



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS FAKULTETAS  
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA

**Otilija Ivinska**

Pagrindinių studijų programa Chemija – II kursas

**FLAVONOLIŲ NUSTATYMAS MAISTO PAPILDUOSE SKYSČIŲ  
CHROMATOGRAFIJOS METODU**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovas: doc. dr. Evaldas Naujalis

Įvertinimas:

Vilnius, 2016

# TURINYS

<b>SANTRUMPOS.....</b>	<b>3</b>
<b>ĮVADAS .....</b>	<b>4</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA.....</b>	<b>6</b>
1.1. PASIRINKTAS TYRIMŲ OBJEKTAS .....	6
1.1.1. <i>Vaistinė žaliava</i> .....	6
1.1.2. <i>Veikliosios medžiagos</i> .....	7
1.1.3. <i>Indikacijos</i> .....	7
1.2. FLAVONOLIAI .....	8
1.3. BANDINIŲ PARUOŠIMAS IR EKSTRAKCIJOS METODŲ APŽVALGA .....	11
1.4. ANALIZĖS METODŲ APŽVALGA .....	17
1.4.1. <i>Spektrofotometrinė analizė</i> .....	18
1.4.2. <i>Dujų chromatografija</i> .....	18
1.4.3. <i>Efektyvioji skysčių chromatografija</i> .....	20
<b>2. EKSPERIMENTO METODIKA.....</b>	<b>23</b>
2.1. MEDŽIAGOS IR TIRPIKLIAI .....	23
2.2. APARATŪRA .....	24
2.2.1. <i>Skysčių chromatografinė sistema</i> .....	24
2.2.2. <i>Naudota pagalbinė įranga ir sąnaudinės medžiagos</i> .....	25
2.3. TYRIMO OBJEKTAI .....	25
2.4. METODIKOS.....	25
2.4.1. <i>Tirpalų ruošimas ir ekstrakcija</i> .....	25
2.4.1.1. <i>Mėlynių lapai ir ūgliai</i> .....	25
2.4.1.2. <i>Džiovintos mėlynių uogos</i> .....	26
2.4.1.3. <i>Maisto papildai</i> .....	26
2.4.1.4. <i>Etaloninių tirpalų gamyba</i> .....	26
2.4.2. <i>Kietafazė ekstrakcija (KFE)</i> .....	27
2.4.3. <i>Optimizuotos chromatografinės sąlygos</i> .....	27
<b>3. REZULTATŲ APTARIMAS.....</b>	<b>29</b>
3.1. FLAVONOLIŲ ATSKYRIMO IR NUSTATYMO SĄLYGŲ PARINKIMAS IR OPTIMIZAVIMAS .....	29
3.2. ANALIČIŲ EKSTRAKCIJOS SĄLYGŲ TYRIMAS .....	30
3.3. FLAVONOLIŲ NUSTATYMO METODO TAIKYMAS AUGALINIŲ EKSTRAKTŲ IR MAISTO PAPILDŲ ANALIZEI .....	33
3.3.1. <i>Metodo analizinių charakteristikų nustatymas</i> .....	33
3.3.2. <i>Maisto papildų analizė</i> .....	35
3.3.3. <i>Išgavos tyrimai</i> .....	36
<b>IŠVADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>39</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>40</b>

## SANTRUMPOS

**AcN** – acetonitrilas

**AR** – aptikimo riba

**DCh** – dujų chromatografija

**ESS** – ekstrakcija subkritiniais skysčiais

**EtAc** - etilacetatas

**EtOH** - etanolis

**GC** – dujų chromatografija

**HCOOH** – skruzdžių rūgštis

**HPLC** – efektyvioji skysčių chromatografija (angl. high performance liquid chromatography)

**KP** - kaempferolis

**KFE** – kietafazė ekstrakcija

**MeOH** – metanolis

**MSD** - masių spektrometrinis detektorius

**ME** - mikrobangomis skatinama ekstrakcija

**MPC** – maisto papildas C

**MPL** - maisto papildas L

**MR** – miricetinas

**MS** – masių spektrometrija

**NR** – nustatymo riba

**QU** - kvercetinas

**PDA** - skenuojantis fotodiodinės matricos detektorius

**SN** – standartinis nuokrypis

**SSN** – santykinis standartinis nuokrypis

**SSE** – ekstrakcija superkritiniais skysčiais

**UE** - ultragarsu skatinama ekstrakcija

## ĮVADAS

Flavonoidai sugeria ultravioletines (280-320 nm) bangas ir apsaugo augalą nuo jų žalingo poveikio, taip pat veikia kaip antioksidantai, suriša susidariusius laisvuosius radikalus ir slopina oksidacijos procesus taip apsaugo ląstelėse esančius lipidus ir kitas jautrias molekules [1]. Flavonoidais vis dažniau gydomos širdies ir kraujagyslių ligos. Labiausiai žinomas ir plačiausiai pritaikomas medicinoje yra flavonoidų antioksidantinis poveikis: jie skirtingais mechanizmais slopina oksidacinį stresą ląstelėse [2]. Flavonoidų priešuždegiminis poveikis susijęs su jų gebėjimu slopinti laisvųjų radikalų poveikį organizme, taip pat flavonoidai slopina azoto oksido sekreciją, kurią sukelia bakterijų endotoksinai ar citokinai. Sumažėjęs azoto oksido kiekis mažina ląstelių oksidacinius sužeidimus [3]. Tyrimais nustatyta, jog flavonoidai gali būti naudojami įvairių akių ligų gydyme: kataraktos, diabetinės retinopatijos, geltonosios dėmės degeneracijos (AMD), glaukomos ir sausų akių sindromo. Kvercetas slopina fermentą aldozės reduktazę ir taip neleidžia pakisti osmosiniam slėgiui akyse, sergant cukriniu diabetu bei atitolina kataraktos formavimąsi [4]. Taip pat atlieka antimikrobines funkcijas, didina organizmo atsparumą radiacijai.

Mokslininkai jau ne kartą pranešė apie ryšį tarp flavonoidų vartojimo ir mirtingumo nuo širdies – kraujagyslių ligų sumažėjimo. Trylika iš penkiolikos meta – analizės metodo perspektyvinių tyrimų parodė flavonoidų apsaugines savybes: mirtinių ir nemirtinų koronarinės<sup>1</sup> širdies ligų atvejuose mirtingumas sumažėjo 65%. [5] Reguliarus flavonoidų vartojimas su maistu gali sumažinti plokštelių dydį iki 40% [6], slopinti uždegiminių citokinų<sup>2</sup> išraišką ir sumažinti miokardo infarkto riziką 30%. [7] Tyrimuose yra stebimas flavonoidų ir kitų polifenolių gebėjimas apsaugoti organizmą nuo galvos smegenų išemijos.

Lietuvos farmacijos rinkoje vis daugiau atsiranda maisto papildų. „Maisto papildai“ sąvoka apibrėžta: „maisto produktai, kurie yra skirti papildyti įprastą racioną ir kurie, vieni arba derinyje su kitomis medžiagomis, yra koncentruotas maistinių ar kitų medžiagų šaltinis, turintys mitybinį arba fiziologinį poveikį, ir kuriais prekiaujama dozuota forma <...>“. („Maistinės medžiagos“ yra apibrėžtos kaip vitaminai ir mineralinės medžiagos<sup>3</sup>.) [8] Pasak Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto Mitybos skyriaus vedėjos Ilonos Drulytės, „Vaistų gamintojai turi įrodyti produkcijos poveikį bei pagrįsti preparato saugą, o maisto papildai – maistas, todėl tokių tyrimų jiems nereikalaujama“. [9] Tačiau ant kiekvienos pakuotės etiketės, kurioje yra užrašas ar piešinys turi būti: 1) nurodyta, kaip produktas ar jo sudedamoji dalis veikia sveikatą, ir 2)

---

<sup>1</sup>Širdies arterijos yra vadinamos vainikinėmis (koronarinėmis) kraujagyslėmis.

<sup>2</sup>Tai yra labai didelė grupė baltyminių medžiagų, koordinuojančių imunines reakcijas.

<sup>3</sup> 2002/46/EB direktyvos 2 straipsnio b punktas

būtinai pagrįsta moksliskai. Pateiktos informacijos atitikimą tikrina Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas.

Kadangi spaudoje ir internetinėje erdvėje nuolat pasirodo prieštaringų straipsnių, pasidarė įdomu, kaip yra iš tikrųjų. Flavonoidai savo savybėmis labai naudingi. Jų yra įvairiuose maisto papilduose.

**Darbo tikslas** – sukurti, iširti ir optimizuoti pasirinktų flavonolių ekstrakcijos ir nustatymo skysčių chromatografijos metodą, jį pritaikyti augalinių ekstraktų bei maisto papildų analizei.

**Darbo uždaviniai:**

1. Išnagrinėti ir apžvelgti jau esamus flavonolių analizės augaliniuose ekstraktuose ir maisto papilduose metodus;
2. Pasirinkti pradines ekstrakcijos ir atskyrimo HPLC sąlygas;
3. Optimizuoti flavonolių ekstrakciją iš mėlynių lapų ir ūglių ir džiovintų mėlynių uogų;
4. Optimizuoti flavonolių ekstrakciją iš pasirinktų maisto papildų;
5. Panaudoti optimizuotą skysčių chromatografijos metodą flavonolių nustatymui ekstraktuose;
6. Įvertinti sukurto metodo pagrindines analizines charakteristikas;
7. Pritaikyti optimizuotus ekstrakcijos metodus realių bandinių analizei HPLC metodu.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Pasirinktas tyrimų objektas

Nuo seno mėlynės vartojamos tikint, jog padeda regėjimui. Kaip minėjau anksčiau, yra nemažai tyrimų, jog flavonoidai gali būti naudojami įvairių akių ligų gydyme. Todėl buvo įdomu sužinoti, kiek flavonoidų turi šios uogos. Tuo pačiu išsiaiškinti, ar maisto papildai, kurie gaminti iš mėlynių uogų, turi tikrai tiek flavonoidų, kiek nurodyta ant pakuotės.

Mėlynė (*lot. Vaccinium myrtillus*) – priklausantis viržinių *Ericaceae Juss* šeimai lapus metantis, daugiametis, nedidelis, 30 – 50 cm aukščio, miškų krūmokšnis arba puskrūmis su žaliomis, briaunotomis šakelėmis. [10] Lapai ovalūs, elipsiški arba kiaušiniški, kraštai smulkiai dantyti. Žiedai pavieniai, rausvai žalios spalvos, išsidėstę lapų pažastyse. Vaisius – melsvai juoda uoga, turinti daug sėklų.



### 1.1. pav. Mėlynių puskrūmis

Mėlynė auga visoje Lietuvoje, plačiai paplitusi pušynuose su eglų priemaiša, pelkėtuose pušynuose, mišriuose miškuose, aukštapelkėse ant kemsų, rečiau – lapuočių miškuose. Didžiausi jų išteklių pietinėje ir rytinėje šalies dalyse. [11] Mėgsta derlingą, rūgštų dirvožemį.

#### 1.1.1. Vaistinė žaliava.

Mėlynės uogos (*Myrtilli fructus*) skinamos rankomis, kai yra gerai sunokusios. Vaisiai perrenkami, išmetamos priemaišos (lapai, vaiskočiai, nesunokusios uogos), pavėsyje apvytinami ir tuomet džiovinami džiovykloje ne aukštesnėje 60 °C temperatūroje. Išdžiovintos uogos labai raukšlėtos, silpno kvapo, rūgščiai saldaus skonio.

Mėlynių lapai (*Myrtilli folium*) skinami prieš augalui žydint ar žydėjimo pradžioje – gegužės–liepos mėn. Džiovinama gerai vėdinamoje patalpoje, pavėsyje. Iš 1 kg šviežių uogų gaunama 150–180 g džiovintų. Visa žaliava laikoma audinio maišuose gerai vėdinamoje vietoje. Ji tinkama vartoti 2 metus. Šviežias uogas galima laikyti ir šaldiklyje. [10]

### 1.1.2. Veikliosios medžiagos.

Mėlynių lapuose yra rauginių medžiagų, glikozidų, organinių rūgščių (citrinos, obuolių, gintaro), flavonoidų, eterinio aliejaus, karotinoidų, alkaloidų ir t. t. Uogose yra daug pektino, vitaminų: C (askorbo rūgšties), B1 (tiamino), B2 (riboflavino), B3 (niacino), karotino, mineralinių medžiagų (geležies, kalcio, kalio, vario, magnio, fosforo, chromo, mangano – daugiausia palyginus su kitais vaisiais ar uogom), flavonolių, antocianinų, rauginių medžiagų, organinių rūgščių, sacharidų, dažančios medžiagos - glikozido mirtilino. [12] Mėlynės yra geras vitamino K šaltinis. Jose taip pat yra ląstelienos, mangano ir kitų antioksidantų (ypač antocianinų).

- Antocianai:
  - malvidinas
  - delfinidinas
  - pelargonidinas
  - cianidinas
  - peonidinas
- Hidroksicinamono rūgštys:
  - kofeino
  - ferulinė
  - kumarino
- Hidroksibenzoinės rūgštys:
  - galo
  - protokatechininė
- **Flavonoliai:**
  - **kaempferolis**
  - **kvercetas**
  - **miricetas**
- Kiti fenoliniai dariniai:
  - pterostilbenas
  - resveratrolis

### 1.1.3. Indikacijos.

Kaip vaistinė žaliava yra naudojamos mėlynių uogos ir lapai.

„Kur valgomos mėlynės ir žemuogės, daktarams nėra kas veikti“, – sako liaudies patarlė.

Didžiausia šių uogų vertybė – didelis kiekis flavonoidų, kurie ir suteikia joms tamsiai mėlyną spalvą. Būtent flavonoliai užkerta kelią mūsų senėjimui, taip pat organizmo audinių rūgštėjimui. Be to, flavonoidai didina kraujagyslių elastingumą ir stiprina jų sienes, užkerta kelią alergijoms, mažina nuovargį bei didina regėjimo aštrumą: atgaivina pavargusias ir paraudusias akis. Mėlynėje esančios medžiagos turi savybę pagerinti regėjimo aštrumą ypač prieblandoje. Įdomus faktas, kad prezidento Džono Kenedžio tėvas Džozefas Kenedis, aviacijos generolas, įvedė į kasdieninį lakūnų racioną mėlynės, kad būtų išsaugotas regėjimo aštrumas skrydžių metu.

Flavonoliai stabdo žarnyno sutrikimus (mėlynių kisielius naudingas virškinimui normalizuoti, padeda tiek esant viduriavimui, tiek esant vidurių užkietėjimui), naikina žarnyno infekcijų sukėlėjus ir šalina iš organizmo sunkiuosius metalus. Tačiau mėlynių negalima vartoti esant infekcinės kilmės viduriavimui. Mėlynės stimuliuoja medžiagų apykaitą, pasižymi sutraukiančiu, šlapimo išsiskyrimą skatinančiu, skausmą mažinančiu, priešuždegiminiu ir kraujavimą stabdančiu poveikiu. [13] Mėlynės turtingos vitaminų C ir E, o jose esanti fruktozė nedidina cukraus kiekio kraujyje.

Bostono universiteto mokslininkas Dž. Džozefas, atlikęs tyrimus, paskelbė, kad, gausiai vartojant mėlynės, sustiprėja raumenų jėga (svarbu dirbantiems sunkų fizinį darbą ar sportuojantiems), gerėja atmintis (aktualu studijuojantiems, dirbantiems protinį darbą), gerėja judesių koordinacija (aktualu pagyvenusiems žmonėms). [14]

Mėlynė turi daug antioksidantų, kurie padeda sumažinti galimybę susirgti širdies ligomis. Mėlynių kisielius ar gėrimas naudingas trombozės, miokardo infarkto profilaktikai. Ugoje daug geležies, kuri padidina hemoglobino kiekį kraujyje, o veidui suteikia skaistumo.

Šiaurės šalyse arbata iš mėlynių uogų ir lapų yra geriama peršalus, skaudant galvai, kosint. Reikėtų stengtis per vasarą, liepą – rugpjūtį privalgyti kuo daugiau mėlynių, o vėlesniu metų laiku – gerti džiovintų uogų ir lapų nuovirą. [14]

## **1.2. Flavonoliai**

Flavonoidai – heterocikliniai organiniai junginiai (lot. flavus – geltonas) paplitę gamtoje, kurių yra iki 6,5 tūkstančio. Tai augalų pigmentai, kurie kaupiasi žieduose, lapuose, vaisiuose. Daugelio augalų geltona ar oranžinė spalva priklauso nuo flavonoidų, esančių augale. Būtent jie suteikia ne tik spalvą, bet ir skonį, aromatą. Šie aromatiniai junginiai augaluose susidaro iš aromatinių rūgščių, fenilalanino, tirozino ir acetato liekanų. [15]



Kaip atskira augalų pigmentų grupė flavonoidai buvo išskirti tik 1938 metais, kai vengrų mokslininkas Albertas Sent – Georgijus pavartojo „vitamino P“ — terminą jų apibūdinimui. [16, 17] Pirmasis išskirtas flavonoidų junginys buvo kvercetas, jį išskyrė XIX a. mokslininkas Ševrole.

Šie polifenoliniai junginiai skirstomi:

- 1) Flavonoliai: kvercetas, kaempferolis, miricetas, izoramnetinas;
- 2) Flavonai: apigeninas, luteolinas, chrisinas, diosmetinas, baikaleinas, tangeritinas;
- 3) Izoflavonai: genisteinas, daidzeinas, gliciteinas;
- 4) Flavononai: hesperetinas, naringeninas, eriodictiolas;
- 5) Flavan-3-oliai: (+)-katechinas, (+)-galokatechinas, (-)-epikatechinas, (-)-epigalokatechinas, (-)-epikatechin-3-galatas, (-)-epigalokatechin-3-galatas, teaflavinas, teaflavin-3-galatas, teaflavin-3'-galatas, teaflavin-3,3'-digalatas, tearubiginas;
- 6) Antocianidinai: cianidinas, delfinidinas, malvidinas, pelargonidinas, peonidinas, petunidinas.

Remiantis struktūra flavonoliai yra flavonoidų klasė, apimanti keturis ankščiau išvardintus junginius. Tai maistiniai metabolitai, kurie veikia širdies ir kraujagyslių sistemą, nors kai kurie mokslininkai prieštaringai vertina jų naudą. [18] Šių aktyvių junginių kiekis maisto produktuose priklauso nuo daugybės faktorių: augalo tipo, metų laiko, šviesos, maisto gamavimo būdo ir pan. Flavonoliai yra blankiai geltonos spalvos ir pagrindiniai jų šaltiniai yra vaisiai, daržovės, arbata ir raudonasis vynuogynas. Nepaisant to didžiausia koncentracija rasta obuoliuose, svogūnuose, uogose, kopūstuose, brokoliuose, kakavoje. [19] Būtent maisto produktuose flavonoliai labiausiai paplitusi flavonoidų rūšis. Tyrimai rodo, kad kvercetas sudaro iki 75% flavonolių suvartojimo dienos metu, kuris vidutiniškai yra 13-64 mg per dieną.

*1 lentelė: Flavonolių kiekis kai kuriose daržovėse ir uogose [20]:*

Maisto produktas	Flavonoliai, mg/100g		
	Kvercetas	Miricetas	Kaempferolis
Brokoliai	3,26	0,06	46,80
<b>Mėlynės</b>	<b>14,42</b>	<b>2,92</b>	<b>0,01</b>
Spanguolės	4,50	2,40	0,12
Raudonieji svogūnai	39,21	2,70	12,30
Braškės	1,11	0,04	34,89

Flavonoliai turi hidroksilo grupę trečioje pozicijoje, todėl jie gali būti laikomi 3-hidroksiflavonais. Daugiausia yra mono-, di- ir triglikozidai. Mono glikozidai dažniausiai būna 3-O-

glikozidai. Glikozidai yra tam tikros molekulės, kuriose cukrinė dalis yra surišta prie kažkokios kitos dalies. Glikozidai vaidina svarbius vaidmenis gyvuose organizmuose. Daug augalų kaupia svarbius cheminius junginius neveiklaus glikozido formoje; atsiradus šių medžiagų poreikiui - glikozidai atnešami su vandeniu ir fermentu. Flavonolių ir flavonų glikozidų susidarymas priklauso nuo šviesos, tad jie randami daugiausia lapuose bei vaisių odelėje, o augalo dalyje, esančioje po žeme, - tik pėdsakai. [21]

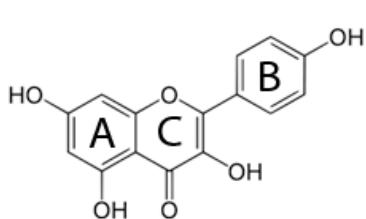
Nemažai mokslinių tyrinėjimų parodė, kad flavonoidai turi daug hidroksilinių grupių, kurios suteikia gana stiprias antioksidacines savybes. Flavonoidų struktūroje B žiedas turi daugiau elektronų nei A ir C žiedai. Todėl radikalai pirmiausia atakuoja B žiedą. Šios savybės susijusios su fenolinių junginių oksidaciniu mechanizmu, kai hidroksilinės grupės veikia kaip elektronų donoriai ir *orto* padėtyje esančių pakaitų hidrolizacija padeda stabilizuoti fenoksilo ar kitus radikalus. Tačiau hidroksilinių grupių glikolizacija yra susijusi su sumažėjusiu antioksidaciniu aktyvumu. [22]

Kaempferolis, miricetinas ir kvercetinas turi identišką molekulinę struktūrą ir yra panašaus dydžio.

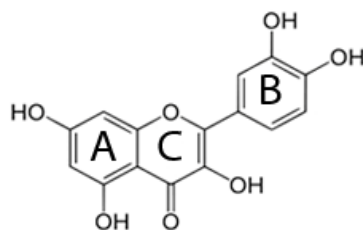
**2 lentelė:** Junginių cheminės formulės ir molekulinės masės:

Flavonolis	Kvercetinas	Miricetinas	Kaempferolis
Cheminė formulė	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>
Molekulinė masė, g/mol	302,24	318,24	286,24

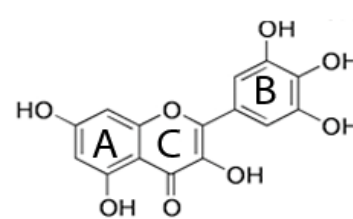
Vienintelis skirtumas tas, kad molekulinėje struktūroje fenolio hidroksilo grupių skaičius B žiede yra skirtingas:



**Kaempferolis**



**Kvercetinas**



**Miricetinas**

### 1.2. pav. Flavonolių struktūra

Flavonolių sudėtis gali ženkliai pasikeisti, kai uogos sunoksta.

Taigi metodai, kurie paremti molekulių dydžiu, nėra tinkami norint visiškai atskirti flavonolius. [23] Tikimasi, jog adsorbinės chromatografijos metodu pavyks sėkmingai įvykdyti flavonolių atskyrimą, kadangi šie junginiai turi skirtingus fenolio hidroksido kiekius, kurie parodytų skirtingas vandenilio susijungimo galimybes.

Paskutiniai tyrimai rodo, jog kvercetas, miricetas ir kaempferolis turi skirtingas farmakologines funkcijas. Kaempferolis gali slopinti citochromų P450 aktyvumą žiurkių hepatocituose. Miricetas turi įtaką žmogaus glioksalazės slopinimui. [23] Tuo tarpu kvercetas gali blokuoti žmogaus trombocitų agregaciją. Pasaulinė organizacija „International Agency for Research on Cancer“ [24] atliko labai daug tyrimų ir pateikė išvadas, jog kvercetas nėra kancerogeniškas žmonėms. Tačiau šiuo metu nėra pakankamai įrodymų, kad kvercetas padeda padidinti fizinį pajėgumą.

Nors ir kvercetas yra potencialiai laikomas antivėžiniu agentu, tačiau turi būti atlikta daugiau tyrimų, kadangi dauguma jų paremti *in vitro*. Jų metu naudojama didelė kverceto koncentracija, kurios suvartojimas dienos metu nėra įmanomas. Be to, jo teigiamas poveikis gydant vėžį atlikus tyrimus su žmonėmis ir su gyvūnais vis dar nėra įtikinamas. [25] Dėl patikimų žinių stokos mokslininkai nerekomenduoja vartoti kverceto nėščioms bei žindančioms. [26]

### **1.3. Bandinių paruošimas ir ekstrakcijos metodų apžvalga**

Mėginių paruošimas bei pati ekstrakcija priklauso nuo mėginio matricos kilmės bei cheminių savybių, molekulių struktūros, poliškumo, koncentracijos, aromatinių žiedų kiekio bei hidroksilio grupių. Mėginių paruošimas bei nereikalingų medžiagų pašalinimas yra svarbūs žingsniai tyrimo metu, tačiau ekstrakcijos procesas yra lemiamą procedūra fenolinių junginių atskyrimui. Kaip buvo minėta anksčiau, pats ekstrakcijos procesas priklauso nuo mėginio rūšies/prigimties, dalelių dydžio, tirpiklio tipo bei taikomų ekstrakcijos metodų. Polifenolių cheminės savybės mėginyje yra susijusios su paprastų bei kompleksinių polifenolinių junginių bei skirtingų fenolinių rūgščių, flavonoidų, anticianinų ir proantocianinų koncentracijos. Flavonoidai dažniausiai ekstrahuojami su metanolio, etanolio, acetono, vandens arba šių įvairių tirpiklių mišinio pagalba.

Nagrinėjant literatūrą, buvo aptiktos tokios bandinių paruošimo analizei technikos:

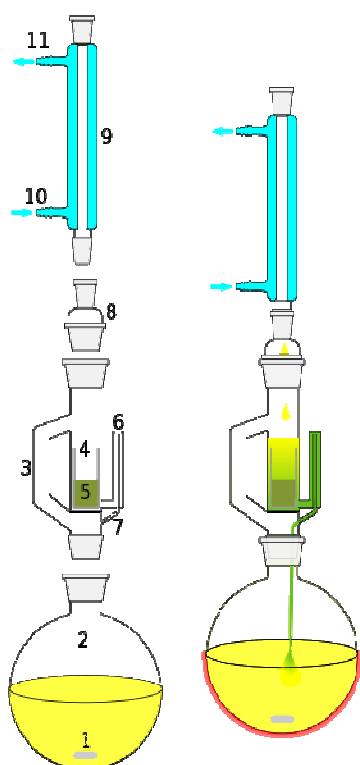
- 1) džiovinimas, homogenizavimas (kietiems ir pusiau kietiems bandiniams);
- 2) tirpinimas (kietiems bandiniams);
- 3) skiedimas, išgarinimas;
- 4) nuskaidrinimas (filtravimas, ultracentrifugavimas);
- 5) analičių išskyrimas (mėginio valymas);
- 6) analičių koncentravimas;
- 7) analičių derivatizacija.

Kai kurios paruošimo technikos reikalauja augalų mėginius išdžiovinti šaldant (liofilizuoti), džiovinti oru arba džiovinimo spintoje. Išdžiovinti mėginiai yra sumalami arba sutrinami tam, kad būtų išgautas reikiamas dalelių dydis. Skysčiai yra pirmiausiai apdorojami juos centrifuguojant, po to jie filtruojami bei išgryninami naudojant atskyrimo sistemas. Sumalus mėginį į mažas daleles palengvinamas ekstrakcijos procesas. Mėginiuose esantys aliejai pašalinami naudojant nuriebalinimo procesą. Daugumoje atvejų susmulkinimas į mažas daleles kartu su džiovinimu bei nuriebalinimu (kur reikia) rekomenduojamas pilnam mėginio paruošimui prieš ekstrakciją. [27]

Vienas labiausiai paplitusių fenolinių junginių ekstrakcijos metodų yra ekstrakcija tirpikliu. Įvairūs ekstrakcijos tirpikliu metodai yra naudojami šiandien, tarp kurių - ekstrakcija karšto vandens vonelėje bei Soksleto ekstrakcija taikomos dažniausiai. Palyginimui su sudėtingesniais metodais Soksleto metodas vis dar naudojamas kaip standartas daugelyje atvejų. Fenolinių junginių ekstrakcijai Soksleto metodu, be metanolio ir/arba acetono, kaip tirpiklis taip pat yra naudojami metanolio ir rūgščių mišiniai. Kitais atvejais, kai Soksleto bei karštos vonelės metodai nėra taikomi, taikomas 24 val. ekstrakcijos tirpikliu metodas. Tačiau vienas didžiausių šių metodų trūkumų yra pernelyg ilgas ekstrakcijos laikas bei aukšta temperatūra, dėl kurios fenoliniai komponentai suyra. Be to, daugelyje atvejų, ekstrakcijai naudojamas didelis tirpiklio kiekis, kas gali sukelti problemų aplinkai.

**Soksleto ekstrakcija** – plačiausiai naudojamas kietų mėginių ekstrakcijos metodas. [28]

Soksleto ekstrakcija gana ilgas procesas, ekstrahuojami junginiai turi pasižymėti terminiu stabilumu



1. Maišiklis;
2. Apvaliadugnė bandinio kolba;
3. Distiliacijos metu susidarančių garų kelias;
4. Ekstrakcijos kapsulė;
5. Ekstrahuojamas bandinys;
6. Sifono viršus;
7. Sifono išėjimas;
8. Jungtis;
9. Vandens šaldytuvas;
10. Įeinantis šaldantis vanduo;
11. Išeinantis šaldantis vanduo.

### *1.3. pav. Soksleto ekstrakcijos sistema [29].*

tirpiklio virimo temperatūroje. Šio metodo taikymas reikalauja didelio pavojingų organinių tirpiklių kiekio, kurie daro žalą sveikatai bei aplinkai. Kitas jo trūkumas yra bandomų išgauti komponentų suirimas dėl išorinių bei vidinių faktorių: šviesos, oro, aukštos temperatūros.

**Maceracijos** proceso metu visas arba sumaltas mėginys dedamas į indą su tirpikliu ir užsandarinamas. Tuomet paliekamas kambario temperatūroje mažiausiai trims dienoms. Tirpalas yra dažnai kratomas iki tol, kol tirpios medžiagos ištirpsta. [30] Po to mišinys filtruojamas, o drėgna kieta medžiaga suspaudžiama. Likusi micelė iš augalų pašalinama naudojant slėgį arba centrifuguojant. Tačiau šiuo metodu iš augalų išekstrahuojamos ne visos veikliosios medžiagos. [31]

Soksleto ekstrakcija ir maceracija – tai dažnai naudojamos procedūros fenolinių junginių išgavimui iš kietųjų mėginių. Soksleto metodas yra taikomas 90 laipsnių temperatūroje kelių valandų bėgyje. Tuo tarpu maceracijos laikas yra kelios dienos normalioje aplinkos temperatūroje. Šie metodai yra pakankamai paprasti bei įrangos kaina yra palyginti nedidelė. Be to, jų pagalba ekstrahuojama pakankamai didelis kiekis fenolinių junginių. [27]

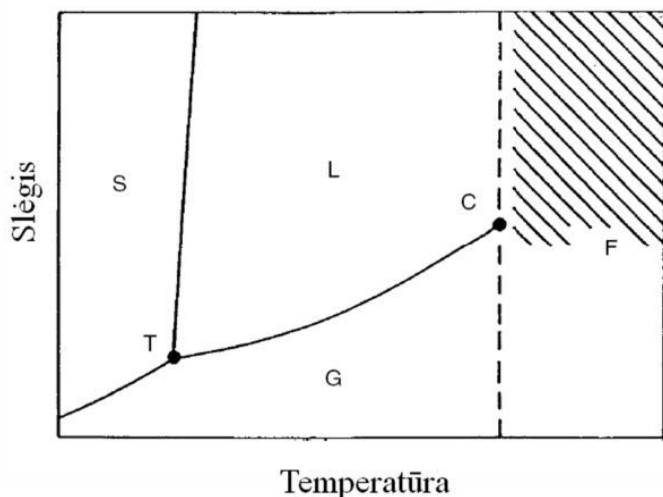
Maceracijos trūkumai tokie patys kaip ir kitų tradicinių ekstrakcijos metodų. Dėl visų šių tradicinių metodų trūkumų, atsirado kitų dažnai taikomų fenolinių komponentų ekstrakcijos technikų, tarp jų mikrobangomis skatinama ekstrakcija (MSE), ultragarsu skatinama ekstrakcija (UE), ekstrakcija superkritiniais skysčiais (SSE), ekstrakcija subkritiniais skysčiais (ESS), ekstrakcija suslėgtais skysčiais. Šie metodai sutrumpina ekstrakcijos laiką, sumažina toksinių teršalų išleidimą dėl naudojamo mažesnio organinių tirpiklių kiekio.

**Ekstrakcija superkritiniais skysčiais (SSE)** – alternatyvus ekologiškas ekstrakcijos metodas. Šios technikos dėka galime sumažinti toksiškų organinių tirpiklių kiekį, padidinti saugumą, sumažinti ekstrakcijos proceso laiką ir palengvinti ekstrakto atskyrimą nuo superkritinių skysčių. Be to, galima užkirsti kelią ekstrahuotų junginių degradacijai dėl šviesos ir oro nebuvimo, o taip pat mėginio užteršimo tirpiklio priemaišomis rizika yra daug mažesnė negu taikant kitus metodus. Nepaisant visų minėtų privalumų, didžiausias metodo trūkumas – brangi įranga. [27]

Ekstrakcijoje superkritiniais skysčiais ekstrahuojanti medžiaga yra savo superkritinėje būsenoje. Skystis yra superkritiniame būvyje tada, kai tiek jo temperatūra, tiek slėgis yra virš jų kritinio taško (**1.4. pav.**). Superkritiniai skysčiai turi unikalias savybes — tarpinę būseną tarp dujų ir skysčių, tai priklauso nuo slėgio, temperatūros ir skysčio sudėties. Jie gaunami kaitinant dujas virš jų kritinės temperatūros arba suslegiant skystį virš jo kritinio spaudimo. Keliant slėgį, didėja

superkritinių skysčių tankis ir molekulių sąveika tampa artima skystų junginių, kurie bus išekstrahuoti, molekulių sąveikai. Keliant temperatūrą padidėja ištraukiamųjų junginių garų slėgis, kas pagerina jų ištraukimą. [32] Išekstrahuotos medžiagos kondensuojasi superkritiniame tirpiklyje. [33]

Dažniausiai naudojami superkritiniai skysčiai šiame metode yra metanas, anglies



**1.4. pav.** Medžiagos fazinė diagrama. *S* – kietą medžiaga, *L* – skystis, *G* – dujos, *C* – kritinis taškas, *F* – superkritinis skystis [28]

dioksidas, etanas, propanas, etanolis, amoniakas, benzenas ir vanduo. Populiariausias superkritinis skystis yra CO<sub>2</sub> dėl jo cheminio stabilumo, sąlyginai mažo toksiškumo, jis nedegus bei nebrangus. Anglies dvideginis nesukuria paviršiaus įtampos, turi žemą kritinę temperatūrą, reikalingą termolabilių junginių ekstrakcijai ir yra lengvai atskiriamas nuo mėginio. Tačiau CO<sub>2</sub> yra nepolinis, todėl netinkamas ekstrahuojant polinius fenolinius junginius. CO<sub>2</sub> ekstrakcijos jėgos padidinimui pridedamas

polinis tirpiklis (etanolis, metanolis, etilacetatas, acetonas). [27] Šis metodas nėra pavojingas aplinkai, greitas ir nebrangus. Kietafazius bandinius galima naudoti mažais kiekiais, be to superkritinis skystis po ekstrakcijos gali būti lengvai atskiriamas mažinant slėgį arba temperatūrą. Šis bandinio paruošimo metodas sėkmingai taikomas dujų chromatografijoje.

Kalbant apie kitus fenolinių junginių ekstrakcijos metodus, reikėtų paminėti **ekstrakcijos ultragarsu (UE)** metodą, kurio metu garso bangos paveikia ląstelių sienelės pagerindamos tirpiklio prasiskverbimo procesą, ko pasekoje pavyksta ekstrahuoti didesnę junginių kiekį. Atskiriant flavonoidus ultragarsu paremta ekstrakcija yra greitas metodas, kuris gali būti naudojamas su nesimaišančių tirpiklių mišiniais: heksanas su metanolio ir vandens mišiniu (9:1). Heksano fazė koncentruoja mažiau polinius seskviterpeninius laktonus ir angliavandenilius, o vandeninė alkoholio fazė koncentruoja flavonoidus ir labiau polinius seskviterpeninius laktonus. [34]

Ultragarso technikos taikymas leidžia tai pat mažinti darbinę temperatūrą, todėl šis metodas yra daug veiksmingesnis ekstrahuojant termolabilius fenolinius komponentus. Ultragarso spinduliai, kurių dažnis aukštesnis nei 20 kHz palengvina organinių bei neorganinių junginių ekstrahavimą iš kietųjų matricių panaudojant skystus tirpiklius. Ekstrakto išgavimas priklauso ne tik

nuo sonifikacijos laiko, temperatūros ir pasirinkto tirpiklio, bet taip pat nuo bangų dažnio bei ultragarso bangų pasiskirstymo. Ultragarso yra naudojamas tiek statiška, tiek dinamiškai metoduose, kai norima išgauti fenolinius junginius iš augalų. Statiška sistema – tai kai ekstrakcija atliekama uždareme inde, kur nėra nuolatinio tirpiklio padavimo. Dinaminės ekstrakcijos atveju šviežias tirpiklis yra pastoviai tiekiamas, o tai skatina efektyvią analičių adsorbciją bei jų perėjimą į ekstrakcijos indą. Būtent nuolatinis ekstrahuotų analičių perėjimas užkerta kelią termolabilių (termiškai neatsparių) junginių suirimui. Ultragarso bangų poveikyje maži burbuliukai susidaro bandinio struktūros viduje, kurie suyra ir suardo ląstelių sienelės, atskiria ląstelių turinį. Tinkamas tirpiklis yra susimaišo su mėginiu ir yra sonifikuojamas kontroliuojamoje temperatūroje tam tikrą laiko tarpą [27].

Lyginant su kitais, USE yra vienas paprastesnių metodų dėl kelių priežasčių: nebrangi ekstrahavimo įranga, gali būti naudojamas platus tirpiklių spektras bei suteikia galimybę atlikti tyrimus su didesnio masto (platesnės skalės tyrimai) medžiagomis, susijusiomis su pramoniniais tikslais.

**Mikrobangų** skatinama ekstrakcija (ME) naudojama kietoms matricoms. Mikrobangos yra nejonizuojanti radiacija, kurios bangų ilgis svyruoja nuo 1 m iki 1 mm (dažnis nuo 300 MHz iki 300 GHz). Mikrobangų energija neveikia nepolinių tirpiklių, todėl ekstrakcijai naudojant nepolinius tirpiklius, reikia pridėti polinių priedų. [28] Mikrobangos sukelia molekulių judėjimą medžiagoje arba tirpikliuose su dipoliais. To pasekoje mėginiai sušildomi labai greitai, o indo sienelių temperatūra nepakinta. Dėl šilumos augalų ląstelės garuodamos praranda drėgmę; garų kiekis didėja ir galiausiai suplėšo ląsteles bei paleidžia jų aktyvius junginius.

ME pliusai: naudojama mažiau organinių tirpiklių, mažas ekstrakcijos laikas (dažniausiai mažiau negu 30 min.) ir didesnis ekstrahuojamų junginių kiekis. [27]

**KFE** - nepusiausvirasis procesas. Visos analitės sorbuojamos iš tekančio per kietą sorbentą skysčio, po to analitės eliuuojamos iš sorbento tinkamu tirpikliu. [28] KFE metodu junginiai gali būti ekstrahuojami iš skystų ir dujinių mėginių. Ekstrakcija naudojant kietą fazę yra panaši į chromatografinį procesą. Naudojama kolonėlė, o dar paprasčiau - nejudrios fazės pripildytas vienkartinis švirkštas. Kietosios fazės ekstrakcijos įranga - puiki mėginių ekstrakcijai, koncentracijai ir išvalymui. Jų yra labai daug dydžių, tipų ir adsorbcijų. Labai svarbu pasirinkti tinkamą įrangą bandiniui.

Kietafazės ekstrakcijos privalumai:

- mažesnė ekstrakcijos trukmė;

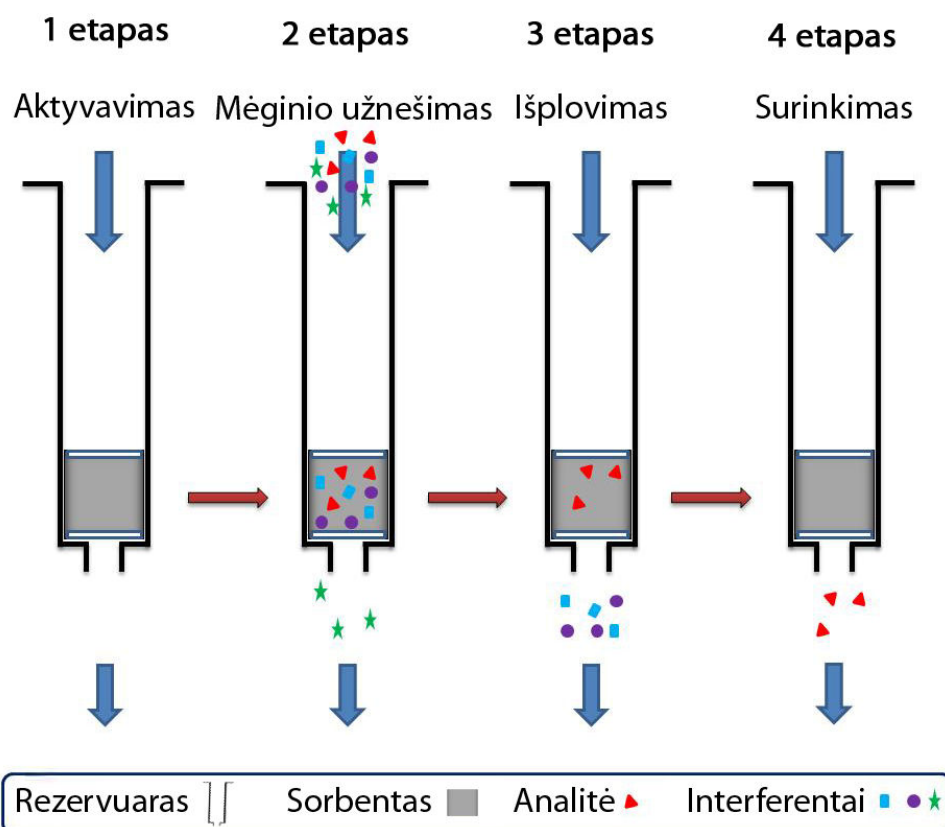
- lengvesnės darbo sąlygos;
- didesnis atkuriamumas;
- mažesnė tikimybė užteršti mėginį;
- mažos tirpiklio sąnaudos;
- geresnė izoliacija;

Ekstrakcijos aparatas vienu metu gali paruošti iki 24 bandinių. Pagrindinės jo savybės: vakuumo kontrolė per manometrą; atskiras ir lengvas tėkmės greičio nustatymas naudojant vožtuvą; stiklinis indas, dangtis ir piedai susideda iš lengvai valomų medžiagų.

Kietafazės ekstrakcijos atlikimui yra būtini keli etapai. Kad būtų galima gauti maksimalų išgavimą, jie turi būti optimizuoti.

1. **Etapas.** Kietosios fazės aktyvavimas/kondicionavimas. Tai būtina sąlyga analitės sorbcijos pakartojamumui. Dažniausiai aktyvuojama su organinio tirpiklio, tokio kaip metanolis, ir vandens mišiniu. Kaip papildomas organinis tirpiklis vartojamas vanduo arba buferis. Metanolis sudrėkina sorbento paviršių ir prasiskverbia per sujungtas alkilo fazes, leisdamas vandeniui efektyviai sudrėkinti silicio paviršių. [35]
2. **Etapas.** Mėginio užnešimas. Šiame procese analizuojama medžiaga koncentruojasi ant sorbento. Būtinai tikslus bandinio perleidimas į rezervuarą, naudojant tūrinę ar mikropipetę. Bandinys turi būti formoje, kuri yra suderinama su kietafaze ekstrakcija. [35]
3. **Etapas.** Išplovimas. Tam, kad būtų pašalintos nereikalingos silpnai sulaikomos medžiagos, reikia nuplauti rezervuarą su tirpalu, kuris stipresnis nei mėginio matrica, tačiau silpnesnis už interferentus, kuriuos siekiama pašalinti. Nuo stacionarios fazės paviršiaus nereikalingi komponentai nunešami su mažu kiekiu vandens ar buferio. Taip pat gali būti naudojamas vandeninis buferis turintis savyje mažą kiekį metanolio.
4. **Etapas.** Absorbuotų analičių surinkimas. Šiame paskutiniame kietafazės ekstrakcijos etape per švirkštą praleidžiamas mažas kiekis tirpalo, kuris pašalina analizuojamus junginius, bet palieka nepašalintas priemaišas išplovimo metu. Optimaliam tirpiklio pasirinkimui būtinos žinios apie analitės struktūrą, tirpumą, poliškumą.





**1.5. pav.** Standartinė kietafazė ekstrakcija [29].

Analičių išgavimas geriausias tada, kai mėginys kontaktuoja su rezervuaru 20 – 60 s. Svarbi maža tėkmė arba lašinimas.

KFE – plačiausiai šiuo metu skysčių chromatografijoje taikomas ekstrakcijos metodas. Ypač populiarus biologinių, biomediciniinių ir aplinkos objektų analizėje, kur labai sudėtingos mėginio matricos bei mažos analičių koncentracijos. O ekstrahuojamų analičių spektras labai platus – nuo mažų jonų iki biomolekulių.

## 1.4. Analizės metodų apžvalga

Viena svarbiausių chemijos ir biochemijos užduočių yra atskirų komponentų išskyrimas iš mišinių. Žinoma daug skyrimo metodų, tačiau dauguma standartinių metodų yra nepakankamai efektyvūs, ypač išskiriant pavienius komponentus iš gamtinių junginių mišinių. Nuolat tobulinant išskyrimo metodus, prieita prie chromatografinių metodų sukūrimo. Dabar chromatografiniai metodai naudojami tiek analitiniams, tiek preparatiniams tikslams.

Norint atlikti analizę, pirmiausia būtina atlikti analizuojamos medžiagos kokybinį ir kiekybinį įvertinimą. Flavonoidų kokybiniams tyrimams naudojama masių spektroskopija, IR bei

UV spektroskopija, kapiliarinė elektroforezė, dujų ir skysčių chromatografija. Kiekybinei flavonoidų analizei naudojama kapiliarinė elektroforezė, UV absorbcinė spektrofometrija, skysčių ir dujų chromatografija. [36]

#### 1.4.1. Spektrofotometrinė analizė

Spektrofotometrijos pagrindas yra molekulių sugerties spektro matavimas. Sugerties spektras – tai kokio nors objekto optinio tankio priklausomybė nuo tiriančios šviesos bangos ilgio. Tirpalų optinis tankis priklauso nuo tiriamos medžiagos koncentracijos, bandinio storio (optinio kelio ilgio) ir ekstinkcijos koeficiento. Kokybinė analizė paremta tuo, kad kiekviena molekulė turi charakteringą sugerties spektrą (maksimumų skaičius spektre, jų bangos ilgiai, juostos plotis ir pan.). Kiekybinė analizė paremta tiesine molekulių sugerties priklausomybe nuo koncentracijos ir sugertiems adityvumu.

Tai pakankamai lengva technika fenolinių junginių kiekio nustatymui augaluose. Folin-Denis ir Folin-Ciocalteu yra daugelį metų plačiai naudojami metodai spektrofotometrinės analizės metu. Šie metodai yra paremti chemine redukcija dalyvaujant reagentams, kurių sudėtyje yra volframo ir molibdeno (Folin – Denis ar Folin–Ciocalteufenolinis reagentas). Šios redukcijos produktai būdami kartu su fenoliniais junginiais yra mėlynos spalvos bei yra plataus šviesos absorbcijos spektro. Abiejų metodų reagentai nereaguoja su visais augaluose esančiais fenoliais, be to analizei trukdo pašalinės medžiagos tokios kaip askorbo rūgštis, aromatiniai aminai ir cukrai. [27]

#### 1.4.2. Dujų chromatografija

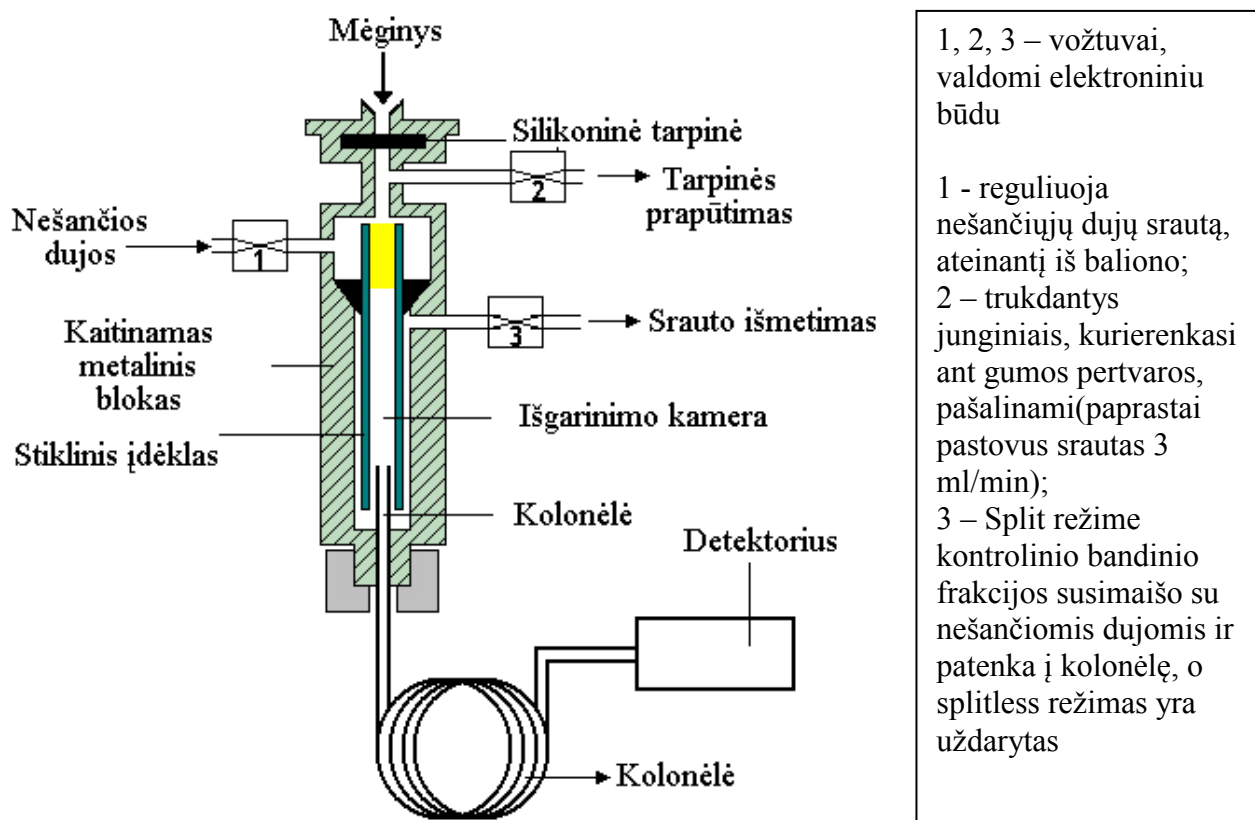
Dujų chromatografija pagrįsta skirtinga dujų ar garų mišinio sudedamųjų dalių adsorbicija pasirinkto adsorbento paviršiuje. Tai dar viena technika naudojama fenolinių junginių (flavonoidų, fenolinių rūgščių) atskyrimui ir kiekio nustatymui. Pagrindinė problema atliekant dujų chromatografijos analizę yra derivatizacija ir fenolinių junginių nepastovumas/kintamumas. GC pagalba, nustatant fenolinių junginių kiekį maisto matricose, gali būti naudojami išvalymo procesai, tokie kaip lipidų šalinimas iš ekstraktų, fenolių išleidimas iš glikozidų ir esterio junginių fermentiniuose, šarminiuose ir rūgštinguose junginiuose bei cheminiai koregavimo procesai (transformacija į nekintamus darinius). [27]

Dažniausiai naudojamos kolonėlės taikant dujų chromatografijos techniką yra lydyto silicio kapiliarai 30 m ilgio su 25 – 32  $\mu\text{m}$  vidinio skersmens ir nejudrios fazės dalelės 0.25  $\mu\text{m}$

dydžio. Naudojamos judrios fazės: He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar. Renkantis He galima didinti greitį – išeis gražios smailės. N<sub>2</sub> klampesnės už vandenilio dujas, dėl to difuzija būtų mažesnė.

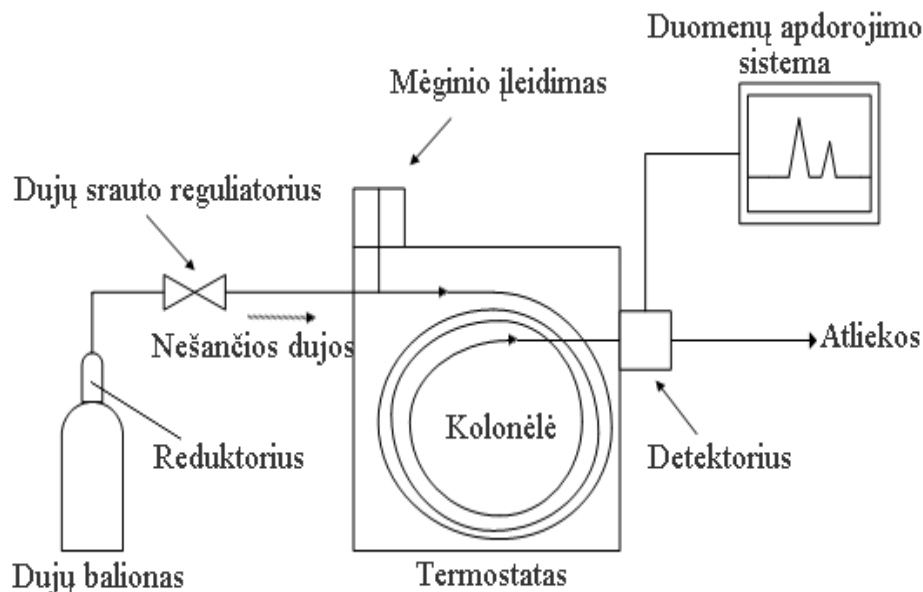
Metalinis kaitinimo blokas elektros energija kaitina 400 – 450 °C temperatūra skystus mėginius iki garinimo, o stikliniame įdėkle skystų bandinių garai.

Pateiktame penktame paveiksle darbiniam split režime visi vožtuvai atidaryti. Mėginys yra įvedamas į purkštuvą (geltona sritis) viršuje. Šis virsta garais, kurie nešančių dujų srautu keliauja į kolonėlę. Tam kompiuteriu valdomas atidaromas trečias vožtuvas norimam dalijimo santykiui reguliuoti (pvz., 1:10 – viena dalis mėginio patenka į išgarinimo kamerą, o 10 dalių išmetama srauto). 1 ir 2 vožtuvai atidaryti, 3 – uždaromas visiškai. Padalintas bandinys įterpiamas į purkštuvą viršų (geltona zona). Vyksta garavimas. Nešančių dujų paimta mėginio garų dalis keliauja į kolonėlę. [37]



1.6 pav. Schema purkštuvus split/splitless (vientisas/išsišakojęs)[37].

Dujų chromatografinėi analizei naudojami chromatografai. Jį sudaro šios pagrindinės dalys (7 pav.): nuolatinio srauto nešančiųjų dujų šaltinis; nešančiųjų dujų valymo sistemos ir greičio

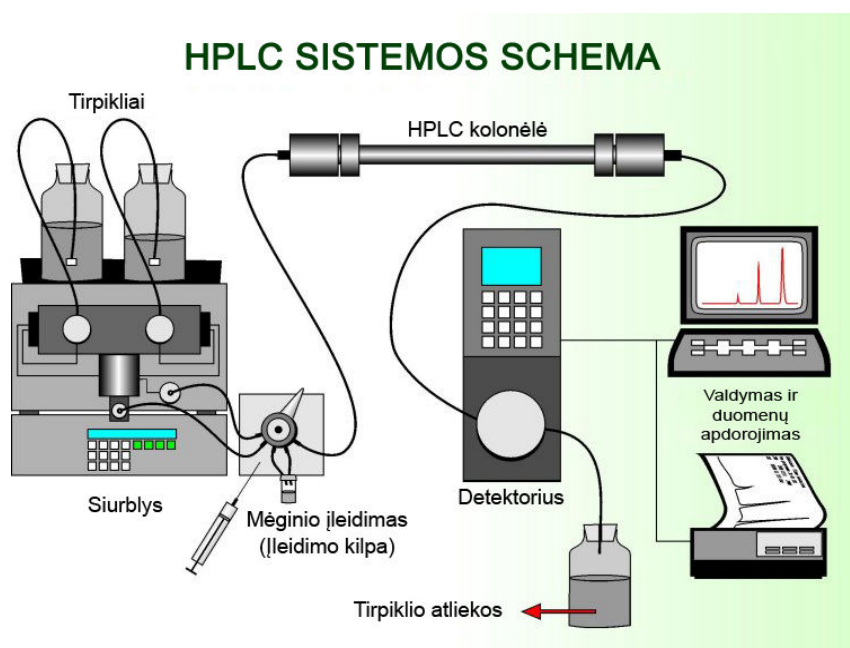


*Dujų chromatografo schema [38]*

matavimo bei reguliavimo mazgas; dozavimo prietaisas tiriamajai medžiagai įvesti; chromatografinė kolonėlė, dirbanti izoterminėmis sąlygomis arba keičiant išilgai sorbento sluoksnio temperatūrinį lauką; detektorius, fiksuojantis ištekančias iš kolonėlės atskirtas mišinio sudedamąsias dalis; prietaisas, paverčiantis detektoriaus impulsą signalu, kuris, pavyzdžiui, gali būti užrašomas popieriaus juostoje; atskirais atvejais - įrenginys atskirtoms mišinio sudedamosioms dalims surinkti. Dujos iš baliono per reduktorių nuolat tiekiamos į chromatografinį įrenginį. [39]

### 1.4.3. Efektyvioji skysčių chromatografija

Efektyvioji skysčių chromatografija – analitinės chromatografijos metodas, naudojamas



mišinių junginiams atskirti, remiantis skirtingomis junginių sulaikymo trukmėmis, kai šie su judria faze (eliuentu), kurioje būna ištirpęs tiriamasis medžiagų mišinys, pereina per stacionarią fazę (sorbentą) kolonėlėje. Mišinio komponentų atskyrimas vyksta dėl skirtingos mišinio komponentų fizikinės –

*1.8 pav. Efektyviosios skysčių chromatografijos schema.*

cheminės sąveikos su nejudria ir judria fazėmis. Chromatografinę analizę sudaro bandinio įleidimas, skirstymas, atskirų analičių detekcija ir gautų duomenų apdorojimas bei įvertinimas.

Chromatografijos metu eliucija vyksta dideliame slėgyje, procesas yra automatizuotas, labai greitas ir efektyvus. Eliucijos buferį į kolonėlę dideliu iki 400 atm slėgiu paduoda siurbliukas, todėl eliucija vyksta ypač greitai. [40] Naudojamos būtinai dvi nesimaišančios fazės (pvz., kieta – skysta, kieta – dujinė, skysta – dujinė, skysta – skysta). Atskiriami mišinio komponentai (analitės) turi tirpti judrioje fazėje ir sąveikauti su nejudria faze. Tuo tarpu pačių atskiriamų analičių sąveika su sorbentu turi būti nevienoda, nes priešingu atveju analitės nebus atskiriamos.

HPLC naudojamos 5 – 50 cm ilgio 2 – 6 mm vidinio skersmens kolonėlės, sorbentų dalelių dydis 3 – 20  $\mu\text{m}$ . Judri fazė pumpuojama siurbliu, automatiškai vyksta detektavimas ir užrašomos atskirų analičių chromatogramos.

Efektyvioji skysčių chromatografija – dažniausiai naudojamas metodas tiek fenolinių junginių atskyrimui, tiek jų kiekio nustatymui. Yra daugybė faktorių kurie įtakoja fenolių analizę taikant šį metodą, t. y. mėginio gryninimas, mobili fazė, kolonėlių tipas ir detektoriai. Išgryninti fenoliniai junginiai dedami į HPLC įrenginį panaudojant atvirkštinės fazės C8- arba C18- sujungtą silicio dioksido kolonėlę, fotodiodo detektorius ir polinius rūgštintus organinius solventus. Taipogi gali būti panaudotos kitos fazės:  $\text{SiO}_2$ , *Sephadex* ir poliamidas. Gradientinė eliucija paprastai atliekama naudojant dvikomponentę tirpiklių sistemą, t. y. vanduo su acetatu arba skruzdžių rūgšties buferis ir metanolis arba acetonitrilas kaip organinis modifikatorius. Mažiau populiarūs fosfatiniai buferiai dėl didelio jonų šaltinio užterštumo. Analizė paprastai atliekama kambario temperatūroje, tačiau kartais rekomenduojama iki 40  $^{\circ}\text{C}$  tam, kad būtų sutrumpintas analizės laikas, nes dėl termostabilių kolonėlių eliucija dažniau kartojasi. Jeigu pagrindinis tyrimo tikslas yra nustatyti dominuojančius flavonoidus mėginyje, pakanka 30 – 60 min. atskyrimui nuo 5 iki 10 junginių. Kita vertus išsamesniam tyrimui gali prireikti iki 2 val. Tokiomis sąlygomis atskiriama ir identifikuojama nuo 30 iki 50 junginių vienu mėginio įleidimu. [41]

HPLC yra greitas, ekonomiškasis chromatografijos būdas, nes galima išskirti ir aptikti mažus medžiagų kiekius, todėl naudojamas biochemijos, molekulinės biologijos, biotechnologijos, farmacijos, eksperimentinės medicinos laboratorijose. [40] Šio analizės metodo geras efektyvumas ir didelė skiriamoji geba, labai greitas atskyrimas, puikus jautris, galimybė automatizuoti analizės procesą.

Pastebėta, jog cukrai molekulės struktūroje fenolinius junginius daro tirpesnius vandenyje, todėl tirpiklių maišymas su vandeniu ekstrakciją daro efektyvesnę. [42] Atlikti tyrimai su avietėmis, šeivamedžio uogomis, gervuogėmis, girtuoklėmis, spanguolėmis, mėlynėmis ir kitomis valgomomis uogomis, pvz., analizuojant fenolinius junginius gervuogėse tarp flavonolių dominavo kvercetas ir

kaempferolis. Naudojant neigiamos jonizacijos masių spektrometriją fenolinis uogų ekstraktų profilis buvo pakankamai skirtingas, kadangi vandens ekstrakto buvo aptikti tik trys junginiai. Teigiamu MS režimu pavyko aptikti panašų antocianinų profilį. [43]

Iš spanguolių buvo sėkmingai išskirtas ir identifikuotas kvercetas HPLC ir DCh-MS metodais. [44]

## 2. EKSPERIMENTO METODIKA

### 2.1. Medžiagos ir tirpikliai

Šiame tiriamajame darbe buvo naudotos šios cheminės medžiagos ir tirpikliai.

Grynos etaloninės medžiagos įsigytos iš *Sigma-Aldrich (Steinheim, Vokietija)*:

- 1) Kvercetas (QU) CAS-Nr. 117-39-5; grynumas  $\geq 98.0\%$ ;
- 2) Miricetas (MR) CAS-Nr. 529-44-2; grynumas  $\geq 96.0\%$ ;
- 3) Kaempferolis (KP) CAS-Nr. 520-18-3; grynumas  $\geq 90\%$ .

Naudoti tirpikliai:

- 1) Dejonizuotas vanduo- pasigamintas laboratorijoje, panaudojant turimą vandens gryninimo sistemą NANOpure Infinity (*Barnstead, JAV*)
- 2) Metanolis (MeOH) ESCh grynumo *Merck (Vokietija)*;
- 3) Skruzdžių rūgštis (HCOOH), 98 - 99% grynumo *Scharlau Chemie (Belgija)*;
- 4) Acetonitrilas (AcN) ESCh grynumo *Merck (Vokietija)*;
- 5) Etanolis (EtOH) ESCh grynumo *Merck (Vokietija)*;
- 6) Etilacetatas (EtAc) ESCh grynumo *Merck (Vokietija)*.

## 2.2. Aparatūra

### 2.2.1 Skysčių chromatografinė sistema

Tyrimai buvo atliekami efektyviosios skysčių chromatografijos sistema Agilent LC 1100 Series (*Agilent Technologies, JAV*), kuri buvo sudaryta iš: nudujinimo įrenginio, keturių kanalų siurblio, įvedimo sistemos su rankiniu vožtuvu, kolonėlių termostato, atvirkščių fazių chromatografinės kolonėlės ir spektrofotometrinio fotodiodinės matricos detektoriaus.



*2.1 pav. Skysčių chromatografinė sistema*



## 2.2.2. Naudota pagalbinė įranga ir sąnaudinės medžiagos:

Svėrimai buvo atliekami analitinėmis svarstyklėmis *KERN 770* (Vokietija);

Automatinės pipetės (Eppendorf, Vokietija);

Matavimo kolbutės 25 mL ir 50 mL;

Purtyklė (Stuart, Vokietija);

Filtrai: vienkartiniai 0,45 µm PTFE;

Azotas tirpikliams nugarinti buvo pagamintas, panaudojant azoto dujų generatorių *Nitro Flow Lab* (Parker Filtration, JAV);

Vanduo buvo distiliuojamas *GFL2002* (Vokietija) distiliatoriumi, vėliau gryninamas *NANOpure Infinity* (*Barnstead*, JAV) dejonizacijos sistema;

## 2.3. Tyrimo objektai

Pasirinkti bandiniai buvo įsigyti vaistinėje Lietuvoje:

- 1) Džiovinti mėlynių lapai ir ūgliai (Lietuva);
- 2) Džiovintos mėlynių uogos (Lietuva);
- 3) Maisto papildas C (MPC) (*JSC Olainfarm*, Latvija);
- 4) Maisto papildas L (MPL) (*UAB Aconitum*, Lietuva).

## 2.4. Metodikos

Darbas atliktas VMTI Fizinių ir technologijos mokslų centro Cheminės metrologijos laboratorijoje. Analizė buvo atlikta remiantis straipsnyje „Optimization of matrix solid-phase dispersion extraction for the chromatographic analysis of flavones in cranberries“ [45] nurodytomis analizės sąlygomis, rekomenduojamomis flavonoidų nustatymui.

### 2.4.1. Tirpalų ruošimas ir ekstrakcija

#### 2.4.1.1. Mėlynių lapai ir ūgliai

Analizei buvo naudoti pirkti vaistinėje džiovinti mėlynių lapai ir ūgliai. Bandiniai sveriami po 1g tiriamojo objekto ir užpilama po 20 ml tirpiklio:

- 1) 100 °C temperatūros dejonizuotas vanduo;
- 2) Kambario temperatūros (22°C) dejonizuotas vanduo;
- 3) MeOH/vanduo tirpalas (70/30) su 0,5 % skruzdžių rūgšties priedu;

- 4) MeOH/vanduo tirpalas (30/70) su 0,5 % skruzdžių rūgšties priedu;
- 5) Metanolis (MeOH);
- 6) Acetonitrilas (ACN);
- 7) Etanolis (EtOH);
- 8) Etil acetatas (EtAc).

Mėginiai purtomi purtyklėje 30 min. Paskui filtruojami vienkartiniais 0,45 μm PTFE filtrais.

I. bandinio paruošimo būdas:

Tiriamieji tirpalai (kiekvienas atskirai) skiedžiami 100 kartų: į 2 ml tūrio mėgintuvėlį įpilant 990 μl MeOH ir 10 μl paruošto mėginio tirpalo.

II. bandinio paruošimo būdas:

Tiriamieji tirpalai (kiekvienas atskirai) skiedžiami 50 kartų: į 2 ml tūrio mėgintuvėlį įpilant 980 μl MeOH ir 20 μl paruošto mėginio tirpalo.

III. bandinio paruošimo būdas:

Tiriamieji tirpalai (kiekvienas atskirai) skiedžiami 10 kartų: į 2 ml tūrio mėgintuvėlį įpilant 900 μl MeOH ir 100 μl paruošto mėginio tirpalo.

#### 2.4.1.2. *Džiovintos mėlynių uogos*

Pirktos vaistinėje džiovintos mėlynių uogos bandiniams ruošti naudotos dviem būdais:

- I. būdas: pasverta po 1g tiriamojo objekto (džiovintų mėlynių uogų);
- II. būdas: prieš sveriant po 1 g mėlynių uogos, sutrintos grūstuvėje.

Analizei tirpalai buvo ruošiami tokiu pačiu principu kaip tai buvo daroma mėlynių lapų ir ūglių atveju. Mėlynių uogos buvo užpilamos tokios pačios sudėties tirpikliais. Mėginiai purtomi purtyklėje 30 min.

#### 2.4.1.3. *Maisto papildai*

Dviejų rūšių maisto papildų kapsulių milteliai sveriami atskirai po 0,5 g. Mėginiai ruošiami analogiškai kaip aprašyta prieš tai 2.4.1.1 skyrelyje.

#### 2.4.1.4. *Etaloninių tirpalų gamyba*

Kvercetino, miricetino ir kaempferolio etaloninės medžiagos buvo pasveriamos po 5 mg (atskirai) ir tirpinama 25 ml MeOH. Metodo optimizavimui buvo naudoti 10 kartų skiesti (į 2 ml tūrio mėgintuvėlį įpilant 900 μl MeOH ir 100 μl paruoštos etaloninės medžiagos) tirpalai.

Kalibravimo grafiko sudarymui buvo naudota serija iš šešių etalonių tirpalų suskirtingom koncentracijom nuo 1 µg/g iki 50 µg/g

#### 2.4.2. Kietafazė ekstraktija (KFE)

Paruošti džiovintų uogų ir maisto papildų bandiniai išvalomi, pasinaudojant kietafaze ekstraktija. Tam tikslui buvo naudojamos Sep-Pak C18 500 mg 6 cc KFE kolonėlės su C18 sorbento užpildu (*Waters, JK*). Iš turimų literatūros duomenų buvo pasirinktos tokios sąlygos:

1. **etapas:** pirmiausia buvo užpilami 5 ml 100% dejonizuoto H<sub>2</sub>O aktyvavimui. Vandenuo efektyviai sudrėkina silicio paviršių;
2. **etapas:** užnešama 10 ml mėginio. Analizuojama medžiaga koncentruojasi ant sorbento. Tiksliai bandinys perleidžiamas į rezervuarą, naudojant mikropipetę;
3. **etapas:** praplaunama 1 ml 100% dejonizuotu H<sub>2</sub>O. Nuo stacionarios fazės paviršiaus nereikalingi komponentai nunešami su mažu kiekiu vandens;
4. **etapas:** surenkama 5 ml 80% MeOH. Per švirškštą praleidžiamas mažas kiekis tirpalo, kuriuo surenkami analizuojami junginiai, bet paliekamos nepašalintos priemaišos išplovimo metu.

#### 2.4.3. Optimizuotos chromatografinės sąlygos

**Injekcijos tūris:** 20 µL;

**Detekcija:** 370 nm (galima naudoti ir 380 nm);

**Eliuentas A:** 0,5 % skruzdžių rūgšties tirpalas dejonizuotame vandenyje;

**Eliuentas B:** metanolis, parūgštintas 0,5 % skruzdžių rūgštimi;

**Judrios fazės srauto greitis palaikomas pastovus** - 1 mL/min;

**SPE kietafazės ekstraktijos kolonėlė:** Sep-Pak Vac C18 6cc.

**Prieškolonėlė:** *Zorbax Eclipse XDB-C18* 12,6 mm x 4,6 mm (Agilent Technologies, JAV);

**Kolonėlė:** Atvirkščių fazių *Zorbax Eclipse XDB-C18* (Agilent Technologies, JAV) 150 mm x 4,6 mm, C18 sorbento dalelių dydis 5 µm.

Mėginiai buvo įvedami, panaudojant 20 µL kilpą. Tirpiklių sistema: eliuentas A – 0,5 % skruzdžių rūgšties tirpalas dejonizuotame vandenyje, eliuentas B – metanolis, parūgštintas 0,5 %

skruzdžių rūgštimi. Nustatymui naudotas eliuavimo gradientinis metodas, nurodytas 3 lentelėje, detekcija – 370 nm (ref 360 nm), srauto greitis - 1,0 mL/min, termostatuojama 22°C.

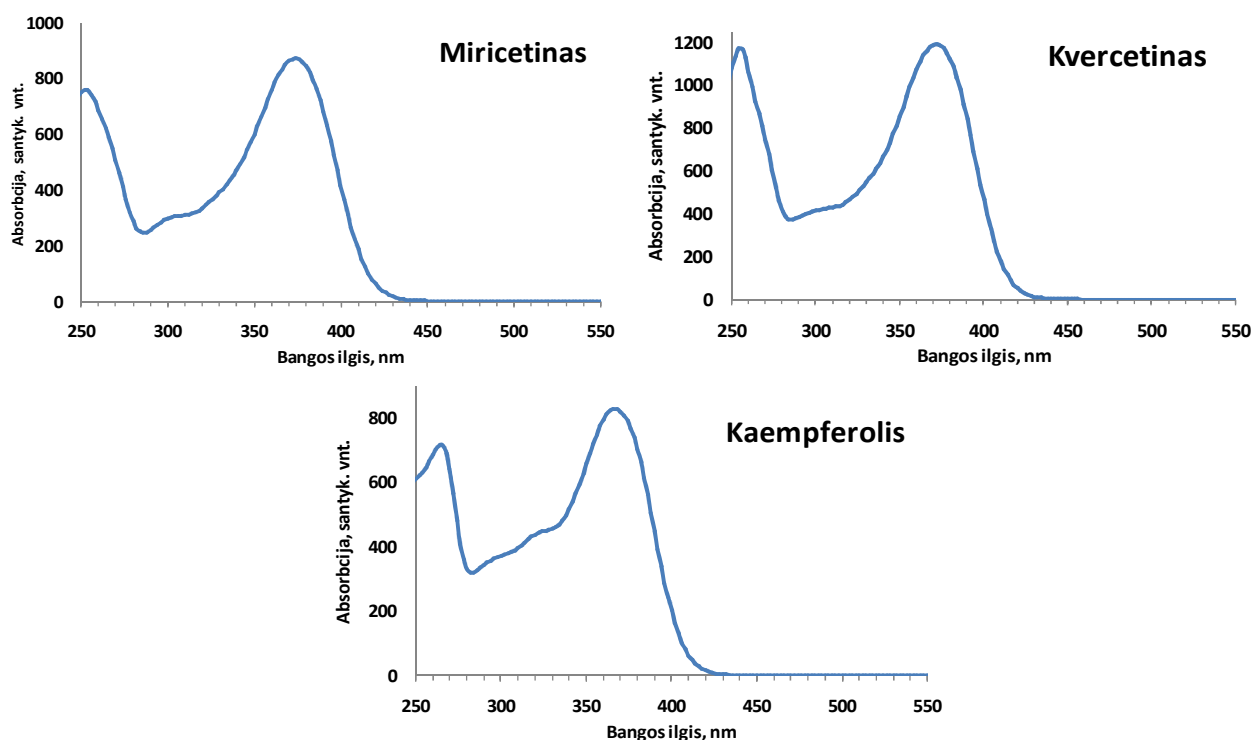
**3 lentelė:** Gradientinis eliuavimo metodas.

<b>Laikas, min.</b>	<b>Eliuentas A, %</b>	<b>Eliuentas B, %</b>
0	70	30
7	50	50
10	40	60
16	30	70
20	10	90

### 3. REZULTATŲ APTARIMAS

#### 3.1. Flavonolių atskyrimo ir nustatymo sąlygų parinkimas ir optimizavimas

Pirmame etape buvo siekiama parinkti optimalius bangos ilgius, kuriuose ne tik modelinių, bet ir kitų flavonolių esančių realiuose objektuose absorbcija būtų maksimali. 3.1 pav. pavaizduoti modelinių flavonolių absorbcijos spektrai, išmatuoti PDA detektoriumi. Tolimesniems tyrimams buvo pasirinkta absorbcijos detekcija 370 nm bangos ilgyje, kai analičių (miricetino, kvercetino ir kaelimpferolio) absorbcijos signalų intensyvumas buvo maksimalus. Iš ankstesnių tyrimų atliktų Cheminės metrologijos laboratorijoje buvo žinoma, kad realių objektų ekstraktų tyrimuose miricetinui detektuoti, kartais trukdo matricos elementai (signalas persikloja su kitais dviem junginiais esančiais ekstraktuose), todėl miricetino atveju galima taikyti detekciją 380 nm bangos ilgyje.



**3.1 pav.** Flavonolių (25 µg/g) absorbcijos spektrai išmatuoti PDA detektoriumi

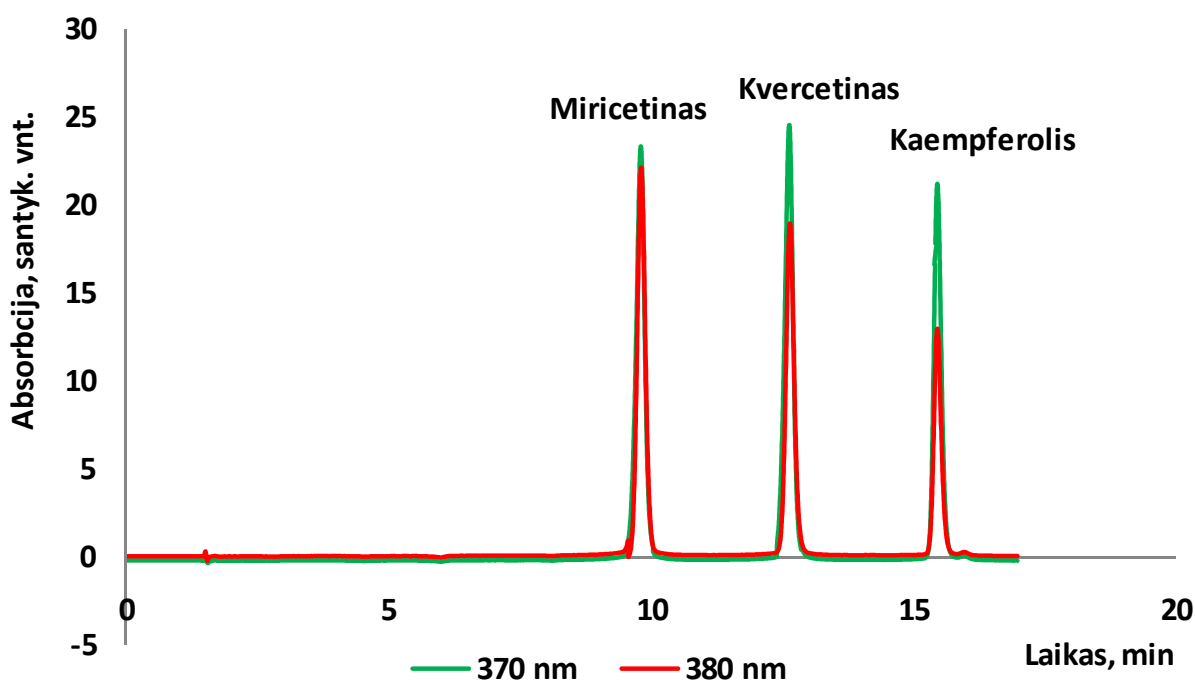
Nors pasirinktų tyrimams analičių (miricetino, kvercetino ir kempferolio) poliškumai yra skirtingi ir šias analites būtų galima atskirti pritaikius izokratinį atskyrimo režimą, darbe naudojome eliuacijos gradientą. Gradientinis režimas leidžia pilnai atskirti įvairius skirtingo poliškumo flavonolius per 16 min. Gradientinis atskyrimas buvo optimizuotas atsižvelgiant į gerą skyra,

priimtinas sulaikymo trukmes bei smailių simetriškumą. 3.1 lentelėje pateikta optimizuota gradientinės flavonolių eliucijos programa.

**3.1 lentelė.** *Judrios fazės gradiento formavimo programa*

Trukmė, min	99,5 % MeOH, parūgštintas 0,5% skruzdžių rūgštimi,%
0,0	30
7.0	50
12.0	60
16.0	70
18.0	70

Trijų flavonolių analičių atskyrimą gradientiniu režimu iliustruoja 3.2 pav. pateikta chromatograma, kurioje matome pilnai perskiriamas 10 µg/g koncentracijos modelinio mišinio smailes.



**3.2 pav.** *Flavonolių standartinio mišinio (10 µg/g) atskyrimas naudojant optimizuotą gradientinį eliucijos režimą: Kolonėlė – Zorbax Eclipse ZDC C-18, 150×4,6 mm, 5 µm. Tekmės greitis – 1000 µl, λ=370 ir 380 nm.*

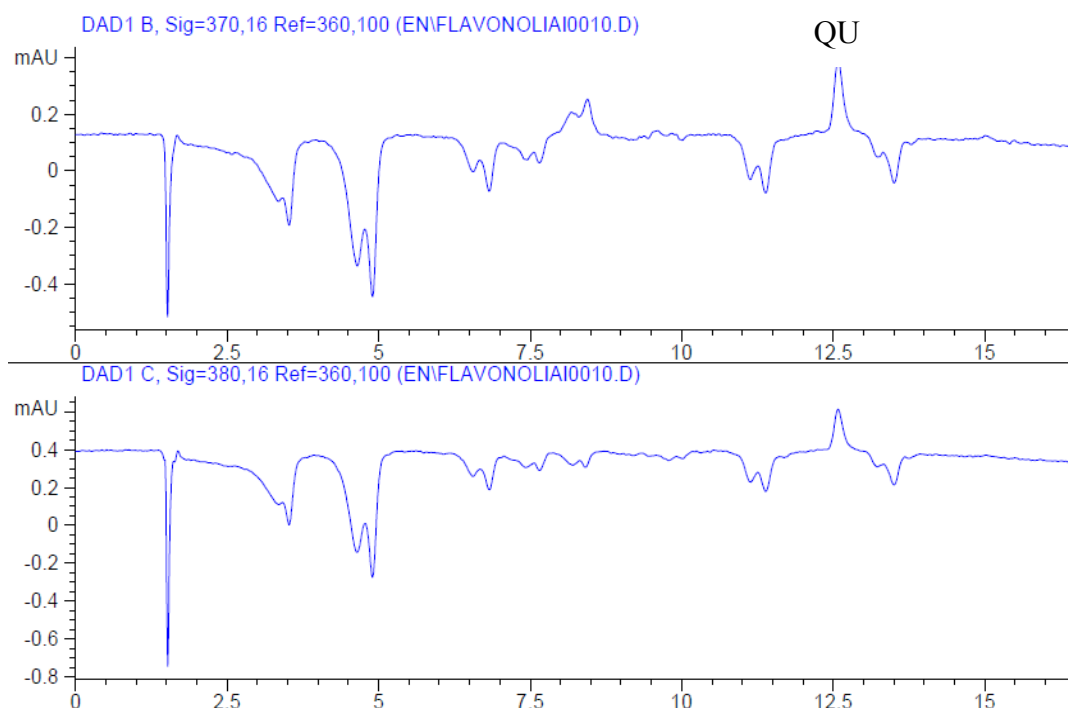
### 3.2. Analčių ekstrahcijos sąlygų tyrimas

Ekstrahcijos efektyvumui labai svarbu tinkamo tirpiklio parinkimas. Tinkamai pasirinktas ekstrahuojantis tirpiklis turi atitikti šiuos reikalavimus: turi gerai ekstrahuoti analites; tirpiklio

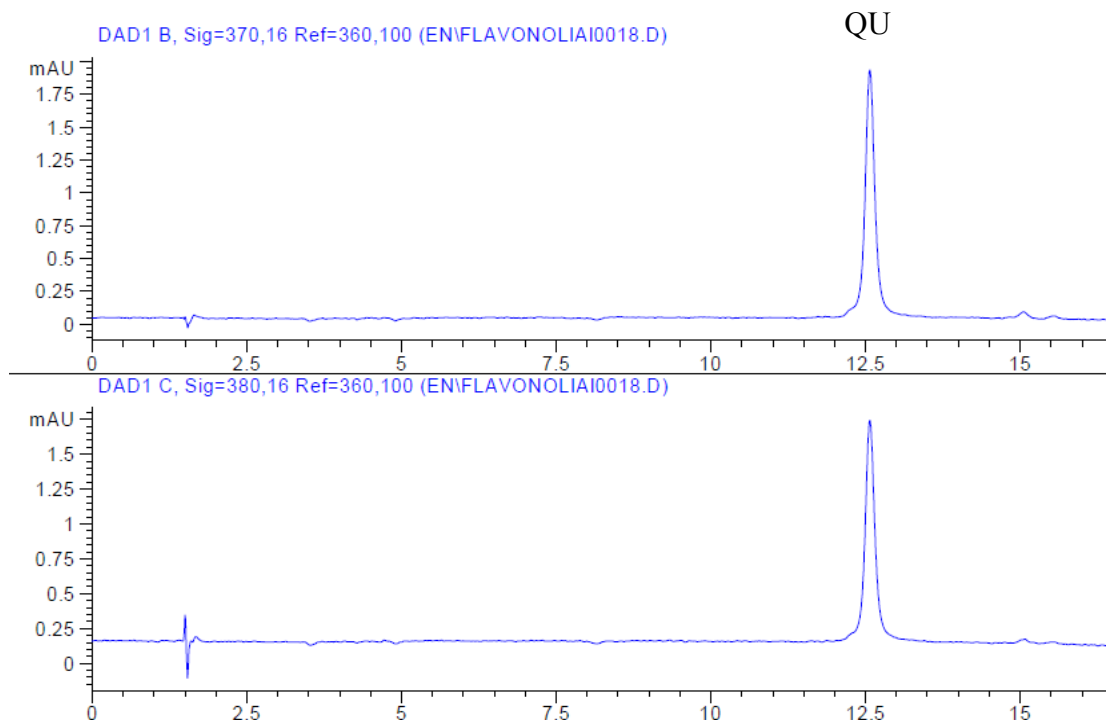
smailė chromatogramoje turi gerai atsiskirti nuo analičių smailių; tirpiklis turi būti suderinamas su skysčių chromatografijos kolonėle.

Optimizuojant sąlygas buvo pasirenkami skirtingi organiniai tirpikliai. Pradinėmis sąlygomis buvo pasirinktas grynas MeOH. Bet dalis aktyvių junginių tirpūs labiau poliniuose tirpikliuose ir todėl neišekstrahuojami su pakankama išgava gryname metanolyje.

Tyrimų metu buvo palyginta ekstrahuojančio tirpiklio prigimties įtaka mėginių ekstrakcijos efektyvumui. Kadangi šios trys analitės yra panašių savybių, be to miricetino ir kaempferolio signalai ne visuose bandiniuose buvo aptinkami (šių medžiagų dažniausiai būna mažiau, nei kvercetino), tai optimizavimas buvo vykdomas remiantis kvercetino (QU) rezultatais. Buvo tiriami ir palyginami penki ekstrahentai: dejonizuotas vanduo 100°C ir kambario temperatūroje (22°C), MeOH/vanduo tirpalas (30/70) su 0,5 % skruzdžių rūgšties priedu, MeOH/vanduo tirpalas (70/30) su 0,5 % skruzdžių rūgšties priedu ir grynas MeOH. Ekstrakcija vykdoma 30 min purtyklėje, kaip aprašyta 2.4.1 skyrelyje. Paskui naudojama kietafazė ekstrakcijos (KFE) procedūra mėginių išvalymui, panaudojant C18 kolonėlę (*Waters, JK*). KFE procedūra šio baigiamojo darbo metu nebuvo optimizuojama, nes šie tyrimai jau buvo atlikti laboratorijoje prieš tai ir buvo panaudota KFE eiga ir sąlygos aprašytos 2.4.3 skyrelyje [45]. 3.3 ir 3.4 paveiksluose pateikiami chromatogramų pavyzdžiai, kuriuose matyti KFE įtaka analičių nustatymui.



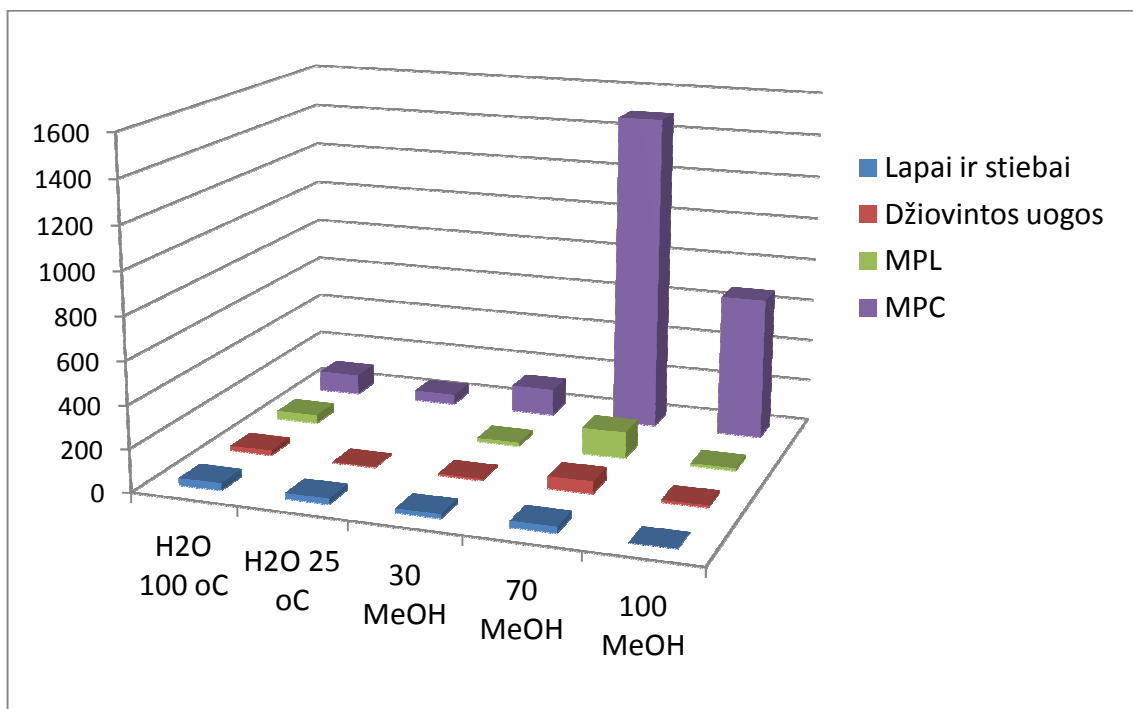
**3.3 pav. Džiovintų mėlynių uogų ekstrakto chromatograma (ekstraktas nufiltruotas per 0,45  $\mu$ m filtrą, praskiestas 50 kartų su metanoliu ir 20  $\mu$ L įvesta į chromatografą analizei). QU-kvercetino smailė.**



**3.4 pav. Džiovintų mėlynių uogų ekstrakto chromatograma (mėginiui atlikta KFE išvalymo procedūra, po kurios 20  $\mu$ L įvesta į chromatografą analizei). QU- kvercetino smailė.**

Iš šių paveikslų matome, kad panaudojus KFE su C18 kolonėle, apie 10 kartų pagerėjo kvercetino analitės jautris dėl sukonzentravimo efekto ir matricos įtakos pašalinimo, išvalant mėginį.

Ekstrakcijos optimizavimo rezultatai pateikiami 3.5 pav.:



**3.5 pav. Kvercetino smailių plotų priklausomybė nuo ekstrahuojančio tirpiklio prigimties, sudėties ir sąlygų, skirtingiems bandiniams (džiovinti lapai ir ūgliai, džiovintos uogos bei maisto papildų milteliai).**



Iš gautų rezultatų matyti, kad geriausias ekstrakcijos efektyvumas skirtingoms matricoms yra pasiekiamas, panaudojant MeOH ir dejonizuoto vandens tirpalą santykiu 70/30 su 0,5 % skruzdžių rūgšties priedu. Taigi būtent šios sudėties tirpiklis buvo naudojamas tolimesniems tyrimams.

### **3.3.Flavonolių nustatymo metodo taikymas augalinių ekstraktų ir maisto papildų analizei**

Sukurtas, iširtas ir optimizuotas pasirinktų flavonolių ekstrakcijos ir nustatymo skysčių chromatografijos metodas pritaikytas augalinių ekstraktų bei maisto papildų analizei. Siekiant atlikti kokybinę maisto papildų ir mėlynių analizę buvo naudojama efektyvioji skysčių chromatografija, formuojant gradientinę eliuciją ir analizei naudojant pasirinktus bandinius (žiūr. 2.3 skyrių). Atliekant kokybinę analizę, siekiant patvirtinti nustatytą analizę, mėginiai buvo įleidžiami su kvercetino, miricetino ir kaempferolio etaloninių tirpalų priedu.

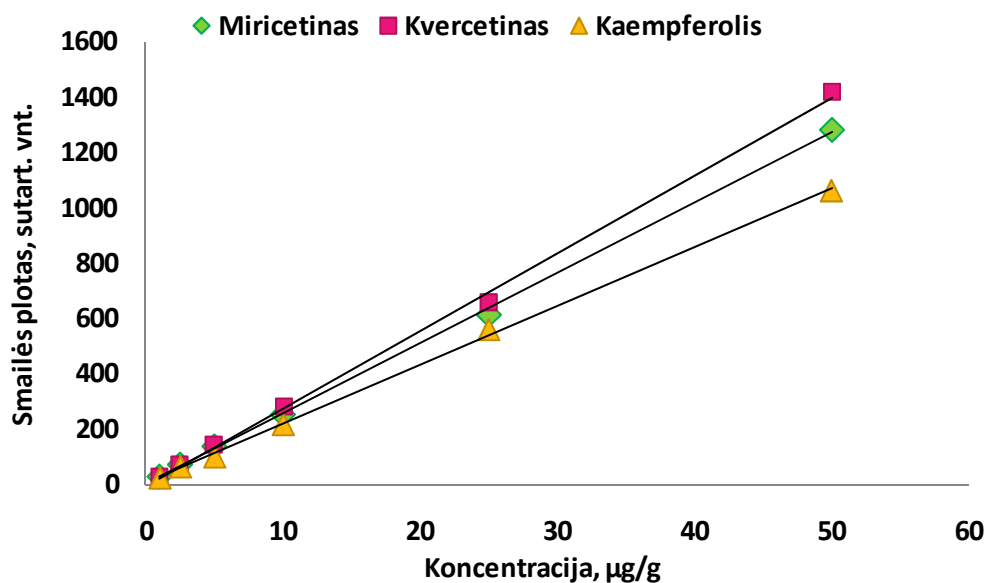
#### **3.3.1. Metodo analizinių charakteristikų nustatymas**

Norėdami atlikti metodo patvirtinimą, buvo įvertintos šios charakteristikos: atrankumas kitiems flavonoliams, kalibracinės kreivės tiesiškumas, aptikimo riba (AR), nustatymo riba (NR), pakartojamumas, glaudumas ir teisingumas (vidinis laboratorijos atkuriamumas).

Flavonolių kiekybiniam nustatymui buvo sudarytas kalibracinis grafikas, panaudojant pasigamintą etaloninių tirpalų seriją, skiedžiant pradinį etaloninį tirpalą. Atsižvelgiant į galimus analizių kiekius mėginiuose buvo pasirinktos šešios skirtingos koncentracijos: 1; 2,5; 5; 10; 25 ir 50  $\mu\text{g/g}$ . Visi analizuoti junginiai parodė gerą tiesiškumą ( $r^2 > 0,998$ ) matuotame intervale.

Kalibravimo grafikai visoms trimis analizėms yra pateikti 3.6 paveiksle.

Visame analizuotame koncentracijų intervale (1- 50  $\mu\text{g/g}$ ) smailių ploto priklausomybė nuo koncentracijos buvo tiesiška (3.2 lentelė).



**3.6 pav.** Pasirinktų flavonolių (QU, MR ir KP) kalibravimo grafikai. Chromatografinės sąlygos kaip aprašyta 2.4.3 skyrelyje, judrios fazės greitis 1mL/min., detekcija 370 nm, kolonėlės temperatūra 22 °C, injekcijos tūris 20 µL

Apskaičiuotos aptikimo (AR) ir nustatymo (NR) ribos įvertinamos lyginant išmatuotą turimos koncentracijos etalono smailės aukštį su bazinės linijos triukšmu ir nustatant minimalią koncentraciją, kada analizė gali būti patikimai aptikta, t.y. atskirta nuo bazinės linijos triukšmo (3x SN) ir kiekybiškai nustatyta (10x SN) (3.2 lentelė):

**3.2 lentelė:** Flavonolių koreliacijos koeficientai, regresijos lygtys, aptikimo ir nustatymo ribos, kai (n=3).

Analitė	Tiesės lygtis	Koreliacijos koeficientas ( $r^2$ )	Aptikimo riba *, µg/g	Nustatymo riba *, µg/g
Miricetinas	$y=0,026x - 0,001$	0,999	0,08	0,1
Kvercetas	$y=0,027x - 0,001$	0,999	0,08	0,1
Kaempferolis	$y=0,021x + 0,002$	0,998	0,04	0,07

\* – AR ir NR apskaičiuotos pagal PDA duomenis.

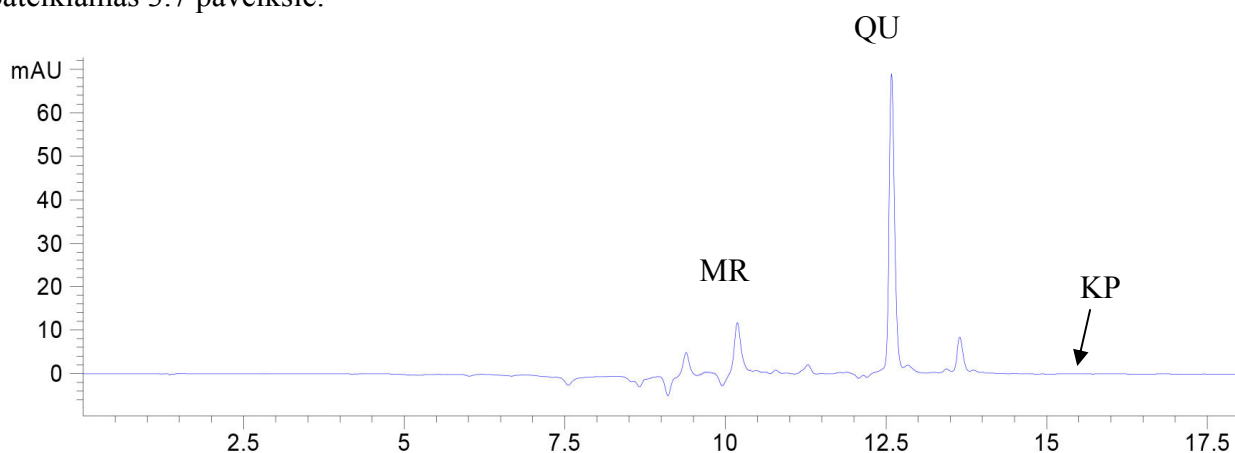
Pasirinktų etaloninių tirpalų gautos smailių išėjimo trukmės nurodytos 3.3 lentelėje.

**3.3 lentelė:** Flavonolių analizių sulaikymo trukmės

Junginiai	Sulaikymo trukmė, min.
MR	9,6
QU	12,5
KP	15,5

### 3.3.2. Maisto papildų analizė

Ištyrus metodo pagrindines analizes charakteristikas, buvo atlikta pasirinktų maisto papildų analizė. Pasirinkti bandiniai buvo įsigyti vaistinėje Lietuvoje: "Maisto papildas C" (MPC) (*JSC Olainfarm, Latvija*) ir "Maisto papildas L" (MPL) (*UAB Aconitum, Lietuva*)- tikrieji pavadinimai neatskleidžiami. Bandinių kapsulėse esantys milteliai buvo pasveriami po vidutiniškai 0,5 g ir mėginiai ruošiami taip kaip aprašyta 2.4.1.1 skyrelyje. Užrašytos chromatogramos pavyzdys pateikiamas 3.7 paveiksle.



**3.7 pav.** Optimizuotu metodu gauto maisto papildų MPL ekstrakto chromatograma. Sąlygos, kaip aprašyta 2.4.3. skyrelyje.

Apibendrinti pasirinktų dviejų maisto papildų tyrimų rezultatai pateikti žemiau esančioje lentelėje. Nustatytos koncentracijos perskaičiuotos ir išreikštos veikliosios medžiagos masė mg vienoje papildų kapsulėje.

**3.4 lentelė.** Miricetino, kvercetino ir kaempferolio nustatymas maisto papilduose

Analitė	Nustatyta veikliosios medžiagos masė papildų kapsulėje ± SN, mg (n=3)	
	MPC *	MPL
Miricetinas	< NR	0,5 ± 0,1
Kvercetinas	26,2 ± 3,1	8,4 ± 1,2
Kaempferolis	< NR	< NR

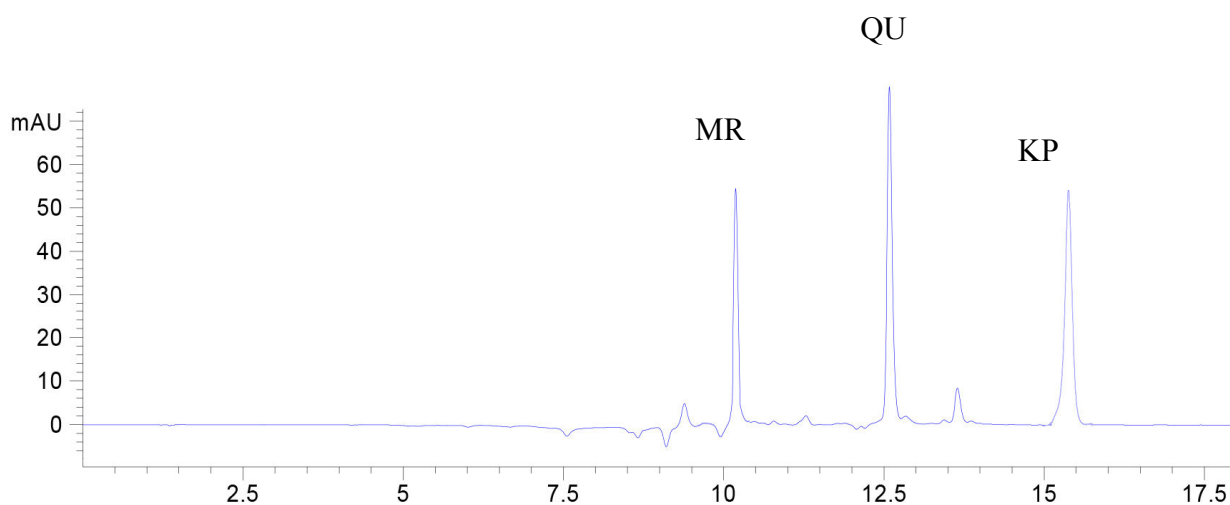
\* **Pastaba:** maisto papildų MPC gamintojas etiketėje nurodo, kad vienoje kapsulėje gaminio yra 30 mg kvercetino.

Siekiant palyginti flavonolių kiekį natūraliuose produktuose vaistinėje buvo įsigytos džiovintų mėlynių lapų - ūglių bei džiovintų mėlynių uogų arbatos (Lietuva). Ištyrus šiuos bandinius mėlynių lapuose ir ūgliuose visų analičių koncentracija buvo žemiau jų nustatymo ribų (mėginiai paruošti kaip aprašyta 2.4.1.1 skyrelyje). Džiovintose mėlynių uoguose (mėginiai paruošti kaip aprašyta 2.4.1.2 skyrelyje) pavyko nustatyti kvercetiną, kurio koncentracija siekė  $43,4 \pm 3,6$   $\mu\text{g/g}$ .

### 3.3.3. Išgavos tyrimai

Baigiamojo darbo metu buvo atlikti išgavos tyrimai. Analizės metodo teisingumas paprastai vertinamas optimizuotomis metodo sąlygomis, analizuojant sertifikuotųjų pamatinių medžiagų mėginius su tiksliai sertifikuotomis analitės ar kelių analičių koncentracijomis. Jei tokių pamatinių medžiagų nėra galimybės įsigyti, tai gali būti atliekamas išgavos testas su „tuščiu“ bandiniu, kuriame nėra nustatomos analitės. Šiame tiriamajame darbe susidūrėme su problema, kad ne tik nėra tinkamų pagamintų pamatinių sertifikuotųjų medžiagų, bet taip pat nėra panašios matricos mėginių, kuriuose nebūtų tiriamųjų analičių. Todėl buvo nuspręsta mėginio matricos įtaką metodo analizinėms charakteristikoms įvertinti analitės priedo metodu, atimant prieš tai nustatytą analičių koncentraciją ir tuomet apskaičiuojant išgava pagal "prieda- rasta" principą.

Į kiekvieną maisto papildą MPL miltelių mėginio porciją buvo pridedamas žinomas kiekis flavonolių etaloninio mišinio (dviejų skirtingų koncentracijų t.y. 2,5 ir 10,0  $\mu\text{g/g}$ ), o po atliktų ekstrakcijos ir išvalymo KFE procedūrų, mėginiai buvo išanalizuoti ir apskaičiuotos išgavos. **3.8** paveiksle pavaizduotos ekstrakto su 10  $\mu\text{g/g}$  standartų priedu chromatogramos.



**3.8 pav. MPL papildo ekstrakto su etaloninio mišinio 10  $\mu\text{g/g}$  koncentracijos priedu chromatogramos.**

3.4 lentelėje pateikti flavonolių nustatymo MPL papildo milteliuose rezultatai ir etalonų mišinio priedo išgavos. Praščiausius išgavos rezultatus parodė kaempferolis, nors nustatymo rezultatų santykinis standartinis nuokrypis - ne didesnis 10%. Greičiausiai tokį rezultatą nulėmė tai, kad šis junginys turi tik viena -OH funkcinę grupę "B" aromatiniame žiede ir jo sąveika su sorbentu KFE atlikimo metu skiriasi nuo kvercetino ir mirecetino. Taigi nemaža dalis analitės prarandama mėginio išvalymo metu.

*3.5 lentelė. Miricetino, kvercetino ir kaempferolio išgavos testo rezultatai*

Analitė	Išgava $\pm$ SSN, % (n=3)	
	Pridėta 2,5 $\mu$ g/g	Pridėta 10,0 $\mu$ g/g
Miricetinas	98 $\pm$ 4	99 $\pm$ 6
Kvercetinas	105 $\pm$ 8	102 $\pm$ 7
Kaempferolis	56 $\pm$ 10	69 $\pm$ 5

Puikius rezultatus gavome su miricetinu – jo išgavos yra labai artimos 100 procentų abiems pridėtiems šios analitės koncentracijoms. Kvercetino išgava viršija 100 % ir tai sietina su atliktų matavimų sklaida.

## IŠVADOS

1. Tiriamojo darbo metu išnagrinėti ir apžvelgti flavonolių analizės augaliniuose ekstraktuose ir maisto papilduose metodai. Buvo pasirinktos tokios optimalios miricetino, kvercetino ir kaempferolio analizių atskyrimo ir nustatymo sąlygos: injekcijos tūris: 20 µL; detekcija: 370 nm (galima naudoti ir 380 nm); eliuentas A: 0,5 % skruzdžių rūgšties tirpalas dejonizuotame vandenyje; eliuentas B: metanolis, parūgštintas 0,5 % skruzdžių rūgštimi; judrios fazės srauto greitis palaikomas pastovus - 1 mL/min; kolonėlė *Zorbax Eclipse XDB-C18* (Agilent Technologies, JAV) 150 mm x 4,6 mm, C18 sorbento dalelių dydis 5 µm. su prieškolonėle *Zorbax Eclipse XDB-C18* 12,6 mm x 4,6 mm (Agilent Technologies, JAV);
2. Optimizuota flavonolių ekstrakcija iš mėlynių lapų ir ūglių, džiovintų mėlynių uogų bei maisto papildų. Geriausi rezultatai gauti, kai ekstrahuojančio tirpiklio sudėtis buvo MeOH/vanduo (70/30), ekstrakcija vykdoma kambario temperatūroje 30 min purtyklėje.
3. Mėginio išvalymui buvo taikyta optimizuota laboratorijoje KFE procedūra, panaudojant C18 kolonėlę, kuri apie 10 kartų pagerino nustatomų analizių jautrius dėl sukonzentravimo ir matricos įtakos pašalinimo.
4. Ištirtos pagrindinės analizinės metodo charakteristikos optimaliomis sąlygomis.
5. Sukurtas ir ištirtas metodas sėkmingai panaudotas komercinių maisto papildų (MPL ir MPC), sudėtyje turinčių mėlynių, analizei kvercetino masė vienoje kapsulėje MPL ir MPC papildų atitinkamai siekė  $8,4 \pm 1,2$  mg ir  $26,2 \pm 3,1$  mg. Nustatytos išgavos svyravo nuo 56 % kaempferoliui iki 105 % kvercetinui.

**Otilija Ivinska**

DETERMINATION OF FLAVONOLS IN FOOD SUPPLEMENTS  
USING LIQUID CHROMATOGRAPHY

Master Thesis

**Research adviser:**

*Assoc. Prof., Dr. Evaldas Naujalis*

**SUMMARY**

Flavonols belong to a class of flavonoids that includes kaempferol, quercetin, myricetin, and isorhamnetin. They are plant-based metabolites that are believed to provide beneficial effects to the cardiovascular system, although which compounds provide benefit and what the specific benefits are remain controversial according to some scientists.

The aim of the Master's thesis is to create, analyse and optimise the extraction and high performance liquid chromatography (HPLC) quantification method and apply it for the analysis of blueberry plant extracts and food supplements with blueberries. Blueberry leaves and stems, dried berries, food supplements 'MPL' and 'MPC' used for the analysis were purchased in a pharmacy. The samples were extracted at 100 °C and at room temperature (22 °C) using deionised water and at room temperature (22 °C) using MeOH/water (70/30), MeOH/water (30/70) and MeOH as extraction solvents. A solid phase extraction method was applied for extracts clean-up procedure. The separation of flavonols was done by High Performance Liquid Chromatography system with C18 column. HPLC was performed using gradient elution: two components system (A: MeOH acidified with 0,5% of formic acid and B: deionised water acidified with 0,5% of formic acid) was used as mobile phase. The detection using DAD was performed at 370nm wavelength.

After the qualitative and quantitative analysis of the samples, traces of quercetin and myricetin were found. However, no kaempferol was detected. Quercetin levels were the highest in supplement 'C' samples and the lowest in blueberry leaves and stems. The study shows that the optimised HPLC method can be successfully applied in the analysis of this kind of food supplements.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Chalker-Scot L. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology*, 1999;70(1): p. 1-9
2. Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5(31): p. 6697-6703
3. Lafuente A. G., Guillamon E., Mauricio A. V., Rostagno A., Martinez J. A.. Flavonoids as antiinflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research* 2009. 58: p. 537–552
4. Majumdera S., Srirangama R.. Potential of the bioflavonoids in the prevention/treatment of ocular disorders. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010. 62(8)
5. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005. 81: 317S-325S
6. C. Heiss, C. L. Keens, M. Kielm. Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Herat journal.* 2010
7. Yamazaki KG, Romero – Perez D, e. c. Short and long term effects of epicatechin on myocardial ischemia – reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008. 295: H761-H767
8. Indrė Špokienė. Vaistų ir maisto papildų teisinio apribojimo teoriniai ypatumai ir praktinės problemos. 2011. p. 772
9. Ana Daukševič. Maisto papildų notifikavimas – vartotojų labui. *Isveikata.lt.* 2014
10. <http://naturalus.sveikas.lt/lt/naturalus-vaistai/vaistazoles/melyne/>
11. [http://www.sos03.lt/Vaistazoles/Paprastoji\\_melyne\\_2010](http://www.sos03.lt/Vaistazoles/Paprastoji_melyne_2010)
12. [http://www.mpe.lt/lt/mpe/medziagos,id,Melyne\\_2009](http://www.mpe.lt/lt/mpe/medziagos,id,Melyne_2009)
13. <http://www.vaistazoles.lt/index.php?id=3&print=1>
14. [http://www.sveikasmogus.lt/Maistas-2688\\_2011](http://www.sveikasmogus.lt/Maistas-2688_2011)
15. Harborne J.B. Flavonoids in the environment: structure-activity relationships, in *Plant flavonoids in biology and medicine; Biochemical, cellular and medicinal properties.* Chapman and Hall: London, 1993. p. 17 – 27
16. Bohm B. Introduction to flavonoids. p. 45
17. Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Antioksidant phenolics in oriental medicine. *Active oxygens, lipid peroxides and antioxidants.* Tokyo, 1993. p. 333 – 346
18. <http://sveikasesu.lt/tag/karotenoidai/>



19. <http://lt.wikipedia.org/wiki/Flavonoidai>
20. Williamson G, Sies H, Heber D, et al. Functional foods for health promotion: state-of-the-science on dietary flavonoids Extended abstracts from the 12 Annual Conference on Functional Foods for Health Promotion, April 2009. *Nutr Rev.* 2009;67: p.736-743
21. <http://nutrition.ucdavis.edu/content/infosheets/fact-pro-flavonol.pdf>
22. Miliauskas G. Screening, isolation and evaluation of antioxidative compounds from *Geranium macrorrhizum*, *Potentilla fruticosa* and *Rhaponticum carthamoides*. Thesis Wageningen University. Dissertation, 2006
23. Seema Bhagwat, David B. Haytowitz, and Joanne M. Holden (ret.). USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 3.1. Nutrient Data Laboratory Beltsville Human Nutrition Research Center Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture. May 2014. p. 28, 31, 60, 67, 83
24. Keller, Raymond B. In: Nutrition and Diet Research Progress Series. Flavonoids: biosynthesis, biological effects and dietary sources. New York : Nova Science Publishers. 2009
25. Ding, P., Liao, X. and Shi, B. Adsorption chromatography separation of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin using cross-linked collagen fibre as the stationary phase. 2013. p. 1575
26. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/mono73-23.pdf>
27. Ali Khoddami, Meredith A. Wilkes, Thomas H. Roberts. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules.* 2013. p. 2330-2340
28. Vida Vičkačkaitė. Ekstrakciniai mėginio paruošimo dujų chromatografinėi analizei metodai. 2008. p. 20, 27
29. Paolo Lucci, Deborah Pacetti, Oscar Núñez and Natale G. Frega. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, Dr. Leonardo Calderon (Ed.). 2012
30. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. Extraction Technologies for Medical and Aromatic Plants. 2008
31. V. Camel. Recent extraction techniques for solid matrices - supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst.* 2001, 126, 1182–1193
32. Coates, P.M., Blackman, M.R., Cragg, G.M., Levine, M., Moss, J., White, J.D. (Ed), *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Marcel Dekker, New York, NY. 2005. p. 580

33. Thomson Healthcare. PDR for Nutritional Supplements. Thomson Health Care Inc. Montvale, NJ. 2001. p.392
34. Qyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group, 2006
35. Bulletin 910. Guide to Solid Phase Extraction
36. S.P. Wang, K.J. Huang. Determination of flavonoids by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of Chromatography. A. 2004.1032:p. 273-279
37. <http://www.chimiamediuului.ro/tag/cromatografie/> 2015
38. [http://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography](http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography)
39. R. Sinkevičius. Prieskoninių augalų, eterinių aliejų sudėties tyrimas, panaudojant skirtingus ekstrakcijos metodus. Magistrinis darbas. 2012. p. 27
40. S. Sasnauskienė, R. Firantienė, V. Jablonskienė. Chromatografijos metodai ir jų taikymas. Laboratorinė medicina. 2012. p. 36
41. Evade Rijke, Pieter Out, Wilfried M.A. Niessen, Freek Ariese, Cees Gooijer, Udo A.Th. Brinkman. Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of Chromatography. 2006. 1112: p. 38
42. Miknienė I., Milašienė R., Ratautaitė V., Ragažinskienė O., Prosevičius J., Kornyšova O., Maruška A. Vaistinių augalų cheminės sudėties tyrimas. Biomedicinos mokslai. Kaunas. 2008. p. 94
43. Sandra C. Gouveia-Figueiraa,b, Paula C. Castilho Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSn and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. 2015 p. 39
44. Hao Chen, Yuegang Zuo Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit. 2006 p. 1363
45. A. Linkevičiūtė, R. Butkienė, E. Naujalis. Optimization of matrix solid-phase dispersion extraction for the chromatographic analysis of flavones in cranberries. Chemija. Lietuvos mokslų akademija. Vilnius 2013. p. 217-222

## **PADĖKA**

Dėkoju VMTI Fizinių ir technologijos mokslų centro Cheminės metrologijos laboratorijai už suteiktas galimybes tiriamojo darbo metu naudotis sąnaudinėmis medžiagomis, reagentais ir įranga.