

## EXTRAKCE A ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK Z TŘAPATKY NACHOVÉ (*Echinacea purpurea* (L.) Moench)

NADĚŽDA VRCHOTOVÁ<sup>a</sup>, STANISLAV KUŽEL<sup>b</sup>,  
JAN TRÍSKA<sup>a</sup>, LADISLAV KOLÁŘ<sup>b</sup>  
a JIŘÍ TOTUŠEK<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ústav ekologie krajiny, Akademie věd České republiky, <sup>b</sup>Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, <sup>c</sup>Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Joštova 10, 662 44 Brno  
e-mail: nada@uek.cas.cz, triska@uek.cas.cz

Došlo dne 6.II.2002

Klíčová slova: Echinacea, extrakce, kyselina kaftarová, kyselina cichorová

### Úvod

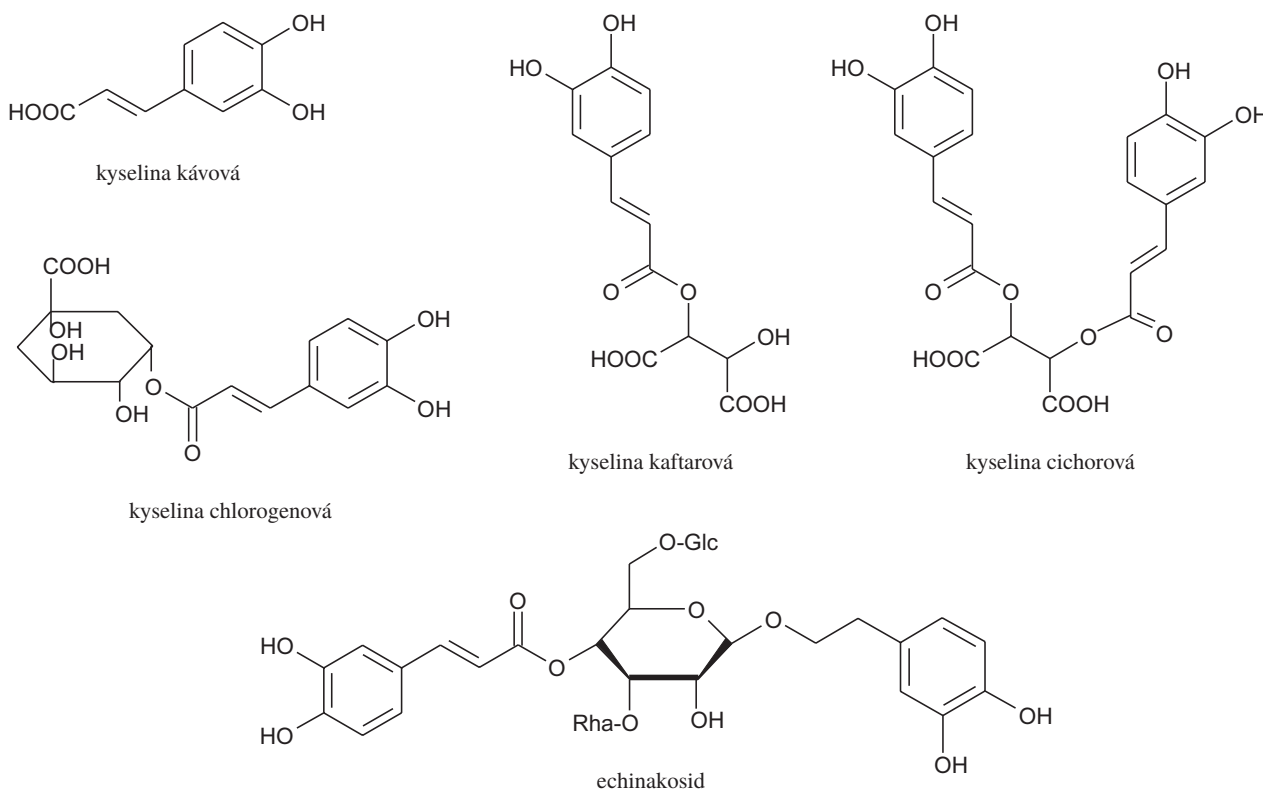
V poslední době se začíná i u nás věnovat zvýšená pozornost alternativním způsobům hospodaření na zemědělské půdě, zejména v okrajových hraničních oblastech. Jednou z možných alternativ je pěstování nových nebo netradičních druhů léčivých rostlin, které by mohly být buď surovinou pro farmaceutický průmysl, anebo by extrakty z nich mohly sloužit jako

potravní doplňky, resp. potraviny určené pro zvláštní výživu. Jedním z hojně studovaných druhů léčivých rostlin v poslední době jsou i rostliny rodu Echinacea.

Rostliny rodu Echinacea pocházejí ze Severní Ameriky, kde je používali jako léčivé rostliny (kořeny) při řadě nemocí již američtí Indiáni<sup>1</sup>. Do Evropy se Echinacea dostala asi před 300 lety a zpočátku byla pěstována jen jako okrasná rostlina. V současné době se Echinacea purpurea (L.) Moench (třapatka nachová) úspěšně pěstuje ve velkém jako léčivá rostlina nejen v Americe, ale i v Evropě a v Austrálii. Kromě třapatky nachové se pěstuje i E. angustifolia DC. (třapatka úzkolistá), méně pak E. pallida (Nutt.) Nutt. (třapatka bledá).

Třapatky obsahují celou řadu látek s léčebnými účinky. Preparáty z třapek se nejčastěji používají při onemocnění horních cest dýchacích a chřipkách. Na imunostimulačních účincích se podílí celý komplex látek jak polárních, tak lipofilních<sup>1-3</sup>. Jsou to např. deriváty kyseliny kávové (kyselina kaftarová, chlorogenová, cichorová), echinakosid, verbakosid, polysacharidy, glykosidy kvercetin, pryskyřice, sílice, polyeny, polyyny, alkylamidy. Na obrázku 1 jsou uvedeny vzorce některých fenolických látek nacházejících se v třapatkách. Z fenolických látek je nejvíce pozornosti věnováno kyselině cichorové a echinakosidu. Kyselina cichorová a kaftarová jsou hlavní složkou kořene a nadzemní části třapatky nachové, echinakosid je dominantní fenolickou látkou kořene třapatky úzkolisté a třapatky bledé.

Obsah kyseliny cichorové v kořenech třapatky nachové dosahuje až 20 mg v 1 g sušiny<sup>4</sup>. Rozdíl v obsahu kyseliny cichorové v různých genetických liniích třapatky nachové může být až čtyřnásobný<sup>5</sup>. Množství kyseliny cichorové a os-



Obr. 1. Schematické vzorce některých fenolických látek z třapatky

tatních látek samozřejmě závisí na době sklizně, na způsobu sušení a způsobu extrakce rostlinného materiálu. Nejšetřivějším způsobem sušení je lyofilizace. Při sušení horkým vzduchem (40 °C) dochází k 10–15 % ztrátě kyseliny cichorové. Podle literárních údajů<sup>6</sup> může být při sušení při 25 °C ztráta až 50 %, při 70 °C je ztráta asi 80 %. Bylo zjištěno, že množství účinných látek v třapatce nachové se zvyšuje při přebytku dusíku v substrátu vzhledem k ostatním živinám<sup>7</sup>.

K laboratorní extrakci fenolických látek se používá převážně suchý rozemletý rostlinný materiál. Extrahuje se nejčastěji methanolem v Soxhletově přístroji. Bauer a spol.<sup>8</sup> extrahují 1 g suché drogy 1 hodinu v Soxhletově přístroji 50 ml methanolu. Jako optimální pro třapatku nachovou doporučuje Kim a spol.<sup>6</sup> 5 hodinovou extrakci 1 g suché drogy 50 ml methanolu v Goldfischově přístroji. Optimální pro společnou extrakci kyseliny cichorové a alkylamidů je podle Stuarda a Willse<sup>9</sup> 60% ethanol. „INA Methods Validation Programs“<sup>10</sup> navrhuje extrahovat 0,125 g suchého materiálu 25 ml směsi ethanol–voda (70:30). Někteří autoři používají k extrakci 70% ethanol v kombinaci s ultrazvukem<sup>5,11</sup>. Nepochopitelné látky se z extraktů odstraňují čištěním přes SPE kolonky s náplní C18 (cit.<sup>6,12</sup>). Někteří autoři odstraňují z rostlinného materiálu nejprve nepochopitelné látky, a to extrakcí chloroformem, poté následuje extrakce methanolem<sup>13</sup>.

Kyselina cichorová podléhá velmi rychle enzymatické degradaci, proto šťávy připravované z čerstvých rostlin neobsahují prakticky žádnou kyselinu cichorovou. Kyselina cichorová se při enzymatické hydrolýze rozpadá na kyselinu kaftarovou a kávovou<sup>14</sup>.

Extrakty z třapatky nachové se používají jako potravní doplňky (potraviny určené pro zvláštní výživu), nejčastěji ve formě tinktur, vodně-ethanolových extraktů a šťáv z čerstvých rostlin. Suchá droga, většinou nadzemní část třapatky nachové, se používá i k přípravě bylinných čajů.

Jak je vidět z výše uvedeného literárního přehledu, údaje týkající se obsahu účinných látek v extraktech a způsoby extrakce se navzájem velice liší. Liší se, nebo chybí nejen údaje o způsobech extrakce, ale i chromatografická data pro dominantní fenolické látky. Některé starší údaje uvádějí i retenční data, která neodpovídají novějším údajům. K tomu všemu je třeba připočítat problém standardů. Firmy většinou nabízejí provedení analýz již hotových extraktů, které zákazník může sám dodat. Hlavním cílem naší práce bylo tedy prostudovat vliv organických polárních rozpouštědel a vody na množství kyseliny kaftarové, kávové a cichorové v různých extraktech z nadzemní části třapatky nachové při použití macerace drogy jako nejběžnější techniky extrakce a ověřit údaje v literatuře týkající se retenčních dat hlavních fenolických látek v podmínkách vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

## Experimentální část

### Použité chemikálie

Methanol a acetonitril (LiChrosolv Gradient grade, Merck), 85% kyselina *o*-fosforečná (Lachema), kyselina kávová a kyselina chlorogenová (Aldrich), kyselina kaftarová (Dalton Chemical Laboratories, Kanada), rutin (Sigma), kyselina trifluoroctová (Fluka), potravinářský 96 % ethanol (Obilní lihovar Kralupy nad Vltavou).

### Přístroje

Kapalinový chromatograf HP 1050 (Hewlett-Packard, USA), DAD detektor HP 1054 (Hewlett-Packard, USA), kolona C18 3 μm, 2×150 mm (Luna Phenomenex, USA). Nastříkovaný objem byl 5 μl, analýza probíhala v gradientu acetonitril–voda s přídavkem 0,15 % trifluoroctové kyseliny, sledované látky byly detegovány při 330 nm (data byla zaznamenána v rozsahu 190–600 nm).

Centrifuga (Tomy Tech PMC – 060, USA), nožový mlyněk VIPO (ČR).

### Rostlinný materiál

Rozemletá sušená nadzemní část třapatky nachové, rok sklizně 2000 (mletí rostlinného materiálu po dobu 2 min na mlynku VIPO).

## Výsledky a diskuse

Ve všech extrakčních pokusech se vycházelo z 0,2 g rozemleté sušené drogy, ke které bylo nejprve přidáno první extrakční činidlo v množství 1,5 ml a po uplynutí extrakční doby byl k této směsi přidán 1 ml druhého extrakčního činidla. Během extrakce byla směs několikrát intenzivně protřepána. Po uplynutí extrakční doby byla směs centrifugována, roztok byl odebrán a uložen při –18 °C. Pouze při extrakci vroucí vodou byl celý objem vody (2,5 ml) přidán najednou a po dobu 15 minut byla teplota udržována blízko bodu varu. Poté byla směs ochlazená a centrifugována. Podrobné schéma extrakce je v tabulce I.

Z tabulky II je vidět, že čisté alkoholy extrahují při pokojové teplotě jen velmi nepatrnou část sledovaných fenolických látek, přičemž o něco účinnější je methanol, zejména pro kyselinu cichorovou. Jestliže použijeme pro extrakci samotnou vodu nebo směs voda–methanol, je extrakční efekt pro kyselinu cichorovou velmi slabý, stejně jako v případě čistých alkoholů. U kyseliny kaftarové, která v podmínkách kapalinové chromatografie na reverzní fázi C18 eluuje dříve než kyselina cichorová (je tedy relativně o něco polárnější), je výtěžek extrakce pouhou vodou daleko větší než výtěžek extrakce alkoholy, jak je také vidět z poměru kyseliny cichorové a kaftarové (poslední sloupec tabulky II). Použijeme-li k extrakci 25% methanol, dochází ke zhruba dvojnásobnému zvýšení výtěžku u obou kyselin.

Nejpoužívanější způsob extrakce je podle německého lékopisu způsob, kdy je droga nejdříve extrahována ethanolem, poté se přidá tolik vody, aby množství ethanolu činilo 60 obj.% a extrahuje se dále po stejnou dobu jako u čistého alkoholu. V našem případě činily výtěžky (v soustavě ethanol, poté stejně množství vody) 60 % pro kyselinu cichorovou a 73 % pro kyselinu kaftarovou. Doba extrakce nehraje v tomto systému podstatnou roli. Jak je vidět z tabulky II, dochází po dvouhodinové extrakci k poklesu výtěžku pouze u kyseliny kaftarové o cca 8 %. Záměnou ethanolu za methanol, což ale není systém vhodný pro farmaceutickou, resp. potravinářskou výrobu, získáme maximální množství obou kyselin, a tato čísla byla zvolena jako referenční vztahná hladina pro výpočet výtěžku extrakce u ostatních systémů.

Tabulka I  
Schéma extrakce fenolických látek z nadzemní části třapatky nachové

Extrakční metoda	Doba extrakce [h]		Teplota [°C]	Počet vzorků
	1. extr. činidlo	2. extr. činidlo		
1.	24 ethanol	24 ethanol	25	2
2.	24 methanol	24 methanol	25	4
3.	24 H <sub>2</sub> O	24 H <sub>2</sub> O	25	6
4.	24 H <sub>2</sub> O	24 H <sub>2</sub> O	4	2
5.	24 25% methanol	24 25% methanol	25	4
6.	24 methanol	24 H <sub>2</sub> O	25	3
7.	168 ethanol	168 H <sub>2</sub> O	25	3
8.	1 ethanol	1 H <sub>2</sub> O	25	3
9.	24 H <sub>2</sub> O	24 methanol	25	4
10. <sup>a</sup>		0,25 H <sub>2</sub> O	100	3

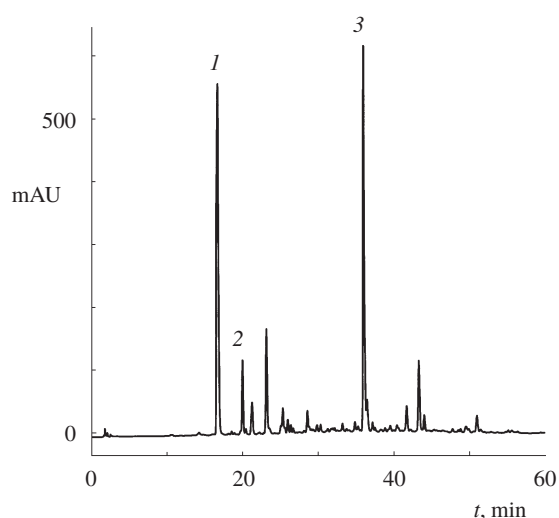
<sup>a</sup> Ke vzorku jednorázově přidáno 2,5 ml vody

Tabulka II  
Obsah kyseliny cichorové a kyseliny kaftarové v extraktech

Extrakční metoda	Kyselina		
	cichorová [%]	kaftarová [%]	cichorová/kaftarová
1.	0,4	0,3	5,7
2.	14,9	4,2	14,4
3.	4,8	42,9	0,5
4.	3,0	17,2	0,7
5.	40,7	80,3	2,1
6.	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	4,1
7.	59,8	73,3	3,4
8.	58,3	64,8	3,8
9.	19,9	48,7	1,7
10.	78,4	125,1	2,6

<sup>a</sup> Obsah kyseliny cichorové v methanol-vodném extraktu (č. 6) je 16,055 mg.g<sup>-1</sup>, obsah kyseliny kaftarové je 3,904 mg.g<sup>-1</sup> suché drogy

Nejzajímavější jsou výsledky získané při extrakci třapatky nachové vroucí vodou, při které dochází k 80 % výtěžku u kyseliny cichorové, ale 125 % výtěžku u kyseliny kaftarové – čaj připravený z třapatky bude tedy obsahovat velké množství polárních (fenolických) látek. Je vidět, že mnoha staletími



Obr. 2. Chromatogram vodně-methanového extraktu z třapatky nachové; HPLC: mobilní fáze A 5% acetonitril + 0,15% kyselina trifluoroctová, mobilní fáze B 80% acetonitril + 0,15% kyselina trifluoroctová, gradient: 0–20 % B (25 min), 20 % B–40 % B (35 min), průtok: 0,25 ml.min<sup>-1</sup>; 1 – kyselina kaftarová, 2 – kyselina kávová, 3 – kyselina cichorová

prověřená lidská zkušenost v přípravě nálevů má také své racionální jádro.

Obsah kyseliny kávové je nejvyšší v extraktu voda–methanol (0,22 mg.g<sup>-1</sup> suché drogy), o něco méně je kyseliny kávové v extraktu 25% methanolem (0,18 mg.g<sup>-1</sup>). U vodně-alkoholových extraktů je obsah kyseliny kávové 0,10–0,12 mg.g<sup>-1</sup>. U ostatních extraktů je obsah kyseliny kávové podstatně nižší.

Zajímavá jsou i data o rozptylu naměřených hodnot výtěžků extrakcí (R.S.D.). Největší rozptyl hodnot (72 %) byl zjištěn u obsahu kyseliny cichorové ve vzorcích extrahovaných vodou při pokojové teplotě. Hodnoty kolem 30 % byly zjištěny v extraktu voda–methanol a v extraktu 25% methanolem. Velmi malý rozptyl hodnot je u vodně-ethanolových extraktů (5–8 %) a u extraktů vroucí vodou (necelá 2 %).

Jak je vidět z provedených extrakčních pokusů, je nejvhodnějším extrakčním postupem skutečně dvoustupňová extrakce (nejdříve čistý alkohol–ethanol, pak po určité době voda). Takto připravené extrakty obsahují jak látky polární, tak i látky méně polární. Všechny extrakty byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie za podmínek popsaných v experimentální části. Vzhledem k tomu, že nebyl k dispozici standard kyseliny cichorové, byla měřena relativní retenční data hlavních fenolických látek a byla zjištěna vynikající shoda s jedinými dosud publikovanými údaji relativních retenčních dat<sup>10</sup>. Retenční časy sledovaných látek byly také porovnávány s retenčními časy některých dalších látek uváděných v literatuře<sup>6,15</sup>, přičemž byly použity různé mobilní fáze (voda–acetonitril–trifluoroctová kyselina, voda–acetonitril–kyselina *o*-fosforečná) i gradienty. K dispozici byly standardy rutinu, kyseliny kaftarové, kyseliny kávové a kyseliny chlorogenové. Množství kyseliny cichorové bylo počítáno z kalibrační křivky pro kyselinu kaftarovou. Na obrázku 2 je ukázka chromatogramu extraktu třapatky nachové s vyznačením hlavních fenolických látek.

*Tato studie byla podpořena výzkumným záměrem ÚEK AV ČR č. AV0Z6087904 s názvem: „Ekologie člověkem ovlivňované krajiny“.*

## LITERATURA

1. Šícha J., Hubík J., Dušek J.: *Cesk. Farm.* 38, 424 (1989).
2. Bukovský M., Košťálová D., Magnusová R., Vavrková Š.: *Cesk. Farm.* 42, 228 (1993).
3. Wagner H.: *Croat. Chem. Acta* 68, 615 (1995).
4. Wills R. B. H., Stuart D. L.: *Food Chem.* 67, 385 (1999).
5. Baum B. R., Mechanda S., Livesey J. F., Binns S. E., Arnason J. T.: *Phytochemistry* 56, 543 (2001).
6. Kim H.-O., Durance T. D., Scaman C. H., Kitts D. D.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 4182 (2000).
7. Kolář L., Ledvina R., Kužel S., Pašek J.: *Rostl. Vyroba* 44, 489 (1998).
8. Bauer R., Forster S.: *Planta Med.* 57, 447 (1991).
9. Stuart D. L., Wills R. B. H.: *Aust. J. Exp. Agric.* 40, 873 (2000).
10. The INA's Methods Validation Program: <http://www.nutraceuticalinstitute.com/methods/>
11. Letchamo W., Livesey J., Arnason T. J., Bergeron C., Krutilina V. S., v knize: *Perspectives on New Crops and New Uses* (Janick J., ed.). ASHS Press, Alexandria 1999.
12. Głowniak K., Zgóřka G., Kozyra M.: *J. Chromatogr., A* 730, 25 (1996).
13. Perry N. G., Burgess E. J., Glennie V. A.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 1702 (2001).
14. Nusslein B., Kurzmann M., Bauer R., Kreis W.: *J. Nat. Prod.* 63, 1615 (2000).
15. Hu C., Kitts D. D.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 1466 (2000).

**N. Vrchotová<sup>a</sup>, S. Kužel<sup>b</sup>, J. Tríska<sup>a</sup>, L. Kolář<sup>b</sup>, and J. Totušek<sup>c</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Landscape Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice*, <sup>b</sup>*Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*, <sup>c</sup>*Institute of Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*): **Extraction and Analysis of Phenolic Compounds of *Echinacea purpurea* (L.) Moench**

The main goal of this study was the investigation of various extraction procedures of the *Echinacea purpurea* plant material in order to optimize the yield of phenolic compounds, such as caftaric acid, caffeic acid, cichoric acid, to establish their relative HPLC retention data together with retention data of rutin and chlorogenic acid and to compare them with the literature data. The most useful was the extraction with methanol or ethanol, followed by extraction with dilute alcohols (60 % v/v) after addition of water. Almost the same results were obtained with boiling water. The measured relative retention data for the phenolic compounds are in good agreement with the data found in the very recent literature.