

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

Marija Lukoševičiūtė

Farmacinė chemija

Magistro baigiamasis darbas

***EPILOBIUM ANGUSTIFOLIUM* ARBATŲ ANALIZĖ**

Darbo vadovas (-ė)

prof. dr. (HP) Vida Vičkačkaitė

(leidimas ginti, data, parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius 2023

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY
ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

Marija Lukoševičiūtė

Pharmaceutical chemistry

Masters thesis

ANALYSIS OF *EPILOBIUM ANGUSTIFOLIUM* TEAS

Scientific adviser

Prof. dr. (HP) Vida Vičkačkaitė

(permission to defend, date, signature)

Date of submission _____

Registration No. _____

Vilnius 2023

TURINYS

ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Oksidacinis stresas.....	6
1.2. Sintetiniai ir natūralieji antioksidantai.....	9
1.2.1. Sintetiniai antioksidantai.....	10
1.2.2 Natūralieji antioksidantai.....	12
1.3. Antioksidacinių savybių tyrimo metodai.....	16
DPPH' metodas.....	18
Bendro fenolių kiekio tyrimas naudojant Folin-Ciocalteu reagentą.....	20
2. EKSPERIMENTO METODIKA.....	22
2.1. Reagentai ir tirpalai.....	22
2.2. Aparatūra.....	22
2.3. Mėginio paruošimas DPPH' analizei.....	22
2.4. Mėginio paruošimas bendrajam fenolinių junginių kiekiui nustatymui.....	23
2.5. Kietafazės mikroekstrakcijos ir dujų chromatografinės-masių spektrometrinės analizės sąlygos.....	23
2.6. Skysčių chromatografinės analizės sąlygos.....	24
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	25
3.1. Gauromečio arbatų antioksidacinių savybių tyrimas DPPH metodu.....	26
3.2. Bendras polifenolinių junginių kiekis.....	30
3.3. Kai kurių gauromečio arbatų komponentų identifikavimas GC-MS metodu.....	31
3.4. Arbatų tyrimas didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodu.....	33
IŠVADOS.....	40
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	41
SANTRAUKA.....	47
SUMMARY.....	48

SANTRUMPOS

ROS - laisvieji radikalai (angl. *reactive oxygen species*)

RNS - (angl. *reactive nitrogen species*)

RSS - reaktyviosios sieros rūšys (angl. *reactive sulfur species*)

HAT - vandenilio atomo perdava, (angl. *hydrogen atom transfer*)

SET - vieno elektrono perdava, (angl. *single electron transfer*)

DPPH - 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radikalas

ESR - elektronų sukimosi rezonansas, (angl. *Electron Spin Resonance*)

EPR - elektronų paramagnetinis rezonansas (angl. *electron paramagnetic resonance*)

KFME - kietafazė mikroekstrakcija

BHA - butilintas hidroksianizolas

BHT - butilintas hidroksitoluenas

TBHQ - *tert*-butilhidrokvinonas

PG - propilgalatas

FCR - Folin-Ciocalteu reagentas

ĮVADAS

Žmonių susidomėjimas tradicine medicina žinomas nuo senų laikų. Ligi šiol įvairios žolelių arbatos, kompresai ir įvairūs užpilai naudojami gydant įvairias ligas ar traumas. Liaudies medicinoje itin dažnai minimos tokios vaistinės žolelės kaip mėta, medetka, ramunėlės ar čiobrelis, tačiau ne mažiau naudingas yra siauralapis gaurometis (*Epilobium angustifolium*). Arbatoms ir nuovirams virti naudojami šio augalai lapai, žiedai ir šakniastiebiai. Ilgainiui augalo populiarumas išaugo iš žolininkų klėčių ribų ir dabar gauromečio lapų ar žiedų galima ne tik prisiskinti įvairiu metų laiku (šis augalas žydi birželio mėnesį, o žolininkės rekomenduoja žiedus surinkti iki Joninių), tačiau ir įvairiais pavidalais nusipirkti parduotuvėse. Parduotuvėse randamos gauromečio lapų arbatos, taip pat fermentuoti ir nefermentuoti lapai, iš šio augalo gaminamos arbatos granulės.

Apie gauromečio teikiamą naudą rašoma nemažai straipsnių, dažnai minimos gauromečio gydomosios ir apsauginės savybės. Siauralapis gaurometis stiprina imuninę sistemą, padeda apsisaugoti ir gydytis peršalimo ligas, stabdo vėžinių ląstelių augimą ir dauginimąsi, balansuoja nervinės sistemos veiklą, stebima nauda sergant skrandžio, šlapimo takų ir virškinimo sistemos ligomis. Taip pat šis augalas veikia kaip antidepresantas, ramina, tačiau kartu suteikia energijos, veikia kaip analgetikas. Šios naudingosios savybės žinomos pakankamai seniai, tačiau tyrimai apie junginius, lemiančius augalo gerąsias savybes, pradėti atlikti palyginus neseniai.

Nagrinėjant siauralapio gauromečio sandarą matyti, kad šiame augale pagrinde dominuoja polifenoliai, taninai ir flavonoidai. Visi šie junginiai yra siejami su gauromečiui būdingomis savybėmis. Nagrinėjant apie gaurometį parašytus straipsnius ir remiantis žolininkų patirtimi tapo aišku, kad tai be abejonės yra sveikatai naudingas augalas. Dažniausiai šis augalas naudojamas gaminant ir geriant arbatas. Pasidarė įdomu, kurios augalo dalies (žiedo, stiebo ar lapų), fermentuota ar nefermentuota, granuliuota ar negranuluota arbatos pasižymi geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis, ir kaip arbatų pagaminimas susijęs su augalo teigiamomis savybėmis.

Iš mokslinio smalsumo atsirado **šio darbo tikslas** - ištirti skirtingas gauromečio arbatas, nustatyti, kurios iš jų pasižymi geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis, identifikuoti pagrindinius arbatų junginius.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti gauromečio arbatų antioksidacines savybes DPPH metodu.
2. Gauromečio arbatose nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį.
3. Identifikuoti pagrindinius lakiuosius gauromečio arbatų komponentus.
4. Ištirti gauromečio arbatų sudėtį didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Oksidacinis stresas

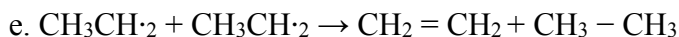
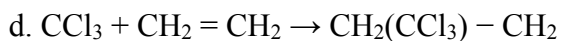
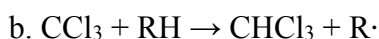
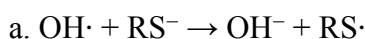
Medžiagų apykaitos metu gyvų organizmų ląstelės naudoja deguonį. Tai labai svarbus procesas aerobinėms gyvybės formoms ir žmonių metabolizmui, kadangi deguonis yra pagrindinis elektronų akceptorius ATP gamybos sistemoje [1]. Deguonis yra labai stiprus oksidatorius, sudarantis oksidus su daugeliu elementų ir junginių. Molekulinis deguonis turi du nesuporuotus elektronus su lygiagrečiais sukintais dviejose atskirose orbitose, jis gali priimti elektronų porą. Tačiau kai perduodama ne elektronų pora, o nesuporuoti elektronai, generuojami laisvieji radikalai, kurie yra kenksmingi organizmui, nes yra labai nestabilūs ir aktyviai reaguoja su kitomis molekulėmis. Šie junginiai vadinami oksidantais arba pro-oksidantais [2].

Laisvieji radikalai natūraliai susidaro organizme vykstančių procesų metu. Tai - kvėpavimas ir ląstelių lygmeniu vykstantys imuniniai procesai. Endogeniniai laisvieji radikalai natūraliai susidaro mūsų organizme dėl ląstelių metabolizmo, streso, pervargimo, nemigos, kai kurių ligų ir uždegiminių procesų. Fagocitinės ląstelės, tokios kaip neutrofilai, monocitai ir makrofagai, ginasi nuo pašalinių organizmų ir gamina didelius O_2^- ar NO^- kiekius. Kelios ligos yra siejamos su per dideliu fagocitų aktyvavimu. Šis perdėtas aktyvumas sukelia audinio pažeidimus, o jie yra siejami su laisvaisiais radikalais [3]. Laisvieji radikalai susidaro ir dėl organizmą veikiančių išorės veiksnių. Egzogeniniai laisvųjų radikalų šaltiniai yra tabako dūmai, teršalai, organiniai tirpikliai ir pesticidai. Dauguma prooksidacinės prigimties junginių gali patekti į organizmą per maistą, didelis spektras radikalų yra įkvepiama su cigarečių dūmais [4].

Esant fiziologinėms koncentracijoms, laisvieji radikalai gali būti reikalingi organizmo funkcijoms palaikyti, tačiau kai jų balansas organizme sutrikęs, jie gali stimuliuoti grandines reakcijas, kurių metu pažeidžiamos ląstelėse esančios biomolekulės, tokias kaip aminorūgštys, lipidai, baltymai, angliavandeniai ir polinesočiosios riebalų rūgštys. Elektronų netekusios molekulės pasidaro nestabilios ir jungiasi su kitomis, sukeldamos grandininę reakciją – oksidacinį stresą. Oksidacinis stresas yra oksidacinė žala, kurią sukelia disbalansas tarp laisvųjų radikalų ir kūno antioksidantų. Ši pažeida galiausiai sukelia įvairius negalavimus ir ligas, skatina ląstelių senėjimą. Tyrimai parodė, kad laisvieji radikalai turi įtakos daugiau kaip šimto ligų atsiradimui ir eigai, įskaitant maliariją, imunodeficito sindromą, širdies ligas, arterosklerozę, diabetą ir vėžį [5,6].

Laisvieji radikalai susidaro trijų elementų pagrindu: deguonies, azoto ir sieros ir vadinami atitinkamai reaktyviosiomis deguonies rūšimis ROS (angl. *reactive oxygen species*), reaktyviosiomis azoto rūšimis RNS (angl. *reactive nitrogen species*) ir reaktyviosiomis sieros rūšimis RSS (angl. *reactive sulfur species*). Didžiausią įtaką oksidaciniam stresui daro ROS. ROS dažniausiai yra superoksidai ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (HO^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}), alkoksil (RO^{\cdot}) ir azoto oksidai (NO^{\cdot}). Hidroksilo ir alkoksilo laisvieji radikalai yra labai reaktyvūs ir greitai reaguoja su šalia esančiomis molekulėmis. Superoksido anijonai, riebalų hidroperoksidai ir azoto oksidai yra mažiau aktyvūs [2]. Be šių radikalų, gyvuose organizmuose aptinkamos ir kitos, neradikalinės, reaktyviosios deguonies rūšys, tokios kaip singletinis deguonis (1O_2), vandenilio peroksidas ir hipochlorito rūgštis (HOCl).

Egzistuoja įvairūs laisvųjų radikalų reakcijų mechanizmai. Laisvieji radikalai gali reaguoti su molekulėmis atiduodami ar prijungdami elektronus radikalams oksiduojantis ar redukuojantis (a), prisijungdami vandenilį (b), sureaguodami vienas su kitu (c), dalyvaudami prisijungimo reakcijose (d) ir dalyvaudami disproporcijos reakcijose (e) [7]:



Hidroksilo radikalas (OH^{\cdot}) yra neutrali hidroksido jono (OH^-) forma. Šis radikalas yra vienas iš reaktyviausių žinomų, jo skilimo pusperiodis yra maždaug 10^{-9} s. Jis gali susidaryti *in vivo* dėl hemolizinio kūno vandens skilimo arba iš endogeninio H_2O_2 . Ultravioletinės spinduliuotės energijos energijos nepakanka vandeniui suskaldyti, bet pakanka suardyti vandenilio peroksido molekulę į du hidroksilo radikalus. Šių labai reaktivių radikalų susidarymas iškart sukelia žalą susidarymo vietoje [8].

Azoto oksidas yra svarbi signalinė molekulė žinduoliams, įskaitant ir žmones. Tai svarbi ląsteliniu lygmeniu dalyvaujanti pernašos molekulė, dalyvaujanti daugelyje fiziologinių ir patologinių procesų. Jos radikalas NO^{\cdot} yra signalinis junginys, kuris susiformuoja iš arginino veikiant fermentams ir atpalaiduoja kraujotaką, tokiu būdu sumažėja kraujotakui spaudimas. Šis radikalas yra pirminės imuninės sistemos atsakė dalyvaujančių aktyvuotų makrofagų veiklos produktas. Per didelis šio radikalo kiekis yra žalingas ląstelei (citotoksiškas). NO^{\cdot} gali

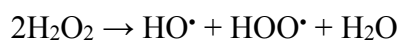
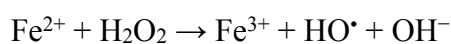
tiesiogiai reaguoti su biomolekulėmis arba jungtis su $O_2^{\cdot-}$ ir sudaryti peroksinitrilą ($ONOO^-$). Ši molekulė skatina riebalų peroksidaciją lipoproteinuose, tačiau vykstant tirozino liekanų baltymuose nitratinimui $ONOO^-$ gali trikdyti ląstelių funkcijas [9].

Peroksinitrilas ($ONOO^-$) yra reakcijos tarp azoto oksido ($\bullet NO$) ir superoksido ($O_2^{\cdot-}$) produktas, skatinantis oksidacinę molekulių ir audinių žalą. Susidarant peroksinitrilui sumažėja azoto oksido bioaktyvumas, to pasekoje sumažėja jo fiziologinės funkcijos ir susilpnėja antioksidanto veiksmi laisvųjų radikalų ir metalų reakcijose. Manoma, kad peroksinitrilas turi įtakos daugelio ligų išsivystymui, įskaitant ūminius ir lėtinius uždegiminius procesus, sepsį, išemiją-reperfuziją ir neurodegeneracinius sutrikimus [10].

Peroksilo radikalas (ROO^{\cdot}) yra gana stabilus ir nesunkiai difunduojantis ROS. Šis radikalas susidaro vykstant riebalų peroksidacijos reakcijoms, kurios prasideda vandenilio atomui atsiskiriant nuo polinesočiųjų riebalų rūgščių. Peroksilo radikalas gali pradėti šią reakcijų grandinę [11].

Tolimesnėse riebalų peroksidacijos reakcijos stadijose susidaro alkoksilo radikalai (RO^{\cdot}) ir organinės kilmės hidroperoksidai ($ROOH$). Pastaroji junginių grupė gali persigrupuoti ir suformuoti tarpinius endoperoksidinius junginius, kurie yra suskaldomi iki aldehidų. Aldehidų reakcija su prie baltymų prisijungusiomis amino grupėmis vyksta modifikuojant baltymų dalį į lipoproteinus. [8]

Vandenilio peroksidas (H_2O_2) yra oksidatorius, o ne laisvasis radikalas. Tai reiškia, kad ši dalelė turi nesuporuotą elektroną, yra labai reaktiva ir nestabili. Ji susiformuoja, kai deguonies molekulė netenka dviejų elektronų. Aplinkoje esant deguonies ir pereinamųjų metalų jonų, vandenilio peroksidas skyla į hidroksidą (OH^{\cdot}) pagal Fentono reakciją [7]. Fentono reakcija pateikiama žemiau [12]:



Vandenilio peroksidas natūraliai gaminasi organizme kaip šalutinis oksidacinio metabolizmo produktas. Jis lengvai difunduoja tarp ląstelių. Vandenilio peroksidas efektyviai konvertuojamas į vandenį naudojant katalazės fermentą, šis procesas nulemia oksidatoriaus pusėjimo pusperiodį [13].

Singletinis deguonis (1O_2) yra dažnas pavadinimas apibūdinant diamagnetinę molekulinio deguonies (O_2) formą, kuri yra mažiau stabilus nei normalus tripletinis deguonis. Tai dar viena neradikalinė reaktyvioji deguonies forma, kuri dažniausiai susidaro *in vivo*, šviesos poveikyje. Šio ROS pusėjimo pusperiodis - 10^{-6} s. Singletinio deguonies reakcijos su molekulėmis dažniausiai

vyksta dvigubųjų ryšių vietoje, todėl jis aktyviai reaguoja su su polinesočiosiomis riebalų rūgštimis ar guaninu, esančiu DNR [14].

Sveikose ląstelėse yra tinkamas prooksidantų - antioksidantų balansas. Šis balansas gali pakrypti į prooksidantų pusę, kai deguonies junginių padaugėja, arba kai antioksidantų kiekis sumažėja. Ši būseną vadinasi oksidaciniu stresu. Oksidacinis stresas apibūdina reaktyvių deguonies junginių gamybos ir apraiškos disbalansą ir biologinės sistemos galimybes neutralizuoti pavojingas medžiagas ir ištaisyti padarytą žalą. Antioksidantų koncentracija mažėja dėl mutuojančių fermentų arba toksinų, taip pat negaunant pakankamo jų kiekio su maistu. Deguonies, azoto ir anglies junginių skaičius, gaunamų iš aktyvuotų fagocitų, padidėja, kai organizme yra chroniškas uždegimas [15].

1.2 Sintetiniai ir natūralūs antioksidantai

Visi aerobiniai organizmai turi antioksidacinę apsaugą. Tai gali būti antioksidaciniai fermentai arba kitos antioksidacinės medžiagos, kurios pašalina arba ištaiso pažeistas molekules. Fermentai laikomi natūraliais antioksidantais, jie naudojami maisto pramonėje šalinant reaktyviasias deguonies formas, deguonį ir lipidų hidroperoksidus [14].

Antioksidantai yra kitų molekulių oksidaciją stabdantys junginiai. Maisto pramonėje antioksidantas yra apibrėžiamas kaip bet kokia medžiaga, kuri, esant mažoms koncentracijoms, lyginant su oksiduojančiu substratu, žymiai sulėtina arba slopina to substrato oksidaciją [7]. Antioksidantai suriša laisvuosius radikalus ir stabdo riebalų peroksidaciją, o tai ilgina maisto produktų galiojimo laiką. Riebalų peroksidacija sukelia maisto ir farmacinių produktų senėjimą, trumpina jų galiojimo laiką, apsunkina gamybą ir laikymą [16]. Antioksidantai apsaugo žmogaus kūną nuo laisvųjų radikalų ir jų sukeliama poveikio, stabdo daugelio lėtinių ligų vystymąsi ir plitimą, mažina riebalų peroksidaciją.

Pastaraisiais metais ypač padidėjo mokslininkų pastangos surasti ir indentifikuoti maiste ir augaluose randamus alternatyvius, natūralius ir saugius antioksidantus. Jie dažnai naudojami kaip grandinines radikalines oksidacijos reakcijas galintys stabdyti priedai į maisto produktus. Jų veikimo principas: antioksidantai stabdo oksidacijos reakciją sustabdydami iniciacijos ir plitimo stadijas. Nustatant antioksidantų aktyvumą maiste dažnai naudojami terminai “antioksidantų aktyvumas” ir “antioksidantų pajėgumas”. Pirmasis terminas apibūdina reakcijos tarp specifinio

antioksidanto ir specifinio oksidanto greitį. Pajėgumas yra tam tikro laisvųjų radikalų, kuriuos pašalina antioksidantas, kiekio matas, dažniausiai išreiškiamas moliais [18].

Vaisių ir daržovių vartojimas mažina kai kurių chroniškų ligų, įskaitant ir itin pavojingą vainikinių arterijų aterosklerozę, riziką. Epidemiologiniai tyrimai parodė atvirkštinį ryšį tarp vaisių ir daržovių suvartojimo ir mirties nuo nuo amžiaus atsirandančių ligų, tokių kaip išeminė širdies liga ir vėžys. Šios ligos siejamos su padidėjusia oksidacine žala, kuri paveikia organizmą ir išbalansuoja gyvybines funkcijas. Svarbiausi vaisiuose ir daržovėse randami bioaktyvūs junginiai yra fenoliai ir flavonoidai. Fenolių antioksidacinės savybės inhibuoja mažo tankio lipoproteininio cholesterolio oksidaciją. Būtent dėl to vaisių ir daržovių vartojimas yra atvirkščiai susijęs su vainikinių arterijų aterosklerozė [19].

Augalinės kilmės maiste randamas platus spektras biologiškai aktyvių fenolinių junginių, kurie savo struktūroje turi vieną ar daugiau aromatinių žiedų. Jie dažniausiai suteikia skonį, spalvą ir tekstūrą. Paprasčiausi fenoliniai junginiai yra monofenoliai su vienu benzeno žiedu, pavyzdžiui 3-etilfenolis ir 3,4-dimetilfenolis, kurie yra randami vaisiuose ir sėkluose, hidroksicinamono rūgščių grupė, kuriai priklauso kofeino ir ferulo rūgštys, flavonoidai ir jų glikozidai (katechinai, proantocianidinai, antocianinai ir flavonoliai). Taninai yra didelės molekulinės masės kompleksiški ir menkai ištirti vandenyje tirpūs fenoliai. Kasdien gaunamų fenolinių junginių skaičius gali pasiekti 1g, bet realus į organizmą patenkančių flavonoidų kiekis yra ne didesnis nei kelios dešimtys miligramų per dieną [20].

Fenolinių junginių antioksidacinis potencialas priklauso nuo hidroksilo grupių skaičiaus ir išsidėstymas molekulėje. Fenoliai, turintys pakaitus meta- padėtyje nėra stiprūs antioksidantai. Pakaitai orto- arba para- padėtyje padidina elektronų tankį hidroksilo grupėje ir sumažina deguonies ir vandenilio jungties energiją, o tai padidina reaktyvumą riebalų laisvųjų radikalų atžvilgiu.

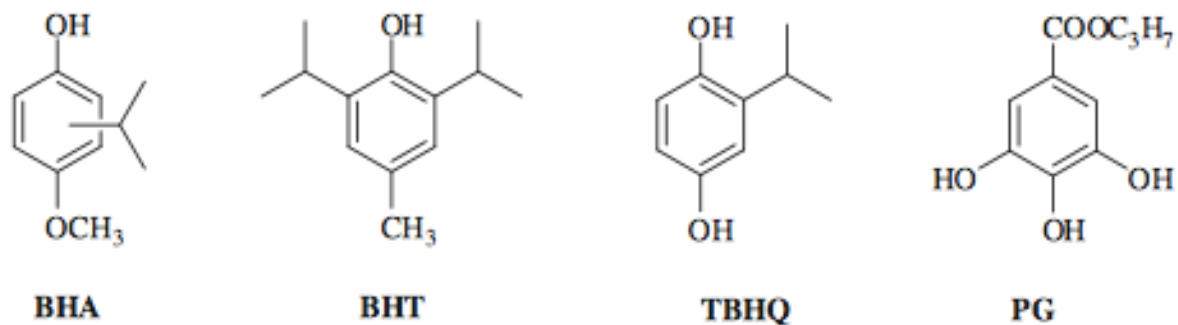
Antioksidantų aktyvumas priklauso nuo grandinės nutraukime dalyvaujančių fenolinių antioksidantų sterinio ir elektroninio poveikio. Norint paaiškinti fenolinių antioksidantų veikimo mechanizmą, buvo taikoma molekulinė orbitalinė teorija [21].

1.2.1 Sintetiniai antioksidantai

Sintetiniai antioksidantai buvo sukurti siekiant turėti standartą, pagal kurį būtų galima vertinti natūralių antioksidantų antioksidacinį aktyvumą. Be to, jie dedami į maistą tam, kad maisto produktai nesioksiduotų apdorojimo metu ir būtų pratęstas maisto galiojimo laikas. Beveik visuose

perdirbtuose maisto produktuose yra sintetinių antioksidantų. Deklaruojama, kad jie yra saugūs, nors kai kurie tyrimai rodo kitaip [7]. Maisto pramonė juos naudoja apie 70 metų [22].

Vieni iš populiariausių naudojamų sintetinių antioksidantų yra fenoliniai junginiai, tokie kaip butilintas hidroksianizolas (BHA), butilintas hidrokstitoluenas (BHT), *tert*-butilhidrokvinonas (TBHQ) ir propilgalatas (PG). Jų struktūros yra pavaizduotos 1 pav.



1 pav. Populiariausi sintetiniai antioksidantai [20]

Šie sintetiniai antioksidantai dažnai naudojami maisto, vaistų, įvairių maisto papildų pramonėje. Sintetinių antioksidantų tirpumas riebaluose ir aliejuose yra pagerinamas jų funkcines grupes pakeičiant alkilais. Nepaisant to, pagal įstatymus BHA ir BHT naudojimas yra ribojamas dėl šių junginių toksinių ir karcinogeninių efektų [23].

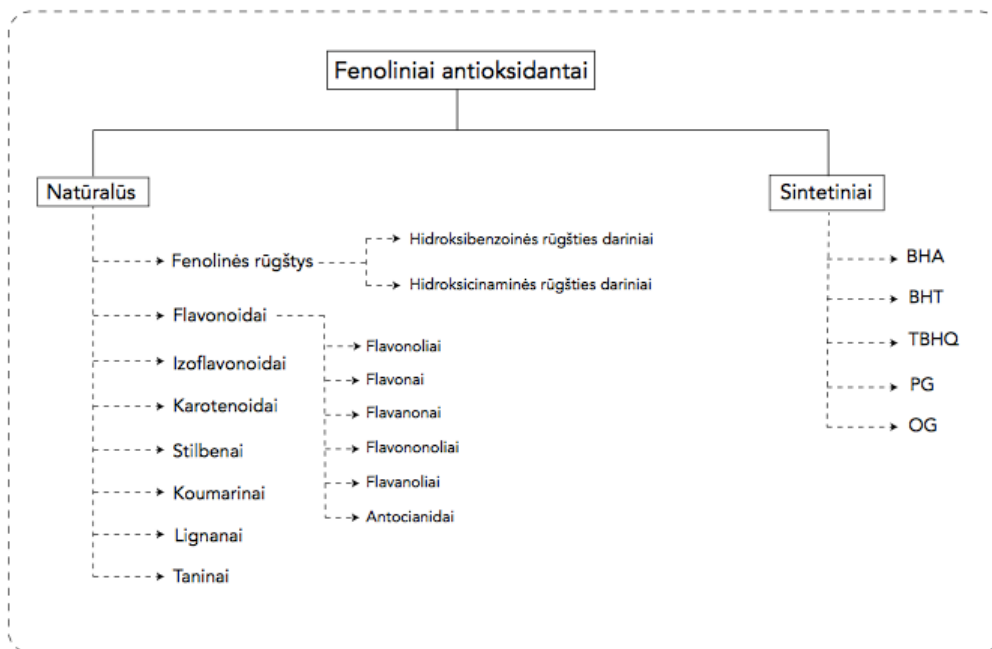
Naudojant sintetinius antioksidantus, jų kiekis maiste (riebaluose ir aliejuose) pagal gerąją gamybos praktiką negali viršyti 0,02%. Tai taikoma keturiems jau anksčiau paminėtiems pagrindiniams sintetiniams antioksidantams. Pats populiariausias antioksidantas, naudojamas augaliniams riebalams, yra TBHQ. BHA ir BHT yra ganėtinai stabilūs aukštoje temperatūroje, todėl dažniausiai naudojami riebalų stabilizavimui kepiniuose. Kai kurie antioksidantai yra kombinuojami tarpusavyje, tokiu būdu išryškinant jų gerąsias savybes. Pavyzdžiui, BHA yra naudojamas kartu su propilgalatu. Sintetiniai antioksidantai yra plačiai ištirti dėl galimų toksikologinių savybių, tačiau dabar ima aiškėti šių junginių toksiškumas, juos naudojant ilgą laiką tarpą [24].

1.2.2 Natūralūs antioksidantai

Dėl sintetinių antioksidantų keliamų pavojų auga susidomėjimas natūraliais antioksidantais ir jų naudojimu maisto pramonėje. Nuo 1980 metų natūralieji antioksidantai pradėti naudoti kaip pakaitalas sintetiniams [25].

Įprastoje žmogui būdingoje dietoje randamas platus spektras antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių, šalinančių ROS iš organizmo. Dažniausi žmogaus dietoje pasitaikantys antioksidantai yra vitaminas C, tokoferoliai, karotenoidai ir flavonoidai. Išskyrus vitaminą C, kiekviena šių antioksidantų grupė susideda iš daugybės struktūriškai skirtingų junginių. Pavyzdžiui, iki šių dienų yra nustatyta apie 600 skirtingų karotenoidų, iš kurių penkiasdešimt gali būti gauti su maistu [16]. Žmogaus dietoje pasireiškia šių junginių sinergetinis efektas. Dažniausiai žmogaus mitybą galima laikyti tam tikru taisyklių rinkiniu, kuriuo remiantis pasireiškia efektai, kurie junginiams gali būti nebūdingi, kai jie veikia po vieną [3].

Natūralieji antioksidantai randami beveik visuose augaluose, mikroorganizmuose, grybuose ir netgi gyvūninėse ląstelėse [20]. Fenoliniai junginiai yra antriniai augalų metabolitai, natūraliai randami beveik visose augalinėse medžiagose, įskaitant augalinės kilmės maisto produktus. Manoma, kad šie junginiai yra neatsiejama žmonių ir gyvūnų mitybos dalis. Dauguma natūralių antioksidantų yra fenoliniai junginiai, o svarbiausios natūralių antioksidantų grupės yra tokoferoliai, flavonoidai ir fenolio rūgštys [23].



2 pav. Fenolių antioksidantų klasifikacija [23]

Flavonoidai yra dažnai sutinkami junginiai augaluose. Šiuo metu yra identifikuota daugiau kaip 8000 polifenolių, iš kurių 4000 yra flavonodai. Jie randami visame augale - lapuose, stiebuose, šaknyse, vaisiuose ir sėklose. Flavonoidai susiformuoja iš aromatinių amino rūgščių fenilalanino ir tirozino, taip pat malonato. Pati paprasčiausia struktūra yra iš 15 anglies atomų sudarytas flavano branduolys, jame anglies atomai sujungti į tris žiedus (C6-C3-C6). Flavonoidai yra plačiausiai paplitę natūraliai augaluose randami fenoliai, atskiriami būtent pagal šiuos tris žiedus [28].

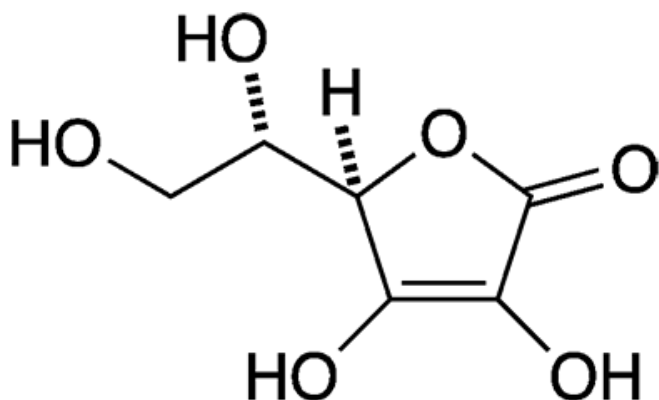
Flavonoidai yra labai stiprūs antioksidantai, todėl manoma, kad jie apsaugo nuo širdies ir kraujagyslių ligų, sumažindami mažo tankio lipoproteinų oksidaciją. Be to, flavonoidai yra vieni iš pagrindinių žmogaus mitybos antioksidantų. Jų paros norma viršija 100 mg [29]. Tačiau flavonoidai paprastai prastai pasisavinami iš maisto. Svarbiausias flavonoidų pranašumas yra apsauga nuo oksidacinių ligų, gebėjimas moduluoti įvairių fermentų aktyvumą ir sąveika su specifiniais receptoriais. Apskritai, veiksmingi flavonoidų antioksidaciniai gebėjimai priklauso nuo kai kurių veiksnių; metalo chelatų sudarymo potencialas, kuris labai priklauso nuo hidroksilų ir karbonilo grupių išsidėstymo aplink molekulę, vandenilio ar elektronų donorų ir flavonoidų gebėjimo delokalizuoti nesuporuotą elektroną, dėl kurio susidaro stabilus fenoksilo radikalas [30].

Dažniausiai sutinkami flavonoidai yra apigeninas, chrizinas, liuteolinas, datiscetinas, kvercetinas, miricetinas, morinas ir kempferolis. Dauguma augaluose esančių flavonoidų egzistuoja glikozidų pavidalu. Flavonoidų gebėjimas slopinti lipidų peroksidaciją yra neblogai ištirtas, tyrimai atlikti tiek natūraliems lipidų produktams, tiek dirbtiniams lipidams [31]. Flavonoidai šalina superoksido anijonų, lipidų peroksilo ir hidroksilo radikalus, taip pat gesina singletinio deguonies ROS, suriša į chelates metalų jonus.

Palyginti neseniai buvo pradėta tirti per vaisius ir daržoves gaunamų fenolinių rūgščių apsauginės funkcijos nuo ligų, kurios išsivysto organizmui patiriant oksidacinio streso poveikį. Pačios pavojingiausios ligos - koronarinė širdies liga, širdies smūgis, vėžys ir gliaukoma. Fenolinės rūgštys sudaro apie 30 procentų visų augaluose randamų fenolinių junginių, jos randamos laisvos ir susijungusios su kitais junginiais. Tokie junginiai yra dažnesni ir aptinkami esterių, glikozidų ir netirpių kompleksų pavidalu [32].

Askorbo rūgštis (vitaminas C) laikomas vienu stipriausių, mažiausiai toksiškų natūraliųjų antioksidantų. Tai vandenyje tirpus vitaminas, didelėmis koncentracijomis randamas maiste ir augaluose. Askorbo rūgštis gali nutraukti grandinines radikalines reakcijas inicijuodama elektronų pernašą. Ši reakcija ypatinga, nes joje pernešamas tik vienas elektronas. Askorbo rūgštis yra efektyvus reduktorius, kuris elgiasi kaip karboksirūgštis. Elektronai dvigubajame karbonilo ryšyje, hidroksilo grupės laisvoji pora ir karbonilo dvigubasis ryšys sukuria konjuguotą sistemą. Dvi

pagrindinės rezonansinės struktūros stabilizuoja deprotonuotą konjuguotą askorbo rūgšties bazę, hidroksilo grupė tampa daug rūgštesnė nei įprastai. Kitais žodžiais tariant, askorbo rūgštis gali būti laikoma enoliu, kurio deprotonizuota forma yra stabilizuotas enolatas [24].



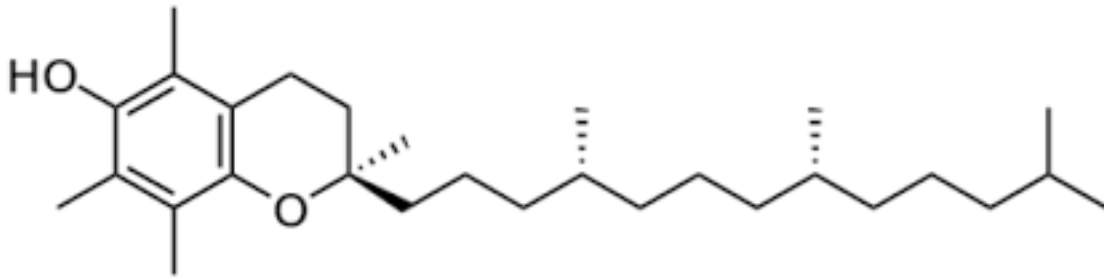
3 pav. Askorbo rūgšties molekulinė formulė [33]

Žmogaus kraujo plazmos sudėtyje randama apie 60 μmol askorbato, kuris reaguodamas su ROS per tarpinę reakciją, kurios metu susidaro askorbilo laisvasis radikalas, oksiduojasi iki dehidroaskorbato. Šis junginys fermentų dėka atsistato į askorbo rūgštį. Būtent dėl fermentų dehidroaskorbatas organizme randamas labai mažais kiekiais lyginant su askorbatu.

Askorbo rūgštis neutralizuoja tokius ROS, kaip superoksido radikalo anijoną, H_2O_2 , hidroksilo radikalą ir singletinį deguonį. Vandeniniuose tirpaluose ji efektyviai neutralizuoja reaktyviuosius azoto oksido junginius. Pagrindiniai askorbo rūgšties šaltiniai maiste yra vaisiai, ypač citrusiniai vaisiai, kiviai, vyšnios, melionai ir daržovės, pavyzdžiui, pomidorai, lapiniai žalumynai, brokoliai, žiediniai kopūstai, Briuselio kopūstai ir kopūstai; kiekis gali viršyti 100 mg askorbato 100 g šviežios masės. 2011 metais Bursal ir Gulcin atliktame tyrime [25] aprašomas eksperimentas, kurio metu iš 1 kg liofilizuotų kivių (*Actinida deliciosa*) ekstrakto gauta 1 g vitamino C. Mažų dozių (100 mg), natūralaus ir sintetinio vitamino C įsisavinimas yra labai panašus. Absorbcijos efektyvumas mažėja didinant dozę. Atliekant *in vitro* eksperimentus gaunama, kad vitaminas C gali regeneruoti tokoferolį iš tokoferoksilo radikalo. Šis radikalas gaunamas riebalų peroksidaciją slopinant vitaminu E [26].

Tokoferoliai yra cheminių junginių klasė, dauguma tos klasės junginių turi daugelį vitamino E savybių. Tai labiausiai ištirti ir plačiausiai naudojami antioksidantai. Jie skirstomi į tokoferolius ir tokotrienolius, ir kiekvienoje iš šių grupių yra po keturis izomerus (α , β , γ and δ). Visi jie turi chromanolio žiedą su hidroksilo grupe, kuri gali atiduoti vandenilio atomą, taip sumažindama

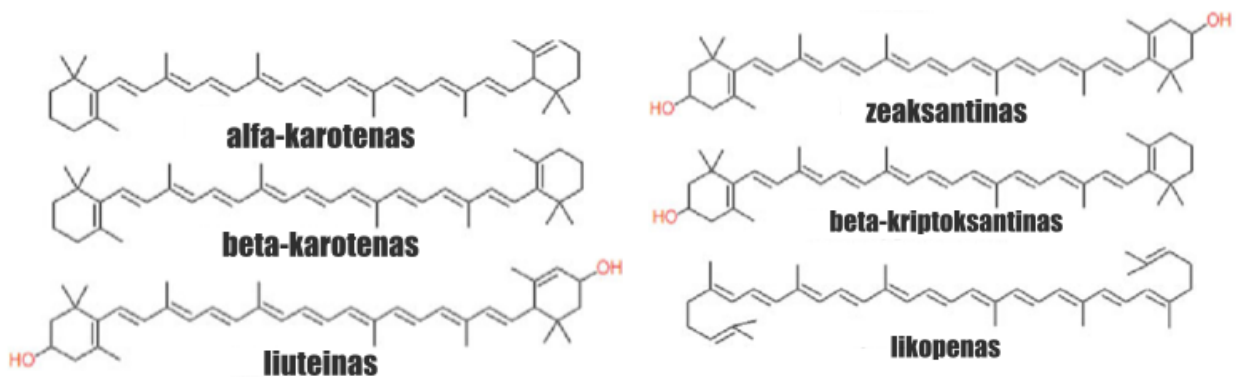
laisvuosius radikalus, ir hidrofobinę grandinės dalį, dėl kurios junginys gali prasiskverbti į biologines membranas [26].



4 pav. Vitamino E molekulinė formulė [58]

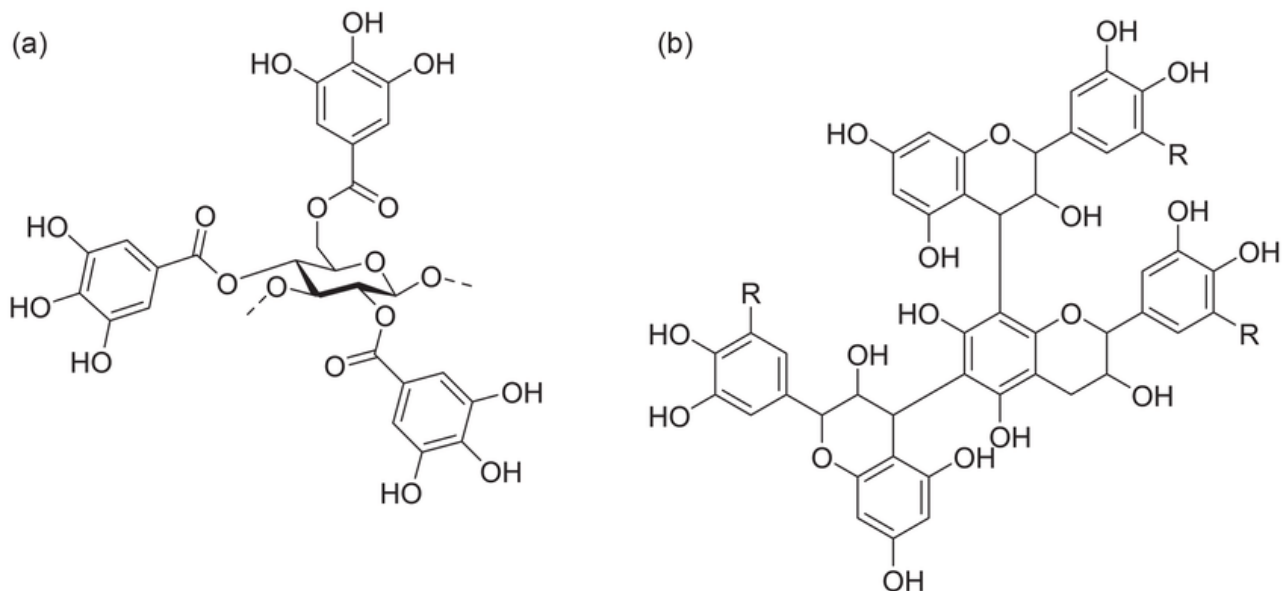
Tokoferolių arba jų pėdsakų randama beveik visose maisto medžiagose. Maisto šaltiniai, kuriuose yra didžiausia vitamino E koncentracija, yra augaliniai aliejai, o po to - riešutai ir sėklos, įskaitant nesmulkintus grūdus. Svarbiausias šios grupės antioksidantas yra α -tokoferolis, kurio antioksidacinis aktyvumas maistiniuose aliejuose yra mažesnis nei kitų tokoferolių. Tai yra lipiduose tirpus antioksidantas, galintis ne tik sumažinti lipidų peroksidaciją, bet ir daryti intraląstelinį poveikį. α -tokoferolis yra lipiduose tirpus vitaminas, esantis išorinėje ląstelių membranoje ir ląstelių organelėse. Jis nutraukia grandinę ir apsaugo membranas nuo tolesnės oksidacijos [27].

Karotenoidai yra grupė natūralių riebaluose tirpių junginių, dažniausiai randamų augaluose. Tai natūralūs pigmentai ir šie junginiai pasižymi antioksidaciniu poveikiu. Jų cheminės savybės yra stipriai susijusios su dvigubais ryšiais ir jų padėtimis junginyje. Karotenoidai yra dažnai sutinkami antioksidantai žmonių dietoje, jie dalyvauja atliekant apsaugines žmogaus organizmo funkcijas [12].



5 pav. Karotenoidai [65]

Taninai yra kompleksiški ir menkai ištirtų vandenyje tirpių fenolių grupė, kuri pasižymi didelės molekulinės masės junginiais. Iš prancūzų kalbos išvertus *tanin* reiškia “dažantis”. Šie junginiai pasižymi intensyvia tamsia spalva, yra naudojami kailiadirbystėje, audinių dažymui, taip pat kaip vaistas ar priešnuodis, maisto pramonėje [68].



6 pav. (a) hidrolizuotas taninas, (b) kondensuotas taninas [34]

1.3 Antioksidacinių savybių tyrimo metodai

Paskutiniaisiais dešimtmečiais stebimas augantis susidomėjimas maisto medžiagų antioksidacinėmis savybėmis, dėl ankstesniuose skyriuose aprašytų daugybės antioksidacinių savybių teikiamų naudų. Todėl būtini greiti ir patikimi antioksidacinių savybių įvertinimo metodai.

Standartizuotas antioksidacinio aktyvumo tyrimo metodas turėtų atitikti šiuos reikalavimus [35]:

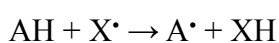
1. matuoti tikrąjį aktyvumą, o ne teorinį potencialiuose maisto šaltiniuose;
2. naudoti biologiškai aktualų radikalų šaltinį;
3. paprastas naudoti;
4. turi būti aiškus cheminės reakcijos mechanizmas;
5. turi gerai atsikartoti;
6. pritaikomas tiek hidrofiliniams, tiek lipofiliniams antioksidantams tirti;

Idealus metodas turėtų nustatyti maiste randamų junginių antioksidacines savybes tokiose sąlygose, kuriose ROS ir RNS sukelia oksidacinį stresą. Tokia siekiamybė sukelia nemažai problemų, nes dažniausiai skirtingoms ROS ir RNS yra naudojami skirtingi tyrimo būdai [36].

Antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodai remiasi dviem mechanizmais - vandenilio atomo perdavimu (HAT, angl. *hydrogen atom transfer*) ir vieno elektrono perdavimu (SET, angl. *single electron transfer*).

Metodai, kurie remiasi vieno elektrono perdavimu, nustato antioksidanto gebėjimą perduoti vieną elektroną, tokiu būdu gali būti redukuojami metalai, karbonilai ir radikalai. Elektrono perdavimas matomas stebint spalvos pokytį, kai oksidantas yra redukuojamas [37].

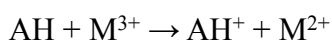
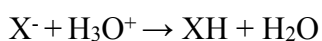
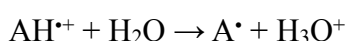
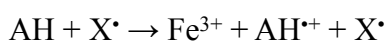
Metodai, kurie remiasi vandenilio atomo perdavimu, matuoja antioksidanto gebėjimą, perduodant vandenilį, redukuoti laisvuosius radikalus. Šios reakcijos nepriklauso nuo naudojamo tirpiklio ir pH, yra greitos (trukmė - nuo kelių sekundžių iki kelių minučių). Redukuojančių agentų (įskaitant ir metalus) buvimas komplikuoja reakcijos eigą, gali būti stebimi padidinti rezultatai [35].



Šių metodų jautrumas priklauso vandenilį atiduodančios grupės antioksidante ryšio disociacijos energijos. Metodai tinkami junginiams su ryšio disociacijos energija apie -10 kcal/mol ir jonizacijos potencialu mažesniu už -36 kcal/mol. Kaip jau buvo paminėta anksčiau, naudojant šiuos metodus reikia vengti redukuojančių junginių, nes esant jiems, fiksuojamas padidintas antioksidacinis aktyvumas.

Šiai kategorijai priskiriami metodai yra: deguonies radikalo absorbcijos pajėgumas (ORAC); bendras radikalų surišimo antioksidacinis parametras (TRAP); mažo tankio lipoproteinų oksidacijos slopinimas; bendro oksiradikalų pašalinimo pajėgumo tyrimas (TOSCA); krokino išblukimo tyrimas; chemiluminescencinis tyrimas [36].

SET metuose perduodant elektroną redukuojami metalų jonai, karbonilo grupės ir radikalai.



SET reakcijos yra stipriai priklausomos nuo pH. Šios reakcijos dažniausiai lėtos, todėl antioksidacinė talpa vertinama pagal santykinę reakcijos produkto pokytį, dažniausiai nelaukiant, kad reakcija įvyktų iki galo [38]. SET metodai yra labai jautrūs askorbo ir šlapimo rūgštims, kurios yra svarbios palaikant kraujo plazmos redokso pusiausvyrą. Šiais metodais taip pat įvertinamas polifenolių antioksidacinis aktyvumas. Komponentų pėdsakai ir teršalai (pavyzdžiui, metalai)

stipriai veikia SET reakcijas ir gali nulemti didelę variaciją tarp rezultatų ir prastą jų atsikratojamumą [39].

SET reakcijoms priskiriami metodai yra: bendro fenolių kiekio tyrimas naudojant Folin-Ciocalteu reagentą; trolokso ekvivalento antioksidacinio pajėgumo (TEAC) tyrimas; geležies jonų gebėjimo redukuoti antioksidantą (FRAP) įvertinimas; bendro antioksidacinio potencialo įvertinimas, naudojant vario (II) kompleksą kaip oksidatorių; 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilo radikalo (DPPH[•]) surišimo įvertinimas; 2,2-Azinobis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninės rūgšties radikalo (ABTS^{•+}) surišimo įvertinimas; N,N-dimetil-p-fenilenediamino radikalo (DMPD^{•+}) surišimo įvertinimas; vario jonų (Cu²⁺) gebėjimo redukuoti antioksidantą (CU-PRAC) įvertinimas.

Yra ir aukščiau minėtoms grupėms nepriskiriamų metodų, kurie leidžia įvertinti sąveikaujančių su makromolekulėmis oksidantų surišimą. Šie tyrimo metodai yra tokie: superoksido anijono radikalo (O²⁻) surišimo įvertinimas; vandenilio peroksido (H₂O₂) surišimo įvertinimas; hidroksilo radikalo (HO[•]) surišimo įvertinimas; singletinio deguonies (¹O₂) gesinimo įvertinimas; peroksinitril radikalo (ONOO[•]) surišimo įvertinimas [40].

Kaip matyti, egzistuoja daugybė antioksidacinių savybių nustatymo metodų ir jų modifikacijų. Kai kurie iš jų specifiniai atskiriems oksidatoriams, pvz., superoksido anijono radikalui, hidroksilo radikalui, peroksinitrilui. Dalis metodų yra labai panašūs, yra to paties metodo modifikacijos. Pvz., į plačiai naudojamą ABTS^{•+} surišimo įvertinimo metodą labai panašus DMPD^{•+} surišimo įvertinimo metodas, tik 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninės rūgšties radikalas pakeistas N,N-dimetil-p-fenilenediamino radikalui. Teigiama, kad naujai pasiūlytas DMPD^{•+} surišimo įvertinimo metodas yra paprastesnis ir pigesnis [41].

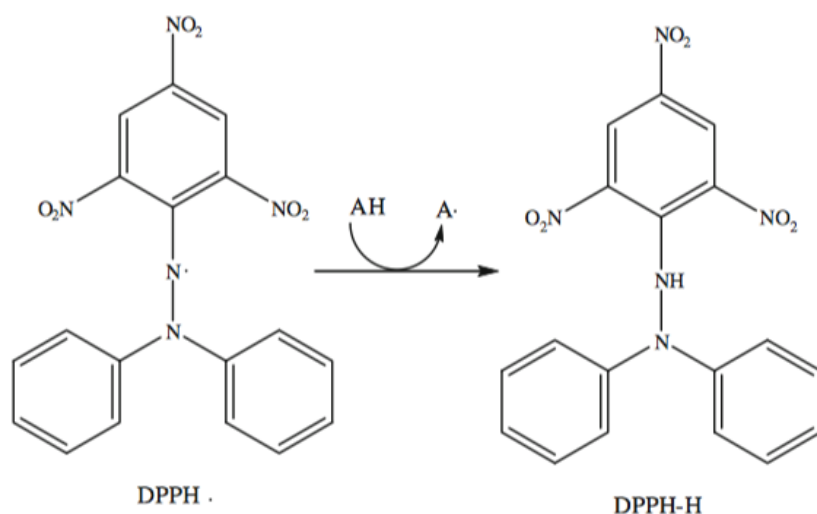
Literatūros apžvalga parodė, kad antioksidacinio aktyvumo nustatymui *in vitro* plačiausiai naudojamas DPPH metodas [42]. Be to literatūroje teigiama, kad mūsų tiriamo gauromečio antioksidacinės savybės žymia dalimi priklauso nuo jame esančių polifenolinių rūgščių ir flavonoidų [43]. Todėl toliau bus detaliai aprašyti DPPH metodas ir bendro fenolių kiekio tyrimas naudojant Folin-Ciocalteu reagentą.

DPPH[•] metodas

Tai seniausias netiesioginis metodas antioksidantų aktyvumui nustatyti, pradėtas taikyti maždaug 1950 metais, pirmiausia naudotas nustatyti vandenilio donorus natūraliose medžiagose. Vėliau šis metodas išvystytas ir pritaikytas tiek maisto, tiek augalų antioksidacinių savybių tyrimui [44]. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas yra vienas iš nedaugelio stabilių organinių azoto

radikalų, jam būdinga sodri violetinė spalva. DPPH' tyrimo metu antioksidantai redukuoja stabilų DPPH radikalą į difenil-pikrilhidraziną, junginį, kuriam būdinga geltona spalva. Šis metodas remiasi DPPH redukcija alkoholio tirpale, jame esant vandenilį atiduodančiam antioksidantui. Vandenilis atsiskiria nuo antioksidanto vykstant reakcijai ir formuojantis neradikalinei DPPH-H formai. Tyrimo metu įvertinamas antioksidanto gebėjimas redukuoti DPPH' radikalą matuojant DPPH absorbcijos sumažėjimą esant 517 nm bangos ilgiui. Pirmiausiai matuojama DPPH tirpalo absorbcija, po to absorbcija DPPH tirpalo su antioksidantu.

7 pav. pavaizduotas DPPH radikalo reakcijos su antioksidantu mechanizmas. Violetinės spalvos radikalas (DPPH') yra redukuojamas antioksidantu (AH) ir susidaro blyškios gelsvos spalvos hidrazinas (DPPH-H). Šis metodas yra paprastas, greitas ir labai populiarus, jam atlikti reikalingas tik UV-VIS spektrometras [45].



7 pav. DPPH radikalo reakcijos su antioksidantu mechanizmas [46]

DPPH radikalo reakcija su antioksidantu dažniausiai atliekama organiniame tirpiklyje (dažniausiai etanolyje arba metanolyje), stebint absorbcijos sumažėjimą 515-528 nm bangos ilgyje [47]. Metanolis naudojamas rečiau dėl savo toksiškumo. Kadangi alkoholio terpėje baltymai koaguliuoja, šis metodas netinka plazmos antioksidacinėms savybėms vertinti.

2007 metais buvo atliktas tyrimas [48], kuriame buvo tiriama, kokios yra tinkamos sąlygos ir galimybės naudoti vandenį kaip tirpiklį reakcijos mišinyje kartu su etanoliu. Nustatyta, jog vandens ir etanolio mišinį (santykiu 50:50) galima naudoti lipofiliniams ir hidrofiliniams antioksidantams. Taip pat nustatyta, jog reakcijos tarp DPPH' ir radikalus surišančių junginių greitis gali stipriai

padidėti didinat vandens kiekį tirpiklyje. Tačiau, pasiekus vandens santykį su etanoliu 60:40, stebimas radikalinės reakcijos sumažėjimas, nes koaguliuoja DPPH' dalis.

Pagrindinis reakciją nulemiantis veiksnys yra sterinis DPPH' radikalo prieinamumas. Mažos molekulės, kurios turi geresnį prieinamumą prie radikalo aktyviojo centro, pasižymi didesniu antioksidaciniu pajėgumu, t.y. tokios molekulės geba geriau neutralizuoti laisvuosius radikalus. Kita vertus, nemažai didelių antioksidantų molekulių, kurios greitai reaguoja su laisvaisiais radikalais, su šio DPPH' radikalu gali reaguoti labai lėtai, arba visai nereaguoti. DPPH' radikalų surišimo reakcija gana lėta, absorbcija matuojama po 20 min – 6 val. [49].

Metodą sunkiau taikyti, kai mėginyje yra karotenoidų, kadangi karotenoidai absorbuojantys tokio pat ilgio elektromagnetines bangas arba kai mėginys drumstas. Tuo atveju vietoje spektrofotometrinio detektavimo galima naudoti elektrocheminį detektavimą [50].

Nepaisant išvardintų trūkumų ir atsižvelgiant į stabilumą, komercinį prieinamumą, metodas yra vienas iš plačiausiai naudojamų grynų junginių, maisto, augalų ekstraktų antioksidacėms savybėms tirti [51].

Bendro fenolių kiekio tyrimas naudojant Folin-Ciocalteu reagentą

Gamtoje randama apie 8000 skirtingų rūšių fenolių ir jų struktūra susideda iš aromatinio hidroksilo branduolio. Augalinės kilmės fenoliai yra pagrindinė pirminių antioksidantų grupė, kuri neutralizuoja laisvuosius radikalus. Augalinės kilmės polifenoliai yra daugiaviečiai, jie gali veikti kaip reduktoriai, vandenilio atomo donorai ir pavieniai deguonies donorai. Tam tikri polifenoliai taip pat yra veiksmingi kaip antioksidantai, galintys sudaryti chelatinus pereinamųjų metalų jonus, kurie kitu atveju gali sukelti Fentono tipo oksidacijos reakcijas laisvosiose būsenose [23].

Folin-Ciocalteu metodas buvo sukurtas tirti baltymus, kurie savo sudėtyje turi tiroziną. Ši aminorūgštis turi fenolio grupę, kurią detektuoja šis reagentas. Vėliau reagentas naudotas bendro fenolių kiekio tyrimui vyne, o galiausiai imtas naudoti tiriant augaluose randamus fenolius [52]. Bendras fenolių kiekis maiste matuojamas fiksuojant elektronų iš fenolinių junginių pernašą į Folin-Ciocalteu reagentą šarminėje terpėje. Folin-Ciocalteu reagentas (trumpinys FCR, literatūroje kartais vadinamas Folin-Denis reagentu) yra fosfomolibdato ir fosfotungstato antioksidantų mišinys. Tyrimo metu matuojamas testuojamos medžiagos kiekis, reikalingas sukelti reagento oksidaciją. Tikslus veikimo principas nėra žinomas, tačiau manoma, kad reakcija vyksta dėl fosfomolibdato ir

fosfotungstato rūgščių kompleksų, kurie yra redukuojami iki mėlynos spalvos chromoforo, kurio absorbcijos maksimumas yra 765 nm [53].

Folin-Ciocalteu reagentas gaminamas ištirpinant 0,1 g natrio tungstato su 25 g natrio molibdato 700 ml distiliuoto vandens, tuomet mišinį rūgštinant koncentruota druskos rūgštimi (50 ml) ir 50 ml 85% ortofosforo rūgštimi (H₃PO₄). Šis mišinys verdamas 10 valandų, tuomet pridedama 150 g ličio sulfato, dėl kurio mišinys įgauna ryškia geltoną spalvą [23].

Tyrimo metu tungstato ir molibdato mišinys yra stipriai baziniame tirpale (5-10% vandeniniame natrio karbonate). Baziniame tirpale fenoliai stipriai oksiduojasi, susiformuoja O²⁻ radikalas, kuris vėliau reaguoja su molibdatu ir susidaro molibdato oksidas. Šis junginys ypač stipriai absorbuojamas ties 750 nm bangos ilgiu. Centrinis Mo jonas, esantis komplekse, dalyvauja redukcijos procese, kurio metu Mo⁶⁺ jonas yra redukuojamas iki Mo⁵⁺ jono prisijungiant elektroną, atsiradusį iš fenolinio antioksidanto. Žemiau pateikiama proceso metu vykstanti reakcija [54]:

$$\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{fenolis} \rightarrow (\text{fenolis} - \text{MoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}, \text{Mo}^{5+} (\text{geltonas}) + e^- \rightarrow \text{Mo}^{4+} (\text{mėlynas})$$

Tyrimuose galo rūgštis yra naudojama kaip standartas, o rezultatai pateikiami kaip galo rūgšties ekvivalentas [55]. Svarbu pabrėžti, kad tyrimo metu atsirandantys mėlyni kompleksai nepriklauso nuo fenolių struktūros.

2. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Reagentai ir tirpalai

Naudoti šie reagentai: 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilinė rūgštis (Trolox), pirktas iš VectaCell™; 3,4,5-Trihidroksibenzoinė rūgštis (galo rūgštis), pirktas iš Sigma-Aldrich; etanolis, pirktas iš Merck; 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH'), pirktas iš Sigma-Aldrich.

Gauromečio žiedai, lapai ir stiebai surinkti 2022 metais Varėnos rajone, iš jų buvo gaminta fermentuota ir nefermentuota arbata. Arbata "Jadvygos žolės" pirktas vaistinėje, gamintojas vaistininkės-žolininkės J. Balvočiūtės ūkis. Arbata "Dr. P. Karvelis" pirktas vaistinėje, gamintojas A. Karvelio terapijos-fitoterapijos įmonė. Arbatos "IvanTea" granulėmis ir lapeliais pirktos vaistinėje, gamintojas Estvita (Estija). Arbata "Širdažolė", gauromečio lapai, pirktas vaistinėje, gamintojas "Širdažolė".

2.2. Aparatūra

Medžiagos buvo sveriamos analizinėmis svarstyklėmis „KERN & Sohn GmbH“.

Dujų chromatografinė-masių spektrometrinė analizė buvo atliekama naudojant dujų chromatografą Clarus 580 (PerkinElmer, JAV) su masių spektrometriniu detektoriumi Clarus 560S (PerkinElmer, JAV). Naudojama kolonėlė Elite – 5MS, kurios ilgis 30 metrų, vidinis skersmuo 0,25 mm, o nejudrios fazės sluoksnio storis 0,25 μm (PerkinElmer, JAV). Kolonėlė padengta metilpolisiloksanu (5 % fenilo grupių).

Kietafazės mikroekstrakcijos (KFME) įranga: rankinis laikiklis 57330-U (Supelco), strypelis 57334-U, dangas karboksenas-polidimetilsiloksanas, dangos storis 85 μm (Supelco).

2.3. Mėginio paruošimas DPPH' analizei

Buvo atlikta spektrofotomerinė analizė, kurios metu naudojamas DPPH reagentas. $6,5 \times 10^{-5}$ M pradinio DPPH radikalo tirpalo buvo gaminamas išsirtinant 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilą metanolyje. 0,2 ml mėginio dedama į 3,8 ml metanolinį DPPH tirpalą. Spektrofotometrinė analizė buvo atliekama po 30 min inkubacinio laikotarpio, tamsoje ir kambario temperatūroje. Buvo nustatytas 517 nm reikšmės bangos ilgis, naudota 10 mm kvarcinė kiuvetė. DPPH absorbcijos

sumažėjimas matuotas ties 517 nm bangos ilgiu. DPPH radikalo išvalymo greitis buvo apskaičiuotas pagal formulę $(Ac - As) \times 100/A$, kurioje Ac yra kontrolinės grupės absorbcija (DPPH tirpalo absorbcija, kai vietoj mėginio įpilamas distiliuotas vanduo), o As yra mėginio absorbcija. Rezultatai buvo pateikti Trolox lygiaverte antioksidantų geba [56].

2.4. Mėginio paruošimas bendrajam fenolinių junginių kiekio nustatymui

Bendrasis fenolinių junginių kiekis (TPC, angl. *total phenolic content*) buvo nustatomas su Folin-Ciocalteu reagentu naudojant etaloninį galo rūgšties tirpalą. Folin-Ciocalteu reagentas buvo skiedžiamas distiliuotu vandeniu (1:10) ir 5 ml įpilama į 1 ml tiriamo mėginio. Vėliau buvo įpilama 4 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo ir po 30 min. spektrofotometru matuojamas tirpalo optinis tankis esant 765 nm bangos ilgiui. Bendras fenolinių junginių kiekis apskaičiuotas išreiškiant galo rūgšties ekvivalentu [57].

2.5. Kietafazės mikroekstrakcijos ir dujų chromatografinės-masių spektrometrinės analizės sąlygos

10 ml tiriamo mėginio imama į 20 ml tūrio indelį, užsandarinama tarpine, indelis dedamas į termostatą. KTME adata praduriama tarpinė, į dujinę fazę virš mėginio išstumiamas KFME strypelis ir 30 min atliekama ekstrakcija. Tada strypelis įtraukiamas į adatą, adata ištraukiama iš indelio ir perkeliama į dujų chromatografo garintuvą. Strypelis išstumiamas ir atliekama terminė desorbcija 250 oC temperatūroje 1 min.

Chromatografinės sąlygos: nešančių dujų (helio) greitis 1,92 ml/min, garintuvo temperatūra 250 oC, kolonėlės temperatūrinis režimas: nuo 45 oC iki 250 oC keliama 5 oC/min greičiu ir laikoma 5 min. Dujų chromatografas sujungtas su masių spektrometru PerkinElmer Clarus 560S. Jungties temperatūra 280 oC. Jonizacijos šaltinio energija 70 eV, temperatūra 180 oC. Analizė atlikta pilno skenavimo režime (m/z 45 – 600). Medžiagos identifikuotos lyginant jų masių spektrus su NIST (NIST angl. National Institute of Standards and Technology) bibliotekos masių spektrais.

2.6. Skysčių chromatografinės analizės sąlygos

Chromatografas: Agilent 1290 Infinity II LC.

Kolonėlė: Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 150 mm, 2.7 μm, Agilent).

Judri fazė: A - 0,1% HCOOH vandenyje; B - 0,1% HCOOH acetonitrile, 0,5 ml/min; linijinis gradientas nuo 10 iki 50% B per 10 min. Detektavimas: DAD 200-600 nm. Chromatogramos pateiktos prie 250 nm.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Tyrimams atlikti naudotų gauromečio žaliavų nuotraukos su pavadinimais pateikiamos žemiau.



8 pav. Iš kairės į dešinę - 2022 metais Varėnos rajone rinkto gauromečio stiebai (S), lapai (L), žiedai (Ž)



9 pav. Iš kairės į dešinę: pirma eilutė - 2022 metais rinktas gaurometis, nefermentuotas (1); 2022 metais rinktas gaurometis, fermentuotas (2); “Jadvygos žolės” gauromečio arbata (3). Antra eilutė - “Dr. P. Karvelio” gauromečio arbata (4); “Širdažolės” gauromečio arbata (5); “IvanTea” gauromečio arbata lapeliais (6). Trečia eilutė - “IvanTea” gauromečio granuliuota arbata (7)

3.1. Gauromečio arbatų antioksidacinių savybių tyrimas DPPH metodu

Populiarioje literatūroje galima rasti įvairiausių patarimų kaip ruošti gauromečio arbatas.

Siūloma gaurometį užpilti užvirintu vandeniu, atšaldytu iki 85-90 laipsnių [58]. Remiantis kitu šaltiniu siūloma lapelius užpilti stikline (200 ml.) karšto vandens ir uždengus palaikyti 10 – 20 min. [59]. Dauguma gamintojų rekomenduoja arbatą gaminti naudojant ne verdantį, tačiau užvirintą ir iki maždaug 85°C atvėsusį karštą vandenį [60].

Remiantis Eugenijos Šimkūnaitės labdaros ir paramos fondo pateikta informacija, siauralapio gauromečio arbatas siūloma užpilti stikline verdančio vandens. Šis metodas rekomenduojamas sergant skrandžio opalige. Skundžiantis skausmais, rekomenduojama saują šviežių švariai nuplautų lapų užpilti stikline verdančio vandens ir tuoj pat nusunkti, o gautą košelę uždėti ant skaudamos vietos [61].

M. Lasinskas teigia, kad arbatoms paprastai naudojamas karštas, bet ne verdantis vanduo. O siauralapiam gauromečiui tiks ir 40 laipsnių temperatūros vanduo, nes tokiame išsiskirs daugiau gleivinių medžiagų [62].

Kadangi literatūroje randama įvairių gairių, kaip paruošti gauromečio arbatą, buvo nuspręsta iširti, kokių būdu paruošta gauromečio arbata pasižymi stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis. Tam buvo atsverta po 0,5 g gauromečio arbatos (rinkta 2022 m. Varėnos rajone) užpilta:

1. 50 ml 80°C temperatūros distiliuotu vandeniu;
2. 50 ml 90°C temperatūros distiliuotu vandeniu;
3. 50 ml 100°C temperatūros distiliuotu vandeniu;
4. 50 ml 100°C temperatūros distiliuotu vandeniu ir pavirinta 5 min.

Po to arbatoms leista pastovėti 20 min ir nufiltruota. Atliktas arbatų antioksidacinio aktyvumo tyrimas DPPH metodu. Neskiestos arbatos visiškai išblukino DPPH tirpalą. Arbatą praskiedus 20 kartų, anti oksidacinis aktyvumas, išreikštas DPPH inaktyvinimo procentais pateiktas 1 lentelėje.

1 lentelė. 20 kartų skiestos gauromečio arbatos antioksidacinis aktyvumas

Užplikymo sąlygos	DPPH inhibicija, %
80°C	25
90°C	30
100°C	36
100°C 5 min.	43

Tyrimo rezultatai parodė, kad didžiausias DPPH inaktyvavimas pasiekiamas gauromečio arbatą pavirinus 5 min. Užplikius gaurometį verdančiu vandeniu, arbatos antioksidacinis aktyvumas šiek tiek mažesnis. Jis dar labiau sumažėja, kai gaurometis plikomas 80°C ir 90°C temperatūros vandeniu.

Kadangi dažniausiai rekomenduojama gauromečio arbatos nevirinti, bet užplikinti verdančiu vandeniu, buvo nuspręsta detaliau ištirti du geriausių antioksidacinį aktyvumą parodžiusius arbatos užplikimo būdus. Arbatoms gaminti buvo naudotos 7 gauromečio žaliavos – Varėnos raj. 2022 metais surinkti gauromečio lapai (1), Varėnos raj. 2022 metais surinkti ir fermentuoti gauromečio lapai (2), vaistinėje pirкта “Jadvygos žolės” gauromečio arbata (3), vaistinėje pirкта “Dr. P. Karvelio” gauromečio arbata (4), vaistinėje pirкта “Širdažolė” gauromečio arbata (5), vaistinėje pirкта fermentuota “IvanTea” gauromečio arbata granulėmis (6) ir vaistinėje pirкта fermentuota “IvanTea” gauromečio arbata (7). Kiekviena arbata buvo ruošta po 3 kartus. Paruoštos arbatos buvo skiestos 25 kartus.

2 lentelė. 25 kartų skiestų gauromečio arbatų antioksidacinis aktyvumas (n=3)

Nr.	DPPH inhibicija, %		Inhibicijos skirtumas, %
	100°C	100°C 5 min.	
1	33,2 ± 1,6	40,5 ± 0,8	22
2	24,4 ± 0,4	30,0 ± 1,3	23
3	26,7 ± 0,5	32,5 ± 0,2	22
4	39,7 ± 5,3	35,3 ± 2,8	-11
5	22,4 ± 0,6	27,8 ± 0,4	24
6	19,0 ± 0,6	23,6 ± 0,4	24
7	21,4 ± 0,7	26,3 ± 1,3	23

Kaip matyti iš rezultatų, geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis užpylus gaurometį 100°C temperatūros vandeniui, pasižymėjo Dr. P. Karvelio žaliava, o pavirinus arbatą 5 min. – Varėnos raj rinkta žaliava. 5 minutes virtų arbatų antioksidacinis aktyvumas 22-24 % didesnis. Vienintelė išimtis – Dr. P. Karvelio gaurometis (Nr. 4). Šios arbatos inhibicija pavirus 5 min sumažėjo 11 %. Įdomu pasirodė ir tai, kad Dr. P. Karvelio gauromečio žolė vizualiai labai skyrėsi nuo kitų. Kaip matyti iš 9 pav. pateiktų nuotraukų, Dr. P. Karvelio gauromečio arbatą sudaro daugiausiai stiebai, o kitose vaistažolėse dominuoja lapai. Dėl to buvo iškelta hipotezė, kad gauromečio stiebų antioksidacinės savybės stipresnės. Norint tuo įsitikinti, buvo tirti 2022 metais Varėnos rajone surinkto gauromečio stiebai (S), lapai (L) ir žiedai (Ž).

Arbatos buvo ruošiamos užpylus atitinkamą žaliavą 100°C temperatūros vandeniui, palaikius 20 min. ir nufiltravus. Rezultatai parodė, kad geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymi gauromečio žiedai, o stiebų antioksidacinis aktyvumas mažiausias. Taigi gauti rezultatai nepaaiškino išskirtinių Dr. P. Karvelio žaliavos savybių.

3 lentelė. 25 kartų skiestų gauromečio stiebų, lapų ir žiedų arbatų antioksidacinis aktyvumas (n=3)

Arbata	DPPH inhibicija, %
Stiebai	11,3 ± 0,7
Lapai	39,8 ± 1,5
Žiedai	65,4 ± 3,0

Dažnai antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas inhibitoriaus koncentracija IC₅₀. IC₅₀ yra antioksidanto kiekis, sumažinantis pradinę DPPH koncentraciją 50 %. IC₅₀ buvo apskaičiuotas išreiškiant Trolox ekvivalentu gramui sausos medžiagos (mg).

Pagal rezultatus, pateiktus 2 lentelėje, matyti, kad geriausia DPPH radikalo inhibicija stebima pavirinant gauromečio arbatą 5 min. Tik “Dr. P. Karvelio” arbatos inhibicija buvo prastesnė pavirinus. Taip pat gauta, kad būtent “Dr. P. Karvelio” arbata pasižymi stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis. Taip pat įdomu tai, kad fermentuota arbata pasižymi ryškesnėmis skoninėmis savybėmis, tačiau prastesnėmis antioksidacinėmis savybėmis. Iš vaistinėje gautų arbatų matyti, kad geriausiomis savybėmis pasižymi “Dr. P. Karvelio” arbata, o prasčiausiomis - “IvanTea” granuluota arbata.

Atlikus Varėnos rajone rinktų gauromečio stiebų, lapų ir žiedų analizę gauta, kad geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymi žiedai, o prasčiausiomis - stiebai.

4 lentelė. Gauromečio IC₅₀ apskaičiuotas išreiškiant Trolox ekvivalentu gramui sausos medžiagos

Nr.	IC ₅₀ mg/g	
	100°C	100°C 5 min.
1	0,88	1,07
2	0,65	0,80
3	0,71	0,87
4	1,05	0,94
5	0,6	0,74
6	0,52	0,64
7	0,63	0,78

Arbatų ruošimui naudojami augalai gali būti fermentuojami. Fermentacija siekiama pakeisti įvairias organoleptines ir fizikines bei chemines augalinių medžiagų savybes, įskaitant spalvą, kvapą, skonį, ekstrakcines savybes [63]. Geriausiai žinomas iš fermentuotų augalo lapų gaminamas gėrimas yra juodoji arbata. Gaurometis arbatoms gali būti naudojamas tiek fermentuotas, tiek nefermentuotas. Fermentuoto gauromečio arbatos skonis panašus juodosios arbatos, gėrimas turi intensyvią tamsią pigmentaciją. Teigiama, kad fermentuoto gauromečio arbata skanesnė, aromatingesnė, lyginant su nefermentuoto.

Mūsų tyrimams buvo naudotos keturios nefermentuotos (1, 3, 4 ir 5) ir trys fermentuotos (2, 6 ir 7) gauromečio arbatos. Silpniausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo "IvanTea" fermentuotas granuliuotas gaurometis (6) bei "IvanTea" fermentuoti gauromečio lapai (7). Palyginus Varėnos rajone 2022 metais surinktą fermentuotą (2) ir nefermentuotą (1) gaurometį matyti, kad nefermentuoto gauromečio antioksidacinės savybės stipresnės. Tai leidžia daryti prielaidą, kad dalies antioksidacinių savybių netenkama fermentacijos proceso metu. Be to tikėtina, kad pramoniniu būdu fermentuojant gaurometį naudojama padidinta temperatūra (to nebuvo daroma fermentuojant namų sąlygomis), dėl to dalis antioksidantų suyra.

3.2. Bendras polifenolinių junginių kiekis

Literatūroje teigiama, kad gauromečio antioksidacinėms savybėms lemiamos įtakos turi polifenoliniai junginiai. Folin-Ciocalteu metodu arbatose nustatėme bendrą polifenolių kiekį.

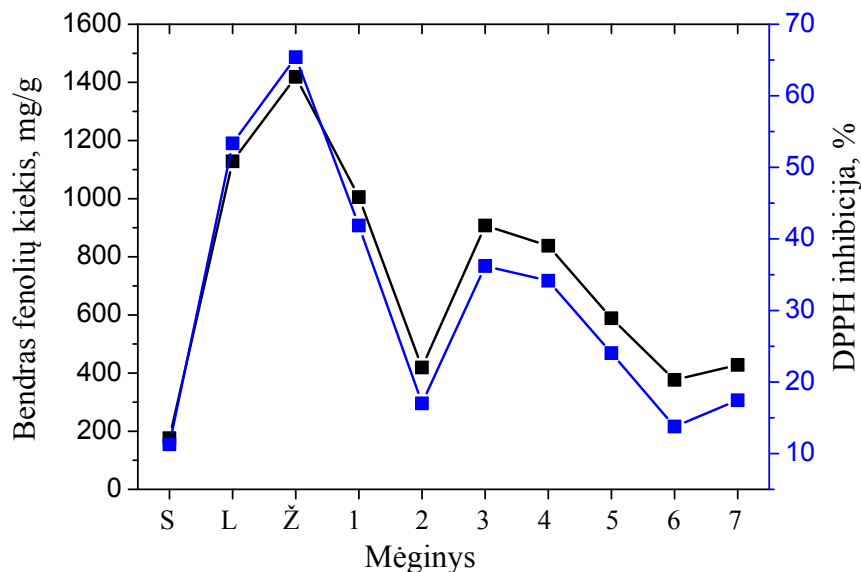
Bendras polifenolinių junginių kiekis apskaičiuotas išreiškiant galo rūgšties ekvivalento miligramais.

5 lentelė. Bendras polifenolinių junginių kiekis apskaičiuotas išreiškiant galo rūgšties ekvivalentais

Nr.	Bendras polifenolių kiekis, mg/g
S	17,6
L	112,9
Ž	141,9
1	110,5
2	41,9
3	90,7
4	83,8
5	58,9
6	37,7
7	42,8

Nustatytas bendras polifenolinių junginių kiekis parodė, kad daugiausia polifenolių yra žieduose ir lapuose, o iš vaistinėje pirkų - "Jadvygos žolės" ir "Dr. P. Karvelio" arbatose. Mažiausias polifenolių kiekis rastas stiebuose ir "IvanTea" granuluotoje arbatoje.

Palyginus bendrą polifenolinių junginių kiekį su tose pačiose arbatose nustatytu antioksidaciniu aktyvumu, matyti aiški antioksidacinio aktyvumo ir polifenolių kiekio koreliacija (10 pav.). Tai leidžia daryti prielaidą, kad antioksidacines gauromečio savybes didžiąja dalimi lemia fenoliniai junginiai.



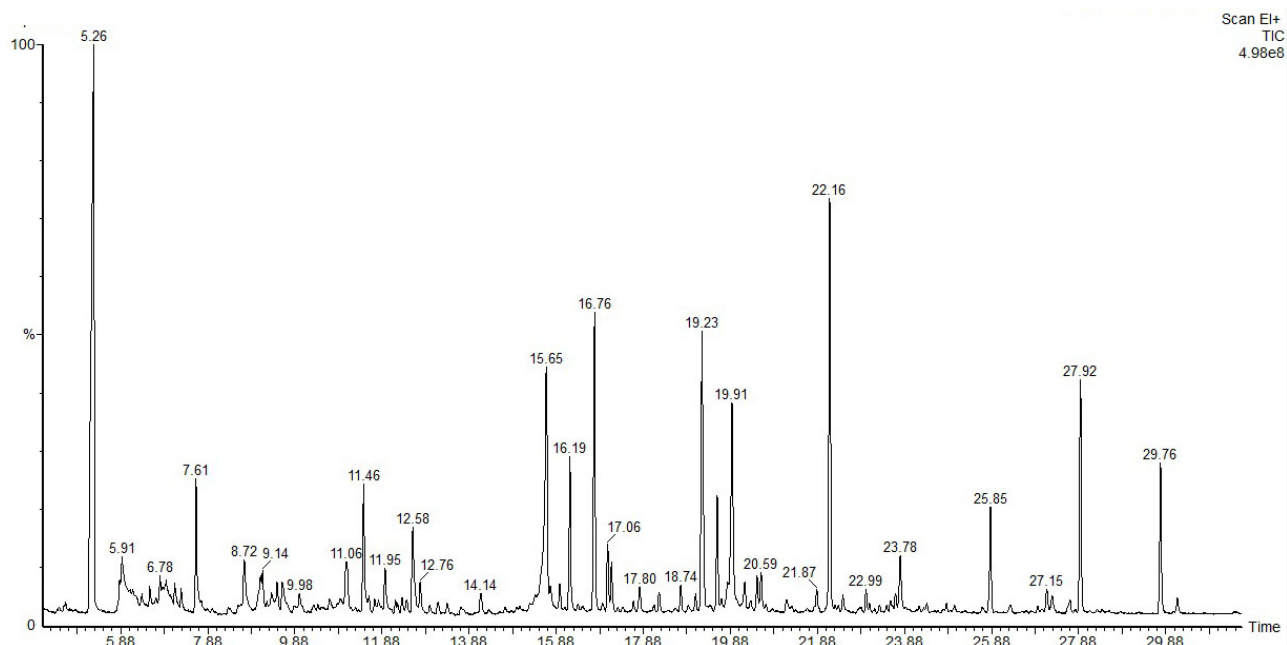
10 pav. Kai kurių gauromečio arbatų komponentų identifikavimas

Bandyta identifikuoti lakius gauromečio komponentus stiebų, lapų ir žiedų arbatose bei 2022 metų fermentuotoje ir nefermentuotoje arbatose. Imta po 10 ml arbatų ir atlikta KFME (žydras strypelis). Analizės trukmė - 60 min, desorbicija - 5 min.

3.3. Kai kurių gauromečio arbatų komponentų identifikavimas GC-MS metodu

Bandyta identifikuoti lakius gauromečio komponentus stiebų, lapų ir žiedų arbatose.

Gauromečio arbatos – vandeniniai tirpalai, jų tiesiogiai leisti į dujų chromatografą-masių spektrometrą negalima, todėl prieš analizę atlikome lakių arbatų komponentų kietafazę mikroekstrakciją. Analizei buvo imta po 10 ml stiebų, lapų ir žiedų arbatų ir atlikta KFME iš viršerdvės. Pagrindiniai nustatyti junginiai pateikti 6 lentelėje. Lapų arbatos chromatograma pateikiama 11 pav. Junginiai identifikuoti palyginus jų masių spektrus su NIST bibliotekos spektrais. Metoksifeniloksimo ir propano rūgšties 2-metil,3-hidroksi-2,4,4-trimetilpentilo esterio identifikavimo tikimybė atitinkamai 82,9% ir 86,6%, kitų junginių identifikavimo tikimybė virš 90%.



11 pav. Gauromečio lapų arbatos chromatograma, gauta atlikus KFME ir dujų chromatografinę-masių spektrometrinę analizę

6 lentelė. Gauromečio arbatų lakių komponentų chromatogramų, gautų dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu, smailių plotai

t. min	Junginys	Stiebai	Lapai	Žiedai
5,77	Metoksifeniloksimas	51042992	56956892	65402556
7,61	2-etilheksanolis	6362416	6213548	6605666
11,52	1-metil-4-(1-metiletil)-cikloheksanolis	4223364	5383599	5847859
11,94	Terpineolis	2363192	1697414	3737481
12,58	2,5-dimetilbanzaldehydas	4852163	4785011	5132123
16,78	Propano rūgšties 2-metil,3-hidroksi-2,4,4-trimetilpentilo esteris	10248044	11404836	11583609
19,25	Tridekanolis	11855708	13181014	14320305
22,17	Propano rūgšties 2-metil,1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1-,3-propandietilo esteris	13581183	15966644	16018133
27,96	Ftalio rūgšties diizobutilo esteris	7543768	9273923	15228800
29,80	Dibutilftalatas	5587243	6276465	9701349

Matyti, kad didžiausi metoksifeniloksimo smailių plotai. Literatūroje pavyko aptikti, kad didelis šio junginio kiekis aptinkamas Matsutaki grybuose, pasižyminčiuose stipriomis antioksidacinėmis savybėmis [64]. Be to teigiama, kad oksimai yra efektyvūs reaktyviųjų deguonies rūšių gesintojai [65]. Taip pat arbatose stebimos didelės tridekanolio, propano rūgšties 2-metil,1-(1,1-dimietil)-2-metil-1-,3-propandietilo esterio ir ftalio rūgšties diizobutilo esterio smailės. Deja, gauti rezultatai neleidžia įvertinti kiekybinės arbatų sudėties, nes kietafazė mikroekstrakcija buvo atliekama iš dujinės fazės, todėl smailių intensyvumas priklauso nuo junginių lakumo, o junginių standartų neturėjome.

Iš 6 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad žiedų arbatoje aptiktų junginių yra daugiau negu lapų arbatoje. Stiebų arbatoje beveik visų junginių aptikta mažiausiai. Tai galėtų paaiškinti, kodėl žiedų arbatos antioksidacinės savybės stipresnės.

3.4 Arbatų tyrimas didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodu

Dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu negalima nustatyti arbatose esančių nelakių junginių. Siekiant gauti daugiau informacijos apie arbatas, buvo atlikta jų analizė didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodu. Naudojamas diodinės matricos detektorius leido gauti kiekvienos smailės absorbcijos spektrus 200 – 600 nm srityje.

7 lentelėje pateikiami didžiausių chromatografinių smailių plotai.

7 lentelė. Gauromečio arbatų komponentų chromatogramų, gautų efektyviosios skysčių chromatografijos metodu, smailių plotai

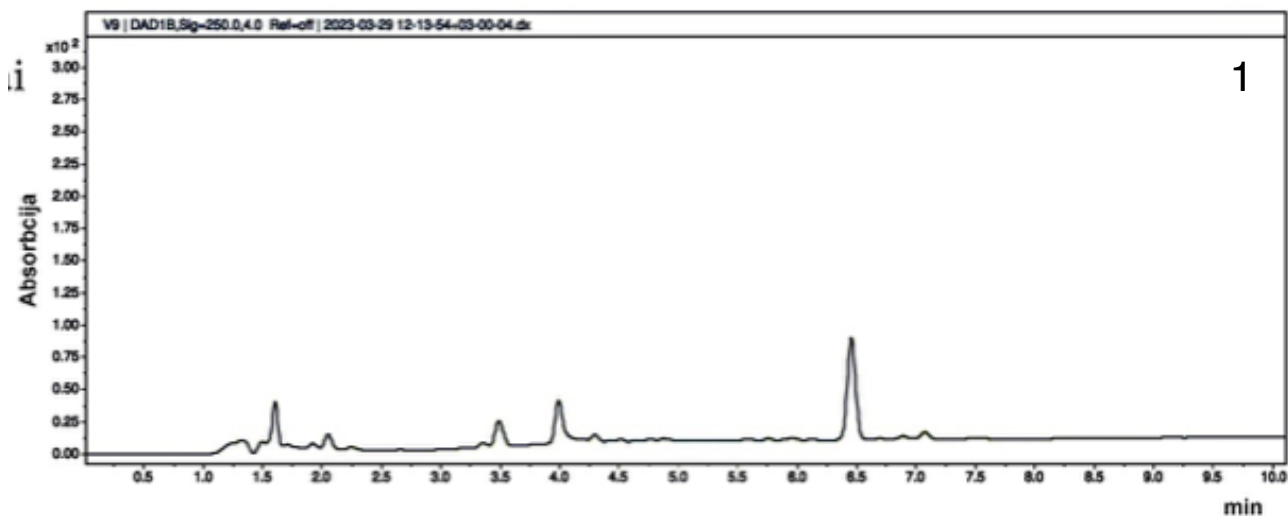
t, min	S	L	Ž	1	2	3	4	5	6	7
1,59	865	955	1034	1015	945	1001	848	930	1170	1052
3.35	-	254	-	172	-	171	40	73	-	-
3,97	748	4412	7840	2820	579	3006	3233	1954	60	329
4,27	-	370	365	245	49	227	126	113	-	-
4,74	-	306	354	912	-	157	-	69	-	-
6,44	117	691	386	814	389	802	391	344	149	343
7,01	-	71	718	58	-	-	-	-	-	-
7,80	-	-	803	-	-	-	-	-	-	-

Buvo bandyta identifikuoti gautas smailes, lyginant jų absorbcijos spektrus su literatūros duomenimis.

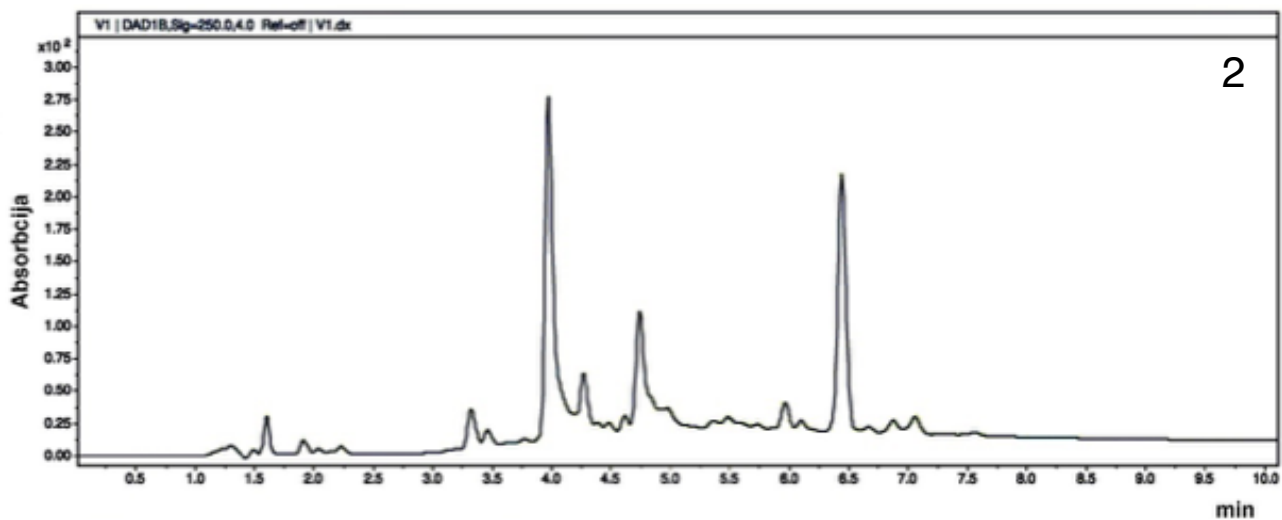
Pirmoji, nesulaikoma medžiaga (1,59 min), kurios absorbcijos maksimumas prie $\lambda = 256$ nm, aptikta visose tirtose arbatose, greičiausiai yra galo rūgštis [66].

Junginys, kurio sulaikymo trukmė 3,35 min. galimai yra ferulo rūgštis. Jos absorbcijos maksimumas prie $\lambda = 326$ nm, petys prie $\lambda = 300$ nm [67]. Nedideli šio junginio kiekiai aptikti nefermentuoto gauromečio arbatose.

Junginiai, kurių sulaikymo trukmės 3,97 min., 4,27 min. ir 4,74 min., greičiausiai yra hidrolizuojami taninai – galotaninai arba elagitaninai. Hidrolizuojamo tanino molekulės centre yra angliavandeniai (dažniausiai D-gliukozė). Angliavandenių hidroksilo grupės yra iš dalies arba visiškai esterintos su fenolinėmis grupėmis, tokiomis kaip galo rūgštis galotaninuose arba elaginė rūgštis elagitanuose. Vieno iš šių taninų – oenoteino B (sulaikymo trukmė 3,97 min.) – yra daugiausiai. Oenoteinas B – tai makrociklinės struktūros elagitanino dimeras. Įrodyta, kad oenoteinas B pasižymi antioksidacinėmis, priešnavikinėmis, antimikrobinėmis savybėmis, ir šis poveikis daug stipresnis, nei polifenolių, turinčių mažesnę molekulinę masę [68]. Įdomu tai, kad jo labai sumažėja fermentuotose gauromečio arbatose. Tai akivaizdžiai matyti iš 11 ir 12 paveiksluose pateiktų Varėnos rajone surinkto nefermentuoto ir fermentuoto gauromečio chromatogramų. Literatūroje taip pat pavyko aptikti duomenų apie oenoteino B kiekio sumažėjimą fermentuojant gaurometį [63]. Tai, greičiausiai, lemia ir silpnesnes fermentuoto gauromečio arbatų antioksidacines savybes.

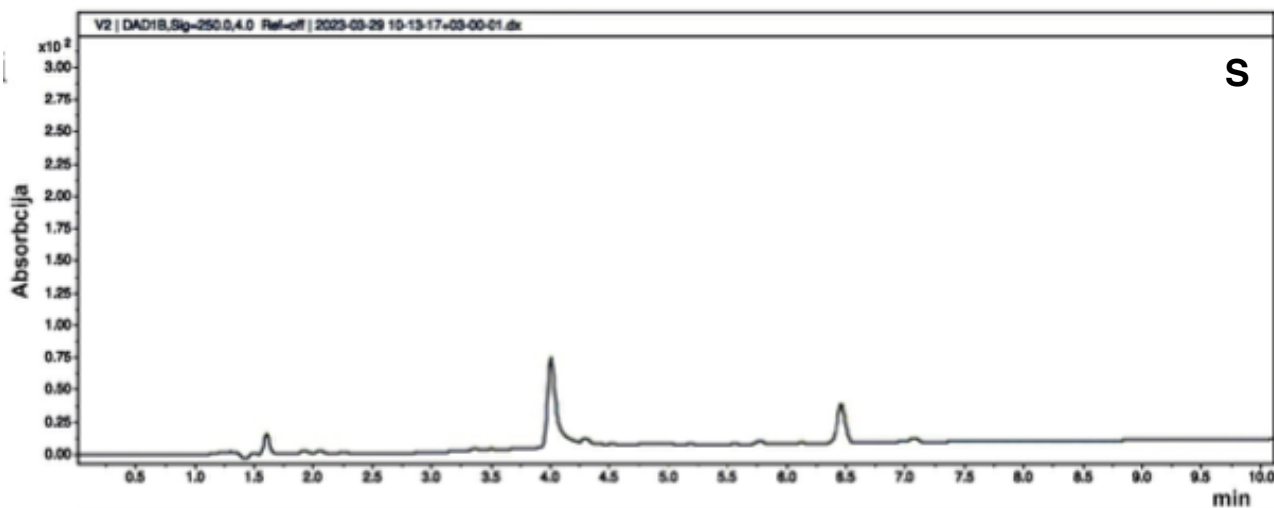


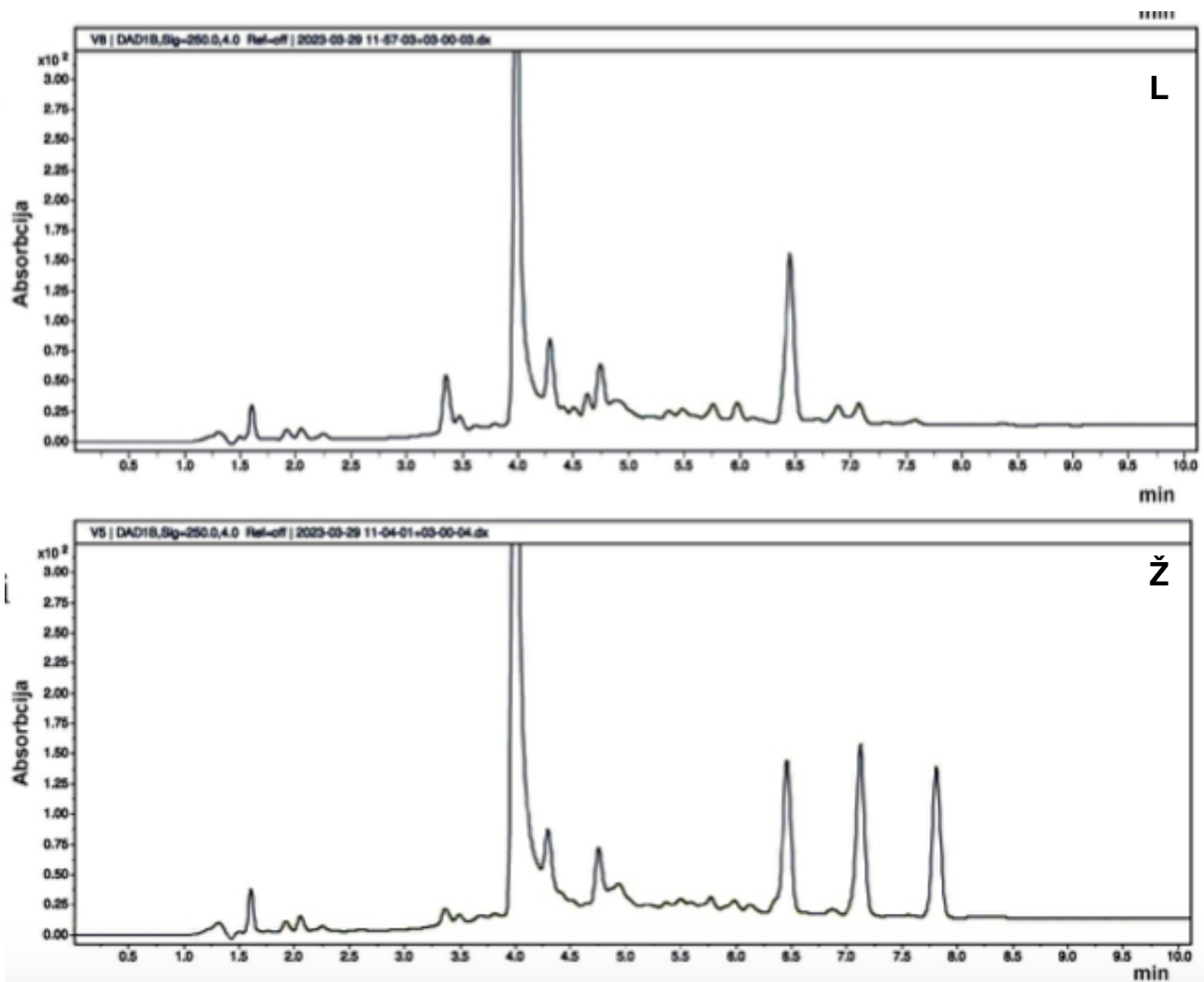
12 pav. 2022 metų nefermentuotos gauromečio arbatos chromatograma



13 pav. 2022 metų fermentuotos gauromečio arbatos chromatograma

Junginio, kurio sulaikymo trukmė 6,44 min, absorbcijos spektre yra du maksimumai ($\lambda=256$ nm ir $\lambda=356$ nm). Tai atitinka kvercetino-3-O-gliukuronido (kitaip mikelianino) absorbcijos maksimumus ($\lambda=255$ nm ir $\lambda=353$ nm) [69]. Kvercetino-3-O-gliukuronidas yra flavonolio gliukuronidas, fenolio junginys. Jo yra vyne ir kai kuriuose vaistiniuose augaluose. [70]. Šio junginio daugiausiai aptikta gauromečio lapuose (13 pav). Tai atitinka ir kitų tyrimų rezultatus [69].





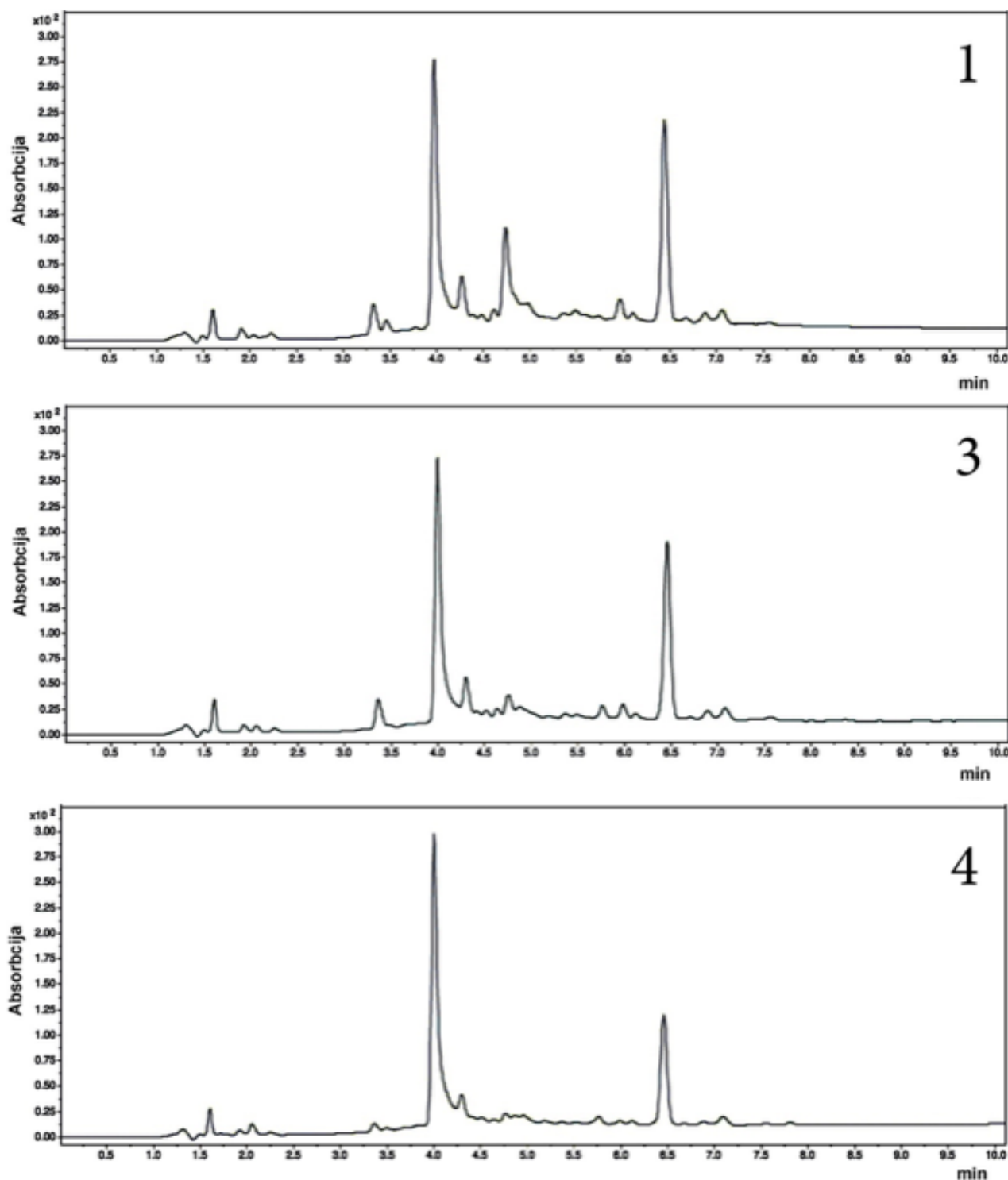
14 pav. Stiebų, lapų ir žiedų chromatogramos

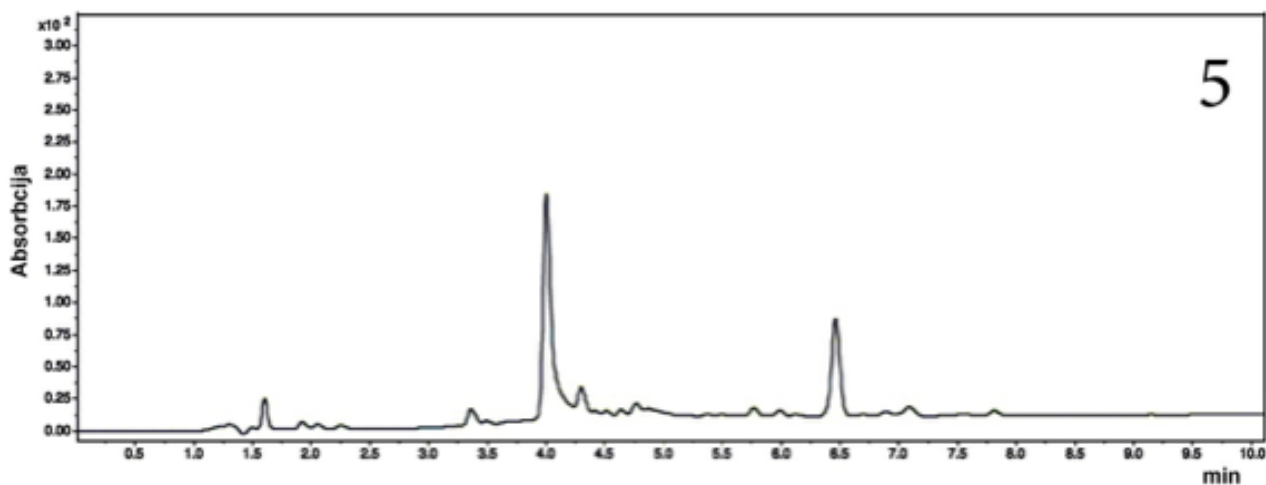
Junginio, kurio sulaikymo trukmė 7,01 min, absorbcijos spektre yra du maksimumai ($\lambda=256$ nm ir $\lambda=350$ nm). Tai atitinka kvercetino-3-O-ramnozido absorbcijos maksimumus ($\lambda=256$ nm ir $\lambda=350$ nm) [71]. Didžiausias kvercetino-3-O-ramnozidas kiekis buvo nustatytas gauromečio žiedų arbatoje, tik pėdsakai buvo aptikti arbatoje, paruoštoje iš lapų ir Varėnos rajone surinktos žaliavos. Literatūroje teigiama, kad kvercetino-3-O-ramnozidas pasižymi priešvėžiniu poveikiu [71].

Junginio, kurio sulaikymo trukmė 7,80 min, absorbcijos spektre yra du maksimumai ($\lambda=264$ nm ir $\lambda=344$ nm). Tai atitinka kaempferolio-3-O-ramnozido absorbcijos maksimumus ($\lambda=263$ nm ir $\lambda=344$ nm) [69]. Kaempferol-3-O-ramnozidas, buvo aptiktas tik gauromečio žiedų arbatoje. Tai atitinka kitų tyrėjų gautus rezultatus, kuriuose tirta eilė gauromečio mėginių ir kaempferol-3-O-ramnozidas aptiktas tik žieduose [69].

Iš 7 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad fermentuoto gauromečio arbatose (1, 6 ir 7) aptinkama mažiau junginių, negu nefermentuoto, be to aptiktų junginių kiekiai mažesni.

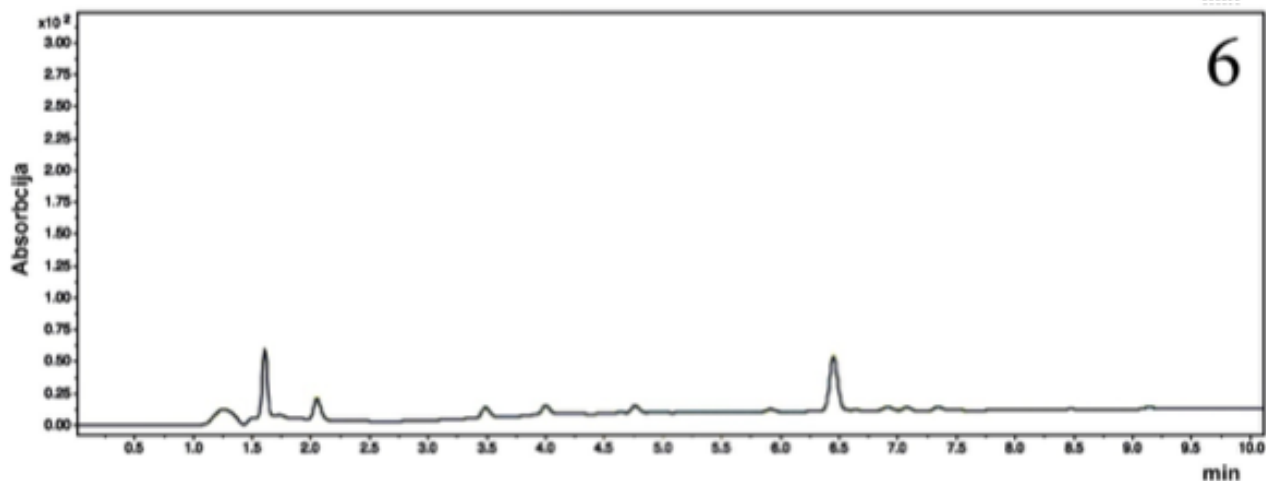
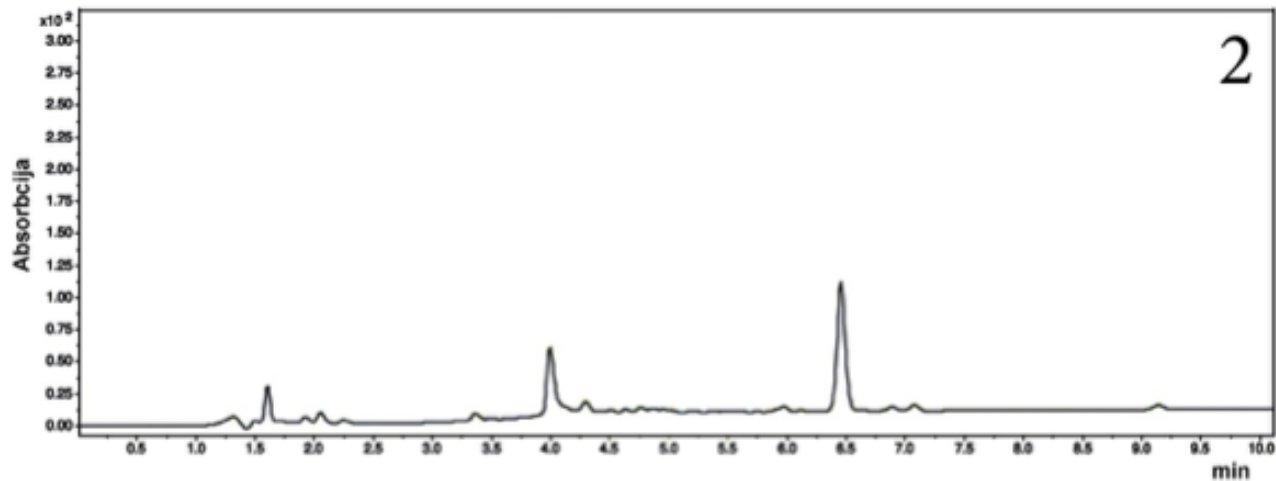
Iš nefermentuotų arbatų didžiausia junginių įvairove pasižymėjo arbata, pagaminta iš Varėnos rajone surinktų žaliavų (14 pav.).

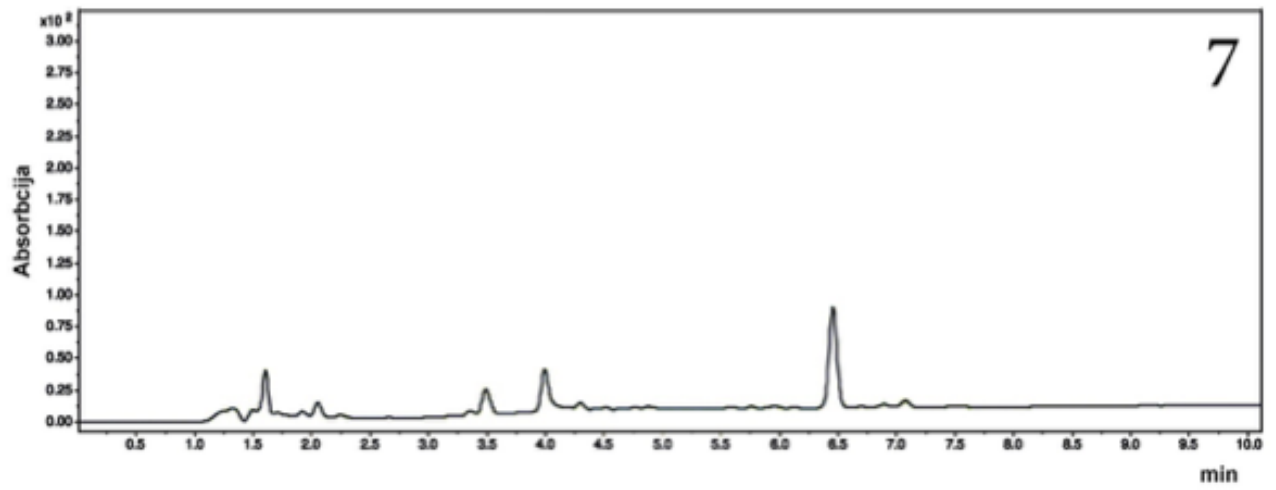




15 pav. Varėnos rajone surinktų gauromečio arbatų chromatogramos

Arbata iš namų sąlygomis fermentuoto gauromečio (2) turėjo didžiausius kiekius oenoteino B ir kvercetino-3-O-gliukuronido. Mažiausiai šių junginių buvo fermentuoto ir granuliuoto gauromečio arbatoje (6). Greičiausiai pramoniniu būdu fermentuojant gaurometį naudojama aukštesnė fermentacijos temperatūra, o formuojant granules aktyviųjų medžiagų prarandama papildomai.





16 pav. Fermentuotų gauromečio arbatų chromatogramos

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad gauromečio arbatų antioksidacinės savybės priklauso nuo žaliavos plikymo temperatūros – antioksidacinės savybės tuo stipresnės, kuo aukštesnės temperatūros vandeniui žaliava plikoma.

2. Ištyrus gauromečio stiebų, lapų ir žiadų arbatas nustatyta, kad stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymi gauromečio žiedų arbata, silpniausiomis – gauromečio stiebų arbata. Tirtų nefermentuotų gauromečio arbatų antioksidacinės savybės stipresnės, negu fermentuotų.

3. Nustatyta, kad gauromečio arbatų antioksidacinis aktyvumas tuo didesnis, kuo jose daugiau fenolinių junginių.

4. Kietafazės mikroekstrakcijos-dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu identifikuoti pagrindiniai lakūs gauromečio arbatų komponentai. Nustatyta, kad žiedų arbatoje aptiktų junginių yra daugiausiai, o stiebų – mažiausiai.

5. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodu nustatyta, kad nefermentuotose arbatose daugiausiai yra hidrolizuojamo tanino oenoteino B. Fermentuotose arbatose jo kiekis žymiai mažesnis. Tai, greičiausiai, lemia ir silpnesnes fermentuoto gauromečio arbatų antioksidacines savybes.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] Davies KJ (1995) *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. Biochem Soc Symp 61:1
- [2] Sies H (1991) *Oxidative stress: from basic research to clinical application*. Am J Med 91:31
- [3] Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J (1998) *Functional food science and defence against reactive oxidative species*. Brit J Nut 80:77
- [4] Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine*, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford
- [5] Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. Meth Enzymol 186:1
- [6] Alho H, Leinonen J (1999) *Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods*. Method Enzymol 299:3
- [7] Caroch, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives*. Food and Chemical Toxicology, 51, 15
- [8] Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J (1998) *Functional food science and defence against reactive oxidative species*. Brit J Nut 80:77
- [9] Beckman JS (1996) *Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite*. Chem Res Toxicol 9:836
- [10] Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A. *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1620; 1990.
- [11] Reaven PD, Witztum JL (1996) *Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification*. Ann Rev Nut 16:51
- [12] M. Solís-López 1, A. Durán-Moreno 2, F. Rigas 3, A.A. Morales 1, M. Navarrete 1, R.M. Ramírez-Zamora. *Assessment of Copper Slag as a Sustainable Fenton-Type Photocatalyst for Water Disinfection*
- [13] Schreck R, Baeuerle PA (1994) *Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-KB*. Method Enzymol 234:151
- [14] Sies H (1997) *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol 82:291

- [15] Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G (2007) *Antioxidant measurements*. *Physiol Meas* 28:Page 41
- [16] Frankel EN (1998) *Lipid oxidation*, Dundee. The Oily Press
- [17] Halliwell B (1997) *Antioxidants in human health and disease*. *Ann Rev Nut* 16:33
- [18] MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML (2006) *Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review*. *J Sci Food Agric* 86:2046
- [19] Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E, Spiegelman D, Stampfer M, Willett W (1996a) *Vegetable, fruits, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men*. *JAMA-J Am Med Assoc* 275:447
- [20] Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (2000) *Antioxidants in food. Practical applications*. Published in North and South America by CRC Press LLC, Corporate Blvd, NW Boca Raton FL 33431, USA
- [21] Tomiyama S, Sakai S, Nishiyama T, Yamada F (1993) *Factors influencing the antioxidant activities of phenols by an ab initio study*. *Bull Chem Soc Jpn* 66:299
- [22] Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). *Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review*. *Journal of Functional Foods*, 18, 820
- [23] Gulcin I. (2020) *Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview*. *Arch Toxicol*, 94(3):651
- [24] Wichi HP (1988) *Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium*. *Food Chem Toxicol* 26:717
- [25] Thompson D, Moldeus P (1988) *Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes*. *Biochem Pharmacol* 37:2201
- [26] Niki E, Tsuchiya J, Tanimura R, Kamiya Y (1982) *Regeneration of vitamin E from a-chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C*. *Chem Lett* 27:789
- [27] Godbout JP, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW (2004) *a-Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain*. *J Neuroimmunol* 149:101
- [28] Harborne JB (1986) In: Cody V, Middleton E, Harborne JB, Alan R (eds) *Plant flavonoids in biology and medicine*. Liss, New York, pp 15
- [29] Dragsted LO, Strube M, Leth T (1997) *Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer?* *Eur J Cancer Prev* 6:522

- [30] Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004) *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?* Free Radical Biol Med 36:838
- [31] Bors W, Heller W, Michael C, Stettmaier K (1996) *Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology*. In: Cadenas E, Packer L (eds) Handbook of antioxidants. Marcel Dekker, New York, pp 409
- [32] Gulcin I (2010) *Antioxidant properties of resveratrol: a structureactivity insight*. Innov Food Sci Emerg 11:210
- [33] Priega per internetą: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/a/ascorbic-acid.html>
- [34] Suvokhiaw S. et al (2019) *Selective Entrapment of Pb²⁺ from Fresh Thunbergia laurifolia Leaves Extract and Thunbergia laurifolia Tea Extract*
- [35] Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. J Agric Food Chem 53:4290
- [36] Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC (2008) *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Anal Chim Acta 613:1
- [37] Huang D, Ou B, Prior RL (2005) *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. J Agric Food Chem 53:1841
- [38] Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffer AEMF, Rietjens IMCM (2001) *The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones*. Free Radical Biol Med 31:869
- [39] Ou B, Prior RL, Huang D (2005) *The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays*. J Agric Food Chem 53:1841
- [40] Miguel MG (2010) *Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review*. Flavour Fragr J 25:291
- [41] Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(3), 1035–1040. doi:10.1021/jf980496s
- [42] Boligon A. A., Machado M. M., Athayde M. L. *Technical Evaluation of Antioxidant Activity*. Medical Chemistry Volume 4(7): 517-522 (2014)
- [43] Li-Qing Deng, Si-Yu Zhou, Jin-Xin Mao, Shuang Liu, Xiao-Zhong Lan, Zhi-Hua Liao & Min Chen (2018) *HPLC-ESI-MS/MS analysis of phenolics and in vitro antioxidant activity of Epilobium angustifolium L.*, Natural Product Research, 32:12, 1432
- [44] Roginsky V, Lissi EA (2005) *Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food*. Food Chem 92:235

- [45] Elmastas M, Tu̇rkekul I, Ȯztu̇rk L, Gu̇lcin I, Isildak Ȯ, Aboul-Enein HY (2006b) *The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (Morchella vulgaris and Morchella esculanta)*. Comb Chem High T Scr 9:443
- [46] Gulcin I (2012) *Antioxidant activity of food constituents: an overview*. Arch Toxicol 86:345
- [47] Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Simon A, Duroux JL (2001) *Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants*. J Agric Food Chem 49:3321
- [48] Stasko A, Brezova V, Biskupic S, Misik V (2007) *The potential pitfalls of using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents*. Free Radical Res 41:379
- [49] Brand-Williams et al. 1995 *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT - Food Science and Technology. Volume 28, Issue 1, 1995, Page 25
- [45] Huang D, Ou B, Prior RL (2005) *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. J Agric Food Chem 53:1841
- [46] de Fatima M. (2000) *Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis*. Journal of Chromatography A, 889 3.
- [47] N. Masque, R.M. Marce, F. Borrull, *New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water*. Trends Anal. Chem. 17 (6) (1998) 384.
- [48] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Quantitative Extraction Using an Internally Cooled Solid Phase Microextraction Device*. Anal. Chem. 67 (1995) 34.
- [49] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Anal. Chem. 62 (1990) 2145.
- [50] Arbelaez J., Vazquez M., Contreras-Calderon J., *Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review*. Food Chemistry. Volume 221, 15 April 2017, Page 1371
- [51] Balaydin et al. (2010) *Synthesis and antioxidant properties of diphenylmethane derivative bromophenols including a natural product*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.
- [52] Oktay M, Gu̇lcin I, Ku̇frevioglu ȮI (2003) *Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (Foeniculum vulgare) seed extracts*. Lebensm WissenTechnol 36:263
- [53] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Ravento's RM (1999) *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*. Methods Enzymol 299:152

- [54] Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). *Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review*. International Journal of Molecular Sciences, 22(7), 3380.
- [55] Gülçin, İ., Berashvili, D., & Gepdiremen, A. (2005). *Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from Perilla pankinensis decne*. Journal of Ethnopharmacology, 101(1-3), 287.
- [56] Jurkonienė S., Mockevičiūtė R., Jankauskienė J., Jankovska-Bortkevič E., Armalytė G., Gavelienė V. *Application of Commercial Plant Probiotics Improves the Berry Yield and Quality of Field-Grown Blackcurrant* ACS AGRICULTURAL SCIENCE & TECHNOLOGY 2021, Volume1 Issue6 Page 615
- [57] Briedis, V. Povilaitytė V., Kazlauskas S., Venskutonis P. R. *Polifenolių ir antocianinų kiekis vynuogėse, vynuogių sultyse ir raudonuose vynuose bei jų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas*. MEDICINA (2003) 39 tomas, 2 priedas, 104
- [58] Prieiga per internetą: <https://sodoexpertai.lt/siauralapio-gauromecio-arbata-ivan-cai/>
- [59] Prieiga per internetą: <https://www.sveik.eu/arbatos-ir-vaistazoles/gauromecio-arbata>
- [60] Prieiga per internetą: <https://7ievosnamai.lt/produktas/fermentuotas-siauralapis-gaurometis-fermentuota-ivan-cai-arbata/>
- [61] Vitalone, A., Guizzetti, M., Costa, L. G., & Tita, B. (2003). *Extracts of various species of Epilobium inhibit proliferation of human prostate cells*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 55(5), 683
- [62] Prieiga per internetą: <https://www.vlmedicina.lt/lt/gurmaniskai-kvapniai-arbatai-siauralapis-gaurometis>
- [63] Daniil N. Olennikov, Christina S. Kirillina, Nadezhda K. Chirikova. *Water-Soluble Melanoidin Pigment as a New Antioxidant Component of Fermented Willowherb Leaves (Epilobium angustifolium)*. Article in Antioxidants 2021, 10, 1300.
- [64] Guo Q., Adelina N. M., Hu J., Zhang L., Zhao Y.. *Comparative analysis of volatile profiles in four pine-mushrooms using HS-SPME/GC-MS and E-nose*. Food control, Volume 134, April 2022, 108711
- [65] Sørensen M., H.J. Neilson E., Lindberg Møller B. *Oximes: Unrecognized Chameleons in General and Specialized Plant Metabolism*. Molecular Plant, Volume 11, Issue 1, 8 January 2018, Page 95
- [66] Boulekbache-Makhlouf L., Meudec E., Chibane M., Mazauric J. P., Slimani S., Henry M., Cheynier V., Madani K. *Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Diode Array Detection Mass Spectrometry of Phenolic Compounds in Fruit of Eucalyptus globulus Cultivated in Algeria*. December 2010 Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(24):12615-24

- [67] Piasecka A., Sawikowska A., Krajewski P., Kachlicki P. *Combined mass spectrometric and chromatographic methods for in-depth analysis of phenolic secondary metabolites in barley leaves*. J. Mass Spectrom. 2015, 50, 513
- [68] Yoshida T., Yoshimura M., Amakura Y. *Chemical and Biological Significance of Oenothin B and Related Ellagitannin Oligomers with Macrocyclic Structure*. Molecules 2018, 23(3), 552
- [69] Baert N., Kim J., Karonen M., Salminen J.H. *Inter-population and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of Epilobium angustifolium*. Phytochemistry 134 (2017) 54
- [70] Yang L., NaXiao, Xiao-Wei L, Fan Y., N.Alolga R., Xiao-Yue Sun, Shi-Lei Wang, Li P., Lian-Wen Qi. *Pharmacokinetic comparison between quercetin and quercetin 3-O- β -glucuronide in rats by UHPLC-MS/MS*. Scientific Reports | 6:35460
- [71] Herni K., Subarnas A., Diantini Y., Iskandar Y. *Cytotoxicity of Quercetin and Quercetin-3-O-rhamnoside of Etlingera elatior (Jack) R.M.Sm. leaves against HeLa Cervical Cancer Cells*. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 11(05), pp 085, May, 2021
- [72] *Inter-population and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of Epilobium angustifolium*. Nicolas Baert, Jorma Kim, Maarit Karonen, Juha-Pekka Salminen. Phytochemistry 134 (2017) 54-63

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

MARIJA LUKOŠEVIČIŪTĖ

Epilobium Angustifolium arbatų analizė

Lietuvoje augantis ir birželio mėnesį žydintis siauralapis gaurometis pasižymi išskirtinėmis savo savybėmis. Įrodyta šio augalo arbatų nauda sergant peršalimo, šlapimo takų ir virškinimo sistemos ligomis, o sumuštas, patinusias ir skaudamas vietas galima apdengti iš gauromečio lapų pagamintomis tyrėmis. Jos malšina skausmą ir uždegimą, mažina tinimą.

Šiame darbe buvo tiriamos gauromečio stiebų, lapų ir žiedų arbatos bei septynios gauromečio arbatos, iš kurių 3 buvo pagamintos iš fermentuotos žaliavos. Nustatyta, kad gauromečio arbatų antioksidacinės savybės tuo stipresnės, kuo aukštesnės temperatūros vandeniui žaliava plikoma. Stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymi gauromečio žiedų arbata, silpniausiomis – gauromečio stiebų arbata. Tirtų nefermentuotų gauromečio arbatų antioksidacinės savybės stipresnės, negu fermentuotų. Nustatyta tiesioginė priklausomybė tarp gauromečio arbatų antioksidacinio aktyvumo ir fenolinių junginių kiekio. Kietafazės mikroekstrakcijos-dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu identifikuoti pagrindiniai lakūs gauromečio arbatų komponentai. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodu nustatyta, kad nefermentuotose arbatose daugiausiai yra hidrolizuojamo tanino oenoteino B. Fermentuotose arbatose jo kiekis žymiai mažesnis.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

MARIJA LUKOŠEVIČIŪTĖ

Analysis of Epilobium Angustifolium teas

Epilobium Angustifolium which grows in Lithuania and blooms in June has its distinctive properties. The usefulness of teas prepared from this plant has been demonstrated for cold, urinary tract and digestive system diseases, and beaten, swollen and painful areas can be covered with purée made from mashed leaves. They relieve pain and inflammation and reduce swelling.

In this work we focused on the teas made out of *Epilobium Angustifolium* stems, leaves and flowers, also on seven teas were bought from pharmacy. Out of these seven, three were made from fermented raw materials. Results showed that the antioxidant properties of the tea is stronger when increasing the temperature of the water with which the raw material is brewed up. The flowers of the *Epilobium Angustifolium* have the strongest antioxidant properties and the stems have the weakest. The antioxidant properties of the unfermented teas are stronger than those of fermented ones. A direct relationship between the antioxidant activity of *Epilobium Angustifolium* teas and the amount of phenolic compounds was established. The main volatile components of the *Epilobium Angustifolium* teas were identified by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. High performance liquid chromatography has shown that the main component of unfermented teas is hydrolysable tannin oenothain B. Fermented teas have significantly lower levels of this tannin.