

Imuninę sistemą gerinančio ekstrakto technologijos ypatybės

Algirdas Baranauskas, Jurga Bernatienė, Raimondas Radžiūnas, Domininkas Bernatonis
Kauno medicinos universiteto Vaistų technologijos ir socialinės farmacijos katedra

Raktažodžiai: rausvažiedė ežiuolė, galeniniai preparatai, hidroksicinamono rūgštys, fitofarmakoterapija.

Santrauka. Straipsnyje aprašoma rausvažiedžių ežiuolių žolės etanolinio ekstrakto (1:1) gamyba parenkant ekstrahento (etanolio) koncentraciją, žaliavos dalelių dydį, ekstrahavimo būdą, ekstrakto išteklėjimo iš perkoliatoriaus greitį.

Imuninę sistemą stiprinančio ekstrakto gamybai vartojant etanolį 60 proc. (v/v), išsiekstrahuoja pigmentinės medžiagos, dėl to ištrauka įgauna žalią spalvą. Dėl to ekstrakto gamybai buvo atsisakyta vartoti etanolį 60 proc. (v/v), 70 proc. (v/v) ir 96 proc. (v/v) koncentracijos. Ištraukos gamybai rekomenduojama vartoti etanolį 50 proc. (v/v). Vartojant etanolį 40 proc. (v/v) išsiekstrahuojamos ne visos veikliosios medžiagos, be to, mažėja tinktūros mikrobinis atsparumas. Nustatyta, kad daugiausia veikliųjų medžiagų ekstrahuojama naudojant reperkoliacijos metodą. Optimalus žaliavos dalelių dydis – 3 mm. Daugiausia veikliųjų medžiagų ekstrahuota, kai ekstrakto išteklėjimo iš perkoliatoriaus greitis 0,2 ml/min.

Imuninę sistemą stiprinančio ekstrakto stabilumas tirtas stebint penkias eksperimentines preparato serijas tamsiai rudo stiklo buteliukuose esant $25 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūrai, kai santykinė drėgmė 60 ± 5 proc. Ektrakto kokybė buvo tikrinama 26 mėnesius ir nustatomi šie parametrai: lūžio rodiklis, santykinis tankis, etanolio koncentracija, sausasis likutis, cikoro rūgšties kiekis. Preparato analizė buvo atliekama kas tris mėnesius. Per visą stebėjimo laikotarpį nepakito ekstrakto spalva, kvapas, skonis. Kai kuriuose bandiniuose iškrito nuosėdų, bet tai leistina preparatams, pagamintiems iš augalinės žaliavos (veikliųjų medžiagų kiekis buvo leistinų ribų). Įvertinus gautus duomenis, galima teigti, jog imuninę sistemą stiprinančio preparato tinkamumo laikas – dveji metai.

Įvadas

Pastaraisiais metais daugeliui alerginių, autoimuninių, onkologinių infekcinių ligų gydymui vietoje sintetinių vaistų vis dažniau vartojami farmakologinio poveikio įvairovę pasižymintys vaistiniai augalai (1–7). Vienas iš tokių imunomoduliatorių yra rausvažiedė ežiuolė (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). Tai daugiametis 70–125 cm aukščio žolinis augalas, paplitęs Šiaurės Amerikoje. Į Europą pateko XVII a. Nuo 1960 m. auginama Lietuvoje (8, 9).

Vaistinei žaliai naudojami žydinti žolė (*Herba*), žiedynai (*Flores*) ir požeminė dalis, t. y. šaknys (*Radix*). Rausvažiedė ežiuolė kaupia alkilamidus, kavos rūgšties darinius, flavonoidus, polisacharidus, eterinius aliejus, makroelementus ir mikroelementus bei kitus junginius (10–12). Daugiausia ištirti ir didžiausią imunostimuliuojantį poveikį turi polisacharidai (13). Jie aktyvina ląstelių imunitetą, stiprina organizmo apsaugines funkcijas, skatina leukocitozę, pasižymi priešmikrobiniu veikimu. Augalo sudėtyje esančios fenilkarboninės rūgštys (kavos rūgštis, cikoro rūgštis

ir jų glikozidai) pasižymi bakteriocidiniu, analgetiniu bei stipriu imunomoduliuojančiu veikimu. Ežiuolės sudėtyje esantys flavonoidai taip pat pasižymi imunostimuliuojančiu veikimu (14, 15). Tyrimais nustatyta, kad Lietuvoje auginama rausvažiedė ežiuolė turtinga cikoro rūgšties (9).

Šio darbo tikslas – paruošti rausvažiedės ežiuolės žolės etanolinio ekstrakto gamybos technologiją, parinkti analizės metodikas, nustatyti stabilumą.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Eksperimentiniams tyrimams naudota:

1) rausvažiedžių ežiuolių žolė, išauginta Lietuvoje. Jos skaitmeniniai rodikliai: hidroksicinamono rūgšties darinių suma, perskaičiuota cikoro rūgštimi ne mažiau kaip 2,1 proc.; drėgmės ne daugiau kaip 13 proc.; bendro pelenų kiekio ne daugiau kaip 12 proc.; stambiųjų dalelių, nebyrančių per 7 mm diametro sieto angeles, ne daugiau kaip 5 proc.; smulkiųjų dalelių, išbyrančių per 0,25 mm diametro sieto angeles, ne daugiau kaip 20 proc.; organinių priemaišų ne daugiau

kaip 2,5 proc.; mineralinių priemaišų ne daugiau kaip 1 proc.; 2) rausvažiedžių ežiulių ekstraktas 1:1. Tyrimo metodai: maceracija, perkoliacija, reperioliacija, nusodinamosios reakcijos, plonasluoksnių chromatografija, spektrofotometrija.

Rezultatai ir jų aptarimas

Įvairių augalinių ekstraktų gamybai dažniausiai ekstrahentu vartojamas įvairios koncentracijos etanolis. Norint nustatyti, kokios koncentracijos etanolis išekstrahuoja didžiausią veikliųjų medžiagų kiekį, vartojome įvairios koncentracijos etanolį: 30 proc. (v/v), 40 proc. (v/v), 50 proc. (v/v), 60 proc. (v/v) ir 70 proc. (v/v). Gautą ištrauką vertiname pagal cikoro rūgšties kiekį ir pagal jos išvaizdą. Gauti duomenys pateikti pirmoje lentelėje.

Lentelės duomenimis, daugiausia cikoro rūgšties išsieksstrahuoja vartojant etanolį 70 proc. (v/v), tačiau vartojant 60 proc. (v/v) etanolį pradeda išsieksstrahuoti ir pigmentinės medžiagos, o ištrauka įgauna žalią spalvą, todėl ekstrakcijai etanolio 60 proc. (v/v) ir 70 proc. (v/v) atsisakėme ir rekomenduojame vartoti etanolį 50 proc. (v/v).

Remiantis literatūros duomenimis, vaistinės medžiagos dalelių dydis turi didelę įtaką preparato kokybei (16). Eksperimentinių tyrimų metu tyrėme žaliavos smulkumo įtaką cikoro rūgšties ekstrakcijos dydžiui. Žaliavą susmulkinome iki dalelių, byrančių per 7–6 mm; 4–5 mm; 3–2 mm ir 1–0,5 mm sietų

angeles. Ekstrakcijai vartojome etanolį 50 proc. (v/v). Po keleto eksperimentų nustatėme, kad daugiausia cikoro rūgšties išsieksstrahuoja, kai yra kuo smulkesnė žaliava, nes padidėja ekstrahento ir žaliavos sąlytis, tačiau daugiau išsieksstrahuoja ir balastinių medžiagų, be to, tokią ištrauką sunku nufiltruoti, todėl rekomenduojame žaliavą smulkinti iki dalelių, byrančių per 3 mm diametro sieto angeles.

Veikliųjų medžiagų ekstrakcijai iš augalinės žaliavos naudojami įvairūs ekstrahavimo metodai: maceracija, perkoliacija, reperioliacija (17). Ištyrėme, kokį ekstrahavimo būdą reikia naudoti, kad išsieksstrahuotų didžiausias veikliųjų medžiagų kiekis. Gauti duomenys pateikiami pirmame paveiksle.

Paveiksle pateiktais duomenimis, naudojant reperioliacijos metodą, daugiau išsieksstrahuoja veikliųjų medžiagų. Veikliųjų medžiagų ekstrakcija iš augalinės žaliavos priklauso ir nuo ekstrakto išteikėjimo greičio. Esant vienodai perkoliatorių pakrovai, perkoliaciją atlikome 0,2 ml/min.; 0,5 ml/min.; 1 ml/min. ir 2 ml/min. greičiu. Daugiausia veikliųjų medžiagų radome perkoliate, surinktame 0,2 ml/min. greičiu.

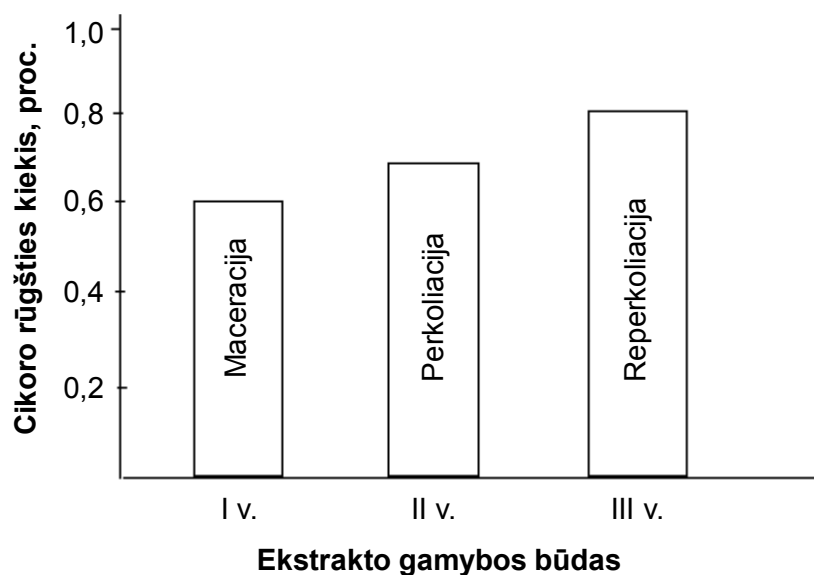
Remdamiesi tyrimų duomenimis, parinkome optimalią rausvažiedžių ežiulių ekstrakto gamybos technologiją: žaliavos dalelių dydis – 3 mm, ekstrahentas – etanolis 50 proc. (v/v), ekstrakto išteikėjimo iš perkoliatoriaus greitis – 0,2 ml/min., ekstrahavimo būdas – reperioliacija.

Surinktą ekstraktą laikėme vėsioje vietoje šešias

1 lentelė. Etanolio koncentracijos įtaka cikoro rūgšties kiekiui*

Etanolio koncentracija, proc. (v/v)	Statistiniai dydžiai	Cikoro rūgšties kiekis, proc.				
		1 serija	2 serija	3 serija	4 serija	5 serija
30	\bar{x}	0,56	0,61	0,59	0,60	0,59
	S	0,015	0,013	0,016	0,011	0,014
	$S_{\bar{x}}$	0,0075	0,0065	0,0080	0,0055	0,0070
40	\bar{x}	0,67	0,70	0,66	0,65	0,67
	S	0,014	0,015	0,012	0,013	0,011
	$S_{\bar{x}}$	0,0070	0,0075	0,0060	0,0065	0,0055
50	\bar{x}	0,70	0,73	0,70	0,71	0,72
	S	0,01	0,011	0,013	0,014	0,01
	$S_{\bar{x}}$	0,005	0,0055	0,0065	0,0070	0,005
60	\bar{x}	0,71	0,74	0,75	0,76	0,74
	S	0,015	0,014	0,013	0,01	0,012
	$S_{\bar{x}}$	0,0075	0,007	0,0065	0,005	0,006
70	\bar{x}	0,78	0,76	0,79	0,77	0,78
	S	0,017	0,015	0,016	0,014	0,017
	$S_{\bar{x}}$	0,0085	0,0075	0,0080	0,0070	0,0085

* kiekvienai serijai atlikta po penkis bandymus.



Pav. Ekstrahavimo metodo įtaka cikoro rūgšties kiekiui

2 lentelė. Rausvažiedės ežiulės ekstrakto analizės duomenys

Serijos žymuo	Išvaizda	Tapatybė			Sunkieji metalai ne >0,01 proc.	Cikoro rūgšties kiekis ne <0,7 proc.	Sausas likutis ne <10 proc.	Lūžio rodiklis 1,370–1,380	Santykinis tankis ne >0,998	Etanolio koncentracija ne <45 proc.
	rudos spalvos savito kvapo skystis	oksidinamono rūgštys	kavos rūgštis	fenoliniai junginiai						
001	Atitinka	+	+	+	Nerasta	0,80±0,03	13,2±0,09	1,375	0,994	46,7±0,1
002	Atitinka	+	+	+	Nerasta	0,77±0,02	12,9±0,07	1,377	0,993	46,4±0,09
003	Atitinka	+	+	+	Nerasta	0,79±0,02	13,1±0,05	1,375	0,996	46,8±0,08
004	Atitinka	+	+	+	Nerasta	0,76±0,03	12,8±0,06	1,376	0,992	46,9±0,05
005	Atitinka	+	+	+	Nerasta	0,78±0,04	13,0±0,07	1,378	0,995	46,6±0,06

paras, po to jį dekantavome ir nufiltravome. Paruoštas ekstraktas esti rudos ar gelsvai rudos spalvos, savito kvapo skaidrus skystis.

Ekstrakto kokybę vertinome pagal išvaizdą, cikoro rūgšties kiekį, sausąjį likutį, santykinį tankį, lūžio rodiklį, etanolio koncentraciją, mikrobinių užterštumą. Duomenys pateikiami antroje lentelėje.

Cikoro rūgšties buvimą įrodėme spektrofotometrinio metodu. Matavome ekstrakto tirpalo 0,1 M vandenilio chlorido rūgšties tirpale absorbcijos dydį nuo 200 iki 400 nm bangų ilgiuose. Cikoro rūgščiai būdingas absorbcijos maksimumas – 328±2 nm bangos ilgyje. Kavos rūgšties buvimą įrodėme plonasluoksnės chromatografijos metodu. Tam panaudojome chromatografines plokštes „Silufol“. Tirpiklių mišinys: etilacetatas – skruzdžių rūgštis – ledinė acto rūgštis – vanduo (100 : 11 : 11 : 27) (v/v). Kavos rūgščių išryškinti-

nome etanoliniu geležies (III) chlorido tirpalu ir palyginome su kavos rūgšties etalono dėme. Fenolinius junginius nustatėme su švino acetato tirpalu (geltonos spalvos nuosėdos). Kiekybiškai ekstrakto nustatėme cikoro rūgšties kiekį spektrofotometrinio metodu. Matavome jo tirpalo 0,1 M vandenilio chlorido rūgšties tirpale absorbcijos dydį 328 nm ilgio bangoje ($E \text{ 1 proc. / 1 cm} = 782$).

Sausąjį likutį, santykinį tankį, lūžio rodiklį, etanolio koncentraciją, mikrobinių užterštumą tikrinome remdamiesi Ph. Eur. 2002 m. reikalavimais (18).

Ekstraktą išpilstėme po 50 ml į tamsaus stiklo buteliukus ir laikėme 25±2°C temperatūroje, esant santykinei drėgmei 60±5 proc. Išlaikėme dvejus metus ir per tą laikotarpį ekstrakto kokybės rodikliai nepakito, išskyrus tai, kad išsiskyrė nuosėdų, o tai leistina vaisiams, pagamintiems iš augalinės žaliavos.

Išvados

1. Paruošta optimali rausvažiedės ežiulės ekstrakto (1:1) gamybos technologija: etanolio koncentracija – 50 proc. (v/v), žaliavos dalelių dydis apie 3 mm, gamybos būdas – reperkoliacija, ekstrakto ištekėjimo iš perkoliatoriaus greitis – 0,2 ml/min.

2. Parinktos ir pritaikytos pagamintam ekstraktui analizės metodikos. Kavos rūgšties tapatumui nustatyti naudotas plonasluoksnės chromatografijos meto-

das; cikoro rūgšties – spektrofotometrinis metodas, o fenolinių junginių buvimas įrodytas nuosėdas sudarančiomis kokybinėmis reakcijomis. Cikoro rūgšties kiekiui nustatyti naudotas spektrofotometrinis analizės metodas.

3. Atlikti ekstrakto stabilumo tyrimai. Nustatyta, kad, laikant ekstraktą kambario temperatūroje, jo kokybės rodikliai išlieka leistinos normos dvejus metus (stabilumo tyrimai tęsiami).

Technology of extract improving the immune system

Algirdas Baranauskas, Jurga Bernatoniene, Raimondas Radziunas, Domininkas Bernatonis

Department of Drug Technology and Social Pharmacy, Kaunas University of Medicine, Lithuania

Key words: *Echinacea purpurea*, galenical preparations, chicoric acid, phytopharmacotherapy.

Summary. The article deals with the production of the extract of *Echinacea purpurea* herbs when selecting an extractant concentration, the size of particles in a raw material and the method of extraction.

Using 60% (v/v) ethanol for production of the immune system enhancing extract, the extract becomes green due to pigmental substances; therefore, 60% (v/v), 70% (v/v), and 96% (v/v) ethanol was not used for extraction. It is recommended to use 50% (v/v) ethanol for extraction. Using 40% (v/v) ethanol not all active substances are extracted and resistance of the extract to microbial contamination is weaker. It was determined that the method of repercolation should be used to yield the largest amount of active substances. The largest amount of active substances in the immune system enhancing extract was obtained when the flow speed of extract was 0.2 ml/min.

The quality of extract was tested within the period of 26 months by the monitoring of following parameters: appearance of the extract, refraction index, relative density, ethanol concentration, the amounts of dry residue and chicoric acid. The analysis was carried out every three months. The samples of the extract remained stable during storage: no alterations of color, smell or taste were observed. Some of the samples had deposits, which is quite natural in the production of drugs from herbal material, as they have no influence on the quality of the drug (the amounts of active substances were found to be within acceptable limits). On the basis of the obtained results, the period of expiry of the immune system enhancing tincture was confirmed to be 2 years.

Correspondence to A. Baranauskas, Department of Drug Technology and Social Pharmacy, Kaunas University of Medicine, Sukilėlių 51, 50161 Kaunas, Lithuania

Literatūra

- Schoneberger D. The influence of immune – stimulating effects of pressed juice from *Echinacea purpurea* on the course and severity of colds. *Forum Immunologie* 1992;8:2-12.
- Foster S. *Echinacea Nature's Immune Enhancer*. Rochester: Vermont; 1991. p. 150.
- Ragažinskienė O, Varkulevičienė, Stankevičienė A. Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo oranžerijoje auginančių vaistinių augalų rūšių įvairovė. (Diversity of medicinal plant species grown in the greenhouse of Kaunas Botanical Garden of Vytautas Magnus University). *Medicina (Kaunas)* 2004;40:783-6.
- Masteiková R, Chalupová Z, Šklubalová Z. Stimuli-sensitive hydrogels in controlled and sustained drug delivery. *Medicina (Kaunas)* 2003;39 Suppl 2:19-24.
- Ragažinskienė O. Vaistinių augalų tyrinėjimai Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sode. (Research of medicinal plants at Kaunas Botanical Garden of Vytautas Magnus University). *Medicina (Kaunas)* 2004;40:801-6.
- Coeugniet EG, Elek E. Immunomodulation with viscum album and *Echinacea purpurea* extracts. *Onkologie* 1987;3:27-33.
- Bauer R, Jurcic K, Puhlmann J, Wagner H. Immunologische on vivo und in vitro untersuchungen mit *Echinacea* – Extrakten. *Arzneimforsch Bd* 1988;38:276-81.
- Ragažinskienė O. Purpurinės ežiulės (*Echinacea purpurea* L. Moench) introdukcija Lietuvoje. (The introduction of Purple Coneflower in Lithuania). *Daktaro disertacijos santrauka*. Kaunas; 1999. p. 40.
- Lapinskienė S, Ragažinskienė O, Rimkienė S. *Echinacea purpurea* (L. Moench) fenologija ir biologinis produktyvumas. (Phenology and biological productivity of *Echinacea purpurea* (L. Moench)). *Botanica Lithuanica* 1999;5(1):41-59.
- Bauer R. *Echinacea* drugs – effects and active ingredients.

- UI – 96239740. Medline Database Med; 1996. p. 95-7.
11. Becker H, Hsich W. Chicoree und deren Derivate aus Echinacea – Arten. Naturforsch Bd 1985;40:585-7.
 12. Migel P, Klinik JW. Alkilamide levels in *Echinacea purpurea*. J Toxol Toxin Rev 1995;14(2):119.
 13. Luetting B, Steinmuller C. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. J Natl Cancer Inst 1989;81(9): 669-75.
 14. Melchart D. Immunomodulation with Echinacea – a systematic review of controlled Clinical trials. Phyto-medicine 1994; 1:245-54.
 15. Jurkštienė V, Kondratas AJ, Kėvelaitis E. Imuninės sistemos kompensacinės reakcijos ir rausvažiedės ežiuolės (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) preparatų poveikis. (Compensatory reactions of immune system and action of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) preparations.) Medicina (Kaunas) 2004;40(7):657-62.
 16. Chalupová Z, Jaborník M, Scheerová I, Rabišková M. Příspěvek ke stanovení velikosti částic v polotuhých emulzních systémech. (A contribution to the estimation of particle size in semisolid emulsion systems.) Česká a slovenská farmacie 1999;48(3):126-8.
 17. Savickas A, Ramanauskienė K, Savickienė N, Kazlauskas S, Masteikova R, Chalupova Z. Výběr vyluhovadla a vypracování technologie výroby extraktu s uklidňujícím účinkem. (Selection of the extraction agent and the elaboration of the technology of the production of an extract with a sedative effect). Česká a slovenská farmacie 2004;53(1):35-8.
 18. European Pharmacopeia. Strasbourg; 2002. p. 0792.

Straipsnis gautas 2004 12 08, priimtas 2005 05 02

Received 8 December 2004, accepted 2 May 2005