



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA**

Miglė Ivanauskaitė
Farmacinė chemija
Magistro baigiamasis darbas

***SALIX PURPUREA „GRACILIS“ EKSTRAKTO GAMYBA IR
PANAUDOJIMAS KOSMETIKOS PRODUKTO GAMYBOJE***

Darbo vadovas (-ė)
prof. dr. Artūras Katelnikovas

(leidimas ginti, data, parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

Vilnius 2020

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Karklo botaninė klasifikacija	7
1.2 Botaninis karklo genties apibūdinimas	7
1.3 Augalų rūšys ir kilmė	8
1.4 Cheminė karklo žievės sudėtis	9
1.5 <i>Salix</i> augalinių ekstraktų panaudojimas medicinoje	10
1.6 Salicinas	10
1.7 Aknė	12
1.8 Salicilo rūgštis	12
1.9 Augaliniai ekstraktai	14
1.9.1 Augalinių ekstraktų gamybos metodai	14
1.10 Augalinių ekstraktų analizė	17
1.10.1 Efektyvioji skysčių chromatografija	17
1.10.2 Dujų chromatografija	20
2. METODIKA	23
2.1 Augalinės žaliavos surinkimas ir paruošimas ekstraktų gamybai	23
2.2 Augalinių ekstraktų gamyba soksleto metodu	23
2.3 Chromatografinė augalinių ekstraktų analizė	23
2.4 Ekstraktų gamyba ultragarso ir maceracijos metodais	24
2.5 Bandomojo kosmetikos gaminio formulavimas	24
2.6 Mikrobiologinis augalinio produkto tyrimas	24
2.7 Bandomojo kosmetikos gaminio tyrimas su žmonių grupėmis	24
3. REZULTATAI	26
3.1 Paruoštos augalinės <i>Salix</i> žaliavos nuodžiūvio paskaičiavimas	26
3.2 Chromatografinė pagamintų augalinių ekstraktų analizė	26
3.3 Hidroglicerino ekstraktai kosmetinio serumo gamybai	28
3.4 Kosmetikos bandomojo gaminio serumo gamyba	29
3.5 Mikrobiologinės augalinio produkto analizės rezultatai	29
3.6 Bandomojo produkto tyrimas su žmonių grupėmis, turinčiomis odos problemų	30
IŠVADOS	32
LITERATŪROS SĄRAŠAS	33

SANTRAUKA	36
SUMMARY	37
PADEKA	38

SANTRUMPOS

- C18 – Oktadecilo grupė
- COOH – Karboksilo grupė
- ESC – Efektyvioji skysčių chromatografija
- KSV – Kolonijas sudarantys vienetai
- OH – Hidroksi grupė
- PSO – Pasaulio Sveikatos Organizacija
- R_t – Sulaikymo trukmė (ang. *Retention time*)
- Si-OH – Silanolio grupė
- UV – Ultravioletinė spinduliuotė

IVADAS

Paskutiniojo dešimtmečio tendencijos rodo, jog augalinės medicinos vartojimas sparčiai populiarėja, siekiant išvengti šalutinių sintetinių vaistinių medžiagų poveikio (Sasidharan ir kt., 2010). Medicininiai preparatai, tokie kaip karklų žievės ekstraktas, yra vieni pirmųjų istorijoje pradėtų naudoti vaistų, buvo žinomi ir naudojami net prieš 6000 metų Mesopotamijoje. Net ir šiais laikais susidomėjimas šiais augaliniais ekstraktais nesumažėjo, yra atrandama vis daugiau vaistinių medžiagų, kurias gluosninių šeimos augalai kaupia savo žievėje. Bene labiausiai augaliniai karklų ekstraktai yra žinomi dėl savo antiuždegiminių ir karščiavimą mažinančių savybių (Foster ir kt., 2010). Augant žmonių populiacijai ir tobulėjant medicinai bei gyvenimo kokybei – neišvengiamai didėja ir vyresnio amžiaus populiacijos atstovų. Medicinos pažangos dėka, žmonės ne tik ilgiau gyvena, bet ir ilgiau išlieka funkcionalūs, pajėgūs dirbti ir dalyvauti socialiniame gyvenime. Natūralu, jog visi šie žmonės nori kuo ilgiau išlaikyti sveiką ir gražią išvaizdą. O jauni asmenys, matydami šias ateities perspektyvas, taip pat aktyviai pradeda rūpintis oda jau nuo ankstyvos jaunystės. Todėl poreikis natūraliai, nežalingai ir veiksmingai kosmetikai neišvengiamai didėja.

Natūralūs produktai, tokie kaip augalų ekstraktai, dėl gausios cheminių medžiagų įvairovės savo sudėtyje, suteikia plačias galimybes naujiems kosmetikos ir medicinos produktams kurti. Baigiamojo magistrinio darbo metu pasirinkta pagaminti produktą, kurio paskirtis yra drėkinti odą, kuri su amžiumi sausėja, ir padėti žmonėms kovojant su odos problemomis, akne. Aknė (lot. *acne vulgaris*) yra dermatologinė liga, sukelianti neuždegiminius pažeidimus (atvirus ir uždarus kamedonus), uždegiminius pažeidimus (papulės, pustulės ir mazgeliai) bei įvairaus laipsnio randus. Tai yra ypač dažna liga, paplitusi iki 85 % pasaulio žmonių populiacijos ir dažniausiai pasireiškianti paauglystėje (Bhate ir Williams, 2013). Išanalizavus statistiką galima pamatyti, jog aknė gali išlikti ir iki pilnametystės: 50 – 9 % bėrimai kamuoja 20 – 29 metų moteris ir 26,3 % vargina ir iki 40 – 49 metų (Collier ir kt., 2008).

Tiriamąjį magistrinio darbo metu, panaudojant augalinę žaliavą, karklo *Salix purpurea* „*Gracilis*“ žievės ekstraktą, buvo sukurtas kosmetinis produktas. Ištyrus gautą ekstraktą ir atlikus chromatografinę analizę buvo pastebėta, jog augale yra sukaupta antiuždegiminės medžiagos salicino. Salicinas tai alkoholinis β -gliukozidas, nuo seno žinomas dėl jau minėtų antiuždegiminių savybių, kuriomis pasitelkiant, salicinas taip pat yra naudojamas vaisto aspirino gamyboje. Taip pat iš salicino cheminiu būdu yra gaunama salicilo rūgštis, kuri yra naudojama vaistinės kosmetikos priemonėse ir veikia kaip antibakterinė medžiaga, valanti poras ir šalinanti spuogus bei odos sudirgimą.

Norint sukurti ekologišką kosmetinį produktą, gamyboje buvo naudojamas grynas ekstraktas, nepaveiktas jokiais cheminiais reagentais ar aukštomis temperatūromis, kurios galėtų sukelti ekstrakto esančių organinių junginių degradaciją. Tiriamas natūralaus salicino poveikis su odos problemomis turinčiais asmenimis. Produkto efektui stebėti buvo numatyta 14 dienų, tiriamieji asmenys produktą naudojo du kartus per dieną, su prašymu nenaudoti kitų kosmetinių priemonių, kurios galėtų daryti įtaką odos būklei. Pagamintas serumas išdalintas žmonėms suskirsčius į dvi grupes – 50 % asmenų naudojo preparatą su salicino ekstraktu ir kiti 50 % naudojo placebo (produktą be tiriamosios medžiagos), tačiau tiriamiesiems asmenims šis faktas atskleistas nebuvo. Gauti duomenys analizuojami ir pateikiami rezultatai apie vietinės kilmės karklo *Salix purpurea* „*Gracilis*“ žievėje esančio salicino poveikį gydant odos ligas.

Baigiamojo darbo tikslas:

1. Chromatografinės analizės metodu nustatyti augaliniame ekstrakte esantį tiriamosios medžiagos - salicino, kiekį.
2. Suformuluoti kosmetikos gaminį su vietinės augalinės kilmės karklo žievės ekstraktu.
3. Atlikti tyrimą su žmonių grupe, turinčia odos problemų, susisteminti rezultatus ir pateikti karklų žievėje esančio salicino efektyvumą gydant problematišką odą.

Uždaviniai:

1. Surinkti augalinę žaliavą, paruošti karklų žievę ekstrakto gamybai, išždiovinus įvertinti augalo drėgmės praradimą.
2. Soksleto metodu pagaminti metanolinius ekstraktus dujų chromatografijos analizei, salicino aptikimo įvertinimui.
3. Maceracijos ir sonifikavimo metodu paruošti hidroglicerino ekstraktus efektyviosios skysčių chromatografijos analizei, salicino kiekio ekstrakte nustatymui.
4. UAB „KOSMETIKOS TYRIMŲ CENTRAS“ laboratorijoje pagaminti augalinio ekstrakto turintį serumą, taip pat placebo serumą, neturintį veikliosios medžiagos.
5. Atlikti bandomojo gaminio mikrobiologinę analizę, įvertinti produkto sterilumo kokybę.
6. Įvertinti sukurto augalinio serumo efektyvumą, remiantis tyrimu su žmonių grupe, turinčia odos problemų, pateikti gautus rezultatus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Karklo botaninė klasifikacija

1. Karalystė – *Plantae* – Augalai
2. Pokaralystė – *Tracheobionta* – Induočiai augalai
3. Super skyrius – *Spermatophyta* – Sėkliniai augalai
4. Skyrius – *Magnoliophyta* – Žydintys augalai
5. Klasė – *Magnoliopsida* – Dviskilčiai augalai
6. Poklasė – *Dilleniidae* - Dilenijažiedžiai
7. Eilė – *Salicales* - Gluosniažiedžiai
8. Šeima – *Salicaceae* – Gluosninių
9. Gentis – *Salix L.* – Karklas (USDA, 2020).

1.2 Botaninis karklo genties apibūdinimas

Šio darbo metu tirtas augalas, karklas, priklauso gluosninių (*Salicaceae*) šeimai. Pasauliniu mastu gluosninių šeimoje yra trys gentys: drebulė, tuopa – *Populus L.*, gluosnis, karklas, žilvitis – *Salix L.* ir čiozenija – *Chosenia Nakai*. Šios genties augalai yra skirstomi į medžius, krūmus ir krūmokšnius, visos rūšys turi polinkį į šakotumą, ypač būdingas simpodinis šakojimasis, dėl kurio atsiranda augalo formų įvairovė, tokios formos kaip kupolas, skėtiška, kūgiška, rutuliška ir pan (Kuzovkina ir kt., 2008).

Gluosninių genties augalai gali išauginti dviejų rūšių metūglius, pirmieji yra ilgaūgliai, kuriems būdingi ilgesni tarpubambliai, stambesni lapai, prielapiai bei pumpurai. Antroji rūšis yra trumpaūgliai, kurių savybė yra išaugti ant vyresnės kartos, tai antros, trečios eilės šakų ir ant jų auginti tipinius savo rūšiai ūglius (Kuzovkina ir kt., 2008). Karklai ir gluosniai turi unikalią biologinę savybę - nukirtus jų stiebus, iš kelmelių išauga gausūs ir sparčiai augantys atžaliniai ūgliai, dažniausiai jų dydis siekia iki 2 – 2,5 metrų, šia savybe remiasi ir biologai augindami gluosninių genties augalus plantacijose (Navasaitis ir kt., 2003).

Pagal fiziologines savybes gali būti skiriami keturi gluosnių ir karklų metūglių plaukuotumo tipai, tai šilkiškas, aksomiškas, voratinkliškas bei trumpai veltiniškas. Žievės spalvos variacija priklauso nuo atitinkamos augalo rūšies (Navasaitis ir kt., 2003).

Salix genties augalų lapai yra pražanginiai, su lapkočiais, lygiais kraštais, dantyti, banguoti arba pjūkliški, forma gali būti įvairi – elipsiška, linijiška – lacentiška, lacentiška, ovali arba kiaušiniška. Karklų lapų apatinė pusė dažniausiai būna padengta sidabriškais plaukeliais (Eisenreich ir kt., 2007). Lapo žiotelės esti pilkšvojoje lapo dalyje, tačiau priklausomai nuo drėgmės kiekio aplinkoje jos gali būti išsidėsčiusios abiejose lapo pusėse (Butkevič, 2007). Taip pat apatinė lapų pusė gali būt apsitraukusi apnašomis (Wichtl, 2004). Lapų dydžiui ir formai įtakos turi jų padėtis ant ūglio, dažniausiai viršutinė lapų spalva skiriasi nuo apatinės ir daugelio rūšių gluosnių ir karklų lapai turi prielapius (Navasaitis ir kt., 2003).

Tiriamųjų karklų žiedai neturi apyžiedžio, yra smulkūs, telkiasi žiedynuose, kuriuos dar galima vadinti žirginiais. Šių augalų žiedų forma paprastai yra vertikali, ne retai būna lenkta, pasitaiko atvejų, kuomet pražydus yra plaukuoti. Atlikti tyrimai rodo, jog skirtingos karklų rūšys turi skirtingą kiekį žiedų, jų gali būti net nuo 19 iki 192 (Butkevič, 2007). Karklų pavienių žiedų

pastebima nėra, jie atsiranda tuomet, kai formuojasi lapai arba vėliau, vyriškosios lyties karklo žiedai turi nuo 1 iki 8 kuokelių (Wichtl, 2004).

Vietinės kilmės dendrofloros gluosnių ir karklų genties rūšys pagal kuokelių skaičių žiede skirstomos į 3 grupes, tai turinčios po 2, 3 ir 15 kuokelių. Moteriškasis (piestelinis) žiedas susideda iš kelių komponentų – pažiedė ir viena arba dvi nektarinės piestelės, kurią sudaro mezginė, liemenėlis, purka ir kotelis. Tipiška viršutinė mezginės forma yra vienalizdė, siaurėjanti į viršūnę, kūgiška, plaukuota arba plika, taip pat gali būti su kotu arba išvis bekotė. Šio augalo purkos būna dviskiautės arba keturskiautės (Navasaitis ir kt., 2003).

Gluosninių šeimos augalų žydėjimas prasideda anksti, varijuoja tarp antros ir trečios balandžio mėnesio dekados, žydėjimas trunka priklausomai nuo klimato sąlygų ir augalo rūšies, tipiška 7 – 10 dienų (Kuzovkina, 2008).

Salix genties karklų vaisius yra diaugiasėklė, vienalizdė dėžutė, kurioje būna nuo 3 iki 22 sėklų. Šios sėklos yra smulkios, turi ilgus skristukus, dažniausiai padengtos plaukeliais ir linkusios greitai tapti nedaigiomis (Kuzovkina, 2008). Daugintis šie augalai geba keliais būdais, tai sėklomis ir vegetatyviniu būdu: atlankomis, gyvašakėmis, žaliaisiais auginiais, gyvakuoliais. Karklai auga labai greitai, turi polinkį į aktyvią rizogenezę, atsparumą šalčiui. Ne retai daugelis rūšių kryžminasi tarpusavyje, ko pasekoje susidaro natūralūs hibridai (Smaliukas, 2006).



a

b

- 1 pav. *Salix alba ssp. alba* kl. 04115 kolekcinio lauko bendras vaizdas: a – vienamečiai atžaliniai ūgliai, b – keturmečiai stiebai. Nuotrauka iš Vilniaus Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto karklų plantacijos, kurioje buvo surinkta augalinė žaliava.

1.3 Augalų rūšys ir kilmė

Tiriamą augalą *Salix* gimtine yra laikoma Azija, Europa bei Šiaurės Amerika (Wichtl, 2004). Šio magistrinio darbo metu naudota augalinė žaliava – žievė, atskirta nuo vietinės kilmės augalų šakų, kurios atsivežtos iš Gamtos mokslų centro Botanikos instituto padalinio Vilniuje. Tirtos penkios skirtingos rūšys: *Salix purpurea f. lutea*, *Salix alba ssp. coerulea*, *Salix purpurea f. angusifolia*, *Salix purpurea „Gracilis“*, *Salix integra xS. kochiana* Nr.43.

Vokietijos komisijos E monografija nurodo rūšis *Salix alba*, *Salix purpurea*, *Salix fragilis* kaip pagrindinį reikiamos žaliavos – salicino šaltinį, tačiau, priklausomai nuo augalo amžiaus ir klimato zonos, kitos rūšys taip pat gali kaupti saliciną ir yra tiriamos (Wichtl, 2004).

1.4 Cheminė karklo žievės sudėtis

Literatūroje išanalizavus atliktus tyrimus su karklų žievėmis, pateikti rezultatai nurodo jos cheminę sudėtį, randama: $\geq 1,5$ – 11 proc. salicilatų, tačiau reikia atsižvelgti, jog žievės kokybinė ir kiekybinė sudėtis labai priklauso nuo atitinkamos karklo rūšies (Wichtl, 2004). Tyrimuose nustatyta, jog apie 0,5 % salicilatų kaupia *Salix alba*, *Salix fragilis* kaupia nuo 1 iki 10 % ir *Salix purpurea* žievėje yra nuo 3 iki 9 % salicilatų (Barnes ir kt., 2007). Taip pat pateikti tyrimų rezultatai, kuriuose pastebėta, jog dažniausiai augalo žievėje nustatomi ir šie glikozidiniai salicilatų dariniai: salicino 6-O-acil junginys, fragilinas, salicinas, populino 2-O-acetil darinys, populinas, salikortinas su jo 2-O-, 3-O-, 4-O-acetil junginiais, salikortino 2-O-benzoil darinys (tremulacinas), vimalinas, 2-O-cinamoil junginys, triandrinas. Kaip pateikta 1 lentelėje, ištyrus karklų *Salix* žievę, joje taip pat randama rūgščių (salicilo, p – hidroksibenzoinė, kofeino, ferulo, p – kumarino rūgštys), flavonoidų (kvercetino, liuteolino, eriodiktiolio, naringenino ir jo darinių, ampelopsino, chalkono, izosalipurpozido, katechino), fenolinių alkoholių (saligeninas), nuo 8 iki 20 % taninų. (Wichtl, 2004).

1 lentelė. Gluosnio žievės sudėtinės dalys.

Fenoliniai junginiai				
Fenoliniai glikozidai	Flavonoidai	Rūgštys	Fenoliniai alkoholiai	Rauginės medžiagos
Salicinas, salicino 6-O-acil darinys, fragilinas (2-O-acetilsalicinas), populinas, populino 2-O-acetil darinys, salikortinas, salikortino 2-O-, 3-O-, 4-O- acetil dariniai, salikortino 2-O-benzoil darinys (tremulacinas), salikortino 2-O-cinamoil darinys	Katechinas, ampelopsinas, kvercetinas, liuteolinas, eriodiktiolis, naringeninas, chalkonas, izosalipurpozidas	Salicilo, p-hidroksibenzoinė, kofeino, ferulo, p-kumarino	Saligeninas	Taninai

1.5 *Salix* augalinių ekstraktų panaudojimas medicinoje

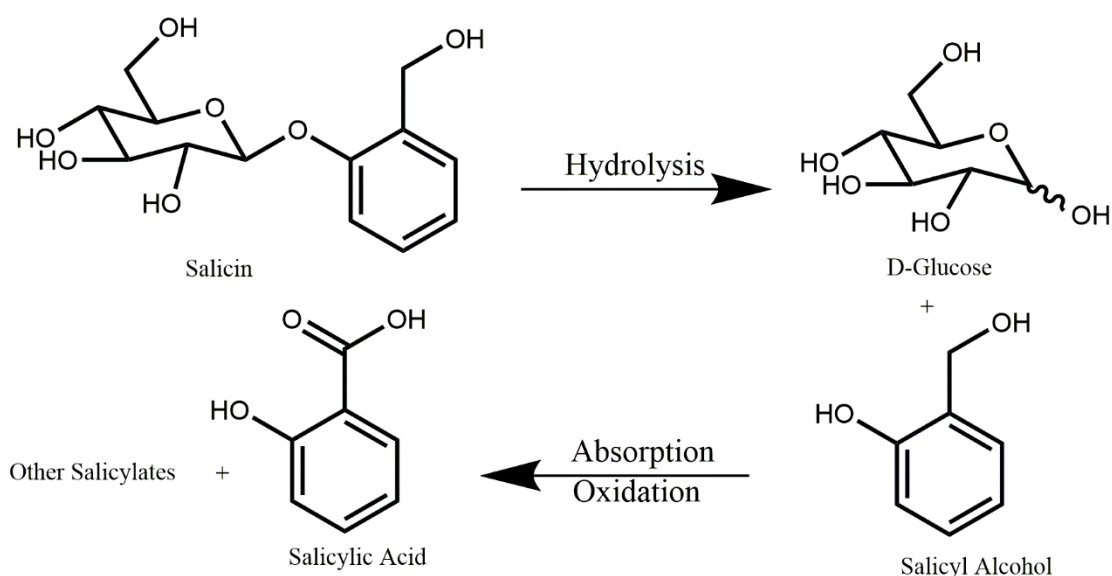
Gluosnių šeimos žievės fito vaistai etno-medicinos istorijoje siekia senovės graikų, asirų ir egiptiečių civilizacijas, jau tais laikais žmonės naudojo *Salix* augalus dėl jų ypatingųjų gydomųjų savybių, kurias teikia žievėje esantis salicinas. Istoriniai dokumentai tvirtina, jog susmulkintos arba miltelių pavidalu daugiausia buvo naudojamos *S. alba*, *S. nigra*, *S. purpurea*, *S. daphnoides* ir *S. fragilis* rūšys (Desborough ir kt., 2017). Tiek natūralus, iš augalinių ekstraktų gaunamas salicinas, tiek sintetinis jo analogas aspirinas, veikia kaip priešūždegiminiai vaistai ir žmogaus organizme yra metabolizuojami į salicilatą – aktyvų farmakoforą, kuris geba konkurencingai slopinti ciklooksigenazę (Akao ir kt., 2002).

Atlikus tyrimus, mokslininkai teikia išvadas, jog tokį gydomąjį poveikį suteikia būtent salicinas, esantis žievėje, tačiau nepaisant to, tolimesni tyrimai parodė, jog tokį poveikį turi ne tik salicinas, bet ir kitos medžiagos esančios žievėje, tai prieš tai minėti augalo žievėje randami polifenoliai ir flavonoidai. Nustatyta, jog pastarieji junginiai turi antioksidacinių, karščiavimą mažinančių, imunitetą stiprinančių ir antiseptinių savybių (El-Shemy ir kt., 2007). Gluosnio žievės ekstraktai yra naudojami medicininiuose preparatuose, skirtuose numalšinti bendrą peršalimą, esant reumatui ar artritui (Kenstavičiene, 2009).

1.6 Salicinas

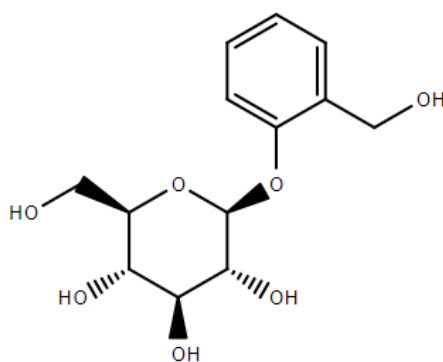
Žodis salicinas kildinamas iš gluosnio lotyniško pavadinimo *Salix*. Salicinas yra balti kartaus skonio milteliai, kurie dažniausiai yra gaunami ekstrahuojant vandenį iš gluosnio žievės ir lapų. Kiti salicino pavadinimai yra: β -D-gliukopiranozidas; 2-(hidroksimetil) fenilas; 2-(hidroksimetil) fenil- β -D-gliukopiranozidas; druskos tirpalas; salikozidas; salicilo alkoholio gliukozidas ir saligenin- β -D-gliukopiranozidas (Mahdi, 2006).

1935 m. italų chemikas Raffaele Piria, atlikęs rūgštinės hidrolizės eksperimentus, nustatė, kad cheminė salicino struktūra yra 2-(hidroksimetil) fenil-1- β -D-gliukopiranozidas (Mahdi, 2010). Virškinimo trakte galima salicino hidrolizė per eterinį ryšį. Gaunama D-gliukozė ir salicilo alkoholis (2 pav.). Salicilo alkoholis toliau oksiduojasi į salicilo rūgštį ir kitus salicilatų junginius, tokius kaip saligeninas, salicilurino rūgštis, salicilo gliukuronidai ir gentizino rūgštis, kurie visi yra pašalinami per inkstus (Mahdi, 2010).



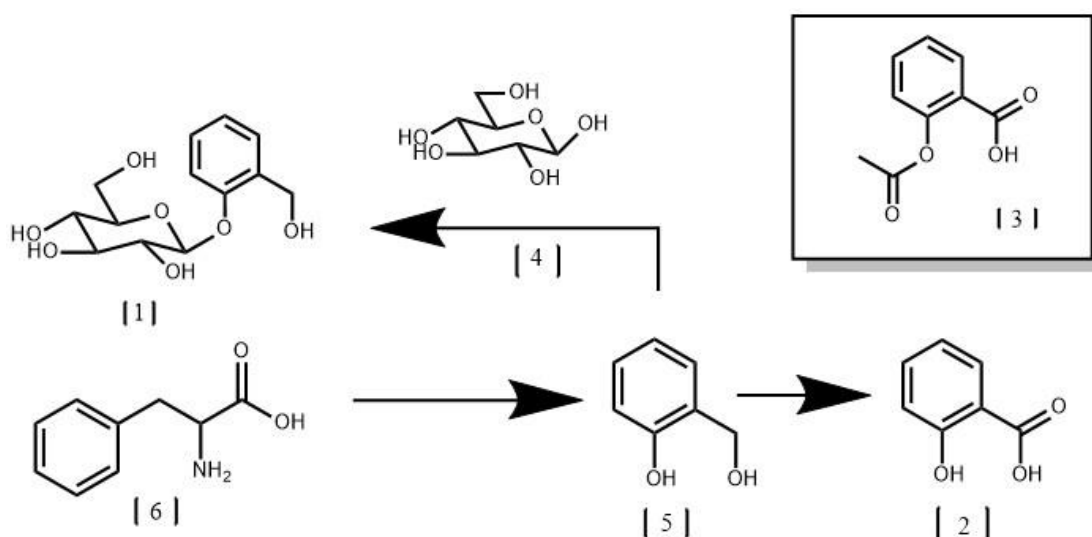
2 pav. Salicino hidrolizės reakcija.

Salicino arba 2-(hidroksimetil) fenil-O- β -D-gliukopiranozido molekulinė masė yra 286,27 g/mol. Medžiagos IUPAC pavadinimas (2R, 3S, 4S, 5R, 6S)-2-(hidroksimetil)-6-[2-(hidroksimetil) fenoksi] oksan-3,4,5-triolis. Cheminė šio junginio struktūra apima β -D-gliukozės ir 2-hidroksibenzilo alkoholį arba salicilo alkoholį (3 pav). Kaip matoma, struktūrinėje formulėje, salicinas turi septynis deguonies atomus kaip H-jungties akceptorius ir penkias hidroksilo grupes. Šis junginys taip pat turi devynis sukimosi ryšius, kurie kontroliuoja jo konformacinę struktūrą. Be to, β -D-gliukozės ir salicilo alkoholio fragmentai yra sujungti β -1,1'-D-glikozidiniu ryšiu. Šios struktūrinės savybės lemia salicino poliškumą, todėl β -D-salicino ekstrahavimui reikalinga polinių tirpiklių sistema, tokia kaip verdantis vanduo ir etilo alkoholis (Mahdi, 2014).



3 pav. Salicino struktūrinė formulė.

Kaip pateikta 4 paveikslėlyje, salicino biosintezė vyksta per fenilpropanoidinį kelią, kuris prasideda nuo L-fenilalanino [6] (4 pav.). Šio junginio, β -D-salicino [1] (4 pav.), susidarymas apima penkis etapus: deaminavimą, orto-hidroksilinimą, β -oksidaciją, C2 eliminaciją ir glikozilinimą (Babst ir kt., 2010).



4 pav. Salicino biosintezės schema.

Patekęs į žmogaus organizmą, vartojant oraliniu būdu, salicinas yra metabolizuojamas į salicilo rūgštį. Šis metabolizmo etapas vyksta virškinimo trakte ir kraujyje, apimant glikono hidrolizę ir benzilo anglies oksidaciją (Mahdi, 2014).

1.7 Aknė

Aknė (lot. *acne vulgaris*) yra dermatologinė liga, sukianti neuždegiminius pažeidimus (atvirus ir uždarus kamedonus), uždegiminius pažeidimus (papulės, pustulės ir mazgeliai) bei įvairaus laipsnio randus. Tai yra ypač dažna liga, paplitusi iki 85 % pasaulio žmonių populiacijos ir dažniausiai pasireiškianti paauglystėje (Bhate ir Williams, 2013). Tačiau išanalizavus statistiką galima pamatyti, jog aknė gali išlikti ir iki pilnametystės: 50 – 9 % bėrimai kamuoja 20 – 29 metų moteris ir 26,3 % vargina ir iki 40 – 49 metų (Collier ir kt., 2008).

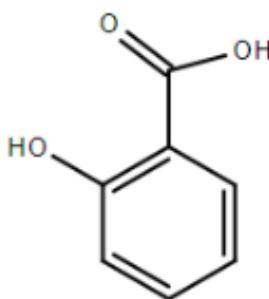
Šios ligos pasekmės yra varginančios ne tik dėl ne estetiško išorinio vaizdo, bet taip pat daugeliui žmonių, turinčių aknę, išsivysto psichologiniai sutrikimai, tokie kaip nepasitikėjimas savimi, depresija ir nerimas, kurie turi įtakos neigiamai gyvenimo kokybei (Ramos-e-Silva ir kt., 2015).

Dermatologinių tyrimų metu nustatyta, jog aknės gydymui yra naudingi cheminiai odos šveitikliai, tiek sintetiniai, tiek natūralūs. Viena iš tokių, literatūroje aprašytų, odos regeneraciją skatinančių medžiagų yra salicilo rūgštis, kurią, kaip anksčiau minėta, galima gauti saliciną paveikus atitinkamais cheminiais reagentais. Ši rūgštis turi savybę suminkštinti giliausiai esantį epidermio sluoksnį, tuomet oda pradeda luptis, pašalindama susidariusius neuždegiminius kamedonus (Lekakh ir kt., 2015).

1.8 Salicilo rūgštis

Vokiečių dermatologas, Paul Gerson Unna, pirmasis 19 amžiaus antroje pusėje aprašė salicilo rūgšties gydomąsias savybes ir panaudojimą. Nuo tada ši veiklioji medžiaga yra naudojama daugelyje preparatų, skirtų kovoti su odos problemomis (Grimes ir kt., 2006).

20-ojo amžiaus dermatologas Kligmanas salicilo rūgštį apibūdino kaip β -hidroksi rūgštį, tačiau Yu ir Van Scott ją klasifikavo kaip fenolinę aromatines rūgštį. Ši rūgštis turi karboksilo (-COOH) ir hidroksilo (-OH) grupes, tiesiogiai prijungtas prie aromatinio benzeno žiedo, skirtingai nuo β -hidroksi rūgšties, turinčios alifatinės anglies atomo grandinę. Taip pat ši rūgštis turi hidroksilo grupę, turinčią rūgštinių savybių, tuo tarpu tikrosios β -hidroksi rūgšties hidroksilo grupė yra neutrali (Arif, 2015).



5 pav. Salicilo rūgšties struktūrinė formulė.

Mokslininių tyrimų metu nustatyta, jog salicilo rūgštis, priešingai nei α -hidroksi rūgštys (pvz. glikolio rūgštis) yra riebaluose tirpi medžiaga, todėl gali maišytis su plaukų folikuluose esančiais

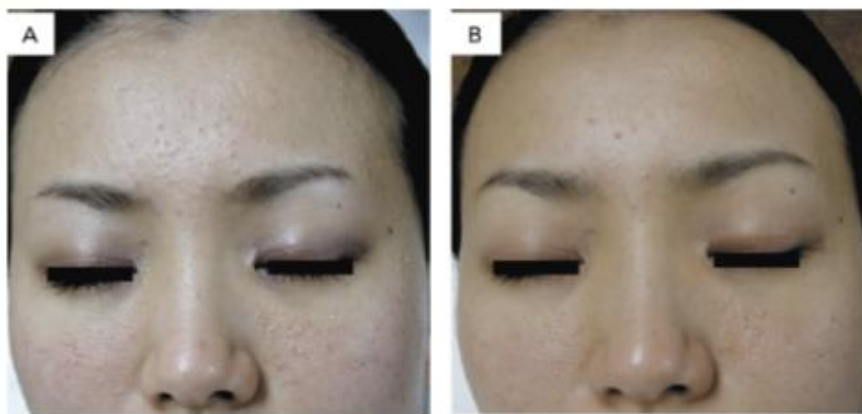
epidermio lipidais ir riebalinių liaukų lipidais. Taip pat ji turi keratolitines ir komedolitines savybes - tirpdo raginį odos sluoksnį bei naikina komedonus – tamsius, riebalinius darinius odos porose (Arif, 2015). Dermatologiniuose tyrimuose ištirta ir nustatyta šios rūgšties nauda pacientams, turintiems odos bėrimų, salicilo rūgštis sumažina riebalų sekreciją, taip sąlygodama bėrimų mažėjimą (Arif, 2015). Salicilo rūgštis veikia kaip lipofilinė medžiaga, kuri gali pašalinti tarpląstelinius lipidus, kovalentiškai susietus su karnizuotu apvalkalu, supančiu paviršiaus epitelio ląsteles. Dermatologai sėkmingai naudoja šį antihiperplastinį rūgšties poveikį chemiam odos atnaujinimui (Arif, 2015).

Odos epidermio ląstelių sankaupos priklauso nuo desmosomų – adhezinių odos ląstelių jungčių, kuriose yra baltymų desmogleinų, atsakingų už desmosomų formavimąsi. Nustatyta, jog salicilo rūgštis turi savybę „ištraukti“ šiuos baltymus, tuomet yra prarandama epidermio ląstelių sankaupa ir vyksta eksfoliacija (negyvų audinių atsiskyrimas) (Imayama ir kt., 2000). Taigi pagal veikimo mechanizmą šią rūgštį galima laikyti desmolitine, o ne keratolitine medžiaga, kadangi ji veikia sutrikdydama ląstelių jungtis, o ne skaidydama ar lizuodama tarpląstelinius keratino filamentus (Del Rosso, 2005). Imayama ir mokslininkų grupė tyrė pelių, neturinčių plauko, odos histologinius pokyčius po sąveikos su salicilo rūgštimi. Išanalizavus rezultatus buvo pastebėta sukietėjusių ląstelių netektis, padidėjęs epidermio ląstelių ir po jomis esančių fibroblastų - jungiamųjų odos audinio ląstelių, aktyvumas (regeneracija). Buvo padaryta išvada, jog salicilo rūgštis gali sukelti apatinio derminio audinio pakitimus, tiesiogiai nepažeidžiant odos (Imayama, 2000).

Viena iš labiausiai tirtų salicilo rūgšties savybių yra jos antioksidacinis aktyvumas. Kadangi ši rūgštis yra naudojama kaip cheminė hidroksilo radikalų gaudyklė, buvo išsiaiškinta, kad salicilo rūgštis gali sumažinti audinių žalą, kurią sukelia hipoksija – tai yra organų ir audinių pažeidimas, kuomet jiems stinga deguonies (Randjelovič ir kt., 2015).

Mokslininkų grupė atliko tyrimą, naudodami salicilo rūgštį, tyrė 16 japonų pacientų, turinčių veido spuogų (atvirų ir uždarų komedonų), tačiau bendrai esančių geros sveikatos būklės (Hashimoto ir kt., 2007). Tiriamieji asmenys 2 savaites naudojo odos šveitiklį, turintį salicilo rūgšties. Kiekvienas pacientas ant savo veido tepdavo 5 g 30 % salicilo rūgštį, esančią polietilenglikolio tirpiklyje, po 5 minučių oda buvo kruopščiai nuplaunama vandeniu. Tyrimo metu visi kiti vietiniai spuogų gydymo būdai buvo draudžiami. 6 – amė paveikslėlyje matomos nuotraukos darytos prieš tyrimą ir po dviejų savaitių produkto naudojimo (Hashimoto ir kt., 2007).

Pagal mokslininkų grupės pasiūlytą klasifikavimo sistemą, kuomet pradinis lygis yra III (sunkūs bėrimai), pacientų veido bėrimai nuo pirmosios dienos iki 2-osios savaitės pabaigos visiems sumažėjo iki I laipsnio (labai sumažėję bėrimai) (Hashimoto ir kt., 2007).



- 6 pav. Nuotrauka prieš (A) ir po (B) tyrimo su salicilo rūgšties odos šveitikliu, akivaizdžiai matomas spuogų ir kamedonų sumažėjimas. B paveikslėlyje nėra pastebima odos riebalų liaukų sekrecija (Hashimoto ir kt., 2007).

1.9 Augaliniai ekstraktai

Pasak Pasaulio Sveikatos Organizacijos, iš 225 vaistų, kurie yra laikomi pagrindiniais ir būtiniais žmonių gydymui, net 11 % iš jų veikliųjų medžiagų yra išskiriama būtent iš augalų. O taip pat ir nemažas kiekis sintetinių vaistų yra gaminamas iš augalinių vaistų pirmtakų (Gupta ir kt., 2012).

Norint išskirti iš augalo atitinkamas veikliąsias medžiagas yra vykdomas fitocheminis tyrimas, kuris apima šiuos pagrindinius veiksmus: augalinės medžiagos autentiškumo nustatymas ir ekstrahavimas, dominančių sudedamųjų dalių atskyrimas ir išskyrimas, išskirtų junginių apibūdinimas ir kiekybinis įvertinimas (Evans, 2008).

Tyrinėdami augalinių ekstraktų gamybos metodikas mokslininkai dėjo daug pastangų, kad būtų išrinktas efektyviausias ir veiksmingiausias būdas. Efektyvumą nusako gauta ekstrakto išėiga, o veiksmingumą nurodo ekstrakto potencialas (biologinė reikšmė / gebėjimas sukelti reikiamą poveikį). Literatūrinuose šaltiniuose nurodoma, jog ekstrakcija yra vienas tvariausių biologinių komponentų išskyrimo būdų iš augalų (Jadhav et al., 2009). Tačiau gaminant augalinį ekstraktą yra privaloma pasirinkti efektyviausią ekstrakcijos principą, todėl neretai tyrėjai išbando bent kelis metodus. Taip jie apsisaugo nuo paklaidų, kurios dažnai iškyla naudojant tas pačias žaliavas, tačiau skirtingas ekstrakcijos metodikas (Gupta ir kt., 2012).

1.9.1 Augalinių ekstraktų gamybos metodai

Ekstrakcija yra pirmas žingsnis norint atskirti natūralias aktyvias medžiagas iš turimų augalinių žaliavų, šis metodas apima ekstrahavimą tirpikliu, distiliavimo metodą bei presavimą. Šiomis dienomis plačiausiai naudojamas ekstrahavimas tirpikliu, kuris taip pat buvo naudojamas mano tiriamajame darbe. Ekstrahavimą tirpikliu galima suskirstyti į keturis segmentus: 1) tirpiklio prasiskverbimas į kietą matricą; 2) tirpinio ištirpimas tirpiklyje; 3) tirpiosios medžiagos (tirpinio) išsiskyrimas iš kietosios matricos; 4) ekstrahuojamų tirpiųjų medžiagų surinkimas. Naudojant šį metodą būtina atsižvelgti į tirpiklio savybes, žaliavų dalelių dydį, tirpiklio ir kietos medžiagos santykį, taip pat ekstrahavimo efektyvumui didelę įtaką turi ekstrahavimo temperatūra ir trukmė (Zhao ir kt., 2011).

Renkantis tirpiklius ekstrahavimui svarbu atsižvelgti į jų selektyvumą, kainą bei saugumą. Remiantis panašumo ir suderinamumo dėsniu (tirpinio tirpumas tirpiklyje), tirpikliai, kurių poliškumo vertė artima tirpios medžiagos poliškumui, greičiausiai veiks geriau bei efektyviau, nei tie, kurių poliškumas neatitinka turimos medžiagos poliškumo. Alkoholiai, tokie kaip etanolis ir metanolis yra universalūs ekstrahavimui vykdant fitocheminius tyrimus. Taip pat dalelių dydis turi reikšmės ekstrakcijos efektyvumui, paprastai, kuo smulkesnis dalelių dydis, tuo geresni išeigos rezultatai gaunami. Tai galima paaiškinti tuo, jog esant mažoms dalelėms, padidėja tirpiklių įsiskverbimas ir tirpių medžiagų difuzija. Tačiau per daug mažas dalelių dydis gali sąlygoti per didelę tirpios medžiagos absorbciją kietoje medžiagoje, kuomet galima susidurti su sunkumais vėlesniame filtravime (Zhang ir kt., 2018).

Svarbu yra tinkamas temperatūros parinkimas, kadangi dažnai aukšta temperatūra padidina augalinės kilmės aktyviosios medžiagos tirpumą bei difuziją, tačiau dėl per daug aukštos temperatūros gali įvykti tirpiklio išgaravimas, ko pasekoje yra tikimybė atsirasti priemaišoms ir termolabilių komponentų suirimui. Atsižvelgiant į ekstrahavimo laiką, efektyvumas didėja ilgėjant proceso trukmei tam tikru laikotarpiu, tačiau pailgėjęs proceso laikas nebeturės įtakos efektyvumui, kuomet bus pasiekta tirpios medžiagos pusiausvyra kietoje matricoje ir išorėje (Zhang ir kt., 2018).

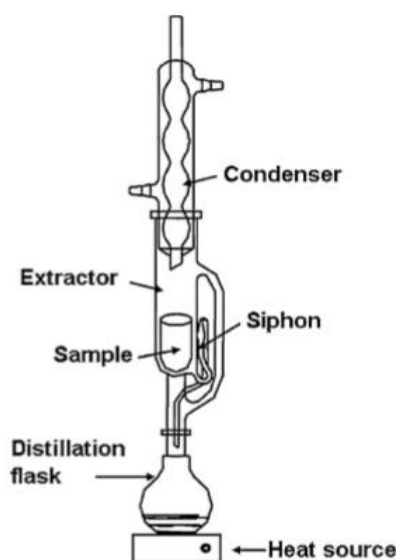
Maceracija yra vienas paprasčiausių ir pigiausių augalinių medžiagų ekstrakcijos metodų, turintis trūkumų dėl ilgo proceso laiko. Įprastai šis metodas yra naudojamas termolabiliems komponentams išgauti (Zhang ir kt., 2018). Maceracijos metodo principas yra žaliavos audinių suminkštinimas ir suskaidymas į mažesnes dalis naudojant skysčius, proceso metu audiniui suminkštėjus, jo viduje esančios veikliosios medžiagos (tirpinys) yra išplaunamos į ekstraktą. Tokiu būdu ekstrakto atsiranda daug metabolitų, tokių kaip fenoliai, terpenai, flavonoidai ir pigmentai (Sharma, 2018). Taip pat neseniai mokslininkai pristatė ir naują maceravimo metodiką – mikrobu maceravimą, kurio metu naudojant skirtingus mikroorganizmus iš vaisių, daržovių, ankštinių augalų, grūdų buvo išgaunami bioaktyvūs junginiai, tokie kaip fenoliai, antioksidantai, taninai ir saponinai. Maceravimo metodas turi didelį pranašumą, nes leidžia išgauti reikiamus junginius iš skirtingų šaltinių, lengvas paruošimo būdas, nedidelės išlaidos bei mažos energijos sąnaudos (Sharma, 2018).

Perkoliacija tai dar vienas ekstrahavimo metodas, kuris yra aprašomas kaip efektyvesnis nei maceracija, nes tai yra nuolatinis nepertraukiamas procesas, kuriame yra nuolat keičiami sotiųjų tirpikliai (Zhang ir kt., 2018). Taikant nuoseklų perkoliacijos metodą, vaistiniai augalai 24 valandas yra laikomi viename tirpiklyje, kai filtratas yra surenkamas, ta pati medžiaga yra ekstrahuojama kitu tirpikliu neteikiant šilumos (Baravalia ir kt., 2009). Perkoliacijos metodo pranašumai yra didesnė ekstrakto išeiga iš sąlyginai mažo kiekio žaliavos. Antrasis perkoliacijos pranašumas yra tai, jog procesas gali būti paliekamas per naktį žemoje temperatūroje ir nesudaro sunkumų tyrėjams. Taip pat šaltojo perkoliacijos metodo metu yra naudojami skirtingo poliškumo tirpikliai, augalinės žaliavos bioaktyvios medžiagos ištirpinamos tirpiklyje pagal jų tirpumo pobūdį, pvz. lipidai ištirps nepoliniuose tirpikliuose, tokiuose kaip toluenas, kuomet cukrūs arba fenoliai tirps poliniuose tirpikliuose, tokiuose kaip acetonas (Chand ir kt., 2012). Šis metodas dažniausiai yra naudojamas aktyviems ingredientams išgauti, ruošiant tinkūras ir skysčių ekstraktus. Proceso metu paprastai naudojamas perkoliatorius (siauras kūgio formos indas, atidarytas iš abiejų galų). Kietoji medžiaga yra įdedama į atitinkamą nurodytą kiekį tirpiklio ir paliekama stovėti maždaug 4 valandas sandarioje talpykloje, praėjus šiam laikui visas turinys yra supilamas į perkoliatorių. Taip pat į perkoliatoriaus talpą yra įpilamas papildomas kiekis tirpiklio, kad susidarytų seklos sluoksnis ir tuomet mišinys 24 valandas paliekamas uždaramame perkoliatoriuje. Po paros, perkoliatoriaus

kamštis yra atidaromas ir skysčiui leidžiama lašėti. Surinkus ekstraktą vykdomas filtravimas, pašalinamos išspaudos, gautas tirpalas praskiedžiamas iki reikiamo kiekio (Chanda ir kt., 2012).

Dekantavimas - gaminant ekstraktą dekantavimo metodu, ekstraktas yra nupilamas nuo nuosėdų, šis procesas gali sąlygoti ekstrakto esantį didelį kiekį vandenyje tirpių priemaišų. Dekantavimo proceso metu neapdorota vaistinė medžiaga nustatytą laiką yra virinama nurodytu kiekiu vandens, po to tirpalas yra filtruojamas. Turimos žaliavos ir vandens pradinis santykis dažniausiai nustatomas ekstrahuojant, žaliavos kiekis turi sudaryti ketvirtadalį ekstrakto tūrio. Gautas ekstraktas filtruojamas arba naudojamas tolimesniuose perdirbimo darbuose (Chanda ir kt., 2012). Pastaroji metodika yra naudojama gaminant augalinius ekstraktus termolabiliems arba lakiems komponentams išgauti (Zhang ir kt., 2018).

Soksletas – šis metodas integruoja refluksinio ekstrahavimo ir perkoliacijos panašumus, kuomet yra naudojamos reflukso ir sifono principais, kad turima žaliava būtų nuolat plaunama šviežiu tirpikliu. Šis principas yra automatinis nepertraukiamo ekstrahavimo metodas, pasižymintis dideliu efektyvumu, reikalaujantis mažiau laiko ir tirpiklio sunaudojimo nei maceracija ar perkoliavimas. Šiam ekstrahavimo metodui yra būdinga, jog aukštesnė temperatūra ir ilgesnis proceso laikas gali padidinti terminio skilimo galimybes (Zhang ir kt., 2018). Taikant šį metodą, vaistinė žaliava yra dedama į porėtą maišelį arba „antpirštį“, pagamintą iš tankaus pluošto medžiagos, kuri yra talpinama soksleto aparato kameroje (7 pav.). Šis procesas yra tęstinis ir vykdomas tol, kol iš sifono vamzdelio išėjęs paskutinis tirpiklio lašas nepalieka likučių išgaravus. Nedidelės apimties darbams soksletas naudojamas kaip vienkartinis procesas, tačiau jis tampa daug ekonomiškėnis ir perspektyvesnis, kuomet vykdoma vidutinio ar didelio masto gamyba ir ekstrakcija vykdoma nepertraukiamai (Chand ir kt., 2012).



7 pav. Soksleto surinkimo schema (Luque de Castro ir kt., 2010).

Suslėgto skysčio ekstrahavimas – šis metodas, skirtingų tyrimų grupių straipsniuose, yra aprašytas kaip pagreitinatas tirpiklio ekstrahavimas, sustiprintas ekstrahavimas, suslėgto skysčio ekstrahavimas ir aukšto slėgio skysčio ekstrahavimas. Būtent šioje ekstrahavimo metodikoje veikia aukštas slėgis, dėl kurio tirpikliai būna skysti, kai jų virimo temperatūra yra aukšta. Tai sąlygoja greitą tirpinio difuziją į tirpiklį ir efektyvų tirpiklio įsiskverbimą į kietą medžiagos matricą. Suslėgto skysčio ekstrahavimas labai sumažina ekstrahavimo laiką ir tirpiklio sąnaudas, taip pat pasižymi didesniu tikslumu, lyginant su anksčiau išvardintais metodais (Zhang ir kt., 2018). Šio metodo

pranašumai yra tokie, jog naudojant aukštą slėgį ir temperatūrą nėra pasiekiamas kritinis taškas, kuris sąlygotų ekstrahuojamų medžiagų praradimą (Nieto ir kt. 2010), taip pat vienas iš suslėgto skysčio ekstrahavimo privalumų yra nedidelės proceso sąnaudos (Nieto ir kt., 2010). Tačiau pagrindiniai šio proceso trūkumai yra tai, kad ekstrahavimo proceso metu tiriamųjų medžiagų atskyrimas nėra aukšto efektyvumo, o analitės kartais gali būti per daug praskiedžiamos, ypač proceso metu vykdant daug ciklų iš eilės (Nieto ir kt., 2010).

Ekstrakcija su ultragarsu - šio metodo išskirtinumas yra tai, jog ekstrahavimo metu yra naudojama ultragarso bangų energija. Pastarasis metodas apima ultragarso, kurio dažnis svyruoja nuo 20 kHz iki 2000 kHz naudojimą. Ultragaras tirpiklyje sukuria kavitaciją (ultragarso figūros keitimo būdas), pagreitina medžiagos tirpimą ir difuziją, taip pat šilumos perdavimą, skatindamas ekstrahavimo efektyvumą. Ultragarso metodo pranašumas yra mažos tirpiklio ir energijos sąnaudos bei sumažinta proceso temperatūra ir laikas, lyginant su anksčiau aptartais metodais. Šis variantas yra tinkamas norint išskirti termolabilius ir nestabilius junginius, būtent iš natūralių augalinių žaliavų (Zhang ir kt., 2018). Nors šis procesas kai kuriais atvejais yra naudingas, kaip pavyzdžiui, karklo žievės ekstrahavimui, tačiau jo naudojimas dideliu mastu yra ribotas dėl didesnių proceso išlaidų (Chanda ir kt., 2012).

1.10 Augalinių ekstraktų analizė

Magistro tiriamojo darbo metu aktyvių medžiagų nustatymui augaliniame ekstrakto buvo naudojami efektyviosios skysčių bei dujų chromatografijos metodai. Chromatografija tai plačiai naudojamas fiziko-cheminis įvairių medžiagų išskirstymo iš mišinio būdas, kuris buvo atrastas rusų-italų botaniko M. S. Cvet'o jau ankstyvame 20-ajame amžiuje. 1903 m. kovo 21 d. Varšuvos Visuomenės Gamtos mokslų susitikime, vykusiame minėtojo mokslininko pristatyme, pavadinimu "On the new form of adsorption phenomena and its application in biochemical analysis", buvo pristatytas labai detalus adsorbcijos, paremtos junginių atskyrimu, fenomenas, kuris pavadintas chromatografija (graik. spalvos egistravimas) (Kazakevich ir kt., 2007). Bėgant metams šis metodas buvo sparčiai vystomas ir kuriama ne viena šiomis dienomis žinoma atmaina. Vienas iš pačių svarbiausių ir vis dar daugiausiai naudojamų chromatografinio atskyrimo metodų yra efektyvioji skysčių chromatografija, kuri pirmą kartą buvo paminėta profesoriaus Horvato dvidešimt pirmojoje Pitsburgo konferencijoje Klivlande 1970 m. Šių dienų farmacinės chemijos tyrimų laboratorijoje pastarasis metodas yra nepakeičiamas kuriant bei identifikuojant įvairias chemines medžiagas (Kazakewich ir kt., 2007).

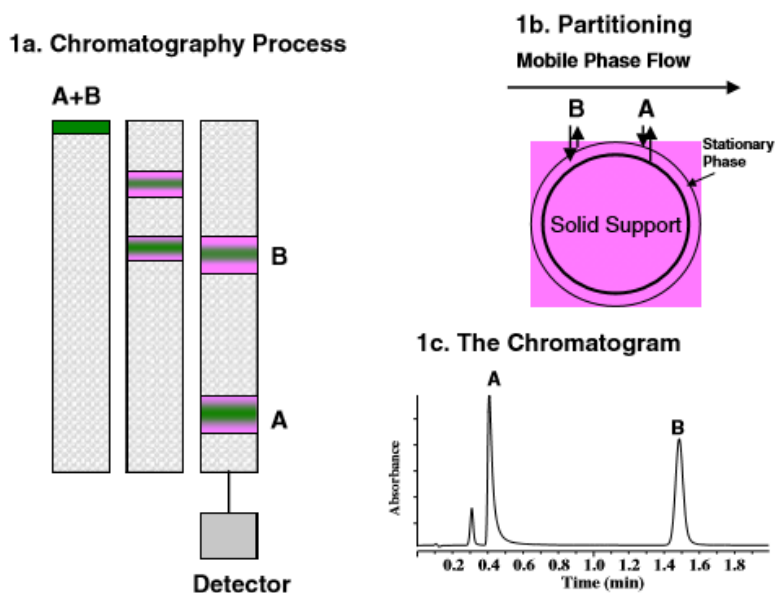
1.10.1 Efektyvioji skysčių chromatografija

Remiantis Europos farmakopėja, gluosnio žievės ekstraktas yra tiriamas efektyviaja skysčių chromatografija (ESC). Tai yra vienas plačiausiai naudojamų chromatografijos metodų, kurio procesą galima apibrėžti kaip atskyrimo būdą, susijusį su masės perdavimu tarp nejudančių ir judančių fazių (Viltrakytė, 2008). Pavadinimas efektyvioji skysčių chromatografija atsirado 20 amžiuje, kuomet mokslininkai nustatė, jog labiausiai analizės efektyvumą padidina dalelių dydžio sumažinimas, o siekiant tirpiklį pernešti pro mažesnę, smulkesnėmis dalelėmis užpildytą kolonėlę, reikia didinti slėgį. Šio proceso metu analizei galima naudoti įvairias atskiras molekules - jonus, termolabilius ir nelakias medžiagas (Maruška ir kt., 2005).

Skysčių chromatografinė analizė yra vykdoma skystoje fazėje, mėginys padalijamas į sudedamąsias dalis (arba analites), kurios paskirsto tarp judančios fazės (skystis) ir nejudančios

fazės (sorbentai, supakuoti kolonėlės viduje). Pavyzdžiui, judri fazė gali būti organinis tirpiklis, toks kaip acetonitrilas, o nejudanti fazė gali būti skirtingo ilgio, alifatinėmis grandinėmis modifikuotos, siloksano dalelės, supakuotos į kolonėlę. Efektyvioji skysčių chromatografija yra moderni skysčių chromatografijos rūšis, paremta mažų dalelių kolonelių naudojimu, per kurias judrioji fazė yra pumpuojama aukštu slėgiu (Dong, 2006). Svarbiausi pastarojo metodo privalumai yra tai, jog ši analizė pasižymi sąlyginai paprastu automatizavimu, ypač specifiniu jautrumu ir suteikia galimybę atlikti tikslų kiekybinę sudėties įvertinimą, taip pat yra tinkama termolabiliems ir nelakiems dariniams analizuoti. ESC metu tirti naudojamų medžiagų spektras yra ganėtinai didelis, analizuojami tokie junginiai, kaip aminorūgštys, vaistai, terpenoidai, baltymai, steroidai, pesticidai, angliavandeniai, antibiotikai ir kiti įvairūs bioorganiniai ir organiniai junginiai.

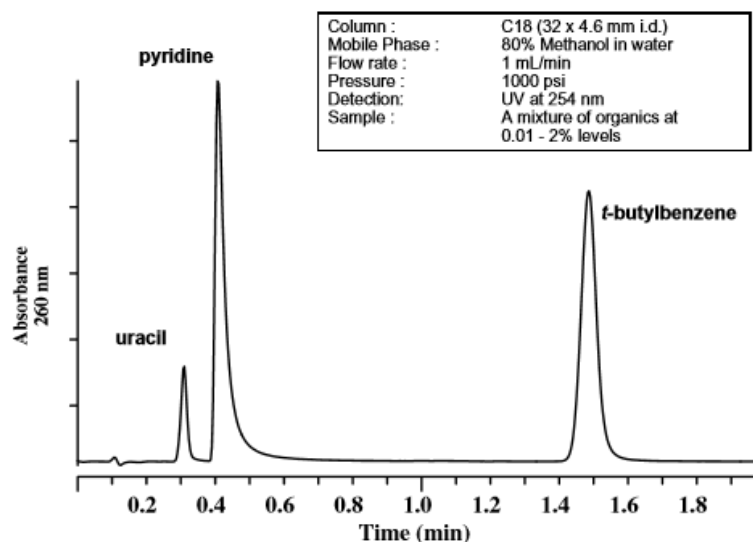
8 paveiksle 1 a yra vaizduojama chromatografinio proceso schema, kai analitės A ir B mišiniai yra padalijami į dvi skirtingas juostas, kuomet jie migruoja žemyn kolonėle, užpildyta pakavimo būdu (nejudanti fazė). 8 paveikslo 1 b schema vaizduoja dinaminio skaidymo procesą, analitės juda tarp susidarancio skysčio ir sferinės dalelės. Atkreipkite dėmesį, kad komponento B judėjimas 1 c grafike sulėtėja, nes kiekviena B molekulė, nejudrios fazės atžvilgiu, turi didesnę afiniškumą nei A molekulė. Linijinis detektorius užfiksuoja kiekvienos atskirtos sudedamosios medžiagos koncentraciją ir kompiuteryje sukuria „pėdsaką“, vadinamą chromatograma (Dong, 2006).



8 pav. Skysčių chromatografijos procesas (Dong, 2006).

Mažai chromatografinės analizės metodų gali atitikti aptartojo ESC universalumą ir tikslumą, kadangi šios analizės rūšies chromatografai turi daug ypač jautrių ir specifinių detektorių, kurių medžiagų aptikimo ribos gali siekti iki nanogramų, pikogramų ir net femtogramų vienetų tikslumo.

Tačiau pastarasis procesas turi ir keletą žinomų trūkumų. Vienas iš jų yra tai, jog ESC chromatografai neturi liepsnos jonizacijos detektoriaus, kuris yra naudojamas dujų chromatografijoje, dėl to analizė gali būti apsunkinama jeigu analizė negali absorbuoti UV spinduliuotės. Taip pat tiriamųjų junginių atskyrimo efektyvumas yra šiek tiek silpnesnis nei naudojant kapiliarinę dujų chromatografiją, todėl didelių junginių (kompleksų) analizė yra sudėtingesnė (Dong, 2006).

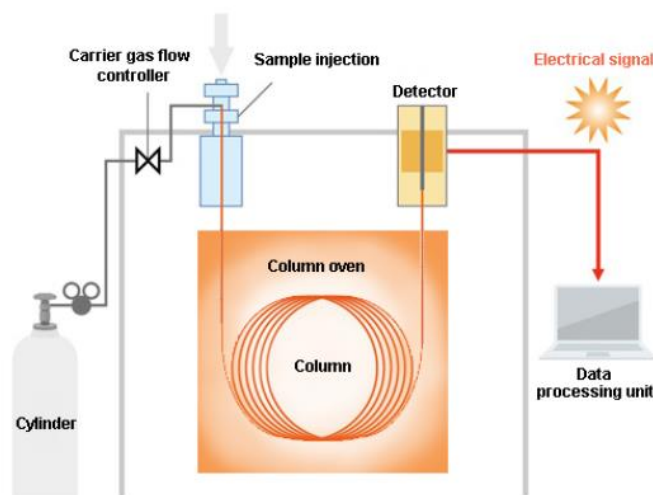


10 pav. Atvirkčių fazių chromatografijos chromatograma, (Dong, 2006).

1.10.2 Dujų chromatografija

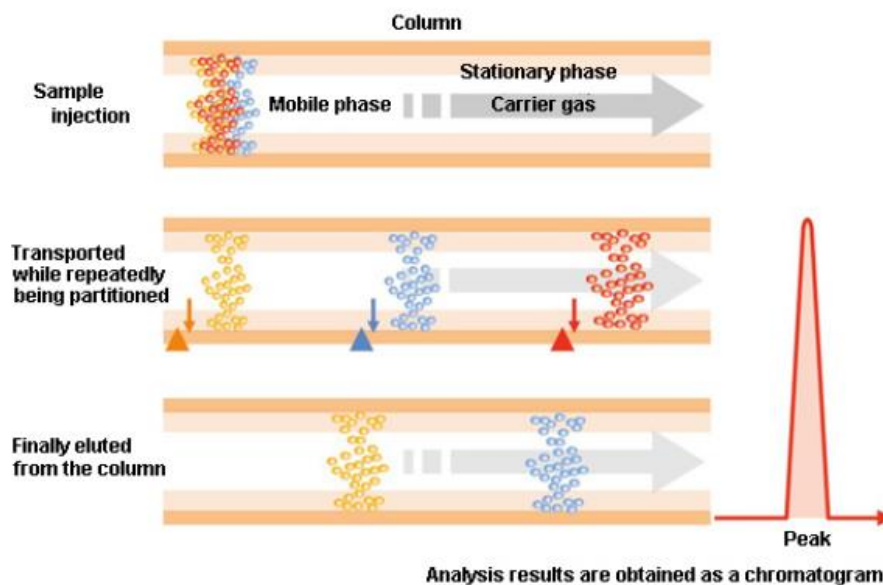
Dujų chromatografija yra atskyrimo būdas, gebantis atskirti sudėtingus nepolinių ir silpnai polinių, lakių ar pusiau lakių skirtingų junginių mišinius, atsižvelgiant į virimo temperatūros / garų slėgio poliškumo skirtumus. Nors skysčių chromatografijos metodas buvo išrastas dvidešimtojo amžiaus pradžioje, o Martinas ir Synge'as 1941 m. pateiktame moksliniame straipsnyje nenurodė jokios priežasties, kodėl mobilią fazę negali būti dujos, šis analizės metodas nebuvo sukurtas iki 1952 m. Tais metais Jamesas ir Martinas paskelbė pirmąjį straipsnį, kuriame parodytas dujų chromatografijos panaudojimas lakiųjų riebalų rūgščių atskyrimui. Bėgant metams dujų chromatografo instrumentinė dalis yra vis tobulinama, tačiau pagrindiniai sudedamieji komponentai žymiai nepasikeitė ir liko gana paprasti, kaip parodyta 11 paveiksle (Stauffer ir kt., 2008).

Dujų chromatografijos metodas pasižymi tuo, jog analizės metu mišinio komponentai, patekę į kolonėlę, atsiskiria nuo jos sienelės skirtingu laiku, tuomet, medžiagos, sudarančios turimą analitę, išėjusios iš kolonėlės juda link detektoriaus. Populiariausias lakiems ir pusiau lakiems junginiams identifikuoti naudojamas detektorius yra masių spektrometrinis detektorius, į kurį iš kolonėlės patekę jonai prieš tai yra jonizuojami jonų šaltinyje, tada nukreipiami į analizatorių, o iš ten patenka į minėtą detektorių. Tokiu būdu detektuojant skirtingus molekulinis jonus ir jų fragmentus gauname junginių individualizuojantį masių spektrą.



11 pav. Dujų chromatografo schema, pateikta iš:
<https://www.shimadzu.com/an/gc/support/fundamentals/gc.html>.

Kolonėlė yra dujų chromatografo širdis. Iš pradžių dujų chromatografijoje buvo naudojamos tik supakuotos kolonėlės – kolonėlės, užpildytos inertiška kieta atrama, padengta skysta nejudančia faze. 1958 m. Golay išrado atvirojo vamzdelio koloną, paprastai vadinamą kapiliarine kolonėle, kuri dabar naudojama daugelyje dujų chromatografų dėl savo aukštos rezoliucijos (Ettre, 2005). Supakuotoje kolonėlėje gali būti ne daugiau kaip 3000 teorinių lėkštelių viename metre, o tai atitiktų 300 μm aukščio ekvivalentų teorinei lėkštelei (Jennings, 2000). Kadangi šios kolonėlės paprastai neviršija 5 metrų ilgio, jos gali pasiekti apie 15000 teorinių lėkštelių. Kapiliarinės kolonėlės aukščio ekvivalentas teorinei lėkštelei gali būti šiek tiek mažesnis nei 100 μm , o tai tik nedidelis padidėjimas, palyginti su pakuotomis kolonėlėmis. Tačiau kapiliarinės kolonėlės yra daug ilgesnės (paprastai nuo 20 iki 60 m), tai gali talpinti nuo 150000 iki 500000 teorinių lėkštelių (Jennings, 2000). Tai rodo aukštą efektyvumą, gautą naudojant kapiliarinę kolonėlę, lyginant su supakuota kolonėle (Ettre, 2008). Chromatografinis atskyrimas vyksta mišiniui einant per kolonėlę (12 pav.). Kai atskirti pavyzdžio komponentai išeina iš kolonėlės, jie patenka į detektorius, kuris siunčia elektroninį signalą į kompiuterį, kuriame yra sudaroma chromatograma pagal eliuotųjų analizių kiekį (Stauffer ir kt., 2008).



12 pav. Dujų chromatografo kolonėlėje vykstantys procesai, pateikta iš: <https://www.shimadzu.com/an/gc/support/fundamentals/gc.html>.

Injektoriai – priemonės, skirtos mėginiui patekti į kolonėlę. Dujos ir skysčiai gali būti įleidžiami tiesiai į įleidimo angą švirkštu, tačiau kietos medžiagos pirmiausia turi būti ištirpintos tinkamame tirpiklyje, kad būtų injekuotos kaip skystas tirpalas. Norint užtikrinti efektyvų medžiagos įleidimą, mėginys turėtų būti įleidžiamas staigiu judesiu, kaip „kamštis“ į kolonėlę (Stauffer ir kt., 2008).

Metodo veikimo efektyvumui didelę įtaką daro sorbento dalelių dydis ir tinkamai parinkta nejudrioji skystoji fazė – organinės medžiagos ir jų poliškumas. Napolinėms fazėms priskiriami silikonai, kadangi jie yra chemiškai stabilūs ir mažai lakūs, darbus galima atlikti 50 - 450 °C temperatūroje. Skystosios nejudrios fazės parinkimas priklauso nuo skirstomosios medžiagos, nepolinės tiriamos medžiagos geriau atskiriamos ant nepolinių fazių, o polinės ant polinių (Danilčenko ir kt., 2011). Ypač svarbus nejudrios fazės parinkimas atkreipiant dėmesį į skirstomąją medžiagą, ši fazė turi būti chemiškai panaši į eliuojamą medžiagą (Danilčenko ir kt., 2011).

Turbūt svarbiausią vietą dujų chromatografe užima detektorius, kuris yra atsakingas už išanalizuotų rezultatų tikslumą ir jautrumą. Detektorius registruoja dujų, išeinančių iš kolonėlės, sudėties pokyčius ir šis signalas yra perduodamas duomenų analizatoriui – kompiuteriui. Paprastai yra naudojami keli detektorių tipai, tai fotometriniai, liepsnos, jonizaciniai ir pagrįsti fizikinių dydžių matavimu (šilumos laidumo, degimo šilumos, dujų tankio). Vienas populiariausių yra liepsnos jonizacijos detektorius, kuris leidžia išmatuoti elektros srovę, tekančią per jonizuotas dujų molekules, tarp dviejų elektrodų, kuriems yra teikiama įtampa (Danilčenko ir kt., 2011). Kai kurie detektoriai yra jautrūs tik tam tikrų tipų cheminiams junginiams, kiti yra laikomi „universaliais“ tuo, kad sugeba aptikti beveik visas analites. Taip pat šios dujų chromatografo dalys skiriasi savo aptikimo ribomis – kuo selektyvesnis detektorius, tuos didesnis jautrumas aptinkamas (Stauffer ir kt., 2008).

2. METODIKA

2.1 Augalinės žaliavos surinkimas ir paruošimas ekstraktų gamybai

Magistrinio tiriamojo darbo metu buvo tiriamos penkios skirtingos *Salix* genties augalų rūšys: *Salix purpurea f. lutea*; *Salix alba ssp. coerulea*; *Salix purpurea f. angusifolia*; *Salix purpurea „Gracilis“*; *Salix integra xS. kochiana Nr.43*.

Augalinė žaliava buvo surinkta Gamtos mokslų centro Botanikos instituto padalinio karklų plantacijose Vilniuje, nuo augalų nugenėtos šakos ir pašalinta tiriamoji medžiaga – žievė. Prieš ekstraktų gamybą susmulkinta žaliava buvo pasverta svarstyklėmis (Hanchen, ZHU-113A) ir 72 val. džiovinama džiovinimo spintoje (Memmert, UF 55), 70 °C. Išdžiovinta tiriamųjų augalų žievė dar kartą pasverta ir įvertintas nuodžiūvis.

2.2 Augalinių ekstraktų gamyba soksleto metodu

Kiekvienos karklo rūšies susmulkintos žievės atsverta po 6 g ir patalpinta į tankią medžiagą, gerai užsandarinama, kad ekstrakte nebūtų nereikalingų žievės priemaišų. Traukos spintoje (6' Thermo Scientific SafeAire II w/ Base Cabinets) sustatoma soksleto sistema, kuri buvo aprašyta 1.9 skyriuje, į soksleto sistemos vidų patalpinama tiriamojo karklo sandariai supakuota augalinė žaliava ir užpilama 500 ml metanolio (Sigma-Aldrich, 99,9%). Soksleto sistema sukonstruota ant kaitinimo plytelės, nustatyta atitinkama temperatūra – 80 °C, procesas paliekamas vykti 24 val.

Pasibaigus procesui, ekstraktai nufiltruoti Biuchnerio piltuvu, kad neliktų analizei trukdančių nuosėdų. Naudojant rotorių nuo gautų ekstraktų pašalintas metanolio perteklius. Tiriamoji medžiaga išpilstyta į 50 ml tūrio laboratorinius mėgintuvėlius ir paruošta tolimesnei chromatografiniai analizei.

2.3 Chromatografinė augalinių ekstraktų analizė

Kokybinei nežinomų junginių sudėčiai nustatyti naudotas dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodas. Gautų mėginių ekstraktai buvo praskiesti metanolio, tyrimo sąlygos: dujų chromatografas su masių spektrometriniu detektoriumi (SHIMADZU QP2010 ULTRA), silpnai polinė kapiliarinė 5 % dimetil polisiloksalinė kolonėlė (Rxi-5ms), nešančios dujos (judri fazė) – helis, injektoriaus temperatūra – 300 °C, kolonėlė termostatuojama nuo 40 iki 300 °C, temperatūros kėlimo greitis – 15 °C/min, jono šaltinio temperatūra – 250 °C, jonizacijos būdas – EI 70 eV, jonų analizatorius – vieno kvadrupolio sistema.

Turimos medžiagos identifikuotos pagal kompiuteryje matomą sulaikymo trukmę ir masių spektrą.

Kiekybinei salicino analizei skysčių chromatografijos metodu paruošti ekstraktai buvo išdžiovinami iki sausos liekanos. Išdžiovinta masė ekstrahuojama metanolio, gauti ekstraktai perfiltruojami ir tiriami skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu. Tyrimo sąlygos: skysčių chromatografas su masių spektrometriniu detektoriumi (SHIMADZU LC-MS 8045 NEXERA-2X), kolonėlė (YMC-Triat C18 150×3,0 mm (S-3 μm/12 nm), proceso temperatūra – 40 °C, mobili fazė – vanduo ir 2 mM amonio formiato + 0,002 % skruzdžių rūgšties metanolyje tirpalas, veikimo režimas – gradientinis, srautas – 0,3000 ml/min.

Masių spektrometro režimas – MRM, jonizacijos metodas – ESI, fragmentacijos energija - -50 eV. Kompiuteryje matomos chromatogramos smailės yra identifikuojamos pagal MRM masių spektrą ir laiką.

2.4 Ekstraktų gamyba ultragarso ir maceracijos metodais

Remiantis kokybinės dujų chromatografijos analizės metu gautais rezultatais ir nustatius kuri *Salix* rūšis savo žievėje saukaupe tiriamosios medžiagos salicino, pradėti gaminti hidroglicerino ekstraktai kosmetikos gamybai.

Hidroglicerino ekstraktai buvo gaminami keliais skirtingais metodais: maceracija – 5 g žaliavos užpilti hidroglicerino tirpalu (25 ml distiliuotas H₂O + 25 ml glicerinas (Roth, 86%)), toks mišinys sandariame inde laikomas tris paras kambario temperatūroje; sonifikavimas - 5 g žaliavos užpilti hidroglicerino tirpalu (25 ml distiliuotas H₂O + 25 ml glicerinas (Roth, 86%)), taip paruoštas tirpalas patalpinamas į ultragarso vonelę (Bandelin Sonorex). Sonifikavimo metodu buvo tiriami trys augaliniai *Salix* ekstraktai, sandarus indas ultragarso vonelėje laikomas 1, 2 ir 3 valandas.

Gauti augaliniai ekstraktai nufiltruoti naudojant Biuchnerio piltuvą, išpilstyti į 50 ml tūrio laboratorinius mėgintuvėlius.

2.5 Bandomojo kosmetikos gaminio formulavimas

Bandomasis kosmetikos gaminys serumas buvo gaminamas dvejais skirtingais būdais: 15 buteliukų pagaminta su tiriamosios augalinės medžiagos ekstraktu ir 15 buteliukų be tiriamosios augalinės medžiagos – placebo, produktas nudažytas naudojant maistinius dažus.

Nr. 1 – 15 % ekstraktas su tiriamąja medžiaga: 77 % distiliuotas vanduo, 15 % *Salix purpurea* „*Gracilis*“ ekstraktas, 7,5 % glicerinas, 0,25 % etilheksil glicerinas, , 0,25 % fenoksietanolis.

Nr. 2 – placebo ekstraktas su 15 % maistinio dažo: 77 % distiliuotas vanduo, 15 % maistinis dažas, 7,5 % glicerinas, 0,25 % etilheksil glicerinas, , 0,25 % fenoksietanolis.

Mišinys homogenizuotas naudojant magnetinę maišyklę, 24 val., kambario temperatūroje.

Detalesnė paruošimo eiga nėra atskleidžiama, produktas pagamintas UAB „KOSMETIKOS TYRIMŲ CENTRAS“ laboratorijoje, gamybos protokolas yra vertinamas kaip intelektinė nuosavybė.

2.6 Mikrobiologinis augalinio produkto tyrimas

Augalinio bandomojo karklų *Salix purpurea* „*Gracilis*“ serumo mikrobiologiniai tyrimai atlikti Nacionalinės Visuomenės Sveikatos priežiūros laboratorijoje, mikrobiologinių tyrimų skyriuje.

Ieškomi mikroorganizmai: Aerobinės mezofilinės bakterijos; Žaliamėlės pseudomonos (*Pseudomonas aeruginosa*); Baltasis balkšvagrybis (*Candida albicans*); Auksiniai stafilokokai (*Staphylococcus aureus*); Žarninės lazdelės (*Escherichia coli*).

2.7 Bandomojo kosmetikos gaminio tyrimas su žmonių grupėmis

Pagamintas serumas išpilstytas į stiklinius 30 ml tūrio buteliukus. Ant visų serumo buteliukų buvo užklijuota vienoda bandomojo gaminio etiketė ir išdalinta tyrime sutikusių dalyvauti žmonių grupei, kurią kamuoja odos bėrimai, aknė. Tiriamiesiems asmenims nebuvo atskleista ar pateiktas

išbandyti produktas yra su tiriamąja medžiaga ar placebo, be veikliosios medžiagos. Kosmetinio produkto testavimas truko 14 dienų. Sukurtą gaminį testuojančių asmenų buvo paprašyta produktą naudoti du kartus per dieną (ryte ir vakare), tuo pačiu kiek įmanoma vengti kitų odos priežiūros priemonių, kurios galėtų paveikti odos būklę ir trukdytų tyrimo tikslumui.

3. REZULTATAI

3.1 Paruoštos augalinės *Salix* žaliavos nuodžiūvio paskaičiavimas

Penkių skirtingų veislių *Salix* augalų šakos buvo atsivežtos į Vilniaus universiteto Chemijos ir Geomokslų fakulteto analizinės ir aplinkos chemijos katedros laboratoriją, paskaičiuotas susmulkintos žievės kiekis:

1. *Salix purpurea g. lutea* – 103,63 g
2. *Salix alba ssp. coerulea* – 106 g
3. *Salix purpurea f. angusifolia* – 113,65 g
4. *Salix purpurea „Gracilis“* – 113,5 g
5. *Salix integra xS. kochiana Nr.43* – 101,85 g

Po 72 val. džiovinimo buvo įvertintas nuodžiūvis tiriamoje medžiagoje, pagal formulę:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \%;$$

m_1 = masė prieš džiovinimą, m_2 = masė po džiovinimo;

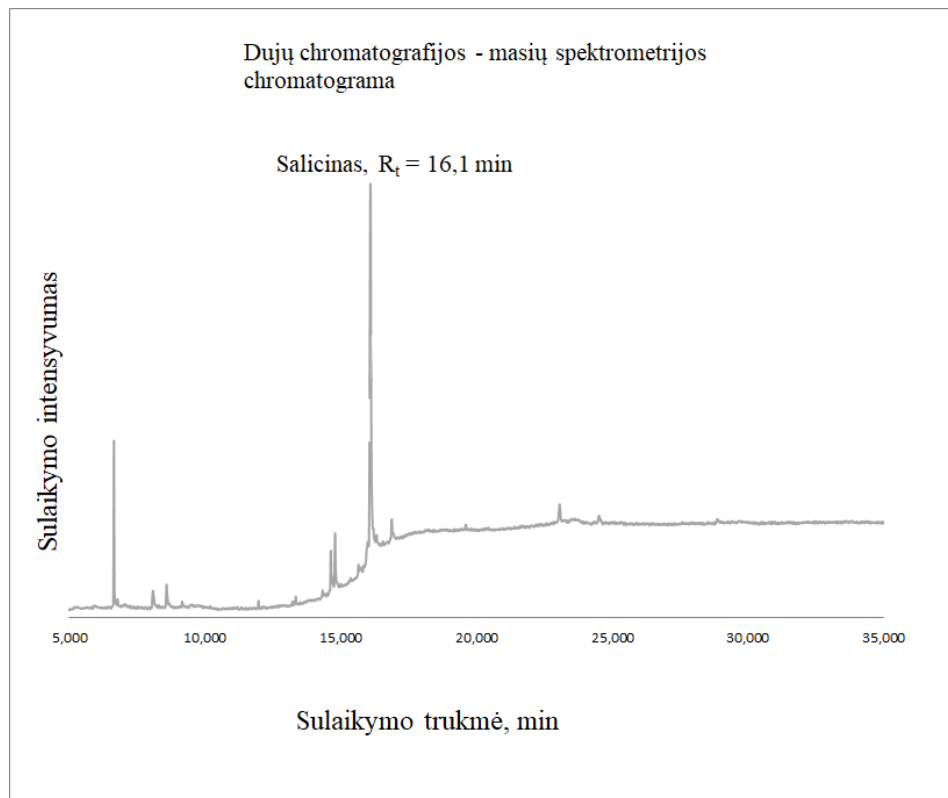
Įvertinus nuodžiūvį pateikti rezultatai:

1. *Salix purpurea g. lutea* – 47 %
2. *Salix alba ssp. coerulea* – 10,5 %
3. *Salix purpurea angusifolia* – 58 %
4. *Salix purpurea „Gracilis“* – 11,3 %
5. *Salix integra xS. kochiana Nr.43* – 44,6 %

Mažiausiai drėgmės praradusios rūšys: *Salix alba ssp. coerulea*; *Salix purpurea „Gracilis“*

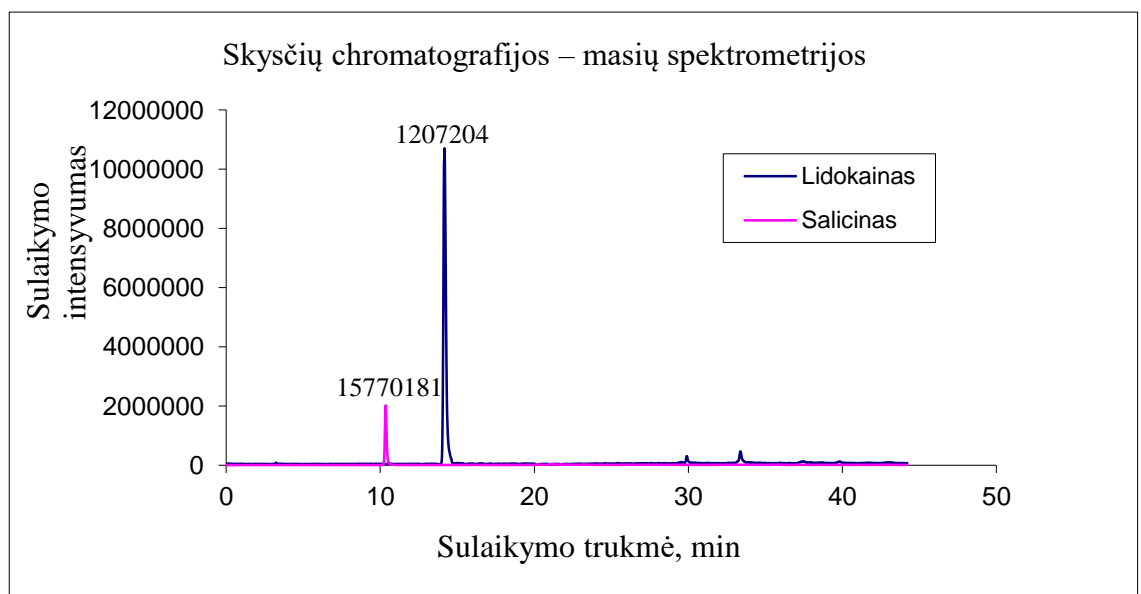
3.2 Chromatografinė pagamintų augalinių ekstraktų analizė

Taikant dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodą, atlikta skirtingų rūšių *Salix* augalų kokybinė analizė (13 pav.) Tokiu būdu nustatyta, jog *Salix purpurea „Gracilis“* rūšis savo žievėje kaupia tiriamąją medžiagą – saliciną. Identifikavimas vyksta vertinant chromatogramos grafiko smailes (salicino sulaikymo trukmė = 16,1 min).



13 pav. Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu gauta *Salix purpurea* „*Gracilis*“ rūšies ekstrakto kokybinės analizės chromatograma.

Siekiant nustatyti santykinę salicino koncentraciją, skirtingais būdais paruoštuose ekstraktuose, atlikta skysčių chromatografija – masių spektrometrinė analizė (14 pav.) Santykinėi koncentracijai įvertinti naudota 0,01 mg/ml koncentracijos lidokaino vidinis standartas. Remiantis gautais tyrimo rezultatais nustatyta, jog nepriklausomai nuo ekstrakto paruošimo būdo, visuose ekstraktuose rasta salicino koncentracija yra vienoda - 0,01 %.



14 pav. Maceracijos metodu pagaminto ekstrakto skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos analizės chromatograma.

14 lentelė. Skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu atliktos analizės rezultatai.

Smailė	Sulaikymo trukmė	m/z	Sritis	Junginys
1	14.174	TIC	120720437	Lidokainas
2	10.353	TIC	15770181	Salicinas
Total			136490619	

Koncentracijos skaičiavimas:

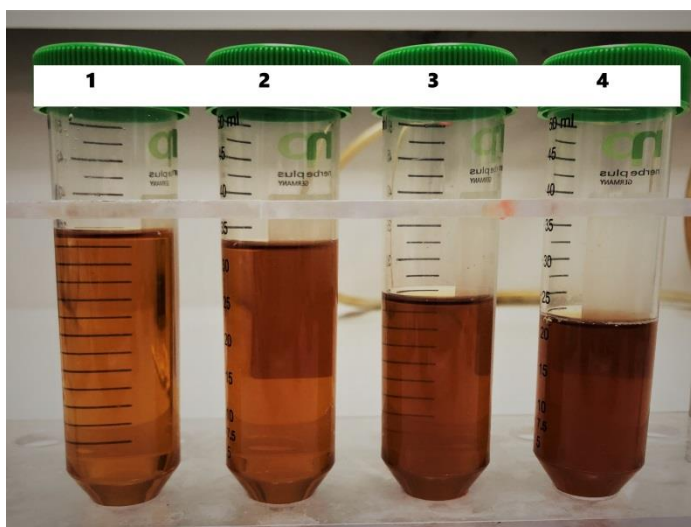
Ekstrakto, išgarinus tirpiklius, masė = 0,1432 g.

Salicino koncentracija mg/ml, apskaičiuota iš chromatogramos duomenų: 0,01 mg/ml lidokaino standarto – 120720437; x mg/ml salicino – 15770181; x = 0,001306 mg/ml.

Procentinė salicino koncentracija: sauso ištirpinto ekstrakto koncentracija mišinyje = 14,32 mg/ml – 100 %; salicino koncentracija mišinyje = 0,001306 mg/ml – x %; x = 0,01 %.

3.3 Hidroglicerino ekstraktai kosmetinio serumo gamybai

Ekstraktai buvo pagaminti keturiais skirtingais metodais, ultragarso metodu, proceso trukmė – 1 val., 2 val., 3 val. ir maceracijos metodu, trukmė 72 val.



15 pav. Pagaminti ir nufiltruoti ekstraktai, 1 – maceracija 72 val., 2 – sonifikavimas 1 val., 3 – sonifikavimas 2 val., 4 – sonifikavimas 3 val.

Atliekant filtravimą pastebėta, jog maceracijos metodu gauto ekstrakto išeiga didžiausia, o pats ekstraktas mažiau kimšo naudotus filtrus. Taip yra todėl, kad sonifikavimo metu atsirado daug mikrometrinio dydžio “šiukšlių”, kurios trukdė filtravimo procesui. Kadangi maceracijos metodas taip pat yra patrauklus dėl savo paprastumo, tolimesniuose tyrimuose buvo nuspręsta naudoti maceravimo metodiką gaminant augalinį ekstraktą.

3.4 Kosmetikos bandomojo gaminio serumo gamyba

Bandomasis kosmetinis produktas buvo suformuluotas UAB „KOSMETIKOS TYRIMŲ CENTRAS“ laboratorijoje, išpilstytas į 30 ml tūrio stiklines kosmetines talpas su pipete ir padalintas tiriamųjų grupei. Placebo varianto ir gaminio su augaliniu salicinu pakuotės paliktos identiškos, ko pasekoje tiriamųjų žmonių grupė negalėjo pastebėti skirtumo kurį produktą vertins (16 pav.).



16 pav. Pagamintas ir paruoštas naudojimui kosmetinis serumas su *Salix purpurea* „Gracilis“ karklo žievės ekstraktu.

3.5 Mikrobiologinės augalinio produkto analizės rezultatai

Nacionaliniame visuomenės sveikatos centre buvo atlikta kosmetikos produkto mikrobiologinė analizė. Buvo nustatyta, jog produktas atitinka Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministerijos kosmetikos sterilumo reikalavimus, kadangi neviršija galimų užterštumo ribinių verčių, kuriose nurodyta, jog aerobinių mezofilinių bakterijų skaičius, kolonijas sudarantys vienetai (KSV), gaminyje neturi viršyti $\leq 1 \times 10^3$ (1 g arba 1 ml). Kitų tirtų neleidžiamų mikroorganizmų produkte nerasta.

3 lentelė. Mikrobiologinės analizės metu tirtų mikroorganizmų bandomajame produkte rezultatai.

Mėginio registravimo Nr.	Tyrimas atliktas pagal metodą	Ieškomi mikroorganizmai	Tyrimų rezultatai
MA 7390	LT EN ISO 21149:2017	Aerobinių mezofilinių bakterijų skaičius KSV /g/ml	<10
MA 7390	LT EN ISO 22717:2016	Žaliamėlių pseudomonų (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) aptikimas 1 g/ml	Nerasta

MA 7390	LT EN ISO 18416:2016	Baltojo balkšvagrybio (<i>Candida albicans</i>) aptikimas 1 g/ml	Nerasta
MA 7390	LT EN ISO 22718:2016	Auksinių stafilokokų (<i>Staphylococcus aureus</i>) aptikimas 1 g/ml	Nerasta
MA 7390	LT EN ISO 21150:2016	Žarninių lazdelių (<i>Escherichia coli</i>) aptikimas 1 g/ml	Nerasta

3.6 Bandomojo produkto tyrimas su žmonių grupėmis, turinčiomis odos problemų

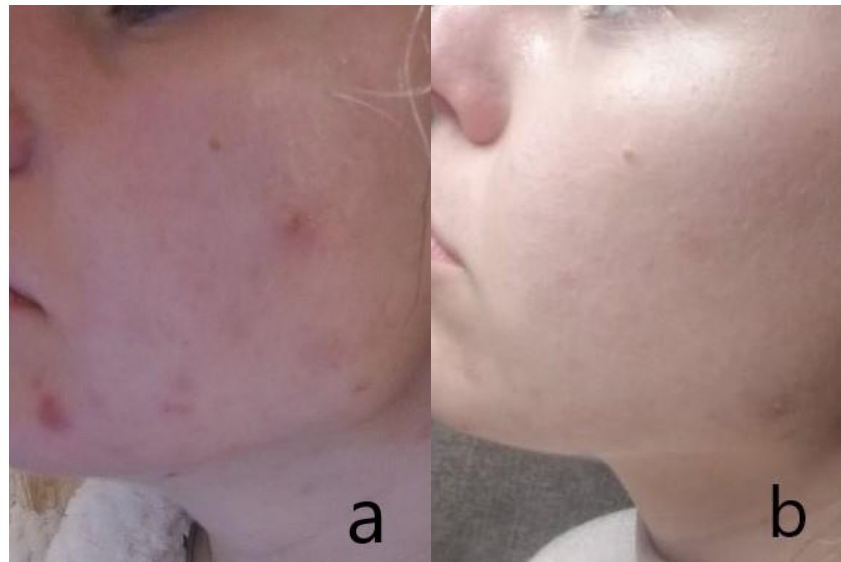
Praėjus dviem savaitėms po augalinio serumo praktinio tyrimo, kuriame dalyvavo 30 žmonių grupė, buvo pateikta apklausa, neatsižvelgiant ar asmuo naudojo placebą ar produktą su tiriamąja medžiaga, užduoti tiksliniai klausimai ir procentais pateikti tiriamųjų asmenų vertinimai. Klausimai:

1. Ar pastebėti teigiami pokyčiai, susiję su odos problemomis? (odos bėrimai, spuogai, aknė)
2. Kaip vertinate bendrą produkto drėkinamąjį efektą?
3. Kaip vertinate bendrą produkto kokybę? (konsistencija, kvapas, išvaizda)
4. Ar būtumėte linkę tokį produktą naudoti?

4 lentelė. Tyrimo metu pateiktos apklausos rezultatai.

Tiriamųjų atsakymai:	Produktas su tiriamąja medžiaga (<i>Salix purpurea</i> „<i>Gracilis</i>“ ekstraktu)	Tiriamųjų atsakymai:	Placebo bandomasis produktas
Sumažėjo bėrimai, susitraukė uždegiminiai spuogai, palygėjo odos reljefas	75 %	Odos pokyčiai nepastebėti, būklė stabili	87,5 %
Teigiami pokyčiai nepastebėti, išliko tie patys bėrimai	25 %	Pastebėtas bėrimų sumažėjimas, palygėjo odos reljefas	12,5 %
Pakankamai pridrėkinta ir skaistesnė oda	87,5 %	Juntamas drėkinamasis pojūtis	100 %
Papildomai teko naudoti kremą, bandomojo serumo neužteko	12,5 %	Papildomai teko naudoti kremą, bandomojo serumo neužteko	0 %
Puiki konsistencija, maloniai padengia odą, kvapas neutralus, nedirgina, pakuotės išvaizda patraukli	100 %	Puiki konsistencija, maloniai padengia odą, kvapas neutralus, nedirgina, pakuotės išvaizda patraukli	100 %

Naudotų šį produktą ir toliau	75 %	Naudotų dėl drėkinamojo efekto, tačiau ne probleminei odai gydyti	87,5 %
Nenaudotų šio produkto	25 %	Naudotų šį produktą odos problemoms gydyti	12,5 %



17 pav. Vienos iš tiriamųjų merginų, naudojusią produktą su *Salix purpurea* „*Gracilis*“ ekstraktu, probleminių veido sričių nuotrauka, a – pirmąją dieną; b – praėjus dviem savaitėms po serumo su salicinu naudojimo.

Išanalizavus pateiktus apklausos rezultatus ir įvertinus tiriamųjų asmenų odos būklę, galima daryti išvadą, jog iš karklo žievės išskirtas augalinis salicinas yra tinkamas naudoti, kaip antiuždegiminė medžiaga, spuogų ir aknės bėrimų gydymui. Tačiau atsižvelgiant į odos tipą, šis produktas efektyviau veikia tiems žmonėms, kurie turi išsausėjusią odą, kadangi produktas turi ir stiprų drėkinamąjį poveikį.

IŠVADOS

1. Atlikus kokybinę dujų chromatografijos analizę, rezultatai parodė, jog tiriamosios medžiagos, salicino, savo žievėje daugiausia sukaupė *Salix purpurea* „*Gracilis*“ rūšis. Kiekybinės efektyviosios skysčių chromatografijos analizės metu tirtame mišinyje nustatyta salicino koncentracija – 0,01 %.

2. Pagamintas kosmetikos gaminys – hialurono serumas, kurio sudėtyje buvo 15 % *Salix purpurea* „*Gracilis*“ ekstrakto. Po 30 dienų nuo produkto pagaminimo buvo įvertinta produkto mikrobiologinė sauga, t. y. - ištirtas mikroorganizmų kiekis. Nustatyta, kad parinkti konservantai efektyviai inhibuoja bakterijų dauginimąsi ir produktas atitinka Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministerijos mikrobiologinio užterštumo normas, keliamas kosmetikos gaminiams.

3. Įvertinus praktinio bandomojo gaminio tyrimo su žmonių grupėmis, turinčiomis odos problemų, rezultatus, nustatyta, jog 75 % tiriamųjų, naudousių produktą su veikliąja medžiaga, sumažėjo bėrimai, palygėjo odos reljefas, 25 % odos bėrimai išliko. Placebą bandę asmenys 87,5 % nepastebėjo jokių odos pokyčių, 12,5 % iškildavo mažiau inkštirų, oda tapo švaresnė. 100 % tiriamųjų, naudousių placebą, jautė drėkinamąjį poveikį, 12,5 % naudojuosiems produktą su salicinu trūko drėkinimo, iš to galima daryti išvadą, jog šis gaminys yra tinkamas žmonėms, turintiems sausą, netgi šerpetojančią odą. 100 % apklaustųjų buvo patenkinti produkto kokybe, konsistencija atitiko reikalavimus, kvapas nedirgino. Testuotojų nuomone, parinkta produkto pakuotė buvo patraukli vartotojui. 75 % tyrime dalyvavusių asmenų, naudousių produktą su salicinu, būtų linkę naudoti šį produktą odos problemoms gydyti, 87,5 % tiriamųjų, bandžusių placebo serumą, naudotų produktą dėl drėkinamųjų savybių.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Akao T., Yoshino T., Kobashi K., Hattori H., Evaluation of salicin as an antipyretic prodrug that does not cause gastric injury, *Planta Med*, p. 714–718, 2002.
2. Arif T., Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review, *Clin Cosmet Investig Dermatol*, p. 455–461, 2015, doi: [10.2147/CCID.S84765](https://doi.org/10.2147/CCID.S84765).
3. Babst B.A., Harding S. A., Tsai C. J., Biosynthesis of phenolic glycosides from phenylpropanoid and benzenoid precursors in *Populous*. *J. Chem. Ecol*, p. 3286–297, 2010.
4. Barnes J., Anderson L. A. , Philipson J. D., *Herbal Medicines*. New Zealand: Pharmaceutical Press; 2007.
5. Bhate K., Williams H. C., Epidemiology of acne vulgaris. *Br J Dermatol*, Nr. 3 p. 474–485, 2013.
6. Chanda S., Kaneria M., Optimization of Conditions for the Extraction of Antioxidants from Leaves of *Syzygium cumini* L. Using Different Solvents, *Food Analytical Methods*, p. 332–338, 2012.
7. Collier C. N., Harper J. C., Cafardi J. A., Cantrell W.C. , Wang W., Foster K. W., The prevalence of acne in adults 20 years and older, *J Am Acad Dermatol*, Nr. 1, p. 56–59, 2008.
8. Del Rosso J., Pharmacotherapy update: current therapies and research for common dermatologic conditions. The many roles of topical salicylic acid. *Skin Aging*, p. 38–42, 2005.
9. Desborough M. J .R., Keeling D.M., The aspirin story – from willow to wonder drug, *Br. J. Haematol*, p. 674–683, 2017.
10. Dong M. W., Modern HPLC for Practicing Scientists, p. 5-9, 2006, doi:10.1002/0471973106.
11. Eisenreich W., Handel A., Zimmer E., *Išsamus augalų ir gyvūnų žinynas*, Vilnius: Naujoji Rosma, 2007.
12. El-Shemy H. A. , Aboul-Enein A. M. , Aboul-Enein K. M., Willow Leaves' Extracts Contain Anti-Tumor Agents Effective against Three Cell Types, 2007, doi:10.1371/journal.pone.0000178
13. Ettre L. S., M.J.E. Golay and the invention of open-tubular (capillary) columns, *Journal of High Resolution Chromatography*, p. 221– 30, 2005.
14. Förster N., Ulrichs C., Zander M., Kätzel R., Mewis I., Factors Influencing the Variability of Antioxidative Phenolic Glycosides in *Salix* Species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p. 8205–8210, 2010, doi:10.1021/jf100887v.
15. Tosti A., Grimes P. E., Padova M. P., Grimes P. E., *Salicylic acid*, *Color Atlas of Chemical Peels*, 2006.
16. Danilčenko H., Kulaitienė J., Tarasevičienė Ž., Zaleckas E., *Instrumentinė ir juslinė maisto produktų analize, mokomoji knyga*, Aleksandro Stulginskio universitetas, Agronomijos fakultetas, Sodininkystės ir daržininkystės katedra, p. 29-30, 2011, ISBN 978-609-449-019-4.
17. Hashimoto Y., Suga Y., Mizuno Y., Hasegaw T., Matsuba S., Ikeda S., Monma T., Ueda S., Salicylic Acid Peels in Polyethylene Glycol Vehicle for the Treatment of Comedogenic Acne in Japanese Patients, Nr. 2, p. 276–279, 2007, doi:10.1111/j.1524-4725.2007.34055.
18. Imayama S., Ueda S., Isoda M., Histologic changes in the skin of hairless mice following peeling with salicylic acid, *Arch Dermatol*, p. 1390–1395 2000.

19. Jennings W., Wilson I., Poole C., Cooke M., II/Chromatography: Gas: Column technology, Encyclopedia of separation science, p 427–34, 2000.
20. Butkevič J., Gluosnio žilvičio (*Salix viminalis L.*) ir kai kurių jo kultivarų bei hibridų klonų morfobiologiniai ir produktyvumo tyrimai lauko kolekcijose, Vilniaus pedagoginis universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biologijos katedra, Magistro baigiamasis darbas, 2007.
21. Kazakevich Y., Lobrutto R., HPLC for Pharmaceutical Scientists, p. 6-11, 2007.
22. Kenstavičiene P., Nenortienė P., Kiliuvienė G., Application of high-performance liquid chromatography for research of salicin in bark of different varieties of *Salix*, p. 644-51, 2009.
23. Kuzovkina Y. A., Weih M., Romero M. A., Charles J., Karp A., Labrecque M., Singh N., Smart L., *Salix*: Botany and Global Horticulture, Horticulture Reviews, p. 447-489, 2008, doi:10.1002/9780470380147.
24. Lekakh O., Mahoney A. M., Novice K., Kamalpour J., Sadeghian A., Mondo D., Kalnicky C., Guo R., Peterson A., Tung R., Treatment of Acne Vulgaris With Salicylic Acid Chemical Peel and Pulsed Dye Laser: A Split Face, Rater-Blinded, Randomized Controlled Trial, *J Lasers Med Sci*, p. 167–170, 2015, doi: [10.15171/jlms.2015.13](https://doi.org/10.15171/jlms.2015.13).
25. Luque de Castro M. D., Priego-Capote F., Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, p. 2383–2389, 2010 doi:10.1016/j.chroma.2009.11.027.
26. Mahdi J. G., Mahdi A. J. , Bowen I. D., Historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative Potential, *Cell Proliferat*, p. 147-155, 2006.
27. Mahdi J., Biosynthesis and metabolism of β -D-salicin: A novel molecule that exerts biological function in humans and plants, p. 73–79, 2014, doi: [10.1016/j.btre.2014.08.005](https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.08.005).
28. Mahdi J., Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin discovery, *Journal of Saudi Chemical Society*, p. 317-322, 2010, <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.04.010>.
29. Mahdi J. G., Medicinal potential of willow: a chemical perspective of aspirin discovery, *J Saudi Chem*, 317–322, 2010.
30. Maruška A., Kornyšova O., Machtejevas E., Efektyviosios skysčių chromatografijos pagrindai, 2005.
31. Navasaitis M., Ozolinčius R., Smaliukas D., Belevičienė J., Lietuvos dendroflora, 2003.
32. Nieto A., Borrull F., Pocurull E., Marce R. M., Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge, *TgAC Trends in Analytical Chemistry*, p. 752-764, 2010, doi:10.1016/j.trac.2010.03.014.
33. Ramos-e-Silva M., Ramos-e-Silva S., Carneiro S., Acne in women, *Br J Dermatol*, p. 20–26, 2015.
34. Randjelović P., Veljković S., Stojiljković N., Sokolović D., Laketić D., Randjelović D., Randjelović N., The Beneficial Biological Properties of Salicylic Acid, 2015, doi:<https://doi.org/10.1515/afmnai-2015-0026>.
35. Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K. M., Latha L., Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts, p. 1–10, 2010, PMID: [22238476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22238476/).
36. Sharma B. R., Kumar V., Gat Y., Kumar N., Parashar A., Pinakin D. J., Microbial maceration: a sustainable approach for phytochemical extraction, 2018, doi: [10.1007/s13205-018-1423-8](https://doi.org/10.1007/s13205-018-1423-8),

37. Smaliukas D., Noreika R., Karalius D., Clonal selection and evaluation of dendrometric characteristic and weight of energetically valuable *Salix* taxa in short turnover plantations – Genetic and physiological fundamentals of plant growth and productivity, Institute of Botany Publishers, 2006.
38. Stauffer E., Dolan J. A., Newman R., Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Fire Debris Analysis, p. 235-293, 2008, doi:10.1016/b978-012663971-1.50012-9.
39. Tan A. U., Schlosser B. J., Paller A. S., A review of diagnosis and treatment of acne in adult female patients, Int J Womens Dermatol, p. 56–71, 2018, doi: [10.1016/j.ijwd.2017.10.006](https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2017.10.006).
40. USDA, Classification for Kingdom Plantae Down to Genus *Salix* L, URL: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=SALIX>, pasinaudota: gegužės 3 d, 2020.
41. Viltrakytė E., Salicylates amount varianton in different species of Lithuanian willow, Kaunas university of Medicine, Faculty of Pharmacy, Analytical and toxicological chemistry department, Master thesis, 2008.
42. Wichtl M., Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm scientific, Nr. 3, 2004.
43. Zhang Q. W., Lin L. G., Ye W. C., Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, Chin Med, 2018, doi: [10.1186/s13020-018-0177-x](https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x).

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

MIGLĖ IVANAUSKAITĖ

***Salix purpurea* „*Gracilis*“ ekstrakto gamyba ir panaudojimas kosmetikos produkto gamyboje**

Per pastaruosius dešimtmečius žymiai išaugo natūralių vaistinių medžiagų vartojimas pasauliniu mastu. Žmonės vis labiau kreipia dėmesį į naudojamų preparatų sudėtį, teikia pirmenybę augalinės kilmės medžiagoms, kurios mažina alergijų ir kitų šalutinių susirgimų riziką, lyginant su chemiškai sintetintomis. Viena iš tokių medžiagų, aptariamųjų tiriamojo magistrinio darbo metu, yra salicinas, kuris yra išgaunamas iš vietinės kilmės karklų žievės ekstrakto. Salicinas, tai alkoholinis β -gliukozidas, nuo seno žinomas dėl savo antiuždegiminių savybių, kurios taip pat yra naudojamos sintetinio vaisto aspirino gamyboje. Tiriamojo darbo tikslas yra išanalizuoti šios medžiagos savybes, kuriant kosmetikos gaminį – serumą, kuris veiktų kaip antiuždegiminė medžiaga gydant odos problemas, skatintų odos ląstelių regeneraciją ir mažintų riebalų išsiskyrimą ant veido. Ištyrus penkias skirtingas karklų veisles, *Salix purpurea* „*Gracilis*“ žievės ekstrakto chromatografinės analizės metu nustatytas sukauptas reikiamas salicino kiekis. Naudojant šį ekstraktą pagamintas hialurono serumas su 15 % *Salix purpurea* „*Gracilis*“. Bandomasis kosmetikos gaminys buvo išdalintas 30 žmonių grupei, kurių pusė naudojo placebo produktą ir kita pusė produktą su tiriamąja medžiaga, kad būtų galima nustatyti konkretų tiriamosios medžiagos aktyvumą. Po dviejų savaičių produkto naudojimo, šie asmenys užpildė pateiktą apklausą apie savo odos būklę tyrimo metu, gauti rezultatai parodė, jog 75 % tiriamųjų, naudojusių produktą su salicino ekstraktu, sumažėjo odos bėrimai, palygėjo odos reljefas, taip pat oda tapo skalesnė ir pakankamai pridrėkinta. Tačiau 25 % tiriamųjų odos problemos išliko tokios pačios. Įvertinus tirtų asmenų odos būklę, buvo prieita prie išvados, jog augalinis serumas labiau tiko žmonėms, turintiems sausą problematišką odą, bet ne tiems, kurių oda yra ypač riebi. Paklausus ar žmonės rinktųsi tęsti šio produkto naudojimą, beveik 80 % tiriamųjų teigė, jog sutiktų įtraukti šį kosmetikos gaminį į savo odos priežiūros rutiną. Taigi iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, jog natūralus salicinas, dėl savo uždegimą mažinančių savybių, yra tinkamas naudoti odos priežiūros priemonėse.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

MIGLÈ IVANAUSKAITĖ

Preparation and usage of *Salix Purpurea* „*Gracilis*“ Extract in Manufacture of Cosmetics

The use of natural medicines worldwide has increased significantly in recent decades. People are paying more and more attention to the composition of the preparations used, preferring herbal substances that reduce the risk of allergies and other side effects over chemically synthesized ones. One such substances, discussed in this master thesis, is salicin, which is extracted from the local origin willow bark. Salicin, an alcoholic β -glucoside, has long been known for its anti-inflammatory properties, which are also used in the production of the synthetic drug aspirin. The aim of the research is to analyze the properties of this substance, creating a cosmetic product – serum, which would act as an anti-inflammatory agent in the treatment of skin problems, promote skin cell regeneration and reduce fat secretion on the face, resulting in skin smoothing. Examination of five different willow species revealed the required salicin content in the bark extract of *Salix purpurea* “*Gracilis*” by chromatographic analysis. Hyaluronic serum with 15 % *Salix purpurea* „*Gracilis*“ was prepared using this extract. The test cosmetic product was distributed to a group of 30 people, half of them used a placebo product and the other half were using the product with the test substance to determine the specific activity of the salicin. After two weeks of using the product, these individuals completed a survey of their skin condition during the study, and the results showed that 75 % of the subjects who used the product with salicin extract had reduced skin rashes, compared skin relief, and had brighter and more hydrated skin. However, 25 % of the subjects, skin problems remained the same. Based on the skin condition of the subjects, it was concluded that the plant serum was more suitable for people with dry skin than for those with particularly oily skin. When asked if people would choose to continue using this product, almost 80 % of those surveyed said that they would agree to include this cosmetic product in their skin care routine. Thus, it can be concluded from the obtained results that natural salicin, due to its anti-inflammatory properties, is suitable for use in skin care products.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti Matui Janulevičiui už nuolatinę pagalbą ir visus vertingus patarimus vykdant praktinį darbą bei vertinant gautus tyrimų rezultatus.

Taip pat norėčiau padėkoti Artūriui Lyskoit už nuoširdžią pagalbą atliekant chromatografinę ekstraktų analizę.

Dėkoju savo baigiamojo magistrinio darbo vadovui prof. dr. Artūriui Katelnikovui už pagalbą ir tikslingus patarimus viso praktinio darbo metu.

Dėkoju UAB „KOSMETIKOS TYRIMŲ CENTRAS“ už konsultacijas ir pagalbą formuojant produktą.