

EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

Ekstrahavimo įtaka skysto jonažolių ekstrakto kokybei

Kristina Ramanauskienė, Arūnas Savickas, Jurga Bernatoniene

Kauno medicinos universiteto Vaistų technologijos ir farmacijos organizavimo katedra

Raktažodžiai: jonažolė, skystasis ekstraktas, depresija.

Santrauka. Naudodami remaceracijos, perkoliacijos ir reperiokoliacijos metodus, pagaminome skystąjį jonažolių ekstraktą. Gaminant remaceracijos metodu, augalinė žaliava nevisiškai išsiekstrahuoja, todėl šio metodo atsisakėme. Perkoliacijos metodu gaminant ekstraktą, būtinas mažos koncentracijos garinimo procesas, kurio metu gali suskilti veikliosios medžiagos. Šis metodas neefektyvus skystajam jonažolių ekstraktui gaminti. Pagaminome skystąjį jonažolių ekstraktą užbaigto ciklo reperiokoliacijos metodu: padalijus augalinę žaliavą į nelygias ir lygias dalis. Nustatėme, kad hipericino, flavonoidų ir sauso likučio koncentracija didžiausia ekstrakto, pagamintame užbaigto ciklo reperiokoliacijos metodu padalijus augalinę žaliavą į lygias dalis. Parinkome optimalų jonažolių žolės ekstrahavimo metodą – užbaigto ciklo reperiokoliacija padalijus augalinę žaliavą į lygias dalis. Eksperimento metu nustatėme, kad veikliųjų medžiagų išsiskyrimui iš augalinės žaliavos įtakos turi augalinės žaliavos užpildymo tankis. Nustatėme, kad optimalus žaliavos užpildymo tankis – 0,11 g/cm³. Parinktas tinkamumo laikas – dveji metai.

Įvadas

Jonažolių žolės (*Hyperici herba*) preparatai, kaip antidepresantai, ypač populiarūs Vakarų Europos šalyse. Vokietijoje gaminama daugiau kaip 300 rūšių jonažolės preparatų (1). Ši šalis yra lyderė jonažolės tyrinėjimų srityje (1, 2). Tuo tarpu Lietuvoje augančių jonažolių žolės preparatų asortimentas labai mažas. Todėl nusprendėme pagaminti skystąjį jonažolių ekstraktą, kuris rekomenduotinas vartoti sergant lengvomis depresijos formomis. Norint pagaminti kokybišką skystąjį jonažolių ekstraktą, būtina parinkti tinkamą ekstrahavimo metodą. Žaliavos ekstrahavimas – viena svarbiausių tinktūrų ir ekstraktų gamybos stadijų (3). Skystieji ekstraktai gaminami remaceracijos, perkoliacijos ir reperiokoliacijos metodais. Dažniausiai naudojami ekstrahavimo metodai skystųjų ekstraktų gamybai – perkoliacija ir reperiokoliacija (4). Žaliavos ekstrahavimui gali būti naudojama daug reperiokoliacijos metodo variantų, pavyzdžiui, Rusijoje populiariausias priešsrautinis reperiokoliacijos metodas (5). Lietuvos farmacijos pramonėje reperiokoliacijos metodas naudojamas labai retai, todėl šio metodo pritaikymas skystųjų ekstraktų gamybai neištirtas. Be šių metodų vaistinių augalinių žaliavų ekstrahavimui gali būti naudojama elektros srovė ir ultragarsas (4, 5). Šie metodai Lietuvos farmacijos pramonėje nenu-

dojami. Parinkus optimalų ekstrahavimo metodą, galima išskirti daugiau biologiškai aktyvių medžiagų iš ekstrahuojamos žaliavos, pagaminti geresnės kokybės preparatus ir pasiekti geresnio jų poveikio. Tyrimo tikslas – įvertinti žaliavos ekstrahavimo įtaką skystojo jonažolių ekstrakto kokybei.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Tyrimo objektas – skystasis jonažolių ekstraktas – tai jonažolių žolės (*Hyperici Herba*) etanolinė ištrauka, kai ekstrahentu naudojamas etanolis 70 tūris/tūris (v/v) procentų (proc.), o žaliavos ir ekstrahento santykis yra 1:2. Naudojama augalinė žaliava (jonažolių žolė) turi atitikti Europos farmakopėjos 2001:1438 straipsnio reikalavimus (6). Etanolis turi atitikti Europos farmakopėjos 01/2002:1317 straipsnio reikalavimus (6). Parinkdami tinkamą ekstrahavimo metodą skystojo jonažolių ekstrakto gamybai, jonažolių žolę ekstrahavome remaceracijos, perkoliacijos metodais bei užbaigto ciklo reperiokoliacijos metodu: padaliję augalinę žaliavą į lygias ir nelygias dalis (4, 5, 7). Gaminant skystąjį jonažolių ekstraktą remaceracijos metodu, reikiamas ekstrakto kiekis gaunamas kelis kartus užpylus ekstrahento ant žaliavos atitinkamu santykiu. Ant išbrinkintos žaliavos užpilama tiek ekstrahento, kad apsemtų ne mažiau kaip 30–40 mm (4,

5). Po 24 val. nupylėme pirmąją dalį ištraukos ir užpylėme atitinkamu ekstrahento kiekiu. Po 24 val. nupylėme likusį ištraukos kiekį ir pagaminome skystąjį jonažolių ekstraktą santykiu 1:2. Gaminant skystąjį jonažolių ekstraktą perkoliacijos metodu, išbrinkusi jonažolių žolė užpilama ekstrahentu ir paliekama maceruoti 24 valandoms. Po to perkoliuojama ir gaunama didelės koncentracijos ištrauka (85 proc. nuo bendrojo ekstrakto kiekio). Silpnoji ištrauka nupilinėjama tol, kol iš augalinės žaliavos visiškai išplaunamos biologiškai aktyviosios medžiagos. Mažos koncentracijos ištrauka garinama rotaciniame garintuve iki 15 proc. bendro skystojo ekstrakto kiekio (4, 5, 7). Didelės ir mažos koncentracijos ištraukos supilamos į vieną indą ir gaunamas reikiamas kiekis skystojo jonažolių ekstrakto. Skystąjį jonažolių ekstraktą gaminame užbaigto ciklo reperkoliacijos metodu: padaliję augalinę žaliavą į lygias ir nelygias dalis. Gaminant pirmuoju būdu, augalinę žaliavą padalijama į tris nelygias dalis: 50 dalių žaliavos dedama į pirmą perkoliatorių, 30 dalių – į antrą ir 20 dalių – į trečią (5). Antruoju būdu gaminant skystąjį jonažolių ekstraktą, naudojama augalinė žaliava padalijama į lygias dalis. Perkoliatorių skaičius priklauso nuo gaminamo ekstrakto kiekio atsižvelgiant į žaliavos užpildymo tankį. Visais nurodytais ekstrahavimo metodais pagamintą skystąjį jonažolių ekstraktą filtravome ir analizavome. Tiriant ekstrakto stabilumą (24 mėnesius), skystas jonažolių ekstraktas buvo laikomas 15–25°C temperatūroje (8). Ekstrakto kokybę įvertinome nustatę santykinį tankį, etanolio, sausojo likučio kiekį, suminį flavonoidų kiekį, perskaičiuotą į rutiną ir suminį hipericino kiekį. Sausojo likučio kiekį nustatėme gravimetrijos metodu. Suminį flavonoidų kiekį, perskaičiuotą į rutiną (proc.), ir suminį hipericino kiekį (proc.) nustatėme spektrofotometrijos metodu. Flavonoidus nustatėme atlikę spalvinės tapatybės reakcijas: su vandenilio chlorido rūgštimi ir magnio milteliais (rudai raudona spalva) (6) bei didelio slėgio chromatografijos metodu. Hipericiną nustatėme plonasluoksnės chromatografijos ir didelio slėgio skysčių chromatografijos metodais. Eksperimento duomenų analizei naudojome statistinį paketą STATISTICA. Kiekvienas bandymas kartotas penkis kartus (n=5).

Rezultatai ir jų aptarimas

Atlikę eksperimentą, nustatėme, kad skystąjį jonažolių ekstraktą gaminant remaceracijos metodu, reikiamas ekstrakto kiekis gaunamas iš dviejų ištraukų. Tačiau, remiantis eksperimento duomenimis, biologiškai aktyviosios medžiagos visiškai išekstrahuojamos nupylus ekstraktą ne mažiau kaip penkis kartus

(1 lentelė). Supylus į vieną indą pirmąją ir antrąją ištraukas, nustatėme: hipericino 0,01 proc., flavonoidų 0,63 proc., sauso likučio 3,91 proc. Supylę trečiąją, ketvirtąją ir penktąją ištraukas, nustatėme: hipericino 0,0057 proc., flavonoidų 0,24 proc., sauso likučio 1,06 proc. Tyrimo duomenys patvirtina, kad remaceracijos metodas labiau tinka tinktūrų gamybai (5, 10). Be to, nupilamų ištraukų skaičius ypatingai turi įtakos gaminamo preparato kokybei. Mūsų atlikto tyrimo duomenys sutampa su pateiktais literatūroje, kad remaceracijos metodas yra efektyvus tada, kai gamybos metu yra nupilama ne mažiau kaip keturios ištraukos (1). Todėl, remdamiesi gautais tyrimo duomenimis, šio metodo atsisakėme.

Skystajame jonažolių ekstrakte, pagamintame perkoliacijos metodu, nustatėme didesnį flavonoidų, hipericino ir sausojo likučio kiekį negu ekstrakte, pagamintame remaceracijos metodu, bet jis mažesnis už kiekį ekstrakte, pagamintame užbaigto ciklo reperkoliacijos metodu padalijant augalinę žaliavą į lygias dalis. Veikliųjų medžiagų kiekis taip pat didesnis negu ekstrakte, pagamintame užbaigto ciklo reperkoliacijos metodu padalijant augalinę žaliavą į nelygias dalis (tyrimo duomenys pateikiami antroje lentelėje). Nors skystasis jonažolių ekstraktas geros kokybės, perkoliacijos metodo atsisakėme dėl šių priežasčių: a) garinimo proceso metu gali suskilti termolabilios veikliosios medžiagos (5); gaminant jonažolių koncentruotą ištrauką, rotaciniame garintuve, vakuume, procesą būtina atlikti labai lėtai ir kruopščiai, kad temperatūra nebūtų aukštesnė kaip 40°C, nes gali pakisti ištraukos sudėtis (11); b) supylus didelės ir mažos koncentracijos ištraukas į vieną indą, reikia koreguoti etanolio koncentraciją; c) mažos koncentracijos ištraukai išgarinti reikalinga speciali aparatūra.

Pagaminome skystąjį jonažolių ekstraktą užbaigto ciklo reperkoliacijos metodu padalydami augalinę žaliavą į lygias ir nelygias dalis. Šio metodo privalumas: ekstraktas visiškai nešildomas, todėl išlieka stabilios termolabiliosios medžiagos (3). Nustatėme, kad sausojo likučio, flavonoidų ir hipericino kiekis skystajame ekstrakte priklauso nuo ekstrahavimo metodo būdo. Skystajame jonažolių ekstrakte, pagamintame užbaigto ciklo reperkoliacijos metodu, padalijus augalinę žaliavą į lygias dalis, sausojo likučio, flavonoidų ir hipericino kiekis didesnis negu ekstrakte, pagamintame metodu, kai žaliava padalijama į nelygias dalis (2 lentelė).

Įvertinę tyrimo duomenis, skystojo jonažolių ekstrakto gamybai parinkome užbaigto ciklo reperkoliacijos metodą padalydami augalinę žaliavą į lygias dalis. Pasirinkę šį metodą, įvertinome, kaip veikliųjų

1 lentelė. Remaceracijos įtaka veikliųjų medžiagų išeigai gaminant skystąjį jonažolių ekstraktą santykiu 1:2

Nustatomos medžiagos, proc.	Ištraukų skaičius				
	1	2	3	4	5
Hipericinas	0,0080±0,0002	0,0035±0,0004	0,0030±0,0001	0,0018±0,0002	0,0010±0,0005
Flavonoidai	0,61±0,06	0,69±0,09	0,22±0,07	0,27±0,03	0,25±0,04
Sausasis likutis	3,71±0,14	3,94±0,25	1,05±0,18	1,11±0,29	1,10±0,31

2 lentelė. Ekstrahavimo įtaka veikliųjų medžiagų išeigai gaminant skystąjį jonažolių ekstraktą santykiu 1:2

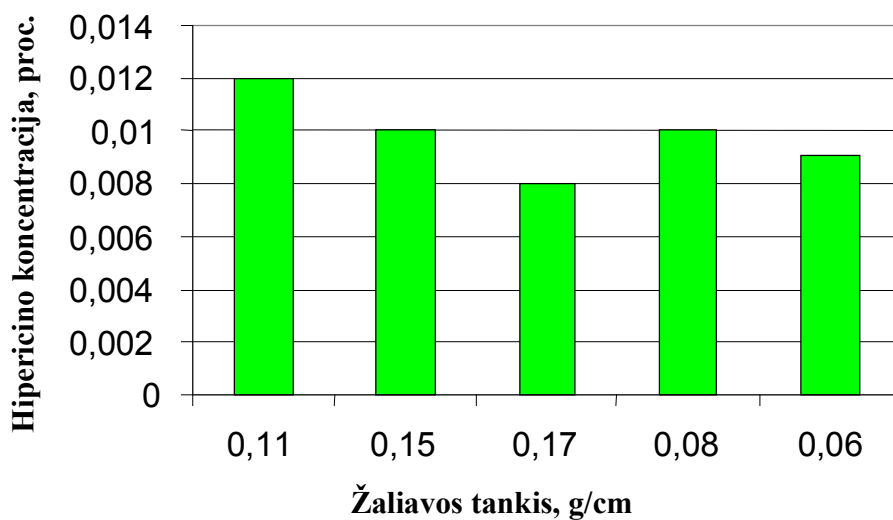
Nustatomos medžiagos, proc.	Ekstrahavimo metodas		
	perkoliacija	reperkoliacija užbaigto ciklo padalijant žaliavą į nelygias dalis	reperkoliacija užbaigto ciklo padalijant žaliavą į lygias dalis
Hipericinas	0,028±0,0004	0,0108±0,0005	0,031±0,0002
Flavonoidai	1,03±0,02	0,74±0,05	1,15±0,027
Sausasis likutis	4,97±0,13	4,00±0,10	6,36±0,24

medžiagų išsiskyrimui iš augalinės žaliavos įtakos turi augalinės žaliavos užpildymo tankis (g/cm^3). Šis rodiklis lemia žaliavos sluoksnio pralaidumą, kuris priklauso nuo žaliavos smulkumo ir tarpelių tarp žaliavos dalelių (12). Nuo žaliavos sluoksnio poringumo priklauso ekstrahuojamas žaliavos plotas. Norėdami nustatyti optimalų žaliavos užpildymo tankį, pagaminome ekstraktą, parinkę skirtingus žaliavos užpildymo tankius: 0,11, 0,15, 0,17, 0,08, 0,06 g/cm^3 . Kai žaliavos užpildymo tankis 0,11 g/cm^3 , ekstrahentas geriausiai prateka per ekstrahuojamą žaliavą, nes išsekstrahuoja didžiausias kiekius biologiškai aktyviųjų medžiagų. Visi jonažolių preparatai, vartojami depresijai gydyti, standartizuojami pagal hipericiną (2, 13, 14), todėl ypač svarbu išekstrahuoti kuo didesnę jo kiekį iš augalinės žaliavos. Nustatėme, kad hipericino kiekis didžiausias ištraukoje, kai žaliavos užpildymo tankis yra 0,11 g/cm^3 . Kiek hipericino išsiskiria iš žaliavos, priklauso nuo žaliavos užpildymo tankio (duomenys pateikiami pirmame paveiksle). Taip pat įvertinome flavonoidų išsiskyrimą iš žaliavos priklausomai nuo žaliavos užpildymo tankio. Nustatėme, kad didžiausias flavonoidų kiekis 0,910 proc. ištraukoje, kai žaliavos užpildymo tankis yra 0,11 g/cm^3 , o mažiausias, t. y. 0,900, kai užpildymo tankis 0,17 g/cm^3 . Įvertinome žaliavos užpildymo tankio įtaką sausojo likučio kiekiui. Didžiausias sausas likutis – 5,4 proc., kai žaliavos užpildymo tankis – 0,11 g/cm^3 ,

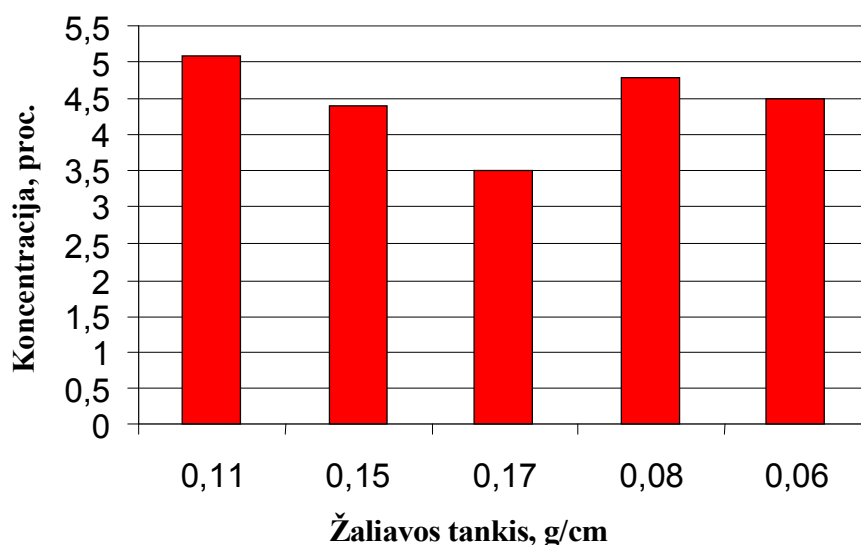
mažiausias – 3,2 proc., kai žaliavos užpildymo tankis yra 0,17 g/cm^3 .

Parinkę ekstrahavimo metodą, atlikome preparato stabilumo tyrimus siekiant nustatyti skystojo jonažolių ekstrakto tinkamumo laiką. Atliekant ekstrakto stabilumo tyrimus, visos jonažolių ekstrakto serijos išliko stabilios: skaidrios, tamsios raudonai rusvos spalvos, savito kvapo, kartoko skonio. Santykinis tankis eksperimentinėse serijose kito labai nežymiai. Pastebėta tankio didėjimo tendencija. Etanolio koncentracija taip pat kito labai mažai. Pastebėta jo mažėjimo tendencija. Apibendrinę visų penkių serijų duomenis ir juos palyginę, nustatėme statistiškai reikšmingus etanolio kiekio skirtumus visais etapais (3 lentelė). Flavonoidų kiekis kito labai nežymiai. Reikšmingo skirtumo atskirose serijose tarp flavonoidų kiekio vidurkių nenustatėme. Be to, nustatėme, kad nėra reikšmingo flavonoidų kiekio kitimo atskirais etapais. Sausojo likučio kiekis preparate laikymo metu pakito labai nežymiai. Nenustatėme reikšmingo skirtumo tarp sausojo likučio vidurkių priklausomai nuo laikymo trukmės (3 lentelė). Atliekant stabilumo tyrimus, nustatyta, kad hipericino kiekis kito labai nežymiai. Pastebėta tik mažėjimo tendencija.

Atlikę stabilumo tyrimą, nustatėme, kad skystasis jonažolių ekstraktas išliko stabilus visą saugojimo laiką. Nustatytas optimalus raminamojo ekstrakto tinkamumo laikas – dveji metai.



1 pav. Augalinės žaliavos užpildymo tankio įtaka hipericino išeigai



2 pav. Augalinės žaliavos užpildymo tankio įtaka sausojo likučio išeigai

3 lentelė. Skystojo jonažolių ekstrakto kokybinių rodiklių stabilumo tyrimas laikant 15–25°C temperatūroje

Laikotarpis	Pradinis	Po 3 mėn.	Po 6 mėn.	Po 12 mėn.	Po 18 mėn.	Po 24 mėn.
Etanolio kiekis (V/V), proc.	59,14±0,21	59,13±0,23	58,98±0,27	59,01±0,30	59,03±0,26	58,96±0,22
Sausojo likučio kiekis, proc.	6,22±0,07	6,19±0,10	6,20±0,13	6,17±0,11	6,15±0,09	6,14±0,15
Flavonoidų kiekis, proc.	1,173±0,022	1,170±0,016	1,166±0,020	1,165±0,024	1,163±0,012	0,160±0,019
Hipericino kiekis	0,0277±0,0007	0,0271±0,0008	0,0268±0,0010	0,0264±0,0009	0,0265±0,0010	0,0261±0,0012
Santykinis tankis	0,913	0,912	0,914	0,913	0,913	0,915

Išvados

1. Parinktas žaliavos ekstrahavimo metodas. Nustatytas didžiausias veikliųjų medžiagų kiekis skystajame jonažolių ekstrakto, pagamintame užbaigto ciklo reperioliacijos metodu, padalijus augalinę žaliavą į lygias dalis.

2. Įvertinta žaliavos užpildymo tankio įtaka skystojo jonažolių ekstrakto kokybei. Nustatyta, kad daugiausia biologiškai aktyvių medžiagų išsiskiria iš ža-

liavos, kai žaliavos užpildymo tankis yra 0,11 g/cm³. Parinktas tinkamiausias žaliavos užpildymo tankis – 0,11 g/cm³.

3. Atlikti skystojo jonažolių ekstrakto stabilumo tyrimai. Ekstraktas tamsaus stiklo buteliukuose laikytas 15–25°C temperatūroje. Nustatyta, kad skystojo jonažolių ekstrakto technologija užtikrina fizikinį ir cheminį preparato stabilumą dvejus metus.

The influence of extraction method on the quality of the liquid extract of St John's wort

Kristina Ramanauskienė, Arūnas Savickas, Jurga Bernatoniene

Department of Drug Technology and Pharmaceutical Management, Kaunas University of Medicine, Lithuania

Key words: St John's wort, liquid extract, depression.

Summary. The liquid extract of St John's wort was produced by methods of remaceration, percolation, and reperioculation. Extraction by remaceration did not result in the complete extraction of herbal raw material; therefore, this method was rejected. Extraction by percolation requires the process of evaporation of the weak extract to take place, during which the active substances can decompose. This method was found to be not efficient. The liquid extract of St John's wort was produced by the complete-cycle reperioculation: by dividing the raw material into unequal parts, and by dividing it into equal parts. It has been found that the highest concentration of hypericine, flavonoids and the dry remainder is obtained in the extract produced by reperioculation with raw material divided into equal parts. The optimal method of extraction for St John's wort has been confirmed to be the complete-cycle reperioculation with raw material divided into equal parts. In the course of the experiment, it was observed that the release of active substances from the raw material is influenced by the density of raw material filling. The optimal density of raw material filling has been found to be 0.11 g/cm³. The most suitable usage period was found to be 2 years.

Correspondence to K. Ramanauskienė, Department of Drug Technology and Pharmacy Organization, A. Mickevičiaus 9, 44307 Kaunas, Lithuania

Literatūra

1. Ernst E, Rand J, Barnes J. Adverse effects profile of the antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum* L). *Eur J Clin Pharmacol* 1998;54:584-94.
2. Drisoll C. Antidepressant effects of *Hyperici perforatum* on rats as evidenced by electroencephalogram. *BIO 490: Senior Seminar*; 1999.
3. Ramanauskienė K. Jonažolių tinktūros, skysto jonažolių ekstrakto ir raminančio ekstrakto technologijų sukūrimas. (Development of St. John's wort tincture, St. John's wort extract and sedative extract technologies.). Kaunas; 1999; p. 6, 13-5.
4. Pogorielova VI. Farmaceuticheskaja technologija. (Pharmaceutics technologies.) Feniks; 2002. p. 430-1.
5. Bagirov VL, Severcev VA. Nastoiki, ekstrakty, eleksiry i ikh standartizacija. (Tinctures, extracts, elixirs and their standardization.) Sankt-Peterburg; 2001. p. 90-9.
6. European Pharmacopoeia. 4th ed. Council of Europe; 2002.
7. Kurt H, Bauer, Karl-Heinz F, Claus F. Pharmazeutische technologie. (Pharmaceutics technologies.) New York; 1986. p. 440-60.
8. European Pharmacopoeia. 3rd ed. Council of Europe; 1997.
9. Sapagovas J, Vilkauskas L, Rašymas A, Šaferis V. Informatikos ir matematinės statistikos pradmenys. (Basis of informatics and mathematical statistics.) Kaunas; 2000. p. 6-32.
10. Ponamarev VD. Ekstrahirovanija lekarstvenogo sirija. (Extraction of medical raw material.) Moskva; 1976. p. 194-9.
11. Hobbs C. St. John's wort. *Herbal Gram* 1998;18-19:25.
12. Minina S, Shigarova LV. Optimizacija procesa ekstrahirovanija korne zhenshenia. (Optimization of extraction process of the Ginseng root.) *Khimiko-farmaceuticheskij zhurnal* 1999; 7:42-5.
13. Fox E, Murphy R, McCully C, et al. Plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of hypericin in nonhuman primates. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:41-4.
14. DeSmet E. St. John's Wort as an antidepressant. *Br Med J* 1999;313:241-2.

Straipsnis gautas 2004 03 23, priimtas 2004 05 31
Received 23 March 2004, accepted 31 May 2004