

Sadržaj i sastav eteričnog ulja u komercijalnim uzorcima kamilice (*Matricaria recutita* L.)

Job, Ines

Professional thesis / Završni specijalistički

2022

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:163:418729>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ines Job

SADRŽAJ I SASTAV ETERIČNOG ULJA
U KOMERCIJALNIM UZORCIMA KAMILICE
(Matricaria recutita L.)

Specijalistički rad

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ines Job

SADRŽAJ I SASTAV ETERIČNOG ULJA
U KOMERCIJALNIM UZORCIMA KAMILICE
(*Matricaria recutita* L.)

Specijalistički rad

Zagreb, 2022.

PSS studij: Fitofarmacija s dijetoterapijom

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Biljana Blažeković, mag. pharm.

Specijalistički rad obranjen je dana 26. rujna 2022. godine, na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. Izv. prof. dr. sc. Biljana Blažeković, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. Dr. sc. Josipa Cvek, znanstvena suradnica, HALMED

Rad ima 66 listova.

PREDGOVOR

Specijalistički rad na poslijediplomskom specijalističkom studiju „Fitofarmacija s dijetoterapijom“ prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljana Blažeković, mag. pharm. na Zavodu za farmakognoziju. Eksperimentalni dio rada proveden je na istoimenom Zavodu.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Biljani Blažeković, mag. pharm. na savjetima i pomoći oko izbora teme, planiranja i provedbe eksperimentalnog dijela te oblikovanja ovog specijalističkog rada. Također, zahvaljujem se voditeljici specijalističkog studija, prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na organizaciji studija.

SAŽETAK

Kamilica je jedna od najduže poznatih i najcjenjenijih ljekovitih biljaka, a među širokim spektrom farmakološki i klinički dokazanih učinaka posebno se ističe primjena zbog protuupalnih i spazmolitičkih svojstava. Terapijski učinak cvjetova uglavnom se pripisuje flavonoidima i sastavnicama eteričnog ulja pa je i farmaceutska kakvoća droge *Matricariae flos* prema Europskoj farmakopeji definirana njihovim sadržajem. Dosadašnja istraživanja ukazala su da je sadržaj i sastav eteričnog ulja kamilice vrlo promjenjiv i da na njih utječe veći broj čimbenika, pa se uslijed velike popularnosti nameće pitanje kakvoće komercijalno dostupnih fitopreparata kamilice. S obzirom na široku primjenu kamilice u obliku najdostupnijeg čaja i njihov veliki izbor na hrvatskom tržištu kao i razlike s obzirom na oblik, proizvođače, porijeklo, regulatorni status i mjesto kupovine, cilj ovog specijalističkog rada bio je prikupiti komercijalno dostupne uzorke kamiličinog čaja i provesti određivanje sadržaja i sastava eteričnog ulja kao važnih pokazatelja kakvoće i njome uvjetovane djelotvornosti droge.

Rezultati fitokemijskih istraživanja ukazali su na značajne razlike u sadržaju eteričnog ulja u kamiličinom cvijetu s tržišta, koji su se kretali u rasponu od 0,7 mL do 5,0 mL eteričnog ulja/kg biljne droge. Samo su tri uzorka droge *Matricariae flos in toto* udovoljavala farmakopejskom zahtjevu za sadržajem najmanje 4 mL/kg eteričnog ulja što ukazuje da velika većina kamiličinog cvijeta dostupnog na hrvatskom tržištu nije farmaceutske kakvoće. Metodom plinske kromatografije spregnute s tandemskom spektrometrijom masa (GC-MS/MS) odijeljeno je i identificirano 37 sastavnica kamiličinog eteričnog ulja. Glavne sastavnice su oksidirani sesviterpenski spojevi α -bisabolol oksid A (13,5-41,9 %) i α -bisabolol oksid B (7,0–31,8 %). Ostale značajnije zastupljene sastavnice su *cis*-spiroeter (4,5 – 18,0 %) i α -bisabolon oksid A (6,2–12,2 %) te *trans*- β -farnezen (0,8–6,5 %) i kamazulen (0,6 – 5,8 %).

Usporedna analiza pokazala je da uzorci cjelovitog cvijeta općenito sadrže eterično ulje ujednačenijeg sastava u odnosu na usitnjen cvijet prisutan na tržištu u obliku filter vrećica kod kojih su uočene veće razlike u sadržaju dviju glavnih sastavnica. Eterično ulje iz kamiličinog cvijeta *in toto* sadržavalo je između 27,2 % i 41,9 % α -bisabolol oksida A, α -bisabolol oksida B u rasponu od 21,1 % do 27,8 % te je bilo bogatije kamazulenom (3,1-5,8 %) u odnosu na eterično ulje kamilice iz filter vrećica (0,6-3,6 %). Rezultati provedene usporedne analize tržišnih uzoraka kamiličinog čaja upućuju na veću kvalitetu cvijeta kamilice *in toto* i samim time na nužnost korištenja tog oblika u ljekovite svrhe. Rad također ističe važnost i nužnost provođenja kontrole kakvoće biljnih droga i pripravaka kako bi se pacijentima osigurala primjena fitopreparata farmaceutske kvalitete što predstavlja imperativ suvremene, racionalne fitoterapije i pridonosi jačanju njihova povjerenja u fitoterapiju općenito.

SUMMARY

Chamomile is one of the longest known and most valued medicinal plants and among the wide range of pharmacologically and clinically proven effects, its use stands out due to its anti-inflammatory and antispasmodic properties. The therapeutic effect of chamomile flower is mainly attributed to the flavonoids and essential oil constituents, so the pharmaceutical quality of the herbal drug *Matricariae flos*, according to the European Pharmacopoeia, is defined by their contents. Previous research has shown that the content and composition of chamomile essential oil is very variable and is influenced by a number of factors, so due to its great popularity, the question of the quality of commercially available chamomile preparations arises. Given the wide use of chamomile in the form of the most available herbal tea and their large selection on the Croatian market as well as differences in relation to form, producers, origin, regulatory status, and place of purchase, the goal of this specialist thesis was to collect commercially available samples of chamomile tea and determine the content and composition of essential oil as important indicators of the quality and related effectiveness of the herbal drug.

Conducted phytochemical studies revealed significant differences between chamomile flowers from the market related to the content of essential oil, which were between 0.7 and 5.0 mL of essential oil per kg of herbal drug. Only three analysed samples of the herbal drug *Matricariae flos in toto* met the pharmacopoeial requirement of the content of at least 4 mL/kg of essential oil, indicating that the vast majority of chamomile herbal teas available on the Croatian market are not of pharmaceutical grade. Using the method of gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), 37 components of chamomile essential oil were separately identified. The main components are the oxidized sesquiterpene compounds α -bisabolol oxide A (13.5 – 41.9%) and α -bisabolol oxide B (7.0 – 31.8%). Other

significant ones are cis-spiroether (4.5 – 18.0%), α -bisabolon oxide A (6.2 – 12.2%), trans- β -farnesene (0.8 – 6.5%) and chamazulene (0.6 – 5.8%).

Comparative analysis showed that whole flower samples generally contain essential oil having more uniform composition compared to samples present on the market in the form of filter bags, where larger oscillations in the content of the two main components were observed. Essential oils of market samples of chamomile flowers *in toto* contained α -bisabolol oxide A in the range from 27.2% to 41.9%, and α -bisabolol oxide B from 21.1% to 27.8%, respectively. Also, those essential oils were richer in chamazulene (3.1 - 5.8%) compared to the chamomile essential oil from filter bags (0.6 - 3.6%). The results of the comparative analysis of market samples of chamomile tea point to the higher quality of the chamomile flower *in toto*, suggesting the necessity of using this form for medicinal purposes. The thesis also highlights the importance and necessity of quality control of herbal drugs and preparations in order to ensure the use of pharmaceutical-quality phytopreparations for patients, which represents the imperative of modern, rational phytotherapy and contributes to strengthening their trust in phytotherapy in general.

SADRŽAJ

PREDGOVOR	i
SAŽETAK	ii
SUMMARY	iv
SADRŽAJ	vi
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
<u>1.1. Fitoterapija i fitopreparati</u>	3
<u>1.1.1. Kakvoća – osnova djelotvornosti i sigurnosti fitopreparata</u>	4
<u>1.1.2. Regulatorni status i dostupnost fitopreparata</u>	7
<u>1.2. Kamilica (<i>Matricaria recutita</i> L.), kamiličin cvijet (<i>Matricariae flos</i>) i kamiličino eterično ulje (<i>Matricariae aetheroleum</i>)</u>	11
<u>1.2.1. Ljekovita biljna vrsta <i>Matricaria recutita</i> L. i njene zamjene</u>	11
<u>1.2.2. Ljekarničke droge <i>Matricariae flos</i> i <i>Matricariae aetheroleum</i></u>	12
<u>1.2.2.1. Fitokemijske sastavnice</u>	13
<u>1.2.2.2. Farmakopejske monografije</u>	15
<u>1.2.2.3. Neklinički i klinički dokazi djelotvornosti i sigurnosti</u>	22
<u>1.2.2.4. Primjena, indikacije i kontraindikacije</u>	27
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJAL I METODE	30
<u>3.1. Biljni materijal</u>	30
<u>3.2. Kemikalije, standardi, instrumenti i pribor</u>	33
<u>3.3. Metode</u>	34
<u>3.3.1. Priprema uzorka</u>	34
<u>3.3.2. Određivanje sadržaja eteričnog ulja</u>	34
<u>3.3.3. Identifikacija kamiličinog eteričnog ulja metodom tankoslojne kromatografije (TLC) ...</u>	35
<u>3.3.4. Analiza eteričnog ulja spregnutim sustavom plinski kromatograf – spektrometar masa (GC-MS/MS)</u>	36
4. REZULTATI I RASPRAVA	37
<u>4.1. Sadržaj eteričnog ulja u kamiličinom cvijetu</u>	37
<u>4.2. TLC karakterizacija eteričnog ulja iz komercijalnih uzoraka kamiličinog cvijeta</u>	42
<u>4.3. Kemijski sastav eteričnog ulja kamilice</u>	44
5. ZAKLJUČAK	53
6. LITERATURA	56
7. ŽIVOTOPIS	66

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Kamilica (*Matricaria recutita* L., Asteraceae) jedna je od najpopularnijih ljekovitih biljaka na svijetu, a primjena njenih cvjetnih glavica u medicinske svrhe datira još iz antičkog doba. Drevni grčki, egipatski i rimski medicinski tekstovi govore o primjeni kamilice u liječenju kožnih oboljenja poput eritema i kseroze (1). U svom preglednom radu pod nazivom „Kamilica: biljni lijek iz prošlosti sa svijetlom budućnošću“ Srivastava i sur. (2) objedinili su brojne zdravstvene tegobe koje se širom svijeta tradicionalno liječe kamilicom, od različitih upalnih, infektivnih i dr. promjena na koži i sluznici (rana, čireva, ekcema, iritacija, modrica, opekлина, pelenskog osipa, ispucalih bradavica, vodenih kozica, afti, konjunktivitisa, hemoroida, mastitisa i dr.), preko raznih gastrointestinalnih smetnji uključujući nadutost, probavne smetnje, grčeve, proljev, anoreksiju, mučninu i povraćanje do neuroloških tegoba poput nemira, tjeskobe i nesanice.



Slika 1. Kamilica (Matricaria recutita L.) (4)

Iskustvene spoznaje o ljekovitosti biljne droge *Matricariae flos* potakle su i usmjerile brojna znanstvena istraživanja *in vivo* i *in vitro* kojima su utvrđena njena protuupalna, antimikrobna, antioksidativna, spazmolitička, antiulkusna i sedativna svojstva te protektivno djelovanje protiv niza oboljenja, a pozitivni rezultati prekliničkih istraživanja utrli su put napretku prema kontroliranim kliničkim studijama (1, 2). Europska agencija za lijekove danas preporuča primjenu kamiličnih cvjetova oralno za liječenje blažih gastrointestinalnih tegoba, inhalacijski kod simptoma prehlade te lokalno za liječenje manjih čireva, rana i upala kože, usne šupljine i grla te kod nadražaja kože i sluznice genitalnog i analnog područja (3). Njihov blagotovorni učinak po ljudsko zdravlje zasniva se na sadržaju eteričnog ulja bogatog seskviterpenskim sastavnicama (α -bisabolol i bisabolol oksidi A i B, matricin/kamazulen) te fenolnih spojeva iz skupina flavonoida, fenolnih kiselina i kumarina, koji svi zajedno doprinose širokom spektru terapijske djelotvornosti droge (5). Osim medicinske, kamilični cvjetovi imaju primjenu i u prehrambenoj industriji, a služe i za dobivanje eteričnog ulja koje se naveliko koristi u aromaterapiji te parfemskoj i kozmetičkoj industriji. Zbog rastućeg komercijalnog interesa potražnja za kamiličnim cvijetom i njezinim uljem na međunarodnom tržištu stalno raste tako da je kamilica danas ekonomski vrlo značajna kultura i naveliko se uzgaja diljem Europe, ali i u drugim dijelovima svijeta (1,5). Porijeklo biljnog materijala uvelike određuje njegovu kakvoću, a farmaceutska uporaba kamiličnih cvjetova i postizanje optimalnog terapijskog djelovanja predmnijeva udovoljavanje farmakopejskim zahtjevima za sadržajem eteričnog ulja i flavonoida apigenin 7-glukozida (6). Danas na hrvatskom tržištu, i to ne samo u ljekarnama i biljnim ljekarnama već i u prodavaonicama zdrave hrane, supermarketima i na tržnicama, nalazimo širok izbor čajeva kamilice različitih oblika, proizvođača, porijekla i regulatornog statusa. S obzirom da je poznato da na sadržaj terapijskih sastavnica, posebice eteričnog ulja, utječe niz različitih čimbenika te je on vrlo

promjenjiv, velika potražnja i laka dostupnost čaja kamilice kao najpopularijeg ljekovitog oblika nameće pitanje kakvoće komercijalno dostupnih proizvoda.

1.1. Fitoterapija i fitopreparati

Fitoterapija je područje medicine u kojem se koriste biljke i biljni organi te biljni ekstrakti za prevenciju i liječenje određenih stanja i bolesti (7).

Najraniji zapis o upotrebi biljaka u liječenju bolesti pronađen je u Kini i datira iz 3000. god. pr. Kr. Brojni su narodi kroz povijest koristili biljke za unapređenje zdravlja i liječenje bolesti stoga se fitoterapija smatra najdrevnijim oblikom liječenja, a njeni temeljni principi primjenjuju se i danas (8,9). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, fitoterapija ima nezaobilazno mjesto u primarnoj zdravstvenoj zaštiti ljudi. Temelji fitoterapije postavljeni su na empirijskim spoznajama prikupljenim i prenošenim generacijama tijekom niza stoljeća, a danas se provode brojna znanstvena istraživanja s ciljem razumijevanja mehanizama djelovanja aktivnih sastavnica ljekovitih biljaka (8,10). Tako razlikujemo tradicionalnu primjenu ljekovitih biljaka koja je temeljena na iskustvu dugotrajne uporabe istih te racionalnu fitoterapiju temeljenu na znanstvenim, kliničkim dokazima (11). Tradicionalni medicinski sustavi poput antropozofske medicine, naturopatske medicine, tradicionalne kineske medicine i Ajurvedske medicine za liječenje najčešće koriste cijele biljke ili njihove dijelove u terapijske svrhe. S druge strane, zapadnjačka se fitoterapija oslanja na primjenu standardiziranih biljnih droga i ekstrakata odnosno biljnih preparata poznatog kemijskog sastava i sadržaja djelatnih sastavnica te propisane farmaceutske kakvoće koji pokazuju o dozi ovisan terapijski učinak, a poznata su i njihova neželjena djelovanja, kontraindikacije i interakcije, pa su kao takvi sastavni dio suvremene medicine (7,12). Sa regulatornog aspekta, prema Direktivi 2001/83/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. studenog 2001. o Zakoniku Zajednice koji se odnosi na lijekove za primjenu kod ljudi i s njom usklađenog hrvatskog Zakona o lijekovima (13) biljni lijekovi (fitopreparati) su oni

ljekoviti proizvodi koji sadrže djelatne tvari isključivo biljnog porijekla, tj. jednu ili više biljnih droga, jedan ili više biljnih pripravaka ili njihovu mješavinu. Biljne tvari (biljne droge) su cjelovite ili usitnjene biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi ili gljive u osušenom, rjeđe svježem obliku i neobrađene izlučine biljaka. Biljni pripravci se dobivaju iz biljnih droga usitnjavanjem, ekstrakcijom, destilacijom, fracioniranjem, pročišćavanjem, ukoncentriravanjem, fermentacijom ili tještenjem. Obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne droge, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka (14).

Djelatne tvari u fitopreparatima najčešće podrazumijevaju više različitih kemijskih spojeva koji mogu djelovati sinergistički zbog čega biljna droga odnosno njen pripravak često pokazuje bolje djelovanje i ima manji rizik od neželjenih učinaka u odnosu na ekvivalentnu količinu izolirane sastavnice (12).

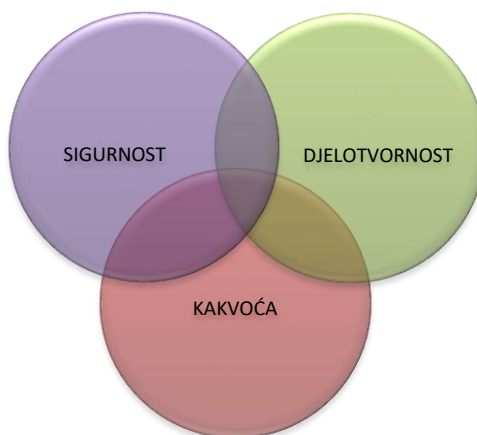
U medicinskoj primjeni ljekovitih biljaka u 21. stoljeću naglasak se stavlja na kvalitetne, standardizirane fitopreparate, koji sadrže definiranu, ujednačenu količinu ljekovitih sastavnica, te se njihov terapijski potencijal potvrđuje kliničkim ispitivanjima, a time raste i potreba za uspostavom sustava farmakovigilancije koji će doprinijeti unapređenju regulatornih okvira za fitopreparate (15).

1.1.1. Kakvoća – osnova djelotvornosti i sigurnosti fitopreparata

Duga tradicija primjene biljnih preparata podrazumijeva njihovu sigurnost i učinkovitost, no samo su za manji broj ljekovitih biljaka dostupni dostatni podaci o sigurnosti primjene i mehanizmima djelovanja biljnih proizvoda dobiveni znanstvenim ispitivanjima. Dok su moderna farmakološka ispitivanja ljekovitih biljaka uglavnom usmjerena na istraživanje pojedinačnih, izoliranih biljnih spojeva, rjeđe i standardiziranih biljnih ekstrakata, farmakognoške studije često se provode u svrhu utvrđivanja opravdanosti tradicionalne primjene biljnih droga i pripravaka i otkrivanje njihovih novih terapijskih svojstava kao i fitokemijskih sastavnica odgovornih za djelovanje (16). Napretkom u znanosti i tehnologiji

unazad nekoliko desetljeća omogućena je proizvodnja visokokvalitetnih fitopreparata, a prihvaćanje fitoterapije kao „prirodne i blage alternative“ sintetskim lijekovima vrlo je rašireno među općom populacijom u razvijenim zemljama. Za razliku od sintetskih lijekova, biljni pripravci predstavljaju kompleksne, višekomponentne mješavine i mehanizam djelovanja im vrlo često nije potpuno razjašnjen (9, 17). Iz tog razloga njihovom primjenom povećava se i mogućnost pojave interakcija i nuspojava (18). Do pojave štetnih učinaka također može doći uslijed zamjene sa otrovnim biljkama ili upotrebom neodgovarajućih biljnih dijelova, zbog pogreške u doziranju i načinu primjene proizvoda, interakcije s drugim lijekovima te zbog kontaminacije biljnog materijala teškim metalima, pesticidima, patogenim mikroorganizmima i mikotoksinima (17, 19). Polazišni biljni materijal koji se koristi za proizvodnju fitopreparata potječe iz uzgoja ili se dobiva sakupljanjem samoniklih biljaka iz prirode. Zbog utjecaja niza različitih unutarnjih i vanjskih čimbenika, od genetskih pa sve do geografskog položaja i uvjeta rasta te potencijalnih kontaminanata, kemijski sastav ljekovitih biljaka, a time i biljnih lijekova može biti vrlo promjenjiv (12, 17). Kako njihova proizvodnja uključuje specifične postupke koji nisu primjenjivi za sintetske lijekove, npr. skupljanje ili uzgoj biljne sirovine, proizvodnju i karakterizaciju ekstrakta, uslijed razlika u kemijskom sastavu ishodnog biljnog materijala i različitih postupaka proizvodnje među proizvođačima moguće su značajne razlike u kakvoći krajnjeg fitopreparata dostupnog na tržištu. U cilju osiguravanja kakvoće biljnih droga i biljnih lijekova uspostavljen je znatan broj međunarodnih smjernica i regulatornih zahtjeva od strane Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) i Povjerenstva za biljne lijekove pri Europskoj agenciji za lijekove (engl. *Committee for Herbal Medicinal Products of the European Medicines Agency*, HMPC/EMA), koji postavljaju standarde za biljne droge i biljne lijekove, kao što su Smjernice o dobroj poljoprivredi i sakupljačkoj praksi (engl. *Good Agricultural and Collection Practices*, GACP) za ishodišni materijal biljnog porijekla, Smjernice o dobroj

proizvođačkoj praksi (engl. *Good Manufacturing Practice* GMP) za biljne lijekove
Smjernice dobre laboratorijske prakse (engl. *Good Laboratory Practice*, GLP) i dr. (9,20).



Slika 2. Kakvoća fitopreparata temelj je njihove sigurne i učinkovite primjene u suvremenoj, racionalnoj fitoterapiji

Da bi se osigurala ujednačena i dosljedna kakvoća fitopreparata, provodi se postupak standardizacije biljne sirovine. Aktivne tvari biljnih lijekova često su kompleksne smjese fitokemijskih sastavnica. Fitopreparati također vrlo često sadrže kombinacije dviju ili više biljnih droga što dodatno komplicira pitanje kakvoće i sadržaja kemijskih sastavnica te otežava standardizaciju. Ograničen broj biljnih droga i biljnih pripravaka sadrži sastavnice za koje je poznato da pridonose njihovom terapijskom učinku i definirane su kao „sastavnice sa poznatim terapijskim učinkom“. No za većinu biljnih tvari/pripravaka te sastavnice nisu poznate pa je ponekad određenim sastavnicama ili grupi sastavnica pripisana terapijska aktivnost, iako nisu odgovorne za puni terapijski učinak. Takve tvari korisne su u ispitivanju kakvoće i nazivaju se aktivnim markerima. Kada nisu poznate sastavnice sa terapijskim učinkom, za identifikaciju i kvantifikaciju fitopreparata koriste se analitički markeri (20).

U Europskoj farmakopeji, njezinom trenutno važećem 10. izdanju, nalazimo 327 monografija biljnih droga i biljnih pripravaka s propisanim zahtjevima kakvoće koji obuhvaćaju postupke identifikacije, ispitivanja čistoće i određivanje sadržaja fitokemijskih sastavnica i služe kao

temelj u kontroli kakvoće. Farmaceutska kakvoća biljne droge i biljnog pripravka predmnijeva udovoljavanje svim zahtjevima navedenim u općoj i specifičnoj farmakopejskoj monografiji. Kakvoća fitopreparata ima izravan utjecaj na njihovu sigurnost i učinkovitost, a sigurnosni problemi kao i nedjelotvornost, s kojim se sve više susrećemo, posljedica su uglavnom nereguliranog, rastućeg tržišta na kojem nedostaje učinkovita kontrola kakvoće (12). Kako bi se osiguralo da fitopreparat koji se stavlja na tržište bude farmaceutske kakvoće nužno je tijekom cijelog procesa proizvodnje slijediti GACP, GMP i GLP smjernice i provoditi kontrolu kakvoće. Na taj se način također osigurava i sigurnost primjene samog fitopreparata što je u interesu svih nacionalnih zdravstvenih tijela.

1.1.2. Regulatorni status i dostupnost fitopreparata

Na tržištu Republike Hrvatske (RH) dostupni su brojni fitopreparati koji se klasificiraju kao biljni lijekovi/tradicionalni biljni lijekovi, dodaci prehrani, galenski pripravci, kozmetika, medicinski proizvodi ili hrana. Među njima prevladavaju dodaci prehrani koji su pod nadležnošću Ministarstva zdravstva i Ministarstva poljoprivrede RH, dok je za najstrože regulirane skupine biljnih lijekova i medicinskih proizvoda nadležna Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) i Europska agencija za lijekove (EMA). Dodaci prehrani, za razliku od biljnih lijekova, ne služe liječenju nego samo dodatno obogaćuju uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja pa se i postupak odobrenja za stavljanje u promet razlikuje. Tako su biljni lijekovi regulirani Zakonom o lijekovima, a dodaci prehrani zakonodavstvom o hrani, tj. Pravilnikom o dodacima prehrani i njihova se ispitavanja u najvećoj mjeri odnose na utvrđivanje zdravstvene ispravnosti (13, 21). Za razliku od biljnih lijekova, dodacima prehrani se ne dokazuje djelotvornost, a i praćenje nuspojava po stavljanju na tržište nije obvezno. Prema Zakonu o lijekovima „lijevak“ 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 kemijskog, ljudskoga, životinjskog ili biljnog podrijetla. „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 zakonom određene uvjete. „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 (13). Registracija tradicionalnog biljnog lijeka provodi se po pojednostavljenom postupku obzirom na sadržaj dokumentacije o sigurnosti primjene i djelotvornosti lijeka, no farmaceutska kakvoća mora biti propisano dokazana. Zakonom o lijekovima utvrđeni su postupak ispitivanja i stavljanja u promet, proizvodnja, označavanje, klasifikacija, promet, farmakovigilancija, oglašavanje i informiranje, nadzor nad lijekovima i provjera njihove kakvoće (13). Odobrenje za stavljanje lijekova u promet u Republici Hrvatskoj izdaje Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) na temelju prikupljenih rezultata farmaceutskih ispitivanja (fizikalno-kemijskih, bioloških i mikrobioloških ispitivanja) te izvješća o nekliničkim i kliničkim ispitivanjima. U postupku davanja i obnove odobrenja za stavljanje lijeka u promet Agencija kontrolira njegovu kakvoću, te se naknadno također provjerava kakvoća lijekova iz prometa, najmanje jednom u razdoblju važeće registracije od pet godina. Proizvođač lijeka zakonski je obavezan obavljati redovitu provjeru kakvoće svake

proizvedne serije lijeka (13). Provjeru kakvoće lijekova iz prometa može biti redovita i izvanredna, a provodi ih HALMED na zahtjev farmaceutske inspekcije Ministarstva zdravlja. Galenski pripravak je „liječnik izrađen u laboratoriju ljekarne ili u galenskom laboratoriju prema postupku izrade u važećoj farmakopeji ili prema standardnoj recepturi iz stručnih farmaceutskih priručnika te normama dobre prakse za galenske laboratorije“. Prema zakonskim propisima, njegovo stavljanje u promet ne zahtjeva odobrenje HALMED-a čime je znatno olakšan njihov dolazak na tržište. Od svih odredbi Zakona o lijekovima, na galenske pripravke se odnose samo one o kakvoći, prema kojima je sama zdravstvena ustanova ili ljekarna koja je proizvela galenski pripravak dužna voditi očvidnik o obavljenoj provjeri njegove kakvoće (13). Hrana je zakonski definirana kao „svaka tvar ili proizvod prerađen, djelomično prerađen ili neprerađen, a namijenjen je konzumaciji ili se može opravdano očekivati da će ga ljudi konzumirati“ i pri tom „nije dopušteno stavljanje na tržište zdravstveno neispravnu hranu“ (Zakon o hrani) te se mora osigurati sljedivost u njenoj proizvodnji i prodaji. Provjera kakvoće prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani vrši se na zahtjev sanitarne inspekcije, no pritom se ne vrši potpuna kontrola kakvoće pripravka već se samo provjerava zdravstvena ispravnost koja obuhvaća određivanje teških metala i mikrobiološku čistoću, što ukazuje na to da njihova kakvoća nije rutinski regulirana. Medicinski proizvod je „proizvod koji se koristi radi postavljanja medicinske dijagnoze, sprječavanja, praćenja, liječenja ili ublažavanja bolesti te nadomještanja tjelesnog oštećenja ili nedostatka; ispitivanja, nadomještanja ili preinake anatomskih i fizioloških funkcija; primjene lijekova te kontrole začeca“, a njegova glavna namjena nije povezana s farmakološkim, metaboličkim i imunološkim djelovanjem, iako u svojoj funkciji može biti podpomognuto proizvodima koji djeluju na takav način. Da bi se medicinski proizvod mogao staviti na tržište mora zadovoljiti propisane zahtjeve prema Zakonu o lijekovima i medicinskim proizvodima, te njegova sukladnost mora biti utvrđena prema propisanom postupku, mora biti označen na propisan

način te upisan u očevidnik (13). Kozmetički proizvod, prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti predmeta široke potrošnje (22), je „svaka tvar ili pripravak namijenjen za stavljanje u doticaj s različitim dijelovima ljudskog tijela ili sa zubima i sluznicom usne šupljine i to isključivo ili pretežito radi njihova čišćenja, parfimiranja, zaštite i/ili održavanja u dobrom stanju, mijenjanja njihova izgleda i/ili korekcije tjelesnih mirisa“. Stavljanje kozmetičkog proizvoda na tržište prijavljuje se Ministarstvu zdravstva i pritom je potrebno dostaviti dokumentaciju koja sadrži niz podataka o kozmetičkom proizvodu uključujući i ocjenu ispravnosti kozmetičkog proizvoda. Sirovine i druge djelatne tvari koje se koriste u proizvodnji kozmetičkog proizvoda, ili su prijeko potrebne u tehnološkom procesu proizvodnje, u pogledu čistoće moraju odgovarati zahtjevima propisanim farmakopejom odnosno drugim propisima i kriterijima (22).



Slika 3. Raznolikost fitopreparata kamilice dostupnih na hrvatskom tržištu – u ljekarnama, specijaliziranim prodavaonicama organske hrane, drogerijama, supermarketima i gradskim tržnicama

1.2. Kamilica (*Matricaria recutita* L.), kamiličin cvijet (*Matricariae flos*) i kamiličino eterično ulje (*Matricariae aetheroleum*)

1.2.1. Ljekovita biljna vrsta *Matricaria recutita* L. i njene zamjene

Matricaria recutita L. (sin. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) je ljekovita biljka iz porodice glavočika (Asteraceae), poznata pod nazivima kamilica, prava kamilica ili njemačka kamilica. Ova jednogodišnja zeljasta biljka visoka je oko 60 (80) cm, ima vretenasto korijenje i uspravnu, razgranatu stabljiku s uskim, perasto razdijeljenim naizmjeničnim listovima. Na vrhu ogranka smještene su pojedinačne cvjetne glavice promjera 10-30 mm, građene od žutih, cjevastih cvjetova dugih 1,5-2,5 mm koji čine središnji dio, i bijelih, jezičastih, rubnih cvjetova dugih 6-11 mm koji ih okružuju. Cvjetište je čunjastog oblika, široko 6-8 mm i iznutra šuplje (23, 24, 25).



Slika 4. Kamilica u cvatu (a); cvjetna glavica (b); jezičasti cvjetić (c); cjevasti cvjetić (d); cvjetište (e); zupci/čaška cjevastih cvjetića (f), prašnici (g); tučak (h); sjeme (i); svježe ubrani cvjetovi (j) (preuzeto iz 24)

Plod je roška duga 0,8 -1 mm, široka oko 0,5 mm. Ravnog je i glatkog vanjskog dijela, dok je unutarnji dio podijeljen na pet rebara (24, 26). Suha čaška koja se nalazi na plodu glavočika, papus, najčešće je manja i u obliku krunice, a nerijetko nedostaje (26). Kamilica cvate tijekom cijelog ljeta, a cvjetne se glavice sabiru u lipnju i srpnju (2, 27). Biljka je široko rasprostranjena i uglavnom raste na europskim i azijskim područjima. Prilagodiva različitim tipovima tla i otporna na hladnoću, raste samoniklo uz obradive površine i livade, a zbog sve većih tržišnih potreba danas se intenzivno uzgaja u mnogim zemljama, uključujući Hrvatsku (24, 28).

Ova ljekovita biljka ponekad se zamjenjuje s biljkama roda *Anthemis*, a posebno treba biti oprezan da se izbjegne zamjena sa otrovnom vrstom *Anthemis cotula* L., koja ima odbojan miris. Također, zbog upotrebe sinonima *Anthemis*, *Chamomilla* i *Matricaria* nerijetko dolazi do nesporazuma prilikom botaničke identifikacije biljke (25). Na području Europe raste i rimska kamilica (*Chamaemelum nobile* (L.) All., sin. *Anthemis nobilis* L.) koja se često zamjenjuje s pravom kamilicom iako su joj cvjetne glavice znatno većih dimenzija (11, 30). U zemljama zapadne Europe rimska kamilica se u govoru naziva „kamilica“, a prava kamilica „njemačka kamilica“, što potencijalno može dovesti do nesporazuma. U zapadnoj Europi rimska kamilica se primjenjuje u iste medicinske svrhe, iako se kemijski sastav ovih dviju biljaka znatno razlikuje (2).

1.2.2. Ljekarničke droge *Matricariae flos* i *Matricariae aetheroleum*

Kamilica je izvor dviju ljekovitih droga, *Matricariae* (*Chamomillae*) *flos* i *Matricariae aetheroleum*. *Matricariae flos* je droga definirana kao osušene cvjetne glavice vrste *Matricaria recutita* L. (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) (6). Biljna droga *Matricariae aetheroleum* definirana je kao plavo eterično ulje dobiveno destilacijom vodenom parom iz svježih ili osušenih cvjetnih glavica ili cvjetnih vrhova vrste *Matricaria recutita* L.

(*Chamomilla recutita* L. Rauschert). Postoje 2 vrste kamilčinog eteričnog ulja koja su okarakterizirana kao ulje bogato bisabolol oksidima ili ulje bogato (-)- α -bisabololom (6).

Cvat i eterično ulje koji se koriste u medicinske svrhe dobivaju se od samoniklih biljaka ili danas najvećim dijelom od kultiviranih. Monografije ovih droga u Europskoj farmakopeji definiraju čimbenike i zahtjeve kakvoće te se koriste u kontroli kakvoće droga, dok monografije Europske agencije za lijekove donose pregled znanstvenih podataka o kemijskom sastavu, nekliničkim i kliničkim učincima kao i sigurnosti primjene droga te mogu poslužiti u pripremi dokumentacije za registraciju biljnih lijekova.

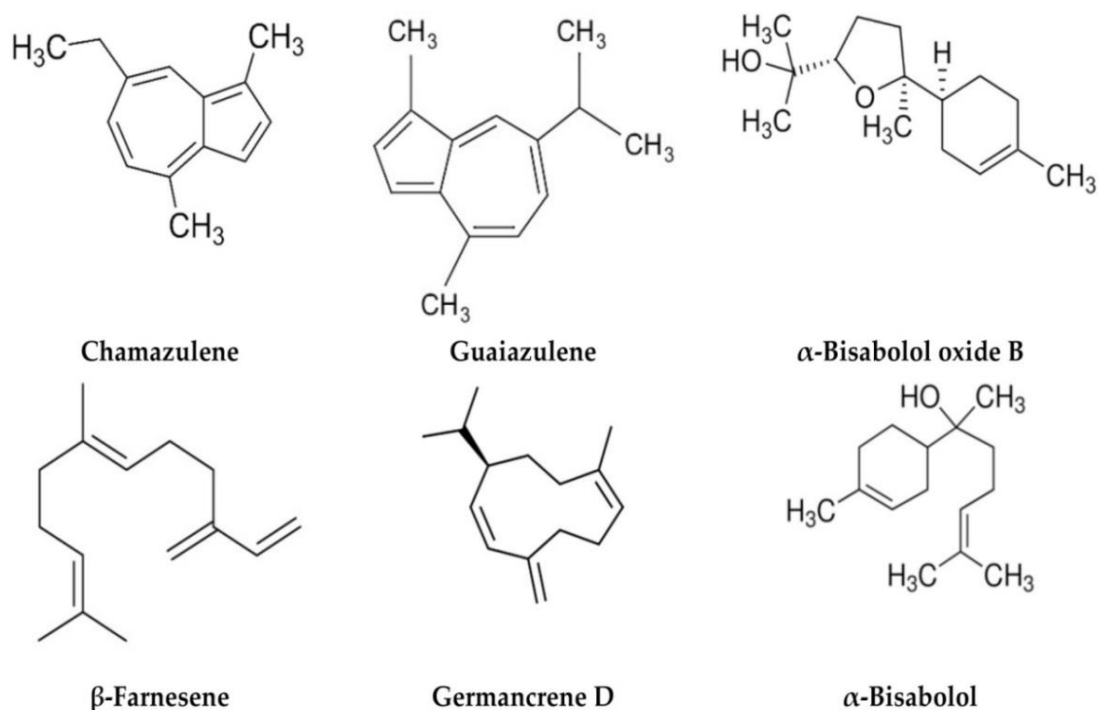
1.2.2.1. Fitokemijske sastavnice

Farmakološki učinci kamilice najvećim se dijelom pripisuju sadržaju eteričnog ulja i flavonoida. Eterično ulje je smjesa lakohlapljivih biljnih sekundarnih metabolita koji pokazuju različite biološke učinke. Među sastavnicama najzastupljeniji su spojevi terpenске strukture te aromatski i alifatski ugljikovodici. Općenito, u eteričnim uljima nalazimo manji broj sastavnica (jedna, dvije ili tri) sadržanih u većem postotku (20 – 95 %) dok su ostale prisutne u manjim udjelima (31).

Prema Europskoj farmakopeji, farmaceutska kakvoća biljne droge *Matricariae flos* uvjetovana je sadržajem najmanje 4 mL/kg eteričnog ulja (0,4 %) i 0,25 % apigenin 7-glukozida (6).

Infuz kamilčinih cvjetova, kao najčešće primjenjivani oblik ove biljne droge, sadrži 10-16 % eteričnog ulja iz cvijeta (32). Eterično ulje je plave boje zbog prisutnosti kamazulena koji nastaje tijekom destilacije iz bezbojnog proazulena matricina. Udio eteričnog ulja u kamilčinom cvijetu je vrlo promjenjiv i kreće se u širokom rasponu od 0,3 % do 1,9 % (33, 34). Kvaliteta eteričnog ulja često se vizualno može procijeniti na osnovu boje koja ukazuje na prisutnost kamazulena pa se ulje tamnije plave boje smatra i kvalitetnijim (35). Kemijski sastav eteričnog ulja kamilice karakterizira sadržaj seskviterpenskih spojeva, poput (-)- α -bisabolola, bisabolol oksida A, bisabolol oksida B, bisabolon oksid, (E)- β -farnezena,

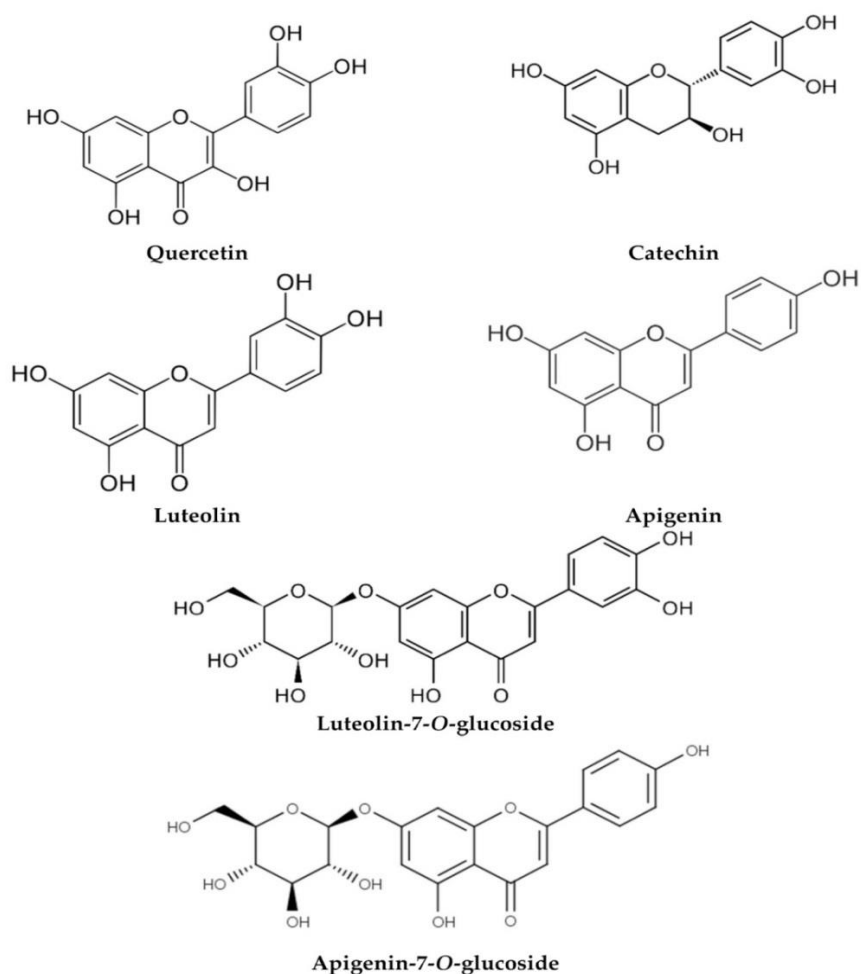
kamazulena, gvajazulena, germankrena (Slika 5) te poliacetilenskih spojeva (spiroetera) koji postoje u dvije izomerne forme, trans-(Z) i cis-(E)-en-in-dicikloeter. Također, detektirani su i monoterpeni poput limonena, (Z)- β -ocimena, γ -terpinena i artemizia ketona (28, 32, 33, 36). Cvjetovi rimske kamilice, koji se često zamjenjuju s pravom (njemačkom) kamilicom, sadrže eterično ulje bogato neterpenskim esterima anđelike kiseline i seskviterpenske laktone poput karakterističnog nobilina i 3-epinobilina (2).



Slika 5. Terpenske sastavnice kamiličinog eteričnog ulja (preuzeto iz 4)

Na sam kemijski sastav, kao i na sadržaj eteričnog ulja utječe veći broj čimbenika kao što su geografsko porijeklo i okolišni čimbenici (34, 37), genetski čimbenici (38), biljne sorte i uvjeti uzgoja, tehnike sušenja, korišteni biljni organ kao i metode izolacije (39, 40). Sastavni dio farmakopejske monografije droge *Matricariae aetheroleum* je i kemijski profil ljekarničke droge određen sadržajem (6). Eterično ulje, osim zbog antibakterijskog i antifungalnog djelovanja, koristi i kao blagi sedativ te kod gastričkih tegoba. Također, široko se koristi u proizvodnji parfema, kozmetike i u aromaterpijske svrhe te u prehrambenoj industriji (25). Uz

eterično ulje, za ljekovitost kamiličnih cvjetova odgovorni su i fenolni spojevi iz skupina flavonoida, fenolnih kiselina i kumarina (5). Udio fenolnih spojeva je također promjenjiv i iznosi do 6 %, a najznačajniji flavonoid je apigenin-7-glukozid pored kojeg nalazimo još i apigenin, luteolin, kvrecetin, rutin, apigetrin i dr. (2, 3, 23, 37). Droga također sadrži kumarine herniarin i umbeliferon. Od ostalih sastavnica u kamiličinom cvijetu prisutni su šećeri, lipidi, aminokiseline, fitosteroli i minerali (3, 23, 41).



Slika 6. Polifenolne sastavnice kamiličinog cvijeta (preuzeto iz 4)

1.2.2.2. Farmakopejske monografije

Monografija biljne droge u Europskoj farmakopeji propisuje standarde kakvoće. Da bi droga *Matricariae flos* bila farmakopejske kakvoće, osim zahtjevima identifikacije i čistoće, mora

udovoljavati i onima za sadržajem ljekovitih tvari - eteričnog ulja i flavonoida apigenin-7-glukozida. Za očuvanje kakvoće droge važno je osigurati pravilno pakiranje i skladištenje kako ne bi došlo do gubitka lakohlapljivog eteričnog ulja (42). Monografija droge *Matricariae aetheroleum* služi kao osnova u ispitivanju kakvoće eteričnog ulja, navodeći zahtjeve za identifikaciju i određivanje kromatografskog profila s definiranim rasponima sadržaja najznačajnijih sastavnica. U nastavku su dani hrvatski prijevodi farmakopejskih monografija kamiličnih droga (6).

07/2019:0404

KAMILIČIN CVIJET

Matricariae flos

DEFINICIJA

Osušene cvjetne glavice vrste *Matricaria recutita* L. (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert).

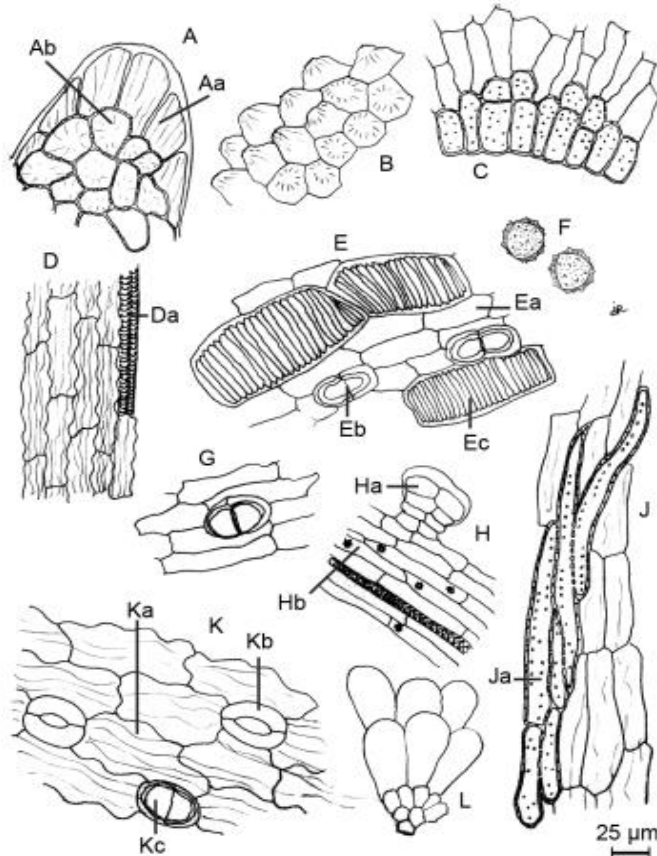
Sadržaj:

- plavo eterično ulje: minimalno 4 mL/kg (suha droga);
- ukupni apigenin 7-glukozid (C₂₁H₂₀O₁₀; Mr 432.4): najmanje 0,25 % (suha droga).

IDENTIFIKACIJA

- A. Kad se rašire, cvjetne glavice su sastavljene od ovoja sastavljenog od mnogobrojnih ovojnih listića, poslaganih u jedan do tri reda; izduženo – stožasto cvjetno, ponekad polukuglasto (kod mladih glavica); 12 – 20 rubnih jezičastih cvjetića s bijelim jezičcem; nekoliko desetaka žutih središnjih cjevastih cvjetića. Ovojni palistići su jajoliki ili suličasti sa smečkastosivim suhokožičavim rubom. Cvjetno je šuplje, bez pljeve. Osnovica cvjetnog vjenčića jezičastih cvjetića je smečkastožuta cijev koja se proširuje u obliku bijelog produženo jajolikog jezičca. Podrasla plodnica je tamnosmeđa, jajolika ili kuglasta i sadrži dugačak tučkov vrat i dvocjepnu njušku. Cjevasti cvjetići su žuti i imaju peterostruko nazubljenu cijev cvjetnog vjenčića, pet singenezijskih, epipetalnih prašnika i ginecej sličan onom od jezičastih cvjetića.
- B. Mikroskopski pregled (2.8.23). Prašak je lagan, svijetlo žućkastosmeđi. Ispituje se pod mikroskopom pomoću otopine kloralhidrata R. Prašak pokazuje sljedeće dijagnostičke karakteristike (slika 0404.-1): dijelove vanjske epiderme ovojnih listića (površinski prikaz [K]), koji na rubovima sadrže stanice tankih stijenki koje su prekrivene blago izbrazdanom kutikulom [Ka], anomocitične puči (2.8.3.) [Kb] i ponegdje dvoredne žljezdane dlake [Kc], središnje područje [J] sastavljeno od izduženih sklereida s umjereno zadebljalom i kanaliziranom stijenkom [Ja]; dijelove unutarnje epiderme cvjetnog vjenčića jezičastih cvjetova koji se sastoje od blago bradavičastih, mnogokutnih stanica tankih stijenki [B]; dijelove vanjske epiderme jezičastih cvjetova koji se sastoje od izveruganih stanica prekrivenih izbrazdanom kutikulom [D], ispod kojih se često nalaze uske traheje [Da]; dijelove s vrha reznja cvjetnog vjenčića jezičastih cvjetića [A] s izduženim stanicama na rubu [Aa] i blago bradavičastim stanicama [Ab]; dvoredne žljezdane dlake s kratkom drškom (jedan ili dva reda s po dvije stanice) i s glavom od dva do tri reda s po

dvije stanice na epidermi cvjetnih vjenčića na obje vrste cvjetova, na palistiću ovojnog listića i na plodnici (površinski prikaz [Eb, G, Kc], bočni prikaz [Ha]); dijelove osnovice cvijeta u kojoj je smještena plodnica s prstenom očvrslulih stanica debelih stijenki [C]; dijelove epiderme s površine plodnice (površinski prikaz [E]) koji se sastoje od tankih, uzdužno produljenih stanica [Ea], naizmjenice s brojnim žljezdanim dlakama [Eb] i velikim, izduženim stanicama ispunjenim sluzi u poprečno preklopljenim slojevima [Ec]; dijelove epiderme plodnice (bočni prikaz [H]), koji nose žljezdane dlake [Ha] ispod kojih se nalaze parenhimske stanice s malim nakupinama kristala kalcijevog oksalata [Hb]; grupe stanica s vrha njuški tučaka stvaraju izdužene bradavice [L]; kuglasta ili trokutasta peludna zrnca, promjera oko 25 µm, s tri pore i bodljikavom eksinom [F].



Slika 0404.-1. – Slikovni prikaz praška kamiličinog cvijeta u svrhu identifikacije B

C. Tankoslojna kromatografija (TLC) (2.2.27)

Ispitivana otopina. 50 µL eteričnog ulja dobivenog kod određivanja sadržaja eteričnog ulja razrijedi se u 1 ml ksilena R.

Poredbena otopina. 2 µL kamazulena R, 5 µL (-)-α-bisabolola R i 10 mg bornil acetata R razrijedi se u 5 ml toluena R.

Ploča: TLC silika gel ploča R.

Pokretna faza: etil acetat R, toluen R (5:95 V/V).

Nanošenje: 10 µL, kao linije.

Razvijanje: u visini do 10 cm.

Sušenje: na zraku.

Detekcija: poprska se otopinom anisaldehyda R i grije 5-10 min na 100-105 °C; odmah se promatra na dnevnom svjetlu.

Rezultati: vidjeti dolje slijed zona prisutnih u kromatogramu poredbene i ispitivane otopine (u kromatogramu ispitivane otopine mogu još biti prisutne i druge zone)

Vrh ploče	
Kamazulen: crvena ili crvenkasto-ljubičasta zona	1 ili 2 plave ili plavkasto-ljubičaste zone Crvena ili crvenkasto-ljubičasta zona (kamazulen)
Bornil acetat: žućkasto-smeđa zona	Smeđa zona (en-in-dicikloeter)
(-)- α -Bisabolol: crveno-ljubičasta ili plavo-ljubičasta zona	Crveno-ljubičasta ili plavo-ljubičasta zona ((-)- α -bisabolol)
Poredbena otopina	Ispitivana otopina

ISPITIVANJA

Izlomljena droga: najviše 25 %, određeno na 20,0 g, prolazi kroz sito (710) (2.9.12).

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

Ukupan pepeo (2.4.16): najviše 13,0 %.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Eterično ulje (2.8.12). Uzme se 30 g cijele biljne droge, tikvica volumena 1000 ml, 500 ml vode R kao destilacijske tekućine i 0,50 ml ksilena R u graduiranu cijev. Destiliraa se 4 sata brzinom od 3-4 ml/min. Pred kraj procesa zaustavi se protok vode u hladilu, ali se destilacija nastavi sve dok plave, s parom hlapljive sastavnice ne dođu do donjeg dijela kondenzacijskog sklopa. Nakon toga se odmah ponovno pusti voda u hladilo kako bi se spriječilo zagrijavanje. Deset minuta nakon toga destilacija se zaustavi.

Ukupan apigenin-7-glukozid. Tekućinska kromatografija (2.2.29).

Smjesa otapala: mobilna faza B, mobilna faza A (25:75 V/V).

Ispitivana otopina. 40 g biljne droge usitni se u prašak (500) (2.9.12). 2,00 g praškaste biljne droge stavi se tikvicu okruglog dna, volumena 500 ml. Doda se 200 ml 96 %-tnog etanola R. Smjesa se grije 15 minuta na vodenoj kupelji pod povratnim hladilom. Ohladi se i filtrira. Filtar i ostatak isperu se s nekoliko mililitara etanola R. U filtrat se doda 10 ml svježe priređene razrijeđene otopine natrijevog hidrosida R. Smjesa se grije oko 1 h na vodenoj kupelji pod povratnim hladilom. Ohladi se. Etanolom (96 %) R razrijedi se do 250,0 ml. U 50,0 ml ove otopine doda se 0,5 g citratne kiseline hidratat R. Mućka se 5 min i filtrira. 5,0 ml ove otopine razrijedi se smjesom otapala do 10,0 ml.

Poredbena otopina (a). 10,0 mg apigenin-7-glukozida CRS otopi se u 100,0 ml metanola R. 25,0 ml ove otopine razrijedi se smjesom otapala do 200,0 ml.

Poredbena otopina (b). 10,0 mg 5,7-dihidroksi-4-metilkumarina R otopi se u 100,0 ml metanola R. 25,0 ml ove otopine razrijedi se smjesom otapala do 100,0 ml. U 4,0 ml ove otopine doda se 4,0 ml poredbene otopine (a) i razrijedi smjesom otapala do 10,0 ml.

Predkolona:

- *veličina:* l = 8 mm, Φ = 4,6 mm;
- *nepokretna faza:* oktadecilsilililikagel za kromatografiju R (5 μ m).

Kolona:

- veličina: $l = 0.25$ m, $\Phi = 4.6$ mm;
- nepokretna faza: oktadecilsilil silikagel za kromatografiju R (5 μ m).

Mobilna faza:

- pokretna faza A: 0,5 % V/V otopina fosfatne kiseline R;
- pokretna faza B: fosfatna kiselina R, acetonitril R (0.5:99.5 V/V);

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (postotak V/V)	Pokretna faza B (postotak V/V)
0 – 9	75	25
9 – 19	75 → 25	25 → 75
19 – 24	25	75

Brzina protoka: 1 mL/min.

Detekcija: spektrofotometar na 340 nm.

Injektiranje: 20 μ l.

Prikladnost sustava: poredbena otopina (b):

- razlučivanje: najmanje 1,8 između vrhova koji odgovaraju apigenin-7-glukozidu i 5,7-dihidroksi-4-metilkumarinu.

Izračuna se postotak sadržaja ukupnog apigenin-7-glukozida pomoću sljedećeg izraza:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,625}{A_2 \times m_1}$$

A_1 = površina vrha koji odgovara apigenin-7-glukozidu u kromatogramu ispitivane otopine;

A_2 = površina vrha koji odgovara apigenin-7-glukozidu u kromatogramu poredbene otopine (a);

m_1 = masa ispitivane biljne droge korištene za pripremu ispitivane otopine, u gramima;

m_2 = masa *apigenin-7-glukozida CRS* korištenog za pripremu poredbene otopine (a), u gramima;

p = postotak sadržaja apigenin-7-glukozida u *apigenin-7-glukozidu CRS*

01/2008:1836

KAMILIČINO ETERIČNO ULJE

Matricariae aetheroleum

DEFINICIJA

Plavo eterično ulje dobiveno destilacijom vodenom parom iz svježih ili sušenih cvjetnih glavica ili cvjetnih vrhova *Matricaria recutita* L. (*Chamomilla recutita* L. Rauschert). Postoje 2 tipa kamiličina ulja koja su karakterizirana kao bogata bisabolol oksidima ili bogata (-)- α -bisabololom.

KARAKTERISTIKE

Izgled: bistra, intenzivno plava, viskozna tekućina.

Intenzivnog karakterističnog mirisa.

IDENTIFIKACIJA

Prva identifikacija: B.

Druga identifikacija: A.

A. Tankoslojna kromatografija (2.2.27).

Ispitivana otopina. 20 μ L eteričnog ulja razrijedi se u 1,0 mL toluena R.

Poredbena otopina. 2 mg gvajazulena R, 5 μ L (-)- α -bisabolola R i 10 mg bornil acetata R razrijedi se u 5,0 mL toluena R.

Ploča: TLC silika gel ploča R.

Pokretna faza: etilacetat R, toluen R (5:95 V/V).



Nanošenje: 10 μ L, kao linije.

Razvijanje: u visini do 10 cm.

Sušenje: na zraku.

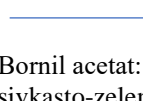
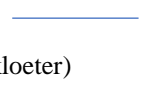
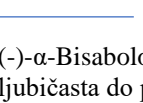
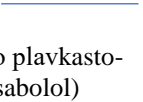
Detekcija A: promatranje na dnevnom svjetlu.

Rezultati A: vidjeti dolje naveden slijed zona prisutnih u kromatogramu poredbene i ispitivane otopine.

Vrh ploče	
Gvajazulen: plava zona 	Plava zona (kamazulen) 
Poredbena otopina	Ispitivana otopina

Detekcija B: poprska se otopinom anisaldehida R i grije 5-10 min na 100 – 105 °C. Odmah se promatra na dnevnom svjetlu.

Rezultati B: vidjeti dolje naveden slijed zona prisutnih u kromatogramu poredbene i ispitivane otopine. Nadalje, u kromatogramu ispitivane otopine mogu biti prisutne zone poput žuto-smeđe do zeleno-žute zone (donja trećina), ljubičaste zone (donja trećina) i druge zone slabog intenziteta.

Vrh ploče	
Gvajazulen: crvena do crvenkasto-ljubičasta zona 	1 ili 2 plave do plavo-ljubičaste zone Crvena do crvenkasto-ljubičasta zona (kamazulen) 
Bornil acetat: žućkasto-smeđa do sivkasto-zelena zona 	Smeđa zona (en-in-dicikloeter) 
(-)- α -Bisabolol: crvenkasto-ljubičasta do plavkasto-ljubičasta zona	Crvenkasto-ljubičasta do plavkasto-ljubičasta zona ((-)- α -bisabolol) Smeđa zona
Poredbena otopina	Ispitivana otopina

B. Usporedba kromatograma dobivenih u ispitivanju kromatografskog profila.

Rezultati: karakteristični pikovi (-)- α -bisabolola i kamazulena u kromatogramu ispitivane otopine slični su po vremenu zadržavanja s vrhovima u kromatogramu poredbene otopinom.

ISPITIVANJA

Kromatografski profil. Plinska kromatografija (2.2.28): upotrijebiti normalizacijsku proceduru.

Ispitivana otopina. 20 μ L eteričnog ulja razrijedi se u 5,0 ml cikloheksana R.

Poredbena otopina. 20 μ L (-)- α -bisabolola R, 5 mg kamazulena R i 6 mg gvajazulena R razrijedi se u 5,0 ml cikloheksana R.

Kolona:

- *materijal:* stopljeni silicijev dioksid

- *veličina*: $l = 30$ m (može se primijeniti film debljine $1 \mu\text{m}$) do 60 m (može se primijeniti debljina filma od $0.2 \mu\text{m}$), $\Phi = 0.25 - 0.53$ mm, pri upotrebi kolone duže od 30 m može se prilagoditi temperaturni program,
- *nepokretna faza*: makrogol 20 000 R

Plin nosač: helij za kromatografiju R

Brzina protoka: $1 - 2$ mL/min

Omjer razdjeljivanja uzorka: $1:100$.

Temperatura:

	Vrijeme (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Kolona	0 – 40	$70 \rightarrow 230$
	40 – 50	230
Injektor		250
Detektor		250

Detekcija: plamena ionizacija.

Injektiranje: $1,0 \mu\text{L}$.

Slijed eluiranja: redoslijed prema sastavu poredbene otopine. Zabilježi vrijeme zadržavanja supstanci poredbene otopine.

Relativno zadržavanje u odnosu na kamazulen (vrijeme zadržavanja = oko 34.4 min); β -farnesen = oko 0.5 ; bisabolol oksid B = oko 0.8 ; bisabolon = oko 0.87 ; $(-)\text{-}\alpha$ -bisabolol = oko 0.9 ; bisabolol oksid A = oko 1.02 .

Prikladnost sustava: poredbena otopina:

- *razlučivanje*: minimalno 1.5 između vrhova kamazulena i gvjazulena.

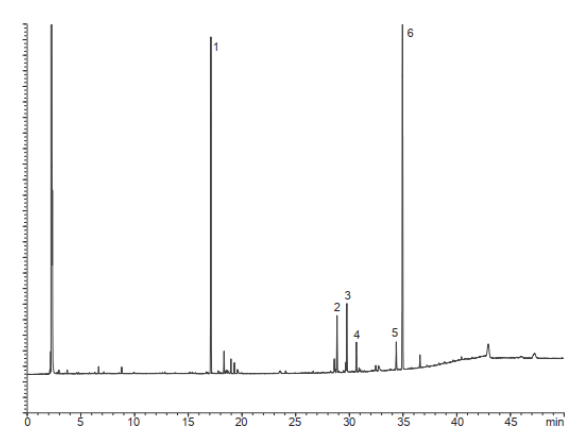
Koristeći vremena zadržavanja određena iz kromatograma poredbene otopine, odredi $(-)\text{-}\alpha$ -bisabolol i kamazulen u kromatogramu ispitivane otopine; odredi bisabolol okside (bisabolol oksid B, bisabolon i bisabolol oksid A) koristeći slike 1836.-1 i 1836.-2 (zanemariti vrh cikloheksana). Kromatogram ispitivane otopine ne sadrži vrh s vremenom zadržavanja gvjazulena.

Odrediti postotni udio komponenata u uzorku. Granice su unutar sljedećeg raspona.

	Kamiličino ulje bogato bisabolol oksidima (%)	Kamiličino ulje bogato $(-)\text{-}\alpha$ -bisabololom (%)
Bisabolol oksidi	$29 - 81$	
$(-)\text{-}\alpha$ -bisabolol		$10 - 65$
Kamazulen	≥ 1.0	≥ 1.0
Ukupni bisabolol oksidi i $(-)\text{-}\alpha$ -bisabolol		≥ 20

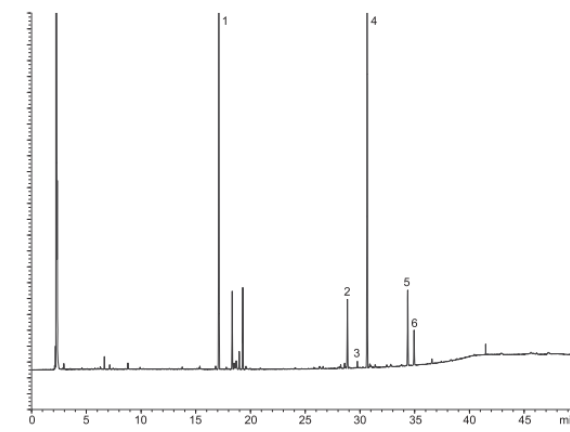
ČUVANJE

Na temperaturi do 25°C .



1. β -farnesene
2. bisabolol oxide B
3. bisabolone
4. $(-)\text{-}\alpha$ -bisabolol
5. chamazulene
6. bisabolol oxide A

Figure 1836.-1. – Chromatogram of matricaria oil rich in bisabolol oxides



1. β -farnesene
2. bisabolol oxide B
3. bisabolone
4. $(-)\text{-}\alpha$ -bisabolol
5. chamazulene
6. bisabolol oxide A

Figure 1836.-2. – Chromatogram of matricaria oil rich in $(-)\text{-}\alpha$ -bisabolol

1.2.2.3. Neklinički i klinički dokazi djelotvornosti i sigurnosti

Kamilica se kao ljekovita biljka koristi već stotinama godina, a njena tradicionalna primjena zasniiva se na protuupalnom, spazmolitičkom i antiseptičkom učinku (2, 25). Brojne nekliničke studije pokazale su da pripravci kamilice i njezine sastavnice posjeduju različite biološke i farmakološke učinke, govoreći u prilog tradicionalnoj primjeni cvijeta kamilice. Znanstveno su mu dokazana protuupalna, baktericidna, anksiolitična, antimutagena, antidijabetička i protutumorska svojstva, sposobnost snižavanja kolesterola i cijeljenja rana (43).

Proveden je niz ispitivanja antimikrobnog učinka cvijeta kamilice kojima je potvrđena značajna aktivnost eteričnog ulja na rast patogenih mikroorganizama (44). U recentnim studijama ispitivan je sinergistički učinak kamilice i drugih antimikrobnih agenasa s ciljem nadvladavanja mehanizama rezistencije mikroorganizama na konvencionalnu terapiju. U ispitivanju provedenom s kompleksom vodenog ekstrakta kamilice i nanočestica srebra potvrđen je njihov sinergistički učinak na 4 soja bakterija pri čemu je kompleks ekstrakta-srebro pokazao pet puta snažniji antimikrobni učinak u odnosu na same nanočestice srebra (45). Göger i sur. (46) ispitali su *in vitro* sinergistički učinak eteričnog ulja kamilice i standardnih antimikrobnih lijekova (ampicilina, cefuroksima, tetraciklina, flukonazola i nistatina) na patogene mikroorganizme te citotoksični učinak tih kombinacija. Ustanovili su da eterično ulje u kombinaciji s flukonazolom i nistatinom pokazuje značajan sinergistički i aditivni inhibitorni učinak na gljivicu *Candida albicans*. Nadalje, kombinacije s antibioticima također su sinergistički djelovale na većinu izoliranih sojeva *Staphylococcus aureus*. Navedene kombinacije nisu pokazale citotoksični učinak pri antimikrobnim koncentracijama.

Protuupalni učinak eteričnog ulja kamilice temelji se na inhibiciji aktivnosti enzima lipooksigenaze. Inhibitorno djelovanje dokazano je pri koncentraciji od 0,5 µg/mL, dok je pri

koncentraciji od 5 $\mu\text{g/mL}$ eterično ulje snažno induciralo aktivnost enzima što se pripisuje prisutnosti poliacetilenskih spojeva za koje je poznato da izazivaju iritacije na koži (47). Na animalnom modelu lokalne upale potaknute karagenanom kao proupalnim agensom dokazano je da kamilično eterično ulje bogato bisabolol oksidima pokazuje o dozi-ovisno antihiperalgezijsko i antiedematozno djelovanje usporedivo s ibuprofenom i indometacinom (48). Zahvaljujući inhibitornom djelovanju na lipooksigenazu te protuupalnom učinku do kojeg dolazi zbog smanjenja citokina i upalnih procesa izazvanih dijabetesom tipa 1, novija istraživanja upućuju na povoljan učinak eteričnog ulja kamilice na životinje sa šećernom bolesti kao i sposobnost smanjenja razine glukoze u krvi (49). Ispitivanja na eksperimentalnom modelu pokazuju i da kamilica pozitivno utječe na kognitivne sposobnosti koje su posljedica neuroloških oštećenja u štakora s dijabetesom tipa 2 (50).

Blagotvorno djelovanje kamilice na kontrolu glikemije, kao i razinu serumskih lipida dokazano je i klinički, jednostruko slijepom, kontroliranom, randomiziranom studijom. Ispitivanje je provedeno na 64 osobe starosti između 30 i 60 godina koje su bolovale od dijabetesa tip 2. Ispitivana skupina ($n = 32$) uzimala je čaj od kamilice (3 g/150 mL vruće vode) 3 puta dnevno neposredno nakon obroka kroz 8 tjedana, dok je kontrolna grupa ($n = 32$) dobivala vodu. Kod ispitivane skupine utvrđeno je značajno smanjenje razine glikoliziranog hemoglobina (HbA1c), serumskog inzulina, ukupnog kolesterola, triglicerida i lipoproteina male gustoće (LDL) te homeostatskog modela procjene inzulinske rezistencije, u odnosu na kontrolnu skupinu (51). Još jedna novija klinička studija također potvrđuje pozitivan utjecaj kamilice na regulaciju razine šećera u krvi kao i serumskih lipida kod pacijenata s dijabetesom tipa 2, izvješćuju pri tom dodatno i o povoljnom utjecaju 4-erotjedne primjene čaja od kamilice na bubrežnu funkciju smanjenjem razine serumskog kreatinina (52).

Zahvaljujući antioksidativnom i antiapoptotičnom mehanizmu djelovanja na stanice štitnjače, etanolni ekstrakt kamilice blagotvorno je djelovao na hioptireoidizam kod štakora sa sindromom policističnih jajnika (53). Nadalje, dokazano je da oralno primjenjeni različiti ekstrakti kamilice djeluju antihipertenzivno preko ACE inhibicije zahvaljući flavonoidnim sastavnicama (54).

U prilog protuupalnom i analgetskom učinku fitopreparata kamilice govori i klinička studija koju su proveli Zargarani i sur. ispitujući učinak oleogela kamilice lokalno primjenjenog kod pacijenata s migrenom bez aure. U studiji koja je uključivala 100 pacijenata utvrđeno je značajno smanjenje boli, povraćanja, fotofobije i fonofobije 30 min nakon primjene oleogela s kamilicom, a učinak se pripisuje kamazulenu i apigeninu (55).

Vezano uz topičku primjenu ekstrakta cvijeta kamilice, postoji niz znanstvenih izvješća o blagotvornom učinku cvijeta kamilice na opekotine, rane, ekceme, čireve, te upale i iritaciju kože i sluznica (25, 43). Pripravci kamilice imaju vrlo mali potencijal za stvaranje iritacija na koži pa se s te strane smatraju sigurnima za primjenu i kod djece (56). Djelotvornost kamilice kod dermatitisa posebno je bila aktualna tema. Nekolicina pretkliničkih studija izvještava da topikalno primjenjen ekstrakt cvijeta kamilice doprinosi poboljšanju atopijskog dermatitisa sa posljedičnim smanjenjem serumskih vrijednosti IgE, IgG i histamina dokazujući tako njegov protuupalni i imunoregulirajući potencijal (57). Klinički je dokazano da gel od kamilice sprječava razvoj dermatitisa kod pacijenata na radioterapiji područja glave i vrata. Upotreba gela omogućila je kontinuiranu radioterapiju bez prekida zbog reakcija preosjetljivosti na koži (58). Također, ekstrakt kamilice u obliku kreme pokazao se učinkovit u tretiranju kožnih ekcema (59). Licari i sur. (60) su na području Italije proveli randomiziranu kliničku studiju ispitujući učinak topikalnih proizvoda s bisabololom kod atopijskog dermatitisa te dokazali poboljšanje stanja kože za 50 % kod 87 % ispitanice djece s kroničnim atopijskim

dermatitisom. Pozitivan učinak pokazao je i sam apigenin u miševa, reducirajući edem i smanjujući histopatološke promjene uslijed atopijskog dermatitisa, smanjujući transepitelni gubitak vode, prilagođavajući pH površine kože i povećavajući hidrataciju kornealnog sloja kože (61). Njegov protuupalni učinak, a posljedično i protutumorski, ustanovljen je na eksperimentalnim životinjama kod kojih je inducirana upala stanica kože UVB zračenjem, djelujući tako da inhibira UVB-induciranu ciklooksigenazu-2 (62). Nastavno na rečeno, klinički rezultati potvrđuju da topikalni liposomalni pripravak ekstrakta kamilice obogaćenog apigeninom djeluje protuupalno kod pacijenata s kontaktnim dermatitisom, pokazujući učinak usporediv s kortikosteroidima (63). Primjena vodenog ekstrakta kamiličinog cvijeta također je rezultirala smanjenjem područja rane, ubrzanjem epitelizacije kože i povećanjem sadržaja aminokiseline hidrokisprolina u oštećenom tkivu (64).

Primjena fitopreparata kamilice u području psihijatrije također je detaljno istražena pa je tako ispitana njihova učinkovitost kod anksioznih i depresivnih poremećaja, ali i kod promjena raspoloženja uvjetovanih hormonalnim promjenama ili stresom. Animalne studije upućuju na anksiolitičko djelovanje vodenootanolnog ekstrakta kamilice, usporedivo s referentnim diazepamom, te antidepresivno djelovanje usporedivo s referentnim tramadolom (65). Anksiolitički učinak kamilice istovjetan diazepamu potvrđuje i ispitivanje na životinjama koje je pokazalo da inhalacija eteričnog ulja kamilice značajno snižava razinu plazmatskog andrenokortikotropnog hormona povećanog stresom (66). U kliničkoj studiji koja je obuhvaćala 118 studentica ispitan je učinak kamilice na promjene raspoloženja u okviru predmenstrualnog sindroma. Ispitanice su podijeljene u dvije grupe, od kojih je jedna primala kapsule s kamilicom, a druga placebo u režimu po jedna kapsula svakih 8 sati u trajanju od 7 dana prije očekivane menstruacije. Kod tretirane skupine žena zapažen je značajniji učinak na promjene raspoloženja u odnosu na placebo skupinu te se ozbiljnost tog simptoma između dvije skupine značajno razlikovala što potvrđuje učinkovitost kamilice u olakšavanju

emocionalnih simptoma povezanih s menstrualnim ciklusom (67). Klinička učinkovitost ekstrakta kamilice kod pacijenata s generaliziranim anksioznim poremećajem sa ili bez pridružene depresije procijenjena je u randomiziranoj, dvostruko slijepoj, placebo kontroliranoj studiji na 179 osoba. Svakodnevna primjena 1500 mg ekstrakta kamilice tijekom 8 tjedana rezultirala je smanjenjem anksioznosti, a dokazan je i klinički značajan antidepressivni učinak u skupini s pridruženom depresijom (68). Provedena je meta analiza kojoj je cilj bio procijeniti učinkovitost i sigurnost primjene kamilice u tretiranju anksioznosti, generaliziranog anksioznog poremećaja, poremećaja spavanja i nesanice kod ljudi. Utvrđeno je značajno poboljšanje stanja kod pacijenata s poremećajem spavanja koji su prije spavanja konzumirali kamilicu u odnosu na placebo skupinu, no statistički značajnije razlike nije bilo kod pacijenata s generaliziranim anksioznim poremećajem i nesanicom. Poboljšanje simptoma generaliziranog anksioznog poremećaja primijećeno je nakon 2 do 4 tjedna primjene pripravka kamilice (69). Dosadašnje spoznaje upućuju na zaključak da se kamilica sa sigurnošću i s minimalnim rizikom od nuspojava može koristiti u terapiji depresije i anksioznosti kod pacijenata koji preferiraju biljne pripravke (70).

Pripravci kamilice također se primjenjuju i za olakšavanje simptoma blage do umjerene mučnine i povraćanja kod trudnica (71), no presječna studija upitnikom provedena prije 7 godina u Italiji sugerira da redovita primjena kamilice tijekom cijele trudnoće može rezultirati većim rizikom od preuranjenog poroda, smanjenjem porođajne mase i dužine novorođenčeta (72). Iako rezultati nisu dosegli statističku značajnost, vjerojatno zbog ograničenog broja ispitanica koje su koristile pripravke kamilice (56 od ukupno 600 intervjuiranih trudnica), autori navode da rezultati upućuju na kamilicu kao čimbenik rizika, osobito stoga što je studija obuhvaćala samo zdrave žene koje nisu uzimale konvencionalne lijekove tijekom fiziološke trudnoće, ne uključujući patološka stanja u trudnoći. Korištenje kamilice tijekom trudnoće obeshrabruju i podaci o njenom oksitocinskom i stimulirajućem djelovanju na

maternicu, što potencijalno može izazvati spontani pobačaj, kao i sposobnost uzrokovanja teške anafilaksije uslijed preosjetljivosti na kamilicu ili druge biljke iz porodice Asteraceae.

1.2.2.4. Primjena, indikacije i kontraindikacije

Kamiličin cvijet najčešće se koristi kao biljni čaj u cjelovitom (*in toto*) obliku ili usitnjen i pakiran u filter vrećice. Služi i za izradu ljekovitih pripravaka kao što su suhi i tekući ekstrakti. Fitopreparati droge *Matricariae flos* primjenjuju se najčešće u obliku najjednostavnijeg i najdostupnijeg infuza (čaja), koji se može uzimati oralno, koristiti za inhalaciju, lokalno primjenjivati na koži ili kao dodatak kupelji ili koristiti za ispiranje usne šupljine, ali i u obliku tekućih oralnih pripravaka te kao polukruti ljekoviti oblici (poput masti) na koži. Postoje i kombinirani fitopreparati koji osim kamiličnih cvjetova sadrže i druge ljekovite biljne droge (3).

Europska agencija za lijekove odobrila je nekoliko indikacija za upotrebu biljne droge *Matricariae flos* među kojima su simptomatsko liječenje tegoba probavnog sustava poput nadutosti i grčeva, olakšavanje simptoma prehlade, zacjeljivanje čireva i lezija manje površine u usnoj šupljini te tretiranje upale usne šupljine i grla, kao potporna terapija kod iritacija kože i sluznice anogenitalne regije te za tretiranje manjih upalnih procesa kože kao što su opekline od sunca i manje površinske ozljede (3). Primjena eteričnog ulja cvijeta kamilice indicirana je samo kao potpora liječenju iritacija kože i sluznice anogenitalne regije (36). Fitopreparate kamilice mogu koristiti odrasle osobe, adolescenti i djeca, a doze su detaljno propisane ovisno o obliku fitopreparata, dobi pacijenta i indikaciji za koju se koristi. Navedene indikacije odobrene su na osnovu tradicionalne primjene biljne droge u spomenutim stanjima što znači da je učinkovitost i sigurnost primjene dokazana uporabom droge unazad najmanje 30 godina, a od toga barem 15 godina u EU. Iako za pojedine indikacije postoje klinički dokazi, njihova razina još uvijek nije dostatna za registraciju pripravaka kao biljnog lijeka.

Glavna kontraindikacija primjene cvijeta i eteričnog ulja kamilice je alergija. Zabilježene su alergijske reakcije ozbiljnijeg karaktera prilikom konzumacije tekućeg pripravka cvijeta kamilice stoga se preparati ne preporučuju osobama alergičnim na kamilicu ili druge biljne vrste iz porodice Asteraceae. Također, upotreba kupke sa drogom *Matricariae flos* u slučaju težih dermatoloških oštećenja kao što su otvorene ili inficirane rane veće površine je zabranjena, potreban je i oprez kod peroralne primjene visokih doza raznih preparata cvijeta kamilice tijekom dužeg vremenskog perioda u pacijenata s transplatacijom bubrega u nedavnoj povijesti bolesti (3,36). Zadnjih godina provedeno je nekoliko ispitivanja sigurnosti primjene preparata kamilice u kombinaciji s određenim lijekovima te je tako dokazana i kontraindikacija primjene preparata kamilice kod pacijenata koji su na antikoagulantnoj terapiji zbog antikoagulacijskog i antiagregacijskog potencijala te biljne droge. Također, preparati kamilice mogu povećati rizik od kardiovaskularnih komplikacija kod primjene antiangiogenih lijekova poput bevacizumaba (70). Klinički značajne interakcije zabilježene su primjenom preparata kamilice i varfarina, statina, takrolimusa, ciklosporina i azatioprina (73).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Kamilica je vrlo popularna ljekovita biljka naših krajeva koja se najčešće koristi u obliku čaja pripremljenog od cvjetova *in toto* ili usitnjenih cvjetova pakiranih u filter vrećice. Terapijski potencijal ove biljne droge pripisuje se prvenstveno eteričnom ulju i flavonoidnim sastavnicama, a dosadašnje spoznaje upućuju na značajne varijabilnosti u njihovom sadržaju i sastavu. Uzevši u obzir dostupnost velikog broja čajeva kamilice na različitim maloprodajnim mjestima u Republici Hrvatskoj kao i činjenicu da se na tržište stavljaju u okviru različitih regulatornih skupina, cilj ovog rada bio je ispitati i usporediti njihovu kakvoću na temelju analize sadržaja i sastava eteričnog ulja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

U istraživanju su korišteni komercijalni uzorci čaja kamilice koji su na tržištu prisutni kao cjelovit kamilčin cvijet (*in toto* oblik) ili usitnjen i pakiran u filter vrećice. Sakupljeni su uzorci kamilice dostupni u ljekarnama, biljnim ljekarnama, specijaliziranim trgovinama organske hrane, drogerijama, supermarketima i na gradskim tržnicama u Republici Hrvatskoj tijekom 2019. godine. Ukupno su prikupljena 22 uzorka, a detaljni podaci o porijeklu i obliku analiziranih uzorka prikazani su u Tablicama 1 i 2.



Slika 7. Uzorci kamilčinog cvijeta dostupnog na hrvatskom tržištu u in toto obliku i u filter vrećicama

Tablica 1. Popis istraživanih uzoraka kamiličinog cvijeta u *in toto* obliku

Broj uzorka	Naziv uzorka	Masa uzorka	Zemlja porijekla	Maloprodajna poslovna jedinica	Klasa	Način upotrebe
1.	Kamilica (Matricariae flos)	30 g	np	ljekarna	galenski pripravak	2 velike žlice kamiličina cvijeta (3 g) prelijte s 250 ml vruće vode. Ostavite 10 minuta u pokrivenoj posudi. Povremeno promiješajte. Procijedite.
2.	Čaj cvijet kamilice	80g	Hrvatska	tržnica	hrana	1 žličicu preliti s 3 dl vruće vode, poklopiti 3 minute, procijediti i piti.
3.	Kamilica čaj	40 g	EU	specijalizirana trgovina organske hrane	dodatak prehrani	Jednu čajnu žličicu preliti s 2 dl vruće vode i ostaviti u pokrivenoj posudi 10 minuta, povremeno promiješati i procijediti. Dnevna doza 3 g (piti 3 puta dnevno).
4.	Kamilica cvijet	30 g	Hrvatska	trgovina	hrana	1 žlicu (oko 2 g) kamilice prelijte s 2 dl vruće vode i ostavite 10-15 minuta u pokrivenoj posudi uz povremeno miješanje. Procijedite.
5.	Kamilica cvijet	100g	np	trgovina	hrana	2 čajne žličice cvijeta kamilice preliti sa 6 dcl kipuće vode, ostaviti poklopljeno 5-7 minuta zatim procijediti. Piti 3 puta dnevno po 2 dcl čaja prije jela.
6.	Kamilica cvijet (Chamomillae flos)	30 g	Hrvatska	trgovina	hrana	1 žličicu čaja preliti s 2-3 dl kipuće vode i ostaviti poklopljeno stajati 5-10 minuta. Procijediti.
7.	Matricariae flos (kamilica cvijet)	500 g	np	ljekarna	galenski pripravak	n/p
8.	Kamilica cvijet	80 g	Hrvatska	tržnica	hrana	1 g čaja (jednu čajnu žlicu) prelijte s 2 dl kipuće vode i ostavite poklopljeno 15-20 minuta. Zatim čaj procijedite.
9.	Kamilica cvijet	40g	Hrvatska	ljekarna	dodatak prehrani	1 malu žličicu čaja preliti s 2 dl kipuće vode i ostaviti 30 minuta u pokrivenoj posudi. Piti svježe pripremljen čaj 1-2 puta dnevno
10.	Kamilica cvijet	100 g	Hrvatska	trgovina	hrana	1-2 čajne žličice cvijeta preliti s 2 dl kipuće vode, ostaviti poklopljeno 10-15 minuta, potom procijediti.
11.	Čaj kamilica cvijet	40 g	np	ljekarna	galenski pripravak	1 veliku žlicu cvijeta kamilice prelijte s 2 dl kipuće vode, nakon 10-15 minuta procijedite. Po želji zasladite. Čajni napitak pijte 3 puta na dan.

Tablica 2. Popis istraživanih uzoraka kamiličinog cvijeta u filter vrećicama

Broj uzorka	Naziv uzorka	Masa uzorka	Zemlja porijekla	Maloprodajna poslovna jedinica	Klasa	Način upotrebe
12.	Kamilica filter vrećica	40 g	Hrvatska	supermarket	hrana	Filter vrećicu prelići s 2-3 dl kipuće vode te šalicu poklopiti. Nakon 10 minuta izvaditi filter vrećicu.
13.	Camomile filter vrećica	37,5 g	Njemačka	supermarket	hrana	U šalicu (200 ml) staviti jednu filter vrećicu, prelići kipućom vodom i ostaviti 6 minuta.
14.	Kamilica čaj filter vrećica	20 g	Hrvatska	supermarket	hrana	Filter vrećicu prelijte s 2-3 dl kipuće vode i poklopite šalicu. Nakon 6-10 minuta izvadite filter vrećicu.
15.	Kamilica filter vrećica	40 g 40 x 1 g	Hrvatska	supermarket	hrana	Filter vrećicu prelići s 2 dl kipuće vode. Ostaviti stajati 5-8 minuta. Izvaditi filter vrećicu.
16.	Kamilica filter vrećica	30 g	Njemačka	drogerija	hrana	Prelići kipućom vodom i ostaviti da odstoji 5-10 minuta.
17.	Kamilica filter vrećica	30 g	Njemačka	drogerija	hrana	Po šalici jednu vrećicu zaliti sa svježom kipućom vodom i pustiti neka odstoji 5-6 minuta. Samo na taj način ćete dobiti zdravstveno ispravnu kamilicu.
18.	Kamilica filter vrećica	20 g	Hrvatska	supermarket	hrana	1 filter vrećicu prelijte s 2 dl vrele vode i ostavite 3-5 minuta.
19.	Čaj od kamilice filter vrećica	30 g	Hrvatska	specijalizirana trgovina organske hrane	hrana	Zakuhajte vodu dok ne proključa. Filter vrećicu prelići s 1,5 – 2 dl kipuće vode. Nakon 10 minuta izvaditi filter vrećicu.
20.	Kamilica čaj filter vrećica	40 g 40 x 1 g	Slovenija	supermarket	hrana	Filter vrećicu prelići s 200 ml kipuće vode. Nakon 5 minuta izvaditi filter vrećicu.
21.	Camomile filter vrećica	30 g	Poljska	supermarket	hrana	Jednu filter vrećicu staviti u šalicu i prelići kipućom vodom (200 ml). Ostaviti stajati 8-10 minuta.
22.	Kamilica filter vrećica	25 g	np	ljekarna	hrana	Filter vrećicu prelići s 2 dl kipuće vode, pustite da odstoji poklopljeno 5 min.

3.2. Kemikalije, standardi, instrumenti i pribor

Za potrebe svih ispitivanja korištene su kemikalije analitičkog stupnja čistoće. Sve otopine reagenasa i uzoraka svježe su pripravljene neposredno prije uporabe.

Kemikalije

- Anisaldehyd (Sigma, SAD)
- Bezvodni natrijev sulfat (Kemika, Zagreb)
- Etil acetat (Poch, Poljska)
- Heksan (Merck, Njemačka)
- Ksilen (Kemika, Zagreb)
- Toluen (T.T.T., Hrvatska)

Standardne supstancije

- Bornil acetat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Kamazulen (Fluka, Švicarska)
- (-)- α -bisabolol (Sigma-Aldrich, SAD)

Instrumenti i pribor

- Analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- Automatska jednokanalna pipeta podesivog volumena (Eppendorf, Njemačka)
- Aparatura za određivanje eteričnog ulja prema Ph. Eur.
- Grijača košara
- Kapilare za tankoslojnu kromatografiju (Hirschmann Laborgeräte, Njemačka)
- Komora za tankoslojnu kromatografiju (Camag, Švicarska)
- Plinski koromatograf (Agilent 7890B) vezan sa spektrometrom masa (Agilent 5977A, Agilent Technologies, SAD)

- Ploče za tankoslojnu kromatografiju TLC Kieselgel 60 F254 (Merck, Njemačka)

3.3. Metode

Eksperimentalni dio rada obuhvaćao je određivanje sadržaja i sastava eteričnog ulja u komercijalnim uzorcima kamilice i bio je usmjeren na kvalitativnu i kvantitativnu analizu terpenkih spojeva kao terapijski najznačajnijih sastavnica. U istraživanju su primijenjene metode propisane u odgovarajućim monografijama Europske farmakopeje (5).

3.3.1. Priprema uzorka

Svi uzorci cjelovitog kamiličinog cvijeta korišteni u ispitivanju podvrgnuti su organoleptičkom pregledu te su uklonjena eventualna onečišćenja i primjese. Kod uzoraka u obliku filter vrećica, sadržaj je objedinjen i homogeniziran.

3.3.2. Određivanje sadržaja eteričnog ulja

Sadržaj eteričnog ulja u komercijalnim uzorcima kamilice volumetrijski je određen metodom destilacije pomoću vodene pare prema postupku opisanom u Europskoj farmakopeji (5). Određivanje je provedeno upotrebom propisane aparature sastavljene od različitih staklenih dijelova (vertikalna cijev, hladilo, lijevak za punjenje vode, bočna cijev s ubrušenim čepom, graduirana cijev, trosmjerni pipac) koji su staljeni u jedinstven sklop, a sastavni dio aparature su i tikvica s okruglim dnom i kratkim grlom od brušenog stakla, stativ s držačima te termostatorana električna grijača košara.

30,0 g biljne droge preneseno je u tikvicu s okruglim dnom i ubrušenim grlom volumena 1000 mL, potom je dodano 500 mL destilirane vode i 0,50 mL ksilena te je sadržaj zagrijavan. Destilacija svakog uzorka je provedena u trajanju od 4 sata brzinom 3-4 ml/min. Pred kraj destilacijskog postupka zaustavljen je protok vode u hladilo, a destilacija je nastavljena sve dok plave kapljice eteričnog ulja nisu dosegle donji dio hladila. Potom je ponovno

uspostavljen protok vode u hladilo kako bi se spriječilo zagrijavanje područja odjeljivanja i nakon 10 minuta destilacija je zaustavljena. Po hlađenju aparature očitana je volumen izoliranog eteričnog ulja u mililitrima (mL). Rezultat je izražen u mililitrima eteričnog ulja na kilogram biljne droge. Analiza je provedena u triplikatu.

3.3.3. Identifikacija kamiličinog eteričnog ulja metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

Identifikacija kamiličinog eteričnog ulja i dokazivanje prisutnosti terpenkih sastavnica provedena je metodom tankoslojne kromatografije. Ispitivana otopina pripravljena je razrjeđivanjem 20 μ L eteričnog ulja u 1 mL toluena. Poredbena otopina pripravljena je razrjeđivanjem 2 μ L kamazulena R, 5 μ L (-)- α -bisabolola R i 10 mg bornil acetata R u 5 mL toluena R. Za odjeljivanje terpenkih sastavnica eteričnog ulja na tankom sloju silikagela korištena je smjesa etil acetata i toluena u propisanim volumnim omjerima (5:95 V/V). Detekcija je provedena prskanjem ploče otopinom anisaldehyda i grijanjem 5-10 minuta na 100 – 105 °C te promatranjem na dnevnom svjetlu (5).

3.3.4. Analiza eteričnog ulja spregnutim sustavom plinski kromatograf – spektrometar masa (GC-MS/MS)

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnog ulja izoliranog iz komercijalnih uzoraka kamilice provedena je metodom plinske kromatografije spregunte s tandemskom spektrometrijom masa (GC-MS/MS) korištenjem uređaja Agilent Technologies 7890B GC System / 5977A MSD. Uzorci za analizu pripremljeni su otapanjem 10 µL eteričnog ulja u heksanu i razrijeđenjem do 1,0 mL te je po 1 µL uzorka injektirano u split modu (1:50). Kao plin nositelj korišten je helij, uz protok 1 mL/min. Sastavnice eteričnog ulja odijeljene su u kapilarnoj koloni HP5ms (5% fenil-metilpolisiloksan) duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25 mm uz sljedeći temperaturni program: početna temperatura kolone 60 °C (1 min), zagrijavanje 3 °C/min do 200 °C te zadržavanje temperature kolone 10 min na 200 °C (74). Odijeljene sastavnice analizirane su na masenom spektrometru (EI 70 eV, m/z 40-400). Smjesa n-alkana od C-8 do C-20 analizirana je pod istim uvjetima. Obrada rezultata provedena je korištenjem računalnog paketa Agilent GC/MSD ChemStation verzija F.01.03. Sastavnice eteričnog ulja identificirane su usporedbom spektara masa u bazi NIST 14, Wiley 9, HPCH 2205 i Adams (85). Identifikacija je također provedena na temelju linearnog retencijskog indeksa (RI) koji je izračunat za svaku odijeljenu sastavnicu prema sljedećem izrazu:

$$RI = 100 \times C + 100 \frac{(t_R)_X - (t_R)_C}{(t_R)_{C+1} - (t_R)_C}$$

gdje je C broj C atoma n alkana, t_R retencijsko vrijeme za pojedinu sastavnicu, a X je komponenta za koju se računa retencijski indeks.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sadržaj eteričnog ulja u kamiličinom cvijetu

Sadržaj eteričnog ulja u uzorcima kamiličinog cvijeta dostupnog na hrvatskom tržištu određen je metom destilacije pomoću vodene pare. Analizirana su ukupno dvadeset dva uzorka, od toga jedanaest uzoraka droge komercijalno dostupne u *in toto* obliku i jedanaest uzoraka u obliku filter vrećica. Rezultati određivanja, izraženi u mL eteričnog ulja sadržanog u kilogramu droge, prikazani su u Tablici 3 kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju analiza.

Tablica 3. Sadržaj eteričnog ulja u komercijalnim uzorcima čaja kamilice

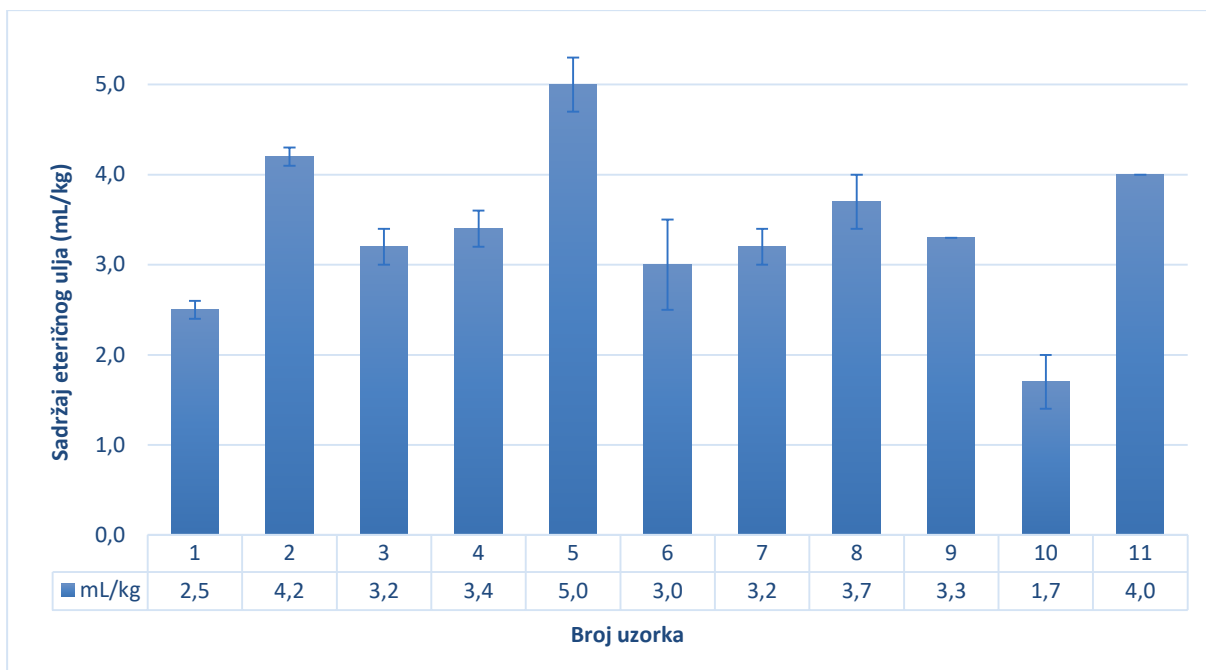
Broj uzorka	Rezultati određivanja (mL eteričnog ulja/ 30 g biljne droge)	Sadržaj eteričnog ulja (mL/kg)
1.	0,07 mL	2,5 \pm 0,1
	0,08 mL	
	0,07 mL	
2.	0,13 mL	4,2 \pm 0,1
	0,12 mL	
	0,13 mL	
3.	0,09 mL	3,2 \pm 0,2
	0,10 mL	
	0,10 mL	
4.	0,11 mL	3,4 \pm 0,2
	0,10 mL	
	0,10 mL	
5.	0,16 mL	5,0 \pm 0,3
	0,14 mL	
	0,15 mL	
6.	0,07 mL	3,0 \pm 0,5
	0,09 mL	
	0,11 mL	
7.	0,09 mL	3,2 \pm 0,2
	0,10 mL	
	0,10 mLg	
8.	0,11 mL	3,7 \pm 0,3
	0,12 mL	
	0,10 mL	

9.	0,10 mL	3,3 ± 0,0
	0,10 mL	
	0,10 mL	
10.	0,05 mL	1,7 ± 0,3
	0,06 mL	
	0,04 mL	
11.	0,12 mL	4,0 ± 0,0
	0,12 mL	
	0,12 mL	
12.	0,02 mL	0,8 ± 0,1
	0,04 mL	
	0,03 mL	
13.	0,02 mL	0,9 ± 0,3
	0,04 mL	
	0,04 mL	
14.	0,05 mL	1,4 ± 0,2
	0,06 mL	
	0,04 mL	
15.	0,03 mL	1,1 ± 0,2
	0,03 mL	
	0,04 mL	
16.	0,03 mL	0,7 ± 0,2
	0,03 mL	
	0,02 mL	
17.	0,03 mL	1,2 ± 0,2
	0,04 mL	
	0,04 mL	
18.	0,05 mL	1,8 ± 0,2
	0,06 mL	
	0,05 mL	
19.	0,07 mL	2,0 ± 0,1
	0,06 mL	
	0,06 mL	
20.	0,06 mL	1,7 ± 0,3
	0,04 mL	
	0,05 mL	
21.	0,04 mL	1,0 ± 0,3
	0,03 mL	
	0,02 mL	
22.	0,03 mL	0,7 ± 0,3
	0,01 mL	
	0,02 mL	

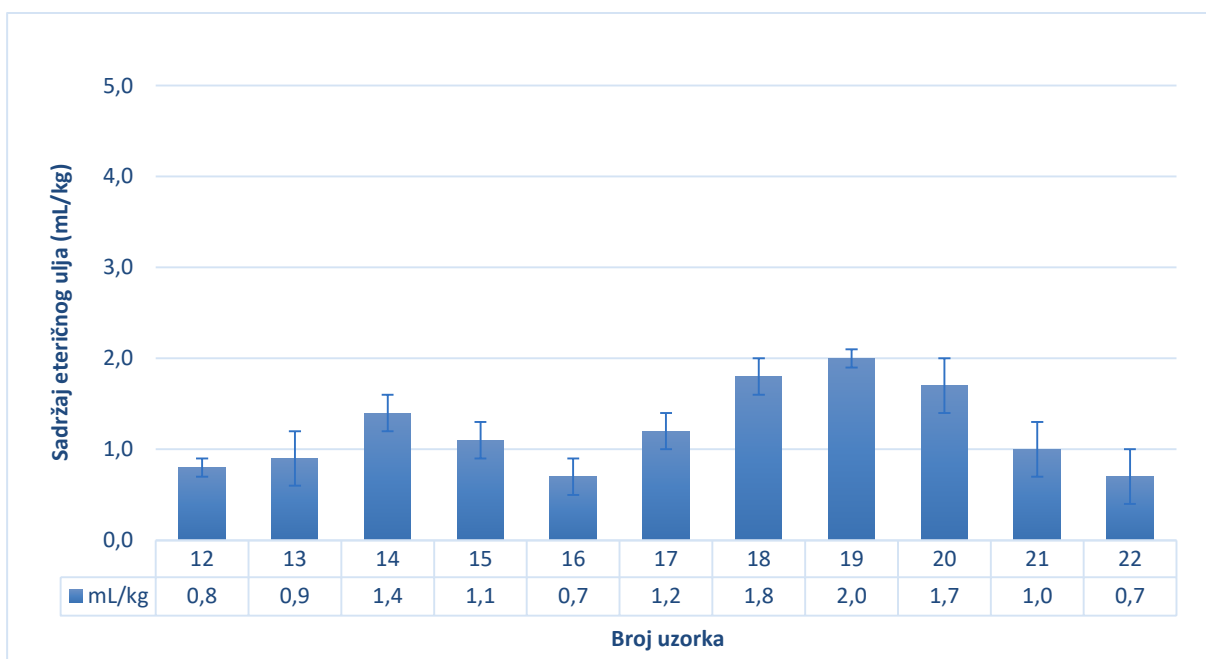
Provedena studija pokazala je da se komercijalni uzorci kamiličinog čaja značajno razlikuju u sadržaju eteričnog ulja jer je utvrđen širok raspon vrijednosti od 0,7 mL do 5,0 mL eteričnog ulja/kg biljne droge. Prikupljeni tržišni uzorci droge *Matricariae flos* u *in toto* obliku sadržavali su između 1,7 mL/kg i 5,0 mL/kg eteričnog ulja (Slika 8a). Uzevši u obzir zahtjev za minimalnim sadržajem 4 mL/kg eteričnog ulja koji nalaže Europska farmakopeja kao jedan od kriterija kakvoće kamiličinog cvijeta, može se zaključiti da velika većina droge *Matricariae flos* (19/22) dostupne na hrvatskom tržištu nije farmaceutske kakvoće. Samo su tri uzorka kamiličinog čaja *in toto* sadržavala količinu eteričnog ulja potrebnu za ostvarivanje ljekovitog djelovanja.

Slika 8b donosi usporedni grafički prikaz sadržaja eteričnog ulja u uzorcima kamiličinog cvijeta komercijalno dostupnog u obliku filter vrećica. U odnosu na cjelovitu drogu, usitnjen cvijet pakiran u filter vrećice sadržavao je značajno manje eteričnog ulja, s udjelima u širokom rasponu od 0,7 mL/kg do 2,0 mL/kg. Od jedanaest analiziranih uzoraka, samo su tri sadržavala 1,7 - 2,0 mL/kg eteričnog ulja dok je kod većine uzoraka određen sadržaj u rasponu između 0,7 i 1,4 mL/kg. Sveukupno, analizirani uzorci kamiličinog čaja dostupnog na tržištu u obliku kupcima vrlo popularnih i za pripremu jednostavnijih filter vrećica sadržavali su 2-6 puta niži udio eteričnog ulja od minimalno propisanog za potvrdu farmaceutske kakvoće i osiguravanje ljekovitog djelovanja.

S obzirom da su kamiličini čajevi na tržište stavljeni u različitim regulatornim skupinama te da ih se može nabaviti na različitim maloprodajnim mjestima, provedena je analiza dobivenih rezultata s obzirom na ove parametre (Slike 9a i 9b). Cjeloviti cvjetovi kamilice prisutni su na tržištu kao galenski pripravci, dodaci prehrani i hrana, dok se cvjetovi u filter vrećicama isključivo nalaze kao hrana. Od 3 galenska pripravka samo je 1 udovoljio farmakopejskom zahtjevu za sadržajem eteričnog ulja, te 2 od 6 uzoraka koji se smatraju hranom, dok niti jedan od 2 analizirana dodatka prehrani nije sadržavao dostatnu količinu eteričnog ulja.

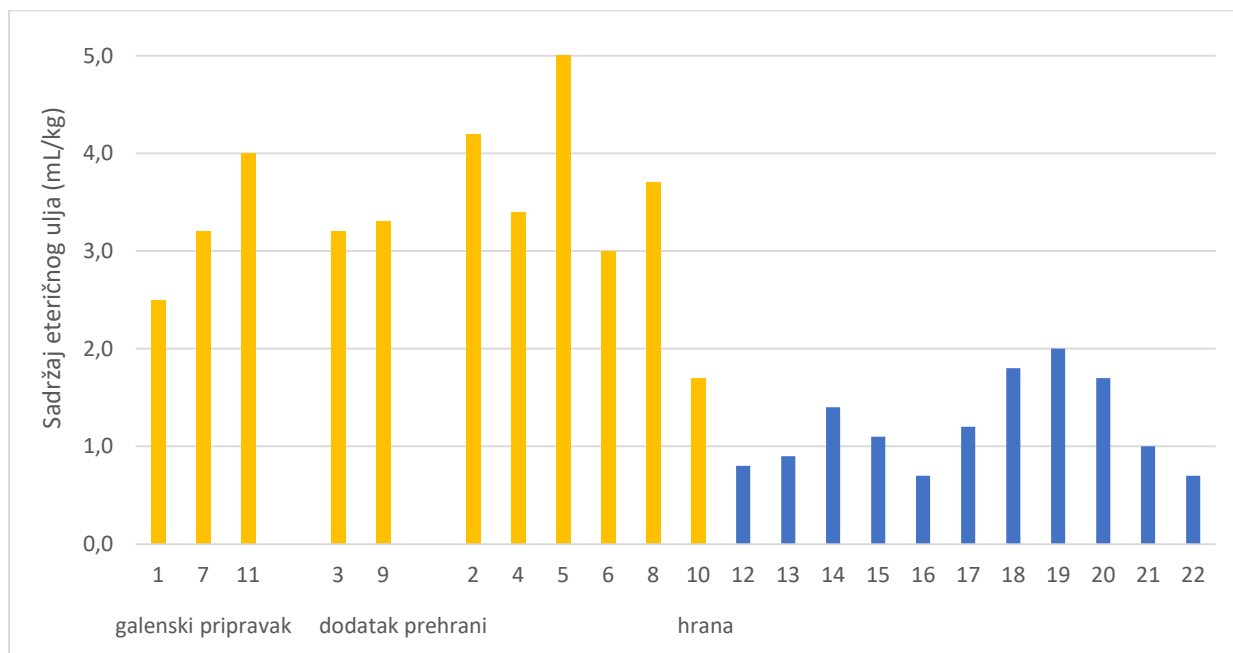


Slika 8a. Usporedni prikaz sadržaja eteričnog ulja (mL/kg) u uzorcima kamiličinog cvijeta in toto

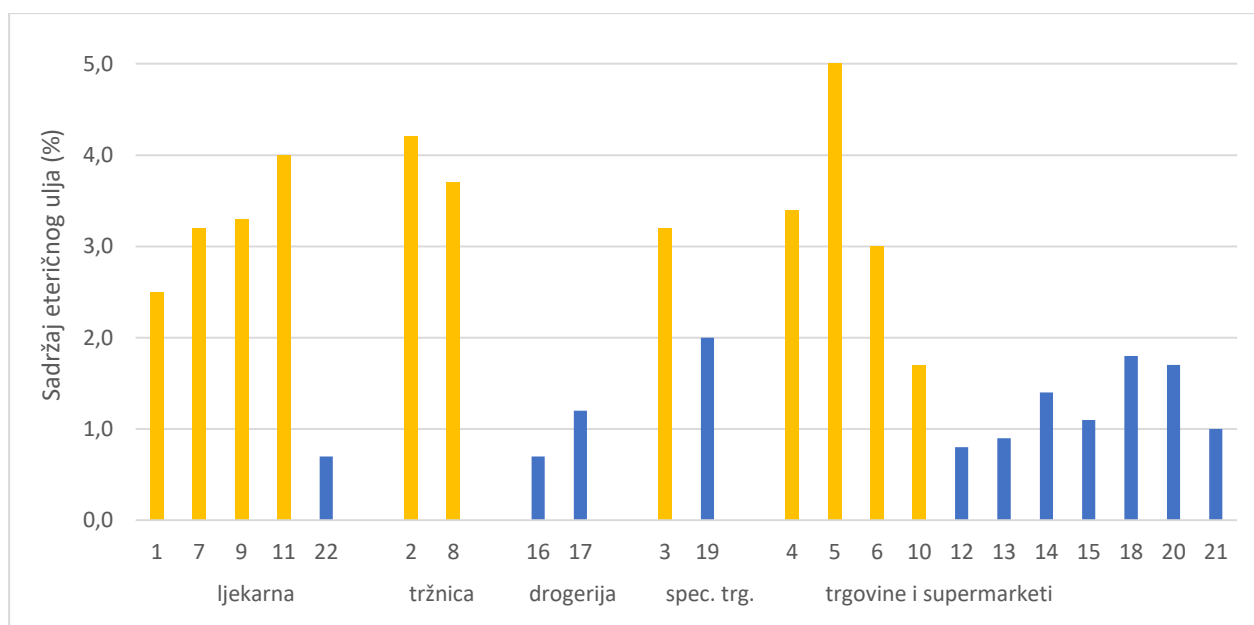


Slika 8b. Usporedni prikaz sadržaja eteričnog ulja (mL/kg) u uzorcima kamiličinog cvijeta u filter vrećicama

Promatrano u odnosu na mjesto nabave, samo je 1 od 6 uzoraka kamiličinog cvijeta kupljenog u ljekarni bio farmakopejske kakvoće, te po 1 od 2 uzorka s gradske tržnice i 1 od 11 uzoraka iz supermarketa, no niti jedan iz drogerije ni specijalizirane trgovine organske hrane.



Slika 9a. Usporedni prikaz sadržaja eteričnog ulja (mL/kg) u tržišnim uzorcima kamiličinog čaja s obzirom na regulatorni status (žuto – cvat in toto, plavo – cvat pakiran u filter vrećice)

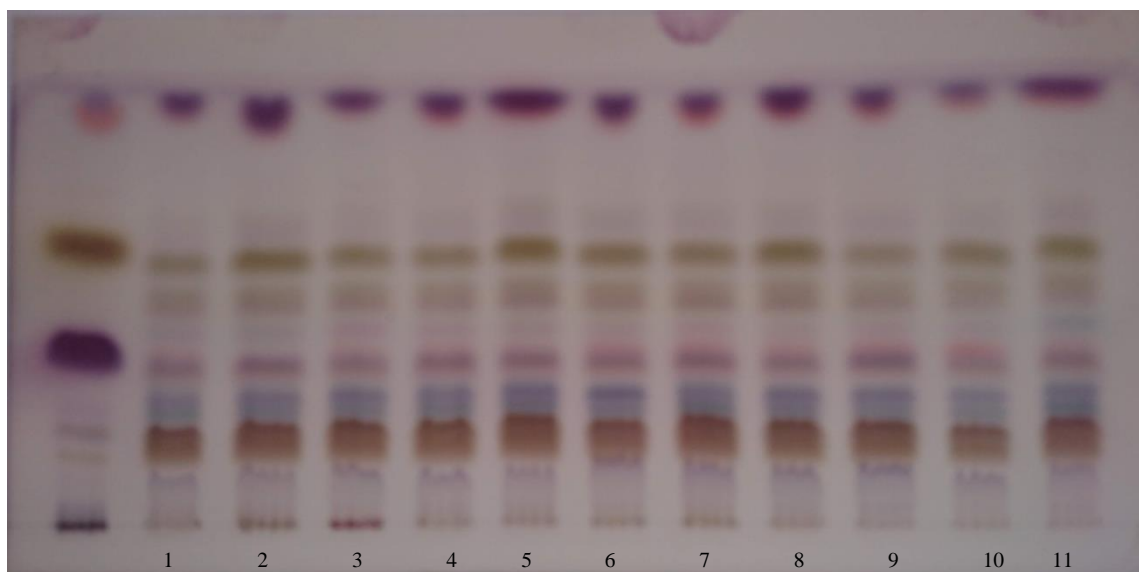


Slika 9b. Usporedni prikaz sadržaja eteričnog ulja (mL/kg) u tržišnim uzorcima kamiličinog čaja s obzirom na mjesto nabave (žuto – cvat in toto, plavo – cvat pakiran u filter vrećice)

4.2. TLC karakterizacija eteričnog ulja iz komercijalnih uzoraka kamiličinog cvijeta

Kromatografskom metodom na tankom sloju silikagela provedeno je odjeljivanje eteričnog ulja izoliranog iz kamiličinog cvijeta korištenjem pokretne faze sastavljene od etil acetata i toluena (5:95 V/V). Ploča je nakon razvijanja poprskana anisaldehyd reagensom, zagrijana do pojave obojenih zona te potom promatrana na dnevnom svjetlu. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slikama 10 i 11. Promatrajući boju, intenzitet i položaj (faktor zaostajanja, R_f) odijeljenih zona ispitivanih uzoraka te usporedbom s poredbenim spojevima i kromatogramima dostupnim u literaturi (5), karakterizirane su sastavnice analiziranih uzoraka.

Slika 10 prikazuje kromatograme jedanaest uzoraka eteričnog ulja izoliranog iz *in toto* droge *Matricariae flos*. U donjoj polovici kromatograma uočljive su zone crveno-ljubičaste ili plavo-ljubičaste boje koje odgovaraju (-)- α -bisabololu. U središnjem dijelu kromatograma, u visini poredbenog bornil acetata, uočljive su smeđe zone koje potječu od en-in-dicikloetera, dok su u gornjem dijelu kromatograma vidljive zone crvenkasto-ljubičaste boje koje odgovaraju kamazulenu. Usporedna analiza kromatograma ukazala je na značajne razlike u intenzitetu obojenja detektiranih sastavnica među kamiličnim eteričnim uljima. Slika 11 prikazuje kromatograme jedanaest uzoraka eteričnog ulja porijeklom iz kamilice u filter vrećicama. Spojevi detektirani u *in toto* uzorcima uočeni su i uzorcima droge u filter vrećicama, no za razliku od *in toto* droga, detektirane zone su uglavnom slabijeg intenziteta.



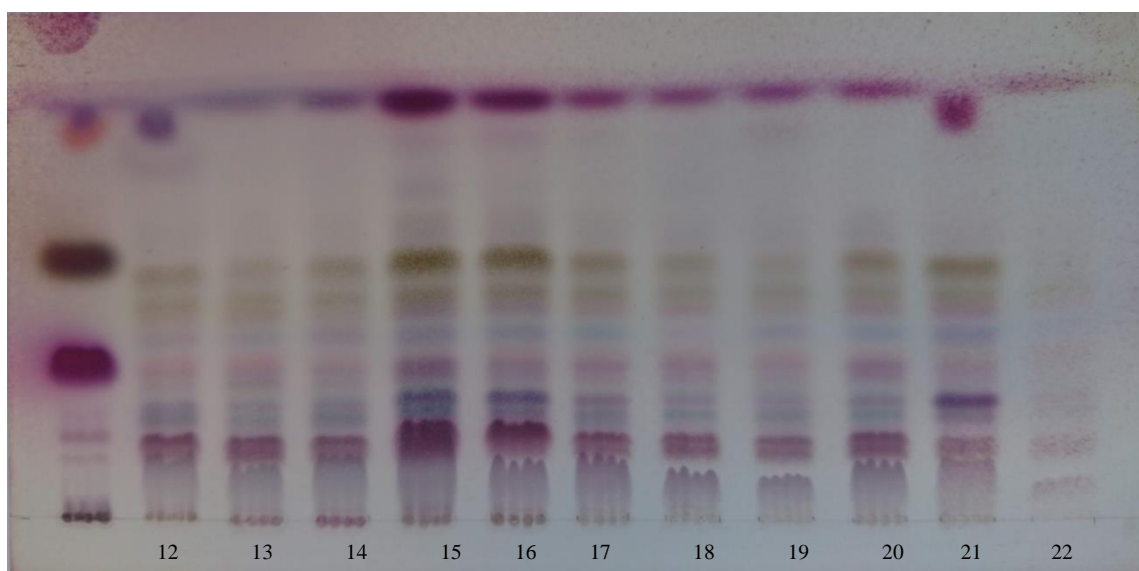
Slika 10. Kromatogram eteričnog ulja izoliranog iz komercijalnih uzoraka kamiličinog cvijeta *in toto* (uzorci 1-11)

Pokretna faza: etil acetat, toluen (5:95 V/V)

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄

Detekcija: anisaldehyd reagens, 100 °C; dnevno svjetlo

Poredbene supstancije: (-)- α -bisabolol ($R_f=0,4$), bornil acetat ($R_f=0,6$), kamazulen ($R_f=0,9$)



Slika 11. Kromatogram eteričnog ulja izoliranog iz komercijalnih uzoraka kamiličinog cvijeta u filter vrećicama (uzorci 12-22)

Pokretna faza: etil acetat, toluen (5:95 V/V)

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄

Detekcija: anisaldehyd reagens; 100 °C; dnevno svjetlo

Poredbene supstancije: (-)- α -bisabolol ($R_f=0,4$), bornil acetat ($R_f=0,6$), kamazulen ($R_f=0,9$)

4.3. Kemijski sastav eteričnog ulja kamilice

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnog ulja izoliranog iz pojedinog uzorka kamiličinog cvijeta provedena je metodom plinske kromatografije spregnute s tandemskom spektrometrijom masa (GC-MS/MS). Hlapljive sastavnice eteričnog ulja identificirane su usporedbom spektara masa te retencijskih indeksa s bazama NIST 14, Wiley 9, HPCH 2205 i Adams (85). Tablice 4-7 donose rezultate analize za svaki od 22 istraživana uzorka. Ukupno je identificirano 37 sastavnica kamiličinog eteričnog ulja. Kemijski profili analiziranih eteričnih ulja pokazali su prisutnost različitog broja hlapljivih sastavnica, uglavnom između 19 i 37 spojeva koji su sačinjavali ukupno 90,79 - 100 % ukupnog kamiličinog eteričnog ulja.

Tablica 4. Rezultati GC-MS/MS analize eteričnih ulja iz kamiličinog cvijeta *in toto* - UZORCI 1-5

Pik	R.T. (min)	RI	Naziv spoja	Udio sastavnice (%)				
				Uzorak				
				1	2	3	4	5
1	9,755	1060	artemizia keton	0,17	0,33			0,24
2	22,756	1374	dekanska kiselina	0,43		0,67		
3	26,131	1456	trans- β -farnezen	1,33	3,47	2,49	1,38	4,01
4	26,586	1468	dehidro-seskvicineol	0,13	0,36	0,21		0,18
5	27,02	1478	germakren D					0,24
6	27,212	1483	β -selinen	0,24			0,47	0,48
7	30,34	1563	trans-nerolidol	0,32		0,23		
8	30,784	1575	spatulenol	1,09	0,8	1,36	1,01	0,9
9	32,326	1615	1,3-dietilbenzen	1,09	1	1,35	1,37	0,84
10	32,827	1629	nerolidol oksid	0,76	0,42	0,86	0,69	0,43
11	33,761	1654	α -bisabolol oksid B	24,14	22,5	26,74	26,96	22,5
12	33,953	1659	8-metilizokinolin N-oksid	1,62	0,91			1,05
13	34,746	1681	α -bisabolon oksid A	8,61	8	9,9	8,35	7,53
14	36,331	1725	kamazulen	4,44	5,23	3,06	5,82	5,81
15	37,037	1745	bisabolol oksid A	39,37	37,6	41,12	41,9	39,05
16	41,592	1879	cis-spiroeter	12,38	15,6	9,27	9,32	15,4
17	42,065	1893	trans-spiroeter	0,19		0,3	0,43	0,53
18	44,324	1963	palmitinska kiselina	0,63				
19	49,855	2132	linolna kiselina			0,38	0,41	0,24
UKUPNO				97,2	96,6	97,94	98,11	99,43

Tablica 5. Rezultati GC-MS/MS analize eteričnih ulja izoliranih iz kamiličinog cvijeta *in toto* - UZORCI 6-11

Pik	R.T. (min)	RI	Naziv spoja	Udio sastavnice (%)					
				Uzorak					
				6	7	8	9	10	11
1	9,755	1060	artemizia keton	0,06	0,36	0,09	0,35		0,12
2	22,756	1374	dekanska kiselina	4,15		1,06	1,11		0,94
3	24,515	1416	β -kariofilen	0,09					
4	26,131	1456	trans - β -farnezen	5,07	0,85	3,34	1,51	0,82	2,42
5	26,586	1468	dehidro-seskvicineol	0,37	0,19	0,17	0,22		0,23
6	27,02	1478	germakren D	0,19		0,16			
7	27,212	1483	β -selinen	0,38	0,25	0,21			0,5
8	27,897	1494	biciklogermakren	0,12		0,09			
9	28,183	1507	β -bisabolen	0,05					
10	28,728	1521	δ -kadinen	0,05					
11	30,34	1563	trans-nerolidol	0,25	0,27	0,27			0,43
12	30,784	1575	spatulenol	2,29	0,96	1,44	1,38	1,08	1,47
13	30,994	1580	kariofilen oksid	0,31		0,16			0,2
14	31,397	1590	salvial-4(14)-en-1-on	0,2		0,16			0,13
15	31,927	1604	rosifoliol	0,12		0,11			
16	32,326	1615	1,3-dietilbenzen	1,22	1,31	1,02	1,21	1,45	1,19
17	32,827	1629	nerolidol oksid	0,76	0,74	0,67	0,74	0,8	0,83
18	33,761	1654	α -bisabolol oksid B	21,11	27,8	21,61	27,42	26,59	27,77
19	33,953	1659	8-metilizokinolin N- oksid	1,35	1,56	1,08	1,82	1,72	1,38
20	34,746	1681	α -bisabolon oksid A	8,8	8,31	7,91	9,47	8,72	9,43
21	36,331	1725	kamazulen	4	5,46	5,36	3,61	5,32	5,42
22	37,037	1745	bisabolol oksid A	27,15	37,88	33,28	39,61	40,56	35,16
23	41,592	1879	cis-spiroeter	11,13	8,75	18,04	8,15	12,94	10,41
24	42,065	1893	trans-spiroeter	0,71	0,45	0,26			0,19
25	44,324	1963	palmitinska kiselina	2,78	0,23	0,52	0,22		0,07
26	49,855	2132	linolna kiselina	1,57		0,48	0,45		
27	57,466	2299	trikoan		2,34				
UKUPNO				94	97,71	97,49	97,27	100	98,29

Tablica 6. Rezultati GC-MS/MS analize eteričnih ulja iz kamiličinog cvijeta u filter vrećicama - UZORCI 12-16

Pik	R.T. (min)	RI	Naziv spoja	Udio sastavnice (%)				
				12	13	14	15	16
1	8,569	1028	limonen				0,27	
2	13,42	1153	menton		0,29	0,57		
3	14,206	1172	mentol		0,43	0,71		
4	17,234	1244	karvon		0,3	0,57		
5	19,046	1285	E-anetol		1,89			0,34
6	22,756	1374	dekanska kiselina		1,32		0,41	0,43
7	26,131	1456	trans - β -farnezen	1,92	1,92	2,82	6,45	3,2
8	26,586	1468	dehidro-seskvicineol	0,52	0,17	0,33		
9	27,143	1481	ar-kurkumen		0,39			0,05
10	27,212	1483	β -selinen			0,39	0,43	
11	30,34	1563	trans-nerolidol			0,47		
12	30,784	1575	spatulenol	1,68	1,28	2,54	2,96	2,75
13	30,994	1580	kariofilen oksid			0,47	0,33	0,27
14	31,397	1590	salvial-4(14)-en-1-on					0,13
15	32,326	1615	1,3-dietilbenzen	1,27	0,8	0,55	0,86	0,38
16	32,827	1629	nerolidol oksid	0,1	0,52	0,25	0,86	0,23
17	33,192	1638	epi- α -kadinol					0,7
18	33,506	1647	β -eudesmol	0,88	0,39	1,84		0,13
19	33,761	1654	α -bisabolol oksid B	31,77	14,09	22,98	22,94	7,03
20	33,953	1659	8-metilizokinolin N- oksid	1,54	1,11	1,08	1,04	
21	34,746	1681	α -bisabolon oksid A	9,82	6,24	8,78	7,5	6,17
22	36,331	1725	kamazulen	3,61	1,22	2,51	3,33	0,62
23	37,037	1745	bisabolol oksid A	34,98	35,04	24,38	26,5	47,51
24	37,66	1763	miristinska kiselina			0,29	0,55	0,4
25	40,419	1844	6,10,14-trimetil-2- pentadekanon	0,73	0,91	1,01	0,66	0,93
26	41,592	1879	cis-spiroeter	4,52	8,13	9,19	9,73	16,99
27	42,065	1893	trans-spiroeter		0,42	0,3	0,37	0,36
28	43,104	1925	metil palmitat				0,44	0,12
29	44,324	1963	palmitinska kiselina	2,75	11,1	7,73	5,84	3,98
30	48,32	2091	metil linoleat				0,68	0,21
31	49,855	2132	linolna kiselina	1,35	2,44	2,38	3,04	1,19
32	52,402	2299	trikozan					2,14
UKUPNO				97,81	90,79	92,14	95,19	96,26

Tablica 7. Rezultati GC-MS/MS analize eteričnih ulja iz kamiličinog cvijeta u filter vrećicama - UZORCI 17-22

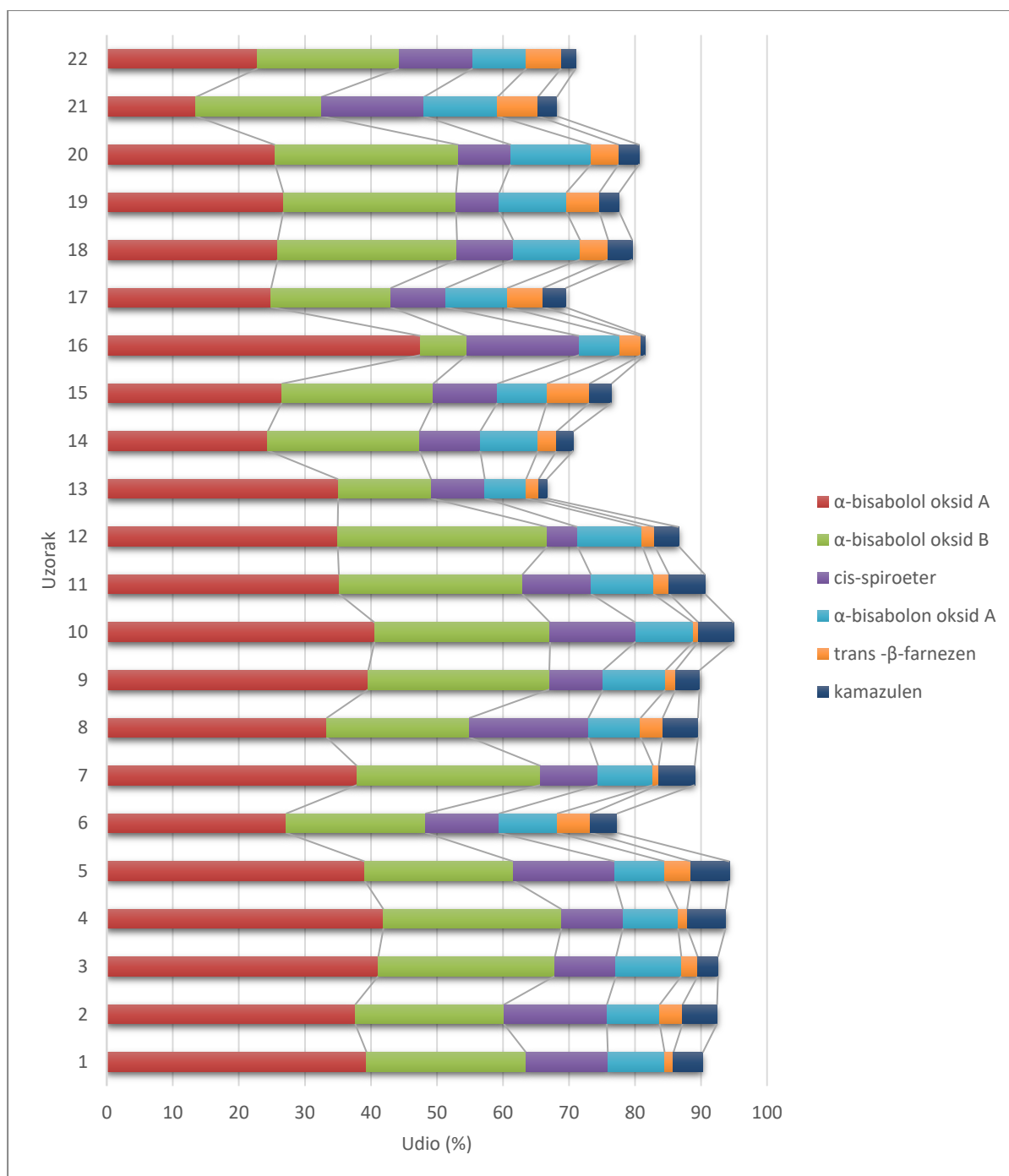
Pik	R.T. (min)	RI	Naziv spoja	Udio sastavnice (%)					
				17	18	19	20	21	22
1	13,42	1153	menton			0,35		0,23	
2	14,206	1172	mentol			0,3		0,3	
3	19,046	1285	E-anetol	0,26		0,91		0,34	
4	22,756	1374	dekanska kiselina	0,29	0,39	0,3	0,5		0,77
5	23,173	1384	α -izokomen					0,29	0,1
6	26,131	1456	trans - β -farnezen	5,43	4,26	4,99	4,18	6,11	5,29
7	26,586	1468	dehidro-seskvicineol	0,29	0,43	0,39	0,47		0,33
8	27,02	1478	germakren D						0,11
9	27,143	1481	ar-kurkumen			1,24			
10	27,212	1483	β -selinen	0,45	0,58				0,98
11	27,897	1494	biciklogermakren			0,29			
12	27,897	1507	β -bisabolen			0,32			
13	27,897	1522	β -seskvifelandren			0,35			
14	27,897	1524	tri-butil ester fosforne kiseline						0,33
15	30,34	1563	trans-nerolidol	0,29	0,42	0,41	0,36	0,54	0,58
16	30,784	1575	spatulenol	2,29	1,68	1,69	2,18	9,08	2,18
17	30,994	1580	kariofilen oksid	0,25		0,32		1,06	0,3
18	31,397	1590	salvial-4(14)-en-1-on						0,17
19	32,326	1615	1,3-dietilbenzen	0,61	0,96	1,09	0,97	0,33	0,89
20	32,827	1629	nerolidol oksid	0,52	0,66	0,65	0,75		0,75
21	32,901	1631	cis-kadin-4-en-7-ol (kamomilol)	0,25					
22	33,49	1647	β -eudesmol	0,71	0,25				0,2
23	33,761	1654	α -bisabolol oksid B	18,09	27,16	26,15	27,78	18,99	21,39
24	33,953	1659	8-metilzokinolin N- oksid	0,8	1,04	0,96	1,15		0,82
25	34,746	1681	α -bisabolon oksid A	9,32	10,13	10,14	12,18	11,17	8,15
26	36,331	1725	kamazulen	3,42	3,64	3,01	3,09	2,87	2,19
27	37,037	1745	bisabolol oksid A	24,89	25,89	26,75	25,47	13,49	22,86
29	37,66	1763	miristinska kiselina	0,63	0,01	0,06			0,6
30	40,419	1844	6,10,14-trimetil-2- pentadekanon	1,26	0,33	0,65	0,51	2,53	0,41
31	41,592	1879	cis-spiroeter	8,33	8,53	6,56	7,97	15,54	11,16
32	42,065	1893	trans-spiroeter	0,3	0,26	0,65	0,6	0,89	0,61
33	43,104	1925	metil palmitat		0,22				
34	44,324	1963	palmitinska kiselina	9,96	4,23	5,47	3,99	8,8	8,91

35	48,32	2091	metil linoleat		0,58					0,12
36	49,855	2132	linolna kiselina	3,04	2,86	3,08	3,38	2,33		1,56
37	52,402	2299	trikoan	4,55	3,4	1,14	2,7	0,19		0,34
			UKUPNO	96,23	97,91	98,4	98,23	95,08		92,1

Rezultati usporedne analize eteričnog ulja izoliranog iz komercijalnih uzoraka kamilice *in toto* i kamilice u filter vrećicama pokazali su da svi uzorci kamilice s hrvatskog tržišta sadrže eterično ulje bogato oksidiranim seskviterpenskim spojevima. Glavne sastavnice kamiličinog eteričnog ulja su α -bisabolol oksid A (13,5 - 41,9 %) i α -bisabolol oksid B (7,0 – 31,8 %). Ostale sastavnice prisutne u značajnijim udjelima su cis-spiroeter (4,5 – 18,0 %) i α -bisabolon oksid A (6,2 – 12,2 %), trans- β -farnezen (0,8 – 6,5 %) i kamazulen (0,6 – 5,8 %). U uzorcima eteričnog ulja kamilice iz filter vrećica (Tablice 6 i 7) detektirani su značajni postotci slobodnih masnih kiselina, posebice palmitinske kiseline (2,8 – 11,1 %) dok se njen udio u *in toto* drogi kretao između 0 % i 2,8 %. Dobiveni rezultati ukazuju na značajne kvantitativne razlike u sadržaju najzastupljenijih sastavnica eteričnog ulja među tržišnim uzorcima kamiličinog cvijeta, dok su kvalitativne razlike manje izražene.

Slika 12. donosi usporedni grafički prikaz udjela 6 najzastupljenijih sastavnica u svim analiziranim uzorcima kamiličinog cvijeta iz kojeg je uočljivo da one čine između 65 % i 95 % ulja. Ustanovljeno je da uzorci cjelovitog cvijeta (1-11) sadrže eterično ulje ujednačenijeg sastava u odnosu na uzorke prisutne na tržištu u obliku filter vrećica. Među potonjim su uočena veća variranja u sadržaju dviju glavnih sastavnica, α -bisabolol oksida A između uzoraka 16 i 21 (47,51 % vs. 13,49 %) te α -bisabolol oksida B između uzoraka 12 i 16 (7,03 % vs. 31,77 % vs.), dok se u ostalim uzorcima udio α -bisabolol oksida A kretao u rasponu 22,9 – 35,0 % , a udio α -bisabolol oksida B između 14,1 i 27,8 %. Tržišni uzorci *in toto* kamiličinog cvijeta sadržavali su α -bisabolol oksida A između 27,15 % i 41,9 % odnosno α -bisabolol oksida B u rasponu između 21,11 % i 27,8 %. Usporedna analiza tržišnih uzoraka pokazuje da je eterično

ulje izolirano iz cjelovite droge bogatije kamazulenom (3,06 - 5,82 %) u odnosu na eterično ulje koje sadrži kamilica u filter vrećicama (0,62 - 3,64 %).



Slika 12. Usporedni prikaz udjela najzastupljenijih sastavnica u svim analiziranim komercijalnim uzorcima kamiličinog cvijeta in toto (uzorci 1-11) i u obliku filter vrećica (uzorci 12-22)

Rezultati dobiveni analizom kemijskog sastava eteričnog ulja iz komercijalno dostupnih uzoraka kamiličinog čaja s hrvatskog tržišta pokazuju znatne sličnosti, ali i određene različitosti u odnosu na dosad objavljena istraživanja. Orav i suradnici (34) istražili su sadržaj i sastav eteričnog ulja izoliranog iz komercijalnih uzoraka kamilice prikupljenih iz ljekarni ili iz uzgoja u 11 europskih zemalja te izvijestili o značajnim razlikama uvjetovanim geografskim porijeklom i okolišnim čimbenicima. Utvrđene su velike razlike među uzorcima kamilice s obzirom na udio eteričnog ulja koji se kretao u širokom rasponu od 0,7 - 6,7 mL/kg. U 8 od 13 uzoraka kamilice prevladavao je bisabolol oksid A (27,5 - 56,0 %) (Njemačka, Estonija, Grčka, Škotska, Engleska i Latvija), u uzorcima iz Moldavije, Rusije i Češke prevladavao je α -bisabolol (23,9 - 44,2 %), uzorak iz Armenije bio je bogat bisabolol oksidom B (27,2 %) i kamazulenom (15,3 %) dok je u ukrajinskom uzorku dominirao bisabolon oksid A (24,8 %). Eterična ulja izolirana iz kamilice uzgajane u Italiji na 13 pokusnih površina dobivena su u prinosu od 2,2 - 8,1 mL/kg i uglavnom su se sastojala od od cis-spiroeterea (11,8 - 45,9 %) ili α -bisabolol oksida B (3,7 - 28,1 %), a na značajne razlike u sadržaju pojedine sastavnice uvelike su utjecali pedološki i klimatski uvjeti, nadmorska visina te plodnost i vlažnost tla (35). Tschiggerl i suradnici (32) utvrdili su da austrijski uzorak kamilice sadrži 4,5 mL/kg eteričnog ulja te da u njegovom sastavu prevladavaju α -bisabolol oksid A (29,92 %), α -bisabolol oksid B (21,13 %), cis-spiroeter (11,67 %), α -bisabolon oksid A (7,87 %) i kamazulen (6,18 %).

Analizom cvjetova koji se dobivaju od tri različita kultivara kamilice uzgojene na području Srbije određen je sadržaj eteričnog ulja u rasponu 4,3 - 4,8 mL/kg, što ukazuje na male razlike među ispitivanim kultivarima. U izoliranom eteričnom ulju dominirao je *trans*- β -farnezen (17,8 - 39 %), a preostale sastavnice koje su činile većinski udio bile su α -bisabolol oksid B (4,1 - 17,5 %), α -bisabolol oksid A (3,6 - 14,9 %), α -bisabolon oksid A (1,5 - 10,0 %), cis-spiroeter (6,7 - 13,0 %) i kamazulen (5,1 - 13,7 %) (75). Komercijalni uzorci kamilice

dostupni na hrvatskom tržištu obzirom na utvrđeni sadržaj eteričnog ulja u rasponu od 0,6 - 5,0 ml/kg u skladu su s rezultatima istraživanja dobivenim u drugim europskim zemljama. Nadalje, utvrđeni sastav eteričnog ulja izoliranog iz komercijalnih uzoraka kamilice *in toto* i onog pakiranog u filter vrećice s hrvatskog tržišta pokazao je da svi uzorci sadrže eterično ulje bogato oksidiranim seskviterpenskim spojevima što je usporedivo s literaturnim podacima, a pritom glavninu sastava čine α -bisabolol oksid A (13,5 - 41,9 %) i α -bisabolol oksid B (7,0 – 31,8), slično kao i kod austrijskog i talijanskog uzorka. Ostale sastavnice prisutne u značajnijim udjelima su *cis*-spiroeter (4,5 – 18,0 %) i α -bisabolon oksid A (6,2 – 12,2 %), *trans*- β -farnezen (0,8 – 6,5 %) i kamazulen (0,6 – 5,8 %) što upućuje na varijabilnost u sastavu eteričnog ulja cvijeta kamilice. Zanimljivo je istaknuti da je glavnina eteričnog ulja izoliranog iz cvijeta u filter vrećicama sadržavala visoku razinu *trans*- β -farnezena, koja se može pripisati preranoj berbi ili u ovom slučaju više vjerojatno prisutnosti stabljika i lišća u uzorku kamilice (76).

Seskviterpeni α -bisabolol i kamazulen smatraju se spojevima od najveće terapijske vrijednosti i nositelji su protuupalnog, spazmolitičkog i antiseptičkog djelovanja, no njihov se udio u ulju znatno razlikuje s obzirom na porijeklo. Tako je eterično ulje dobiveno iz kamilice uzgojene u Armeniji i Poljskoj sadržavalo više od 15 % kamazulena (34). Podaci iz Poljske ukazuju da kultivirane biljke sadrže više kamazulena (25 %) u odnosu na samonikle (16 %). Nasuprot tome, ulja iz Egipta, Indije, Grčke, Njemačke i Engleske sadržavala su manje od 2 % kamazulena, dok u iranskom uzorku droge nije niti detektiran (4, 34). U slučaju α -bisabolola, njegov je sadržaj bio vrlo visok (67-69 %) u uzorcima ulja dobivenog iz kamilice s Malte i Krima, bogata njime bila su i ulja iz Moldavije i Mađarske, dok je u američkom ulju bio prisutan u tragovima (1,2 %) (5, 34).

Odavno je poznat blagotvoran učinak α -bisabolola na kožu pa je tako zabilježen i njegov učinak na zacjeljivanje rana kad se primijenjuje u koncentraciji od 25 % tijekom 30 dana.

Nekoliko studija također potvrđuje sposobnost α -bisabolola da smanji razinu proupalnih citokina te njegovu učinkovitost u liječenju dermatitisa i ekcema (56). Novija istraživanja otkrivaju nekoliko novih svojstava α -bisabolola, pa su tako Alves i suradnici ispitivanjem na miševima potvrdili smanjenje podražljivosti perifernih živaca primjenom odgovarajuće doze α -bisabolola (77), a dokazan je i njegov protektivni učinak na stanice bubrega temeljen na sposobnosti zaštite stanica tubularnog epitela od oštećenja izazvanih oksidativnim stresom (78). Obzirom na njegova analgetska, antimikrobna i protuupalna svojstva, Amora-Silva i suradnici kliničkom studijom na 30 ispitanika dokazali su da primjena vodice za ispiranje usta s α -bisabololom značajno poboljšava oralnu higijenu i zacjeljivanje rana te smanjuje postoperativnu bol u usnoj šupljini (79). Na animalnom modelu α -bisabolol je smanjio mehaničku hiperpodražljivost trigeminalnog živca što upućuje na mogućnost primjene u liječenju orofacijalne boli (80).

Farmakološke studije provedene s kamazulenom, kao jednom od glavnih bioaktivnih sastavnica kamiličinog eteričnog ulja, također otkrivaju nove potencijalne primjene u liječenju različitih stanja. Melo i suradnici dokazali su učinkovitost primjene u liječenju osteoartritisa (81), a otkriven je i njegov značajan hepatoprotektivni učinak kod alkoholom inducirano oštećenja jetre u životinja (82). Nadalje, poznat je i antioksidativni potencijal kamazulena (83), a time i njegov blagotvorni učinak u tretiranju raznih upalnih stanja kože (84).

Preostali, manje zastupljeni spojevi također doprinose sinergističkom učinku eteričnog ulja kao mješavine većeg broja strukturno različitih bioaktivnih spojeva.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog specijalističkog rada određen je sadržaj i sastav eteričnog ulja izoliranog iz komercijalno dostupnih farmaceutskih oblika kamiličinog cvijeta (*in toto* i filter vrećice) u svrhu utvrđivanja kakvoće uzoraka biljne droge dostupne na hrvatskom tržištu.

Sadržaj eteričnog ulja u 22 uzorka kamiličinog cvijeta volumetrijski je određen metodom destilacije pomoću vodene pare primjenom relevantne farmakopejske metode te su uočene značajne razlike u korist droge *in toto*. Tržišni uzorci droge *Matricariae flos* u *in toto* obliku sadržavali su između 1,7 mL/kg i 5,0 mL/kg eteričnog ulja, dok je usitnjena kamilica pakirana u filter vrećice sadržavala značajno manje eteričnog ulja, od 0,7 mL/kg do 2,0 mL/kg. S obzirom da je farmakopejska kakvoća droge uvjetovana minimalnim sadržajem eteričnog ulja od 4 mL/kg, utvrđeno je da samo tri od jedanaest *in toto* uzoraka udovoljava tom zahtjevu te niti jedan uzorak iz filter vrećica, što upućuje na zaključak da glavnina kamiličinog cvijeta dostupnog na hrvatskom tržištu nije farmaceutske kakvoće. Ustanovljeni rezultati u suglasju su s literaturnim podacima o kamilici prisutnoj na tržištu drugih europskih zemalja gdje je također zabilježen širok raspon vrijednosti udjela eteričnog ulja.

Budući da su eterična ulja smjese velikog broja lakohlapljivih spojeva njihov je udio vrlo promjenjiv jer na njega utječu brojni intrinzični i ekstrinzični čimbenici. Nizak udio eteričnog ulja može biti posljedica nedostatne kakvoće sirovog biljnog materijala i/ili posljedica gubitaka lakohlapljivih sastavnica eteričnog ulja uslijed neprikladne obrade, postupka usitnjavanja i/ili skladištenja droge. Navedeni čimbenici mogu biti razlogom relativno niskog udjela eteričnog ulja u analiziranim uzorcima usitnjenog kamiličinog cvijeta kojeg na tržištu nalazimo pakiranog u vrlo popularne i za korištenje jednostavnije filter vrećice. Značajne razlike u sadržaju eteričnog ulja među cjelovitim i usitnjenim cvjetovima upućuju na zaključak da je za postizanje očekivanog blagotvornog učinka kamilice na ljudsko zdravlje

nužno koristiti ljekarničku drogu *in toto* s obzirom da je opsežna analiza tržišnih uzoraka ukazala da su dvostruko do šestostruko bogatiji ljekovitim tvarima.

Identifikacija izoliranog eteričnog ulja kamilice provedena metodom tankoslojne kromatografije rezultirala je uspostavom karakterističnih TLC profila sastavnica eteričnog ulja. Među tržišnim uzorcima istog ljekovitog oblika nisu detektirane značajnije razlike, no uočene su određene razlike u sastavu eteričnog ulja izoliranog iz cjelovite i usitnjene droge što upućuje na mogućnost da su u filter vrećicama osim cvjetova sadržani i drugi biljni dijelovi kamilice.

Detaljna kvalitativna i kvantitativna analiza sastava eteričnog ulja kamilice provedena GS/MS-MS metodom omogućila je odijeljivanjem i identifikacijom 37 sastavnica. Svi komercijalni uzorci kamilice sadržavali su eterično ulje bogato oksidiranim seskviterpenskim spojevima, među kojima su najzastupljeniji α -bisabolol oksid A (13,5 - 41,9 %) i α -bisabolol oksid B (7,0 – 31,8 %). Ostale sastavnice prisutne u značajnijim udjelima su *cis*-spiroeter (4,5 – 18,0 %) i α -bisabolon oksid A (6,2 – 12,2 %), *trans*- β -farnezen (0,8 – 6,5 %) i kamazulen (0,6 – 5,8 %). Eterično ulje iz cjelovite droge bogatije je kamazulenom u odnosu na ono dobiveno iz usitnjenih cvjetova pakiranih u filter vrećice, no samo je jedan od 22 analizirana uzorka sadržavao manje od Farmakopejom zahtjevanih 1 %. U većini uzoraka eteričnog ulja kamilice iz filter vrećica detektirani su značajni postotci *trans*- β -farnezena, što se povezuje s preranom berbom ili, ovdje više vjerojatnom prisutnošću stabljike i listova kamilice. Rezultati provedene usporedne analize tržišnih uzoraka kamiličinog čaja upućuju na veću kvalitetu cvijeta kamilice *in toto* i samim time na nužnost korištenja tog oblika u ljekovite svrhe.

Kamiličin čaj danas je široko dostupan na hrvatskom tržištu, i to ne samo u ljekarnama i biljnim ljekarnama već i u prodavaonicama zdrave hrane, supermarketima, gradskim tržnicama, gdje nalazimo širok izbor čajeva kamilice različitih oblika, proizvođača, porijekla i

regulatornog statusa. Provedena tržišna analiza nije ukazala na superiornost u kakvoći droge pribavljene u ljekarni u odnosu na druga maloprodajna mjesta. Štoviše, tri uzorka droge najbogatija eteričnim uljem potječu iz trgovina mješovitom robom, gradske tržnice i ljekarne te su stavljeni u promet unutar različitih regulatornih skupina, odnosno kao hrana i galenski pripravak.

Rezultati ovog rada potvrđuju prethodne spoznaje o velikim razlikama u sadržaju etričnog ulja u kamiličinom cvijetu te varijabilnosti u njegovom kvalitativnom i kvantitativnom sastavu, što se može negativno odraziti na kvalitetu biljne droge, eteričnog ulja i biljnih ekstrakata, a time i na njihovo terapijsko djelovanje. Rad također ističe važnost i nužnost provođenja kontrole kakvoće biljnih droga i pripravaka kako bi se pacijentima osigurala primjena fitopreparata farmaceutske kvalitete što predstavlja imperativ suvremene, racionalne fitoterapije i pridonosi jačanju njihova povjerenja u fitoterapiju općenito.

6. LITERATURA

1. Blažeković B, Stanić G. Ispitivanje bioaktivnog sastava kamilice (*Matricaria recutita* L.) metodom tankoslojne kromatografije. Farm Glas 2004;60(6):243-254.
2. Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. Mol Med Rep 2010;3(6):895-901.
3. HMPC (EMA Committee on Herbal Medicinal Products). European Union herbal monograph on *Matricaria recutita* L., flos. EMA/HMPC/55843/2011. European Medicines Agency, London, 2015, str. 1-13.
4. Köhler H.A. Medizinal-Pflanzen. Gera, Franz Eugen Köhler, 1887, str. 64.
5. El Mihaoui A, Esteves da Silva JCG, Charfi S, Candela Castillo ME, Lamarti A, Arnao MB. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A review of ethnomedicinal use, phytochemistry and pharmacological uses. Life 2022;12(4):479.
6. EDQM, European Pharmacopoeia. The Ninth Edition (Ph. Eur. 9.5.), Council of Europe, Strasbourg, 2018.
7. Falzon CC, Balabanova A. Phytotherapy: An introduction to herbal medicine. Prim Care 2017;44(2):217-227.
8. Lopes CMC, Lazzarini JR, Soares Júnior JM, Baracat EC. Phytotherapy: yesterday, today, and forever? Rev Assoc Med Bras 2018;64(9):765-768.
9. Fürst R, Zündorf I. Evidence-based phytotherapy in Europe: Where do we stand? Planta Med 2015;81(12-13):962-7.
10. Conway P. The consultation in phytotherapy. Churchill Livingstone; 2011, str. 1-38.
11. Schulz V, Hänsel R, Blumenthal M, Tyler VE. Rational phytotherapy: A reference guide for physicians and pharmacists (5th ed.). Springer-Verlag; 2004.

12. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* 2010;81(6):462-71.
13. a) Zakon o lijekovima. Narodne novine 100/18. b) Pravilnik o provjeri kakvoće lijeka. Narodne novine 60/2014.
14. Official Journal of the European Union: Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending, as regards traditional herbal medicinal products, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use, Strasbourg, 30.04.2004.
Available at: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:136:0085:0090:en:PDF> Accessed June 5, 2022.
15. Barkat MA, Goyal A, Barkat HA, Salauddin M, Pottoo FH, Anwer ET. Herbal medicine: clinical perspective and regulatory status. *Comb Chem High Throughput Screen* 2021;24(10):1573-1582.
16. Colalto C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytother Res* 2018;32(3):413-425.
17. Zhang J, Wider B, Shang H, Li X, Ernst E. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. *Complement Ther Med* 2012;20:100-6.
18. Fasinu PS, Bouic PJ, Rosenkranz B. An overview of the evidence and mechanisms of herb-drug interactions. *Front Pharmacol* 2012;3:69.
19. Shinde VM, Dhalwal K, Potdar M, Mahadik KR. Application of quality control principles to herbal drugs. *Int J Phytomed* 2009;1:4-8.
20. EMEA/HMPC: Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin. *Available at:* https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-good-agricultural-collection-practice-gacp-starting-materials-herbal-origin_en.pdf. Accessed at June 5, 2022.

21. Pravilnik o dodacima prehrani. Narodne novine 126/2013.
22. a) Zakon o predmetima opće uporabe. Narodne novine 55/22. b) Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti predmeta široke potrošnje. Narodne novine 55/2022
23. Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb, Poljoprivredni nakladni zavod, 1956, str. 527-528.
24. Kuštrak D. Farmakognozija-fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, str. 51-52, 55, 335-339, 409.
25. Chauhan R, Singh S, Kumar V i sur. A comprehensive review on biology, genetic improvement, agro and process technology of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Plants 2021;11(1):29.
26. Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. Pharmacogn Rev 2011;5(9):82-95.
27. Domac R. Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Školska knjiga, 1973, str. 372, 379.
28. Gursky Z. Zlatna knjiga ljekovitog bilja. 5. izd., Nakladni zavod Matice hrvatske, 1999, str. 235-237.
29. Sharifi-Rad M, Nazaruk J, Polito L i sur. *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. Microbiol Res 2018;215:76-88.
30. Marković S. Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka: temelji fitoaromaterapije. Centar Cedrus, 2005, str. 115, 224.
31. Wang M, Avula B, Wang YH i sur. An integrated approach utilising chemometrics and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products. Food Chem 2014;152:391-8.

32. Shaaban AEH, Ahmed H, Shibamoto EG, Shibamoto T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J Essent Oil Res* 2012;24:203-212.
33. Tschiggerl C, Bucar F. Guaianolides and volatile compounds in chamomile tea. *Plant Foods Hum Nutr* 2012;67(2):129-35.
34. Raal A, Orav A, Püssa T, Valner C, Malmiste B, Arak E. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. *Food Chem* 2012; 131:632–638.
35. Orav A, Raal A, Arak E. Content and composition of the essential oil of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert from some European countries. *Nat Prod Res* 2010; 24:48–55.
36. Formisano C, Delfino S, Oliviero F, Tenore GC, Rigano D, Senatore F. Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). *Ind Crops Prod* 2015;63:256-263.
37. HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products). Assessment report on *Matricaria recutita* L., *flos* and *Matricaria recutita* L., *aetheroleum*. European Medicines Agency. London, 2015b
38. Piri E, Sourestani MM, Khaleghi E i sur. Chemo-diversity and antiradical potential of twelve *Matricaria chamomilla* L. populations from Iran: Proof of ecological effects. *Molecules* 2019;24(7):1315.
39. Mavandi P, Assareh MH, Dehshiri A, Rezadoost H, Abdossi V. Flower biomass, essential oil production and chemotype identification of some Iranian *Matricaria chamomilla* var. *recutita* (L.) accessions and commercial varieties. *J Essent Oil Bear PI* 2019;22:1228.–1240.
40. Ghasemi M, Babaeian Jelodar N, Modarresi M, Bagheri N, Jamali A. Increase of chamazulene and α -bisabolol contents of the essential oil of German chamomile

- (*Matricaria chamomilla* L.) using salicylic acid treatments under normal and heat stress conditions. *Foods* 2016; 5(3):56
41. Wesolowska A, Grzeszczuk M, Kulpa D. Propagation method and distillation apparatus type affect essential oil from different parts of *Matricaria recutita* L. *J Essent Oil Bear Pl* 2015;18 (1):179 – 194.
 42. Qureshi MN, Stecher G, Bonn GK. Quality control of herbs: determination of amino acids in *Althaea officinalis*, *Matricaria chamomilla* and *Taraxacum officinale*. *Pak J Pharm Sci* 2014;27(3):459-62.
 43. Toplak Galle K. Domaće ljekovito bilje. Mozaik knjiga, 2005, str. 10-11, 80-81.
 44. Miraj S, Alesaeidi S. A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recutita* chamomile (chamomile). *Electron Physician* 2016;8(9):3024-3031.
 45. Kazemi M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Matricaria chamomilla*. *Bull Env Pharmacol Life Sci* 2014;3(2):148-153.
 46. Parlinska-Wojtan M, Kus-Liskiewicz M, Depciuch J, Sadik O. Green synthesis and antibacterial effects of aqueous colloidal solutions of silver nanoparticles using chamomile terpenoids as a combined reducing and capping agent. *Bioprocess Biosyst Eng* 2016;39(8):1213-23.
 47. Göger G, Demirci B, Ilgın S, Demirci F. Antimicrobial and toxicity profiles evaluation of the chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil combination with standard antimicrobial agents. *Ind Crops Prod* 2018;120:279-285.
 48. Wei A, Shibamoto T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *J Agric Food Chem* 2010;58(12):7218-25.
 49. Tomić M, Popović V, Petrović S i sur. Antihyperalgesic and antiedematous activities of bisabolol-oxides-rich *Matricaria* oil in a rat model of inflammation. *Phytother Res* 2014, 28(5), 759-766.

50. Saghahazrati S, Abdulmajid Ayatollahi S, Kobarfarda F, Minaii Zang B. Attenuation of inflammation in streptozotocin-induced diabetic rabbits by *Matricaria chamomilla* oil: A focus on targeting NF- κ B and NLRP3 signaling pathways. *Chin Herb Med* 2020, 12(1),73-78.
51. Heidarianpour A, Mohammadi F, Keshvari M, Mirazi N. Ameliorative effects of endurance training and *Matricaria chamomilla* flowers hydroethanolic extract on cognitive deficit in type 2 diabetes rats. *Biomed Pharmacother* 2021, 135 (15), 111230.
52. Rafrat M, Zemestani M, Asghari-Jafarabadi M. Effectiveness of chamomile tea on glycemic control and serum lipid profile in patients with type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest* 2015;38(2):163-70.
53. Kaseb F, Yazdanpanah Z, Naghdipour Biregani A, Barkhordari Yazdi N, Yazdanpanah Z. The effect of chamomile (*Matricaria recutita* L.) infusion on blood glucose, lipid profile and kidney function in type 2 diabetic patients: a randomized clinical trial. *Progr Nutr* 2018;20(1-S):110-8.
54. Alahmadi AA, Alzahrani AA, Ali SS, Alahmadi BA, Arab RA, El-Shitany NAE. Both *Matricaria chamomilla* and metformin extract improved the function and histological structure of thyroid gland in polycystic ovary syndrome rats through antioxidant mechanism. *Biomolecules* 2020;10(1):88.
55. Awaad AA, El-Meligy RM, Zain GM i sur. Experimental and clinical antihypertensive activity of *Matricaria chamomilla* extracts and their angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Phytother Res* 2018;32(8):1564-1573.
56. Zargarani A, Borhani-Haghighi A, Salehi-Marzijarani M i sur. Evaluation of the effect of topical chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) oleogel as pain relief in migraine

- without aura: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Neurol Sci* 2018;39(8):1345-1353.
57. Dos Santos DS, Barreto RSS, Serafini MR i sur. Phytomedicines containing *Matricaria* species for the treatment of skin diseases: A biotechnological approach. *Fitoterapia* 2019;138:104267.
58. Ortiz-Bautista RJ, García-González LL, Ocádiz-González MA i sur. *Matricaria chamomilla* (aqueous extract) improves atopic dermatitis-like lesions in a murine model. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2017;55(5):587-593.
59. Ferreira EB, Ciol MA, Vasques CI i sur. Gel of chamomile vs. urea cream to prevent acute radiation dermatitis in patients with head and neck cancer: a randomized controlled trial. *J Adv Nurs* 2016;72:1926–1934.
60. Shimelis ND, Asticcioli S, Baraldo M i sur. Researching accessible and affordable treatment for common dermatological problems in developing countries. An Ethiopian experience. *Int J Dermatol* 2012;51:790–795.
61. Licari A, Ruffinazzi G, De Filippo M i sur. A starch, glycyrrhetic, zinc oxide and bisabolol based cream in the treatment of chronic mild-to-moderate atopic dermatitis in children: a three-center, assessor blinded trial. *Minerva Pediatr* 2017;69(6):470-475.
62. Man MQ, Hupe M, Sun R, Man G, Mauro TM, Elias PM. Topical apigenin alleviates cutaneous inflammation in murine models. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:912028.
63. Byun S, Park J, Lee E i sur. Src kinase is a direct target of apigenin against UVB-induced skin inflammation. *Carcinogenesis* 2013;34(2):397-405.
64. Arsić I, Tadić V, Vlaović Dj i sur. Preparation of novel apigenin-enriched, liposomal and non-liposomal, antiinflammatory topical formulations as substitutes for corticosteroid therapy. *Phytother Res* 2011;25(2):228-33.

65. Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E i sur. Skin wound healing and phytomedicine: A Review. *Skin Pharmacol Physiol* 2014;27:303–310.
66. Ioniță R, Postu PA, Cioancă O, Mircea C, Hăncianu M, Hrițcu L. Anxiolytic and antidepressant effects of *Matricaria chamomilla* hydroalcoholic extract in a rat model of scopolamine. *Farmacologia* 2019; 67(1):68-72.
67. Shaaban M, El-Hagrassi AE, Osman AF, Soltan MM. Bioactive compounds from *Matricaria chamomilla*: structure identification, *in vitro* antiproliferative, antimigratory, antiangiogenic, and antiadenoviral activities. *Z Naturforsch C J Biosci* 2021;77(3-4):85-94.
68. Mollabashi EN, Ziaie T, Khalesi ZB. The effect of *Matricaria chamomile* on menstrual related mood disorders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X* 2021;12:100134.
69. Amsterdam JD, Li QS, Xie SX, Mao JJ. Putative Antidepressant effect of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) oral extract in subjects with comorbid generalized anxiety disorder and depression. *J Altern Complement Med* 2020;26(9):813-819.
70. Hieu TH, Dibas M, Dila KAS i sur. Therapeutic efficacy and safety of chamomile for state anxiety, generalized anxiety disorder, insomnia, and sleep quality: A systematic review and meta-analysis of randomized trials and quasi-randomized trials. *Phytother Res* 2019;33(6):1604-1615.
71. Yeung KS, Hernandez M, Mao JJ, Haviland I, Gubili J. Herbal medicine for depression and anxiety: A systematic review with assessment of potential psychoneurologic relevance. *Phytother Res* 2018;32(5):865-891.
72. Khorasani F, Aryan H, Sobhi A i sur. A systematic review of the efficacy of alternative medicine in the treatment of nausea and vomiting of pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 2020;40(1):10-19.

73. Trabace L, Tucci P, Ciuffreda L i sur. "Natural" relief of pregnancy-related symptoms and neonatal outcomes: above all do no harm. *J Ethnopharmacol* 2015;174:396-402.
74. Awortwe C, Makiwane M, Reuter H, Muller C, Louw J, Rosenkranz B. Critical evaluation of causality assessment of herb-drug interactions in patients. *Br J Clin Pharmacol* 2018;84(4):679-693.
75. Kindl M, Bucar F, Verbanac D i sur. Essential oils of selected *Thymus* species wild-growing in Croatia: chemical composition and antibacterial activity. U: *Natural Volatiles & Essential Oils*. Badebio, 2017, str. 181.
76. Acimovic M, Stankovic J, Cvetkovic M, Kripovski B, Todosijevic M. Essential oil quality of tetraploid chamomile cultivars grown in Serbia. *J Essent Oli Bear Pl* 2018;21:1,15-22.
77. Höferl M, Wanner J, Tabanca N i sur. Biological activity of *Matricaria chamomilla* essential oils of various chemotypes. *Planta Med Int Open*. 2020;7:e114-e121.
78. Alves Ade M, Gonçalves JC, Cruz JS, Araújo DA. Evaluation of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. *Neurosci Lett*. 2010;472(1):11-15.
79. Sampaio TL, Menezes RRPPB, Lima DB, et al. Involvement of NADPH-oxidase enzyme in the nephroprotective effect of (-)- α -bisabolol on HK2 cells exposed to ischemia - Reoxygenation. *Eur J Pharmacol*. 2019;855:1-9.
80. Amora-Silva BF, Ribeiro SC, Vieira CL, et al. Clinical efficacy of new α -bisabolol mouthwashes in postoperative complications of maxillofacial surgeries: a randomized, controlled, triple-blind clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2019;23(2):577-584.
81. Melo LT, Panchalingam V, Cherkas P, Campos AR, Avivi-Arber L, Sessle BJ. (-)- α -Bisabolol reduces nociception and trigeminal central sensitisation in acute orofacial neuropathic pain induced by infraorbital nerve injury. *Life Sci*. 2019;227:122-128.

82. Ma D, He J, He D. Chamazulene reverses osteoarthritic inflammation through regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and NF- κ B pathway in in-vitro and in-vivo models. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020;84(2):402-410.
83. Wang X, Dong K, Ma Y, Jin Q, Yin S, Wang S. Hepatoprotective effects of chamazulene against alcohol-induced liver damage by alleviation of oxidative stress in rat models. *Open Life Sci.* 2020;15(1):251-258.
84. Capuzzo A, Occhipinti A, Maffei ME. Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. *Nat Prod Res.* 2014;28(24):2321-2323.
85. Ornano L, Venditti A, Ballero M, et al. Chemopreventive and antioxidant activity of the chamazulene-rich essential oil obtained from *Artemisia arborescens* L. growing on the Isle of La Maddalena, Sardinia, Italy. *Chem Biodivers.* 2013;10(8):1464-1474.
86. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 2001.

7. ŽIVOTOPIS

Ines Job

Zaposlenje:

2020. – danas Ljekarna Štefanić Đurđevac, magistra farmacije u ljekarni (voditelj ljekarne)

2016. – 2020. Ljekarna Marija Hajdinjak, mag.pharm. Koprivnica, magistra farmacije u ljekarni

2015. – 2016. ZU za ljekarničku djelatnost Vaše Zdravlje Čakovec, magistra farmacije u ljekarni

2014. – 2015. Belupo d.d. Zagreb, Stručni suradnik za Razvoj poslovanja

2013. – 2014. Belupo d.d. Koprivnica, Rukovoditelj u Proizvodnji polukrutih i tekućih lijekova

2012. – 2013. Belupo d.d. Koprivnica, Tehnolog u Proizvodnji polukrutih i tekućih lijekova

2011. – 2012. Belupo d.d. Koprivnica, Pripravnik u Proizvodnji polukrutih i tekućih lijekova

Školovanje:

2018. – 2022. Poslijediplomski specijalistički studij “Fitofarmacija s dijetoterapijom“, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilište u Zagrebu

2005. – 2011. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, studij Farmacije

2001. – 2005. Opća gimnazija „Fran Galović“, Koprivnica

Akademski naslovi:

mag. pharm.

Članstva:

Hrvatska ljekarnička komora