

# MODERN TECHNIQUES FOR CONCENTRATION OF ACTIVE PRINCIPLES FROM PLANT EXTRACTS, BASED ON MEMBRANARY TECHNOLOGIES

## TEHNICI MODERNE DE CONCENTRARE A PRINCIPIILOR ACTIVE DIN EXTRACTE DE PLANTE, PE BAZĂ DE TEHNOLOGII MEMBRANARE

Demetra SIMION<sup>1\*</sup>, Carmen GAIDAU<sup>1</sup>, Gabriela PAUN<sup>2</sup>, Margarita KOLEVA<sup>3</sup>, Snezjana CUPARA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu st., sector 3, postal code: 031215, Bucharest, Romania, email: demetra.simion@yahoo.com

<sup>2</sup>INCDSB, Bucharest, Romania

<sup>3</sup>University of Chemical Technology and Metallurgy, Textile and Leather Department, 8 Kliment Ohridski Blvd., Sofia, 1756, Bulgaria

<sup>4</sup>Kragujevac Medicine Faculty, Serbia

---

### MODERN TECHNIQUES FOR CONCENTRATION OF ACTIVE PRINCIPLES FROM PLANT EXTRACTS, BASED ON MEMBRANARY TECHNOLOGIES

**ABSTRACT.** This work is focused on the separation and concentration of the active principles from the *Viscum album* and *Tymus vulgaris* aqueous extracts by using membrane techniques. By membranes processes such as microfiltration – ultrafiltration both the proteins, polyphenols and flavonoids concentration and their separation from the compounds with smaller molecular weight (free amino acids, monosaccharides, etc.) that pass through the membranes were obtained. The main advantages of membranary technologies for separation and concentration of active principles from plant extracts are the following: low costs, high separation yield, high purity, absence of phase changes, process development at room temperature and preservation of active principles, simplicity, modulated compact installations.

**KEY WORDS:** plant extracts, active principles, ultrafiltration, microfiltration, reverse osmosis.

### TEHNICI MODERNE DE CONCENTRARE A PRINCIPIILOR ACTIVE DIN EXTRACTE DE PLANTE, PE BAZĂ DE TEHNOLOGII MEMBRANARE

**REZUMAT.** Lucrarea se referă la separarea și concentrarea principiilor active din extractele apoase de *Viscum album* și *Tymus vulgaris*, prin utilizarea tehnicielor membranare. Prin procesele membranare: microfiltrare - ultrafiltrare s-au obținut atât concentrarea proteinelor, polifenolilor, flavonoidelor, cât și separarea acestora de compușii cu greutate moleculară mică (aminoaciizi liberi, monozaharide etc.) care nu sunt reținuți prin membrane. Principalele avantaje ale tehnologiilor membranare de separare și concentrare a principiilor active din extractele de plante sunt următoarele: costuri reduse, randament înalt de separare, puritate maximă, absența unor modificări de fază, dezvoltarea procesului la temperatură camerei și conservarea principiilor active, simplitate, instalații modulare compacte.

**CUVINTE CHEIE:** extracte din plante, principii active, ultrafiltrare, microfiltrare, osmoză inversă.

### TECHNIQUES MODERNES POUR LA CONCENTRATION DES PRINCIPES ACTIFS D'EXTRAITS DE PLANTES, BASÉES SUR LES TECHNOLOGIES MEMBRANAIRES

**RÉSUMÉ.** Cet article est centré sur la séparation et la concentration des principes actifs des extraits aquueux de *Viscum album* et *Tymus vulgaris* en utilisant des techniques membranaires. Par des procédés membranaires tels que la microfiltration - l'ultrafiltration on a obtenu à la fois la concentration des protéines, polyphénols, flavonoïdes et la séparation des composés à poids moléculaire plus faible (acides aminés libres, monosaccharides, etc.) qui passent à travers les membranes. Les principaux avantages des technologies membranaires de séparation et de concentration des principes actifs à partir de extraits de plantes sont les suivants: le faible coût, le rendement de séparation élevé, l'haute pureté, l'absence de changements de phase, le développement de processus à la température ambiante et la préservation des principes actifs, la simplicité, les installations modulés compactes.

**MOTS CLÉS:** extraits de plantes, principes actifs, ultrafiltration, microfiltration, osmose inverse.

---

## INTRODUCTION

Active principles are in most of the cases photo and thermal non-stabilised, so that under common proceeding they partly or entirely lose their phytotherapeutic activity. Thus, while preparing the pharmaceutical products based on the natural active principles, an essential role is played by selection of the

## INTRODUCERE

De cele mai multe ori, principiile active nu sunt foto- și termo-stabilizate, astfel încât în timpul prelucrării își pierd parțial sau integral activitatea lor fitoterapeutică. Astfel, în timpul preparării produselor farmaceutice pe bază de principii active naturale un rol

\* Correspondence to: Demetra SIMION, INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu st., sector 3, postal code: 031215, Bucharest, Romania, email: demetra.simion@yahoo.com

right method, in order to get minimum effect on the properties that are being studied [1-5]. Those membranes techniques occurring at the environment temperature, usually have no effect on the involved phases, and are coming forth as an alternative to the classic techniques for plant extracts processing. Thus, through the microfiltration ballast substances from the proceeded liquid media (with the size of over 0.1 µm) are stopped, and the biologically active principles, due to their size (of 100-10,000 Da) are separated and concentrated through ultrafiltration process.

## MATERIALS AND METHODS

In order to separate and concentrate the bioactive compounds from the *Viscum album* and *Tymus vulgaris* aqueous extracts, by using membrane processes, in the first step microfiltration and ultrafiltration membranes were obtained, in the second step the aqueous extracts were prepared from both of the above mentioned medicinal herbs, and in the last step the active principles from the aqueous extracts were separated and concentrated.

The extracts presented in this work were obtained by smashing the medicinal herb and mixing the paste with water (as solvent), due to the procedure facility and to the fact that it allows a good extraction of the active compounds. The smashed herb is mixed with an adequate quantity of cold or hot solvent, keeping this mixture a well determinate time, stirring up this mixture continuously or in steps, then the extractive solution is separated from the waste on the paper filter support – 1 Whatman with vacuum Buchner funnel, while the waste is washed with 2-3 small demineralised water volumes. In the end, the aqueous extract is analysed through various physical-chemical methods.

The effected experiments allowed to have set up the optimal parameters, which helps to get the aqueous extracts of *Viscum album* or *Tymus vulgaris*: 6% concentration, 4 hrs. mixture with the smashed herb and solvent, continuous stirring up.

The microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) membranes were prepared by phase inversion method [2]. To increase the viscosity in the polysulfone solution, polivinylpirrolidone (PVP) 1-2% (masic concentration) was added.

The polymeric MF and UF membranes were obtained with the continuous monitoring plant in the following conditions:

esențial îl are selecția metodei adecvate, pentru a nu influența proprietățile [1-5]. Tehnicile membranare se desfășoară la temperatura camerei și nu au niciun efect asupra fazelor implicate, fiind o alternativă la cele clasice de prelucrare a extractelor vegetale. Prin microfiltrare sunt oprite substanțe de balast din mediul lichid prelucrat (cu dimensiunea de peste 0.1 µm), iar principiile biologic active, datorită dimensiunii lor (de 100-10.000 Da) sunt separate și concentrate prin procesul de ultrafiltrare.

## MATERIALE ȘI METODE

Pentru a separa și concentra principiile active din extractele apoase de *Viscum album* și *Tymus vulgaris* prin proceze membranare, într-o primă etapă s-au obținut membrane de microfiltrare și ultrafiltrare, apoi s-au preparat extractele apoase iar în final s-au separat și concentrat principiile active din acestea.

Extractele apoase au fost obținute prin mărunțirea plantei și adăugarea solventului (apă), fiind o procedură simplă, care facilitează o extracție bună a principiilor active. Peste planta mărunțită se adaugă o cantitate adecvată de solvent rece sau cald, agitare continuă sau în mai multe etape un timp bine determinat, apoi se separă soluția de extracție de deșeuri pe un suport de hârtie de filtru nr. 1 Whatman cu o pâlnie Buchner sub vid, iar deșeurile se spală în 2-3 volume mici de apă demineralizată. La final, extractul apos este analizat prin diferite metode fizico-chimice.

Experimentele efectuate au permis stabilirea parametrilor optimi pentru obținerea extractelor apoase din *Viscum album* sau *Tymus vulgaris*: concentrație 6%, agitarea continuă a plantei mărunțită în prezența solventului timp de 4 ore.

Membranele de microfiltrare (MF) și ultrafiltrare (UF) s-au preparat prin metoda inversiei de fază [2]. Pentru a mări viscozitatea s-a adăugat polivinilpirolidonă (PVP) 1-2% (concentrație masică) în soluția de polisulfonă.

Membranele polimerice de MF și UF s-au obținut cu o monitorizare continuă, în următoarele condiții:

- the used polymer: polysulfone (ULTRASON);
- the used solvent: DMF and NMP;
- polymeric solution concentration: 9% and 10% for the MF membranes; 18%, 19% and 20% for the UF membranes;

- the used additive: polyvinylpirrolidone (PVP) – 2%.

Microfiltration process was effected by passing the whole quantity of the aqueous extracts through the microfiltration membranes, the light permeable phase obtained being analysed by comparison with the first (previous) extract. The light liquid obtained from the microfiltration is, then, concentrated through the ultrafiltration. Ultrafiltration process was performed under a constant pressure of 8 bar, until we got a 5:1 concentration ratio (400 mL permeate and 100 mL concentrate).

*Viscum album* extracts are made from complex mixtures of compounds, the most important biologically active principles of these being from the proteins (viscotoxines and lectine) and from the flavonoides. Having in view that there is no possibility to separate each of the compounds from these 2 types of the mentioned groups, we are treating these compounds as an entire group of proteins and, in a similar way, the entire group of flavonoides (expressed as routhoside) as a whole. The proteins separation was effected through the Lowry method, the absorption capacity reading is being made at 660 nm, the flavonoides separation was effected according to the method described in Romanian Pharmacopea, the absorption capacity reading being made at 430 nm, for the analysed solutions.

The *Tymus vulgaris* aqueous extracts are made from complex mixtures of compounds, among these the most important as biologic activity are polyphenols and flavonoides. The total polyphenols were separated and identified by their reaction with phosphowolframic acid, according to the method described by the Romanian Pharmacopea, the absorption capacity reading being made at 660 nm.

## RESULTS AND DISCUSSION

The scanning electron micrographs for MF membrane obtained were presented in Figure 1. In the photomicrographs cross-sections presented we can see the asymmetric structure, an active dense layer with 10-20  $\mu\text{m}$  thickness and a macroporous layer with 150-200  $\mu\text{m}$  thickness.

- polimerul utilizat: polisulfonă (ULTRASON);
- solventul utilizat: DMF și NMP;
- concentrația soluției polimerice: 9% și 10% pentru membranele MF; 18%, 19% și 20% pentru membranele UF;

- aditivul utilizat: polivinilpirolidonă (PVP) – 2%.

Procesul de microfiltrare s-a efectuat prin prelucrarea extractelor apoase prin membranele MF, iar faza de permeat a fost analizată comparativ cu primul extract (anterior). Concentratul realizat prin microfiltrare a fost prelucrat prin ultrafiltrare. Procesul de ultrafiltrare s-a desfășurat la presiunea constantă de 8 bar, până la obținerea unui raport de concentrație 5:1 (400 ml permeat și 100 ml concentrat).

Extractele de *Viscum album* conțin amestecuri complexe de compuși, cel mai important biologic activ fiind format din proteine (viscotoxine și lectina) și flavonoide. Având în vedere că nu există nicio posibilitate de a separa fiecare compus din aceste 2 tipuri de grupuri menționate, acești compuși se consideră ca un grup de proteine și în mod similar pentru flavonoide (exprimate ca rutozide). Separarea proteinelor s-a efectuat prin metoda Lowry, analiza capacitatei de absorbție la lungimea de undă de 660 nm, iar în cazul flavonoidelor separarea în conformitate cu metoda descrisă în Pharmacopea română, iar studiul la 430 nm.

Extractele apoase de *Tymus vulgaris* conțin amestecuri complexe de compuși biologic activi, cei mai importanți fiind polifenolii și flavonoidele. Polifenolii totali au fost separați și identificați prin reacția cu acidul fosfowolframic, în conformitate cu metoda din Pharmacopea română, iar analiza capacitatei de absorbție s-a efectuat la 660 nm.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Micrografia electronică a membranei de MF este prezentată în Figura 1. În secțiunea transversală se poate observa structura asimetrică, cu un strat dens având grosimea de 10-20  $\mu\text{m}$  și unul macroporos de 150-200  $\mu\text{m}$ .

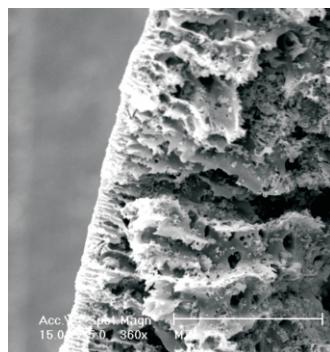


Figure 1. SEM picture of microfiltration membrane  
Figura 1. Imagine SEM a membranei de microfiltrare

Microporous structure of the ultrafiltration membranes obtained was presented in scanning electron micrograph (SEM) - Figure 2.

Structura microporoasă a membranei de ultrafiltrare este prezentată în micrografie electronică (SEM) - Figura 2.

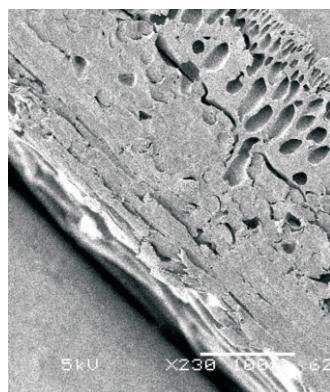


Figure 2. SEM picture of ultrafiltration membrane  
Figura 2. Imagine SEM a membranei de ultrafiltrare

Ultrafiltration membranes obtained correspond to the retention condition of the biologically active compounds from liquid extracts as generally molecular weight is bigger than 25,000 Da.

Depending on the extract composition, on its nature, on the initial concentration, as well as the imposed quality indicators, the stages of membranary technology are presented in Figure 3.

Membranele de ultrafiltrare sunt indicate pentru retenția compușilor biologic activi din extractele studiate, deoarece greutatea lor moleculară este mai mare de 25000 Da.

În funcție de compoziția extractului, de natura sa, concentrația inițială, precum și de indicatorii de calitate impuși, etapele tehnologiei membranare sunt prezentate în Figura 3.

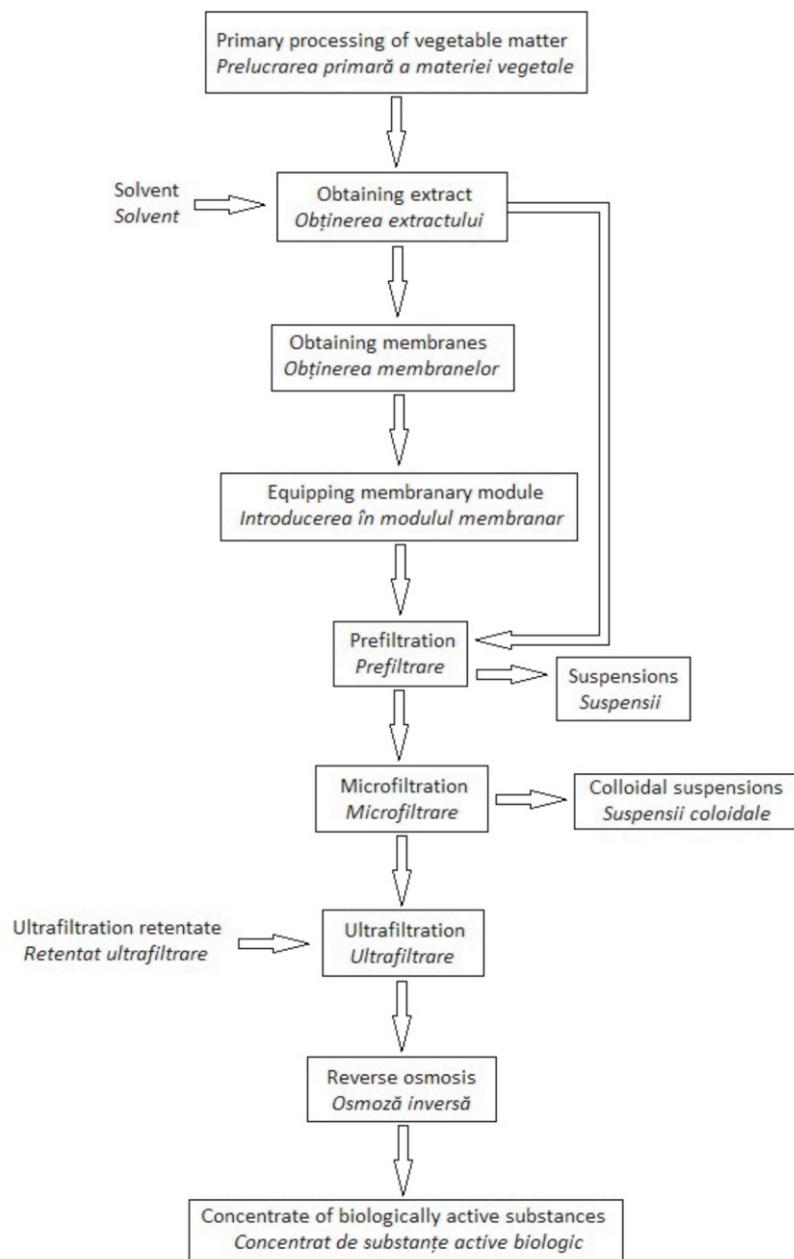


Figure 3. The stages of membranary technology  
Figura 3. Etapele tehnologiei membranare

Calibrating plot (Figure 4) for *Viscum album*: protein concentration, flavonoid concentration and polyphenols concentration are presented in Figures 4-6.

La *Viscum album* curbele de etalonare pentru dozarea proteinelor, flavonoidelor și polifenolilor sunt prezentate în Figurile 4-6.

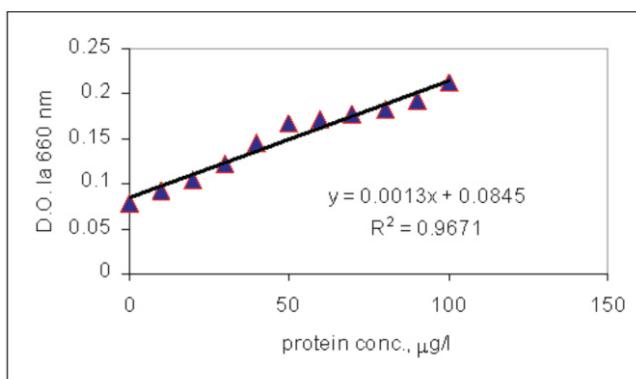


Figure 4. Calibrating plot for protein dosage using Lowry method  
 Figura 4. Curba de etalonare pentru dozarea proteinei utilizând metoda Lowry

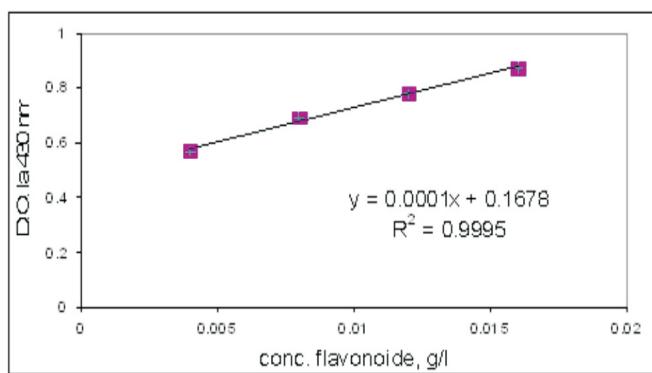


Figure 5. Calibrating plot for flavonoid concentration determination  
 Figura 5. Curba de etalonare pentru determinarea concentrației de flavonoide

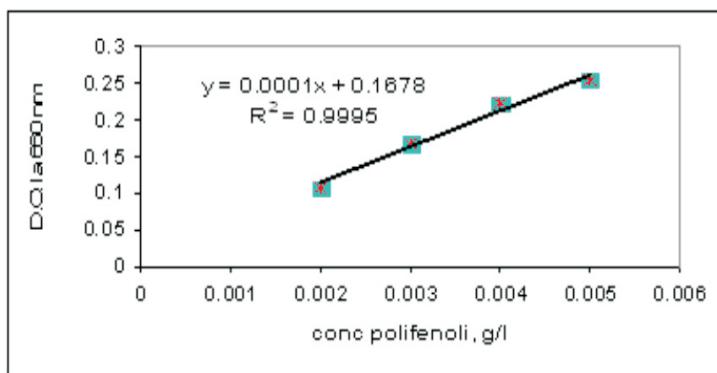


Figure 6. Calibrating plot for polyphenols concentration determination  
 Figura 6. Curba de etalonare pentru determinarea concentrației de polifenoli

The experimental results obtained at the micro- and ultrafiltration of the *Tymus vulgaris* aqueous extract are presented in Table 1.

Rezultatele experimentale obținute la micro- și ultrafiltrarea extractului apos de *Tymus vulgaris* sunt prezentate în Tabelul 1.

Table 1: Experimental results for micro- and ultrafiltration of *Tymus vulgaris* aqueous extract  
Tabelul 1: Rezultatele experimentale pentru micro- și ultrafiltrarea extractului apos de *Tymus vulgaris*

No. Nr. crt.	Membrane type <i>Tip membrană</i>	MWCO, Da	Flow, L/m <sup>2</sup> h <i>Flux,</i> <i>L/m<sup>2</sup>h</i>	Polyphenols concentration, mg/L <i>Concentrație polifenoli, mg/L</i>		Flavonoid concentration, mg/L <i>Concentrație flavonoide, mg/L</i>	
				Concentrate <i>Concentrat</i>	Permeate <i>Permeat</i>	Concentrate <i>Concentrat</i>	Permeate <i>Permeat</i>
1	(MF)	-	700	-	2.11	-	6
2	(UF1)	20,000	100	12.31	0.655	45.12	1.11
3	(UF2)	14,000	111	12.88	0.555	45.19	1.000
4	(UF3)	10,000	50	14	0.457	45.62	0.09

## CONCLUSIONS

1. The level of the flavonoids' recovery into the concentrates provided from the *Viscum album* aqueous extracts is of over 89%, while the level of the proteins' recovery (such as lectine, viscotoxine) is of over 92%, into the same concentrates.

2. *Viscum album* aqueous extract (and, accordingly, alcoholic extract) processed through membrane filtration techniques: microfiltration – ultrafiltration, using polysulphone based, with asymmetric polymer structure membranes result in increasing the interesting products' quality and quantity, versus their similar being largely used on the market, into different industries.

3. By using the succession of the membrane processes: microfiltration – ultrafiltration the effects we may get are both the polyphenols' and the flavanoids' concentrating and their separation from the smaller molecular sizes compounds (free amino acids, monosaccharides, etc.), that are passing across the membranes into the permeate.

## Acknowledgements

This work was financially supported by ANCS-UEFISCDI, Capacities Programme PN-2, Module III, Bilateral Cooperation Romania-Bulgaria 453CB/18.10.2010.

## CONCLUZII

1. Gradul de recuperare a flavonoidelor în concentratele obținute din extractele apoase de *Viscum album* este de peste 89% iar a proteinelor (cum ar fi lectinele, viscotoxinele) de 92%.

2. Extractul apos de *Viscum album* prelucrat prin tehnici membranare de filtrare – microfiltrare – ultrafiltrare utilizând membrane cu structură polimerică, asimetrică, a determinat creșterea calității și cantității produselor obținute comparativ cu cele similare de pe piață.

3. Prin utilizarea succesiunii de procese membranare de microfiltrare – ultrafiltrare, efectele obținute se referă atât la concentrarea polifenolilor și a flavonoidelor, cât și la separarea acestora de compuși moleculari cu dimensiuni mai mici (aminoacizi liberi, monozaharide etc.), care trec prin membrane în permeat.

## Mulțumiri

Această lucrare a fost finanțată de ANCS-UEFISCDI, Programul Capacități PN-2, Modulul III, prin proiectul de colaborare bilaterală România-Bulgaria 453CB/18.10.2010.

## REFERENCES

1. Saenz, M., Ahumada, M., Garcia, M., Extracts from Viscum and Crataegus are cytotoxic against larynx cancer cells, *Z Naturforsch [C]*, **1997**, 52, 42-44.
2. Garganciu, D., Roman, G., Nuta, D., Lehr, C., Nita, O., Batrinescu, Gh., Godeanu, M., Membranes techniques for active principles separation from vegetale extracts, International Symposium "Performances in Milenium III Chemistry", the VIIth edition, Bucharest, **2003**.
3. Mulder, M., Basic Principles of Membrane Technology, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, **1996**, 77-78.
4. Porter, M.C., Handbook of Industrial Membrane Technology, Noyes Publications, **1990**, 13-20.
5. Simion, D., Niculescu, O., Gaidau, C., Simion, M., Popescu, G., Chelaru, C., The Influence of Surfactants on Separation Processes Involving Membranes, *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2011**, 11, 1, 53-60.