

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE PERKO

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE PERKO

**PROTIGLIVIČNO DELOVANJE IZVLEČKA IZ ZELI IN  
KORENINE ŠKRLATNE EHINACEJE (*ECHINACEA PURPUREA*)**

**ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PURPLE CONEFLOWER  
(*ECHINACEA PURPUREA*) HERB AND ROOT EXTRACT**

UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta. Preskus občutljivosti gliv so opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Univerze v Ljubljani.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se prof. dr. Samu Kreftu za mentorstvo pri diplomskem delu in številne nepogrešljive usmeritve. Prav tako se zahvaljujem osebju Katedre za farmacevtsko biologijo, ki so s praktičnimi nasveti olajšali moje laboratorijsko delo.

Hvala staršema, ki sta mi omogočila študij ter me pri tem vseskozi podpirala in spodbujala. Hvala Blažu, Roku, Alji in Anji – ker ste.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta.

# Vsebina

1 Uvod .....	5
1.1 Ehinaceja .....	5
1.2 Škrlatna ehinaceja.....	5
1.2.1 Opis.....	5
1.2.2 Fitokemične lastnosti .....	6
1.2.3 Farmakološke raziskave.....	7
1.2.4 Tradicionalna uporaba.....	11
1.2.5 Uporaba danes.....	12
1.3 Okužbe z glivami.....	13
1.4 Separacija tekoče-tekoče.....	14
1.5 Tankoplastna kromatografija.....	14
1.6 Metode ugotavljanja protiglivičnega delovanja .....	16
2 Namen dela.....	17
3 Materiali in metode .....	17
3.1 Materiali.....	17
3.2 Priprava vzorca za zaporedno ekstrakcijo .....	18
3.3 Zaporedna ekstrakcija.....	19
3.4 Tankoplastna kromatografija.....	20
3.5 Identifikacija kromatografskih lis.....	21
3.6 Gravimetrična analiza .....	22
3.7 Protiglivična učinkovitost.....	22
4 Rezultati in razprava.....	24
4.1 Zaporedna ekstrakcija.....	24
4.2 Tankoplastna kromatografija.....	25
4.3 Identifikacija kromatografskih lis.....	27
4.4 Gravimetrična analiza .....	29
4.5 Protiglivična učinkovitost.....	30
5 Sklep.....	32
6 Literatura .....	33

## Povzetek

Pripravki škrlatne ehinaceje imajo dolgo tradicijo medicinske uporabe. V farmakoloških raziskavah so pokazali vpliv na imunski sistem in protivnetno ter protimikrobno delovanje (proti virusom, bakterijam in glivam). Strokovne organizacije jih večinoma priporočajo pri prehladih in okužbah dihal.

Pogostnost okužb z glivami skokovito narašča, čeprav so sistemske okužbe z njimi razmeroma redke, pogostejše pa so okužbe kože in sluznic. Zdravimo jih z antimikotičnimi zdravili, ki delujejo na celično steno ali v jedru celic gliv.

Glavni cilj tega diplomskega dela je bil ugotoviti, ali ima kombinacija izvlečka zeli in izvlečka iz korenine škrlatne ehinaceje protiglivični učinek in katerim frakcijam, pripravljenim z zaporedno ekstrakcijo, lahko pripišemo ta učinek.

Ugotovili smo, da nerazredčen etanolni izvleček zeli in korenine škrlatne ehinaceje deluje proti glivam *Candida glabrata*, *Aspergillus niger* in *Aspergillus fumigatus* bolj kot kontrola z enako koncentracijo etanola. Od vseh frakcij je protiglivično delovanje pokazala le butanolna frakcija, in sicer proti glivama *Candida glabrata* in *Aspergillus niger*. Tako izvleček zeli in korenine škrlatne ehinaceje kot tudi njegove frakcije z redčitvijo hitro izgubljajo protiglivično delovanje, zato je neposreden učinek peroralno apliciranega pripravka na sistemske okužbe z glivami vprašljiv. Bolj pa je verjetno, da je pripravek učinkovit za dermalno zdravljenje okužb kože in sluznic z glivami.

## Abstract

Purple coneflower preparations have a long tradition of medicinal use. Pharmacological experiments with these preparations showed influence on immune system and anti-inflammatory and antimicrobial activity (against viruses, bacteria and fungi). Scientific organizations mostly recommend them for treatment of colds

and respiratory tract infections.

Incidence of fungal infections is rapidly increasing, although systemic fungal infections are rare. Infections of skin and mucous membranes are, however, more frequent. These conditions are treated with antimycotic medicines which effect fungal cell wall or nucleus.

Main aim of this research was to establish whether combination of Purple coneflower herb and root extract possess antifungal activity and to which fractions (prepared with consecutive extraction) can this effect be attributed.

We established that undiluted ethanolic extract of Purple coneflower herb and root act against *Candida glabrata*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* more than control preparation with equal content of ethanol. Of all fractions, only butanolic showed antifungal activity – against *Candida glabrata* and *Aspergillus niger*. Antifungal activity of extract and its fractions rapidly decreases with dilution; therefore, a direct effect of orally applied preparation on systemic fungal infections is questionable. It is, however, more likely that the preparation is effective for dermal treatment of fungal infections of skin and mucous membranes.

## **Ključne besede**

škrlatna ehinacea, protiglivično delovanje, zaporedna ekstrakcija, tankoplastna kromatografija, gravimetrična analiza

## **Keywords**

Purple coneflower, antifungal effect, consecutive extraction, thin-layer chromatography, gravimetric analysis

## Seznam okrajšav

ATCC: *American Type Culture Collection*

ESCOP: Evropska znanstvena kooperativa za fitoterapijo

HIV: virus humane imunske pomanjkljivosti

HMPC: Odbor za zdravila rastlinskega izvora

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

McF: *McFarland*

NST/PEG: *Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagens* (orositveni reagent s polietilenglikolom za dokazovanje naravnih pripravkov)

PEG: polietilenglikol

Ph. Eur.: Evropska farmakopeja

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium* (medij za gojenje celičnih kultur)

TLC: tankoplastna kromatografija

UV: ultravijoličen

# 1 Uvod

## 1.1 Ehinaceja

Ehinaceja ali ameriški slamnik je zelnata trajnica, ki spada v družino nebinovk (*Asteraceae*) oziroma košaric (*Compositae*) (1). Ime *echinacea* izvira iz grške besede *echinos*, ki pomeni jež - osrednji del cvetnega koša namreč spominja nanj (2).

Poznamo več vrst ehinaceje, v medicini pa uporabljamo tri:

- škrlatna ehinaceja (*Echinacea purpurea*),
- ozkolistna ehinaceja (*Echinacea angustifolia*),
- bleda ehinaceja (*Echinacea pallida*) (1, 2).

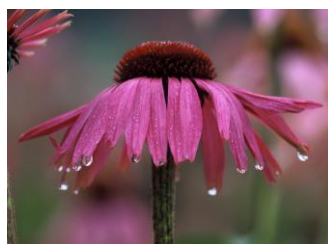
Zdravila, ki vsebujejo ehinacejo, so izdelana iz njene zeli (stisnjen sok ali tekoči izvleček) in/ali korenine (tekoči izvleček) (2). Pripravki iz drugih delov ehinaceje niso običajni.

V tem diplomskem delu smo preučevali kombinacijo izvlečka iz zeli in izvlečka iz korenine škrlatne ehinaceje.

## 1.2 Škrlatna ehinaceja

### 1.2.1 Opis

Škrlatna ehinaceja je visoka od 60 do 180 cm s pokončnim, malo razvejanim stebлом in značilnimi škrlatnimi jezičastimi cvetovi (2).



Slika 1. Cvet škrlatne ehinaceje

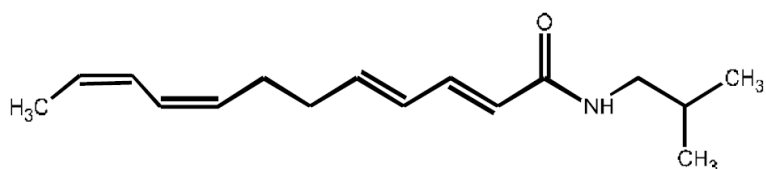


Škrlatna ehinacea cveti od junija do septembra. Rastlina je bila sprva endemična na vzhodnem delu Severne Amerike, danes pa jo gojijo tudi drugod (3). Njeno gojenje je razmeroma preprosto. Najbolje uspeva na peščenih tleh, na sončnih ali polsenčnih legah. Žanjemo jo popoldan, da ne ovene, in jo vezano v snope pustimo čez noč. Pobiramo jo zgodaj zjutraj, preden se otopli (2).

### 1.2.2 Fitokemične lastnosti

Kot je značilno za vse zdravilne rastline, je tudi v škrlatni ehinaceji več farmakološko aktivnih spojin, vendar natančne fitokemične sestave še niso ugotovili. Najpomembnejše skupine spojin so alkilamidi, polisaharidi in derivati kavne kisline, v novejših raziskavah pa so ugotovili, da bi škrlatna ehinacea lahko vsebovala tudi melanine (4, 5).

Alkilamidi so lipofilne spojine, ki vsebujejo amidno skupino in alkilno verigo. Alkilamid, ki ga škrlatna ehinacea vsebuje največ, je izobutilamid dodeka-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenojske kisline.

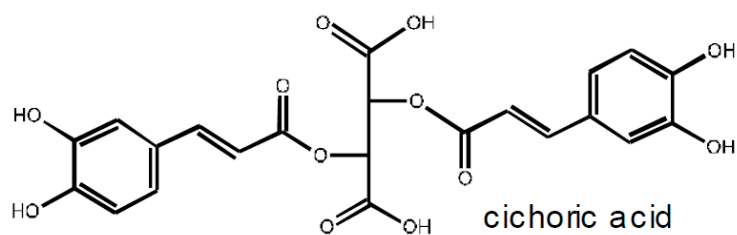


Slika 2. Izobutilamid dodeka-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenojske kisline (4)

Iz nadzemnih delov škrlatne ehinaceje so izolirali dva imunostimulativna polisaharida, ki ju označujemo s kraticama PS I in PS II. Prvi je 4-O-metilglukuronoarabinoksilan s povprečno molekulsko maso 35000, drugi pa kislinski arabinoramnogalaktan z molekulsko maso 45000. Izolirali so tudi ksiloglukan z molekulsko maso 79500 (iz zeli) in pektinu podobne polisaharide (iz stisnjene soka).

Izmed derivatov kavne kisline sta v škrlatni ehinaceji najbolj zastopana cikorna kislina (2,3-O-dikafeoil vinska kislina) (Slika 3) in kaftarna kislina (2-O-kafeoil vinska

kislina). V manjših količinah sta prisotni še 2-O-feruoil vinska kislina in 2-O-kafeoil-3-kumaroil vinska kislina.



Slika 3. Cikorna kislina (4)

Škrlatna ehinacea vsebuje še druge spojine, ki pa so terapevtsko manj pomembne; izmed njih je največ flavonoidov (na primer kvercetin) in eteričnih olj (na primer borneol) (2, 4-6).

### 1.2.3 Farmakološke raziskave

Iz pregledov raziskav s škrlatno ehinacejo je razvidno, da se večina farmakoloških raziskav osredotoča na tri področja: vpliv na imunski sistem, protivnetno delovanje in protimikrobno delovanje (proti virusom, bakterijam in glivam). Ker smo v diplomskem delu preučevali protiglivični učinek škrlatne ehinaceje, bomo v tem poglavju navedli pregled farmakoloških raziskav protimikrobnega delovanja.

Starejše raziskave bomo povzeli po dveh pregledih, o katerih bomo sicer več napisali v poglavju 1.2.5: poročilo o oceni vseh razpoložljivih podatkov o zeli škrlatne ehinaceje (4) in korenini škrlatne ehinaceje (6) Odbora za zdravila rastlinskega izvora (HMPC) pri Evropski agenciji za zdravila. Novejše raziskave smo pridobili s pomočjo iskalnika PubMed.

#### 1.2.3.1 Protivirusno delovanje

Orinda in sod. so prvi pokazali, da stisnjen sok ehinaceje zavira razmnoževanje virusov. Stisnjen sok ehinaceje je mišje celice L-929 zaščitil pred citopatskimi učinki virusa encefalomiokarditisa in virusa vezikularnega stomatitisa (4, 7).

Wacker in Hilbig sta ugotovila virustatični učinek soka zeli sveže škrlatne ehinaceje in metanolnega ter vodnega izvlečka korenine škrlatne ehinaceje. S preparativno tankoplastno kromatografijo sta pripravila frakcije navedenih izvlečkov in preverila, ali imajo virustatični učinek spojine v lisah, ki so vidne na ultravijolični (UV) svetlobi. Zaključila sta, da učinka ni mogoče pripisati spojinam v nobeni od teh lis in da so torej spojine, odgovorne za virustatični učinek, porazdeljene po celotnem kromatogramu (4, 8).

Cheminat s sod. je ugotovil, da cikorna kislina iz stisnjene soka škrlatne ehinaceje za več kot 50 % zmanjša količino virusa vezikularnega stomatitisa v mišjih celicah L-929 (4, 9).

Beuscher in sod. so pokazali protivirusni učinek visokomolekulske frakcije (polisaharidi in glikoproteini) korenine škrlatne ehinaceje proti virusu virusu herpesa simpleksa in virusu influence (6, 10).

Skwarek in sod. so preučevali protivirusno delovanje dekokta in 30-odstotnega etanolnega ekstrakta škrlatne ehinaceje. Ugotovili so, da oba pripravka zavirata znotrajcelično razmnoževanje virusa ECHO9 HILL v celični kulturi opičje ledvice (4, 11).

Binns in sod. so ugotavljali protivirusno delovanje osmih taksonov iz roda *Echinacea*. Ugotovili so protivirusni učinek proti virusu herpesa simpleksa vrste 1 po izpostavljenosti vidni in UV-A svetlobi. Bolj kot etilacetatni ekstrakti, ki vsebujejo kavno kislino, so bili učinkoviti n-heksanski ekstrakti korenine, ki vsebujejo alkene in amide (6, 12).

Hudson in sod. so preučevali protivirusno delovanje frakcij ekstraktov različnih vrst ehinaceje, med katerimi je bila tudi škrlatna ehinaceja. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) so določili koncentracijo derivatov kavne kisline in alkilamidov v teh pripravkih. Vodni ekstrakt škrlatne ehinaceje je vseboval malo

kavne kisline in alkilamidov; pokazal je razmeroma močno protivirusno delovanje proti virusu herpesa simpleksa in virusu influence, ne pa proti rinovirusu. Etilacetatna frakcija je vsebovala veliko cikorne kisline, vendar je pokazala šibko učinkovitost proti virusu herpesa simpleksa in virusu influence (13).

Vimalanathan in sod. so ugotavljali protivirusno delovanje različnih frakcij stebela, lista in cveta škrlatne ehinaceje. Pokazali so učinkovitost vseh vodnih frakcij proti virusu herpesa simpleksa in virusu influence, ne pa proti rinovirusu (14).

V raziskavi Pleschke s sod. so ugotavljali učinkovitost pripravkov škrlatne ehinaceje v različnih koncentracijah proti virusom influence H5N1, H7N7 in H1N1. Vsi pripravki so inaktivirali vse viruse influence. Avtorji so tudi pokazali, da pripravek iz škrlatne ehinaceje zavira vezavo virusa na receptor in tako verjetno preprečuje vstop virusa v celico. Primerjali so še nastanek odpornosti virusa H5N1 proti pripravku iz škrlatne ehinaceje in sintezni zdravilni učinkovini oseltamivirju (zaviralcu nevraminidaze), ki se uporablja za zdravljenje in preprečevanje gripe. Ugotovili so odpornost na oseltamivir, ne pa na pripravek iz škrlatne ehinaceje. Virusi, odporni na oseltamivir, so bili v kasnejšem poskusu dovzetni za pripravek iz škrlatne ehinaceje (15).

Sharma in sod. so ugotavljali učinkovitost izvlečka iz zeli in korenine škrlatne ehinaceje proti rinovirusom. Uporabili so tridimenzionalni model epitelijskega človeških dihal, ki so mu dodali rinovirus tipa 1A. Ugotovili so, da se rinovirusi pod vplivom pripravka škrlatne ehinaceje v epiteliju ne razmnožujejo (16).

### **1.2.3.2 Protibakterijsko delovanje**

Schulte in sod. so v dveh raziskavah ugotovili, da dva glavna alkilamida iz škrlatne ehinaceje zavirata rast bakterij *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* (4, 17, 18).

Podobno raziskavo so opravili Reisch in sod., ki so ugotovili zaviranje rasti bakterij *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* (4, 19).

Sharma in sod. so preučevali protibakterijske lastnosti izvlečka iz korenine in

kombinacije izvlečkov iz zeli ter korenine škrlatne ehinaceje. Rezultati so prikazani v Tabeli 1 (20).

Tabela 1. Občutljivost bakterij na dva pripravka iz škrlatne ehinaceje

	Kombinacija izvlečkov iz zeli in korenine škrlatne ehinaceje	Izvleček iz korenine škrlatne ehinaceje
Občutljivost	<i>S. pyogenes, H. influenzae, L. pneumophila, P. acnes, C. difficile</i>	<i>L. pneumophila</i>
Neobčutljivost ali nepomembna občutljivost	<i>S. aureus, A. baumannii, B. cereus, B. subtilis, E. faecalis, E. coli, K. pneumoniae, M. smegmatis, P. aeruginosa</i>	<i>S. pyogenes, H. influenzae, P. acne, C. difficile, S. aureus, A. baumannii, B. cereus, B. subtilis, E. faecalis, E. coli, K. pneumoniae, M. smegmatis, P. aeruginosa</i>

V nadaljnji raziskavi, ki jo je opravil Sharma s sod., so ugotavljali protibakterijsko učinkovitost kombinacije izvlečkov iz zeli in korenine škrlatne ehinaceje. Ugotovili so, da pripravek inaktivira bakterije *Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenzae* in *Legionella pneumophila* ter v manjši meri *Staphylococcus aureus* in *Mycobacterium smegmatis*. Neučinkovit pa je bil proti bakterijam *Acinetobacter baumannii, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* in *Pseudomonas aeruginosa* (21).

Sharma je s sodelavci opravil še eno raziskavo protibakterijskega delovanja kombinacije izvlečkov zeli in korenine škrlatne ehinaceje, vendar so se tokrat osredotočali le na bakterijo *Propionibacterium acnes*. Pripravek je deloval baktericidno na standardni laboratorijski sev in različne klinične izolate (22).

### 1.2.3.3 Protiglivično delovanje

V prej opisani raziskavi avtorja Reisch in sodelavcev so poleg protibakterijskega preskušali tudi protiglivično delovanje dveh glavnih alkilamidov iz škrlatne ehinaceje. Ugotovili so zaviranje rasti gliv *Aspergillus niger* in *Candida albicans* (4, 19).

V raziskavi, ki jo je opravil Binns s sod., so ugotovili, da izobutilamidi in poliacetileni in škrlatne ehinaceje zavirajo rast gliv *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shelata*, *Candida kefyr*, *Candida albicans*, *Candida steatulytica* in *Candida tropicalis*. Ob sočasnem obsevanju s svetlobo valovne dolžine blizu UV so ugotovili močnejši učinek (4, 23).

Merali in sod. so preučevali učinek izvlečkov različnih taksonov iz roda *Echinacea*, med njimi tudi učinek izvlečka škrlatne ehinaceje proti glivam *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* in *Pseudallescheria boydii*. Pripravki so pokazali učinkovitost proti večini preskušanih gliv (24).

Sharma in sod. so v prej opisani raziskavi poleg protibakterijskega ugotavljali tudi protiglivični učinek izvlečka iz korenine in kombinacije izvlečkov iz zeli ter korenine škrlatne ehinaceje. Glivi *Candida albicans* in *Trichoderma viride* nista pokazali občutljivosti na nobenega od obeh pripravkov neodvisno od prisotnosti svetlobe (20).

Tudi v naslednji raziskavi so Sharma in sod. poleg protibakterijskega delovanja raziskovali učinkovitost proti glivam. Glivi *Candida albicans* in *Trichoderma viride* sta bili razmeroma odporni na pripravek iz škrlatne ehinaceje (21).

Mir-Rashed in sod. so raziskovali mehanizem protiglivičnega delovanja ehinaceje, vendar v povzetku raziskave niso navedli, katero vrsto rastline so uporabili v raziskavi. Ugotovili so, da je tarča verjetno celična stena gliv (25).

To ugotovitev so potrdili tudi v novejši raziskavi, ki so jo opravili Cruz in sod. (26).

#### **1.2.4 Tradicionalna uporaba**

Pripravki škrlatne ehinaceje imajo dolgo tradicijo medicinske uporabe pri severnoameriških Indijancih (3, 4, 27). Ti so s pomočjo kamnov zdrobili zel ali korenino in ta pripravek uporabljali zunanje na ranah, opeklinah in pikih insektov. Pri

zobobolu in bolečinah v žrelu so žvečili korenino, peroralno pa so uporabljali pripravke iz zeli pri vročinskih boleznih, krčih v želodcu, ošpicah in gonoreji. Pri piku kače in drugih zastrupitvah so škrlatno ehinacejo uporabljali kot protistrup (3).

### 1.2.5 Uporaba danes

Na voljo so priporočila različnih strokovnih organizacij.

Nekdanja nemška Komisija E priporoča uporabo stisnjene soka iz zeli škrlatne ehinaceje kot **dodatno zdravljenje pri prehladih ter kroničnih okužbah dihal in spodnjih sečil** (2).

Monografija ESCOP (Evropske znanstvene kooperative za fitoterapijo) zel škrlatne ehinaceje priporoča peroralno za **podporno zdravljenje in preprečevanje ponavljajočih se okužb zgornjih dihal in sečil**, zunanje pa za **podporno zdravljenje površinskih ran**. Priporočene terapevtske indikacije za korenino škrlatne ehinaceje so podobne: peroralno za **podporno zdravljenje in preprečevanje ponavljajočih se okužb zgornjih dihal** (5).

Odbor za zdravila rastlinskega izvora (HMPC) pri Evropski agenciji za zdravila je leta 2008 sprejel poročilo o oceni vseh razpoložljivih podatkov o zeli škrlatne ehinaceje in leta 2010 o korenini škrlatne ehinaceje. Pri tem so upoštevali tudi omenjeno monografijo ESCOP. Na osnovi teh poročil so pripravili monografijo o zeli škrlatne ehinaceje in monografijo o korenini škrlatne ehinaceje, ki ju morajo predlagatelji v postopkih pri pristojnih organih upoštevati pri pripravi informacij o zdravilu (povzetek glavnih značilnosti zdravila, navodila za uporabo, ovojnina). V teh pregledih so za zel škrlatne ehinaceje določili terapevtsko indikacijo **kratkotrajno zdravljenje in preprečevanje prehlada**, za korenino škrlatne ehinaceje pa **podporno zdravljenje prehlada** (4, 6).

Škrlatna ehinaceja ublaži jakost simptomov prehlada in gripe ter skrajša trajanje bolezni (2).

### 1.3 Okužbe z glivami

Medicinsko pomembne glive morfološko razdelimo v tri skupine: kvasovke, plesni in dimorfne glive. Kvasovke so enocelične glive kroglaste oblike, ki se razmnožujejo z brstenjem; značilna predstavnika te skupine sta *Candida* in *Cryptococcus*. Za plesni je značilno, da rastejo v obliki dolgih niti, imenovanih hife. V to skupino spada na primer *Aspergillus*. Dimorfne glive pa imajo dvojen značaj: ko so v gostiteljskem organizmu, so kroglaste oblike (tako kot kvasovke), *in vitro* pa so nitaste kot plesni (28, 29).

Pogostnost okužb z glivami skokovito narašča, kar lahko pripišemo boleznim, ki oslabijo imunski sistem, na primer okužba z virusom humane imunskve pomanjkljivosti (HIV), premalo kritičnemu predpisovanju antibiotikov, ki rušijo ravnovesje v človekovi mikrobni flori, kemoterapiji in jemanju imunosupresivnih zdravil pri presaditvah organov (29, 30).

Z glivami se lahko okužimo z vdihovanjem spor, stikom s kožo ali neposredno inokulacijo na poškodovani koži, mestu injiciranja oziroma iatrogeno (28, 29).

Okužbe z glivami lahko glede na mesto oziroma razširjenost okužbe razdelimo na sistemske okužbe, okužbe kože in površinske okužbe. Čeprav so glive vseprisotne, so sistemske okužbe z njimi redke - običajno se pojavljajo pri posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom in pogosto povzročijo smrt. Po drugi strani pa so okužbe kože, nohtov in sluznice ust ter genitalij z glivami pogostejše, vendar redko smrtne (28, 29).

Okužbe z glivami lahko razdelimo tudi na endemske in oportunistične. Endemske okužbe povzročajo glive, ki niso del normalne človekove mikrobne flore (na primer *Coccidioides*). Oportunistične okužbe pa povzročajo glive, ki so normalno prisotne pri človeku (na primer *Candida* in *Aspergillus*); osebe z oslabljenim imunskim sistemom se zaradi njihove razširjenosti razmeroma lahko okužijo z njimi (29).

Antimikotike glede na njihovo strukturo razdelimo v sedem skupin: polieni, alilamini,



morfolini, nukleozidni analogi, azoli, ehinokandini in drugi antimikotiki. Ta zdravila antimikotični učinek dosegajo na različne načine:

- z vplivom na sintezo celične stene (ehinokanadini),
- z inhibicijo sinteze DNK in RNK v celičnem jedru (nukleozidni analogi),
- z inhibicijo mitoze v celičnem jedru (grizeofulvin, ki spada v skupino drugih antimikotikov),
- z vplivom na funkcijo celične membrane (polieni),
- z inhibicijo sinteze gradnika celične membrane ergosterola (alilamini, morfolini, azoli) (30).

#### **1.4 Separacija tekoče-tekoče**

Separacija oziroma ekstrakcija tekoče-tekoče je analizna tehnika, ki jo v farmaciji uporabljamo tako za analizo bioloških vzorcev, kot tudi farmacevtskih pripravkov. Pri tej tehniki se analiti porazdelijo v dve topili z različno polarnostjo glede na porazdelitveni koeficient. Ta je pri danih pogojih konstanten in neodvisen od količine analita. Čim večji je koeficient, tem bolj se analit ekstrahira v manj polarno fazo (31, 32).

V lij ločniku zmešamo raztopino vzorca in drugo topilo, ki se ne meša s topilom, v katerem je raztopljen vzorec. Dvofazni sistem, ki pri tem nastane, stresamo, da se majhne kapljice manj polarne faze zmešajo z bolj polarno fazo. Med stresanjem analiti prehajajo iz bolj polarne faze v manj polarno. Nato lij ločnik nekaj časa pustimo v mirovanju, da se fazi ponovno ločita. Spontana ločitev včasih traja dolgo – pospešimo jo lahko s centrifugiranjem.

Na ta način lahko izoliramo določen analit iz vzorca z več analiti, zmanjšamo kompleksnost vzorca z več analiti ali vzorec razdelimo na različno polarne frakcije (31).

#### **1.5 Tankoplastna kromatografija**

Tankoplastna kromatografija (TLC) je hitra in preprosta analizna tehnika, saj ne terja zahtevnih priprav ali aparaturo in omogoča analizo več vzorcev hkrati.

Pri tej kromatografiji je stacionarna faza v tanki plasti dispergirana na ploščo, običajno stekleno ali aluminijasto. Vzorec, ki ga želimo analizirati, raztopimo v hlapnem topilu in ga z mikropipeto nanesemo na stacionarno fazo v obliki točke ali črte. Pred nadaljevanjem postopka moramo topilo z nanešenega vzorca odpariti, tako da je plošča povsem suha.

Kromatogram nato razvijemo, in sicer tako da ploščo vstavimo v kadičko z mobilno fazo. Sestavo mobilne faze izberemo glede na vrsto analita in stacionarne faze. Lahko jo sestavlja le ena ali več spojin.

Glede na polarnost stacionarne in mobilne faze ločimo dve vrsti tankoplastne kromatografije:

- normalnofazna kromatografija (uporabljena najpogosteje): stacionarna faza je polarna (največkrat silikagel z dodatkom veziva), mobilna faza pa nepolarna;
- reverznofazna kromatografija: stacionarna faza je nepolarna, mobilna pa polarna (primerno pri vzorcih, raztopljenih v vodi).

Mobilna faza potuje po plošči skozi stacionarno fazo s pomočjo kapilarne sile. Najpogosteje razvijanje poteka od spodaj navzdol (ascendentna TLC), možno pa je tudi v obratni smeri (descendentna), vodoravno (horizontalna) ali iz sredine navzven (centrifugalna).

Analiti iz nanešenega vzorca potujejo po plošči glede na to, kako se porazdeljujejo med mobilno in stacionarno fazo. Pri normalnofazni TLC bodo polarni analiti zaradi interakcije s stacionarno fazo prepotovali manjšo razdaljo, nepolarni analiti pa bodo skupaj z mobilno fazo potovali dlje. Na mestu, kjer se analit ustavi, nastane lisa.

V zadnji fazi ploščo odstranimo iz kadičke in z nje odparimo mobilno fazo. Lise so lahko vidne že na vidni svetlobi, v določenih primerih pa jih zaznamo pod UV svetlobo ali po oroševanju z orositvenimi reagenti.

TLC lahko uporabimo za oceno čistosti vzorca, ločitev in istovetenje posameznih analitov v vzorcu ali kvantitativno analizo enega ali več analitov v vzorcu. S pomočjo položaja lise lahko izračunamo retencijski faktor – razmerje med razdaljo, ki jo je potovala lisa, in razdaljo, ki jo je prepotovala mobilna faza. Če smo sočasno nanесли tudi standard oziroma vzorec z znanim analitom, lahko s primerjavo retencijskih faktorjev sklepamo na istovetnost analita.

Slabost tankoplastne kromatografije je njena majhna občutljivost v primerjavi z drugimi separacijskimi metodami in njena nezmožnost analize hlapljivih vzorcev (31, 33).

## **1.6 Metode ugotavljanja protiglivičnega delovanja**

Za ugotavljanje protiglivičnega delovanja se najpogosteje uporabljajo tri metode: disk-difuzijska metoda, agar-difuzijska metoda z luknjami in mikrodilucijska metoda.

Pri disk-difuzijski metodi na gojišče s pomočjo brisa enakomerno razmažemo suspenzijo gliv. Na površino položimo sterilne papirnate diske, na katere naneseemo vzorec, za katerega želimo določiti protiglivično učinkovitost. Sprememba v intenzivnosti rasti okrog diska pomeni zaviranje rasti.

Agar-difuzijska metoda z luknjami je podobna, le da pri njej ne uporabljamo diskov. Na gojišče s pomočjo brisa razmažemo suspenzijo gliv in nato na površini naredimo luknje, v katere dodamo vzorec, za katerega želimo določiti protiglivično učinkovitost. Sprememba v intenzivnosti rasti okrog luknje pomeni zaviranje rasti.

Pri mikrodilucijski metodi uporabljamo mikrotitrsko ploščo z vdolbinami. V vsako vdolbino naneseemo vzorec, za katerega želimo določiti protiglivično učinkovitost, in njegove razredčitve. V vsako vdolbino naneseemo suspenzijo gliv. Rezultat odčitamo spektrofotometrično.

## 2 Namen dela

V tem diplomskem delu bomo ugotavljali, ali ima kombinacija etanolnega izvlečka zeli in etanolnega izvlečka korenine škrlatne ehinaceje (v nadaljevanju: preučevano zdravilo; opis je v poglavju 3.1) protiglivični učinek in katerim frakcijam, pripravljenim z zaporedno ekstrakcijo, lahko pripišemo ta učinek.

Poleg tega bomo raziskali:

- ali način priprave vzorca za zaporedno ekstrakcijo (z rotavapiranjem oziroma redčenjem preučevanega zdravila) vpliva na lastnosti frakcij,
- kakšna mobilna faza omogoča najboljšo ločljivost čim večjega števila kromatografskih lis pri kromatografiji TLC,
- kako se celotna masa preučevanega zdravila porazdeli med frakcije,
- v katerih frakcijah so analizni markerji.

## 3 Materiali in metode

### 3.1 Materiali

Preučevali smo zdravilo Echinaforce® peroralne kapljice, raztopina, ki ima dve zdravilni učinkovini: 860 mg/ml tekočega ekstrakta zeli sveže škrlatne ehinaceje (*Echinacea purpurea* (L.) Moench: *herba*) (1:12), ekstrakcijsko topilo: 65-odstotni (V/V) etanol in 45 mg/ml tekočega ekstrakta korenine sveže škrlatne ehinaceje (*Echinacea purpurea* (L.) Moench: *radix*) (1:11), ekstrakcijsko topilo: 65-odstotni (V/V) etanol. Zdravilo proizvaja podjetje Bioforce AG, CH-9325 Roggwil, Švica.

Pri eksperimentih smo uporabili naslednje spojine:

- topila: heksan, eter, etil acetat, n-butanol, metanol, toluen, etanol, metanojska kislina;
- orositveni reagenti: vanilin, žveplova (VI) kislina, betaamino ester difenilborove kisline, polietilenglikol (PEG) 600;

- analizni markerji (več o njih smo napisali v poglavju 3.5):, rutin, kavna kislina, klorogenska kislina, kvercetin in  $\beta$ -sitosterol.

Vse spojine so imele čistost *pro analysis* (p. a.).

Pri kromatografiji TLC smo uporabili kromatografske plošče *TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>* proizvajalca Merck.

Za rotavapiranje smo uporabili *Rotavapor R-210* z enoto za nadzor tlaka *Vacuum controler V-850* in enoto za nadzor temperature *Heating Bath B-491* proizvajalca Büchi.

Pri ugotavljanju protiglivičnega delovanja smo uporabili gojišče RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium* - medij za gojenje celičnih kultur) 1640 z 0,2 % glukoze. Preskusili smo občutljivost naslednjih gliv:

- *Candida albicans* (lasten izolat iz bolnika),
- *Candida albicans* (standardni sev ATCC 90028; ATCC je kratica za *American Type Culture Collection* - organizacija, ki pripravlja standardne referenčne mikroorganizme),
- *Candida glabrata*,
- *Candida parapsilosis*,
- *Aspergillus niger* (lasten izolat iz bolnika),
- *Aspergillus niger* (standardni sev ATCC 10578),
- *Aspergillus flavus*,
- *Aspergillus fumigatus*.

Iz vsakega seva smo pripravili suspenzijo v fiziološki raztopini.

### **3.2 Priprava vzorca za zaporedno ekstrakcijo**

Jedro tega diplomskega dela je bilo ugotavljanje protiglivičnega delovanja preučevanega zdravila in njegovih frakcij. Te smo pripravili z zaporedno ekstrakcijo preučevanega zdravila, ki je podrobneje opisana v poglavju 3.3.

Preučevano zdravilo vsebuje etanol, ki lahko vpliva na zaporedno ekstrakcijo z

organskimi topili. Temu vplivu se lahko izognemo na dva načina:

- vzorec rotavapiramo in s tem odstranimo etanol,
- vzorec razredčimo s prečiščeno vodo, s čimer zmanjšamo koncentracijo etanola in posledično njegov vpliv na ekstrakcijo.

#### Priprava z rotavapiranjem

5 ml preučevanega zdravila smo 10 minut rotavapirali pri temperaturi 37 °C. To temperaturo smo izbrali, ker ji je zdravilo izpostavljeno tudi v telesu - torej bodo razgradni procesi, odvisni od temperature, potekali v podobni meri kot v telesu. Preostanek po rotavapiranju smo s pomočjo ultrazvočne kadičke raztopili v 50 ml prečiščene vode.

#### Priprava z redčenjem

5 ml preučevanega zdravila smo razredčili s prečiščeno vodo do 50 ml.

### **3.3 Zaporedna ekstrakcija**

Pripravili smo različne frakcije rotavapiranega in redčenega preučevanega zdravila, in sicer z zaporedno ekstrakcijo z naslednjimi topili: heksan, eter, etil acetat in n-butanol. Tem topilom v navedenem vrstnem redu narašča polarnost, zato se v vsako naslednjo organsko fazo izločijo bolj polarne spojine. Na koncu je ostala vodna faza z najbolj polarnimi spojinami.

V lij ločnik smo dodali 50 ml vzorca, ki smo ga pripravili z rotavapiranjem preučevanega zdravila, in 30 ml heksana ter dobro premešali. Po ločitvi faz smo organsko fazo odlili in vodno ponovno ekstrahirali s 30 ml heksana. Ponovno smo odlili organsko fazo in jo združili z organsko fazo prejšnje ekstrakcije – tako smo dobili heksansko frakcijo preučevanega zdravila.

Lij ločnik smo sprali z naslednjim topilom (etrom) in vanj dodali vodno frakcijo, ki je ostala po prejšnji ekstrakciji, ter 30 ml etra. Nato smo sledili enakemu postopku, kot smo ga opisali v prejšnjem odstavku, dokler nismo dobili štiri frakcije in vodno frakcijo, ki je ostala od zadnje ekstrakcije. Organsko topilo smo iz vsake frakcije

odstranili z rotavapiranjem.

Tlak rotavapiranja vsake frakcije smo določili na osnovi priporočil v programski opremi rotavaporja. Če smo opazili, da kljub priporočenemu tlaku topilo ne izpareva več, smo tlak postopno nižali dokler nismo opazili suhosti vzorca.

Po zaključku rotavapiranja smo suhe ostanke raztopili v 5 ml 65-odstotnega (V/V) etanola. To koncentracijo smo izbrali zato, ker ustreza koncentraciji v preučevanem zdravilu, s čimer simuliramo posamezno frakcijo v zdravilu.

### **3.4 Tankoplastna kromatografija**

Preverili smo, ali oba opisana načina priprave vzorcev vplivata na prisotnost spojin v posameznih frakcijah, pridobljenih z zaporedno ekstrakcijo, in ali lahko z modifikacijo sestave mobilne faze dosežemo boljšo ločljivost kromatografskih lis. To smo naredili s primerjavo kromatogramov TLC, pripravljenih na več različnih načinov.

Opravili smo kromatografijo TLC rotavapiranih ter redčenih vzorcev, in sicer z osnovno mobilno fazo, kot jo priporoča knjiga Wagner: Drogen analyse (34) za večino rastlinskih pripravkov ter različnimi modifikacijami te mobilne faze.

#### Osnovna analiza s kromatografijo TLC

Knjiga Wagner: Drogen analyse (34) za večino rastlinskih pripravkov priporoča kromatografijo TLC z mobilno fazo iz etilacetata, metanola in vode v razmerju 100:13,5:10. Nanesli smo po 50 µl vzorcev (dvakrat po 25 µl). Kromatogram smo orosili z mešanico 1-odstotnega vanilina v etanolu in 5-odstotne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v etanolu.

#### Modifikacije osnovne analize s kromatografijo TLC

Želeli smo dodano ločiti spojine tik pod fronto v heksanski, eterni in etil acetatni frakciji ter spojine na bazni liniji v vodni frakciji, zato smo naredili še tri TLC kromatografske analize z modificirano sestavo mobilne faze:

- bolj polarno: etilacetat, metanol in voda v razmerju 100:27:20;
- manj polarno: etil acetat in metanol v razmerju 100:13,5;

- še manj polarno: toluen in etilacetat v razmerju 93:7, ki jo knjiga Wagner: Drogen analyse (34) priporoča za analizo eteričnih olj.

Da bi izboljšali vidnost lis, smo namesto dvakrat po 25 µl vzorcev nanašali petkrat po 10 µl.

### 3.5 Identifikacija kromatografskih lis

Rastlinski izvlečki so zmesi številnih spojin. Pri razmeroma redkih rastlinskih izvlečkih lahko terapevtsko učinkovitost pripišemo točno določeni spojini oziroma skupini spojin, zato je vrednotenje njihove kakovosti manj zapleteno, saj vemo, na katere spojine se moramo osredotočiti. Pri večini izvlečkov pa to ni mogoče, zato si za vrednotenje kakovosti izberemo spojino ali skupino spojin, za katere vemo, da jih izvleček vsebuje – te imenujemo analizni markerji. Kadar vemo, da ima neka spojina ali skupina spojin vlogo pri terapevtskem učinku, kot analize markerje izberemo njih (35). V tem diplomskem delu smo izbrali rutin, kavno kislino, klorogensko kislino, kvercetin in β-sitosterol. Ugotavljali smo, v katerih frakcijah so prisotni.

V prvem poskusu smo želeli ugotoviti, ali je z dosedanjimi izvedbami TLC sploh mogoče zaznati analize markerje rutin, kavno kislino in klorogensko kislino. Opravili smo kromatografijo TLC z modificiranim predpisom monografije »Purple Coneflower Herb« v 8. izdaji Evropske farmakopeje (Ph. Eur.) (36). Na ploščo smo nanegli 40 µl (štirikrat po 10 µl vsake spojine, raztopljene v metanolu v koncentraciji 0,2 mg/ml in 40 µl preučevanega zdravila. Monografija sicer predpisuje koncentracijo 0,1 mg/ml, vendar smo se to koncentracijo odločili podvojiti, da bi bila v primeru preveč intenzivnih lis mogoča nadaljnja redčitev. Ker gre le za kvalitativno analizo, zaradi tega ne pričakujemo vpliva na rezultate. Izmed 4 mobilnih faz, ki smo jih uporabili do zdaj, smo se na osnovi zaključka predhodnega poskusa odločili za najbolj polarno (etilacetat, metanol in voda v razmerju 100:27:20). TLC ploščo smo po razvijanju orosili z mešanico 1-odstotnega vanilina v etanolu in 5-odstotne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v etanolu.

V drugem poskusu smo opravili enako analizo kot pri prvem, le da smo tokrat uporabili modificiran orositveni reagent NST/PEG (*Naturstoff-Polyethylenglykol-*



*Reagens* - orositveni reagent s polietilenglikolom za dokazovanje naravnih pripravkov): 1-odstotna raztopina betaamino estra difenilborove kisline v metanolu in nato 5-odstotna raztopina PEG 600 v etanolu. Predpis sicer zahteva PEG 4000, vendar se ta spojina ni raztopila v etanolu, zato smo se odločili za modifikacijo. Kromatogram smo pregledali na UV svetlobi pri valovni dolžini 366 nm.

V tretjem poskusu smo poleg prej navedenih analiznih markerjev uporabili še kvercetin. Poleg tega smo preverili, ali mobilna faza iz etil metanoata, toluena, metanojske kisline in vode v razmerju 100:5:10:10 omogoča boljšo ločljivost, vendar smo zaradi trenutne nedosegljivosti metanojske kisline uporabili etanojsko.

V četrtem poskusu smo uporabili analizni marker  $\beta$ -sitosterol. Kromatografijo TLC smo opravili skladno z monografijo »Purple Coneflower Root« v 8. izdaji Ph. Eur. (36).

### **3.6 Gravimetrična analiza**

Zanimalo nas je, kakšen delež mase preučevanega zdravila se porazdeli v posamezne frakcije, pripravljene z zaporedno ekstrakcijo. Zato smo opravili gravimetrično analizo zdravila in posameznih frakcij.

Za analizo smo uporabili 10 ml preučevanega zdravila in po 5 ml vsake frakcije. Najprej smo stehali prazno bučko in jo nato rotavapirali, s čimer smo želeli odstraniti morebitne hlapne snovi, adsorbirane na steklu (na primer vlaga). Po rotavapiranju smo bučko ponovno stehali. Dodali smo vzorec in jo ponovno stehali. Nato smo vzorec rotavapirali do izgleda suhosti ter bučko ponovno stehali. Vzorce smo nato naprej rotavapirali in v rednih časovnih intervalih določali maso. Ko se ta ni več zmanjševala, smo poskus zaključili.

### **3.7 Protiglivična učinkovitost**

Preskus občutljivosti gliv na preučevano zdravilo in njegove frakcije smo opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Univerze v Ljubljani.

### Disk-difuzijska metoda

S to metodo smo želeli ugotoviti, ali so glive *Candida albicans* (lasten izolat iz bolnika), *Candida albicans* (standardni sev ATCC 90028), *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus niger* (lasten izolat iz bolnika), *Aspergillus niger* (standardni sev ATCC 10578), *Aspergillus flavus* in *Aspergillus fumigatus* občutljive na preučevano zdravilo (desetkrat razredčeno) in njegove frakcije, pripravljene z zaporedno ekstrakcijo.

Iz vsakega seva smo v fiziološki raztopini pripravili suspenzijo gostote 0,5 McF (*McFarland* - enota za jakost suspenzije mikrobov) in jo s pomočjo brisa enakomerno razmazali po gojišču RPMI 1640 z 0,2 % glukoze. Na površino inokuliranega gojišča smo položili sterilne papirnate diske premera 6 mm. Na vsak disk smo nanegli 10 µL posameznega vzorca. Sledila je inkubacija pri 37 °C. Končne rezultate občutljivosti plesni smo odčitali po 24 h inkubacije, kvasovk pa po 48 h inkubacije. Kakršnokoli spremembo v intenzivnosti rasti okoli diska smo smatrali kot zaviranje rasti. Metodo smo ponovili trikrat.

### Agar-difuzijska metoda z vdolbinami

Tudi s to metodo smo želeli ugotoviti, ali so glive *Candida albicans* (lasten izolat iz bolnika), *Candida albicans* (standardni sev ATCC 90028), *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus niger* (lasten izolat iz bolnika), *Aspergillus niger* (standardni sev ATCC 10578), *Aspergillus flavus* in *Aspergillus fumigatus* občutljive za preučevano zdravilo (nerazredčeno in desetkrat razredčeno) ter frakcije.

Iz vsakega seva smo v fiziološki raztopini pripravili suspenzijo gostote 0,5 McF ter jo s pomočjo brisa enakomerno razmazali po gojišču RPMI 1640 z 0,2 % glukoze. V inokulirano gojišče smo s pomočjo sterilne epruvete naredili vdolbine premera 10 mm in vanje dodali 100 µL vsakega vzorca. Negativna kontrola je bil 65-odstotni (V/V) etanol. Sledila je inkubacija pri 37 °C. Končne rezultate občutljivosti plesni smo odčitali po 24 h inkubacije, kvasovk pa po 48 h inkubacije. Kakršnokoli spremembo v intenzivnosti rasti okoli luknjice smo smatrali kot zaviranje rasti. Metodo smo ponovili trikrat.

### Mikrodilucijska metoda

S to metodo smo želeli ugotoviti:

- ali so glive *Candida glabrata*, *Aspergillus niger* (lasten izolat iz bolnika) in *A. niger* (standardni sev ATCC 10578) občutljive na preučevano zdravilo (desetkrat razredčeno) in butanolno frakcijo preučevanega zdravila,
- ali je gliva *Candida parapsilosis* občutljiva na različne koncentracije preučevanega zdravila.

Preskus smo ponovili še z nerazredčenim zdravilom, pri čemer smo uporabili vse izolate.

V vsako vdolbino mikrotitrne plošče z ravnim dnom smo dodali 100  $\mu$ L dvakratnega tekočega gojišča RPMI 1640 z 2 % glukoze. Pripravili smo deset redčitev vzorca preučevanega zdravila; redčili smo ga z destilirano vodo v razmerju 1 proti 10. Po 100  $\mu$ L tako pripravljene redčitvene vrste smo nanegli v vsako vdolbinico posamezne vrstice mikrotitrne ploščice. Iz vsakega seva smo v fiziološki raztopini pripravili suspenzijo gostote 0,5 McF ter jo desetkrat razredčili, da smo dobili 0,5- $2,5 \cdot 10^5$  celic/mL. Vsako luknjico ustrezne vrstice smo inokulirali s 100  $\mu$ L tako pripravljene suspenzije. Negativna kontrola je bilo dvakrat redčeno gojišče s 100  $\mu$ L sterilne destilirane vode. Pozitivna kontrola je bilo dvakrat redčeno gojišče s 100  $\mu$ L ustreznega inokuluma. Sledila je 24-urna inkubacija pri 37 °C. Končne rezultate občutljivosti tako kvasovk, kot tudi plesni smo odčitali spektrofotometrično pri 450 nm. Metodo smo ponovili trikrat.

## **4 Rezultati in razprava**

### **4.1 Zaporedna ekstrakcija**

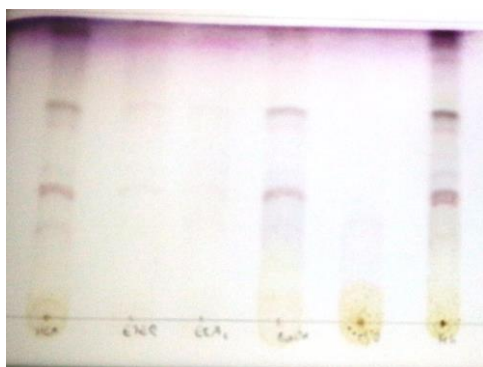
Z zaporedno ekstrakcijo smo uspešno pripravili različno polarne frakcije preučevanega zdravila. Edina posebnost, ki smo jo opazili pri tem, je bil pojav motne vmesne faze (domnevno emulzije) pri uporabi heksana. Pri rotavapiranih vzorcih smo jo prenesli v organsko fazo, pri redčenih pa smo jo z 2-minutnim

centrifugiranjem pri 4.000 obratih na minuto ločili na vodno in organsko fazo.

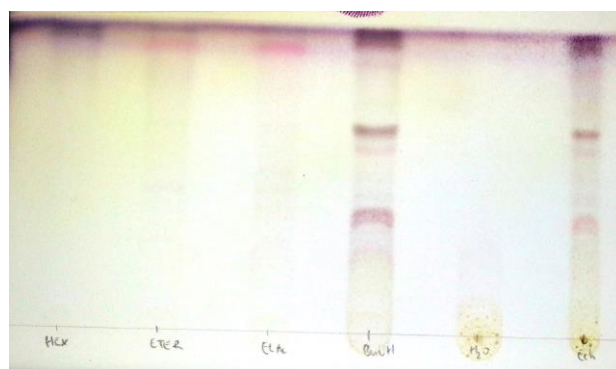
## 4.2 Tankoplastna kromatografija

Rezultati TLC kromatografske analize so prikazani na slikah 4 do 10. Na vsakem kromatogramu so od leve proti desni nanešeni naslednji vzorci: heksanska frakcija, eterna frakcija, etil acetatna frakcija, butanolna frakcija, vodna frakcija in preučevano zdravilo.

Mobilna faza etilacetat, metanol, voda v razmerju 100:13,5:10 (priporočena)

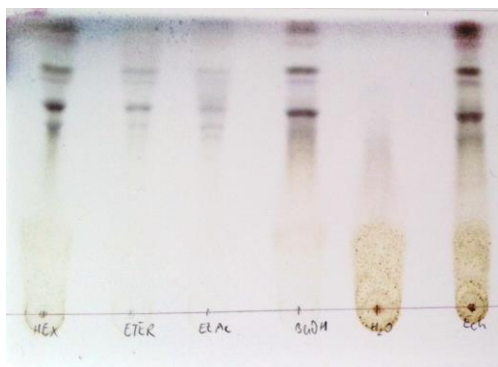


*Slika 4. Kromatogram TLC rotavapiranih vzorcev s priporočeno mobilno fazo*

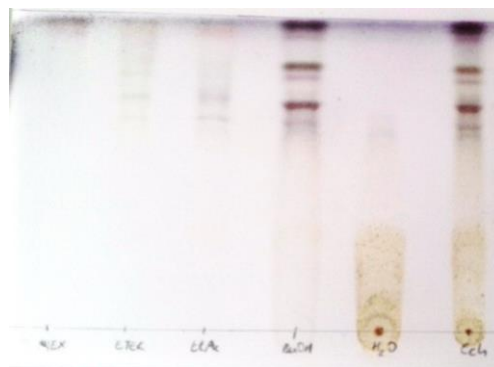


*Slika 5. Kromatogram TLC redčenih vzorcev s priporočeno mobilno fazo*

Mobilna faza etilacetat, metanol, voda v razmerju 100:27:20 (bolj polarna)

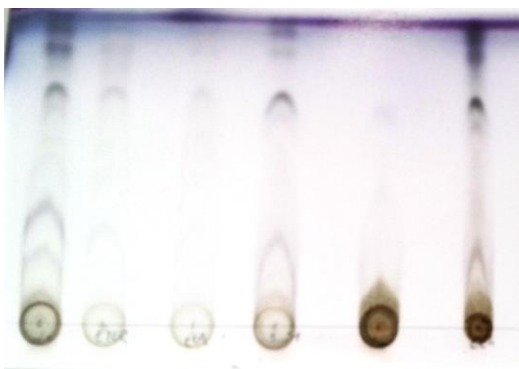


*Slika 6. Kromatogram TLC rotavapiranih vzorcev z bolj polarno mobilno fazo*

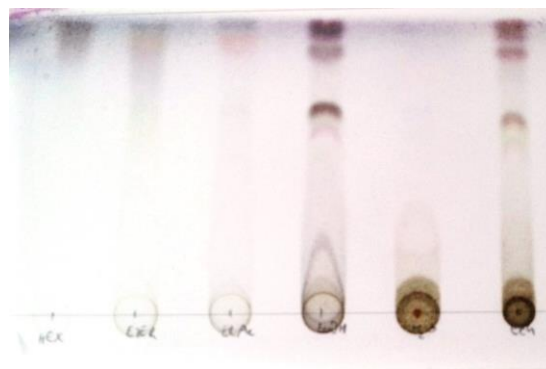


*Slika 7. Kromatogram TLC redčenih vzorcev z bolj polarno mobilno fazo*

Mobilna faza etilacetat, metanol v razmerju 100:13,5 (bolj nepolarna)



*Slika 8. Kromatogram TLC rotavapiranih vzorcev z bolj nepolarno mobilno fazo*



*Slika 9. Kromatogram TLC redčenih vzorcev z bolj nepolarno mobilno fazo*

Mobilna faza toluen, etilacetat 97:3 (še bolj nepolarna)



*Slika 10: TLC kromatogram redčenih vzorcev s še bolj nepolarno mobilno fazo*

Pri heksanski frakciji rotavapiranih vzorcev (slike 4, 6 in 8) so se pojavile lise, ki so prisotne tudi v botanolni frakciji, pri redčenih vzorcih (slike 5, 7, 9 in 10) pa teh lis nismo opazili. Sklepamo, da je to posledica prej omenjene vmesne faze in da smo se pri redčenih vzorcih pravilno odločili za njeno ločitev s centrifugiranjem.

Bolj polarna mobilna faza (etilacetat, metanol, voda v razmerju 100:27:20) je omogočila boljšo ločitev lis v vseh frakcijah ter preučevanem zdravilu (sliki 6 in 7), z uporabo bolj nepolarne mobilne faze (etilacetat, metanol v razmerju 100:13,5) pa nismo opazili boljše ločitve lis (sliki 8 in 9). Nadaljnje zmanjšanje polarosti mobilne faze (etilacetat, toluen v razmerju 97:3) je omogočilo opazno boljšo ločitev lis pri zdravilu in vseh frakcijah, vendar so v vodni frakciji vse spojine ostale na bazni črti (slika 10). Na osnovi opravljenih TLC kromatografskih analiz zaključujemo, da je za

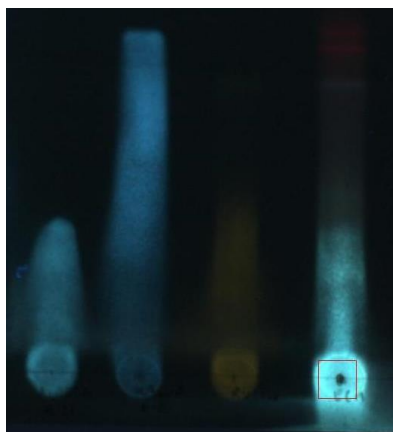
analizo preučevanega zdravila in vseh njegovih frakcij najustreznejša mobilna faza etilacetat, metanol, voda v razmerju 100:27:20.

Na osnovi primerjave vseh kromatogramov sklepamo, da ta kromatografija TLC ne kaže na razlike med rotavapiranimi in redčenimi vzorci. Na vseh kromatogramih so bile lise podobne oblike in na podobnih mestih, zato bomo v nadaljnjih poskusih uporabljali razredčene vzorce, saj je njihova priprava preprostejša.

### 4.3 Identifikacija kromatografskih lis

V **prvem poskusu** (dosedanje izvedbe kromatografije TLC) se nobeden od standardov ni obarval.

V **drugem poskusu** (orositev z modificiranim reagentom NST/PEG) smo detektirali vse uporabljene analizne markerje, vendar ločljivost ni bila zadovoljiva (slika 11).

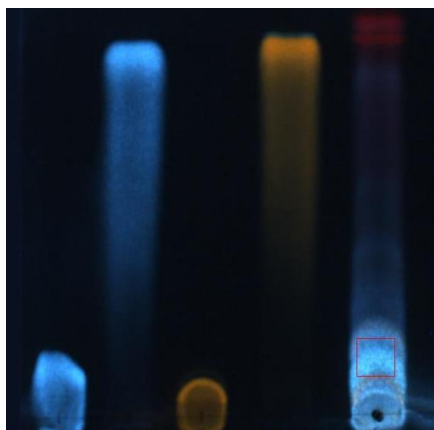


*Slika 11. TLC kromatogram na UV svetlobi, orošen z modificiranim reagentom NST/PEG (od leve proti desni: klorogenska kislina, kavna kislina, rutin, preučevano zdravilo)*

Z mobilno fazo iz etil metanoata, toluena, metanojske kisline in vode v razmerju 100:5:10:10 smo v **tretjem poskusu** dosegli boljšo ločljivost kromatografskih lis, čeprav ta še vedno ni zadovoljiva (slika 12). Detektirali smo tudi kvercetin (četrti nanos z leve).

Spodnji del kromatografske lise, ki pripada nanosu preučevanega zdravila, je slabo

ločen. V tem območju bi lahko bili skriti lisi, ki ustrezata klorogenski kislini in rutin. Na vrhu sta dve rdeči lisi, za kateri smo v naslednjem poskusu preverili, ali bi lahko ustrezali kvercetinu. Lis, ki bi ustrezali kavni kislini, pa na kromatografski lisi preučevanega zdravila nismo opazili.



*Slika 12. TLC kromatogram na UV svetlobi s spremenjeno mobilno fazo (etil metanoat, toluen, metanojska kislina, voda v razmerju 100:5:10:10), orošen z modificiranim reagentom NST/PEG (od leve proti desni: klorogenska kislina, kavna kislina, rutin, kvercetin, preučevano zdravilo)*

Preverili smo, ali bi rdeči lisi na vrhu kromatograma preučevanega zdravila lahko ustrezali kvercetinu. Po pregledu kromatograma na vidni svetlobi smo ugotovili, da gre za dve zeleni lisi, ki verjetno predstavljata klorofil A in B.

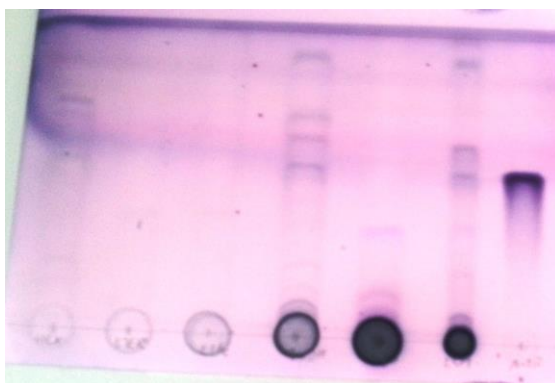


*Slika 13. TLC kromatogram na vidni svetlobi s spremenjeno mobilno fazo (etil metanoat,*

*toluen, metanojska kislina, voda v razmerju 100:5:10:10), orošen z modificiranim reagentom NST/PEG (od leve proti desni: klorogenska kislina, kavna kislina, rutin, kvercetin, preučevano zdravilo)*

Zaključujemo, da ta TLC kromatografska analiza z mobilno fazo etil metanoat, toluen, metanojska kislina, voda v razmerju 100:5:10:10 zaradi slabe ločljivosti ni uporabna za določitev analiznih markerjev v posameznih frakcijah.

**V četrtem poskusu** smo ugotovili da je analizni marker  $\beta$ -sitosterol mogoče zaznati v preučevanem zdravilu in butanolni frakciji.



*Slika 14. TLC kromatogram skladno z monografijo »Purple Coneflower Root« v 8. izdaji Ph. Eur z analiznim markerjem  $\beta$ -sitosterolom (od leve proti desni: heksanska, eterna, etil acetatna, butanolna in vodna frakcija, preučevano zdravilo ter  $\beta$ -sitosterol)*

#### 4.4 Gravimetrična analiza

*Tabela 3. Rezultati gravimetrične analize*

Vzorec	Masa
Preučevano zdravilo	157,9 mg
Heksanska frakcija	2,5 mg
Eterna frakcija	3,4 mg
Etil acetatna frakcija	5,3 mg
Butanolna frakcija	20,0 mg
Vodna frakcija	117,7 mg



Seštevek mas vseh frakcij je 148,9 mg, kar je zadovoljiv približek masi preučevanega zdravila 157,9 mg. Vidimo lahko, da preučevano zdravilo vsebuje največ hidrofilnih spojin, ki pa se na uporabljenem kromatografskem sistemu ne obarvajo dobro.

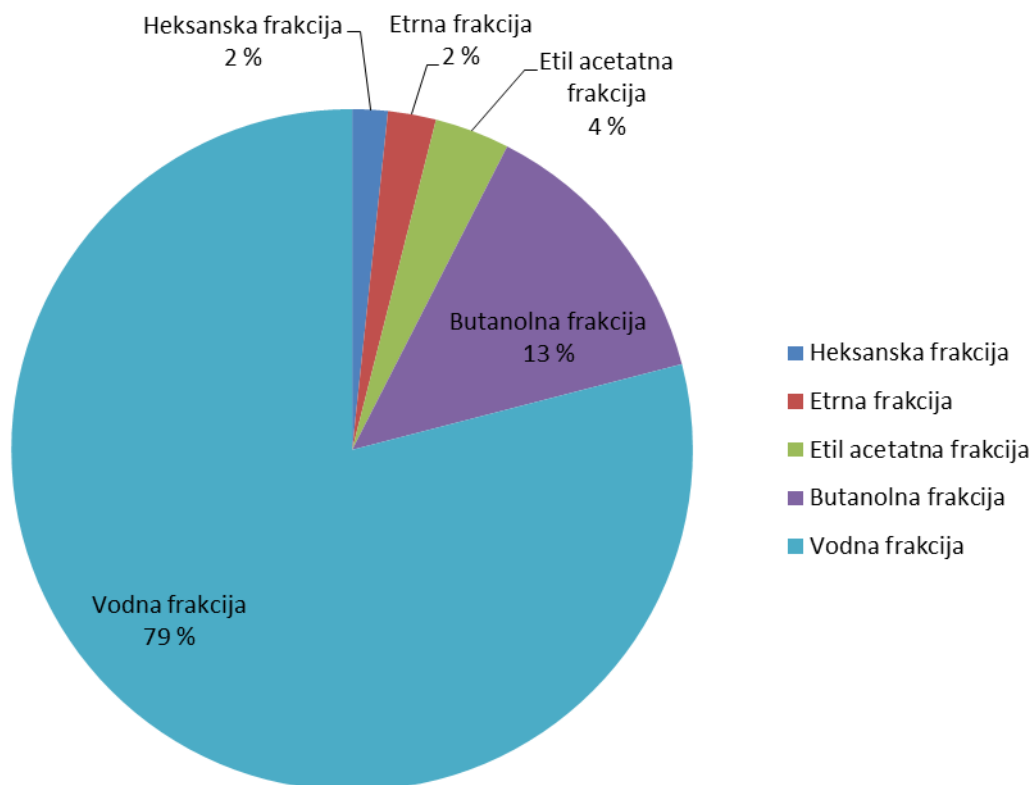


Diagram 1. Porazdelitev mase v frakcijah

## 4.5 Protiglivična učinkovitost

### Disk-difuzijska metoda

Noben vzorec ni zavrl rasti glivnih izolatov.

### Agar-difuzijska metoda z vdolbinami

Nerazredčeno preučevano zdravilo je zavrlo rast gliv *Candida glabrata*, *Aspergillus niger* (standardni sev ATCC 10578) in *Aspergillus fumigatus*.

Desetkrat razredčeno preučevano zdravilo je zavrlo rast gliv *Candida glabrata*,

*Candida parapsilosis*, *Aspergillus niger* (lasten izolat iz bolnika) in *Aspergillus niger* (standardni sev ATCC 10578).

Butanolna frakcija je zavrla rast gliv *Candida glabrata*, *Aspergillus niger* (lasten izolat iz bolnika) in *Aspergillus niger* (standardni sev ATCC 10578).

#### Mikrodilucijska metoda

Nerazredčeno preučevano zdravilo je zavrla rast gliv *Candida glabrata*, *Aspergillus niger* (standardni sev ATCC 10578) in *Aspergillus fumigatus*. Desetkratna redčitev je zavrla rast le glive *Candida glabrata*, višje redčitve pa nobeni glivi.

Na osnovi tega poskusa zaključujemo, da je neposreden učinek peroralno apliciranega preučevanega zdravila na sistemske okužbe z glivami vprašljiv, lahko pa bi učinkovalo preko imunostimulacije. Z dobro načrtovano klinično raziskavo bi bilo smiselno preveriti, ali lahko sočasno zdravljenje s konvencionalnimi antimikotiki in izvlečkom iz škrlatne ehinaceje omogoča zmanjšanje odmerka konvencionalnih zdravil in s tem zmanjšanje tveganja za neželene učinke in razvoj odpornosti gliv.

Bolj verjetno pa je, da je izvleček iz škrlatne ehinaceje učinkovit za dermalno zdravljenje okužb kože in sluznic z glivami, saj bi ga aplicirali v koncentraciji, ki je v tej raziskavi pokazala učinkovitost. Tudi to bi bilo smiselno preveriti z dobro načrtovano klinično raziskavo.

## 5 Sklep

Ugotovili smo, da je pri uporabi heksana treba biti pozoren na pojav motne vmesne faze (domnevno emulzije), ki moti separacijo tekoče-tekoče. Za boljše rezultate je to vmesno fazo s centrifugiranjem treba ločiti na organsko in vodno.

Za analizo preučevanega zdravila in vseh njegovih frakcij s kromatografijo TLC je najustreznejša mobilna faza etilacetat, metanol, voda v razmerju 100:27:20, ki daje optimalno ločljivost kromatografskih lis.

Sklepamo, da ni razlik med pripravo vzorcev z rotavapiranjem in redčenjem. Zaradi lažje priprave priporočamo uporabo redčenja.

Ugotavljanje prisotnosti analiznih markerjev v preučevanem zdravilu in njegovih frakcijah s kromatografijo TLC ni smiselno, ker se v kromatografskem sistemu, ki se je v predhodnih poskusih izkazal za optimalnega, ne obarvajo. Tudi ko dosežemo obarvanje z NST/PEG na UV svetlobi, je ločljivost kromatografskih lis slaba (lise se razvlečejo). Smiselno pa je ugotavljanje prisotnosti  $\beta$ -sitosterola skladno z monografijo »Purple Coneflower Root« v 8. izdaji Ph. Eur. (36).

Pri zaporedni ekstrakciji se večina (79 %) mase porazdeli v vodno frakcijo, izmed polarnih pa največjo maso vsebuje butanolna frakcija (13 %).

Nerazredčeno preučevano zdravilo je pokazalo protiglivično delovanje proti glivam *Candida glabrata*, *Aspergillus niger* in *Aspergillus fumigatus*. Od vseh frakcij je protiglivično delovanje pokazala le butanolna frakcija, in sicer proti glivama *Candida glabrata* in *Aspergillus niger*. Tako preučevano zdravilo kot tudi njegove frakcije z redčitvijo hitro izgubljajo protiglivično delovanje, zato je neposreden učinek peroralno apliciranega zdravila na sistemske okužbe z glivami vprašljiv (lahko pa bi učinkovalo preko stimulacije imunskega sistema). Bolj pa je verjetno, da je izvleček iz škrlatne ehinaceje učinkovit za dermalno zdravljenje okužb kože in sluznic z glivami.

## 6 Literatura

1. Petauer T: Leksikon rastlinskih bogastev, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1993: 190.
2. Kreft S, Kočevar Glavač N: Sodobna fitoterapija : Z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2013: 74-87.
3. Saller R: Phytotherapie : klinische, pharmakologische und pharmazeutische Grundlagen, Karl F Haug Verlag GmbH & Co., Heidelberg, 1995: 315-324.
4. Committee on Herbal Medicinal Products European Medicines Agency: Assessment Report on *Echinacea purpurea* (L.) Moench., herba recens, 2008: London.
5. European Scientific Cooperative on Phytotherapy: E/S/C/O/P Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Second Edition, Supplement 2009, European Scientific Cooperative on Phytotherapy v sodelovanju z založbama Georg Thieme Verlag in Thieme New York, Združeno kraljestvo, 2009: 91-109.
6. Committee on Herbal Medicinal Products European Medicines Agency: Assessment Report on *Echinacea purpurea* (L.) Moench., radix, 2010: London.
7. Orinda D, Diederich J, Wacker A: Antiviral activity of compounds of *Echinacea purpurea*. *Arzneimittelforschung (Drug Research)* 1973(23): 1119-1120.
8. Wacker A, Hilbig W: Virus-inhibition by *Echinacea purpurea*. *Planta Medica* 1978(33): 89-102.
9. Cheminat A, et al.: Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: structures and biological activity. *Phytochemistry* 1988(27): 2787-2794.
10. Beuscher N, et al.: Immonomodulierende Eigenschaften von Wurzelextrakten verschiedenen *Echinacea*-Arten. *Z Phytother* 1995(16): 157-166.
11. Skwarek T, et al.: *Echinacea* – inducer of interferons. *Herba Polonica* 1996(42): 110-117.
12. Binns SE, et al.: Antiviral activity of characterized extracts from *echinacea* spp. (*Heliantheae: Asteraceae*) against herpes simplex virus (HSV-I). *Planta Med* 2002; 68(9): 780-3.

13. Hudson J, et al.: Characterization of Antiviral Activities in Echinacea. Root Preparations. *Pharmaceutical Biology* 2005; 43(9): 790-796.
14. Vimalanathan S, et al.: Echinacea purpurea. Aerial Parts Contain Multiple Antiviral Compounds. *Pharmaceutical Biology* 2005; 43(9): 740-745.
15. Pleschka S, et al.: Anti-viral properties and mode of action of standardized Echinacea purpurea extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *Virology* 2009; 6: 197.
16. Sharma M, Schoop R, Hudson JB: The efficacy of Echinacea in a 3-D tissue model of human airway epithelium. *Phytother Res* 2010; 24(6): 900-4.
17. Schulte KE, Rücker G, Boehme R: Polyacetylenes as compounds of the roots of burs. *Arzneimittelforschung* 1967(17): 829-833.
18. Schulte KE, Rücker G, Perlick J: The presence of polyacetylene compounds in Echinacea purpurea and Echinacea angustifolia. *Arzneimittelforschung* 1967(17): 825-829.
19. Reisch J, Spitzner W, Schulte KE: The problem of the microbiological activity of simple acetylene compounds. *Arzneimittelforschung* 1967(17): 816-825.
20. Sharma M, et al.: Echinacea Extracts Contain Significant and Selective Activities Against Human Pathogenic Bacteria. *Pharmaceutical Biology* 2008; 46(1-2): 111-116.
21. Sharma SM, et al.: Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized Echinacea extract (Echinaforce): dual actions against respiratory bacteria. *Phytomedicine* 2010; 17(8-9): 563-8.
22. Sharma M, et al.: The potential use of Echinacea in acne: control of Propionibacterium acnes growth and inflammation. *Phytotherapy Research* 2011; 25(4): 517-521.
23. Binns SE, et al.: Light-mediated antifungal activity of Echinacea extracts. *Planta Medica* 2000(66(3)): 241-244.
24. Merali S, et al.: Antifungal and Anti-inflammatory Activity of the Genus Echinacea. *Pharmaceutical Biology* 2003; 41(6): 412-420.
25. Mir-Rashed N, et al.: Disruption of fungal cell wall by antifungal Echinacea extracts. *Medical Mycology* 2010; 48(7): 949-958.

26. Cruz I, et al.: Alkamides from Echinacea disrupt the fungal cell wall-membrane complex. *Phytomedicine* 2013.
27. Prijatelj N: Farmakognozija. Rastlinske droge, DZS, Ljubljana, 2003: 133-135.
28. Kumar P, Clark ML: Kumar and Clark's Clinical Medicine, Elsevier Health Sciences UK, 2012: 139-142.
29. Longo D, et al.: Harrison's Principles of Internal Medicine, Mcgraw-Hill, 2011: 1637-1638.
30. Brunskole M, Rižner TL, Strojjan J: Antimikotiki: sedanje in nove možnosti zdravljenja glivičnih okužb. *Farmaceutski vestnik* 2009(60): 295-302.
31. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K: Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Ghichester, West Sussex, PO19 8SQ, Združeno kraljestvo, 2012: 163-172, 274-287.
32. Skoog DA, West DM, Holler FJ: Fundamentals of Analytical Chemistry, Saunders College Publishing, 1996: 764-774.
33. Touchstone JC: Practice of Thin Layer Chromatography, John Wiley & Sons Ltd, 1992: 1-12.
34. Wagner H, Blatt S, Zgainski EM: Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer-Verlag, 1983: 294-295.
35. Committee on Herbal Medicinal Products European Medicines Agency: Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products, 2008: London.
36. European Pharmacopoeia Commission European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare Council of Europe: European Pharmacopoeia, 8th Edition, Council Of Europe : European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Strasbourg, 2013: 1357-1361.