit će se ako podaci i dokumenti priloženi uz zahtjev nisu u skladu s propisanim te ako se utvrdi postojanje jednog od sljedećih razloga:

– kvalitativni i/ili kvantitativni sastav nije jednak deklariranom, ili

– indikacije nisu u skladu s člankom 63. stavkom 2. podstavkom 1. ovoga Zakona, ili

– tradicionalni biljni lijek može biti štetan u uobičajenim uvjetima primjene, ili

– podaci o tradicionalnoj uporabi nisu dostatni, osobito ako farmakološki učinci ili djelotvornost nisu vjerojatni na temelju dugotrajne uporabe i iskustva, ili

– farmaceutska kakvoća nije zadovoljavajuće prikazana.

(2) Agencija je obvezna o uskrati registraciju tradicionalnog biljnog lijeka te o razlozima takve odluke obavijestiti Europsku komisiju i drugo nadležno tijelo koje to zatraži.

Članak 65.

Odredbe ovoga Zakona koje se odnose na stavljanje lijeka u promet, proizvodnju, klasifikaciju, oglašavanje, promet, uvoz, provjeru kakvoće, farmakovigilanciju, obustavu stavljanja i povlačenje iz prometa te nadzor nad lijekovima na odgovarajući se način primjenjuju i na tradicionalne biljne lijekove, osim ako ovim Zakonom ili propisom donesenim na temelju ovog Zakona nije drugačije propisano.

Dokumentacija o lijeku treba biti u skladu sa zakonskom osnovom za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet (npr. generički lijek, tradicionalni biljni lijek, lijek s provjerenom medicinskom uporabom). Bez obzira na zakonsku osnovu, kvaliteta lijeka koji sadrži biljnu djelatnu tvar, mora uvijek biti dokazna.

Odbor za biljne lijekove (HMPC) pri EMA-i donosi biljne monografije s ciljem harmonizacije biljnih lijekova i tradicionalnih biljnih lijekova na području EU. Biljna monografija predstavlja znanstveno mišljenje HMPC-a o sigurnosti i djelotvornosti podataka biljne djelatne tvari i njezine pripreme namijenjene za medicinsku primjenu. HMPC ocjenjuje sve dostupne znanstvene informacije, uključujući nekliničke i kliničke podatke, ali i iskustvo dokumentirane dugogodišnje uporabe u Europskoj uniji. Monografija donosi i sve potrebne informacije vezane za korištenje biljne djelatne tvari ili njezinu pripremu, uključujući indikacije i kontraindikacije, kome je biljni lijek namijenjen te sigurnosni profil lijeka (npr. podaci o neželjenim učincima i interakcijama s drugim lijekovima). Monografije su objavljene zajedno s drugim dokumentima kao što je izvješće o procjeni koje sadrži pregled svih dostupnih podataka važnih za medicinsku primjenu biljne djelatne tvari ili pripravka.

Svaki fitopreparat se procjenjuje individualno s obzirom da dostupna informacija može varirati od jedne pripreme do druge. Kao rezultat, neki se preparati nalaze u koloni provjerena medicinska uporaba a neki u koloni tradicionalni biljni lijekovi. Neki preparati nisu uključeni ukoliko dostupni podaci nisu dovoljni.

Iako države članice nisu obvezne koristiti monografije (Sažetak opisa svojstava lijeka, upute o lijeku i označavanje), bilo koja odluka o nepridržavanju sadržaja monografije mora biti detaljno obrazložena u postupku registracije lijeka tj. potrebno je dostaviti:

- literaturne podatke koji podupiru razlike u odnosu na HMPC monografiju
- vlastitia ispitivanja koja podupiru razlike u odnosu na HMPC monografiju.

Nacionalno regulatorno tijelo nakon ocjene dokumentacije, može zatražiti dodatne podatke potrebne za ocjenu sigurnosti primjene lijeka (16).

4.1.4. Monografija *Ginko biloba* L., folium

Odbor za biljne lijekove (HMPC) pri Europskoj agenciji za lijekove (EMA) usvojio je 28. siječnja 2015. godine monografiju droge Ginkgo folium (EMA/HMPC/321097/2012) koja započinje nazivom droge na 25 jezika zemalja Europske unije.

1. **Naziv lijeka** je specificiran za svaki pojedini lijek.
2. **Kvalitativni i kvantitativni sastav**[1,2] podrazumijeva Izjavu o aktivnoj tvari(ma) za pojedini lijek koje moraju biti u skladu s relevantnim smjernicama kakvoće te da materijal odgovara monografiji Europske farmakopeje (01/2011:1828).

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
U vezi zahtjeva za registraciju prema članku 10(a) Direktive 2001/83/EC kako je izmijenjen	U vezi zahtjeva za registraciju prema članku 16d (1) Direktive 2001/83/EC kako je izmijenjen
Ginko biloba L., folium (ginkov list)	*Ginko biloba* L., folium (ginkov list)
i) Biljna tvar	i) Biljna tvar
Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
ii) Biljni pripravak	ii) Biljni pripravak
Suhi ekstrakt (DER 35-67:1), ekstrakcijsko otapalo: aceton 60% (m/m)[3]	biljna tvar u prahu

3. **Farmaceutski oblik**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Biljni pripravci u krutom ili tekućem obliku za oralnu primjenu.	Biljni pripravci u krutom obliku za oralnu primjenu.
Ovaj farmaceutski oblik bi trebao biti opisan u Europskoj farmakopeji u punom standardnom pojmu.	Ovaj farmaceutski oblik bi trebao biti opisan u Europskoj farmakopeji u punom standardnom pojmu.

[1] Izjava o aktivnoj tvari(ma) za pojedini lijek mora biti u skladu s relevantnim smjernicama kakvoće
[2] Materijal odgovara Ph. Eur. Monografiji 01/2011:1828
[3] Biljni pripravak treba biti u skladu s monografijom Europske farmakopeje “Ginkgo dry extract, refined and quantified” 04/2008: 1827

4. **Klinički podaci**

4.1. **Terapijske indikacije**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Biljni lijek za poboljšanje (povezano s dobi) kognitivnih poremećaja i kvalitete života kod blage demencije.	Tradicionalni biljni lijek za ublažavanje osjeta težine u nogama te hladnih ruku i nogu povezane s manjim cirkulacijskim poremećajima, nakon što je liječnik isključio ozbiljna stanja. Tradicionalni biljni lijek za primjenu kod naznačenih indikacija temeljenih na iskustvu dugotrajne uporabe.

4.2 Doziranje i način primjene

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Doziranje *Odrasli, stariji* Pojedina doza: 120-240 mg Dnevna doza: 240 mg Ne postoje relevantne indikacije za djecu i adolescente. **Trajanje primjene** Liječenje bi trebalo trajati najmanje 8 tjedana. Ako se stanje ne popravi ili se čak pogorša nakon terapijskog razdoblja od 3 mjeseca, liječnik mora odlučiti je li nastavak terapije opravdan. **Način primjene** Za primjenu kroz usta.	**Doziranje** *Odrasli, stariji* Pojedina doza: 250-360 mg. Dnevna doza: 750 mg Upotreba u djece i adolescenata mlađih od 18 godina nije preporučana (vidjeti dio 4.4. „Posebna upozorenja i mjere opreza pri uporabi“). **Trajanje primjene** Ako simptomi potraju duže od 2 tjedna, potrebno je posavjetovati se s liječnikom ili kvalificiranim zdravstvenim stručnjakom. **Način primjene** Za primjenu kroz usta.

4.3**. Kontraindikacije**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Preosjetljivost na djelatnu tvar. Trudnoća (vidjeti dio 4.6. Plodnost, trudnoća i laktacija).	Preosjetljivost na djelatnu tvar.

4.4. **Posebna upozorenja i mjere opreza pri uporabi**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Ukoliko se simptomi bolesti pogoršaju tijekom primjene ovog lijeka, potrebno je posavjetovati se s liječnikom ili ljekarnikom. U bolesnika koji imaju patološki povećanu sklonost krvarenju (hemoragijska dijateza) i istodobno uzimaju antikoagulanse i antitrombotike, ovaj lijek se smije primijeniti tek nakon savjetovanja s liječnikom. Pripravci koji sadrže ginko može povećati sklonost krvarenja, lijek treba prekinuti uzimati kao mjeru opreza tri do četiri dan prije operacije. U bolesnika koji boluju od epilepsije, ne možu se isključiti pojava daljnjih napadaja potaknutih uzimanjem proizvoda koji sadrže ginko. Istodobna primjena proizvoda koji sadrže ginko i efavirenz nije preporučana (vidjeti dio 4.5).	Primjena u djece i adolescenata mlađih od 18 godina nije ustanovljena zbog nedostatka adekvatnih podataka. Ukoliko se simptomi bolesti pogoršaju tijekom primjene ovog lijeka, potrebno je posavjetovati se s liječnikom ili ljekarnikom.

4.5 **Interakcije s drugim lijekovima i drugi oblici interakcija**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Ako je lijek primijenjen istodobno s antikoagulansima (npr. fenoprokumon i varfarin) ili antitromboticima (npr. klopidrogel, acetilsaliclna kislina i drugi nesteroidni protuupalni lijekovi), moguć je utjecaj na njihov učinak. Dostupne studije s varfarinom nisu ukazale na interakciju između varfarina i proizvoda koji sadrže ginko, no adekvatno praćenje se preporučuje kad se počinje s terapijom, mijenja doza, prestaje s primjenom ili ako se mijenja proizvod koji sadrži ginko. Interakcija s talinolom ukazuje da bi ginko mogao inhibirati intestinalni P-glikoprotein. To može dovesti do povećane izloženosti lijekovima koji imaju učinak na intestinalni P-glikoprotein, kao što je dabigatran eteksilat. Preporučuje se oprez ako se ginko uzima istodobno s dabigatranom.	Ginkov list može pojačati učinak antikoagulanska kao što su kumarinski derivati.

Jedna studija o interakcijama je ukazala da C_{max} nifedipina može biti povećana uzimanjem ginka. U nekih pojedinaca s povećanjem do 100% je uočena vrtoglavica i pojačano crvenilo, uz osjećaj vrućine. Istodobna upotreba preparata koji sadrže ginko i efavirenz nije preporučena, razina koncentracije efavirenza u plazmi može biti smanjena zbog indukcije CYP34A (vidjeti 4.4.)	

4.6. **Plodnost, trudnoća i dojenje**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Trudnoća Ginkovi ekstrakti mogu umanjiti agregacijsku sposobnost trombocita. Može se pojačati sklonost krvarenju. Ispitivanja na životinjama nisu dostatna za definiranje reproduktivne toksičnosti (vidjeti dio 5.3.). Primjena u trudnoći je kontraindicirana (vidjeti dio 4.3). **Dojenje** Nije poznato izlučuju li se metaboliti bioaktivnih sastavnica ginka u majčino mlijeko. Rizik za novorođenčad/dojenčad ne može se isključiti. Zbog ograničenih podataka primjena za vrijeme dojenja nije preporučena. **Plodnost** Specifične studije za procjenu učinaka ginka na plodnost nisu provedene. U ispitivanjima na ženskim miševima opaženi su učinci na plodnost (vidjeti dio 5.3.)	Sigurnost primjene za vrijeme trudnoće i dojenja nije utvrđena. U nedostatkui dostatnih relevantnih podataka, primjena za vrijeme trudnoće i dojenja nije preporučena.

4.7 **Utjecaj na sposobnost upravljanja vozilima i rada na strojevima**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Nisu provedena dostatna ispitivanja o utjecaju lijeka na sposobnost upravljanja vozilima i rada na strojevima.	Nisu provedena dostatna ispitivanja o utjecaju lijeka na sposobnost upravljanja vozilima i rada na strojevima.

4.8. **Nuspojave**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Poremećaji krvi i limfnog sustava Prijavljivana su krvarenja pojedinih organa (uho, nos, mozaki gastrointestinalni sustav). Učestalost nije poznata. *Poremećaji živčanog sustava* Vrlo često: glavobolja Često: omaglica. *Poremećaji probavnog sustava* Često: proljev, abdominalna bol, mučnina, povraćanje *Poremećaji imunološkoj sustava* Mogu se javiti reakcije preosjetljivosti (alergijski šok). Učestalost nije poznata. *Poremećaji kože i potkožnog tkiva* Mogu se javiti kožne alergijske reakcije (eritem, edem, svrbež i osip). Učestalost nije poznata. U slučaju pojave neželjenog učinka koji nije prethodno naveden potrebno je obratiti se liječniku ili ljekarniku.	Prijavljivani su poremećaji probavnog sustava, glavobolja i alergijske reakcije. Učestalost nije poznata. U slučaju pojave neželjenog učinka koji nije prethodno naveden potrebno je obratiti se liječniku ili ljekarniku.

4.9. **Predoziranje**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Nije zabilježen slučaj predoziranja.	Nije zabilježen slučaj predoziranja.

5. **Farmakološka svojstva**

5.1. **Farmakodinamička svojstva**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Farmakoterapijska skupina: ostali lijekovi protiv demencije ATK oznaka: N06DX02 Točan mehanizam nije poznat. Farmakološki učinci u ispitivanjima na ljudima pokazuju povećanu EEG budnost u gerijatrijskih ispitanika, smanjenje viskoznosti krvi i poboljšanu cerebralne perfuziju u određenim područjima u zdravih muškaraca	Nije potrebno prema Članku 16c(1)(a)(iii) Direktve 2001/83/EK s izmjenama i dopunama.

(60-70 godina) i smanjenje agregacije trombocita. Dodatno, prikazani su vazodilatacijski učinci na krvnim žilama podlaktice uzrokujući lokalno povećani protok krvi.	

5.2 **Farmakokinetička svojstva**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Nakon oralne promjene120 mg ekstrakta ginka (u obliku otopine), opažena je sveukupna srednja vrijednost bioraspoloživosti u ljudi za terpenske laktone ginkolid A (80%), ginkolid B (88%) i bilobalid (79%). Maksimalne koncentracije terpenskih laktona u plazmi bile su 16-22 ng/ml za ginkolid A, 8-10 ng/ml za ginkolid B i 27-54 ng/ml kada je primijenjeno u obliku tableta. Odgovarajuće poluvrijeme eliminacije ginkolida A i B i bilobalida je bio 3-4, 4-6 i 2-3 sati. Kad je 120 mg ginkovog ekstrakta primjenjivano u obliku otopine, maksimalne koncentracije u plazmi su bile 25-33 ng/ml, 9-17 ng/ml i 19-35 ng/ml za ginkolid A i B i bilobalid. Poluvrijeme eliminacije ginkolida A je bilo 5 sati, ginkolida B 9-11 sati te bilobalida 3-4 sata.	Nije potrebno prema Članku 16c(1)(a)(iii) Direktve 2001/83/EK s izmjenama i dopunama.

5.3 **Neklinički podaci o sigurnosti primjene**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Kronična toksičnost Kronična toksičnost ispitivana je tijekom 6 mjeseci u štakora i pasa peroralnom primjenom dnevnih doza od 20 i 100 mg/kg t.m (odgovara faktoru sigurnosti do 3,3. u štakora i 11.6 u pasa) te povećanjem doza na 300, 400 i 500 mg/kg t.m u štakora odnosno na 300 i 400 mg/kg t.m. u pasa (odgovara faktoru sigurnosti do 16,8 u štakora i 46,3 u pasa). Rezultati su pokazali nisku toksičnost samo u pasa kod najviše doze. *Reproduktivna toksičnost* Dostupni su samo ograničeni podaci o reproduktivnoj toksičnosti suhog ginkovog ekstrakta. Objavljeni podaci su kontradiktorni. Dok jedna starija studija na štakorima i zečevima i nova studija na miševima nisu pokazale teratogeno, embriotoksično i štetno djelovanje na reproduktivnost, jedna druga	Nije potrebno prema Članku 16c(1)(a)(iii) Direktve 2001/83/EK s izmjenama i dopunama. Odgovarajuća ispitivanja reproduktivne toksičnosti, genotoksičnosti i kancerogenosti nisu provedena.

studija je pokazala učinak u miševa na reproduktivne parametre kao što su plodnost, reproduktivna svojstva te je došlo do vaginalnog krvarenja. Dodatno, ispitivanja s nespecificiranim ili nešto različitim ginkovim ekstraktima pokazala su učinke na razvoj fetusa (s ili bez toksičnosti kod majke) ili je došlo do supkutanog krvarenja, hipopigmentacije, inhibicije rasta i anoftalmiju u pilećih embrija. Ne postoje adekvatna ispitivanja reproduktivne toksičnosti. *Mutagenost, kancerogenost* Nema rezultata ispitivanja genotoksičnosti i kancerogenosti za suhi ginkov ekstrakt. Ekstrakt sličan onom opisanom u monografiji je bio ispitivan u nizu studija na genotoksičnost i kancerogenost. Rezultat je bio pozitivan na mutaciju gena u bakterija. Ispitivanje mikronukleusa perifernih eritrocita dao je negativan rezultat u mužjaka i dvosmislen rezultat u ženki. Tumor tiroidne žlijezde ustanovljen u ispitivanju kancerogenosti u štakora i hepatocelularni karcinom u ispitivanju kancerogenosti u miševa se smatraju specifičnim za glodavce, negenotoksični odgovor povezan (pri dugotrajnoj primjeni) s visokim dozama induktora jetrenih enzima. Ovi tipovi tumora ne smatraju se relevantnim za ljude. Ekstrakt nije pokazao mjerljive genotoksične učinke u miševa do 2000 mg/kg.	

6. **Farmaceutske pojedinosti**

Provjerena medicinska uporaba	**Tradicionalni biljni lijekovi**
Nije primjenjivo	Nije primjenjivo.

7. Datum sastavljanja / datum zadnje revizije

28. siječanj 2015. (17)

4.1.4. Stavljanje u promet dodatka prehrani koji sadrži ginko

Dodaci prehrani su pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja, ali nisu namijenjeni liječenju bolesti. Hranjivim tvarima smatraju se vitamini i minerali, a ostale, druge tvari čine aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, biljne vrste, ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom. Na tržište se stavljaju isključivo zapakirani dodaci prehrani i to pojedinačno ili u kombinaciji (18,19).

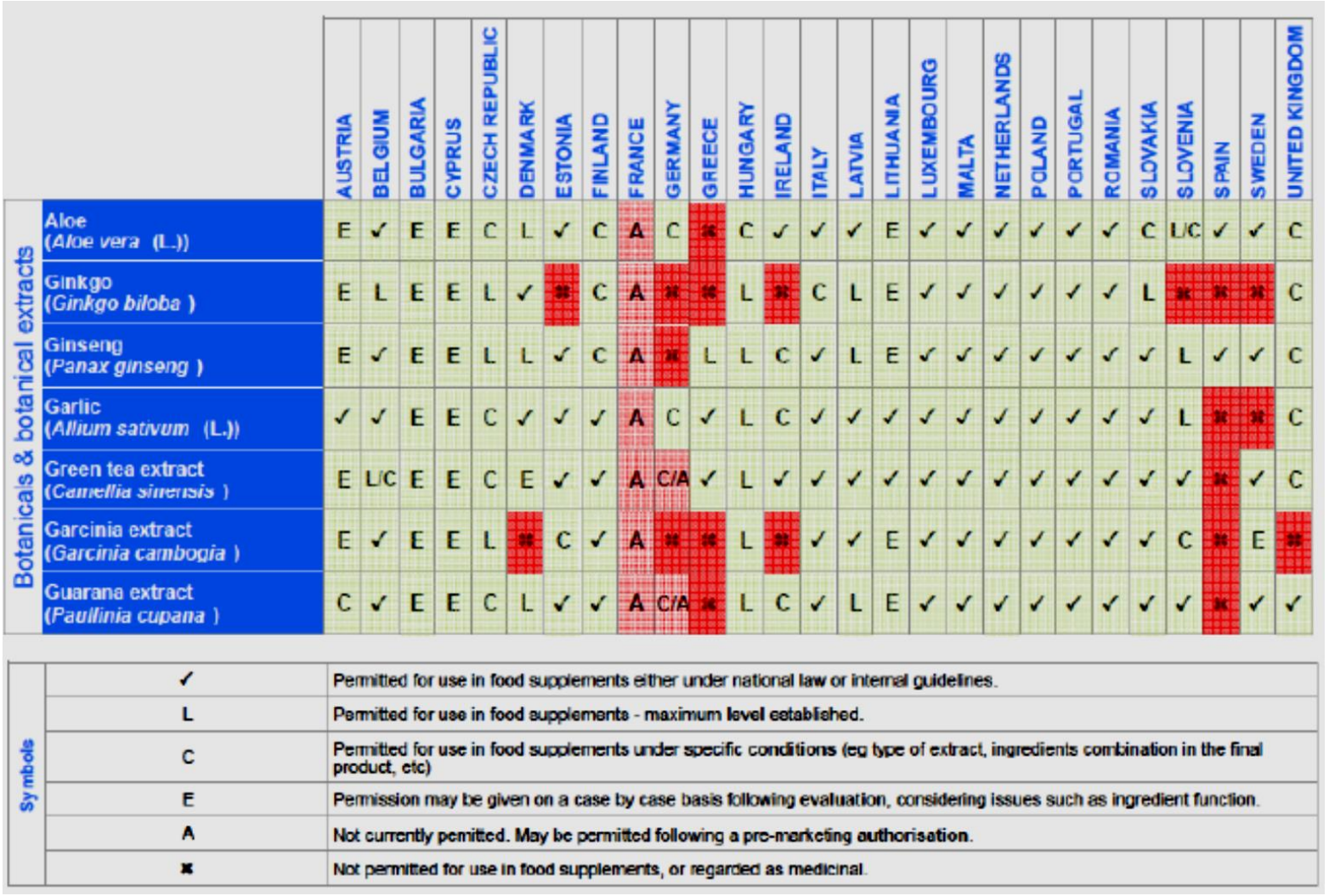
Sastav, označavanje i stavljanje u promet dodataka prehrani u RH regulirano je Zakonom o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima (20), Pravilnikom o dodacima prehrani (21), Pravilnikom o uvjetima za uvrštavanje u program monitoringa i provođenje programa monitoringa dodataka prehrani, hrane kojoj su dodani vitamini, minerali i druge tvari i hrane s prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama (22) i Pravilnikom o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno (23). Pravilnikom o dodacima prehrani preuzete su odredbe Direktive 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća Europe od 10. lipnja 2002. o usklađivanju zakona država članica u odnosu na dodatke prehrani.

U Prilogu II Pravilnika o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno (24) među dozvoljenim biljnim vrstama, nalazi se i standardizirani ekstrakt lista ginka (tablica 2). Slika 6 prikazuje neke od prihvaćenih biljnih vrsta i njihovih ekstrakata, uključujući i ginko, pojedinačno u zemljama EU.

Tablica 2. Podaci o ginku iz Priloga II Pravilnika o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno

Latinsko ime	**Hrvatsko ime**	**Dodatna ograničenja i upozorenja za dodatke prehrani***
Ginko biloba	Ginko	Dopuštena je upotreba samo standardiziranog ekstrakta lista s najviše 5 ppm ginkolnih kiselina. Najveća dnevna doza: 80 mg ekstrakta. Osobe na terapiji lijekovima trebaju se prije uzimanja posavjetovati s liječnikom. Ne preporučuje se kod poremećaja zgrušnjavanja krvi, trudnicama, dojiljama i djeci.

* Upozorenja se navode na dodacima prehrani koji u svom sastavu kao druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom imaju organe, ekstrakte i produkte biljnih vrsta.



Botanicals & botanical extracts	AUSTRIA	BELGIUM	BULGARIA	CYPRUS	CZECH REPUBLIC	DENMARK	ESTONIA	FINLAND	FRANCE	GERMANY	GREECE	HUNGARY	IRELAND	ITALY	LATVIA	LITHUANIA	LUXEMBOURG	MALTA	NETHERLANDS	POLAND	PORTUGAL	ROMANIA	SLOVAKIA	SLOVENIA	SPAIN	SWEDEN	UNITED KINGDOM
Aloe (*Aloe vera* (L.))	E	✓	E	E	C	L	✓	C	A	C	✖	C	✓	✓	✓	E	✓	✓	✓	✓	✓	✓	C	L/C	✓	✓	C
Ginkgo (*Ginkgo biloba*)	E	L	E	E	L	✓	✖	C	A	✖	✖	L	✖	C	L	E	✓	✓	✓	✓	✓	✓	L	✖	✖	✖	C
Ginseng (*Panax ginseng*)	E	✓	E	E	L	L	✓	C	A	✖	L	L	C	✓	L	E	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	L	✓	✓	C
Garlic (*Allium sativum* (L.))	✓	✓	E	E	C	✓	✓	✓	A	C	✓	L	C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	L	✖	✖	C
Green tea extract (*Camellia sinensis*)	E	L/C	E	E	C	E	✓	✓	A	C/A	✓	L	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✖	✓	C
Garcinia extract (*Garcinia cambogia*)	E	✓	E	E	L	✖	C	✓	A	✖	✖	L	✖	✓	✓	E	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	C	✖	E	✖
Guarana extract (*Paullinia cupana*)	C	✓	E	E	C	L	✓	✓	A	C/A	✖	L	C	✓	L	E	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✖	✓	✓

Symbols	
✓	Permitted for use in food supplements either under national law or internal guidelines.
L	Permitted for use in food supplements - maximum level established.
C	Permitted for use in food supplements under specific conditions (eg type of extract, ingredients combination in the final product, etc)
E	Permission may be given on a case by case basis following evaluation, considering issues such as ingredient function.
A	Not currently pemitted. May be permitted following a pre-marketing authorisation.
✖	Not permitted for use in food supplements, or regarded as medicinal.

Slika 6. Ginko u dodacima prehrani u zemljama Europske unije (19)

Oblici dodataka prehrani su:

1. kapsule, pastile, tablete i drugi dozirani oblici;
2. prah, granule, tekućine te ostali oblici koji se uzimaju u odmjerenim količinama i/ili posebnim načinom primjene.

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) osnovana je u okviru sveobuhvatnoga programa za poboljšanje sigurnosti hrane, osiguranje zaštite potrošača te ponovnu uspostavu i održavanje povjerenja u opskrbu hranom na području EU. EFSA nudi neovisne i znanstveno utemeljene savjete o svim temama koje se izravno ili neizravno odnose na sigurnost hrane. Mandatom navedene agencije obuhvaćena je sigurnost hrane i hrane za životinje, prehrana, zdravlje i dobrobit životinja te zaštita i zdravlje bilja. Agencija otvoreno i transparentno izvještava o rizicima. Procjene rizika koje provodi EFSA čvrst su temelj europskih politika i zakonodavstva te podrška Europskoj komisiji, Europskomu parlamentu i državama članicama EU pri donošenju učinkovitih i pravovremenih odluka u području upravljanja rizicima. Prikupljanje i analiza znanstvenih podataka, utvrđivanje mogućih rizika i znanstvena podrška Europskoj komisiji, posebice u slučaju krizne situacije u prehrambenome sektoru, daljnji su zadaci u okviru EFSA-ina mandata, kako je utvrđeno Uredbom o osnivanju (EZ) br. 178/2002 od 28. siječnja 2002 (19).

Stavljanje u promet dodataka prehrani u RH je u nadležnosti Ministarstva zdravstva kojem se podnosi obavijest o stavljanju na tržište dodataka prehrani s biljnim vrstama koje dolaze pojedinačno ili kao mješavine u skladu s listom dopuštenih vrsta iz Priloga II Pravilnika. Registracija i ishođenje notifkacijskog broja u tom slučaju nije potrebna, ukoliko se ne koriste „on hold“ zdravstvene tvrdnje (18).

4.1.5. Zdravstvene tvrdnje o dodacima prehrani koji sadrže ginko

Zdravstvena tvrdnja jest svaka tvrdnja kojom se izjavljuje, sugerira ili navodi na zaključak da kategorija hrane, određena hrana ili sastojak hrane utječe na zdravlje ljudi. Ukoliko se na proizvodu navodi zdravstvena tvrdnja obvezno je navođenje informacija iz članka 10. Stavka 3. Pravilnika o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama (25). S ciljem usklađivanja sa zakonskom regulativom EU u području dodataka prehrani i zdravstvenih tvrdnji, Ministarstvo zdravstva RH je donijelo Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o dodacima prehrani (26) i Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama (27). Pravilnikom o izmjenama i dopunama Pravilnika o dodacima prehrani je ukinuta namjena, pa svaki navod na proizvodu kojom se izjavljuje, sugerira ili navodi na zaključak da kategorija hrane, određena hrana ili sastojak hrane utječe na zdravlje ljudi morat biti sukladan Pravilniku o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama.

U EU je navođenje prehrambenih i zdravstvenih tvrdnji na hrani uključujući i dodatke prehrani regulirano Uredbom 1924/2006 te nizom drugih uredbi kojima se odobrava ili uskraćuje odobrenje za određene zdravstvene tvrdnje koje se odnose na smanjenje rizika od neke bolesti i tvrdnje koje se odnose na rast i zdravlje djece, zatim Uredbom 432/2012 kojom se uspostavlja lista odobrenih zdravstvenih tvrdnji koje se navode na hrani, osim onih koje se odnose na smanjenje rizika od neke bolesti te na razvoj i zdravlje djece. Odredbe Uredbe 1924/2006 već su prenesene u Pravilnik o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama u RH.

Iznimno, tvrdnje za koje još nije dovršena procjena EFSA-e i/ili razmatranje Europske komisije, tzv. „on hold“ tvrdnje koje se uglavnom odnose na biljne vrste, moći će se koristiti, uz prethodno ishođenje notifikacijskog broja od Ministarstva zdravstva, ali samo dok Europska komisija ne donese konačnu odluku (tablica 3). Činjenica da se određena tvrdnja nalazi na „on hold“ listi ne znači da će ta tvrdnja biti automatski odobrena, nego će u svakom pojedinom slučaju odlučivati odgovorno povjerenstvo Ministarstva zdravstva. Povjerenstvo neće razmatrati tvrdnje koje se ne nalaze na listi „on hold“ tvrdnji, kao ni tvrdnje koje nisu odobrene (18, 19).

Tablica 3. Zdravstvene tvrdnje o dodacima prehrani koji sadrže ginko na znanstvenoj evaluaciji pri Europskoj agenciji za sigurnost hrane (19)

PREDMET	**DATUM ZADNJE REVIZIJE**
4707: ***Ginko biloba*, list, ekstrakt**; mate paragvajski čaj, list; magnezijev laktat; soja; lecitin; laktoza aglomerat; mikrokristalinična celuloza; škrob; stearinska kiselina; talk - Poboljšava cerebralnu i perifernu cirkulaciju, smanjuje razinu kolesterola i djeluje kao nutrijent za živčane stanice. Pojačava kognitivnu sposobnost i pamćenje, što pomaže u razdobljima fizičke i mentalne intenzivnog napora. Opći tonik.	17/05/2013
4638: mali zimzelen, zelen; iđirot, podanak; ***Ginko biloba*, list**; paragvajski čaj, list; ružmarin, list – Održava metalno zdravlje zbog alkaloida, polifenola, kolina, ginkolida i hlapljivih ulja, sastavnica prisutnih u ovoj biljnoj kombinaciji.	17/05/2013
4635: velika kopriva, zelen; stolisnik, zelen; žuti kokotac, zelen; ***Ginko biloba*, list**; indijska sena, list; kamilica, cvijet; neven, cvijet – Potpora normalnom tonusu vena zbog tanina, azulena, sluzi i flavonoida, sastavnica prisutnih u ovoj biljnoj kombinaciji.	17/05/2013
4614: šipak, plod; hibiskus, cvijet; ***Ginko biloba*, list**; žuti kokotac, zelen - Pridonosi normalnoj krvnoj cirkulaciji nogu zbog kumarina, antocijanina, flovonoida i ginkolida, sastavnica prisutnih u ovoj kombinaciji.	17/05/2013
4567: ***Ginko biloba* list**; bijeli glog, list i cvijet; žuti kokotac, zelen; ružmarin, list; limun, eterično ulje – Pridonosi zdravlju mozga zbog ginkolida, epikatehina, proantocijana, kumarina i fenola, sastavnica prisutnih u ovoj kombinaciji.	17/05/2013
4529: zeleni čaj, list; veprina, korijen; ***Ginko biloba*, list**; pitomi kesten, list; vinova loza, list; *Citrus auranthium*, pericarpium, gorka naranča, kora – Pridonosi normalnoj venskoj cirkulaciji zbog polifenola, floavonoida, hidroksikumarina i proantocijanida, sastavnica prisutnih u ovoj kombinaciji.	17/05/2013
4527: zeleni čaj, list; ***Ginko biloba*, list**; hibiskus, cvijet; pasji trn, plod; šipak, plod; kakaovac, plod; paprena metvica, zelen; crveni čaj, list – Pomaže zaštiti od oksidacijskog stresa zbog polifenola, katehina, flavonoida i vitamina C, sastavnica prisutnih u ovoj kombinaciji.	05/08/2010
4304: ***Ginko biloba*** (zajedničko ime: ginko) – sistemska mikrocirkulacija krvi	17/05/2013
3918: ***Ginko biloba*** (zajedničko ime: ginko) – neurosenzitorne funkcije	19/03/2010

3917: ***Ginko biloba*** (zajedničko ime: ginko) – zdravlje mozga	19/03/2010
3768: ***Ginko biloba*** (zajedničko ime: ginko) – kognitivne funkcije	17/05/2013
3767: ***Ginko biloba*** (zajedničko ime: ginko) – antioksidativna svojstva	28/10/2009
3676: ginseng (kada se koristi u kombinaciji s vrstom ***Ginko biloba***) – kognitivne funkcije	17/05/2013
3364: ***Ginko biloba*** [suhi ekstrakt GK501 Pharmaton suhi ekstrakt iz listova vrste *Ginko biloba*, omjer droga/nativni ekstrakt (35-45):1, ekstrakcijsko otapalo aceton/voda, 6,0% terpenski laktoni, 24,5% flavonoidi ginka] – za kognitivna svojstva/krvnu cirkulaciju	17/05/2013
2807: drvo ginka (***Ginko biloba***) – kardiovaskularni sustav. Oči. Uši.	17/05/2013
2546: ***Ginko biloba*** - Živčani sustav. Demencija.	17/05/2013
2261: ***Ginko biloba*** [suhi ekstrakt GK501 Pharmaton, suhi ekstrakt iz lista vrste *Ginko biloba*, omjer droga/nativni ekstrakt (35-45) :1, ekstakcijsko otapalo aceton/voda, 6,0% terpenski laktoni, 24,5% flavonoidi ginka] – za kognitivna svojstva/krvnu cirkulaciju	17/05/2013

4.1.6. Farmakovigilancija i nutrivigilanicija

Farmakovigilancija je skup aktivnosti vezanih uz otkrivanje, procjenu, razumijevanje, prevenciju i postupanje u slučaju nuspojava lijekova kao i novih saznanja o škodljivosti primjene lijekova. Nuspojava je svaka štetna i neželjena reakcija na lijek. To uključuje neželjene učinke koji nastaju primjenom lijeka unutar odobrenih uvjeta, nuspojave koje nastaju primjenom lijeka izvan odobrenih uvjeta (uključujući predoziranje, primjenu izvan odobrene indikacije ("off-label"), pogrešnu primjenu, zloporabu i medikacijske pogreške) te nuspojave koje nastaju zbog profesionalne izloženosti. Informacije koje se dobivaju iz navedenih izvora se detaljno probiru i analiziraju. Ti podaci mogu pokazati da se radi o novim nuspojavama koje do sada nisu bile poznate za određeni lijek, da se neke od nuspojava pojavljuju češće nego što se dotadašnjim ispitivanjima pokazalo, da neki ljudi ili skupine bolesnika razvijaju nuspojave češće nego drugi, otkrivaju se nuspojave koje se pojavljuju nakon dugotrajne uporabe lijeka ili nuspojave s odgodom i dr.

Zdravstveni radnik koji dolazi u doticaj s pacijentom/korisnikom lijeka, proizvođač lijeka, nositelj odobrenja, nositelj odobrenja za paralelni uvoz, uvoznik te veleprodaja obvezni su o sumnjama na nuspojave lijeka, osobito o ozbiljnim i neočekivanim, pisano izvijestiti HALMED. Ovakvi podaci mogu dovesti do promjena kao što su: ograničenja u primjeni lijeka, promjene u doziranju lijeka, izmjene sažetka opisa svojstava lijeka i uputa koje se prilažu lijeku u dijelu indikacija, doziranju, kontraindikacija, nuspojava, upozorenja ili mjere opreza i drugih regulatornih akcija (28).

Nutrivigilancija je znanstvena disciplina koja se bavi sigurnošću hrane. Obuhvaća niz mjera, postupaka i aktivnosti s ciljem prepoznavanja i minimiziranja rizika povezanih s konzumacijom hrane te pravodobnog reagiranja. Nutrivigilancija je relativno novo područje i ne predstavlja zakonsku obvezu. Cilj praćenja su dodatne spoznaje o samom proizvodu, tj. o neželjenim učincima hrane, potencijalnom međusobnom djelovanju s drugom hranom ili lijekovima, posebnim upozorenjima, doziranju, stanjima pri kojima se ne preporuča primjena hrane, primjeni u djece, trudnica, dojilja i dr. Eventualne sumnje na nuspojave dodataka prehrani moguće je prijaviti HALMED-u, čiji će stručnjaci zaprimljene prijave sumnji na nuspojave dodataka prehrani evaluirati, obraditi i proslijediti nadležnim institucijama (29).

4.1.7. Izražavanje sastava fitopreparata s ginkom

Porastom potrošnje proizvoda s ginkom javila se i potreba za standardiziranjem ekstrakta ginka, budući da samo kvalitetni, prirodni proizvodi s odgovarajućim udjelima djelatnih tvari mogu ostvariti očekivano biološko djelovanje. Cilj standardiziranja je ujednačen i pouzdan sastav ekstrakta, čime se osigurava i djelotvornost pripravaka koji ga sadrže.

Prvi ginkov standardizirani ekstrakt ginka (EGb 761) registrirala je 1989. godine njemačka tvrtka Dr. Willmar Schwabe, čime je otvoren put proizvodnji brojnih preparata na njegovoj osnovi.

Pročišćeni ginkovi ekstrakati u velikom broju dodataka prehrani se standardiziraju na 24% flavonskih glikozida ginka i 6% terpenskih laktona. U proizvođačkim specifikacijama ginkovih standardiziranih ekstrakata navode se udjeli tih supstancija, a isti podatak se nalazi i na deklaraciji pripravaka koji ga sadrže (slika 7). No, važno je istaknuti da to nije uvjet naveden u važećem zakonodavstvu za dodatke prehrani (30).

Prilikom izražavanja sastava lijekova koji sadrže ekstrakt ginka nužno je slijediti monografije Europske farmakopeje te smjernice EMA-e za lijekove od 11. ožujka 2010. (EMA/HMPC/CHMP/CVMP/287539/2005 Rev.1, „Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products“). Navedene smjernice donose kratku definiciju svakog pojma i daju primjere deklaracije u podacima o lijeku (31).

Ukoliko lijek sadrži ginkov suhi ekstrakt, rafiniran i kvantificiran, potrebno je navesti omjer biljne tvari prema pripravku te ekstrakcijsko otapalo. Omjer biljne droge i ekstrakta (engl. *drug extract ratio*, DER) označava omjer između količine biljne tvari koja se koristi u proizvodnji biljnog pripravka i količine dobivenog biljnog pripravka.

Primjer:

Suhi ekstrakt ginkovog lista, rafiniran.
Količina stvarnog ekstrakta: 100% stvarnog ekstrakta.
DER stvarni: 35-67:1.
Kvantifikacija: 22,0 do 27,0% flavonoida izraženih kao flavonolski glikozidi; 2,8 do 3,4% ginkolida A, B i C; 2,6 do 3,2% bilobalida.
Ostale pomoćne tvari: 0%.
Prvo ekstrakcijsko otapalo: aceton 60% m/m.
Količina stvarnog kvantificiranog ekstrakta u biljnom lijeku: 60 mg/kapsula.

Podaci o lijeku trebaju sadržavati sljedeći navod:

Svaka tvrda kapsula sadrži 60 mg ekstrakta (kao suhi ekstrakt, rafiniran) vrste *Ginko biloba* L., folium (ginkov list) (35-67:1), što odgovara:

a) 2 do 16,2 mg flavonoida izraženih kao flavonolski glikozidi

b) 1,68 do 2,04 mg ginkolida A, B, C

c) 1,56 do 1,92 mg bilobalida.

Prvo ekstrakcijsko otapalo aceton 60% m/m.

Prema važećim monografijama Europske farmakopeje, ginkov list se kvantificira na udio flavonoida. Propisano je da mora sadržavati najmanje 0,5 posto flavonoida, izraženo kao flavonolski glikozidi (Mr 757) (suha droga). Suhi ginkov ekstrakt kvantificira se na ukupni udio flavonoida (22,0-27,0%), bilobalida (2,6-3,2%) te ginkolida A, B i C (2,8-3,4%) (32).

DEPONT MOLECULAR CO.,LTD.

Tel: 0086-25-84215993;
Email no.: info@depontech.com Fax: 0086-25-84217866;

Certificate Of Analysis

DATE:Jan 2009

PRODUCT **Ginkgo biloba P.E.**
BATCH NO. 20090120
QUANTITY 1000 kg
APPEARANCE Light yellow fine powder

	SPECIFICATION	RESULT
Odor/Taste	Characteristic	Conforms
Extract Solvent	Ethanol&Water	Conforms
Excipient	None	Confroms
Particle Size(CP2005)	100% through 80 mesh	Conforms
Bulk Density(CP2005)	0.55g/ml~0.68g/ml	Conforms
Total Flavone glycosides(by HPLC)	24% min	24.8%
Quercetin(by HPLC)		12.38%
Quercetin / Kampferol ratio		1.07
Total Terpene Lactones	6% min	7.07%
Ginkgolides(A)		2.32%
Ginkgolides(B)		1.12%
Ginkgolides(C)		1.09%
Ginkgolides(J)		0.32%
Bilobalides		2.22%
Total Ginkgolic acid(by HPLC)	5ppm max	3.52 ppm
Loss on Dying(CP2005)	3.00 % max	2.80%
Total heavy metals(Atomic Absorption)	10ppm max	Conforms
Lead	1ppm max	Conforms
Arsenic	1ppm max	Conforms
Cadmium	1.5ppm max	Conforms
Mercury	1ppm max	Conforms
Pesticides Residue	Not Detected	Conforms
Microbiological Test		
Total plate count(CP2005)	1000 cfu/g max	Conforms
Yeast& molds	100 cfu/g max	Conforms
E.Coli.	Negative	Conforms
Salmonella	Negative	Conforms
Staphylococcus	Negative	Conforms
Aflatoxins	20PPB max	Conforms

MANUFACTURING DATE Jan 20 2009
EXPIRY DATE Jan 19 2011

CONCLUSION :THE QUALITY OF THIS MATERIAL CONFORMS TO THE SPECIFIC REQUIREMENTS.

Depont Molecular Co.,Ltd.

Slika 7. Primjer ispravne specifikacije ginkovog ekstrakta (35)

4.2. Kakvoća fitopreparata s ginkom

Kakvoća lijekova i sirovina za njihovu proizvodnju (biljne droge, biljni pripravci, pomoćne tvari), uključujući materijale za unutarnje pakiranje lijeka, mora biti u skladu s Hrvatskom farmakopejom, odnosno lijek mora biti proizveden i provjerene kakvoće u skladu s postupcima i zahtjevima važeće Europske farmakopeje. Farmakopeja je skup propisa koji utvrđuju zahtjeve i postupke za izradu i provjeru kakvoće lijekova. Da bi se osigurala kakvoća, svi sastojci lijekova i metode njihove analize se moraju standardizirati. Europsku farmakopeju (32) objavljuje Europsko ravnateljstvo za kakvoću lijekova i zdravstvenu skrb (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, EDQM) koje djeluje pri Vijeću Europe u Strasbourgu (Council of Europe). Europska farmakopeja postavlja zajedničke i obvezne standarde kojima jamči kakvoću lijekova u svim zemljama potpisnicama Konvencije o izradi Europske farmakopeje. RH je od 1994. potpisnica Konvencije i članica Europske farmakopeje. Pristupanjem Konvenciji, norme kakvoće za tvari iz monografijskog fonda Europske farmakopeje postale su obvezne za sve lijekove proizvedene ili uvezene u RH. HALMED je hrvatsko nacionalno tijelo za pitanja farmakopeje. Ispitivanja opisana u farmakopejskim monografijama službene su metode na kojima su postavljeni standardi Europske farmakopeje. Alternativne metode analize mogu se koristiti u svrhu kontrole kakvoće u dogovoru s regulatornim tijelima, pod uvjetom da se dokaže kako njihova službena primjena osigurava prihvaćene standarde. Farmaceutska supstancija mora udovoljiti svim zahtjevima navedenima u monografiji da bi postigla farmaceutsku kakvoću koju propisuje farmakopeja (33).

Zahtjev kakvoće za biljnu tvar je propisan općom monografijom za biljne droge te posebnom monografijom za biljnu tvar. Lijekovi koji sadrže ginko definirani su sljedećim monografijama Europskom farmakopeje: List ginka (Europska farmakopeja 8.0; 01/2011:1828) i Suhi ekstrakt ginka, rafiniran i kvantificiran (Europska farmakopeja 8.0, 04/2008:1827) (32, 33).

HALMED, kao nadležno tijelo za provjeru kakvoće lijekova na tržištu, obavlja provjeru kakvoće lijekova uzetih iz prometa od farmaceutske inspekcije, prema planu najmanje jednom u pet godina za svaki farmaceutski oblik i jačinu lijeka (11).

Ministarstvo zdravstva RH nadležno je tijelo za nadzor nad dodatacima prehrani. Uprava za sanitarnu inspekciju provodi službeno uzorkovanje. Službeni uzorci dostavljaju su u službene laboratorije koje imenuje nadležno tijelo. Služba za zdravstvenu ekologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) je centralno mjesto u mreži javnozdravstvenih ustanova, Zavoda za javno zdravstvo, koje provode mjere zaštite zdravlja ljudi, vezano uz čimbenike okoliša s potencijalno štetnim djelovanjem (34). Određeni laboratoriji u sastavu HZJZ-a su ovlašteni kao službeni laboratoriji za potrebe inspekcija u Ministarstvu zdravstva.

AOAC 2006.07 je akreditirana metoda za analizu fitopreparata koji sadrže ginko. *AOC International* je neprofitna znanstvena udruga sa sjedištem u gradu Rockville, Maryland, SAD. Objavljuje standardizirane kemijske metode analize dizajnirane za povećanje pouzdanosti kemijskih i mikrobiološka analiza. Vladine agencije i građanske organizacije često zahtijevaju da laboratoriji koriste službene AOAC metode. Panel stručnjaka u *AOC International* je razvio AOAC 2006.07 metodu analize kako bi odredio najzastupljenije flavonolske aglikone (kvercetin, kemferol i izoramnetin) u biljnoj sirovini i gotovim proizvodima koji sadrže ginko (34, 35).

Za dodatke prehrani, prema Pravilniku o tvarima koje se mogu dodavati hrani, koristiti u proizvodnji hrane te tvari čije je korištenje u hrani ograničeno ili zabranjeno u dodacima prehrani, dopuštena je upotreba samo standardiziranog ekstrakta lista s najviše 5 ppm ginkolatnih kiselina (23).

4.2.1. Farmakopejska monografija droge Ginkov list

Ginkgonis folium: 01/2011:1828 (Ph. Eur. 8.0)

DEFINICIJA

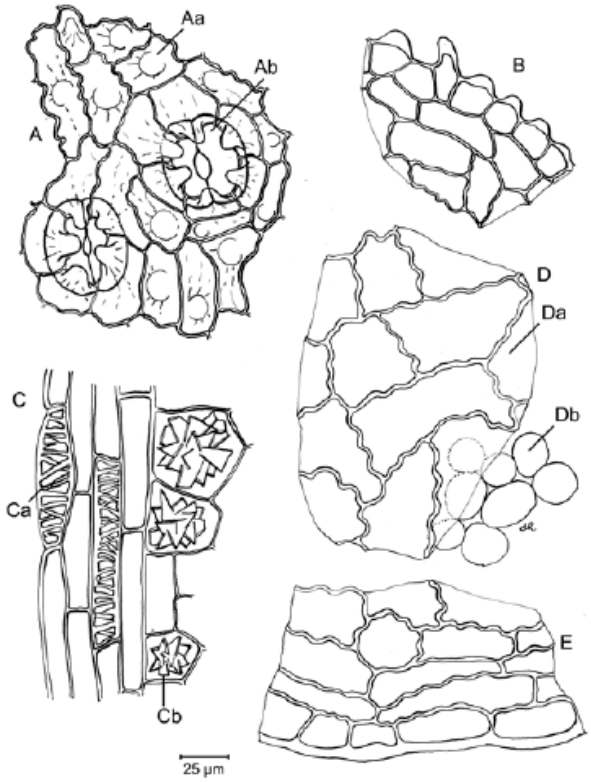
Cijeli ili fragmentirani, osušeni list vrste *Ginko biloba* L.

Sastav: najmanje 0,5% flavonoida, izraženih kao flavonolski glikozidi (M_r 757) (osušena droga).

IDENTIFIKACIJA

A. List je sivkast, žučksatozelen ili žućkastosmeđ. Gornja površina je nešto tamnija nego donja površina. Peteljke su oko 4-9 cm duge. Plojka je oko 4-10 cm široka, oblika lepeze, obično dvorežnjasta ili ponekad nepodijeljena. Obje su površine glatke, poredak žila je dihotoman, žile se pojavljuju radijalno iz baze; jednako su istaknute na obje površine. Gornji rub plojke je usječen, nepravilno i različitog stupnja, te nepravilno razdijeljen ili izrubljen. Bočni rubovi su cijeloviti i sužavaju se prema bazi.

B. Usitniti u prašak (355) (*2.9.12.*). Prašak je sivkast ili žućkastozelen ili žučksatosmeđ. Ispitati pod mikroskopom koristeći otopinu *kloralhidrata R*. Prašak pokazuje sljedeća dijagnostička obilježja (slika 9): nepravilno oblikovani fragmenti plojke [A, B, D, E] s gornjom epidermom, površinskog [D] te poprečnog presjeka [E] koji se sastoji od izduženih stanica s nepravilno valovitim stijenkama [De], s često pridruženim stanicama palisadnog parenhima [Db] te s donjom epidermom površinskog [A] i poprečnog presjeka [B] koji se sastoji od malih stanica, s fino izdrazdanom kutikulom i papiloznom svakom stanicom [Aa] i pučima [Ab] širokim oko 60 µm i duboko udubljenima sa 6-8 stanica pratilica; fragmenti žilnog staničja iz peteljke i žile [C] s ksilemom [Ca] i parenhimom, neke stanice sadrže ružice kalcijeva oksalata različitih veličina [Cb] (slika 8).



Slika 8. Ilustracija za identifikacijski test B za ginkov list u prahu

C. Tankoslojna kormatografija (*2.2.27*).

Poredbena otopina. U 2,0 g biljne droge u prahu (710) (*2.9.12*) dodati 10 mL *metanola R*. Zagrijavati 10 minuta u vodenoj kupelji pri 65 °C. Često protresati. Ostaviti da se ohladi na sobnoj temperaturi i filtrirati.

Poredbena otopina. Otopiti 1,0 mg *klorogenske kiseline R* i 3,0 mg *rutina* u 20 mL *metanola R.*

Ploča: TLC silikagel ploča R.

Pokretna faza: anhidrid mravlje kiseline R, *ledena octena kiselina R, voda R, etilni acetat R* (7,5:7:5:17,5:67,5 V/V/V/V).

Nanošenje: 20 µL u linijama.

Razvijanje: iznad visine od 17 cm.

Sušenje: pri 100-105 °C.

Detekcija: poprskati toplu ploču otopinom 10 g/L *aminoetilnog estera difenilboratne kiseline R u metanolu R*, potom s istim volumenom 50 g/L *makrogola 400 R* u *metanolu R*, ostaviti oko 30 min da se osuši na zraku i ispitati u ultraljubičastom svijetlu pri 365 nm.

Rezultat: vidjeti dolje naveden slijed zona prisutnih u kromatogramu dobivenom s poredbenom otopinom i ispitivanom otopinom. Osim toga, druge slabo fluorescirajuće zone mogu biti prisutne u kromatogramu dobivenom s ispitivanom otopinom.

Vrh ploče	
	Žučkasto-smeđa fluorescentna zona Zelena fluorescentna zona Dvije žučkasto-smeđe fluorescentne zone Intenzivna svijetla plava fluorescentna zona ponekad preklopljena zelenkastosmeđom fluorescentnom zonom
Klorogenska kiselina: svijetloplava fluorescentna zona Rutin: žučkastosmeđa fluorescentna zona	Zelena fluorescentna zona Dvije žučkasto-smeđe fluorescentne zone Zelena fluorescentna zona Žučkastosmeđa fluorescentna zona
Poredbena otopina	**Ispitivana otopina**

ISPITIVANJA

Strane primjese (*2.8.2*): najviše 5 posto stabiljke i 2 posto drugih tvari.

Gubitak sušenjem (*2.2.32*): najvišeo 11,0 posto, određeno na 1,000 g biljne tvari u prahu (355) (*2.9.12*) nakon sušenja u sušioniku pri 105 °C tijekom 2 sata.

Ukupni pepeo (*2.4.16*): njaviše 11,0 posto.

SADRŽAJ

Flavonoidi. Tekućinska kromatografija (*2.2.29*)

Ispitivana otopina. Zagrijava se 2,500 g biljne droge u prahu (710) (*2.9.12*) u 50 mL 60 postotne V/V otopine *acetona R* s povratnim hladilom tijekom 30 minuta. Filtrira se i prikupi filtrat. Ostatak droge se ekstrahira drugi put na isti način, koristeći 40 mL 60 postotne V/V otopine *acetona R* te filtrira. Prikupe se filtrati i nadopune do 100,0 mL sa 60 postotnom V/V otopinom *acetona R*. Zagrijava se 50,0 mL otopine da se ukloni aceton te se ostatak prenese u vial od 50,0 mL, uz ispiranje s 30 mL *metanola R*. Doda se 4,4 mL *klorovodične kiseline R1*, razjedi *vodom R* do 50,0 mL i centrifugira. Stavi se 10 mL supernatanta u smeđu staklenu bočicu od 10 mL. Bočica se zatvori gumenim zatvaračem i aluminijskom kapicom i zagrijava 25 minuta na vodenoj kupelji. Ostavi se ohladiti na sobnu temperaturu.

Poredbena otopina: otopi se 10,0 mg *kverctin dihidrata CRS* u 20 mL *metanola R*. Doda se 15,0 mL *razrijeđene klorovodične kiselina R* i 5 ml *vode R* te razjedi *metanolom R* do 50 mL.

Kolona:

- *veličina:* l = 0,125 m, Ø = 4 mm;
- *nepokretna faza*: *oktadecilsilil silikagel za kromatografiju R* (5 µm);

- *temperatura:* 25 °C.

Pokretna faza:

- *pokretna faza A:* otopina 0,3 g/L *fosforne kiseline R* prilagođena na pH 2,0;
- *pokretna faza B:* metanol R;

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (postotak V/V)	Pokretna faza A (postotak V/V)
0-1	60	40
1-20	60 → 45	40 → 55
20-21	45 → 0	55 → 100
21-55	0	100

Brzina protoka: 1,0 mL/min.

Detektor: spektrofotometar pri 370 nm.

Injektiranje: 10 µL.

Relativno zadržavanje u odnosu na kvercetin (vrijeme zadržavanja oko 12,5 min): kemferol oko 1,4; izoramnetin oko 1,5.

Prikladnost sustava:

- *razlučivanje:* najmanje 1,5 između pikova kemferola i izoramnetina.

Ne uzimati u obzir pikove koji eluiraju prije pika kvercetina ili nakon pika izoramnetina u kromatogramu dobivenom s ispitivanom otopinom.

Izračunati udio flavonoida u postocima, izražen kao flavonolski glikozidi, koristeći sljedeći izraz:

$$2 \times \frac{F_1 \times m_1 \times 2{,}514 \times p}{F_2 \times m_2}$$

F_1 = zbroj površina svih pikova uzetih u obzir u kromatogramu dobivenim s ispitivanom otopinom

F_2 = površina pika kvercetina u kromatogramu dobivenim s poredbenom otopinom;

m_1 = masa kvercetina korištenog za pripremu poredbene otopine, u gramima;

m_2 = masa ispitivane biljne droge korištene za pripremu ispitivane otopine, u gramima

p = postotni udio bezvodnog kvercetina u *kvercetin dihidratu R.*

4.2.2. Farmakopejska monografija droge Ginkov suhi ekstrakt, rafiniran i kvantificiran

Ginkonis extractum siccum raffinatum et quantificatum: 04/2008:1827 (Ph. Eur. 8.0)

DEFINICIJA

Rafiniran i kvantificiran suhi ekstrakt iz droge Ginkov list *(1828)*.

Sadržaj:

- *flavonoidi, izraženi kao flavonolski glikozidi* (M_r 756.7): 22,0 posto do 27,0 posto (osušeni ekstrakt);
- *bilobalid*: 2,6 posto do 3,2 posto (osušeni ekstrakt);
- *ginkolidi* A, B *i* C: 2,8 posto do 3,4 posto (osušeni ekstrakt);
- ginkolne kiseline: najviše 5 ppm (osušeni ekstrakt).

DOBIVANJE

Ekstrakt je proizveden iz biljne droge prikladnim postupkom koristeći organska otapala i njihove mješavine s vodom, odjeljivanje kao i druge odgovarajuće procese.

OBILJEŽJA

Izgled: svijetlo žutosmeđi, prašak ili rastresita masa.

IDENTIFIKACIJA

Tankoslojna kromatografija *(2.2.27).*

Ispitivana otopina. Otopi se 20,0 mg ekstrakta koji će biti ispitivan u 10 mL mješavine 2 volumena *vode R* i 8 volumena *metanola R*.

Poredbena otopina. Otopi se 1,0 mg *klorogenske kiseline R* i 3,0 mg *rutina R* u 20 mL *metanola R*.

Ploča: TLC silikagel ploča R (5-40 µm) ili [TLC silikagel ploča R (2-10 µm)].

Pokretna faza: *anhidrid mravlje kiseline R, ledena octena kiselina R, voda R, etilni acetat R* (7,5:7.5:17,5:67,5 V/V/V/V).

Nanošenje: 20 µL [ili 5 µL] u linijama

Razvijanje: iznad visine od 17 cm [ili 6 cm]

Sušenje: pri 100-105 °C

Detekcija: poprskati ploču dok je vruća otopinom 10 g/L *aminoetilnog estera difenilboratne kiseline R u metanolu R*, potom prskati otopinom 50 g/L *makrogola 400* R u *metanolu R*; ostaviti oko 30 minuta da se osuši na zraku i ispitati u ultraljubičastom svjetlu pri 365 nm.

Rezultat: vidjeti dolje naveden slijed zona prisutnih u kromatogramu dobivenom s poredbenom i ispitivanom otopinom. Osim toga, druge slabije fluorescirajuće zone mogu biti prisutne u kromatogramu dobivenom s ispitivanom otopinom.

Vrh ploče	
_____	Plava fluorescentna zona Nekoliko blijedo obojenih zona _____ Smeđa fluorescentna zona Zelena fluorescentna zona Intenzivna svijetla plava fluorescentna zona ponekad preklopljena zelenkastosmeđom fluorescentnom zonom
Klorogenska kiselina: svijetloplava fluorescentna zona Rutin: žućkastosmeđa fluorescentna zona _____	Jedna ili dvije zelene fluorescentne zone Jedna ili dvije žućkastosmeđe fluorescentne zone _____ Nekoliko zelenih i žućkastosmeđih fluorescentnih zona
Poredbena otopina	**Ispitivana otopina**

SADRŽAJ

Flovonoidi. Tekućinska kromatografija (*2.2.29*).

Poredbena otopina. Otopi se 0,200 g ekstrakta koji će biti ispitivan u 20 mL *metanola R*. Doda se 15,0 mL *razrijeđene kloridne kiseline R* i 5 ml *vode R* te se razjedi do 50 mL *metanolom R*. Prenese se 10,0 mL ove otopine u smeđi stakleni vial od 10 mL. Vial se zatvori gumenim membranskim čepom i osigura aluminijskom kapicom. Zagrijava se 25 minuta na vodenoj kupelji. Ostavi se ohladiti na 20 °C.

Poredbena otopina: otopi se 10,0 mg *kverctin dihidrata CRS* u 20 mL *metanola R*. Doda se 15,0 mL *razrijeđene kloridne kiseline R* i 5 mL *vode R* te razjedi *metanolom R* 50 mL.

Kolona:

- *veličina:* l = 0,125 m, Ø = 4 mm;
- *nepokretna faza*: *oktadecilsilil silikagel R* (5 µm);
- *temperatura:* 25 °C.

Pokretna faza:

- *pokretna faza A:* otopina 0,3 g/L *fosforne kiseline R* prilagođena na pH 2,0;
- *pokretna faza B: metanol R*;

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (postotak V/V)	Pokretna faza A (postotak V/V)
0-1	60	40
1-20	60 → 45	40 → 55
20-21	45 → 0	55 → 100
21-55	0	100

Brzina protoka: 1,0 mL/min.

Detektor: spektrofotometar pri 370 nm.

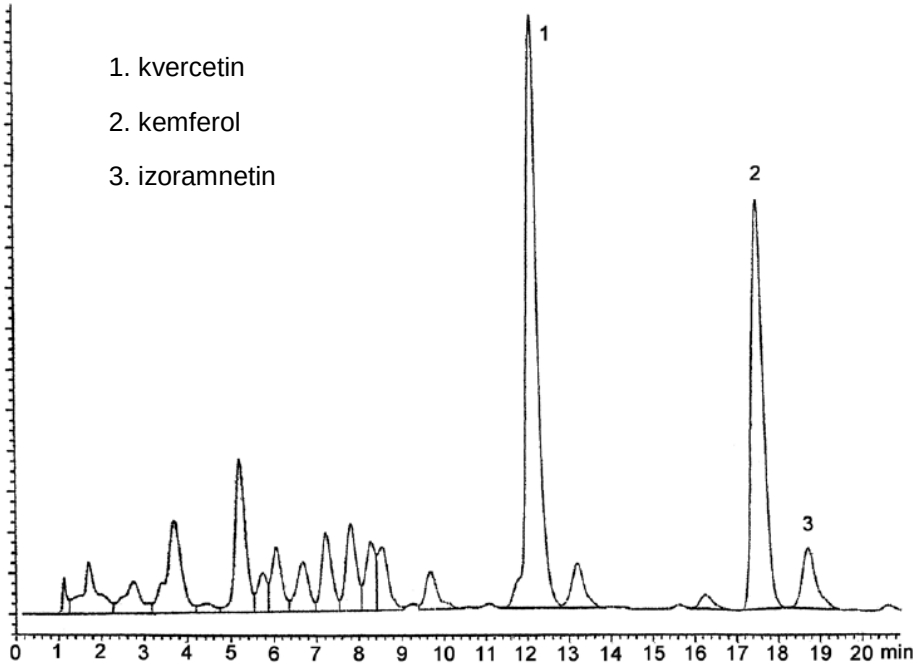
Injektiranje: 10 µL.

Relativno zadržavanje u odnosu na kvercetin (vrijeme zadržavanja oko 12,5 min): kemferol oko 1,4; izoramnetin oko 1.5.

Prikladnost sustava: poredbena otopina

- *rezlučivanje:* najmanje 1,5 između pikova kemferola i izoramnetina.

Odrediti zbroj površina pikova uključujući sve pikove od pika kvercetina do pika izoramnetina u kromatogramu dobivenom s ispitivanom otopinom (vidjeti sliku 9).



Slika 9. HPLCromatogram flavonoida u rafiniranom i kvantificiranom ginkovom ekstraktu

Izračunati postotni udio flavonoida, izraženo kao flavonolski glikozidi, koristeći sljedeći izraz:

$$2 \times \frac{F_1 \times m_1 \times 2{,}514 \times p}{F_2 \times m_2}$$

F_1 = zbroj površina svih pikova od pika kvercetina do pika izoramnetina u kromatogramu dobivenim s ispitivanom otopinom

F_2 = površina pika kvercetina u kromatogramu dobivenim s poredbenom otopinom;

m_1 = masa kvercetin dihidrata CRS u poredbenoj otopini, u gramima;

m_2 = masa ispitivanog ekstrakta korištenog za pripremu ispitivane otopine, u gramima;

p = postotak udjela bezvodnog kvercetina u *kvercetin dihidratu CRS.*

Terpenski laktoni: Tekućinska kromatografija (*2.2.29*).

Ispitivana otopina. Stavi se 0,120 g ispitivanog ekstrakta u laboratorijsku posudu od 25 mL te se, uz miješanje, otopi u 10 mL *otopine fosfatnog pufera pH 5,8 R*. Prenese se otopina u kromatografsku kolonu duljine oko 0,15 m dugu i oko 30 mm unutarnjeg promjera, koja sadrži 15 g *dijatomejske zemlje za kromatografiju R.* Ispere se čaša s 2 porcije od 5 mL *otopine fosfatnog pufera pH 5.8 R* te se ispirci prenesu u kromatografsku kolonu. Pusti se stajati 15 minuta. Eluira se sa 100 mL *etilnog acetata R.* Eluat se upari do suha u vodenoj kupelji na 50 °C i pri tlaku koji ne prelazi 4 kPa. Ostatak otapala se ukloni u struji zraka. Ostatku se doda 2,5 mL pokretne faze.

Poredbena otopina (a). Otopi se 30,0 mg *benzilnog alkohola CRS* u pokretnoj fazi i istom razjedi do 100,0 mL.

Poredbena otopina (b). Stavi se 0,120 g *suhog ekstrakta ginka za identifikaciju pikova CRS* u čašu od 25 mL i miješajući otopi u 10 mL *otopine fosfatnog pufera pH 5.8 R*, te dalje postupa kako je opisano za ispitivanu otopinu.

Kolona:

- *veličina:* l = 0.25 m, Ø = 4 mm;
- *stacionarna faza: oktasilil silikagel za kromatografiju R* (5 µm);
- *temperatura*: 25 °C.

Pokretna faza: tetrahidrofuran R, metanol R, voda R (10:20:75 V/V/V).

Protok: 1,0 mL/min.

Detekcija: refraktometar pri 35 °C.

Injektiranje: 100 µL.

Identifikacija pikova: koristiti kromatogram dobiven sa *ginkovim suhim ekstraktom za identifikaciju pikova CRS* i kromatogram dobiven s poredbenom otopinom (b) za indentifikaciju pikova bilobalida i ginkolida A, B i C.

Prikladnost sustava:

- kromatogram dobiven s poredbenom otopinom (b) je sličan kromatogramu dobivenim sa *ginkovim suhim ekstraktom za identifikaciju pikova CRS.*

Izračunati postotni udio bilobalida, koristeći slijedeći izraz:

$$\frac{F_1 \times m_1 \times p \times 0{,}025 \times 1{,}20}{F_2 \times m_2}$$

Izračunati postotni udio ginkolida A, koristeći sljedeći izraz:

$$\frac{F_2 \times m_1 \times p \times 0{,}025 \times 1{,}22}{F_5 \times m_2}$$

Izračunati postotni udioj ginkolida B, koristeći sljedeći izraz:

$$\frac{F_3 \times m_1 \times p \times 0{,}025 \times 1{,}19}{F_2 \times m_2}$$

Izračunati postotni udio ginkolida C, koristeći sljedeći izraz:

$$\frac{F_4 \times m_1 \times p \times 0{,}025 \times 1{,}27}{F_2 \times m_2}$$

F_1 = površina pika bilobalida u kromatogramu dobivenim s ispitivanom otopinom;

F_2 = površina pika ginkolida A u kromatoragmu dobivenim s ispitivanom otopinom;

F_3 = površina pika ginkolida B u kromatoragmu dobivenim s ispitivanom otopinom;

F_4 = površina pika ginkolida C u kromatoragmu dobivenim s ispitivanom otopinom;

F_5 = površina pika benzilnog alkohola u kromatogramu dobivenim s poredbenom otopinom (a);

m_1 = masa *benzilnog alkohola* CRS u poredneboj otopini (a), u gramima;

m_2 = masa ispitivanog ekstrakta za pripremu ispitivane otopine, u gramima;

p = postotni udio benzilnog alkohola u *benzilnom alkoholu CRS*

Izračunati sumu postotnih udjela ginkolida A, B i C koristeći sljedeći izraz:

$$G_A + G_B + G_C$$

G_A = postotni udio ginkolida A;

G_B = postotni udio ginkolida B;

G_C = postotni udio ginkolida C.

Ginkolne kiseline. Tekućinska kromatografija (*2.2.29*).

Ispitivana otopina. Otopiti 0,500 g ispitivanog ekstrakta u prahu u 8 mL *metanola R*, koristeći ultrazvuk ako je potrebno, i otopiti u 10.0 mL istog otapala.

Referentna otopina. Otopiti 10,0 mg *ginkolatnih kiselina CRS* u 8 mL *metanola R*, po potrebi koristeći ultrazvuk, te istim razrijediti do 10,0 mL. Razrijediti 2,0 mL ove otopine *metanolom R* do 10,0 mL.

Kolona:

- *veličina:* l = 0,25 m, Ø = 4,6 mm;
- *nepokretna faza*: *oktasilil silikagel za kromatografiju R* (5 µm)
- *temperatura*: 35 °C.

Pokretna faza:

- *pokretna faza A:* razrijediti 0,1 mL *trifluoroctene kiseline R vodom R* do 1000 mL;
- *pokretna faza B*: razrijediti 0,1 mL *trifluoroctene kiseline* R *acetonitrilom R* do 1000 mL;

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (postotak V/V)	Pokretna faza A (postotak V/V)
0-30	25 → 100	75 →90
30-35	10	90
35-36	10 → 25	90 → 75
36-45	25	75

Protok: 1,0 mL/min.

Detekcija: sektrofotometar pri 210 nm.

Injektiranje: 50 µL.

Identifikacija sastavnica: koristiti kromatogram dobiven s *ginkolnom kiselinom CRS* i kromatogram dobiven s ispitivanom otopinom za identifikaciju pikova ginkolnih kiselina C13, C15 i C17.

Prikladnost sustava: referentna otopina:

- *razlučivanje*: najmanje 2,0 između pikova ginkolnih kiselina C13 i C15.
- *faktor simetrije:* 0,8 do 2,0 za pikove ginkolnih kiselina C13, C15 i C17.

Izračunati sadržaj u dijelovima po milijunu ginkolnih kisleina izraženih kao ginkolna kiselina C17 koristeći sljedeći izraz:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 2000}{A_2 \times m_1}$$

A_1 = zbroj površina svih pikova ginkolnih kiselina C13, C15 i C17 u kromatogramu dobivenim s ispitivanom otopinom;

A_2 = zbroj površina svih pikova ginkolnih kiselina C17 u kromatogramu dobivenim s poredbenom otopinom;

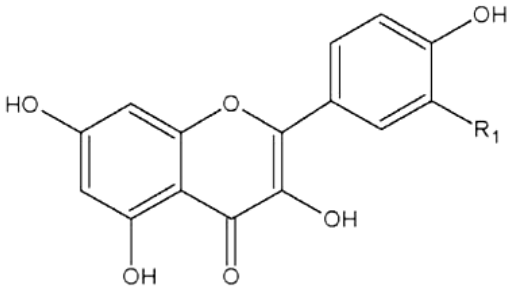
m_1 = masa ispitivanog ekstrakta za pripremu ispitivane otopine, u gramima;

m_2 = masa *ginkolne kiseline CRS* za pripremu poredbene otopine, u gramima

p = postotni udio ginkolne kiseline C17 u *ginkolnoj kiselini CRS*

4.2.3. HPLC metoda određivanja flavonoida u biljnom materijalu i gotovim proizvodima ginkga (AOAC 2006.07)

Fitopreparati na bazi ginkga su među najraširenijim biljnim lijekovima i dodacima prehrani u svijetu. Iako su u znanstvenoj literaturi opisane brojne HPLC metode analize flavonoida (36, 37), inicijativom *National Institutes of Health/Office of Dietary Suplements*, *U.S. Food and Drug Administration* i AOAC *International* te suradnjom 12 laborarija u SAD-u razvijena i validirana HPLC metoda za kvantifikaciju biljne droge i standardizaciju proizvoda (38). Tom metodom se određuje ukupna količina triju najzastupljenijih aglikona (slika 10) nakon hidrolize flavonolskih glikozida klorovodičnom kiselinom, uz zagrijavanje na 90 °C. Iz dobivenih rezultata izračuna se ukupni udio glikozida, a važno je i odrediti omjer sadržaja kvercetina i kemferola koji je karakterističan za ginko.



flavonol	R_1
kvercetin	OH
kemferol	H
izoramnetin	OCH_3

Slika 10. Strukture najzastupljenijih flavonolskih aglikona u fitopreparatima koji sadrže ginko

Analiti se odjeljuju tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) i određuju pri UV 370 nm, u usporedbi s vanjskim standardom kvercetina, kamferola i izoramnetina. Ukupna koncentracija flavonolskih glikozida se zatim računa koristeći pojedinačne faktore konverzije za tri aglikona.

Reagensi:

a. *Metanol* (HPLC čistoća)
b. *Etanol* 95% (ASC spektrofotometrijska čistoća)
c. *Dimetil sulfoksid, DMSO* (otapalo visoke čistoće)
d. *Fosforna kiselina* 85% (ACS čistoća)
e. *Klorovodična kiselina, HCl* 37%
f. *Voda* deionizirana (HPLC ili nano čistoće)
g. *Pokretna faza*: izokratična. Metanol - 0,85%-tna fosforna kiselina, 81+1, V/V). Za pripremu 1 L mobilne faze, ulije se metanol u menzuru od 500 mL do oznake volumena. Pomoću serološke pipete prenese se 250 mL vode u drugi graduirani cilindar od 500 mL te doda 5 mL fosforne kiseline (85-87%) i razrijedi vodom do

oznake volumena. Združi se sadržaj iz obje menzure u stakleni spremnik za mobilnu fazu od 1 L te odstrane plinovi prije uporabe. Označi se kao „*pokretna faza"*.

h. Otapalo: etanol - voda - HCl (50+20+8, V/V/V). Prenese se 40 mL vode pomoću menzure ili pipete u Erlenmeyerovu tikvicu od 200 mL te doda 100 mL etanola primjenom menzure. Pažljivo se odpipetira 16 mL HCl u ovu otopinu te se pažljivo promiješa. Označi se kao *„otapalo*".

i. *Poredbeni standardi*: kvercetin dihidrat, kemferol i izoramnetin.

j. *Priprema otopine standarda*: pripremi se početna otopina DMSO-a i metanola pri konačnoj koncentraciji od cca. 0,33 mg/mL kvercetina, 0,34 mg/mL kemferola i 0,09 mg/mL izoramnetina tako da se u volumetrijsku tikvicu od 50 mL izvaže 21 mg (± 0,06 mg) kvercetin dihidrata, 19 mg kemferola i 5,0 mg (± 0,02 mg) izoramnetina.

Doda se oko 10 mL DMSO-a u volumetrijsku tikvicu te otapanje poredbenih standarda pospješi primjenom ultrazvuka 1-5 min. Razrijedi se do oznake volumena s metanolom i temeljito promiješa preokretanjem. Označi se kao „*izvorna otopina*". Ta je otopina stabilna do 6 mjeseci ako je pohranjena u čvrsto zatvorenoj smeđoj bočici u hladnjaku.

Izvorna otopina se razrijedi metanolom u volumetrijskoj tikvici kako bi dobili 5 dodatnih kalibracijskih krivulja u području od približno 8 do 135 µg/mL (kevrcetin i kemferol) i cca. 2 do 36 µg /mL (izoramnetin) kao što je prikazano u Tablici 4.

Tablica 4. Priprema otopina standarda flavonolskih aglikona iz izvorne otopine

Broj otopine	Volumen izvorne otopine standarda	Konačni volumen (mL)	Kvercetin (µg/mL)	Kemferol (µg/mL)	Izoramnetin (µg/mL)
1	0,25	10,0	8,3	8,5	2,3
2	0,5	10,0	16,5	17,0	4,5
3	1,0	10,0	33,0	34,0	9,0
4	1,0	5,0	66,0	68,0	18,0
5	2,0	5,0	132,0	136,0	36,0

Napomena: svaka otopina označi se brojevima od 1 do 5. Početna i kalibracijska otopina čuva se pri 4 °C, a donese se na sobnu temperaturu prije uporabe.

Prikladnost sustava

Odredi se površina pikova i vrijeme zadržavanja za svaku poredbenu supstanciju. Izračuna se relativna standardna devijacija (RSD) za svaku površinu koja bi trebala biti $\leq$ 1,5%.

Kalibracijska krivulja

Napravi se kalibracijska krivulja od 5 točaka za svježe pripremljenu otopinu standarda. Koeficijent određivanja (R^2) za svaku poredbenu supstanciju bi trebao biti ≥ 0.999.

Priprema ispitivanih uzoraka

a) *Biljni materijal (osušeni ginkovi listovi)*: izvaže se 200 mg (± 5,0 mg) droge u prašku u prozirnu staklenu bočicu od 30 mL i zapiše točna odvaga. Doda se 12 mL otapala, otapanje provodi 5 minuta uz ultrazvuk, bočica zatvori aluminijskom kapicom i teflonskom pregradom. Sadržaj se hidrolizira zagrijavanjem zatvorene bočice 60±3 minuta u peći na 90±2 °C. Bočica se izvadi i ohladi na sobnu temperaturu. Sadržaj se prenese u volumetrijsku tikvicu od 25 mL, a bočica dodatno ispere otapalom koje se zatim prenese u istu tikvicu. Volumen se nadopuni do oznake metanolom i dobro promiješa. Dio otopine se profiltrira (0,45 µm) u vial za automatsko injektiranje.

b) *Suhi ekstrakt u prahu:* odvaže se 15±1,5 mg suhog ekstrakta u prahu u prozirnu staklenu bočicu od 30 mL i zapiše točna odvaga. Doda se 5 mL otapala, otapanje provodi 5 minuta uz ultrazvuk, bočica zatvori aluminijskom kapicom i teflonskom pregradom. Sadržaj se hidrolizira zagrijavanjem zatvorene bočice 60±3 minuta u peći na 90±2 °C. Bočica se izvadi i ohladiti na sobnu temperaturu. Sadržaj se prenese u volumetrijsku tikvicu od 10 mL, a bočica dodatno ispere otapalom koje se zatim prenese u istu tikvicu. Volumen se nadopuni do oznake metanolom i dobro promiješa. Dio otopine se profiltrira (0,45 µm PVDF) u vial za automatsko injektiranje.

c) *Kapsule: iz*važe se 5 kapsula, isprazni sadržaj, izvažu prazne kapsule te izračuna neto sadržaj po kapsuli. Zapiše se odvaga i sadržaj prenese u prikladan spremnik sa zatvaračem na navoj i temeljito promiješa. Ukoliko je potrebno, usitni se u tarioniku pomoću pistila do praškaste konzistencije kako bi se dobio prašak koji prolazi kroz sito broj 60. Odvaže se 15-600 ± 1,5 mg suhog praška u prozirnu staklenu bočicu od 30 mL. Zapiše se točna masa. U bočicu se doda 5 mL otapala i miješa 5 minuta uz ultrazvuk. Zatvori se aluminijskom kapicom i teflonskom pregradom. Hidrolizira se sadržaj tako da se zatvorena bočica drži u peći na 90± 2 °C kroz 60±3 minuta. Bočica se izvadi i ohladi na sobnu temperaturu. Sadržaj se prenese u tikvicu od 10 mL, bočica ispere, te se otopina razrijedi metanolom do oznake volumena i dobro promiješa. Filtrira se dio otopine (0.45 µm) u vial za samoinjektiranje.

d) Tablete: izvaže se 5 tableta i zapiše masa. Tablete se smrve u tarioniku pomoću pistila do praška čije čestice prolaze kroz sito broj 60. Zapiše se masa i prenese sadržaj u smeđi spremnik sa zaštitnom kapom i dobro promiješa. Odvaže se 15-600 ± 1,5 mg suhog praška u prozirnu staklenu bočicu od 30 mL. Zapiše se točna masa. U bočicu se doda 5 mL otapala te miješa 5 minuta uz ultrazvuk. Zatvori se aluminijskom kapicom i teflonskom pregradom. Hidrolizira se sadržaj tako da se zatvorena bočica drži u peći 60±3 minuta na 90 ± 2 °C. Bočica se izvadi i ohladi na sobnu temperaturu. Sadržaj se prenese u tikvicu od 10 mL,

tikvica ispere, a otopina razrijedi metanolom do oznake volumena i dobro promiješa. Filtrira se dio otopine (0,45 µm) u vial za samoinjektiranje.

Analiza

a) *LC radni uvjeti*: temperatura kolone 35 °C; brzina protoka 1,0 mL/min, volumen injektiranja 10 µL, detekcija UV-370 nm, vrijeme analize 35 minuta (slika 11).

Izračun

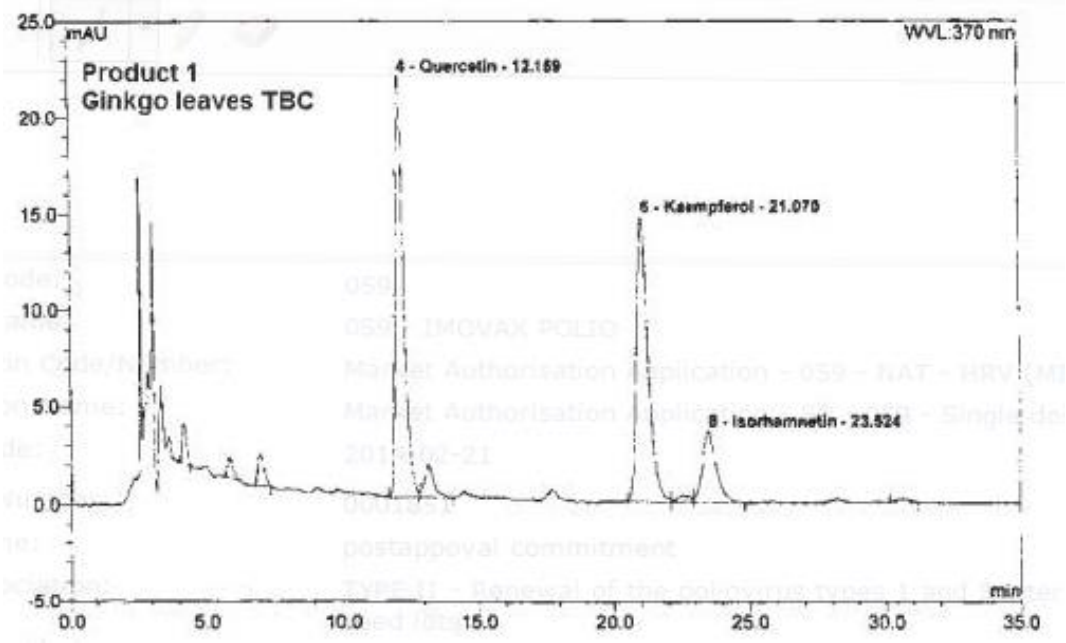
Ukupna koncentracija flavonolskih glikozida je određena zbrojem pojedinačnih koncentracija tri flavonolska glikozida pri UV-370 nm. Flavonolski glikozdi određuju se ili kao postotak pojedinog glikozida ili kao postotak pojedinog glikozida po kapsuli ili tableti prema niže navedenim formulama:

$$\% \text{ pojedinačni glikozid (\%W/W)} = (C \times FV \times F \times 100) / W$$

gdje je C = koncentracija aglikona (mg/mL) određena iz baždarne krivulje; FV = konačni volumen; F = konverzijski faktor (2,504 za kvercetin, 2,588 za kamferol, 2,437 za izoramnetin); W = masa uzorka (mg).

$$\% \text{ pojedinačni glikozid/tableta (µg)} = ((C \times FV \times F) / W) \times T$$

gdje je C = koncentracija aglikona (mg/mL) određena iz baždarne krivulje; FV = konačni volumen; F = konverzijski faktor (2,504 za kvercetin, 2,588 za kamferol, 2,437 za izoramnetin); W = masa uzorka (mg); T – prosječna masa kapsule ili tablete (mg).



Slika 11. HPLC kromatogram flavonolskih aglikona iz ginkova lista dobiven akreditiranom AOAC 2006.07 metodom (38)

4.2.5. Usporedba farmakopejske i AOAC 2006.07 metode određivanje flavonoida ginka

Metode iz pripadajuće monografije Europske farmakopeje primjenjuju se u svrhu kontrole kakvoće ginkovog ekstrakta u lijekovima, dok za dodatke prehrani koji sadrže ginkgo Hrvatski zavod za javno zdravstvo koristi AOAC 2006.07 metodu (35, 38).

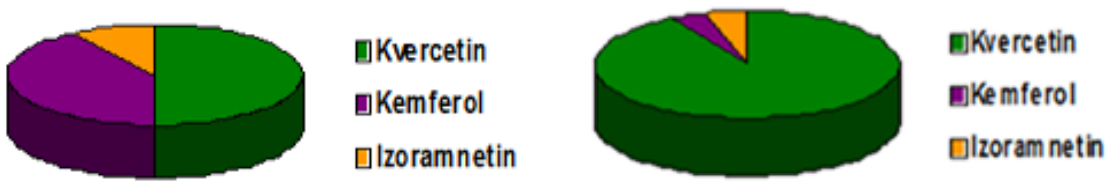
Primjenom navedenih metoda određuju se udjeli glavnih flavonolskih aglikona kvercetina, kemferola i izoramnetina, koji se preračunavaju u njihove glikozidne oblike. Prema AOAC 2006.07 metodi najprije se određuju pojedinačni udjeli svakog od triju flavonolskih glikozida, koji se zatim zbrajaju (uz mogućnost provjere njihovih međusobnih omjera). Dobivena količina ukupnih glikozida uspoređuje se s deklariranom vrijednošću. U farmakopejskoj metodi se kao rezultat uzima samo ukupan zbroj glikozida, i to izražen prema kvercetinu. Tom metodom ne provjeravaju se međusobni omjeri pojedinih aglikona te se time ostavlja mogućnost pozitivne ocjene neispravnog uzorka. Takvim načinom izražavanja rezultata nije moguće uustanoviti zamjene ekstrakta ginka s manjom ili većom količinom nekog drugog biljnog ekstrakta, sličnog profila flavonoida. Nadalje, tom metodom nije moguće utvrditi dodatak kvercetina koji ne potječe od ginka, jer ukupna količina glikozida najčešće odgovara deklariranoj vrijednosti (19).

4.2.6. Krivotvorenje fitopreparata s ginkom

Razlike u fitokemijskom sastavu ginkovih listova su uobičajene, a posljedica su određenih geografskih, klimatskih, pedoloških i drugih okolišnih čimbenika. Da bi se osigurala kakvoća droge i gotovih fitopreparata postavljene su određene vrijednosti flavonoida i njihovi međusobni odnosi. Prema dostupnim podacima iz prakse (39), omjer udjela kvercetina, kemferola i izoramnetina u prosjeku iznosi 5:5:1, a prema nekim autorima prihvatljivi su i omjeri u rasponima od 4:4:1 do 6:5:1.

Poseban naglasak se stavlja na omjer kvercetina i kemferola. Za uzorke ekstrakata kod kojih je taj omjer veći od 2 pretpostavlja se da kvalitetom ne odgovaraju (slika 12). Velika potražnja i sve veća ponuda su utjecali na pojavu krivotvorenja ekstrakta ginka. Deklarirana ukupna količina flavonoida može se postići dodatkom flavonoida koji ne potječu od ginka. No, njihovi omjeri ne odgovaraju onima u prirodnom ginkovom ekstraktu. U tu se svrhu koristi kvercetin, odnosno njegov glikozidni oblik rutin, kao jedan od najzastupljenijih flavonoida koji se, između ostalog, može izolirali iz heljde (*Fagopyrum esculentum*), bazge (*Sambucus nigra*) ili rute (*Ruta graveolens*), a prisutan je i u mnogim drugim ljekovitim biljnim vrstama, voću i povrću. Budući da tako pripremljen ekstrakt sadrži potrebnu količinu ukupnih flavonolskih glikozida, fitopreparati se mogu ocijenjiti kao ispravni u slučaju kontrole provedene neadekvatnom metodom. Stoga su izbor odgovarajućeg analitičkog postupka i interpretacija dobivenih rezultata izuzetno važni za prepoznavanje mogućeg krivotvorenja.

U rijetkim slučajevima može se analizom komercijalnih pripravaka koji sadrže ginko naići i na znatno veći udio kemferola, što upućuje na mogućnost krivotvorenja ekstrakta ginka ekstraktom azijske biljke *Sophora japonica*, koja sadrži i desetak puta više tog flavonoida nego ginko (35, 39).



Slika 12. Ispravan (lijevo) i neispravan (desno) uzorak ginkovog ekstrakta (35)

4.2.7. Nadzor dodataka prehrani s ginkom u Republici Hrvatskoj

Javno dostupni podatci (40) pokazuju da je Ministarstvo zdravstva, Uprava za sanitarnu inspekciju, u vremenskom razdoblje od 1. siječnja 2013. godine do 31. prosinca 2013. godine provela službeno uzorkovanje - monitoring na 2686 uzoraka hrane na unutarnjem tržištu RH. U sklopu navdenog nadzora analizirano je pet uzoraka biljnih dodataka prehrani s ginkovim ekstraktom (maloprodaja, ljekarne i biljne ljekarne) s područja Zadarske županije.

Analizom je bila obuhvaćena ukupna količina triju karakterističnih flavonolskih glikozida te omjer kvercetina i kemferola. Poznato je da fitopreparati na EU tržištu u tom pogledu često ne odgovaraju deklaraciji, odnosno da je ginkov ekstrakt djelomično ili potpuno zamijenjen ekstraktom neke druge, jeftinije biljke sličnog sastava, čime se prema odredbama članka 14., točka 3.b. Uredbe (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i vijeća, obmanjuje krajnji potrošač.

Jedan uzorak nije odgovarao omjerom kvercetina i kemferola koji se smatra indikatorom autentičnosti ginkovog ekstrakta, međutim, nije značajno odstupao od deklarirane ukupne količine flavonolskih glikozida. Taj podatak ukazuje na mogućnost djelomične zamjene ginkovog ekstrakta s nekim jeftinijim biljnim ekstraktom sličnog sastava. Nadalje, jedan uzorak nije zadovoljavao u pogledu ukupne količine flavonolskih glikozida, ali je omjer kvercetina i kemferola bio prihvatljiv. Razlog tome može biti prisutna manja količina ginkovog ekstrakta od deklarirane vrijednosti i/ili nedovoljno dobar izbor nosača aktivne tvari iz kojeg se ona ne može ekstrahirati primijenjenom metodom, što ujedno ukazuje da najveći dio ekstrakta samo prolazi kroz probavni sustav vezan na nosaču te pritom ne ostvaruje očekivani biološki učinak.

Tablica 5. Prikaz rezultata određivanja ginkovog ekstrakta u biljnim dodacima prehrani na tržištu Republike Hrvatske u 2013. godini

Oblik biljnog dodatka prehrani	Udio ekstrakta po kapsuli/tableti	Deklarirani udio ekstrakta po kapsuli/ tableti	Udio ukupnih flavonolskih glikozida (mg/kg)	Omjeri udjela kvercetina i kemferola
Kapsule	66,87*	60	22926	3,1
Kapsule	43,30*	40	41471	0,98**
Tablete	41,06*	40	49941	0,86**
Dražeje	48,71*	40	8824	1,13**
Tablete	5,93	60	2029	–

* ne odstupa značajno od deklarirane količine ginkovog ekstrakta; **odgovara autentičnim omjerima kvercetina i kemferola u ginku (< 2)

Iz izvješća Ureda za sanitarnu inspekciju u području sigurnosti hrane za 2015. godinu (41) može se uočiti da je ispitano 10 dodataka prehrani koji sadrže ginko na tržištu RH. Fitopreparati su bili u obliku kapsula i tableta/dražeja, a porijeklom su iz Hrvatske (7 uzoraka), Njemačke (2 uzorka) i SAD-a (1 uzorak). It tablice 6 je vidljivo da udjeli ekstrakata u ispitanim uzorcima ne odstupaju značajno od deklariranih te da su omjeri kvercetina i kemferola manji od 2. Iako su temeljem provedenih analiza svi uzorci zadovoljili propisane zahtjeve, u jednom je ustanovljena prisutnost izoflavonoida (fitoestrogena) genisteina (4756 mg/kg) koji nije karakterističan za ginko, što je ukazalo na patvorenje. Dodatno provedenom HPLC analizom ustanovljena je prisutnost ekstrakta japanske sofore (*Sophora japonica* L.).

Tablica 6. Prikaz rezultata određivanja ginkovog ekstrakta u biljnim dodacima prehrani na tržištu Republike Hrvatske u 2015. godini

Oblik biljnog dodatka prehrani	Udio ekstrakta po kapsuli/tableti	Deklarirani udio ekstrakta po kapsuli/ tableti	Udio ukupnih flavonolskih glikozida (mg/kg)	Omjeri udjela kvercetina i kemferola
Tablete	21,8	25	5691	0,87
Tablete	40,3	50	8337	0,88
Dražeje	87,6	90	7715	1,00
Tablete	60,5	60	46834	1,03
Tablete	38,5	40	27975	1,17
Kapsule	58,8	60	18816	1,06
Kapsule	58,4	60	20037	1,04
Tablete*	58,7	60	21330	0,84
Kapsule	73,5	80	32566	1,12
Kapsule	38,95	40	46714	1,03

* u uzorku je dokazana prisutnost genisteina

Za razliku od navedenog, pretraživanjem mrežne stranice HALMED-a nije uočena javna objava sumnje u neispravnost biljnih lijekova koji sadrže ginko u razdoblju do prosinca 2016. godine (11).

5. ZAKLJUČCI

Ovaj specijalistički rad predstavlja sveobuhvatan pregled stručnih i znanstvenih spoznaja o kontroli kakvoće i regulatornim zahtjevima za fitopreparate koji sadrže ginko, a koji imaju regulatorni status lijeka ili dodatka prehrani u Republici Hrvatskoj.

Nadležno tijelo za lijekove u Republici Hrvatskoj i Europskoj uniji su Agencija za lijekove i medicinske proizvode i Europska agencija za lijekove, a za dodatke prehrani Ministarstvo zdravstva RH te Europska agencija za sigurnost hrane.

Biljni lijekovi koji sadrže ginko mogu se registrirati u EU kao lijekovi za koje je dostupna cjelovita dokumentacija, lijekovi s provjerenom medicinskom uporabom ili tradicionalni biljni lijekovi. U RH stavljeno je u promet šest lijekova iz prve kategorije sa standardiziranim ginkovim ekstraktom u dozama 40, 80 i 120 mg. Cjelokupni postupak utvrđen je Zakonom o lijekovima, a kontrola kakvoće provodi se prema utvrđenim postupcima Europske farmakopeje. Djelatnu tvar predstavlja suhi ginkov ekstrakt, rafiniran i kvantificiran, u kojem propisani udio flavonoida iznosi 22-27%, bilobalida 2,6-3,2%, ginkolida A,B i C 2,8-3,4%, a ginkolnih kiselina može biti najviše 5 ppm.

Sastav, označavanje i stavljanje u promet dodataka prehrani u RH regulirano je Pravilnikom o dodacima prehrani, kao drugim i relevantnim zakonima i pravilnicima. Dozvoljeno je korištenje standardiziranog ekstrakta ginkovih listova u najvećoj dnevnoj dozi od 80 mg, s najviše 5 ppm ginkolnih kiselina. Budući da su dodaci prehrani regulirani zakonodavstvom o hrani, njihova kontrola kakvoće prvenstveno se odnosi na zdravstvenu ispravnost. Za razliku od biljnih lijekova, dodaci prehrani s ginkom imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja, ali nisu namijenjeni liječenju bolesti.

Krivotvorenje fitopreparata s ginkom je važan problem, posebice unutar dodataka prehrani koji prije stavljanja u promet ne prolaze rigorozne postupke provjere poput biljnih lijekova. Akreditirana HPLC metoda analize flavonoida ginka (AOAC 2006.07), kojom se određuje, ne samo ukupni udio flavonoida već i omjeri njihovih pojedinačnih udjela karakterističnih za ginko, omogućuje utvrđivanje krivotvorenih ginkovih ekstrakata.

Iako nije propisano zakonskom regulativom, i dodatke prehrane s ginkom trebalo bi, po uzoru na biljne lijekove, podvrgavati zahtjevnijim ispitivanjima kakvoće i sigurnosti prije stavljanja u promet, postrožiti nadzor te prijavljivati neželjene učinke iz prakse.

6. LITERATURA

1. HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products). Assessment report on *Ginkgo biloba* L., folium. European Medicines Agency; 2014, str. 1-120.
2. WHO (World Health Organization). WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 1. World Health Organization; 1999, str. 154-167.
3. Del Tredici P. The evolution, ecology, and cultivation of *Ginkgo biloba*. U: van Beek TA. ur. *Ginkgo biloba*. Harwood Academic Publishers; 2000, str. 7-23.
4. Godet J-D. Drveće i grmlje. Arboris Verlag; 1998, str. 168-169.
5. Samuelsson G, Bohlin L. Drugs of natural origin. Apotekarsocieteten; 2009, str. 423-426.
6. Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Medpharm; 2004, str. 251-254.
7. Defeudis VF, Drieu K. In vitro studies of the pharmacological and biochemical activities of *Ginkgo biloba* extract (EGB 761) and its constituents. U: van Beek TA, ur. *Ginkgo biloba.* Harwood Academic Publishers, 2006;279-301.
8. Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matheis RJ, Noskinm O, Richards JS, Schoenberger NE. *Ginkgo biloba* extract: Mechanisms and clinical indications. Arch Phys Med Rehabil 2000;81:668-978.
9. Gail B. Mahady. *Ginkgo biloba*: A rewiev of quality, safety and efficasy. Nutr Clin Care 2001;4:140-147.
10. Mahadevan S, Park V. Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: Chemistry, efficacy, safety, and uses. J Food Sci 2008;73, Nr. 1,
11. HALMED (Agencija za lijekove i medicinske proizvode): Baza lijekova
    Dostupno na: http://www.halmed.hr/?ln=hr&w=lijekovi. Pristupljeno 1. listopada 2015.
12. Zakon o lijekovima
    Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1522.html.
    Pristupljeno 20. kolovoza 2016.
13. Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet
    Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_83_1802.html.
    Pristupljeno: 2. rujna 2016.
14. Europska unija: Uredbe, direktive i ostali akti
    Dostupno na: http://europa.eu/eu-law/decision-making/legal-acts/index_hr.htm
    Pristupljeno 17. kolovoza 2016.
15. Direktiva 2001/20/E
    Dostupno na: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2001_20/dir_2001_20_en.pdf. Pristupljeno 17. kolovoza 2016.
16. European Medicines Agency: European Union herbal monographs
    Dostupno na:
    http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000212.jsp&mid=WC0b01ac058003380a. Pristupljeno 30. kolovoza 2016.
17. HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products). European Union herbal monograph on *Ginkgo biloba* L., folium. European Medicines Agency; 2014; str. 1-8.

18. Ministarstvo zdravstva (MZ): Dodaci prehrani
Dostupno na:
http://www.zdravlje.hr/ministarstvo/djelokrug/uprava_za_unaprjedenje_zdravstva/hrana/dodaci_prehrani Pristupljeno: 5. rujna 2016.

19. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA): Registar pitanja
Dostupno na:
http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/ListOfQuestionsNoLogin?5.
Pristupljeno: 15. rujna 2016.

20. Zakon o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima
Dostupno na:http://www.zakon.hr/z/576/Zakon-o-prehrambenim-i-zdravstvenim-tvrdnjama-te-hrani-oboga%C4%87enoj-nutrijentima Pristupljeno: 15. studenog 2016.

21. Pravilnik o dodacima prehrani
Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_10_126_2740.html
Pristupljeno: 15. studenog 2016.

22. Pravilnik o uvjetima za uvrštavanje u program monitoringa i provođenje programa monitoringa dodataka prehrani, hrane kojoj su dodani vitamini, minerali i druge tvari i hrane s prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama
Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_83_1804.html
Pristupljeno: 15. studenog 2016.

23. Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno
Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_12_160_3359.html
Pristupljeno 15. studenog 2016.

24. Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno
Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_12_160_3359.html
Pristupljeno 15. studenog 2016.

25. Pravilnik o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama
Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_07_84_2402.html
Pristupljeno: 15. studenog 2016.

26. Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o dodacima prehrani
Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_41_777.html
Pristupljeno: 19. studenog 2016.

27. Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama
Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_42_804.html
Pristupljeno 19. studenog 2016.

28. HALMED (Agencija za lijekove i medicinske proizvode): Farmakovigilancija
Dostupno na: http://www.halmed.hr/Farmakovigilancija/Sto-je-farmakovigilancija/
Pristupljeno 19. studenog 2016.

29. Vujić M, Pollak L. Composition, labelling, and safety of food supplements based on bee products in the legislative framework of the European Union – Croatian experiences. Arh Hig Rada Toksikol 2015;66:243-249.

30. Christen Y, Maixent JM. What is *Ginkgo biloba* extract EGb 761? An overview-from molecular biology to clinical medicine. Cell Mol Biol 2002;48:601-611.
31. European Medicines Agency: Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations 1 in herbal medicinal products 2 /traditional herbal medicinal products Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003272.pdf Pristupljeno 19. studenog 2016.
32. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines). European Pharmacopoeia 8.0. Council of Europe, 2014.
33. HALMED. Hrvatska farmakopeja 2007 s komentarima. Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2007.
34. Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ): Služba za zdravstvenu ekologiju Dostupno na: http://www.hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-zdravstvenu-ekologiju/. Pristupljeno 30. rujna 2016.
35. Papić J. Ginko u dodacima prehrani. In Pharma 2009;1:2-7.
36. Van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. J Chromatogr A 2009;1216:2002-2032.
37. Liu XG, Wu SQ, Li P, Yang H. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in *Ginkgo biloba*. J Pharm Biomed Anal 2015;113:212-125.
38. Dean Gray, Kerri LeVanseler, Meide Pan i sur. Evaluation of a Method to Determine Flavonol Aglycones in Ginkgo bilobaDietary Supplement Crude Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography, JAOAC Int 2007;90:43-53.
39. Adulteration Stifles the Ginkgo Biloba Market Dostupno na: https://www.naturalproductsinsider.com/articles/2008/10/adulteration-stifles-the-ginkgo-biloba-market.asp Pristupljeno 2. veljače 2017.
40. Godišnji izvještaj sanitarne inspekcije u području sigurnosti hrane 2013. Dostupno na: https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/Tekstovi razni/Godišnji izvještaj sanitarne inspekcije u području sigurnosti hrane 2013.godine.pdf. Pristupljeno 19. studenog 2016.
41. Godišnji izvještaj o radu sanitarne inspekcije u području sigurnosti hrane 2015. Dostupno na: https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/Tekstovi razni/Godišnji izvještaj sanitarne inspekcije u području sigurnosti hrane 2013.godine.pdf Pristupljeno 2. veljače 2017.