

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

AUŠRA LINKEVIČIŪTĖ

**LIPIDŲ SAVITVARKIŲ SKYSTAKRISTALIŲ SISTEMŲ SU
ĮTERPTAIS FLAVONOIDAIS KŪRIMAS IR CHARAKTERIZAVIMAS**

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2015 metai

Disertacija rengta 2010 – 2014 metais Vilniaus universitete, Analizinės ir aplinkos chemijos katedroje ir Fizinių ir technologijos mokslų centre, Cheminės metrologijos laboratorijoje.

Mokslinis vadovas – doc. dr. Evaldas Naujalis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

Mokslinis konsultantas – dr. Justas Barauskas (AB „Camurus“, Lundas, Švedija ir Malmės universitetas, Malmė, Švedija, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

*“If we knew what it was we were doing,
it would not be called research, would it?”*

Albert Einstein

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	9
1 LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1 Fenoliniai junginiai	12
1.1.1 Funkcinis maistas ir nutraceutikai	12
1.1.2 Flavonoidai	13
1.1.3 Spanguolės – natūralus flavonoidų šaltinis	16
1.2 Flavonoidų ir kitų fenolinių junginių ekstrakcijos ir nustatymų metodai augalinėje matricoje	19
1.2.1 Flavonoidų ir kitų fenolinių junginių ekstrakcija iš uogų	19
1.2.2 Flavonoidų ir kitų fenolinių junginių nustatymas	21
1.2.3 Kietafazė disperguojamoji ekstrakcija	26
1.3 Lipidų savitvarka	30
1.3.1 Lipidinės pernašos sistemos	30
1.3.2 Lipidų savitvarka ir polimorfizmas	32
1.3.3 Rentgeno spindulių difrakcijos taikymas lipidinių sistemų tyrimuose	35
1.3.4 Flavonoidų įterpimas į lipidų pagrindu sukurtas sistemas	39
2 EKSPERIMENTO METODIKA	43
2.1 Reagentai ir medžiagos	43
2.2 Mėginių paruošimo procedūros	44
2.2.1 Kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos procedūra	44
2.2.2 Lipidų skystakristalių fazių pirmtakų paruošimas	45
2.2.3 Lipidų skystakristalių fazių paruošimas	45
2.2.4 Disperguotų lipidų skystakristalių nanodalelių paruošimas	45
2.2.5 Kvercetino stabilumo tyrimai	46
2.2.6 Antioksidacinio aktyvumo nustatymas naudojant DPPH [•] radikalo surišimo testą	46

2.3	Įranga ir matavimo sąlygos	47
2.3.1	Efektyvioji skysčių chromatografija-masių spektrometrija.....	47
2.3.2	Poliarizuojančios šviesos mikroskopija.....	48
2.3.3	Mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija.....	48
2.3.4	Dinaminė šviesos sklaida ir zeta potencialas.....	49
2.3.5	Kriogeninė transmisinė elektroninė mikroskopija.....	49
2.3.6	Antioksidacinio aktyvumo nustatymas spektrofotometriniu metodu.....	50
3	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	51
3.1	Flavonolių nustatymas ESCh-MS metodu, panaudojant KDE.....	51
3.1.1	Flavonolių detektavimo ir atskyrimo sąlygų tyrimas	51
3.1.2	KDE sąlygų tyrimas	55
3.1.3	Metodo tinkamumo įvertinimas	60
3.1.4	Flavonoidų nustatymo KDE-ESCh-MS metodais apibendrinimas	64
3.2	Lipidų skystakristalių sistemų su įterptu kvercetinu paruošimas ir charakterizavimas.....	65
3.2.1	Modelinio junginio QU tirpumas lipidų mišiniuose.....	65
3.2.2	Pilnai hidratuotos SPC/GDO skystakristalės fazės su įterptu kvercetinu...	67
3.2.3	Disperguotų lipidų SPC/GDO skystakristalių fazių nanodalelės su įterptu kvercetinu	71
3.2.4	Kvercetino stabilumo tyrimai lipidų SPC/GDO pirmtakuose, SK fazėse ir disperguotose LSKN.....	77
3.2.5	Lipidų skystakristalių sistemų su įterptu kvercetinu apibendrinimas.....	79
3.3	Spanguolių flavonoidų įterpimas į lipidų skystakristales sistemas ir sistemų charakterizavimas.....	80
3.3.1	Natūralių flavonoidų įterpimas į lipidų skystakristales sistemas.....	80
3.3.2	Antioksidacinio aktyvumo palyginimas skirtingose lipidinėse pernašos sistemose su įterptais flavonoidais	87
	IŠVADOS.....	90

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS.....	92
PADEKA.....	93
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	94

SANTRUMPOS

- a – gardelės parametras
 $2D-H_2$ – dvimačio periodiškumo atvirkštinė heksagoninė fazė
 $3D-H_2$ – trimačio periodiškumo atvirkštinė heksagoninė fazė
ACN – acetonitrilas
AcOH – acto rūgštis
AR – aptikimo riba
APCI – atmosferos slėgio cheminė jonizacija (*angl. term.*)
C8 – oktasilikagelis
C18 – oktadecilsilikagelis
 d – tarpplotuminis kartotinis atstumas
DGMO – diglicerolio monooleatas
DPPH[•] – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas
ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija
EtOH – etanolis
 $Fd\bar{3}m$ – atvirkščių micelių kubinė fazės erdvinė grupė
GDO – glicerolio dioleatas
GME – glicerolio monooleato eteris
GMO-50 – glicerolio monooleatas
KDE – kietafazė disperguojamoji ekstrakcija
Krio-TEM – kriogeninė transmisinė elektroninė mikroskopija
 L_2 – atvirkštinių micelių fazė
LSK – lipidų skystakristalis
LSKN – lipidų skystakristalės nanodalelės
 L_α – skystųjų kristalų lamelinė fazė
MeOH – metanolis
MS – masių spektrometrija
NR – nustatymo riba
 $P6_3/mmc$ – 3D heksagoninės fazės erdvinė grupė

P80 – Polioksitileno (20) sorbitano monooleatas, Polisorbatas 80, stabilizuojantis agentas, emulsiklis

PC – fosfatidilcholinas

PDA – skenuojantis fotodiodinės matricos detektorius

PPM – paliudyta pamatinė medžiaga

SAXD – mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija

SCh – skysčių chromatografija

SK – skystasis kristalas, skystakristalis

SSN – santykinis standartinis nuokrypis

SPC – sojos fosfatidilcholinas

TE – Trolokso ekvivalentai

TEAC – Troloksui ekvivalentiška antioksidantinė galia (angl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*)

Troloksas – (±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetra-metilchroman-2-karboksi rūgštis

V_2 – besitęsianti atvirkštinė kubinė fazė

q – sklaidos vektorius

QU – kvercetas (*angl. Quercetin*)

3FR – III frakcijos flavonoidai

4FR –IV frakcijos flavonoidai

ĮVADAS

Pastaruoju metu spanguolės kelia vis didesnę visuomenės susidomėjimą kaip funkcinis maistas, skirtas sveikatos gerinimui. Šiose uogose gausiai kaupiasi flavonoidai, kurie labiausiai žinomi kaip gamtiniai antioksidantai, gebantys žmogaus organizme surišti laisvuosius radikalus. Bioaktyvūs flavonoidai taip pat pasižymi priešvėžinėmis, antivirusinėmis, priešuždegiminėmis savybėmis, stabdo senėjimo procesus organizme. Kadangi šie junginiai yra paveikūs išoriniams faktoriams (deguonis, UV-spinduliuotė, temperatūra, vanduo ir pan.), vartojant kaip funkcinį maistą ar nutraceutikus, gali neturėti laukto teigiamo poveikio sveikatai. Todėl šiuo metu svarbu ne tik sukurti ir pritaikyti naujus analizės metodus augalinės kilmės medicininiams preparatams tirti ir kontroliuoti, bet taip pat sukurti naujas stabilias pernašos sistemas, kurios tarnautų kaip tikslinės medžiagos nešikliai.

Šiuo požiūriu, nanoporėtos lipidų skystakristalės fazės pasižymi dideliu vidiniu paviršiaus plotu ir tarnauja kaip matrica patalpinimui, apsaugai ir reikiamam medžiagos atpalaidavimui. Pernašos sistemų, sukurtų lipidų pagrindu, pagrindinė funkcija yra didinti transportuojamų biologiškai aktyvių medžiagų biologinį prieinamumą. Tuo pačiu lipidų savitvarkis nešiklis gali maksimaliai padidinti veikliosios medžiagos tirpumą, stabdyti agregaciją ir kristalizaciją, užtikrinti ilgalaikę įterpto junginio apsaugą nuo degradacijos.

Darbas pagrįstas biologiškai aktyvių junginių analizinių charakteristikų tyrimu, jų elgsenos lipidinėse skystakristalėse fazėse įvertinimu bei potencialiu pritaikymu biosistemų nešiklių maisto, kosmetikos ir (ar) farmacijos pramonėje. Atsižvelgus į tai, suformuluotas pagrindinis šio darbo tikslas bei darbo uždaviniai šiam tikslui įgyvendinti.

Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas – išsamiai ištirti ir pritaikyti kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos ir efektyviosios skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodus flavonolių nustatymui spanguolėse ir jų produktuose. Taip pat lipidų skystakristalių sistemų, suformuotų sojos fosfatidilcholino (SPC), glicerolio

dioleato (GDO) ir vandens pagrindu, su įterptais mažamolekuliniais biojunginiais – flavonoidais struktūrinių savybių ir cheminio stabilumo tyrimai.

Darbo uždaviniai:

1. Optimizuoti flavonolių (miricetino, kvercetino ir kaempferolio) atskyrimą ir identifikavimą ESCh-MS metodu sąlygas.
2. Ištirti ir optimizuoti KDE metodą flavonolių išskyrimui iš liofilizuotų natūralių spanguolių miltelių.
3. Įvertinti KDE-ESCh metodo analizes charakteristikas ir pritaikyti naujas sistemas realių mėginių analizei.
4. Įvertinti įvairių lipidų mišinių tirpinamąją gebą modeliniam junginiui – flavonoliui kvercetinui ir KDE metodu išskirtiems natūraliems spanguolių ekstraktams.
5. Nustatyti modelinio junginio – kvercetino ir spanguolių ekstrakto esančių flavonoidų poveikį pilnai hidratuotų lipidų SPC/GDO skystakristalių sistemų fazių virsmams.
6. Ištirti kvercetino ir spanguolių ekstrakto esančių flavonoidų įtaką disperguotų lipidų SPC/GDO skystakristalių fazių nanodalelių dydžiui ir jų stabilumui.
7. Ištirti įterpto kvercetino cheminį stabilumą trijose lipidų SPC/GDO pagrindu sukurtose sistemose (pirmtakuose, SK fazėse ir disperguotose LSK nanodalelėse).
8. Palyginti antioksidacinį aktyvumą skirtingose lipidinėse pernašos sistemose su įterptais flavonoidais.

Ginamieji teiginiai

1. Flavonolių ekstrakcijos procedūra iš augalinės kilmės matricos KDE metodu yra greitesnė, efektyvesnė ir paprastesnė už iki šiol taikytus skystafazės ir kietafazės ekstrakcijos metodus.

2. Pritaikytas KDE metodas leidžia atlikti greitesnį flavonoidų chromatografinį atskyrimą ir (ar) kiekybinę analizę.
3. Į lipidų savitvarkės skystakristales sistemas galima įterpti didelius kiekius flavonoidų.
4. Lipidų savitvarkės skystakristalės sistemos apsaugo bioaktyvias medžiagas nuo degradacijos.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Fenoliniai junginiai

1.1.1 Funkcinis maistas ir nutraceutikai

Ilgą laiką augalinės kilmės produktus žmogus naudojo kaip profilaktinę priemonę nuo įvairių ligų. Hipokratas (460-370 pr. m. e.) yra pasakęs: „Leisk maistui tapti vaistu ir vaistas taps maistu“ (*angl.* „Let food be the medicine and medicine be the food“). Prieš 20 metų pradėtas naudoti terminas „nutraceutikai“, siekiant apibūdinti sąsają tarp maisto ir vaistinių preparatų, kurie turi teigiamą poveikį žmogaus sveikatai [1]. Mokslinėje aplinkoje pastaruoju metu smarkiai išaugo publikacijų skaičius, kuriose pateikiami įvairūs tyrimai, susiję su funkciniu maistu ir nutraceutikais [2]. Jie abu priskiriami prie sveikatinimosi produktų. Juose esantys biologiškai aktyvūs junginiai didina atsparumą susirgimams bei gerina daugelį žmogaus organizmo fiziologinių procesų. Tarp nutraceutikų ir funkcinio maisto nėra aiškios ribos, o pagrindinis skirtumas yra tik forma, kuria jie vartojami. Kai fitocheminiai junginiai yra įtraukiami į mitybą ir vartojami kaip maisto produktai – tuomet tai laikoma funkciniu maistu, o jei pateikiami maisto papildų forma (kapsulėmis, piliulėmis, tabletėmis ir pn.) – nutraceutikais [3]. Pastebėjus, kad kai kurie augalinės kilmės maisto produktai sumažina lėtinių ligų riziką, nustatyta, jog tai susiję su tuose produktuose esančiais antriniais metabolitais (fitocheminiais junginiais). Nepaisant to, kad šie metabolitai nėra tokie biologiškai aktyvūs kaip farmaciniai vaistai, vartojant juos reguliariai ir gausiai (kaip mitybos dalį), pastebėtas ilgalaikis fiziologinis poveikis. Yra visa eilė biologinių mechanizmų, kurių dėka nutraceutikai įtakoja patofiziologinius mechanizmus [3]. Šie produktai yra gerokai saugesni ir turi mažesnę šalutinį poveikį, nei daugelis sintetinių medikamentų, be to jie yra gerai toleruojami. Tačiau dažnai yra brangūs, nėra vykdoma farmacijos lygio gamybos kontrolė ir kartais gali būti net neveiksmingi ar net pavojingi sveikatai.

Dar viena problema, su kuria susiduria nutraceutikų gamintojai yra tai, kad veikliosios medžiagos cheminė sudėtis ir kiekis augaluose priklauso nuo

klimato, metų laiko, temperatūros, drėgmės ir kitų išorinių faktorių. Augalinės žaliavos surinkimas, identifikavimas ir joje esančių junginių kokybinė ir kiekybinė kontrolė yra esminiai faktoriai, užtikrinantys saugų ir efektyvų nutraceutikų vartojimą. Pažangių analizinių metodų pritaikymas nutraceutikų tyrimuose yra būtinas. Tai taip pat svarbu naujų nutraceutikų identifikavimui, juose esančių junginių cheminės struktūros ir biologinio aktyvumo nustatymui, kiekybinei junginių analizei pradinėje žaliavoje, produkto gamybos eigoje ir galutiniame produkte.

Turint omenyje šiuos paminėtus aspektus, aptarsime bioaktyviems junginiams priklausančios fenolinių junginių šeimos savybes, ekstrakcijos ir nustatymo metodus augalinėse matricose, didžiausią dėmesį skiriant flavonoidams, kurie gausiai kaupiasi spanguolėse.

1.1.2 Flavonoidai

Fenolinių junginių klasė apima daugiau kaip 5000 junginių, kurie skirstomi į 12 poklasių. Šie junginiai susidaro daržovėse, vaisiuose, grybuose ir kai kuriose bakterijose, kaip vykstančių biocheminių procesų antriniai metabolitai. Vieni iš jų yra svarbūs augalų fiziologinėms funkcijoms, kiti naudojami savisaugai stresinėse situacijose, taip pat privilioti ar apsiginti nuo kitų organizmų [4]. Maiste šie junginiai veikia kaip pigmentai, antioksidantai, skonio/aromato pirmtakai [4, 5]. Šiomis dienomis jie siejami su dietinėmis savybėmis, nuo kurių mažėja cukraus kiekis kraujyje, krinta kūno svoris [6], taip pat pasižymi priešvėžinėmis [7, 8], antitrombogeninėmis [9, 10], priešuždegiminėmis savybėmis, stabdo senėjimo procesus organizme [11]. Tačiau pagrindinė ir svarbiausia fenolinių junginių funkcija išlieka jų antioksidacinės savybės.

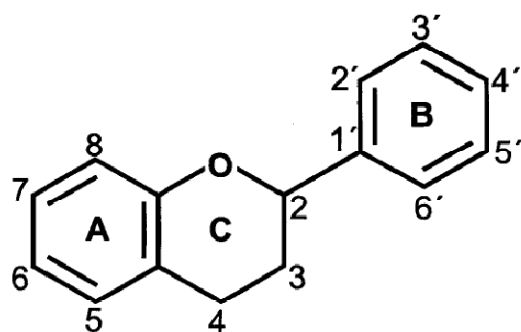
Pagrindinis skirtumas tarp *bioaktyvių fenolinių junginių*, kurie gali veikti kaip nutraceutikai, ir *kitų fenolinių junginių*, nepasižyminčių bioaktyvumu, yra jų metaboliniai keliai. Pirmieji junginiai susidaro dviem būdais: šikimato rūgšties būdu (septynių žingsnių sintezė) ir (arba) acetato/malonato sintezės

būdu [12]. Dažniausiai fenoliniai junginiai susijungia tarpusavyje arba prisijungia glikozidus. Fenolinius junginius paprastai galima suskirstyti į šias 4 grupes [4]: 1) benzendioliai (paprasciausios struktūros, kurių pagrindas yra hidroksifenolis); 2) fenolinės rūgštys (gaunamos iš benzoinės (C6-C1) arba cinamono (C6-C3) rūgščių, kai fenolinės rūgštys susijungia į ilgus polimerus); 3) kumarinai (jų struktūros pagrindą sudaro 2H-1-benzopiran-2-onas); 4) flavonoidai (jų struktūros pagrindą sudaro 2-fenilbenzo- γ -pirono žiedas (C6-C3-C6)).

Flavonoidų klasifikacija, funkcijos, teigiamos savybės

Flavonoidai yra gausiausia fenolinių junginių grupė. Šiuos junginius sudaro 15 anglies atomų, išsidėsčiusių C6-C3-C6 struktūra. Flavonoidai skiriami į tris dideles klases: chalkonų, auronų ir flavonoidų [13, 14]. Kiekvienu atveju du benzeno žiedai yra sujungti trijų anglies atomų grupe. Šis C3 grupės išsidėstymas ir nulemia, kaip junginiai yra klasifikuojami (1.1 lentelė).

Flavonoidų poklasių junginius sudaro šešianarių heterociklas: du aromatiniai žiedai A ir B yra sujungti trimis anglies atomais, kurie dažnai sudaro deguonimi prisotintą heterociklą C (pirano arba pirono darinys) (1.1 pav.).

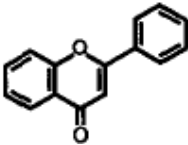
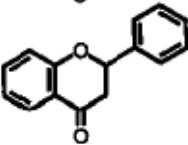
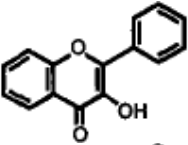
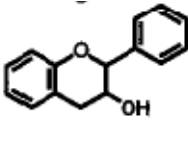
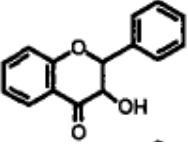
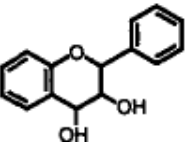
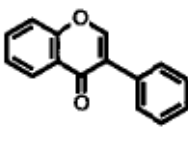
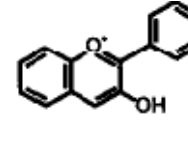
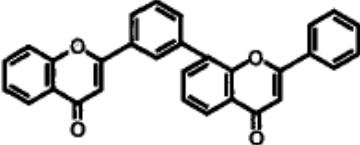
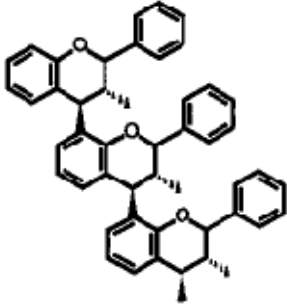
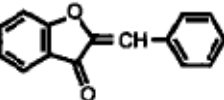
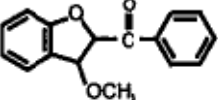
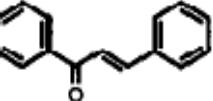
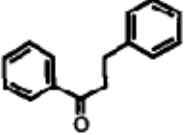


1.1 pav. Bendra flavonoidų struktūrinė formulė [14]

Pagal tai, ar yra ketono grupė C žiedo 4 padėtyje, ar yra dvigubas ryšys tarp 2 ir 3 anglies atomų, ar 3 padėtyje yra prijungta hidroksi grupė ir

priklausomai nuo hidroksi grupių išsidėstymo ir jų skaičiaus B žiede, flavonoidai skirstomi į atskirus poklasius (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Flavonoidų klasių ir poklasių pavadinimai ir jiems būdinga bendra cheminė struktūra [14].

Pavadinimas	Struktūra	Pavadinimas	Struktūra
Flavonas		Flavanonas	
Flavonolis		Flavanolis	
Dihydroflavonolis (flavanonolis)		Leukoantocianidinai (flavandiolis)	
Izoflavonoidas		Antocianidinas	
Biflavonoidas			
Proantocianidinas (kondensuoti taninai)			
Auronai			
Chalkonai		Dihidrochalkonai	

Gamtoje flavonoidai dažnai yra randami glikozidų pavidalu (tokia jų forma yra atsparesnė laisvųjų radikalų poveikiui). Cukrinė dalis sudaryta iš heksozių: gliukozės, galaktozės, ksilozės ar arabinozės, arba disacharidų.

Flavonoidų esama visose augalų dalyse, bet gausiausiai jų sukaupiama žieduose, lapuose, vaisiuose. Būtent šie biologiškai aktyvūs junginiai atlieka apsaugines funkcijas stresinėse situacijose (pvz., sausros metas, UV spinduliuotė), veikia kaip priviliojimo ar atgrasymo priemonė. Apskritai, flavonoidai atlieka svarbų vaidmenį didinant augalo atsparumą [15].

Šie fenoliniai junginiai labiausiai žinomi kaip gamtiniai antioksidantai [4, 16-18]. Jie žmogaus organizme geba tiesiogiai surišti laisvuosius radikalus, tokiu būdu apsaugodami jį nuo žalingo radikalų poveikio. Be stiprių antioksidacinių savybių, flavonoidai taip pat pasižymi priešuždegiminiu [11], priešvėžiniu [7, 8, 16], antitrombogeniniu [9, 10], antivirusiniu, priešgrybeliniu ir antibakteriniu [19, 20] poveikiu.

1.1.3 Spanguolės – natūralus flavonoidų šaltinis

Spanguolė – klasifikacija, morfologiniai požymiai ir paplitimas

Spanguolė (lot. *Oxycoccus*) – šilauogių (*Vaccinium*) genties, erikinių (*Ericaceae*) šeimos atstovas. Tai daugiametis, visžalis, šliaužiantis pažeme krūmokšnio ar vijoklio tipo (iki 2 metrų ilgio ir nuo 5 iki 20 cm aukščio) augalas. Stiebai – ploni, pusiau sumedėję, lapai – smulkūs, maži, ovaliniai, trumpakočiai. Maži rausvi žiedai išauga ant kotelių. Vaisiai – rutuliškos, iš pradžių gelsvos, prinokus – intensyvios raudonos spalvos uogos (1.2 pav.). Yra skiriamos keturios šių uogų rūšys: smulkiauogė spanguolė (*Oxycoccus microcarpus*), stambiauogė spanguolė (*Oxycoccus macrocarpus*, auganti Šiaurės Amerikoje, šiaurinėje dalyje, pelkėse; taip pat auginama ir Lietuvoje), Hagerupo spanguolė (*Oxycoccus gigas Hagerup*, retai sutinkama ir mažai ištirta) ir paprastoji spanguolė (*Oxycoccus palustis*, auga Euroazijoje ir Šiaurės Amerikoje šalto ir vidutinio šaltumo klimato zonose, taip pat ir Lietuvoje, pelkėse ir supelkėjusiuose miškuose) [21].



1.2 pav. *Paprastosios spanguolės (Oxycoccus palustris) žiedai ir vaisiai [22, 23]*

Spanguolių kaupiamos biologiškai aktyvios medžiagos

Iš daugelio uogų spanguolė išsiskiria savo gydomosiomis savybėmis. Tai siejama su tuo, kad šiose uogose sukaupiamas didelis kiekis fenolinių junginių, o iš jų dominuojantys yra fenolinės rūgštys ir flavonoidai [24]. Nustatyta, kad bendras fenolinių junginių kiekis yra lygus $158,8 \pm 3,2 \mu\text{mol/g}$ (sausos masės) ir yra didžiausias iš tirtų 20 uogų ir vaisių rūšių [25]. Spanguolėse gausu įvairių poklasių flavonoidų: fenolinių rūgščių [26], antocianinų, flavonolių, flavan-3-olių, proantocianidinų, triterpenoidų, vašku [27-30], taip pat randama mineralinių medžiagų (K, Ca, Mg, Fe, P), vitaminų (A, C, E, K, B1 ir B2), skaidulinių ir kitų medžiagų [21, 31].

Antocianinai yra rausvos, mėlynos, raudonos ar purpurinės spalvos pigmentai, paprastai kaupiami glikozidų pavidalu. Kadangi antocianinų aglikonai, antocianidinai yra labai nestabilūs, spanguolėse randami tik du – cianidinas ir peonidinas [32]. Ką tik nuskintose uogose antocianinų kiekis gali svyruoti nuo 25 iki 65 mg/100 g [28].

Šiek tiek mažesnis kiekis (nuo 20 iki 48 mg/100 g) nustatomas kito flavonoidų poklasio junginių – flavonolių [27, 28]. Daugiausiai šių junginių sukaupama uogos luobelėje [27]. Paprastai tik miricetinas, kvercetinas ir kaempferolis yra aglikonai. Kaip ir antocianinai, flavonoliai kaupiami

glikozidų forma [32]. Spanguolėse net 75 % flavonolių sudaro kvercetino glikozidai: gliukozidai, galaktozidai, ramnozidai [27, 28, 32].

Prinokusiose spanguolėse flavan-3-olių nustatyta tik 7–11 mg/100 g. Skirtingai nei kitų flavonoidų, šių junginių dominuojanti forma – katechino ir epikatechino aglikonai [27].

Kaip poklasis, proantocianidinai yra sudėtingos struktūros ir sudėties junginiai, kurių pagrindą sudaro tarpusavyje skirtingais būdais susijungę flavan-3-oliai (katechinas, epikatechinas ir jų galatai). Dominuojantys spanguolių proantocianidinai yra epikatechino dimerai, trimerai ir kiti oligomerai [28]. Šviežiose uogose jų koncentracija svyruoja nuo 410 iki 505 mg/100 g [27].

Apie flavonolių, flavanolių ir fenolinių rūgščių stabilumą randama mažai informacijos. Greičiausiai tai yra susiję su tuo, kad mokslininkai siekia atlikti biologinę atranką ir junginių identifikavimą, o ne ištirti šių junginių degradaciją funkciname maiste ar nutraceutikuose. Tačiau remiantis tuo, kad flavonoidai yra natūralūs antioksidantai, o kaip žinoma, antioksidantai yra lengvai paveikiami išorinių faktorių (pvz., deguonies, UV-spinduliuotės, temperatūros, vandens ir pan.), flavonoidai priskiriami prie nestabilių junginių [33].

Farmakologinis spanguolių poveikis

Spanguolės pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu ($177,0 \pm 4,3$ $\mu\text{mol/g}$) iš tirtų 20 uogų ir vaisių rūšių [25, 34]. Yan Sun su bendraautoriais pažymi, kad 100 gramų spanguolių bendras antioksidacinis aktyvumas ekvivalentiškas 3120 mg vitamino C [34]. Kaip jau buvo minėta, aukštą antioksidacinį aktyvumą nulemia tai, kad šis augalas geba kaupti didelį kiekį flavonoidų ir fenolinių rūgščių. Pastebėta, kad spanguolių ekstraktai, kuriuose gausu šių junginių, slopina oksidacinius procesus, pvz., mažo tankio lipoproteinų oksidaciją [35], stabdo uždegiminių procesų sukeltą kraujagyslių endotelio pažeidimą [36]. Spanguolių antioksidantai atlieka svarbų vaidmenį, stabdant širdies ir kraujagyslių ligas, tokias kaip aterosklerozę, miokardo infarktą, taip pat su amžiumi susijusių neurodegeneracinių ligų atsiradimą [29].

Mokslininkai kelia prielaidą, kad spanguolių antioksidacinės savybės gali įtakoti šių uogų priešvėžines savybes (nors veikimo mechanizmas nėra aiškus) [28]. Atlikti *in vitro* tyrimai pagrindė, kad spanguolėse esantys junginiai slopina plaučių, prostatos, kepenų, piktybinių navikų (adenokarcinomos), leukemijos bei kitų vėžinių ląstelių vystymąsi [37-39].

Labiausiai spanguolės žinomos kaip priemonė geram šlapimo pūslės ir šlapimo takų funkcijos palaikymui. Atlikti tyrimai įrodė, kad spanguolėms būdingas stiprus antibakterinis aktyvumas prieš šlapimo takų infekcijų sukėlėjus [27, 40].

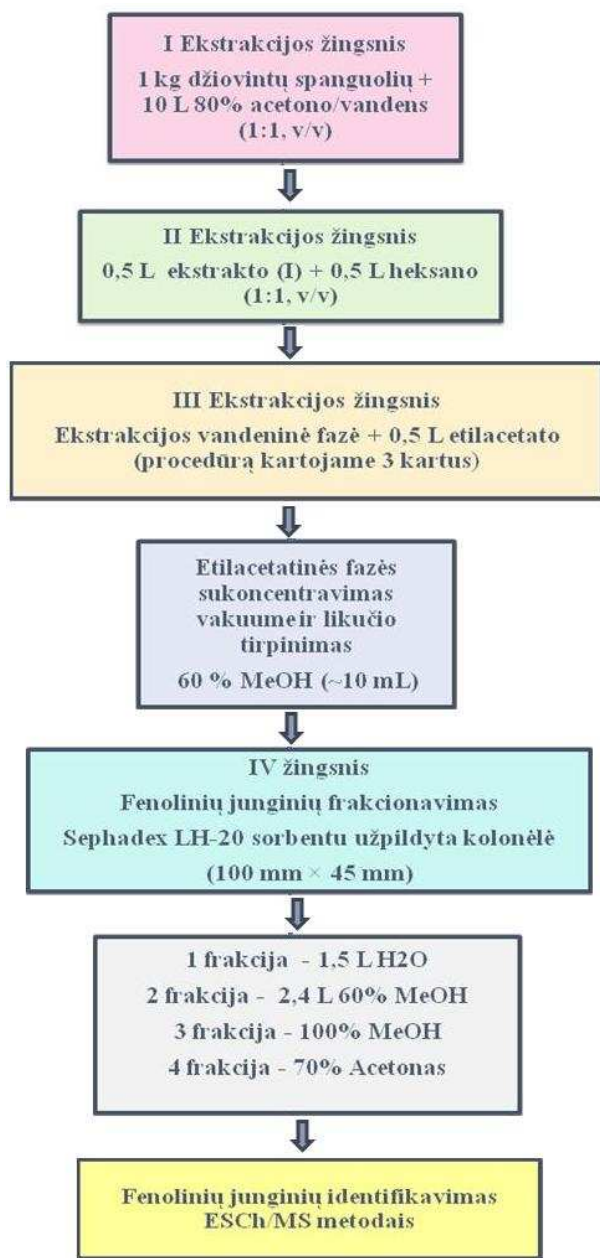
1.2 Flavonoidų ir kitų fenolinių junginių ekstrakcijos ir nustatymo metodai augalinėje matricoje

1.2.1 Flavonoidų ir kitų fenolinių junginių ekstrakcija iš uogų

Fenolinių junginių gausa, o būtent flavonoidų, pasižymi daugelis uogų: mėlynės, spanguolės, bruknės, avietės, žemuogės, gervuogės, vynuogės ir kadagio uogos. Ruošiant mėginius analizei yra labai svarbu, kad viso šio proceso metu būtų išvengta nustatomų flavonoidų ir kitų fenolinių junginių degradacijos. Meyer su bendraautoriais [17] pasiūlė papildomai pridėti antioksidacinių agentų, kurie eliminuotų fenolinių junginių oksidaciją. Tačiau, jei bus matuojamas šių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, tai tiesiogiai iškreiptų rezultatus. Dar vienas būdas išvengti autooksidacijos mėginio paruošimo metu – uogų užšaldymas ir smulkinimas skystame azote [41, 42], tuo tarpu ta pati Meyer tyrėjų grupė pasiūlė procedūrą anaerobinėse sąlygose [17]. Darbuose pažymima, kad reikėtų vengti dirbti su mėginiais t. y. uogomis, kurios yra užšaldytos daugiau kaip keletą mėnesių. Dirbant su liofilizuotomis uogomis [17, 18, 43, 44], prieš ekstrakciją jos yra smulkiai sumalamos. Žinoma, yra labai patogu ir greitai, jei galima atlikti tiesioginę ekstrakciją iš susmulkintų šviežių uogų.

Flavonoidų ir fenolinių rūgščių ekstrakcija iš uogų dažniausiai atliekama acetono-vandens [18, 41, 42, 45, 46], metanolio-vandens [17, 46] ar etanolio-

vandens mišiniais [43], procedūrą kartojant keletą kartų iki visiško mėginio matricos spalvos išblukimo. Po filtravimo ar centrifugavimo, ekstraktai yra sumaišomi ir sukonzentruojami. Acetono pagrindu gauti ekstraktai gali būti papildomai ekstrahuojami chloroformu, į kurį pereina karotenoidai ir lipidai [42, 45]. Taip pat galima atlikti ekstrakciją heksanu, kurios metu pašalinami lipidai ir lipiduose tirpūs junginiai [43]. Galutinis ekstraktas yra sukonzentruojamas vakuume, žemoje temperatūroje, siekiant išvengti polifenolinių junginių oksidacijos. Galutinis mėginys tirpinamas parūgštintame vandenyje arba organiniame tirpiklyje – priklausomai kokia įranga bus atliekama analizė. Kai kuriuose darbuose prieš analizę ekstraktai papildomai išvalomi su kietafazės ekstrakcijos kolonėlėmis. Iš pirminių ekstraktų pašalinami cukrūs ir rūgštys naudojant C18 sorbentu užpildytas kolonėles [18, 42]. Pastarąjį dešimtmetį dažniausiai taikoma nuosekli ekstrakcija su keliais skirtingo poliškumo organiniais tirpikliais, kurios pagalba įmanoma atskirti skirtingas junginių grupes. **1.3** paveiksle pateikta flavonoidų ekstrakcijos schema iš spanguolių [44]. Daugelis publikacijų autorių savo darbuose naudoja tokį pat arba šiek tiek modifikuotą dr. I. Vvedenskaya su bendraautoriais paskelbtą ekstrakcijos metodiką [32, 37, 44, 47-50]. Šios ekstrakcijos esmė yra ta, kad naudojant įvairių tirpiklių seką t. y. acetoną, heksaną, etilacetatą, metanolį ir (arba) jų vandeninius tirpalus, išfrakcionuojami spanguolėse esantys antocianinai, procianidinai, flavonoliai ir kiti vandenyje tirpūs ar dalinai tirpūs fenoliniai junginiai į atskiras frakcijas. Vėliau ekstraktai papildomai koncentruojami, valomi ir frakcionuojami, taikant Sephadex LH-20 sorbentu užpildytą kolonėlę ir (arba) preparatyvinę skysčių chromatografijos aparatūrą. Visos šios minėtos procedūros reikalauja ne tik daug laiko, bet ir specifinės laboratorinės įrangos, pvz., Sephadex LH-20 sorbentu užpildytos kolonėlės, kuri yra brangi, taip pat sunaudojami dideli kiekiai organinių tirpiklių [32, 37, 44, 47-50].



1.3 pav. Vieno iš dažniausiai taikomų skysčių-skysčių ekstrakcijos modelio schema flavonoidų išskyrimui iš spanguolių [44]

1.2.2 Flavonoidų ir kitų fenolinių junginių nustatymas

Fenolinių junginių nustatymui ir kiekybiniam įvertinimui įvairiuose biologinės kilmės objektuose literatūroje aprašomi šie metodai: dujų chromatografija – fenoliniams junginiams pipiruose [51] ir spanguolių produktuose [50], katechinams žaliojoje arbatoje [52], fenolinėms rūgštims

mangostaninėje garcinijoje [53], kapiliarinė elektroforezė – fenoliniams junginiams vynuogėse ir jų odelėse [54, 55], resveratrolui maisto papilduose [56], įvairūs spektrometriniai metodai – flavonams apelsinų aliejuje [57], karnozino rūgščiai rozmarinė [58], bet, nepriklausomai nuo didelio spektro objektų įvairovės, plačiausiai taikomas analizinis metodas yra skysčių chromatografija.

Šioje dalyje apžvelgsime ESCh metodo analizines charakteristikas, kai yra analizuojami būtent spanguolių uogų ar iš šių uogų pagamintų produktų ekstraktai. Reikėtų pažymėti, kad fenolinių junginių kompozicijos yra sudėtingos ir iki šiol nėra atliktas pilnas šių junginių identifikavimas ne tik spanguolėse, bet ir daugelyje uogų [33]. Dažnai junginiai yra apibūdinami juos priskiriant tam tikroms junginių, pvz., flavonoidų, klasėms. Be to, nėra visų junginių etaloninių junginių ir pamatinių paliudytų medžiagų (PPM). Todėl kiekybinis įvertinimas gali būti atliekamas remiantis kitu etaloniniu junginiu, priklausančiu tai pačiai junginių klasei.

Efektyvioji skysčių chromatografija – lankstus analizinis metodas, kurio pagalba galima atlikti flavonoidų, fenolinių rūgščių ir jų darinių atskyrimą ir kiekybinį įvertinimą. Kaip jau buvo minėta, retai yra žinomi tikslūs kiekvieno augalinės kilmės junginio identifikavimo parametrai. Dažnai junginiai sugrupuojami pagal charakteringuosius absorbcijos maksimumus: fenolio rūgštys ir flavanoliai – 280 nm, flavonoliai – 260 arba 365 nm ir antocianai – 520 nm [17, 42]. Kiekvieno chromatografiškai atskirto junginio UV spektrą galime išmatuoti su fotodiodų matricos UV detektoriumi – jį galima palyginti su etaloninio junginio spektru ir taip identifikuoti junginį arba priskirti tam tikrai junginių grupei.

Daugelyje publikacijų pateikiama, kad spanguolėse esantys įvairūs flavonoidų poklasių junginiai analizuojami taikant atvirkščių fazių chromatografiją [24, 32, 37, 39, 44, 47-49, 59, 60]. Fenolinių junginių atskyrimui naudojamos kolonėlės, užpildytos nepoliniais sorbentais – oktasilikageliu (C8) ar oktadecilsilikageliu (C18) (kolonėlės su pastarąja nejudria faze yra populiariausios). Analizių atskyrimas atliekamas su dviejų

eliuentų – parūgštintų dejonizuoto vandens (eliuentas A) ir organinio tirpiklio (eliuentas B) sistema. Elientu B daugelis tyrėjų naudoja metanolį arba acetonitrilą, ar šių dviejų tirpiklių mišinį. Abu elientai rūgštinami pridodant acto (AcOH) arba skruzdžių (FrOH) rūgštis. Didžiojoje dalyje darbų tyrėjai taiko ESCh su masių spektrometriniu (MS) detektoriumi. Šių dviejų analizinių metodų sujungimas, kuomet analizės atskiriamos chromatografinėje kolonėlėje, o MS detektoriumi išmatuojamos jų molekulinės masės, praplėtė ir supaprastino junginių identifikavimo galimybes.

Y. Zuo su kolegomis [24] pasiūlė taikyti ESCh flavonoidų ir kitų fenolinių junginių identifikavimui spanguolių sultyse. Mėginio paruošimo procedūra užtrunka net 16 val. – atliekama rūgštiniais katalizatoriais inicijuota hidrolizė. Mėginys prieš analizę tirpinamas metanolyje ir analizuojamas. Atskyrimas vyksta gradientiniu režimu, judria faze naudojamas 3 % (v/v) vandeninis AcOH tirpalas ir 100 % MeOH. Junginiai identifikuojami pagal sulaikymo trukmes ir absorbcijos spektrus, kurie lyginami su etaloninių junginių spektrais. Analizė užtrunka 45 min., o tiriama junginių grupė fiksuojama nuo 15 min. iki 36 min. – autoriai pateikia tik šiuo periodu užfiksuotą chromatogramą.

Daug detalesnes identifikavimo studijas atliko X. Yan su kolegomis [39]. Reikėtų pažymėti, kad mėginio paruošimui naudojami sveikatai ir aplinkai kenksmingi organiniai tirpikliai: petroleteris, heksanas, chloroformas, metanolis, etilacetatas. Flavonolių gliukozidų atskyrimas atliekamas su C18 kolonėle, naudojant dviejų eliuentų sistemą – dejonizuoto vandens ir metanolio, parūgštintų 2 % (v/v) AcOH. Junginiai detektuojami PDA detektoriumi intervale nuo 250 iki 700 nm, o molekulinės masės apskaičiuojamos su tandeminiu MS detektoriumi, esant elektrošpurškimo jonizacijai. Visos analizės trukmė – 60 min.

2004 metais pasirodė I. O. Vvedenskaya ir N. Vorsa paruoštos publikacijos [44, 47], kurios įnešė naujumo į flavonolių ekstrakcijos procedūras – pradėtos taikyti Sephadex LH-20 sorbentu užpildytos kolonėlės. Šios kolonėlės leido frakcionuoti ekstraktą į skirtingas junginių grupes, nors

sunaudojamų organinių tirpiklių kiekiai nesumažėjo (1.3 pav.). Chromatografiniam analičių atskyrimui naudojamas gradientinis režimas, judri fazė – vanduo ir metanolis, su 2 % (v/v) skruzdžių rūgšties priedu. ESCh sistema sujungta su MS detektoriumi. MS detekcija atliekama atmosferos slėgio cheminės jonizacijos (MS-APCI) sąlygomis, 150–1100 m/z verčių intervale. Identifikuoti 22 spanguolėse esantys flavonoliai. Analizuojamų junginių grupė atskiriama nuo 28 iki 48 min.

Kaip jau buvo rašyta anksčiau, iš visų uogų spanguolės pasižymi stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis. Tai lemia jose esantys flavonoliai, antocianinai ir proantocianidinai. C. C. Neto su mokslininkų grupe [37] atliko tyrimą, kurio metu iš natūralių spanguolių išskyrė proantocianidinius ir stebėjo šių junginių pajėgumą slopinti vėžines ląsteles. Proantocianidinai išplaunami iš Sephadex LH-20 kolonėlės su acetono ir vandens mišiniu, 70/30 % (v/v). Prieš tai iš užnešto spanguolių ekstrakto išplaunami mažamolekuliniai fenoliniai junginiai (gryno vandens frakcija), fenolinės rūgštys (H₂O/MeOH, 85/15 %, v/v), flavonoliai ir antocianinai (H₂O/MeOH/FrOH, 25/70/5 %, v/v/v). Chromatografinis proantocianidinių atskyrimas vyksta gradientiniu režimu, judria faze naudojant vandenį ir metanolį su 2 % AcOH priedu, kolonėlė – RP-C8. Po šio atskyrimo seka dar viena procedūra, kurios metu atskiriamos proantocianidinių subklasės. Vėliau jos analizuojamos MALDI-TOF (*angl. term.*) masių spektrometru.

A. P. Singh su bendraautorais [48] šiek tiek modifikavo I. O. Vvedenskaya publikuotą [44] flavonoidų ekstrakcijos metodą. Bioaktyvių junginių identifikavimą ir kiekybinę analizę atliko ESCh-MS metodais. Analinių atskyrimui naudojo Hypersil Gold C18 kolonėlę, o flavonolių ir proantocianidinių signalai buvo detektuojami PDA spektrometru 280 nm ir 366 nm bangos ilgiuose, MS detekcija atlikta elektronų srauto jonizacijos šaltiniu. Minėti junginiai buvo atskirti gradientiniu režimu, eliuentas A – 10 % MeOH (pH = 3,5), eliuentas B – MeOH/H₂O/ACN, 20/20/60 % (v/v/v). Analizės trukmė – 45 min., kurios metu nustatyti trys proantocianidinai (mono-, di- ir

trimerai) ir šeši flavonoliai – kvercetino ir miricetino galaktozidai, ramnozidai ir gliukozidai.

Arkanzaso universiteto tyrėju grupė [32] detaliai ištyrė polifenolinių junginių sudėtį spanguolių išspaudose. Iš atliekų, likusių po pirminio perdirbimo, buvo išekstrahuotos trys fenolinių junginių grupės: antocianinai, flavonoliai ir proantocianidinai. Šioms flavonoidų subklasėms frakcionuoti buvo naudojama Sephadex LH-20 sorbentu užpildyta kolonėlė, eliuantai – MeOH/H₂O (30/70 %, v/v), kuriuo atskiriami antocianinai ir flavonoliai, o 70 % acetono vandeninis tirpalas – atskiriami proantocianidinai. Antocianinų ir flavonolių chromatografinis atskyrimas atliekamas su C18 kolonėle, pirmųjų junginių grupę detektuojant 520 nm, o antrųjų – 360 nm bangos ilgiuose. Gradientai formuojami eliuentais naudojant 5 % skruzdžių rūgšties vandeninį tirpalą ir metanolį. Procianidinų chromatografinis atskyrimas atliekamas su normalių fazių kolonėle Luna (250 × 4,6 mm, 5 μm, Phenomenex), pritaikius gradientinį režimą. Eliuentas A – keturių komponentų mišinys: dichlormetanas/MeOH/H₂O/AcOH (82/14/2/2 %, v/v/v/v), eliuentas B – MeOH/H₂O/AcOH (96/2/2 %, v/v/v). Šių junginių analiziniai signalai detektuojami fluorescenciniu detektoriumi, matuojant emisiją 316 nm bangos ilgyje. Visų trijų flavonoidų poklasių detekcija taip pat atlikta su MS elektroišpurškimo jonizacijos šaltiniu, nustatytu neigiamai jonizacijai. Tiek ekstrakcijos, tiek analizės procedūros užtrunka beveik po valandą. Identifikuoti 6 antocianinų gliukozidai, 13 flavonoliai ir 8 procianidinai.

Yueng Zuo su kolegomis publikavo keletą darbų, kuriuose siūlo spanguolėse esančius fenolinius junginius analizuoti su dujų chromatografinė sistema sujungta su masių spektrometriniu detektoriumi (DCh-MS) [26, 50, 61]. Įvairios fenolinės ir benzoinės rūgštys, flavonoidai tiriami spanguolėse ir jų produktuose, žmogaus kraujo plazmoje (nustatomi rūgščių likučiai po uogų suvartojimo). Visais atvejais mėginio paruošimo procedūros yra ilgos – derivatizacijos reakcijos trunka daugiau kaip 16 valandų. Todėl ESCh metodas yra patogesnis, nes galime atlikti tiesioginę flavonoidų analizę.

Baigiant būtina pažymėti, kad peržvelgus visą prieinamą literatūrą, nepavyko aptikti atrankaus ir greito ekstrakcijos metodo leidžiančio atlikti greitą flavonolių identifikavimą ir (ar) kiekybinę analizę. Daugelyje apžvelgtų darbų taikomos ilgos flavonoidų poklasių ekstrakcijų procedūros, kurių metu sunaudojami dideli kiekiai sveikatai ir aplinkai kenksmingų tirpiklių. O vienu ar kitu metodu tiriamų fenolinių junginių analizė užtrunka daugiau kaip valandą, daugelis autorių pateikia tik tam tikru analizės periodu užfiksuotus duomenis (pvz., chromatogramas).

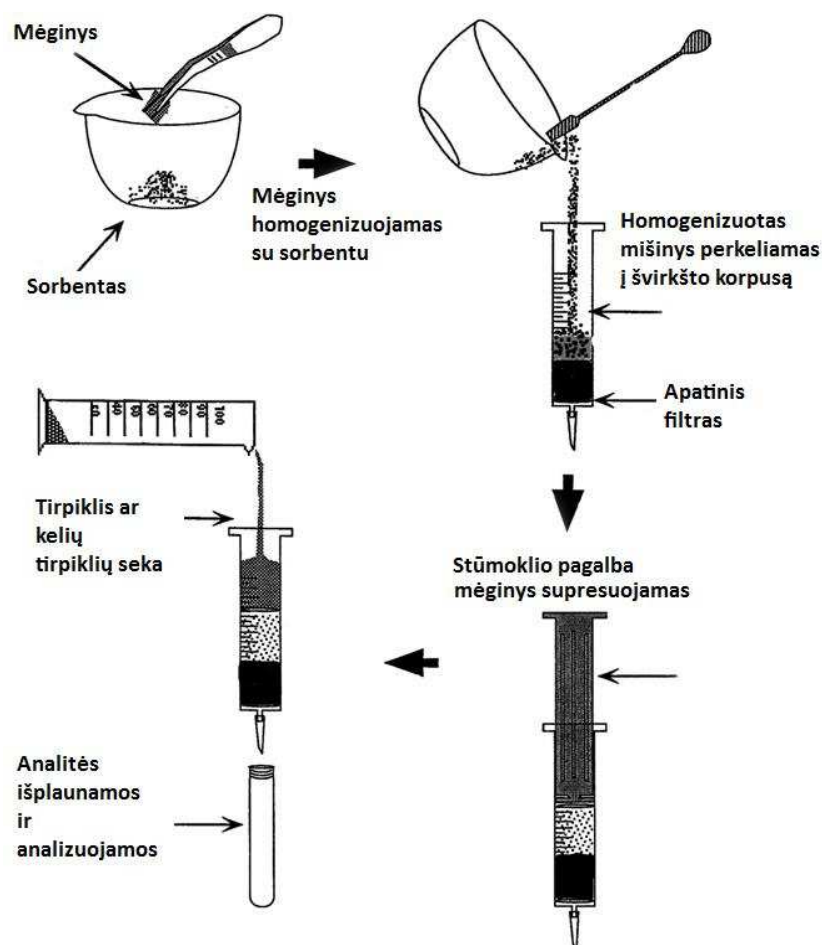
1.2.3 Kietafazė disperguojamoji ekstrakcija

Pastaruoju metu, kaip alternatyva, mėginių paruošimui iš įvairių sudėtingų matricių, taikoma kietafazė disperguojamoji ekstrakcija (KDE) [62-64]. Šis metodas pirmą kartą aprašytas profesoriaus S. A. Barkerio su kolegomis 1989 m. [65], o patentuotas 1993 m. Kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos metodas skirtas organinių junginių išskyrimui iš kietų, pusiau kietų arba labai klampių biologinės kilmės mėginių.

Šis metodas sėkmingai pradėtas taikyti ir skirtingų poklasių fenolinių junginių išskyrimui iš augalų ar maisto produktų: fenolinių junginių išskyrimui iš geltonųjų vynuogių ir raudonojo vyno [66, 67], izoflavonų iš *Trifolium pratense* [68], labdano diterpenoidų iš *Coleus Forskohlii* [69] ir ligniną iš *Sinopodophyllum* [70].

Kaip matome principinėje KDE metodo schemoje (1.4 pav.), mėginio porcija yra įdedama į stiklo ar agato tiglį, kuriame jau yra atitinkamas kiekis kieto sorbento, pvz., silikagelio ar kito. Mėginys ir sorbentas trinamas stiklo ar agato grūstuve apie 2 min. Šiame etape gali būti įdedamas vidinis standartas ar analičių standartinis priedas. Dispergavus mėginį su sorbentu, gaunamas mišinys, kuriuo užpildoma kolonėlė ar švirkšto korpusas ir atsargiai supresuojamas stūmoklio pagalba. Analitės išplaunamos leidžiant per disperguotą mišinį pasirinkto tirpiklio porciją ar nuosekliai kelis tirpiklius. Jei

reikia sukonzentruoti ar pakeisti tirpiklį, eliuatas nugarinamas (dažniausiai azoto sraute), tirpinamas, filtruojamas ir analizuojamas.



1.4 pav. Principinė KDE metodo schema [64]

Norint papildomai išvalyti ruošiamą ekstraktą, prieš suberiant su sorbentu disperguotą mėginį į kolonėlę, į kolonėlės dugną galima pridėti kokio nors kito sorbento [64]. Tokiu būdu, tekėdamas per papildomą sorbento sluoksnį eliuatas gali būti dar papildomai išgrynintas tradiciniu kietafazės ekstrakcijos principu tos pačios procedūros metu.

KDE metodas remiasi keletu paprastų cheminių ir fizikinių principų. Pirmiausia, mechaniškai trinant mėginį su kietu sorbentu, suardoma mėginio struktūra. Dėl to, mėginio matrica sąveikauja su sorbento paviršiuje esančiomis prijungtomis funkcinėmis grupėmis arba sorbento paviršiumi. Dispergavimo

metu vyksta du procesai: susmulkinamas mėginys, ir inicijuojamos įvairios hidrofilinės ar hidrofobinės mėginio komponentų ir sorbento sąveikos. Dėl pasiskirstymo ir (arba) adsorbcijos pusiausvyros analizės pasiskirsto tarp mėginio matricos, kieto sorbento ir tirpiklio. Šios ekstrakcijos išskirtinė savybė yra ta, kad analizės tolygiai pasiskirsto/adsorbuojasi visame sorbento tūryje, o ne viršutiniame jo sluoksnyje. Homogeniškas mėginio sluoksnis ant sorbento dalelių leidžia efektyviai vykti masės pernašos procesams. Todėl KDE metode aukštai išgavai pasiekti užtenka palyginti nedidelių desorbcijos tirpiklių tūrių [71]. Deja, detalesni tyrimai apie ekstrakcijos mechanizmą iki šiol neatlikti.

Trumpai aptarsime pagrindinius veiksnius, įtakančius KDE efektyvumą ir atrankumą.

1) *Sorbento prigimtis*: sorbento parinkimas turi lemiamą įtaką KDE metodo atrankumui. Tai yra vienas iš pagrindinių veiksnių, kuris nulemia ieškomų analičių sulaikymą/išplovimą iš kolonėlės. Kurį laiką KDE metodui buvo naudojamas tik silikagelis. Šiuo metu vis dažniau taikomi modifikuoti silikagelio sorbentai. Nemažą įtaką analičių eliucijai daro vidutinis dalelių diametras. Labai mažo diametro (3–20 μm) sorbento dalelės labai sulėtina analičių desorbciją, kartais net ir visiškai užkemša kolonėlę, todėl reikia papildomai naudoti vakuumą arba slėgį [62]. Plačiausiai naudojami sorbentai, kurių dalelių dydis yra 40–100 μm , o porų dydis 60–100 Å. Dažniausiai naudojami mėginio ir sorbento masių santykiai yra 1:1–1:4 intervale [69]. Konkrečiam mėginiui ir analitėms šis santykis paprastai nustatomas eksperimentiškai metodo optimizavimo metu [63].

Norint dirbti su modifikuotu sorbentu, reikia atsižvelgti kokio poliškumo jis yra, nes tai tiesiogiai įtakoja ekstrakcijos rezultatus. Dažniausiai KDE metode naudojami modifikuoti atvirksčių fazių sorbentai. Pats populiariausias – C18 modifikuotas silikagelis, taip pat naudojami C8 bei C30 modifikuoti silikagelio sorbentai. Teoriškai sorbento dalelės suardo biologinio mėginio struktūrą, o prijungtos alkilinės grupės prisideda prie mėginio komponentų tirpimo ir santykinai išvalo ekstraktą. Ekstrakcijai iš tokių sorbentų dažniausiai

naudojami poliniai tirpikliai: acetonitrilas, metanolis ar jų mišiniai su vandeniu [71].

2) *Ekstrakto išvalymas*: vienas iš būdų padidinti KDE metodo atrankumą analitėms yra papildomas disperguoto mėginio „praplovimas“ prieš ekstrakciją [72]. Jis leidžia išplauti pašalinius junginius, paliekant disperguotame mėginyje dominančią analitę ar jų grupę. Įprastai trukdančios medžiagos išplaunamos 1–2 ml tirpikliu/100 mg sorbento-mėginio mišiniui. Srauto greitis turi būti toks, kad tirpiklis kontaktuotų su sorbentu apie 1–2 minutes. Dažniausias pašalinių medžiagų išplovimo tirpiklis yra dejonizuotas vanduo arba buferinis tirpalas. Taip pat pašalinės medžiagos plaunamos tirpalais, kurių sudėtyje yra organinių tirpiklių. Vandeninis buferinis tirpalas, turintis 10–30 % metanolio ar etanolio, naudojamas pašalinti hidrofilinius junginius pvz., cukrus ir kitas polines medžiagas iš vaisių mėginių, disperguotų ant C18 modifikuoto silikagelio paviršiaus [18, 42].

3) *Mėginio matricos prigimtis*: mėginio matrica KDE dalyvauja kaip chromatografinės sistemos dalis, kuri yra kaip papildoma fazė. Todėl logiška, kad analičių išgavos turėtų skirtis priklausomai nuo to, iš kokios matricos jos ekstrahuojamos, pvz., iš augalinės ar gyvulinės. Deja, iki šiol neatlikti išsamūs mėginio matricos įtakos KDE tyrimai, kad tai galėtume konstatuoti kaip tikrą faktą.

4) *Analičių desorbcija*: šiame metode labai svarbus tirpiklio ir disperguojančio sorbento poliškumų santykis. Būtent tai nulemia kokios analitės bus išplautos, o kokios pasiliks disperguotame mišinyje. Naudojant vieną ar keletą skirtingo poliškumo tirpiklių ar jų mišinių, KDE metodas leidžia atskirti skirtingo poliškumo analites – frakcionuoti cheminius junginius pagal klases. Labai gerai, kai tirpiklio savybės yra tinkamos vėlesniems mėginio paruošimo etapams. Desorbcijos tirpiklis turi būti suderinamas ir su analizės metodu. Kai analitė nustatoma skysčių chromatografijos metodu, desorbcijos tirpiklis turėtų būti suderinamas su judria faze.

Dažniausiai analičių eliucijai naudojami tirpiklio tūriai yra nuo 5 iki 15 ml. Žinoma, desorbcijos tirpiklio tūris priklauso nuo mėginio/sorbento kiekio.

Ekstrakcijos metu svarbu kontroliuoti desorbcijos greitį, t. y. eliuento tekėjimo greitį. Desorbuodami per dideliu greičiu galime pilnai neišplauti analičių, jei tirpiklis leidžiamas labai lėtai – sumažėja ekstrakto grynumas. Įprastai desorbuojama 1–5 ml/min greičiu. Optimalus tirpiklis ir jo tūris konkrečiai sistemai paprastai nustatomas eksperimentiškai. Dažniausiai desorbcijos tirpikliu naudojami metanolis, acetonitrilas, acetonas, tirpiklių mišiniai su skruzdžių ar acto rūgštimis (1–5 %) [64].

Apibendrinant galima konstatuoti, kad KDE metodas ženkliai sumažina sunkumus atsirandančius atliekant klasikinę skysčių-skysčių ar kietafazę analičių ekstrakciją iš kietų arba pusiau kietų biologinių mėginių. Pagrindiniai KDE metodo privalumai – paprastumas ir greitis.

1.3 Lipidų savitvarka

1.3.1 Lipidinės pernašos sistemos

Pernašos sistemų, sukurtų lipidų pagrindu, pagrindinė funkcija yra didinti transportuojamų biologiškai aktyvių medžiagų (pvz., vaistų, fermentų, funkcinio maisto ingredientų) biologinį prieinamumą. Mokslininkai, kurdami naujas lipidines pernašos sistemas, pritaikytas maistiniams komponentams ir vaistams, kelia šiuos tikslus: 1) lipidų nešiklis turi maksimaliai didinti veiklios medžiagos tirpumą; 2) nešiklis turi stabdyti įterpiamo junginio agregaciją ir kristalizaciją; 3) nešiklis turi užtikrinti ilgalaikę įterpto junginio apsaugą nuo degradacijos [73, 74]. Vienos jų, lipidų skystakristalės sistemos turi labai dideles perspektyvas medicinoje ir maisto pramonėje, nes šios sistemos konstruojamos iš maistinių komponentų t. y. lipidų, ir gali absorbuoti/tirpinti didelius kiekius tiek hidrofobinės, tiek hidrofiliinės prigimties junginių. Į skirtingų tipų lipidų nešiklius gali būti įterpiami antioksidantai, tokiu būdu padidinamas jų tirpumas, biologinis prieinamumas ir užkertamas kelias nepageidaujamai sąveikai su kitais maisto komponentais [75]. Toliau aptarsime lipidines sistemas, kurios jau yra taikomos tikslinės medžiagos pernešimui.

Micelės, mikroemulsijos ir emulsijos – skystos dispersinės sistemos, sudarytos iš riebalų ir vandeninės fazės su paviršiaus stabilizuojančio agento (emulsiklio) priedu. Šios paprastos savitvarkės struktūros plačiai naudojamos farmaciniuose gaminiuose. Į miceses dažniausiai įterpiami hidrofiliniai junginiai, deja daugelio vandenyje netirpių medžiagų tirpumas yra ypač mažas. Micelės, mikroemulsijos ir emulsijos sistemos jautrios skiedimui, o po patekimo į organizmą, yra didelė tikimybė, kad gali skilti į sudedamąsias dalis. Dėl didelių paviršiaus stabilizuojančio agento koncentracijų šios savitvarkės struktūros gali būti toksiškos [76, 77].

Liposomos – sferinės bisluoksnės struktūros, savo sandara primenančios ląstelių membranas. Šių sistemų gamybai dažniausiai naudojami amfifilinės prigimties fosfolipidai (šios molekulės turi hidrofilinę „galvą“ ir hidrofobinę „uodegą“). Fosfolipidai vandeninėje terpėje formuoja sferines bisluoksnės struktūras, kuriose hidrofobinės molekulių dalys orientuojasi viena į kitą (bisluoksnio vidinė dalis), o hidrofilinės – į išorę. Liposomų privalumas yra tai, kad hidrofiliniai junginiai gali būti įterpti į vandens pripildytą liposomos vidinę dalį, o hidrofobiniai – į bisluoksnio vidinę dalį [73]. Vienas iš sėkmingų liposomų pritaikymo pavyzdžių – propilenglikolio pagrindu pagamintų liposomų su įterptu epirubicinu pritaikymas gydant krūties vėžį. Šios sistemos parodė gerą skvarbą ne tik per naviko ląstelės membraną, bet ir per branduolio membraną [78]. Tačiau platesnį pritaikymą riboja tai, kad liposomos yra nestabilios – fosfolipidų skilimas autooksidacijos metu ir padidėjęs pralaidumas skatina įterptos medžiagos išėjimą. Taip pat sudėtingos jų paruošimo procedūros [76].

Kietosios lipidų nanodalelės – paskutiniu metu didelio susidomėjimo sulaukusi koloidinė sistema, kuri geba padidinti biologinį prieinamumą ir tuo pačiu metu kontroliuoja veikliosios medžiagos pernašą į specifinę organizmo vietą. Paprastai tai yra sferinės dalelės (10–1000 nm), sudarytos iš kietųjų lipidų (stabilizuojamos naudojant paviršinio aktyvumo medžiagas), į kurias efektyviai įterpiamos lipofilinės ar hidrofilinės molekulės. Šioms sistemoms konstruoti naudojami monogliceridai, digliceridai, trigliceridai, riebiosios

rūgštys, steroidai ir vašgai [73]. Tokiose lipidų struktūrose veikliosios medžiagos lieka stabilios – tinka apsaugai nuo degradacijos. Tačiau įterpimo talpa yra maža, o mėginio praskiedimas arba vandens pašalinimas gali daryti įtaką sistemos pusiausvyrai [76].

Lipidų skystakristalės nanodalelės (LSKN) – skystųjų kristalų fazės išskaidytos vandens pertekliuje. Į šią sistemą pridėjus stabilizatoriaus arba emulsiklio susiformuoja minkštos, įvairios vidinės struktūros dalelės (100–500 nm). LSKN pasižymi dideliu sąlyčio paviršiaus plotu ir mažu klampumu. Dėl LSKN vidinės nanostruktūros galima įterpti įvairių hidrofiliųjų, hidrofobinių ir amfifiliųjų junginių [79]. Šios nanostruktūros yra termodinamiškai stabilios, biologiškai suderinamos, stabilios vandens pertekliuje, gerai pasisavinamos organizme ir adheziškos [80]. Kai kurių komponentų naudojimas yra ribotas, nes ne visi lipidai ir paviršiaus aktyviosios medžiagos leidžiamos naudoti farmacijoje ir tam tikrose farmacijos srityse – reikia papildomų toksikologinių tyrimų. Įterptos biologiškai aktyviosios molekulės gali paveikti vidinę nanodalelių tvarką ir keisti jų struktūrą [79].

1.3.2 Lipidų savitvarka ir polimorfizmas

Lipidinės pernašos sistemos susidaro dėl unikalios lipido cheminės struktūros. Šiuos junginius galime skirstyti į dvi grupes – polinius ir nepolinius lipidus. Nepoliniai lipidai neturi polinės grupės (arba ji labai maža), todėl sąveika su vandeniu yra labai ribota ir nesudaro skystųjų kristalų fazių bei neformuoja monosluoksnio vandeninėje terpėje. Šiai grupei priskiriami triacilgliceroliai, diacilgliceroliai ir steroliai [74]. Poliniai lipidai su viena ar dviem angliavandenilių „uodegomis“ ir poline „galva“, sąveikauja su vandeniu ir gali savaime formuoti skystųjų kristalų agregatus, dar kitaip vadinamas mezomorfines fazes [74]. Būtent molekulių amfifiliškumas nulemia savitvarkės struktūros susidarymą – polinė dalis orientuojasi į vandeninę fazę, sudaro „polinį“ paviršių, kuris atskiria angliavandenilių sluoksnį nuo vandens.

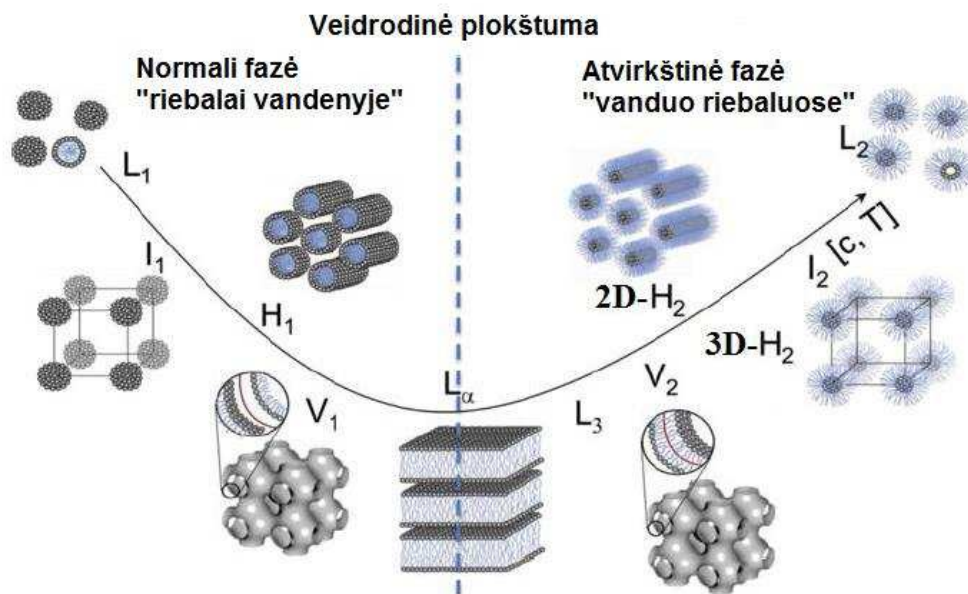
1.5 paveiksle pateikta idealizuota skystakristalių fazių susidarymo priklausomybė nuo lipido ir vandens santykio. Daugeliu atvejų, žinodami amfifilinės molekulės geometrinius supakavimo parametrus konkrečioje aplinkoje, galima numatyti tam tikros fazės susidarymą. Tai apskaičiuojama pagal, taip vadinamą, kritinį supakavimo parametą (KSP), o $KSP = v/al$, kur v yra lipido molekulės hidrofobinės „uodegos“ tūris, l – grandinės ilgis ir a – polinės „galvutės“ plotas. Apskritai kalbant, kai KSP vertė yra mažesnė už vienetą ($KSP < 1$), susiformuoja struktūra su poliniu paviršiumi, kuris yra hiperbolės formos („balnas“) t. y. formuojasi normalios fazės – „riebalai vandenyje“ (*angl. term.*: „oil in water“) (**1.5** pav.). Kai KSP vertė yra didesnė už vienetą ($KSP > 1$), turime neigiamą struktūrų paviršiaus išlinkį ir formuojasi atvirkščių fazių struktūros, t. y. „vanduo riebaluose“ (*angl. term.*: „water in oil“) (**1.5** pav.). Lamelinių fazių kritinis supakavimo parametras artimas vienetui ($KSP = 1$). Kritinis supakavimo parametras nėra pastovus dydis – jį įtakoja sistemos kintamieji: amfifilinio lipido cheminė struktūra ir jo koncentracija sistemoje, vandens kiekis, temperatūra, pH [81, 82].

Skystakristalė lamelinė fazė (L_α) yra viena paprasčiausių ir dažniausiai sutinkamų struktūrų. L_α mezostruktūrą sudaro vandeninėje terpėje lygiagrečiai išsidėsčiusios lipidų bisluoksnės savitvarkės struktūros, kurios suformuoja vienmatę gardelę 1D. Sistemose galima stebėti ir kitų tipų lamelines fazes – gelinę (L_β) ir kristalinę (L_C). L_β labai panaši į L_α , bet daug klampesnė (tai įtakoja alkilo grandinių *trans* konformacija).

Heksagoninės fazės susidaro iš tankiai supakuotų cilindrinų micelių, išdėstytų 2D heksagoninėje gardelėje. Šios savitvarkės struktūros yra dviejų tipų: H_1 – normalių fazių, kai cilindų šerdį sudaro angliavandeniliai, H_2 – atvirkščių fazių, kai cilindų šerdis užpildyta vandeniu.

Kubinių fazių (Q) erdvinis išsidėstymas yra pats sudėtingiausias iš visų žinomų liotropinių skystųjų kristalų. Egzistuoja trys pagrindinės 3D kubinės gardelės struktūros: paprastoji kubinė, centruotų paviršių kubinė ir centruoto tūrio kubinė. Šios fazės yra optiškai izotropinės ir dažnai labai klampios. Kaip pavaizduota **1.5** pav., susidaro normalių arba atvirkščių fazių savitvarkos:

kubinės micelės (normalių (I_1) ir atvirkščių (I_2) fazių, kurios priskiriamos į $Fm\bar{3}m$ (Q^{225}), $Fd\bar{3}m$ (Q^{227}), $Im\bar{3}m$ (Q^{229}) ir $Pm\bar{3}n$ (Q^{223}) erdvines grupes [81]) bei besitęsiančios kubinės fazės (normalių (V_1) ir atvirkščių (V_2) fazių, kurios skirstomos į tris erdvines grupes: pirminę ($Im3m$), deimanto ($Pn3m$) ir giroido ($Ia3d$)).



1.5 pav. Idealizuota perėjimų tarp SK fazių priklausomybė nuo vandens dalies sistemoje

Lamelinė skystakristalė fazė (L_α) gali būti laikoma veidrodžio plokštuma (*brūkšninė linija*) tarp normalių („riebalai vandenyje“) ir atvirkščių („vanduo riebaluose“) struktūrų. Iš abiejų pusių galimas kubinių besitęsiančių (V_1 arba V_2), heksagoninių (H_1 arba H_2), kubinių micelinių (I_1 ar I_2) ir micelinių fazių (L_1 arba L_2), taip pat kitų tarpinių fazių (pvz., L_3 fazė („kempinės“)) formavimasis [82].

Kaip minėta anksčiau, vaistinių medžiagų ir maisto komponentų pernašai galima taikyti ir koloidines dispersijas. Išskaidytos vandens pertekliuje polinių lipidų (pvz., fosfatidilcholinai) savitvarkės sistemos formuoja *disperguotas lipidų skystakristalių fazių nanodaleles*. Analogiškai, kaip ir su liposomų dispersijomis, LSKN dispersijos gali būti paruošiamos per visą fazių struktūrų seką, t. y. apimti visas nelamelines SK fazių struktūras („vanduo riebaluose“). Norėusi paminėti, kad normalių fazių („riebalai vandenyje“) suformavimui

netinka vandenyje tirpūs poliniai lipidai, nes jie neišlaiko micelių struktūros vandens pertekliuje. Apibendrinant būtų galima pasakyti, kad visos atvirkščios fazės (besitęsianti kubinė (V_2), heksagoninė (H_2), kubinė micelė (I_2), kempinės (L_3)) gali būti išskaidytos į nanodaleles, kurių vidutinis dydis svyruoja nuo 50 iki 500 nm, su joms būdingomis vidinėmis nanostruktūromis ir funkcinėmis savybėmis.

Tiek SK fazių, tiek LSKN dispersijų vidinių struktūrų nustatymas ir jų elgsenos tyrimai atliekami šiais metodais: mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija, poliarizuojančios šviesos mikroskopija, kriogenine transmisine elektronine mikroskopija, o dispersinių dalelių parametrai išmatuojami su lazerio šviesos sklaidos prietaisais.

1.3.3 Rentgeno spindulių difrakcijos taikymas lipidinių sistemų tyrimuose

Šio skyriaus tiklas yra trumpai ir glaustai supažindinti su rentgeno spindulių difrakcijos metodo principais, galutinių struktūrų interpretacija ir taikymu lipidinių sistemų tyrimuose.

Rentgeno spindulių kilmė ir panaudojimas. Rentgeno spinduliai elektromagnetinių spindulių skalėje yra tarp ultravioletinių ir gama spindulių, o jų bangos ilgis – 1-100 Å (t. y. 0,1-10 nm). Šie spinduliai susidaro, kai įgreitinti elektronai, dideliu greičiu atsitrenkę į anodą, savo judėjimo energijos dalį išspinduliuoja būtent rentgeno spindulių pavidalu. Šiuo metu dalelių greitintuvai vis dažniau naudojami kaip rentgeno spindulių šaltiniai. Greitintuvuose elektronai arba pozitronai yra įleidžiami į labai ilgą vakuuminį žiedą, kuriame jie cirkuliuoja ypatingai dideliu greičiu (įgreitinami galingais radijo dažnio bangų šaltiniais). Išoriniai superlaidūs magnetai išlaiko daleles žiede. Toks greitintuvas išskiria sinchrotroninę spinduliuotę – plataus spektro ypač galingus rentgeno spindulius (100 ar net 10 000 kartų galingesnius už įprastinius). Matavimams pasirenkama norimo bangos ilgio beveik monochromatinė spindulio dalis, dažniausiai – apie 1 Å [83].

Rentgeno spindulių difrakcija ir Brego dėsnis. Nors Konradas Vilhelmas Rentgenas 1895 m. pirmą kartą aptiko šią spinduliuotę, bet jų fizikinė prigimtis nebuvo žinoma. 1912 m. Maksas von Laue nustatė, kad kristalai difraguoja rentgeno spindulius. O seras Viljamas L. Bregas pastebėjo panašumą tarp kristalų difrakcijos ir įprasto atspindžio, išvedė lygtį, kuri aprašo difrakciją, kaip atspindį nuo gardelės plokštumų. Grįžtant prie rentgeno spindulių difrakcijos, šio metodo esmė yra ta, kad krintančio spindulio kelyje esantys analizuojamos medžiagos elektronai pradeda svyruoti tokiu pačiu dažniu ir amplitude kaip ir pirminė spinduliuotė. Spinduliuotės sukeltos periodinės elektronų tankio fliuktacijos gali sukurti konstruktyvią interferenciją, kuri ir yra detektuojama. Kiekvienas tiriamos medžiagos atomas elgiasi kaip taškinis išsklaidytos spinduliuotės šaltinis. Taikant šį principą lipidų skystakristalių sistemoms, galime teigti, kad spindulių difrakcija vyksta nuo plokštumos. Detalizuokime Brego dėsnį: jei du rentgeno spinduliai (1) ir (2) ant dviejų plokštumų $P1$ ir $P2$, tarp kurių yra atstumas d (1.6 pav.) krenta kampu θ , tai elektronai, esantys taškuose O ir C , pradės vibruoti, ir vibruojantys krūviai skleis spindulius visomis kryptimis [83]. Ta kryptimi susidarę antriniai spinduliai $1'$ ir $2'$ turi tenkinti sąlygą – kiekvienas jų turi būti maksimalaus intensyvumo difragavęs spindulys nuo plokštumos kampu θ ir antrinių spindulių $1'$ ir $2'$ fazės turi sutapti. Tuomet nubrėžus aukštines iš pirminio spindulio kritimo taško O į A ir B , turime, kad $\angle AOC = \angle BOC = \theta$, o $AC=BC$. Todėl spindulio $2'$ bangos fazė sutaps spindulio $1'$, jei $AC+CB$ ($=2AC$) yra sveikas bangos ilgių λ skaičius. Tai išreiškiama lygtimi:

$$2AC = n\lambda \quad (1.1)$$

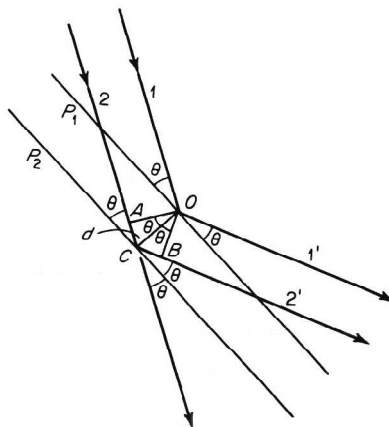
$AC/d = \sin\theta$, tuomet pakeitę gauname Brego dėsnį:

$$2d \sin\theta = n\lambda \quad (1.2)$$

Gaunamose difraktogramose yra pateikiami atspindėjimo intensyvumai ir q – sklaidos vektorius, kuris apskaičiuojamas pagal Brego dėsnio išvestinę lygtį:

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} = \frac{2\pi}{d} \quad (1.3)$$

čia: n – difrakcijos laipsnis (sveikasis skaičius), λ – krintančios rentgeno spinduliuotės bangos ilgis, d – kintantis dydis, atstumas tarp kristalinės gardelės plokštumų [83-86].



1.6 pav. Difrakcijos sąlygos elementarioje kristalinėje gardelėje [86]

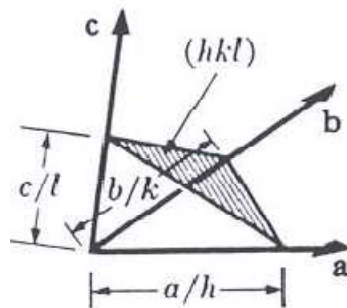
Taigi, d atvirkščiai proporcingas $\sin\theta$, todėl kuo didesni kartotiniai atstumai d , tuo mažesni kampai ties kuriais stebima spindulių difrakcija. Iš to seka, kad vienas svarbiausių faktorių yra rentgeno spinduliuotė. Norėdami nustatyti θ kampus, kurie yra apie 1° (kas atitinka keletą ar kelioliką nanometrų kartotinių atstumą d), reikia išgauti aukštos kokybės ir didelio pajėgumo rentgeno spindulių, gaunamų tik sinchrotronuose. Todėl SAXD metodas yra idealus tvarkingų struktūrų su dideliais atstumais (pvz., skystųjų kristalų ar kompleksinių skysčių) tyrimui.

Rentgeno difrakcijos vaizdas yra proporcingas atvirkštinei gardelei, t. y. difrakcinio vaizdo intensyvumas yra susijęs su kristalo erdvinės struktūros trimate Furjė transformacija. Atlikę atbulinę transformaciją, gauname elektronų tankio pasiskirstymą, pagal kurį ir modeliuojame/priskiriame atitinkamoms kristalų šeimoms. T. y. elektronų išsidėstymas (arba tankis) atspindi molekulės struktūrą. Kadangi kristaluose molekulės yra išsidėsčiusios periodiškai, todėl elektronų tankį visoje kristalo gardelėje galima aprašyti matematiškai, kaip periodinę funkciją $\rho(x, y, z)$. O elektroninio tankio žemėlapis yra periodinė funkcija, kurią galima aprašyti Furjė eilutėmis. Norint

galutinai nustatyti gardelės struktūrą, reikia nustatyti atspindžio fazes. Elektroninio tankio žemėlapi $\rho(x, y, z)$ su difrakciniu vaizdu sieja lygtis:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (1.4)$$

kurioje h , k ir l yra atspindžių indeksai, o F_{hkl} yra struktūrinis elementas, aprašantis atspindį. Kiekvienas struktūrinis elementas išsamiai aprašo difragavusį spindulį, kuris sukelia atspindį hkl . h , k ir l , dar kitaip vadinami Milerio indeksai, kristalografijoje apibūdina gardelės plokštumas ir kryptis. Jeigu naudojama trijų matmenų difrakcinė gardelė kaip matematinis modelis, tai šie trys indeksai h , k , l tampa gardelės kraštinių a , b , c ilgių atitikmenimis (1.7 pav.).



1.7 pav. Kristalografinių parametrų hkl ir gardelės parametrų abc sąsajos

Kristalų erdvinės grupės yra suskirstytos į septynias trimates kristalų šeimas: triklinikinė, monoklinikinė, ortorombinė, tetragoninė, trigoninė-romboedrinė, heksagoninė ir kubinė. Priklausomai nuo gardelės mazgų pozicijos gardelėje, egzistuoja 7 primityviosios ir 7 neprimityvios Bravė (*pranc.*, Auguste Bravais) gardelės. Septynios neprimityviosios gardelės priklauso septynioms kristalinėms simetrijoms. Todėl parenkant gardelę, atsižvelgiama ne tik į gardelę, bet ir į simetriją. Parinkdami vieną iš 32 taškų grupių ir vieną iš 14 Bravė gardelių, galime gauti 230 unikalių taškų išsidėstymų erdvėje ir šie išsidėstymai padeda įvardinti, kokiai erdvinei grupei priklauso tiriamą medžiaga.

1.3.1 lentelėje pateiktos dažniausiai LSK sutinkamų fazių indeksuojamų kristalų šeimų tarpplokštuminio atstumo (d_{hkl}) skaičiavimo formulės ir

matematinės atspindžių dėsnių skaičiavimo formulės, kurios padeda tiksliai nustatyti kristalo simetrijos tipą.

1.3.1 lentelė. Kristalinių sistemų tarpplokštuminio atstumo (d_{hkl}) skaičiavimo formulės ir atspindžio dėsniai.

Kristalų šeima	d_{hkl}	Atspindžio dėsnis
Lamelinė ($L\alpha$)		$\left(\frac{a}{d}\right)^2 = 1, 2, 3, 4, 5, 6 \dots$
Kubinė $Pn3m (C_D)$	$\frac{1}{d^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2}$	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 \dots$
Kubinė $Ia3d (C_G)$		$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 6, 8, 14, 16, 20, 22 \dots$
Kubinė $Im3m (C_P)$		$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 \dots$
Kubinė $Fd\bar{3}m$		$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 3, 8, 11, 12, 16, 19, 24 \dots$
Heksagoninė	$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2}$	$\left(\frac{\sqrt{3} \cdot a}{2 \cdot d_{hkl}}\right)^2 = 1, 3, 4, 7 \dots H_2$ atveju

1.3.4 Flavonoidų įterpimas į lipidų pagrindu sukurtas sistemas

Pastaruoju metu spanguolės kelia vis didesnę visuomenės susidomėjimą kaip funkcinis maisto papildas, skirtas sveikatos gerinimui. Šiose uogose gausu fenolinių rūgščių, flavonolių, antocianinų, proantocianidinų. Moksliniai tyrimai patvirtino, kad spanguolėse esantys flavonoidai pasižymi antioksidaciniu, antitrombogeniniu, priešuždegiminiu, priešvėžiniu, antivirusiniu poveikiu [27-29, 48, 87, 88]. Didelio dėmesio yra sulaukęs ir kvercetas (QU) (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavonas), vienas iš gausiausiai spanguolėse kaupiamų flavonolių aglikonų, kuris pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu [89, 90]. Be antioksidacinių savybių, QU taip pat pasižymi priešvėžinėmis, antivirusinėmis, antialerginėmis savybėmis [91, 92]. Atlikti *in vivo* ir *in vitro* eksperimentai įrodė, kad šis natūralus antioksidantas slopina krūties, plaučių, storosios žarnos, prostatos, gimdos kaklelio piktybinių navikų vystymąsi [93-95].

Pagrindinės problemos, kurios riboja QU pritaikymą medicinoje, yra mažas tirpumas vandenyje ir nestabilumas fiziologinėje terpėje (pvz., preparatą vartojant per burną) [96]. Siekiant išplėsti QU (o vėliau ir natūraliose

spanguolėse esančių flavonoidų) klinikinį pritaikymą, išspręsti tirpumo, stabilumo ir biologinio prieinamumo problemas, būtina sukurti stabilias pernašos sistemas, kurios tarnautų kaip tikslinės medžiagos nešikliai. Literatūroje galima rasti įvairių lipidų pagrindu sukurtų pernašos sistemų su imobilizuotu/įterptu QU (pvz.: mikrokapsulės [97], emulsijos [98-101], nanosuspensijos [102], kietosios lipidinės nanodalelės [60, 103-106]), kurios iš dalies išsprendžia prieš tai minėtas problemas. Keletą šių eksperimentų aptarsime plačiau. 2007 m. pasirodžiusioje publikacijoje autoriai siūlė QU įterpti į polimetilmetakrilato pagrindu pagamintas mikrokapsules [97]. Be pateiktų morfologinių, *in vitro*, veikliosios medžiagos atpalaidavimo tyrimų, autoriai nurodė, kad įkapsuliavimo koeficientas svyravo nuo 12,7 iki 26,9 % (pirminiame mikrokapsulių gaminimo etape, QU koncentracija buvo tik 0,4 %). Stabilumo tyrimai parodė, kad per 28 dienas, esant 42 °C temperatūrai, veikliosios medžiagos sistemoje teliko 18 %, esant 25 °C – 81 %. F.T.M.C. Vicentini su kolegomis kaip veikliosios medžiagos (QU) nešiklį panaudojo mikroemulsijas [99]. Šių sistemų sudėtis būtų: 15 % propilenglikolio ir vandens fazė (3/1, v/v), 46,75 % emulsiklis (Span 80 arba Tween 80) ir 46,75 % rapsų aliejus. QU ištirpinamas aliejuje (0,3 %) ir įnešamas į bendrą sistemą. Paruoštos emulsijos buvo naudojamos *in vitro* ir *in vivo* skverbimosi pro odą tyrimuose. S. Bose ir B. Michniak-Kohn kvercetiną įterpė į glicerilbehenato ir oleino rūgšties pagrindu pagamintas kietąsias nanodaleles [106]. Šiose sistemose veikliosios medžiagos koncentracija buvo 0,05 ir 0,025 %. Stabilumo tyrimai tęsėsi 14 savaičių, kurių metu mėginiai buvo laikomi 2–8 °C temperatūroje. Geriausias rezultatus parodė dalelės su įterpta mažesne QU koncentracija – autoriai teigia, kad išmatuotas vidutinis dalelių dydis ir z-potencialas liko nepakitę. Taip pat daug dėmesio sulaukė fosfolipidų pagrindu sukurtos įvairios vaistinių medžiagų nešiklių sistemos ir liposomos, kurios tinka kvercetino įterpimui ir pernašai [107-113]. Fosfolipidai dėl savo amfifilinės prigimties gali įtakoti veikliosios medžiagos tirpumą nešiklyje, išsiskyrimo/išėjimo greitį iš nešiklio, taip pat padidinti absorbciją per biologinius barjerus [73, 107, 114]. Bet šių nešiklių pritaikymą kasdieniniame

gyvenime riboja sudėtingas paruošimas ir mažas įkapsuliavimo koeficientas vandenyje netirpių junginių, tokių kaip kvercetas. Apibendrinant būtų galima pastebėti, kad daugelyje šių eksperimentų į lipidines sistemas buvo įterpti labai maži kiekiai QU. Antra, kadangi šios paruoštos sistemos buvo naudojamos lokalizuotiems eksperimentams ant odos ir gleivinės, ilgalaikiai stabilumo tyrimai neatlikti arba šių tyrimų metu buvo matuojama ne tiesioginė kverceto koncentracija sistemose, o pvz., vidutinis dalelių dydis ar antioksidacinis aktyvumas.

Kaip alternatyva, hidrofobinių, hidrofilinių, o taip pat ir amfifilinių junginių įterpimui, pradėtos taikyti nelamelinės SK fazės, kurios ne tik gerai tirpina šiuos junginius, bet ir pasižymi daug didesniu talpos plotu nei lamelinės SK fazės [115-117]. Todėl gali būti pritaikytos sistemų, skirtų baltymų, peptidų ir maisto komponentų pernašai [79, 118]. Kaip jau rašėme anksčiau, nelamelinės SK fazės, tokios kaip heksagoninė, kempinė ir kubinė, priklausomai nuo lipidų prigimties ir (arba) lipidų mišinio sudėties, gali formuoti mono arba bisluoksnes besitęsiančias savitvarkes struktūras [74]. Vienos jų, glicerolio dioleato (GDO) ir sojos fosfatidilcholino (SPC) pagrindu sukurtos lipidinės pernašos sistemos pasižymi savo universalumu, t. y. bioadhezija, kontroliuojamu veikliosios medžiagos atpalaidavimu, didele talpa įterpiamam junginiui ir geba formuoti platų spektrą savitvarkių struktūrų nuo lamelių iki nelamelinių SK fazių [119, 120]. Be to, į lipidų SPC/GDO mišinius pridėjus nedidelį kiekį polimerinio dalelių stabilizatoriaus P80 ir dispergavus vandens pertekliuje, galima gauti nelamelines lipidų skystakritales nanodaleles, su kontroliuojamu dalelių dydžiu ir vidine struktūra, kurias sėkmingai galima taikyti vaistų pernešimui [82, 121, 122]. Peržvelgus visą prieinamą literatūrą, pavyko aptikti tik vieną tyrimą, kurio metu Murgia su kolegomis įterpė QU į glicerolio monooleato (GMO) pagrindu suformuotas bisluoksnes besitęsiančias kubines LSKN ir parodė, kad nedideli kiekiai QU nekeičia nanodalelių dydžio, krūvio ir vidinės struktūros [123].

Tad, tiek lipidų skystakristalės fazės, tiek ir disperguotos SK nanodalelės, pasižyminčios dideliu vidiniu paviršiaus plotu, gali tarnauti kaip patalpinimo, apsaugos nuo degradacijos ir tikslinės medžiagos atpalaidavimo matrica.

2 EKSPERIMENTO METODIKA

2.1 Reagentai ir medžiagos

Tirpikliai: acetonitrilas (ACN), gradientinės ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, Vokietija); acetonas, >99,5 % grynumo (Merk Millipore, Vokietija); etanolis (EtOH), 99,7 % grynumo (Merk KgaA, Vokietija); metanolis (MeOH), gradientinės ESCh grynumo (Merk KgaA, Vokietija); skruzdžių rūgštis, 98–99 % grynumo (Scharlau Chemie, Belgija). Dejonizuotas vanduo paruoštas vandens gryninimo įranga NANOpure Infinity (Barnstead, JAV).

Flavonoidų etaloninės medžiagos: miricetinas (CAS-Nr. 529-44-2), $\geq 96,0$ % grynumo, kvercetinas (CAS-Nr. 117-39-5), $\geq 98,0$ % grynumo ir kaempferolis (CAS-Nr. 520-18-3), $\geq 90,0$ % grynumo (Sigma-Aldrich, Vokietija). Pirminiai flavonoidų etaloniniai tirpalai (0,5 mg/g) buvo ruošiami metanolyje ir laikomi tamsiuose buteliukuose 4 °C temperatūroje. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo ruošiami skiedžiant pirminius etaloninius tirpalus metanolio ir vandens mišiniu (9:1, v/v).

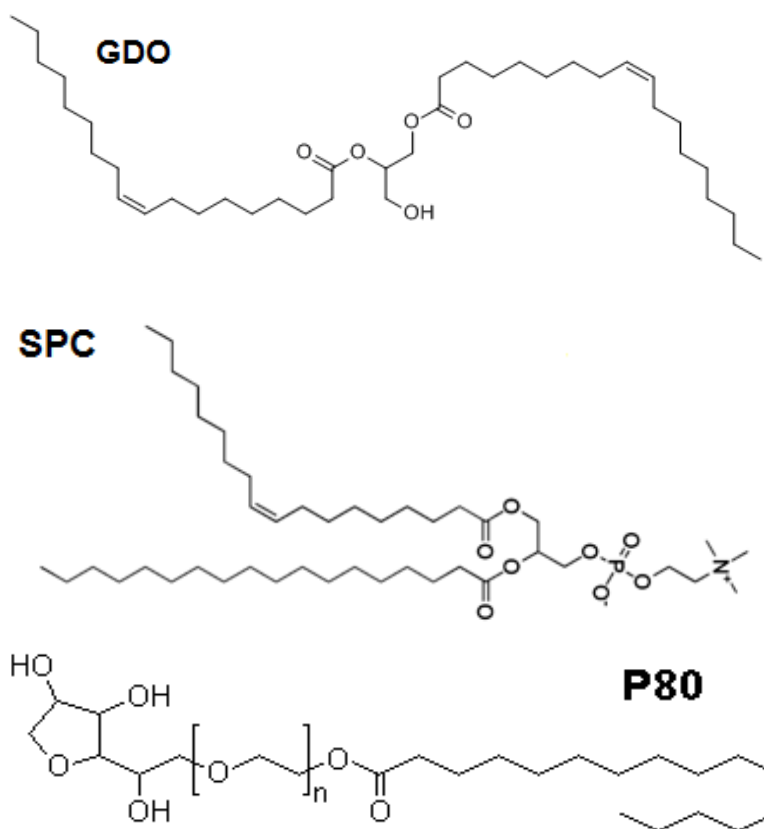
Kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos sorbentai: silikagelis, 40–63 μm ir oktadecilsilikagelis (C18), 40–63 μm , (Sigma-Aldrich, JAV).

Lipidai: diglicerolio monooleatas (DGMO) (Danisco, Danija), glicerolio dioleatas (GDO) (Danisco, Danija), sojos fosfatidilcholinas (SPC S100) (Lipoid GmbH, Vokietija), glicerolio monooleato eteris (GME) (Niko Chemicals, Japonija), komercinis mono-, di- ir trigliceridų mišinys Campul GMO-50 (Abitec, JAV).

Polioksitileno sorbitano monooleatas (Polisorbatas 80, P80, Tween 80) (Abitec, JAV). Šio junginio ir dviejų lipidų, daugiausiai naudotų šiame darbe, struktūrinės formulės pateiktos 2.1 paveiksle.

Antioksidacinių savybių tyrimų reagentai: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH⁻), (Sigma-Aldrich, Vokietija), (\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksi rūgštis (Troloksas), $\geq 97,0$ % grynumo (Sigma-Aldrich, Vokietija).

Mėginys: liofilizuotų spanguolių milteliai (Healthy Supplies, JK).



2.1 pav. Lipidų sojos fosfatidilcholino (SPC), glicerolio dioleato (GDO) ir stabilizuojančio agento P80 struktūrinės formulės

2.2 Mėginių paruošimo procedūros

2.2.1 Kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos procedūra

0,5 g pasirinkto disperguojančio sorbento suberiama į agato grūstuvę, ant sorbento sulašinama modelinio flavonolių etaloninio tirpalo (0,05 mg/g miricetino ir kvercetino), mišinys atsargiai sutrinamas su agato grūstuve. Dispergavus mėginį su sorbentu (apie 2 min), gautas mišinys suberiamas į tuščią 15 ml tūrio švirkšto korpusą su filtru apačioje, uždengiame iš viršaus kitu filtru, lengvai supresuojama. Taip užpildytas švirkštas prijungiamas prie frakcijų kolektoriaus, sujungtu su vakuuminiu siurbliu. Analitės desorbuojamos su 5 ml pasirinkto vandens/metanolio mišiniu (eliucijos greitis 2–3 ml/min). Visi eliuatai nugarinami iki sausos liekanos kambario

temperatūroje azoto sraute. Liekana tirpinama 1 g MeOH, filtruojama ir analizuojama.

Po ekstrakcijos optimizavimo, ši procedūra buvo pritaikyta liofilizuotų spanguolių miltelių mėginiams, maisto papildams.

2.2.2 Lipidų skystakristalių fazių pirmtakų paruošimas

Lipidų skystakristalių fazių pirmtakai ruošiami maišant atitinkamus kiekius lipidų (DGMO, GDO, Campul GMO-50, GME ir SPC) su tirpiklio priedu ir be. Lipidų mišiniai paliekami maišytis 24 val. sukamajame įrenginyje iki pilnos homogenizacijos. Paruošti mėginiai paliekami kambario temperatūroje iki tolimesnio panaudojimo. SK fazių pirmtakai su įterptu modeliniu junginiu kvercetinu (QU) ar natūraliais flavonoidais, ruošiami pridedant flavonoidų į pirmtakus ir paliekant juos homogenizuotis 24–48 valandoms sukamajame įrenginyje. Norint įvertinti neištirpusį įterptą junginį, mėginiai buvo apžiūrimi pro kryžminį poliarizatorių ir šviesos mikroskopą. Šiame darbe komponentų santykis lipidų mišiniuose pateiktas svorio procentais (%).

2.2.3 Lipidų skystakristalių fazių paruošimas

Lipidų skystakristalės fazės gaminamos iš lipidų SK pirmtakų (su modelinės medžiagos priedu ir be jo), juos (apie 300 mg) įlašinant į vandenį, santykiu SK pirmtakas/vanduo – 5/95. Paruošti mėginiai tuoj pat sandariai uždaromi ir paliekami pusiausvyrintis kambario temperatūroje 10 dienų iki tolimesnių tyrimų.

2.2.4 Disperguotų lipidų skystakristalių nanodalelių paruošimas

LSKN gamybai paruošiami bevandeniai lipidų mišiniai sumaišant atitinkamą SK pirmtaką (SPC/GDO = 35/65, 60/40 %), polimerinį dalelių stabilizatorių P80 ir etanolį, santykiu 75/15/10 ((SPC+GDO)/P80/EtOH).

Šiuose mišiniuose tirpinamas ir modelinis junginys QU ar atitinkamų frakcijų junginiai, kurių koncentracija buvo 0,5, 1,0, 2,0 ir 4,0 %. Lipidų skystakristalių fazių nanodalelės ruošiamos disperguojant prieš tai paruoštą mišinį su vandeniu, santykiu 17,5/82,5 %. Vandeninės dispersijos labai greitai ir stipriai supurtomos, sandariai uždaromos ir paliekamos 72 valandoms purtyklėje (275 judesių/min.), o vėliau laikomos tamsoje, kambario temperatūroje .

2.2.5 Kvercetino stabilumo tyrimai

Įterpto QU stabilumo tyrimai buvo atliekami lipidų skystakristalių fazių pirmtakuose, lipidų skystakristalėse fazėse ir disperguotose lipidų skystakristalėse nanodalelėse. Tyrimų laikotarpis – trys mėnesiai, kurio metu bandiniai buvo laikomi kambario temperatūroje, tamsoje. Numatytuose laiko taškuose (1, 15, 30, 60 ir 90 diena) bandinio porcija (apie 10–15 mg) buvo tirpinama ACN:MeOH (1:1, v/v) mišinyje, santykiu bandinys:tirpiklis 1:100 (%), vėliau mėginys filtruojamas ir analizuojamas (žr. 2.3.1 skyrelį). Kiekvienas mėginys analizuojamas tris kartus.

2.2.6 Antioksidacinio aktyvumo nustatymas naudojant DPPH[•] radikalo surišimo testą

DPPH[•] radikalo paruošimui buvo atsveriamas 0,0236 g DPPH[•] reagento, tirpinama ir skiedžiama iki 100 ml 100 % MeOH. Kolbutė izoliuojama nuo šviesos ir 30 min. laikoma ultragarsinėje vonelėje. Darbinis DPPH[•] tirpalas paruošiamas, skiedžiant pirminį DPPH[•] tirpalą 100 % MeOH. Darbinio DPPH[•] tirpalo absorbcija išmatuojama spektrofotometru (žr. 2.3.6 skyrelį) prie 515 nm ir turi būti lygi $0,730 \pm 0,02$ sant. absorbcijos vienetų. Į matavimo kiuvetes įnešama po 100 µl paruošto mėginio, pridedama 3,9 ml darbinio DPPH[•] tirpalo ir paliekama 30 min. tamsoje iki matavimų. Absorbcija matuojama 515 nm bangos ilgyje. Antioksidacinis aktyvumas nustatomas pagal Troloxso kalibracinės kreivės lygtį, koncentracijų 25–100 mM intervale. Matavimai buvo kartojami po tris kartus.

Trolokso kalibracinė kreivė nustatoma tokia seka: paruošiamas pirminis Trolokso etaloninis tirpalas – ištirpiname 5 mg Trolokso reagento 100 ml MeOH/H₂O (70/30, % v/v) mišinyje. Skiedimo būdu pagaminame keturis kalibracinius tirpalus (100, 50, 25 ir 12,5 % Trolokso). Į matavimo kiuvetes įnešama 100 µl kiekvieno kalibracinio tirpalo, pridama 3,9 ml darbinio DPPH^{*} tirpalo. Absorbicija matuojama kiekvienam kalibracinės kreivės taškui 515 nm bangos ilgyje su spektrofotometru. Remiantis matavimais, gaunama kalibracinė kreivė, kuri naudojama tolimesniuose antioksidaciniuose aktyvumo skaičiavimuose. Visi mėginiai matuojami po tris kartus.

2.3 Įranga ir matavimo sąlygos

2.3.1 Efektyvioji skysčių chromatografija-masių spektrometrija

ESCh tyrimai buvo atliekami su Agilent HPLC 1100 Series (Agilent Technologies, JAV) chromatografu, sukomplektuotu iš aukšto slėgio keturių kanalų gradientiniu siurbliu, rankinės mėginio įvedimo sistemos, kolonėlių termostato ir fotodiodinės matricos (PDA) ultravioletinio bei matomo (UV/VIS) spektro absorbcijos detektoriaus ir didelio jautrio jonų gaudyklės tipo masių spektrometro Agilent 1100 LC/MSD Trap XCT Plus (Agilent Technologies) šaltinio, taikant neigiamą jonizaciją. Įvedamas mėginio tūris – 20 µl. Chromatografinė kolonėlė termostatuojama 25 °C temperatūroje. Analičių atskyrimui naudota Zorbax Eclipse XDB C-18 (150 × 4,6 mm, 5,0 µm) kolonėlė (Agilent Technologies, JAV) ir C18 prieškolonėlė (Agilent Technologies, JAV). Judrios fazės srauto greitis – 1 ml/min. Judri fazė formuojama iš dviejų eliuentų: dejonizuotas vanduo (A) ir metanolis (B), parūgštinti 0,5 % skruzdžių rūgštimi. Eliucijos gradiento programa, MS-APCI jonizacijos šaltinio parametrai pateikti skyriuje „Rezultatai ir jų aptarimas“ 3.1.1 dalyje. Duomenys buvo apdorojami ChemStation B.01.03 programine įranga.

2.3.2 Poliarizuojančios šviesos mikroskopija

SK fazių tekstūra ir struktūriniai pokyčiai, kintant temperatūrai, buvo stebimi poliarizuojančios šviesos mikroskopu Optiphot, sukomplektuotu su kamera DS-2Mv (Nikon) ir mėginio kaitinimo stalu Analysa LTS350 (Linkam). Mažas mėginio kiekis buvo padedamas ant mikroskopinio stikliuko ir uždengiamas kitu, stikliukų kraštai ištepami temperatūrai atspariu silicio tepalu, kuris apsaugo bandinį nuo vandens išgaravimo. Palaipsniui didinant temperatūrą (matavimo žingsnis – kas 5 °C, kaitinimo greitis – 1 °C/min.) fiksuoti struktūriniai pokyčiai. LSKN tyrimai su įterptu QU ar flavonoidais buvo atliekami su poliarizuojančios šviesos mikroskopu DM 750 (Leica), sukomplektuotu su skaitmeniniu fotoaparatu MC170 (Leica).

2.3.3 Mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija

Detaliems lipidų SK fazių nanostruktūros ir jų elgsenos tyrimams, esant temperatūros pokyčiams, buvo taikomas mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcijos metodas (SAXD). Šie tyrimai atlikti Nacionalinėje sinchrotroninėje laboratorijoje MAX-lab, I911-4 spindulio stotyje (Lundo universitetas, Švedija), naudojant 1M PILATUS 2D detektorių (981 × 1043 vaizdo taškų). Kelių miligramų SPC/GDO SK fazių mėginiai sudedami į atskirus poliimidinius langelius (Kapton[®]), kurie pritvirtinami plieniniame laikiklyje. Atstumas tarp mėginio ir detektoriaus buvo 1917 mm. Difraktogramos fiksuojamos vakuume, kai spindulio, einančio per mėginį, bangos ilgis 0,91 Å, o spindulio dydis 0,25 × 0,25 mm (visas plotis maksimumo viduryje). Matavimai atlikti 25, 35, 45, 55 ir 65 °C temperatūrų taškuose, kiekviename jų pusiausvyros trukmė buvo 10 min., o ekspozicija – 60 s. Sidabro behenatas (CH₃-(CH₂)₂₀-COOAg) buvo naudojamas atstumui tarp mėginio ir detektoriaus, ir pačio detektoriaus pozicijai sukalibruoti. Gauti CCD vaizdai integruoti ir analizuoti Fit2D programine įranga (dr. A. Hammersley: <http://www.esrf.fr/computing/scientific/FIT2D>).

2.3.4 Dinaminė šviesos sklaida ir zeta potencialas

Disperguotų lipidų SK nanodalelių dydžio pasiskirstymai išmatuoti dinaminės šviesos sklaidos, o dalelių paviršiaus krūvis – matuojant zeta potencialą, elektroforezės metodais, naudojant ZetasizerNano ZS analizatorių (Malvern Instruments, JK). Matavimams naudojamos 1 ml tūrio vienkartinės kiuvetės, kuriose LSKN bandinys skiedžiamas iki 99,5 % vandens. Duomenys sukaupiami iš 30 matavimų (kiekvienas trunka 10 s). Lūžio rodiklis lipidų nanodalelėms buvo 1,48, o vandeniui – 1,33. Tikrasis hidrodinaminis spindulys (diametras) (D_H) apskaičiuotas pagal Stokso-Einšteino lygtį sferinėms dalelėms:

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

Čia: k – Boltzmano konstanta, T – absoliuti temperatūra, η – dispersinės fazės klampa, r – sferinių dalelių spindulys, D – difuzijos koeficientas. Dalelių dydžio pasiskirstymai išreiškiami iš apskaičiuotų intensyvumo vidurkių ir polidispersiškumo indekso. Mėginiai dalelių paviršiaus krūvio matavimams ruošiami analogiškai prieš tai aprašyta seka – vienkartinėse 1 ml tūrio kiuvetėse, LSKN bandinį skiedžiant vandeniui iki 99,5 %. Zeta potencialas apskaičiuotas pagal Smoluchovskio aproksimaciją vandeninėms dispersijoms su dinaminio klampumu 0,8872 cP, refrakcijos indeksu 1,33 ir dielektrine konstanta lygia 78,5.

2.3.5 Kriogeninė transmisinė elektroninė mikroskopija

LSKN dispersijų mėginiai kriogeninės transmisinės elektroninės mikroskopijos (krio-TEM) matavimams buvo ruošiami griežtai kontroliuojamose aplinkos sąlygose, siekiant užtikrinti stabilią oro temperatūrą (25–28 °C) ir apsaugoti mėginį nuo drėgmės praradimo. 5 μ l LSKN dispersijos (atskiestos iki 95 % vandens) bandinio užnešama ant anglimi dengtų varinių grotelių, atsargiai nusausinama su filtro popieriumi. Ant mėginio paviršiaus susiformuoja plona skysčių plėvelė (20–400 nm). Grotelės greitai panardinamos į skystą etaną (–196 °C) tam, kad bandiniuose esantis

vanduo pavirstų į amorfinį ledą. Taip išvengiama ledo kristalų susidarymo ir išsaugoma nepažeista mėginio vidinė struktūra. Paruošti mėginiai iki matavimų laikomi skystame azote ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Matavimo metu mėginiai pernešami kriogeniniu laikikliu (Oxford CT3500) į mikroskopą Philips CM120 BioTWINCryo sukomplektuotu su prieškolonėliniu energijos filtru Gatan GIF100. Matavimo metu įtampos pagreitis buvo lygus 120 kV, o darbinė temperatūra palaikoma mažesnė nei $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nuotraukos padarytos skaitmenine CCD kamera, esant mažai elektronų dozei.

2.3.6 Antioksidacinio aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio metodu

UV/Vis spektrofotometru LAMBDA 25 (PerkinElmer, JAV) išmatuotas ir įvertintas antioksidacinis aktyvumas spanguolių ekstraktuose, lipidinėse sistemose su modeliniu junginiu ir natūraliais ekstraktais.

3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

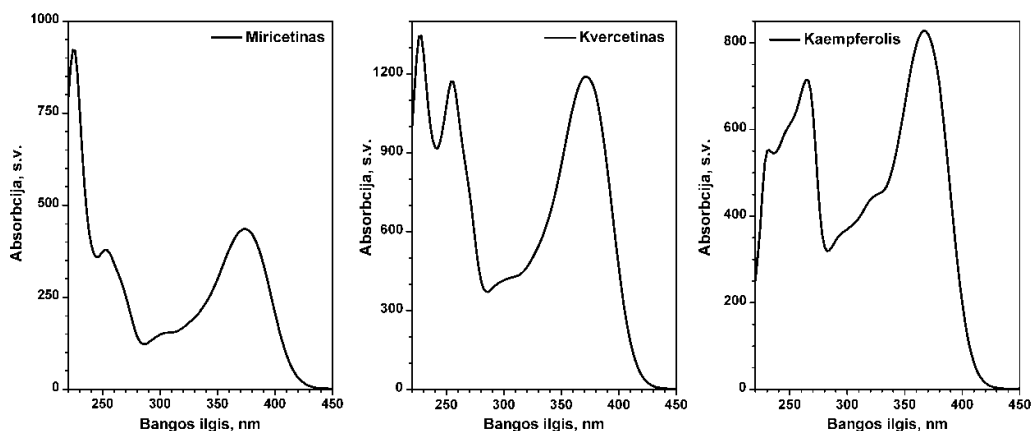
3.1 Flavonolių nustatymas ESCh-MS metodu, panaudojant KDE

Taikomi augalinės kilmės mėginių paruošimo metodai chromatografinėi bei masių spektrometrinei analizei dažnai yra ilgai trunkantys, reikalaujantys specifinės laboratorinės įrangos bei didelių kiekių organinių tirpiklių. Siekdami supaprastinti ir pagreitinti mėginių paruošimo procedūrą, flavonolių išskyrimui iš natūralių spanguolių ir maisto papildų, pritaikėme ir ištyrėme kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos metodą, optimizavome ESCh-MS analizę.

3.1.1 Flavonolių detektavimo ir atskyrimo sąlygų tyrimas

Kaip jau minėjome literatūrinėje apžvalgoje, spanguolių flavonolių, antocianinių ir proantocianinių atskyrimas ir identifikavimas dažniausiai atliekamas ESCh-MS metodais. Vieno ar visos junginių grupės atskyrimui skysčių chromatografinėje analizėje dominuoja atvirkščių fazių variantas, kuriame nejudriomis fazėmis naudojami nepoliniai sorbentai (pvz., oktasilikagelis (C8) ar oktadecilsilikagelis (C18)), o judriomis fazėmis – vandens ir polinių tirpiklių (MeOH, ACN) mišiniai. Šiame darbe flavonolių atskyrimui pasirinkome atvirkščių fazių C18 kolonėlę ir metanolio-vandens-skruzdžių rūgšties sistemą.

Pirmame etape buvo siekiama parinkti optimalius bangos ilgį, kuriuose ne tik modelinių, bet ir kitų flavonolių esančių spanguolėse absorbcija būtų maksimali. 3.1 pav. pavaizduoti modelinių flavonolių absorbcijos spektrai, išmatuoti PDA detektoriumi. Analizių rezultatai šiuose tyrimuose pateikti, kai kvercetino ir kaempferolio absorbcijos signalai registruoti 370 nm, o miricetino – 380 nm bangos ilgiuose. Būtų galima visus šiuos tris junginius registruoti 370 nm absorbcijoje, bet šiame bangos ilgyje miricetino signalas persikloja su kitais dviem junginiais esančiais natūralių spanguolių ekstraktuose. Todėl miricetinas buvo detektuojamas 380 nm bangos ilgyje, dėl ko detekcijos jautris liko nepakitęs.

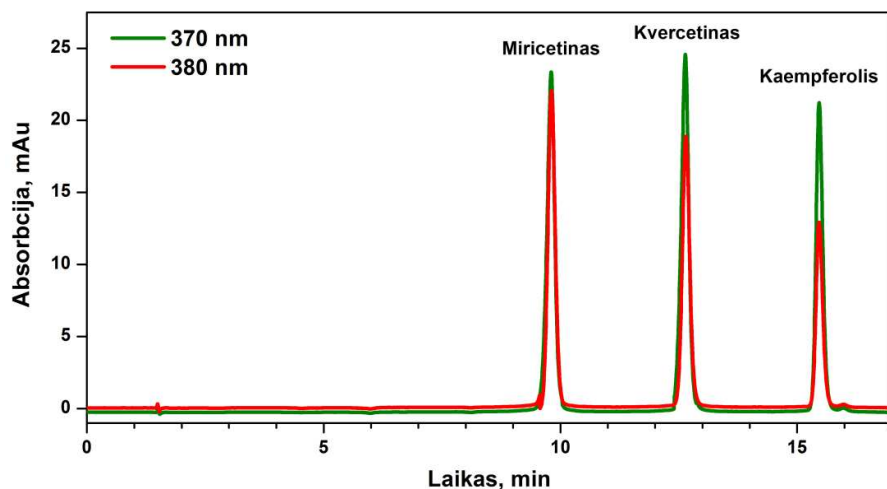


3.1 pav. Flavonolių (50,0 µg/g) absorbcijos spektrai išmatuoti PDA detektoriumi

Nors modelinių junginių, t. y. miricetino, kvercetino ir kaempferolio poliškumai yra skirtingi ir šias analites būtų galima atskirti pritaikius izokratinį atskyrimo režimą, darbe naudojome eliucijos gradientą. Gradientinis režimas leidžia pilnai atskirti platų spektrą spanguolėse esančių skirtingo poliškumo flavonolių – tokį rezultatą būtų sunku pasiekti taikant izokratinę eliuciją. Gradientinis atskyrimas buvo optimizuotas atsižvelgiant į gerą skyrą, priimtinas sulaikymo trukmes bei smalių simetriškumą. 3.1 lentelėje pateikta optimizuota gradientinės flavonolių eliucijos programa. Flavonolių atskyrimą gradientiniu režimu iliustruoja 3.2 pav. pateikta chromatograma. ESCh detektavimo sąlygos nurodytos 3.2 lentelėje.

3.1 lentelė. Judrios fazės gradiento formavimo programa

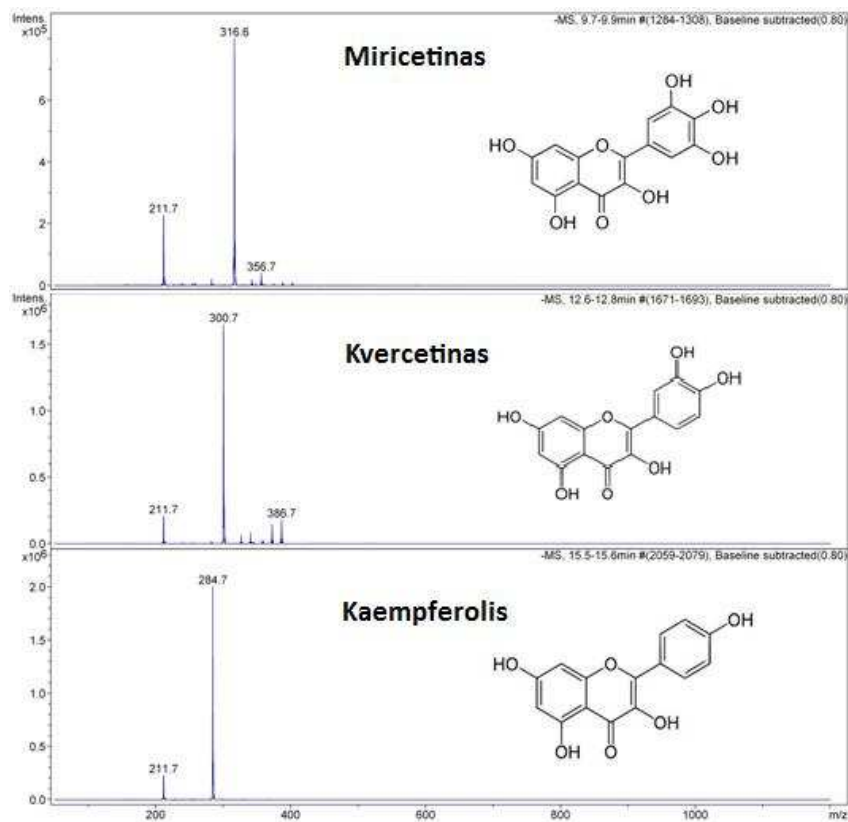
Trukmė, min	Metanolis, parūgštintas 0,5 % skruzdžių rūgštimi, %
0,0	30
7,0	50
12,0	60
16,0	70
18,0	70



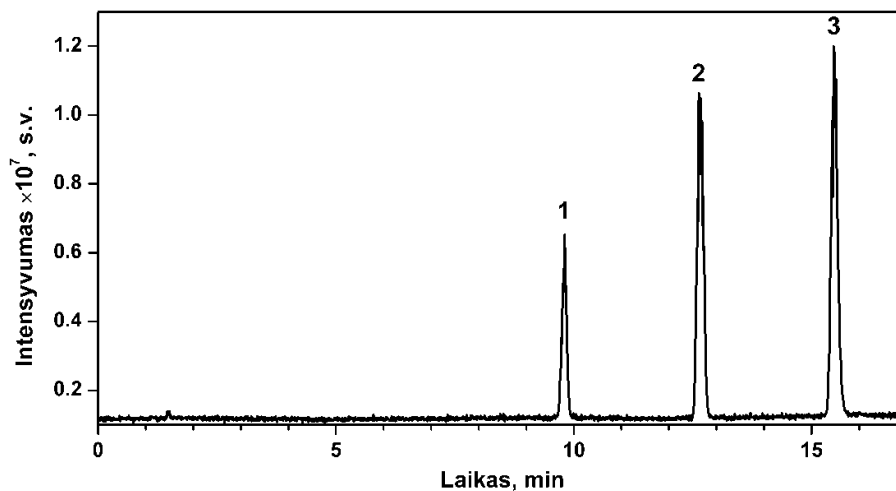
3.2 pav. Flavonolių etaloninio mišinio (10 µg/g) atskyrimas naudojant optimizuotą gradientinį eliucijos režimą

Kolonėlė – Zorbax Eclipse ZDC C-18, 150 × 4,6 mm, 5 µm. Srauto greitis – 1000 µl/min., analizės detektuojamos 370 ir 380 nm bangos ilgiuose.

Norint parinkti optimalias MS detektavimo sąlygas, buvo išmatuoti miricetino, kvercetino ir kaempferolio etaloninių tirpalų masių spektrai taikant neigiamą jonų jonizaciją cheminės jonizacijos atmosferos slėgyje. Detekcija atliekama 50–1400 m/z verčių intervale. Matavimai atlikti parinkus šiuos optimalius parametrus*: vainikinio išlydžio adatos įtampa – +3500 V, kapiliaro įtampa – +3500 V, nešančių dujų t. y. azoto srauto greitis 6 l/min., temperatūra – 315 °C, o išgarinimo temperatūra – 350 °C. Turėdami flavonolių masių spektrus, pasirinkome didžiausio intensyvumo deprotonizuotus molekulinis $[M-H]^-$ jonus kiekvienam junginiui, pagal kuriuos juos ir identifikavome (3.3 ir 3.4 pav.).



3.3 pav. Eksperimentiškai išmatuotų flavonolių etalonų (10 µg/g) masių spektrai



3.4 pav. Flavonolių etaloninio mišinio (10 µg/g) chromatograma, atliekant analizę MS-APCI⁻ optimaliomis sąlygomis*
 Smailės: 1 – miricetinas, 2 – kvercetas ir 3 – kaempferolis.

Kiekybiniam flavonolių įvertinimui gali būti taikomi abu detektoriai, bet PDA detektorius yra jautresnis mažoms koncentracijoms, taip pat matuojant

natūralių spanguolių ekstraktus gaunamos stabilesnės bazinės chromatogramų linijos. Todėl duomenys gauti su PDA detektoriumi buvo naudojami kiekybinei analizei. Apibendrinti ESCh-PDA ir MS-APCI detektavimo parametrai pateikti 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. ESCh ir MS detektavimo parametrai flavonoliams

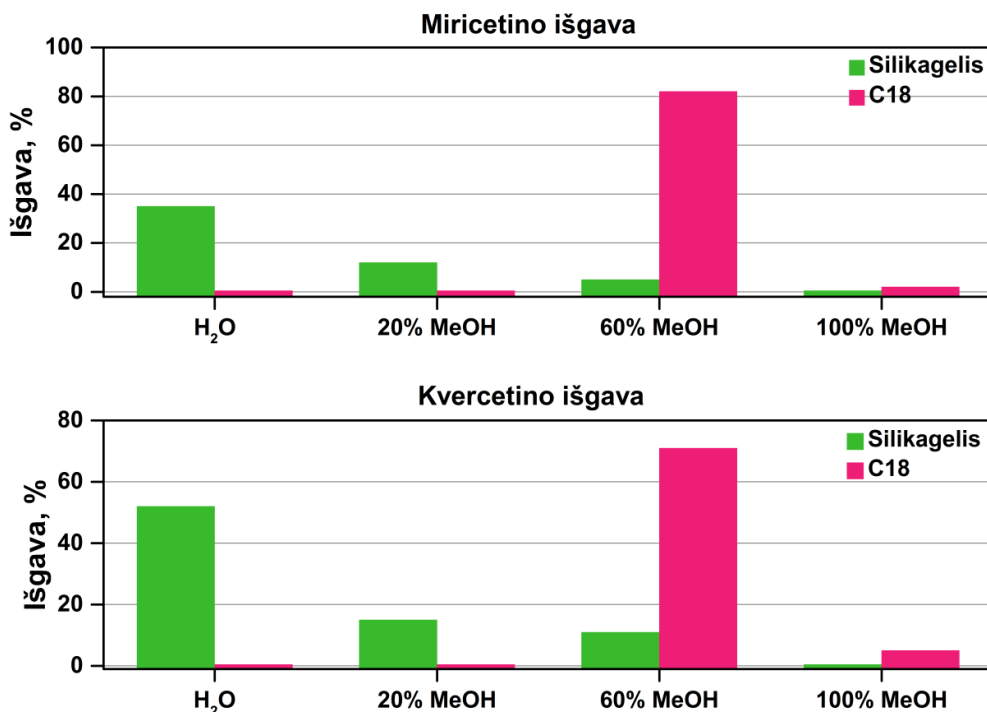
Analitė	Sulaikymo trukmė, min.	Detekcija PDA, nm	Molekulinis jonas, m/z
Miricetinas	9,79	380	316,6
Kvercetas	12,56	370	300,7
Kaempferolis	15,46	370	284,7

3.1.2 KDE sąlygų tyrimas

Literatūros apžvalgoje rašėme apie tai, kad sorbento prigimtis ir tinkamo ekstrakcijos tirpiklio parinkimas yra vieni svarbiausių faktorių įtakojančių kietafazę disperguojamąją ekstrakciją (KDE), dėl ko turime efektyvų junginių išskyrimą ir švarų galutinį ekstraktą [66, 68, 69]. Sorbentas KDE naudojamas ne tik dominančių analizių adsorbicijai ir atskyrimui, bet ir mėginio matricos suardymui, tolygiam mėginio komponentų pasiskirstymui ir sąveikai su sorbento paviršiuje esančiomis grupėmis arba sorbento paviršiumi.

Šių tyrimų etape išbandėme silikagelį ir oktadecilsilikagelį (C18). Anksčiau publikuotų darbų autoriai, taikydami KDE metodą, nurodė būtent šiuos sorbentus, kaip tinkančius fenolinių junginių adsorbicijai iš augalinės kilmės matricos [66-68]. Preliminariuose tyrimuose į 0,5 g pasirinkto disperguojančio sorbento buvo įlašinta modelinio flavonolių standarto (50 µg/g), disperguojama ir analitės desorbuojamos per mėginį leidžiant atitinkamus vandens/metanolio mišinius. Tyrimų metu buvo atsižvelgiama į du kriterijus: analizių išgavas ir gautų ekstraktų grynumą. Iš 3.5 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad tuomet, kai ekstrakcija atliekama su poliniu sorbentu silikageliu, miricetino ir kvercetino išgavos siekia 35 % ir 52 % jau pirmojoje frakcijoje (eliuentas – 100 % vanduo). Naudojant C18 modifikuotą silikagelio sorbentą šių modelinių junginių išgavos pirmojoje frakcijoje buvo labai mažos

ir siekė tik 0,5 %. Geriausios išgavos buvo trečiojoje frakcijoje, kai analizės desorbuojamos 60 % MeOH eliuentu. Šie pirminiai tyrimai svarbūs norint pašalinti trukdančius junginius iš natūralių spanguolių matricos ir norit gauti ekstraktus tik su mus dominančiomis analizėmis. Dėl šios priežasties, C18 sorbentas buvo pasirinktas tolimesniems tyrimams.

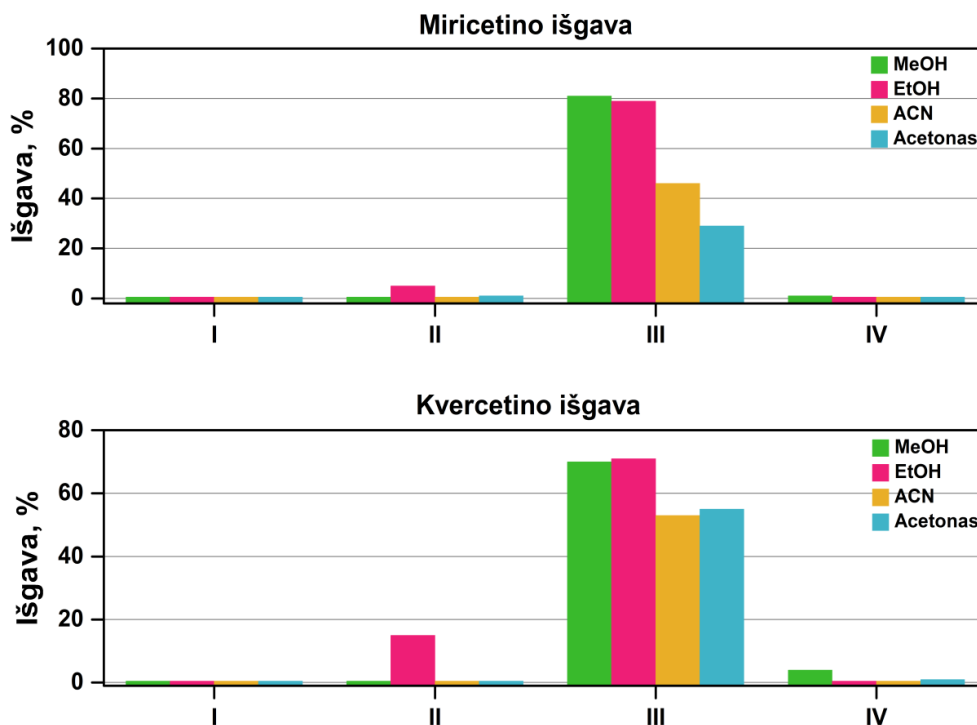


3.5 pav. Modelinių junginių išgavos ($n=3$), išmatuotos disperguojant mėginius su 50 $\mu\text{g/g}$ analičių priedu skirtingo poliškumo sorbentais. Desorbuojančio tirpiklio tūris – 5 ml; disperguojančio sorbento kiekis – 5 g.

Kadangi tiriamų junginių grupė pasižymi hidrofobiškumu, efektyviai iš biologinės matricos ją turėtų desorbuoti mažesnio poliškumo tirpikliai, tokie kaip acetonas ar heksanas. Tačiau tokie tirpikliai ne mažiau efektyviai ekstrahuos ir pašalinius matricos komponentus, dėl ko nukentės ekstrakcijos atrankumas. Idealu, kai ekstrakcijos tirpiklis eliuuoja tik dominančias analites, eliminuodamas nepageidaujamus junginius ar jų grupes. Pagal šiuos principus tyrimams parinkome keturis mažesnio poliškumo, tačiau gerai tirpinančius analites ir suderinamus su judria faze, naudojama ESCh analizėje, tirpiklius: acetoną ($\epsilon=20,7$), etanolį ($\epsilon=24,35$), metanolį ($\epsilon=33,1$) ir acetonitrilą ($\epsilon=37,5$).

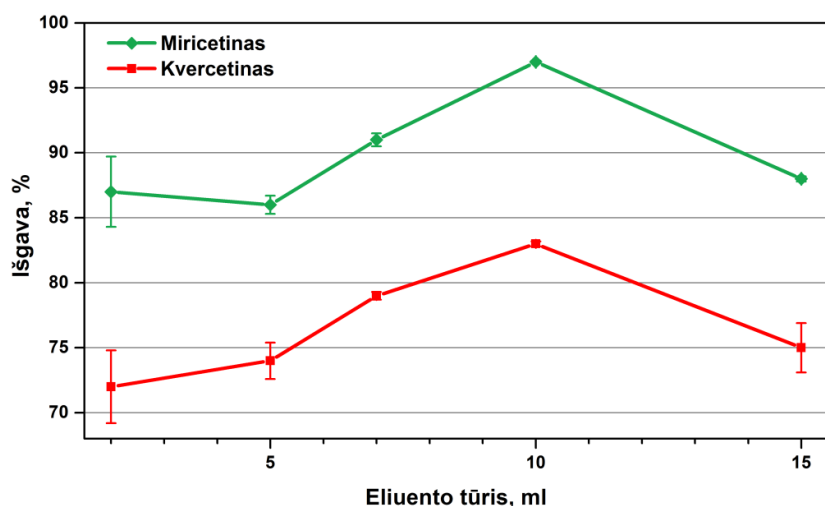
3.6 pav. pateiktos analičių išgavos, išmatuotos disperguojant C18 su

modeliniais junginiais ir desorbuojant 5 ml atitinkamo tirpiklio mišiniu. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad geriausios išgavos (70–81 %) gautos eliuentais naudojant etanolį ir metanolį. Kaip ir buvo galima tikėtis, acetonas, polinis aprotoninis tirpiklis, nepasižymėjo efektyvia desorbcija šios subklasės fenoliniams junginiams. Eliuciją atliekant su etanolio mišiniais gauti geri rezultatai, tačiau 5–15 % modelinių junginių buvo išplauta jau antroje frakcijoje. Eksperimentus atliekant su metanoliumi, miricetino ir kvercetino eliuuojama maksimaliai trečiojoje frakcijoje, o kitose frakcijose užfiksuoti minimalūs šių junginių kiekiai. Todėl metanolis ir jo mišiniai su vandeniu pasirinkti tolimesniems tyrimams. Specifinių klasių junginių, pasižyminčių skirtingu tirpumu, ekstrakcija su metanoliumi iš spanguolių uogų sutapo su prieš tai publikuotais tyrimais [38, 44, 48].



3.6 pav. *Tirpiklio prigimties įtaka miricetino ir kvercetino išgavoms*
 Sorbentas – C18 (0,5 g); desorbuojančio tirpiklio tūris – 5 ml; I frakcija – 100 % H₂O; II frakcija – 20 % organinio tirpiklio; III frakcija – 60 % organinio tirpiklio; IV frakcija – 100 % organinis tirpiklis.

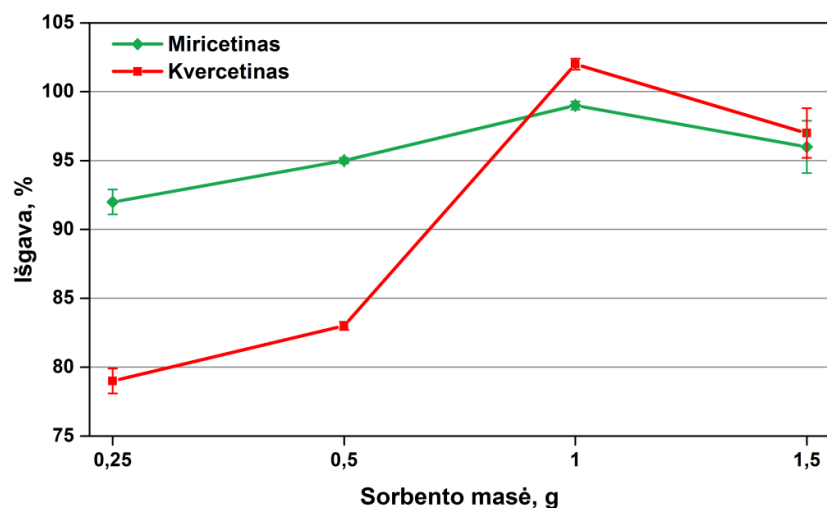
Optimizuojant analičių ekstrakcijos sąlygas paprastai siekiama maksimalaus ir kuo atrankesnio jų išskyrimo iš mėginio matricos minimaliu tirpiklio tūriu. 3.7 pav. pateikta metanolio tūrio įtaka modelinių junginių išgavoms. Kaip matome, didžiausia miricetino (97 %) ir kvercetino (83 %) ekstrakcija/desorbcija pasiekama su 10 ml eliuento. Naudojant mažesnius eliuento tūrius, desorbuojasi ir mažesni kiekiai tiriamų analičių t. y. miricetino išgavos varijavo nuo 85 % iki 91 %, o kvercetino – 72–77 %, atitinkamai. Reikėtų paminėti, kad pernelyg dideli kiekiai eliuento gali gerokai sumažinti jautrį ir prailginti mėginio paruošimo procedūrą. Atsižvelgiant į visus šiuos faktorius, nuspręsta eliaciją atlikti su 10 ml tūrio kiekvienos frakcijos vandens ir (ar) metanolio mišiniais.



3.7 pav. Miricetino ir kvercetino išgavų priklausomybė nuo eliuento tūrio Sorbentas – C18 (0,5 g); pateikti III frakcijos matavimų duomenys.

KDE metode kaip ir kitose klasikinėse ekstrakcijose siekiama maksimaliai išekstrahuoti nustatomas analites kuo minimalesnėmis medžiagų, (t. y. sorbento, eliuento ir pan.) kiekiais ir laiko sąnaudomis. Ekstrakcijos efektyvumas, gautų ekstraktų grynumas, taip pat nustatymo jautris atliekant analizę priklauso nuo mėginio ir sorbento masių santykio. Literatūroje, dirbant su KDE metodu, šis santykis varijuoja nuo 1:1 iki 1:4 [67]. Pirmiausia atlikome eksperimentus, kurių metu į keturis skirtingus C18 sorbento svėrinus

(0,25; 0,5; 1,0 ir 1,5 g) įnešėme fiksuotą kiekį modelinių junginių. Analizių desorbicija buvo atlikta su 10 ml metanolio vandeninių mišinių t. y. visos keturios frakcijos išplaunamos po 10 ml atitinkamo eliuento. Po atliktų matavimų apskaičiuotos analizių išgavos pateiktos 3.8 pav. Kaip matome, abiem atvejais geriausi rezultatai pasiekiami ekstrakcijos metu naudojant vieną gramą C18 sorbento.



3.8 pav. *Miricetino ir kvercetino išgavų priklausomybė nuo disperguojančio sorbento masės*
Sorbentas – oktadecilsilikagelis; pateikti III frakcijos matavimų duomenys.

Optimaliausias mėginio ir disperguojančio sorbento santykis priklauso ir nuo mėginio matavimų prigimties. Kadangi iki šio žingsnio buvo dirbama su modeliniais junginiais, tam, kad įsitikintumėme savo pasirinkimo teisingumu, atlikome eksperimentus su liofilizuotais spanguolių milteliais. Šių tyrimų metu pasirinkome keturis skirtingus santykius nuo 1:3 iki 1:6, kuriuose disperguojančio C18 sorbento kiekis buvo fiksuotas (1 g), o kintamasis – liofilizuotos spanguolės (0,16; 0,2; 0,25 ir 0,33 g). Šiame žingsnyje vizualiai buvo įvertinamas galutinių ekstraktų švarumas; lyginamos ESCh analizių chromatogramos, siekiant įvertinti, ar reikalingos papildomos ekstraktų valymo procedūros, ar būtinos praskiedimo ar koncentravimo procedūros.

Optimizuotos flavonolių ekstrakcijos procedūros KDE metodu sąlygos būtų: 1,0 g oktadecilsilikagelio agato grūstuvėje trinama (apie 2 min) su 0,25 g liofilizuotų spanguolių miltelių, disperguotas mišinys suberiamas į švirkšto korpusą su filtru apačioje, švelniai supresuojamas, uždengiamas su kitu filtru iš viršaus ir desorbuojame analites 10 ml tūrio keturiomis frakcijomis eliuentų (vandens/metanolio mišiniais); surinkti ekstraktai sukonzentruojami iki sausos liekanos azoto sraute, likutis tirpinamas 1 g metanolio ir analizuojamas.

3.1.3 Metodo tinkamumo įvertinimas

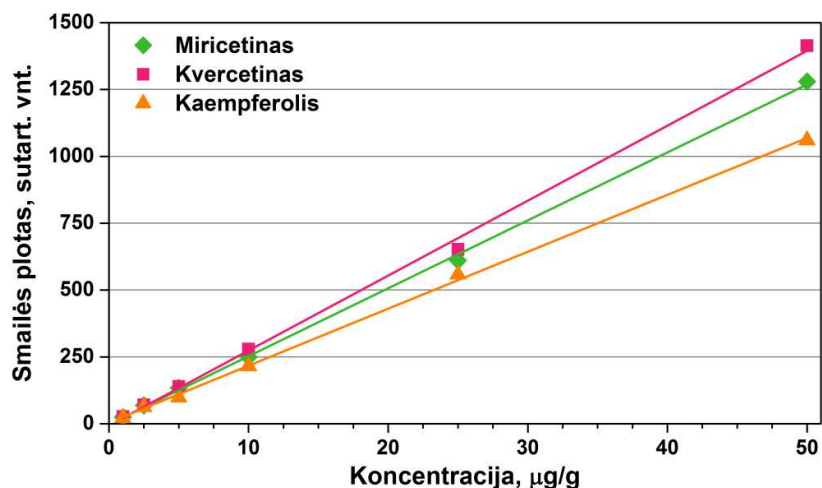
Norėdami atlikti metodo patvirtinimą, įvertinome šias charakteristikas: atrankumas kitiems flavonoidams, kalibracinės kreivės tiesiškumas, aptikimo riba (AR), nustatymo riba (NR), pakartojamumas, glaudumas ir teisingumas (vidinis laboratorijos atkuriamumas).

Kalibravimo grafikų tiesiškumo intervalai trims flavonoidams buvo matuojami su aštuoniomis skirtingomis koncentracijomis, intervale nuo 0,25 iki 50,0 µg/g. Visi analizuoti junginiai parodė gerą tiesiškumą ($r^2 > 0,998$) matuotame intervale. Aptikimo ribos buvo nustatomos esant signalo/fono triukšmų santykiui 3, o nustatymo ribos – esant signalo/fono triukšmų santykiui 10. Nustatytos charakteristikos pateiktos 3.3 lentelėje, o 3.9 paveiksle pavaizduotos analičių kalibracinės kreivės.

3.3 lentelė. Pagrindinės analizinės charakteristikos (n=3)

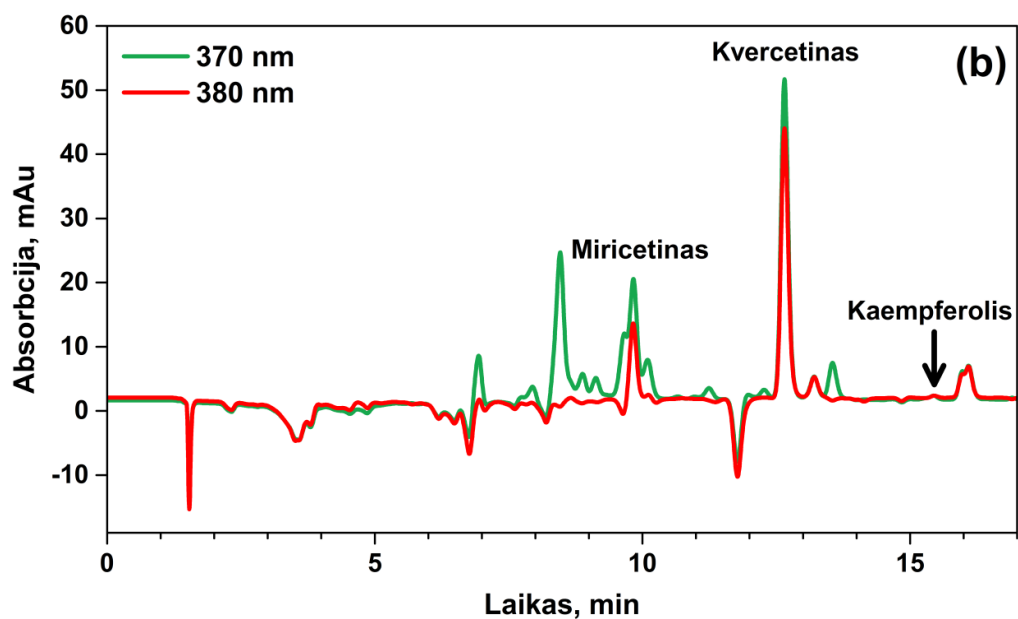
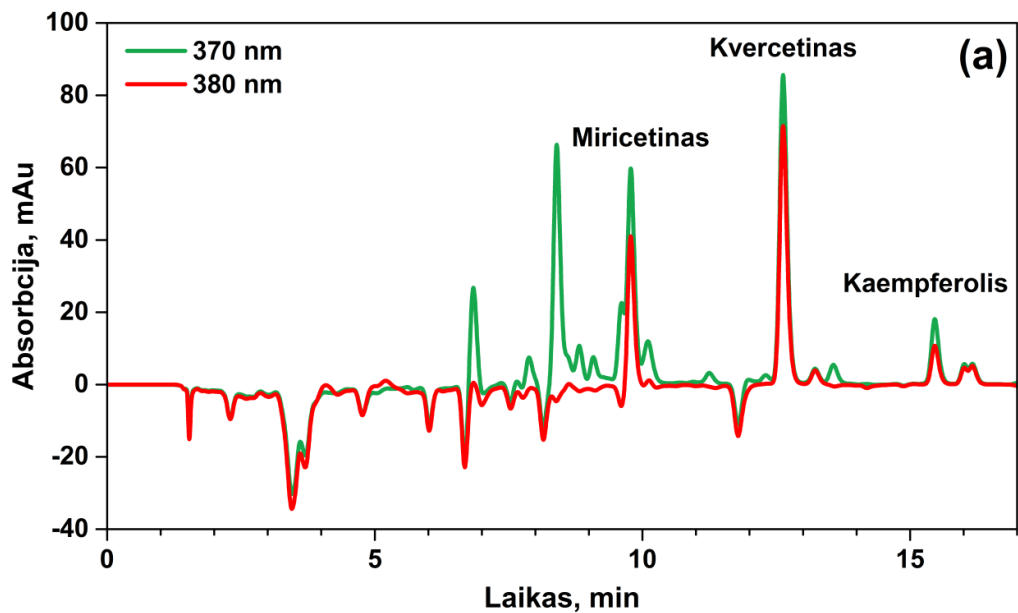
Analitė	Tiesės lygtis	Koreliacijos koeficientas (r^2)	Aptikimo riba *, µg/g	Nustatymo riba *, µg/g
Miricetinas	$y=0,026x - 0,001$	0,999	0,08	0,1
Kvercetinas	$y=0,027x - 0,001$	0,999	0,08	0,1
Kaempferolis	$y=0,021x + 0,002$	0,998	0,04	0,07

* – AR ir NR apskaičiuotos pagal PDA duomenis.



3.9 pav. Flavonolių kalibravimo kreivės

Po optimizavimo su modeliniais junginiais, KDE metodo procedūra buvo panaudota natūralių flavonoidų ekstrakcijai iš liofilizuotų spanguolių miltelių. Analizės metodo teisingumas paprastai vertinamas optimizuotomis metodo sąlygomis, analizuojant paliudytų pamatinių medžiagų (PPM) mėginius su tiksliai sertifikuotomis analitės ar analičių koncentracijomis. Jei tokių paliudytų pamatinių medžiagų nėra, tuomet gali būti atliekamas išgavos testas su „tuščiu“ mėginiu, kuriame nėra nustatomos analitės. Šiame darbe susidūrėme su problema – nėra gaminami PPM, taip pat nėra tokios pat arba panašios matricos mėginių, kuriuose nebūtų šiame darbe tiriamų analičių. Todėl buvo nuspręsta mėginio matricos įtaką metodo analizinėms charakteristikoms įvertinti priedo metodu. Į kiekvieną liofilizuotų spanguolių miltelių mėginio porciją buvo pridėdamas žinomas kiekis flavonoidų etalonų (dviejų skirtingų koncentracijų t. y. 2,5 ir 10,0 µg/g), o po atliktų KDE procedūrų, mėginiai buvo išanalizuoti ir apskaičiuotos išgavos. 3.10 paveiksle pavaizduotos liofilizuotų spanguolių ekstrakto su 10 µg/g standartų priedu (a) ir be standartų priedo (b) chromatogramos.



3.10 pav. Liofilizuotų spanguolių ekstrakto su etaloniniu priedu (10 µg/g) (a) ir be priedo (b) ESCh-PDA chromatogramos

3.4 lentelėje pateikti flavonolių nustatymo liofilizuotuose spanguolių milteliuose rezultatai ir etalonų priedo išgavos. Prasčiausius išgavos rezultatus parodė kaempferolis, nors nustatymo rezultatų santykinis standartinis nuokrypis – mažesnis nei 10 %. Greičiausiai tokį rezultatą nulėmė tai, kad šis junginys nebuvo įtrauktas į visą optimizavimo procedūrą. Puikius rezultatus

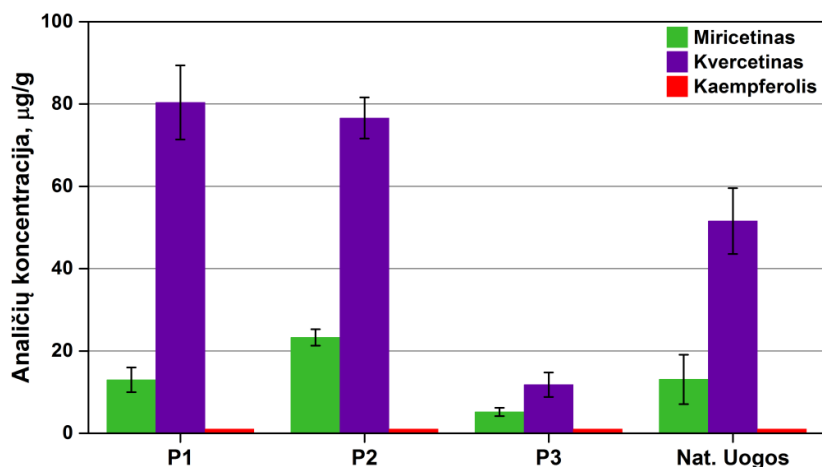
pademonstravo miricetinas – išgava yra lygi esant abiemis pridėtiems šio junginio etalonų koncentracijoms. Kvercetino išgava viršija 100 % ir tai sietume su mėginio matrica ir joje esančių komponentų netolygiu pasiskirstymu. Tai galėtų patvirtinti ir tai, kad SSN abiejų priedų koncentracijų atveju yra beveik lygūs – 6,6 ir 6,3 %. Tad natūralu, kad įnešus minimalų 2,5 µg/g etalono priedą gaunamas toks rezultatas.

3.4 lentelė. *Miricetino, kvercetino ir kaempferolio nustatymas liofilizuotuose spanguolėse priedo metodu (n=5)*

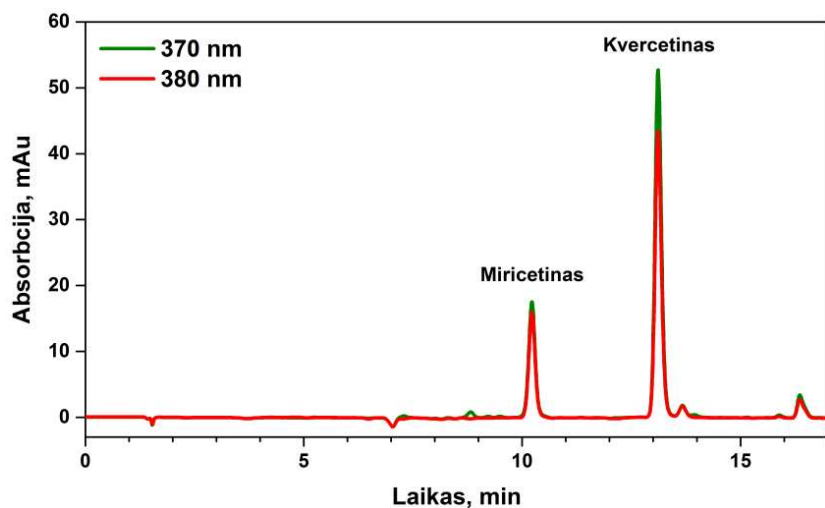
Analitė	Išgava ± SSN, %	
	Pridėta 2,5 µg/g	Pridėta 10,0 µg/g
Miricetinas	97,9 ± 3,4	98,7 ± 9,5
Kvercetinas	111,5 ± 6,6	102,2 ± 6,3
Kaempferolis	59,1 ± 8,2	73,4 ± 4,9

Optimizuotas KDE-ESCh-MS metodas buvo panaudotas flavonolių nustatymui maisto papilduose. Gamintojai informaciniuose lapeliuose teigia, kad jų parduodami maisto papildai yra pagaminti iš natūralių spanguolių ekstraktų ir skirti gerai šlapimo pūslės ir šlapimo takų funkcijos palaikymui. Vaistinėse įsigijome keturių gamintojų papildus iš trijų skirtingų valstybių: Lietuvos, Suomijos ir Čekijos. Vienas mėginys nebuvo ištirtas, nes nepavyko atlikti ekstrakcijos. Greičiausiai tam įtakos galėjo turėti tai, kad šiuose papilduose be uogų ekstrakto gausu papildomų sintetinių komponentų (aviečių ir miško uogų aromato kvapiosios medžiagos, saldikliai aspartamas, acesulfatas K ir kt.). Tyrimų rezultatai pateikti **3.11** pav.

Kadangi visuose tirtuose mėginiuose flavonolio kaempferolio buvo žemiau nustatymo ribos, kiekybiškai šios analitės negalėjome įvertinti. **3.12** pav. pavaizduota P2 gamintojo parduodamų papildų ekstrakto ESCh-PDA chromatograma.



3.11 pav. Flavonolių koncentracija trijuose skirtingų gamintojų papildų mėginiuose (P1, P2 ir P3) ir natūraliose liofilizuotose spanguolėse (µg/g)



3.12 pav. Maisto papildų (P2) KDE metodu gauto ekstrakto ESCh-PDA chromatograma

3.1.4 Flavonoidų nustatymo KDE-ESCh-MS metodais apibendrinimas

KDE metodas gali būti sėkmingai taikomas flavonoidų ekstrakcijai iš natūralių liofilizuotų spanguolių, šių uogų pagrindu pagamintų maisto produktų ir gėrimų, maisto papildų, skirtų sveikatos gerinimui. Gryniausi ekstraktai gaunami mėginius disperguojant su oktadecilsilikagelio sorbentu. Atlikdami frakcionavimą su skirtingos sudėties metanolio/vandens eliuentais gauname uogų ekstraktus su skirtingomis flavonoidų grupėmis. Flavonoidų, esančių III frakcijoje (flavonolių), chromatografinis atskyrimas trunka tik 17

min., tuo pačiu galime vykdyti ir šių junginių masių spektrometrinę detekciją. Pagrindinis šio metodo privalumas – žymiai trumpesnė mėginio paruošimo procedūra: sunaudojami daug mažesni tirpiklių kiekiai, nereikalingos papildomos mėginių valymo procedūros, dėl ko 2–3 kartus sutrumpėja analizės trukmė.

3.2 Lipidų skystakristalių sistemų su įterptu kvercetinu paruošimas ir charakterizavimas

Kaip jau minėjome literatūrinėje apžvalgoje, pastaruoju metu spanguolės kelia vis didesnę visuomenės susidomėjimą kaip funkcinis maistas, skirtas sveikatos gerinimui. Šiuo metu svarbu ne tik sukurti ir pritaikyti naujus analizės metodus augalinės kilmės medicininiam preparatams tirti ir kontroliuoti, bet taip pat sukurti naujas stabilias pernašos sistemas, kurios tarnautų kaip tikslinės medžiagos nešikliai. Šiuo požiūriu, lipidų skystakristalės fazės, pasižyminčios dideliu vidiniu paviršiaus plotu, gali tarnauti kaip patalpinimo, apsaugos nuo degradacijos ir tikslinės medžiagos atpalaidavimo matrica. Lipidinių sistemų studijoms pasirinkome komerciškai lengviausiai prieinamą sintetinį flavonolį kvercetiną. Šis modelinis junginys yra gausiai akumuliuojamas natūraliose spanguolėse – todėl gali pilnai atstovauti jau šiame darbe tirtą flavonoidų grupę. Svarbu ne tik kontroliuoti veikliosios medžiagos kiekius lipidinėse sistemose, esant praktiniams taikymams, bet ir ištirti veikliosios medžiagos įtaką pačiai lipidinės sistemos vidinei struktūrai. Tad ši išsami studija su kvercetinu padėjo atsakyti į šiuos iškeltus klausimus.

3.2.1 Modelinio junginio QU tirpumas lipidų mišiniuose

Tiesioginį kvercetino pritaikymą medicinoje riboja jo mažas tirpumas vandenyje ir mažas stabilumas fiziologinėje aplinkoje. Šią problemą būtų galima išspręsti šį junginį įterpus į daug palankesnę terpę pvz., lipidų pagrindu sukurtas sistemas. Iki šiol publikuotuose darbuose, kuriuose buvo tirtos lipidų

ir kitų amfifilinių junginių pagrindu sukurtos sistemos, tokios kaip mikroemulsijos [99], liposomos [109], lecitino – chitosano nanodalelės [104] ir kietosios lipidinės nanodalelės [103], maksimalus kvercetino tirpumas buvo visiškai mažas, o papildomai naudojant paviršiaus aktyviausias medžiagas ir (ar) tirpiklius [101], šio flavonoido tirpumas tesiekė 0,5 %. Nors yra žinoma, kad kai kurie vandenyje mažai tirpūs junginiai vis tik gali blogai tirpti ir lipidinėse sistemose dėl įvairių fizikinių ir (ar) cheminių priežasčių [114].

Prieš atliekant rentgenostruktūrinius tyrimus su lipidų nelamelinėmis skystakristalėmis fazėmis, buvo įvertinta LSK fazių pirmtakų geba tirpinti modelinį junginį. Pirminiams tyrimams buvo pasirinktos šios dvikomponenčių lipidų sistemos: DGMO/GDO (85/15 ir 60/40 %), DGMO/GMO-50 (85/15 ir 60/40 %), DGMO/GME (85/15 ir 60/40 %) ir SPC/GDO (60/40 ir 35/65 %). Rezultatai parodė, kad nepriklausomai nuo lipidų santykio, visuose mono ir digliceridų pagrindu pagamintuose mišiniuose, ištirpusio QU kiekis svyravo nuo 0,3 iki 0,4 %. Kvercetino tirpumas nepagerėjo net į šiuos LSK pirmtakus papildomai pridėjus 10 % etanolio. Taigi, ištyrus mono ir digliceridų tirpinamąją gebą, šie rezultatai sutapo su prieš tai publikuotais duomenimis panašiose sistemose. Vertėtų paminėti, kad komerciniuose ilgos grandinės monogliceriduose (pvz., „Migloyl 812“, „Capmul MCM“, „Labrafil 1944“) QU tirpumas siekė 1 % [101].

Daug didesne tirpinamąja geba pasižymėjo sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato mišinys. Tiek SPC, tiek GDO pasižymi didele klampa ir paruošti šių komponentų mišinį reikiamu santykiu yra labai sudėtinga. Tad nuspręsta šių lipidų mišinius pagaminti tik su tirpiklio priedu. Į SPC/GDO lipidų sistemą papildomai pridėjus 10 % etanolio, kvercetino ištirpo net 5 %. Apibendrinant šio etapo tyrimus, galime daryti išvadą, kad lipidų mišiniai, sudaryti iš monogliceridų ir digliceridų, su EtOH priedu ir be jo, turi ribotą QU tirpinamąją gebą. Į lipidų sistemą pridėjus sojos fosfatidilcholino tirpumas padidėjo 10–20 kartų. Todėl SPC/GDO lipidų sistema su 10 % etanolio priedu buvo pasirinkta tolimesniems tyrimams.

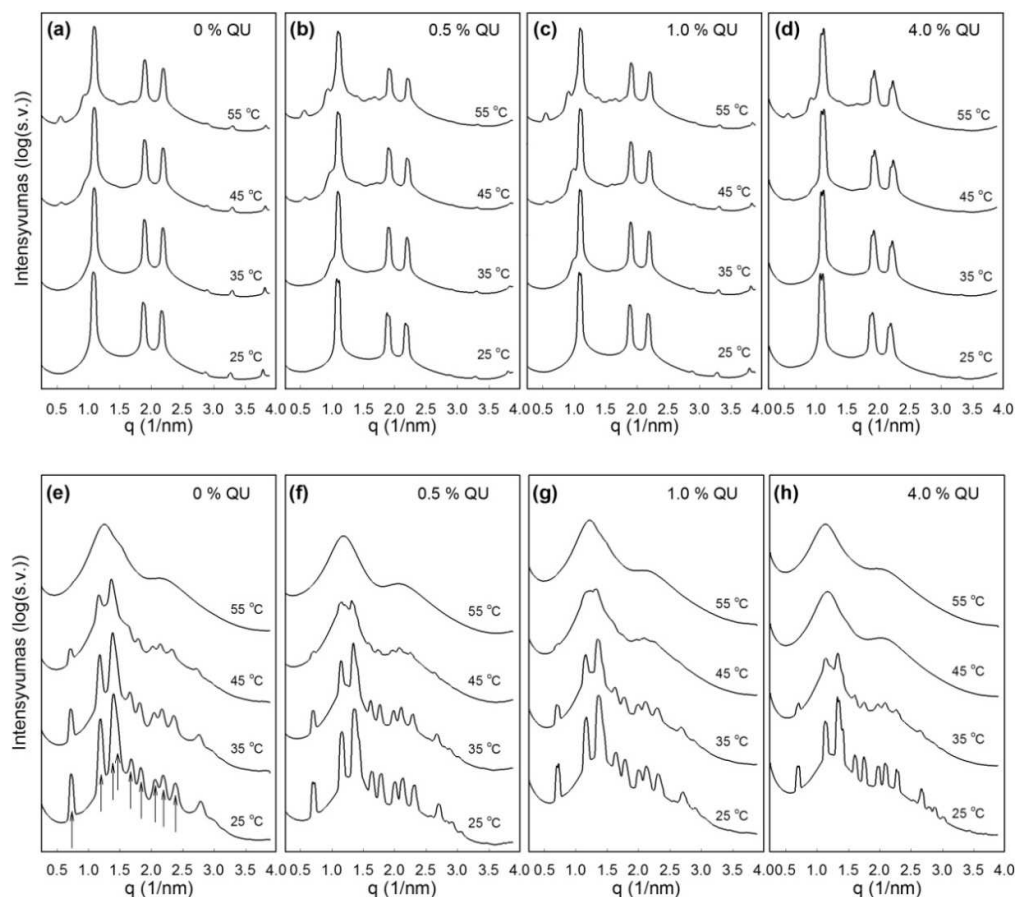
3.2.2 Pilnai hidratuotos SPC/GDO skystakristalės fazės su įterptu kvercetu

Naujausi rentgeno spindulių difrakcijos tyrimai parodė, kad pilnai hidratuotų SPC/GDO mišinių nelamelinių skystakristalių fazių elgsena yra sudėtinga [82]. 25 °C temperatūroje, didėjant glicerolio dioleato kiekiui, pilnai hidratuotuose SPC/GDO mišinių SK fazėse, vyksta šie faziniai perėjimai: lamelinė (L_a) → 2D atvirkštinė heksagonalinė (H_2 , iki SPC/GDO svorio santykio 62,5/37,5) → kubinė atvirkštinių micelių, priklausanti $Fd\bar{3}m$ erdvinei grupei (SPC/GDO svorio santykių intervale 50/50 – 45/55 %) → 3D atvirkštinė heksagonalinė, priklausanti $P6_3/mmc$ erdvinei grupei (SPC/GDO svorio santykių intervale 42/58 – 40/60) → nenustatytos SK struktūros regionas (SPC/GDO svorio santykių intervale 39/61 – 37/63) → $Fd\bar{3}m$ fazė (SPC/GDO svorio santykių intervale 35/65 – 22,5/77,5) → L_2 (nuo SPC/GDO svorio santykio 20/80). Taigi, norėdami ištirti modelinio junginio įtaką skirtingoms SK fazių nanostruktūroms pasirinkome šiuos SPC/GDO svorio santykius: 60/40, 50/50, 40/60 ir 35/65. Mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcijos (SAXD) matavimai atlikti keturiuose temperatūrų taškuose: 25, 35, 45 ir 55 °C.

3.13 paveiksle pateikti visiškai hidratuotų lipidų SPC/GDO dviejų svorio santykių 60/40 ir 35/65 SK fazių su įterptu QU (modelinės medžiagos koncentracijos: 0, 0,5, 1,0 ir 4 %) gauti SAXD tyrimų profiliai.

Visiškai hidratuotoje sistemoje SPC/GDO, kai lipidų svorio santykis yra 60/40, o temperatūra – 25 °C, formuojasi 2D atvirkštinė heksagonalinė fazė (H_2) (žr. pav. **3.13 a**), kurią charakterizuoja trys Brego smailių santykinės pozicijos 1: $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$ (šioje vietoje ir visame **3.2** skyriuje indeksuojamų kristalų šeimų parametro d ir atspindžio dėsnių skaičiavimo formulės pateiktos **1.3.1** lentelėje). 45 °C temperatūroje pradeda formotis kita SK fazė, greičiausiai kubinė $Fd\bar{3}m$ – atsiranda papildomų pikų. Tačiau, nepriklausomai nuo temperatūros įtakos ir skirtingų QU koncentracijų, visose difraktogramose vaizdas išlieka vienodas. Be to, apskaičiuotas gardelės parametras a pagal atitinkamus atspindžio dėsnius fazėms, nepriklausomai nuo įterptos modelinės

medžiagos koncentracijos ir analizės temperatūros, išliko beveik nepakitęs, t. y. skiriasi nežymiai nuo 6,6 iki 6,7 nm. Tai parodo, kad mišiniuose su didele SPC dalimi gaunamos H₂ fazės gali talpinti didelius kiekius hidrofobinio kvercetino, nekeisdamos skystakristalės fazės nanostruktūros.

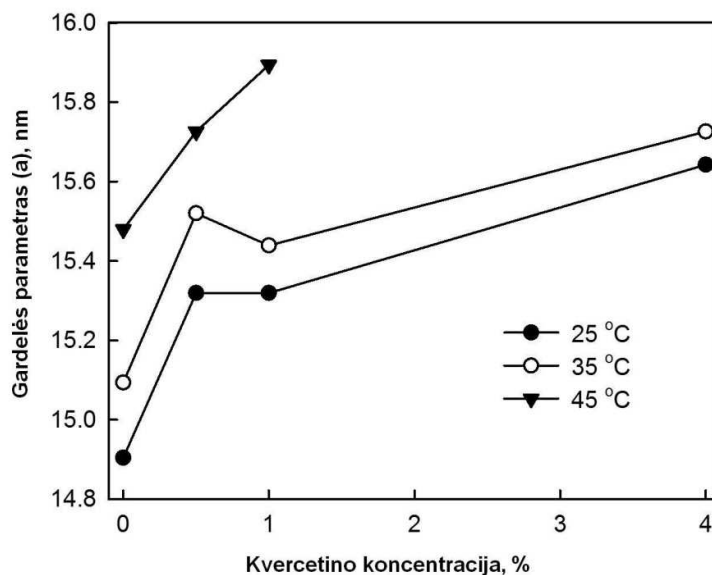


3.13 pav. Visiškai hidratuotų (95 % dejonizuoto vandens) lipidų SPC/GDO SK fazių su įterpta modeline medžiaga (QU) SAXD profiliai skirtingose temperatūrose

Lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių 60/40 (a–d) ir 35/65 (e–h) SAXD profiliai temperatūrų 25–55 °C intervale. Įterpto kvercetino koncentracija nurodyta kiekviename SAXD profilyje.

Esant lipidų SPC/GDO tarpusavio svorio santykiui 35/65 (25 °C temperatūroje) susiformuoja atvirkštinė kubinė $Fd\bar{3}m$ fazė, kurią aiškiai charakterizuoja pirmosios 9 Brego smailių santykinės padėtys, esančios $\sqrt{3} : \sqrt{8} : \sqrt{11} : \sqrt{12} : \sqrt{16} : \sqrt{19} : \sqrt{24} : \sqrt{27} : \sqrt{32}$ (žr. pav. 3.13 e). Priešingai nei H₂ fazė, kubinė $Fd\bar{3}m$ fazės vidinė struktūra yra jautri tiek įterptai modelinės medžiagos

koncentracijai, tiek temperatūrai. 45 °C temperatūroje pradeda irti, o 55 °C temperatūroje visiškai transformuojasi į netvarkingą atvirkštinių micelių (L_2) fazę, kurią patvirtina Brego smailių išnykimas ir jų perėjimas į dvi išplitusias difrakcijos juostas. Kvercetino koncentracijos įtaką hidratuotų fazių struktūrai įrodo tai, kad fazėse su 0,5 ir 1 % modelinės medžiagos tvarkinga kubinė $Fd\bar{3}m$ struktūra pereina į netvarkingą fazę 45 °C temperatūroje (pav. 3.13 f ir g). Tuo tarpu, kai šioje sistemoje yra įterpta 4 % QU, toks pat persitvarkymas stebimas jau esant 35 °C temperatūrai. Kaip parodyta 3.14 paveiksle, abu faktoriai t. y. įterptas QU ir temperatūra, žymiai padidina gardelės parametrus, kai lipidų SPC/GDO svorio santykis yra 35/65. Didėjant kvercetino koncentracijai fazėse nuo 0 iki 4 % 25 °C temperatūroje, gardelės parametras a didėja nuo 14,9 iki 15,6 nm. Nėgana to, aukštesnėje temperatūroje (45 °C), fazėse esant 1 % QU, šis parametras didėja ir pasiekia didžiausią vertę, lygią 15,9 nm, iki visiško tvarkingos $Fd\bar{3}m$ struktūros persitvarkymo į netvarkingą L_2 fazę.



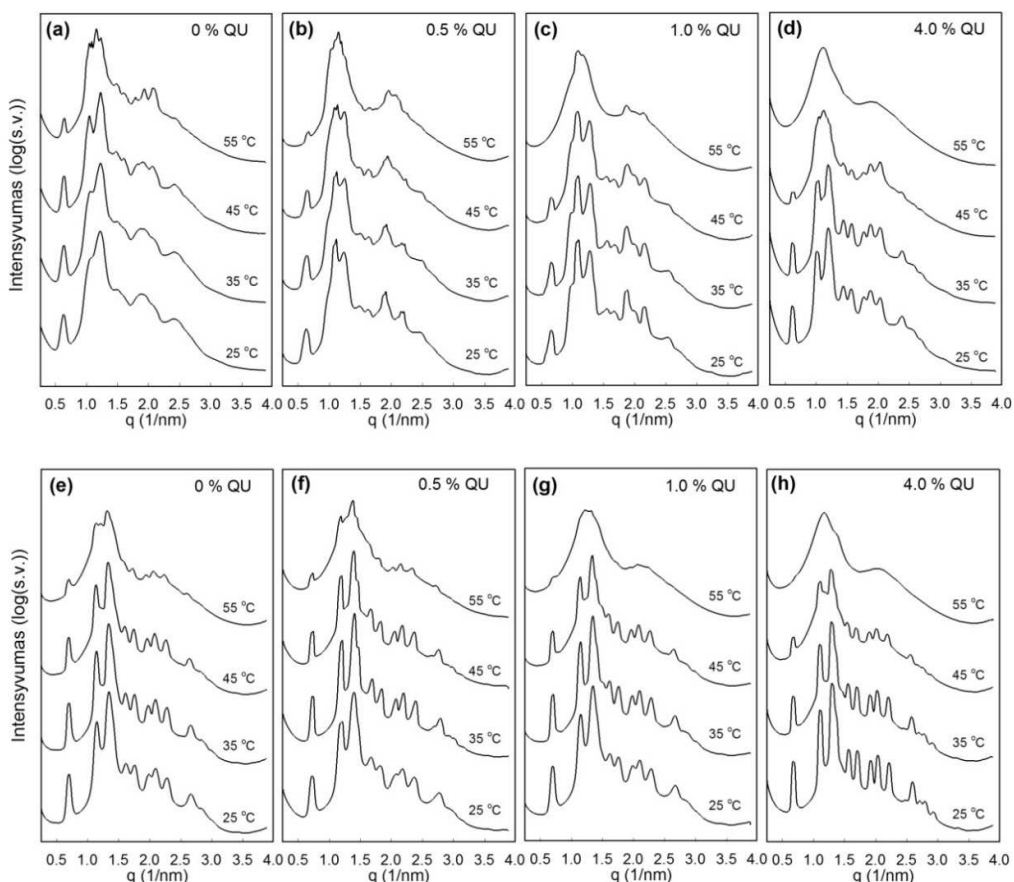
3.14 pav. Gardelės parametro (a) priklausomybė nuo temperatūros ir įterpto QU koncentracijos

Tyrimai atlikti su pilnai hidratuota atvirkščių micelių kubine $Fd\bar{3}m$ faze, kai SPC/GDO svorio santykis – 35/65.

Kvercetino paveiktą tvarkiosios struktūros išardymą sistemoje būtų galima pagrįsti prielaida, kad vandenyje netirpus, hidrofobinis QU SK fazėje pirmumo principu įsiterpia tarp ilgų lipido angliavandenilių grandinių. QU įsitvirtinimas hidrofobinėse tvarkingai išsidėsčiusių atvirkštinių micelių srityse padidina lipidų grandinių sanglaudos įtempį, tuo pačiu ir atstumą tarp micelių, dėl ko padidėja ir gardelės parametro a vertės. Tuo pačiu metu, tolimesnis QU įsiterpimas ir gardelės parametrų didėjimas nėra įmanomas, nes įvyksta fazės persitvarkymas į netvarkingą L_2 fazę. Esant aukštesnėms temperatūroms šis procesas stebimas mažesnėse QU koncentracijose, nes būtent temperatūra inicijuoja tvarkiosios lipidų struktūros iširimą. Panašus fazių elgesys stebimas taip pat ir SPC/GDO kubinės $Fd\bar{3}m$ su įterptu benzidaminu, lidokainu ir granisetronu [120].

Be to, ne toks žymus, bet panašus tvarkiosios struktūros suardymas sukeltas kvercetino stebimas ir SK fazėse, kai lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykiai buvo 50/50 ir 40/60 % (pav. 3.15). Šiuo atveju įterptas QU turi mažą įtaką gardelės parametrui SK fazėse. Tačiau, abiem atvejais QU mažina fazių virsmo temperatūrą, kai iš tvarkingos SK fazės pereinama į L_2 fazę, kuri buvo stebima esant aukštesnei nei 45 °C temperatūrai.

Šioje vietoje galime daryti išvadą, kad QU įtaka SPC/GDO fazių nanostruktūrai priklauso nuo lipidų svorio santykio. Taigi, kai sistemą sudarančių lipidų svorio santykis yra 60/40, H_2 SK fazės struktūros nepaveikia įterptas QU. Priešinga situacija, kai lipidų svorio santykis yra 35/65, kubinė $Fd\bar{3}m$ fazė yra labai jautri įterptai QU koncentracijai – fazinis virsmas prasideda esant 35 °C temperatūrai ir 4 % QU. Galiausiai, SK fazės sudarytos iš lipidų svorio santykių 50/50 ir 40/60, parodė vidutinį jautrį kvercetinui.



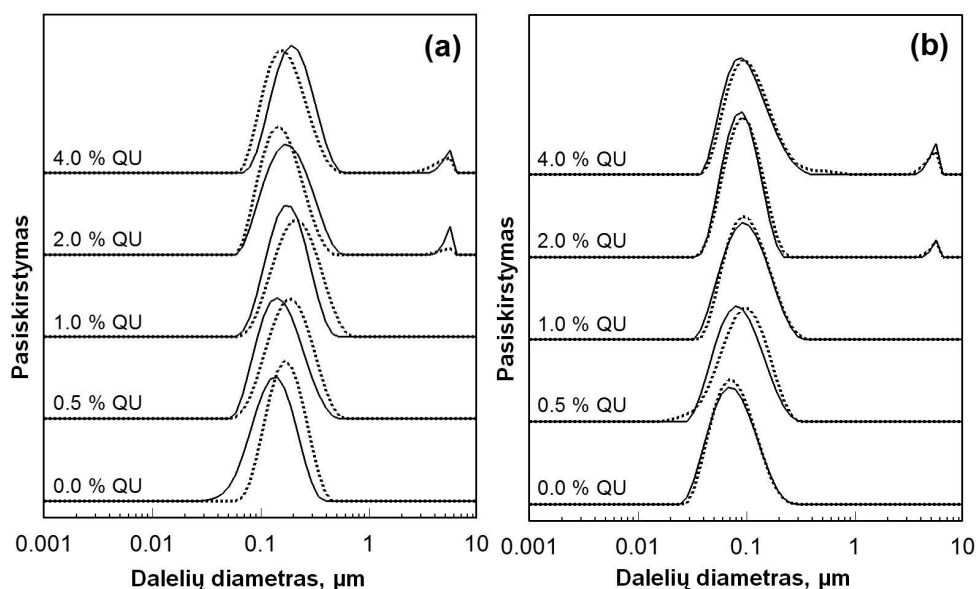
3.15 pav. *Visiškai hidratuotų (95 % dejonizuoto vandens) lipidų SPC/GDO fazių su įterpta modeline medžiaga (QU) SAXD profiliai skirtingose temperatūrose*

Lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių 50/50 (a–d) ir 40/60 (e–h) SAXD profiliai temperatūrų 25–55 °C intervale. Įterpto kvercetino koncentracija nurodyta kiekviename SAXD profilyje.

3.2.3 Disperguotų lipidų SPC/GDO skystakristalių fazių nanodalelės su įterptu kvercetinu

Šios dalies tikslas buvo ištirti kvercetino įtaką lipidų skystakristalių nanodalelių (LSKN) dydžiui ir jų stabilumui. Disperguotos LSKN gaunamos SK fazes išskaidant vandeninės terpės pertekliuje su stabilizuojančiu agentu „Polisorbatas P80“ (P80). Tyrimams buvo pasirinkti du lipidų SPC/GDO pirmtakų santykiai – 60/40 ir 35/65 %, o stabilizatoriaus ir lipido santykis išlaikomas fiksuotas visų eksperimentų metu (detalesnė LSKN gamybos eiga aprašyta skyriuje „Eksperimento metodika“ 2.2.4 dalyje). Dalelių dydis, krūvis

ir morfologija buvo matuojama dispersijose, kuriose buvo įterpta 0,5, 1, 2 ir 4 % modelinės medžiagos.

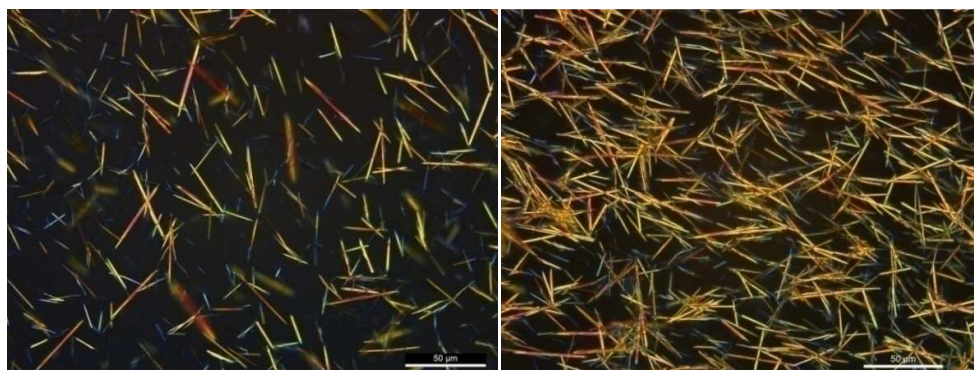


3.16 pav. Dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybė nuo QU koncentracijos *ka tik paruoštose (ištininė kreivė) ir po 3 mėnesių (taškų kreivė) LSKN*

LSKN dispersijose SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 (a) ir 35/65 (b). Dispersijos buvo paruoštos 82,5 % vandens, lipido ir P80 svorio santykis išlaikytas fiksuotas – 75/15.

3.16 paveiksle pateiktos dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybės nuo kvercetino koncentracijos. Paveikslo **3.16 a** ir **b** dalyse, esant žemoms QU koncentracijoms, LSKN dispersijose labai gerai matomi monomodaliniai dalelių dydžio pasiskirstymai, kurių polidispersiškumo indeksai svyravo intervale nuo 0,13 iki 0,16. Abiem lipidų SPC/GDO svorio santykių atvejais, kai sistemose buvo įterpta 2 ir 4 % QU, dispersijose papildomai užfiksuoti apie 5 μm dydžio agregatai. Atlikus papildomus matavimus su poliarizuojančios šviesos mikroskopu, nustatyta, kad šie didesni agregatai yra LSKN dispersijose susidarę „adatu“ formos kristalai (pav. **3.17**). Kadangi kristalai yra ryškios geltonos spalvos (tai matoma žiūrint ir pro nepoliarizuojančios šviesos mikroskopą), galima teigti, kad jie susiformuoja būtent iš kvercetino. Šie papildomi tyrimai parodo, kad SPC/GDO/P80 LSKN dispersijose

homogeniškai gali būti įterpta iki 2 % kvercetino. Tuo tarpu tos pačios lipidų kompozicijos pirmtakuose veikliosios medžiagos koncentracija siekia 4–5 %. Greitesnis kristalų susidarymas dispersijose gali būti susijęs su dideliu dalelių paviršiaus ploto ir tūrio santykiu bei vandeninėje terpėje daug gausiau susidarančių kristalizacinių QU centrų skaičiumi. Be to, negalima atmesti, kad stabilizatorius P80 taip pat gali daryti įtaką QU tirpumą. Tačiau reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad QU kristalai ir fazių skirtumai nedaro įtakos lipidų SK nanodalelių dydžio pasiskirstymo charakteristikoms. Džiugu, kad LSKN dispersijos su įterptu QU pasižymėjo geru koloidiniu stabilumu. Nedidelius dalelių dydžio pasiskirstymo pokyčius sistemoje pastebėjome tik po 3 mėnesių, dispersijas laikant tamsoje, kambario temperatūroje (pav. 3.16 taškų kreivė).

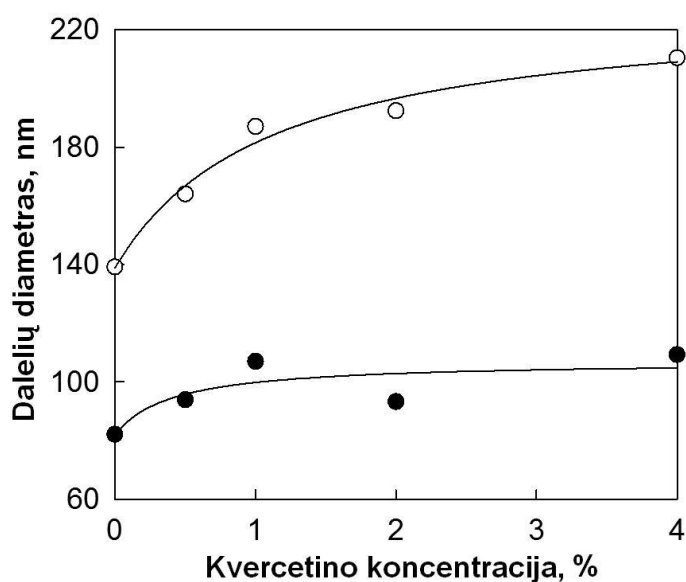


3.17 pav. *Kvercetino kristalų poliarizuotos šviesos mikroskopijos nuotraukos LSKN dispersijose*

Lipidų SPC/GDO svorio santykis buvo 35/65, o įterpto QU koncentracija – 4 %. Dispersijos buvo paruoštos 82,5 % vandens, lipido ir P80 svorio santykis išlaikytas fiksuotas – 75/15.

Iš 3.18 paveikslo kreivių matome, kad vidutinis dalelių dydis priklauso ir nuo lipidų svorio santykio, ir nuo veikliosios medžiagos koncentracijos. Taigi, kai lipidų SPC/GDO svorio santykis yra 60/40, dispersijų nanodalelės yra šiek tiek didesnės ir apskaičiuoti dalelių dydžio vidurkiai yra nuo 140 iki 210 nm, didėjant QU koncentracijai nuo 0 iki 4 %. Priešingai, kai dispersinė LSKN sistema sudaryta iš 35/65 lipidų svorio santykio, dalelės yra mažesnės ir jų dydis kinta nuo 80 iki 110 nm. Deja, mes negalime paaiškinti QU daromos įtakos dalelių parametrams vien tik fazine elgsena ir SK fazių

nanostruktūrinėmis savybėmis. Kadangi LSKN dispersijos buvo paruoštos mechaniškai purtant, mes manome, kad įterptas QU gali šiek tiek padidinti sankibos jėgas SK vidinėje struktūroje ir (arba) paveikti monokristalo domeno dydį. Todėl daug daugiau energijos reikia SK fazių su įterptu QU suardymui į mažesnes daleles. Be to, kintant QU koncentracijai LSKN dispersijose zeta potencialas išlieka nepakitęs ir yra apie -16 mV ir -10 mV, kai SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 ir 35/65, atitinkamai. Atsižvelgiant į dalelių dydį ir paviršiaus ploto bei tūrio santykį, galima teigti, kad dalelių paviršiaus krūvio tankis yra panašus abiemis tiriamiems lipidų SPC/GDO svorio santykiams.

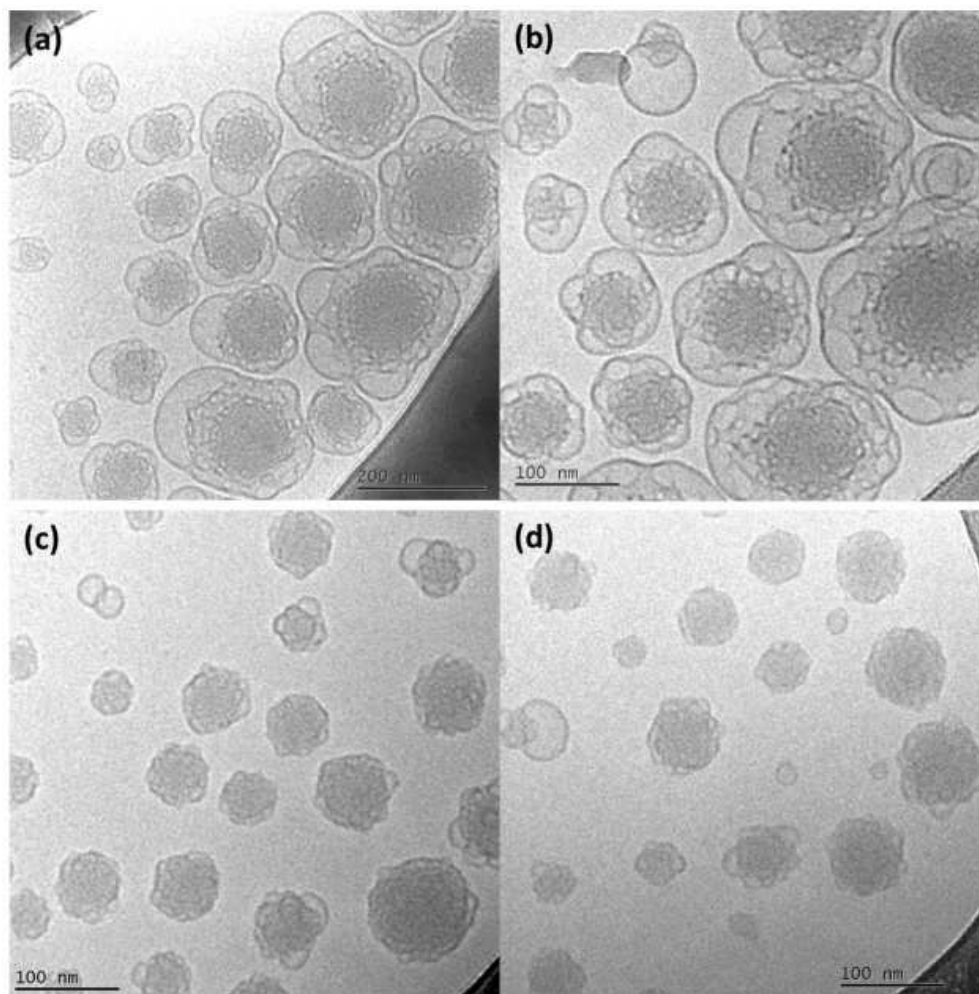


3.18 pav. Vidutinio dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybės nuo QU koncentracijos LSKN dispersijose

Paruoštos dispersijos SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 (tuščiaviduriai rutuliukai) ir 35/65 (pilnaviduriai rutuliukai). Geresniam duomenų supratimui nubrėžtos kreivės.

Daugiau įžvalgų apie disperguotų SK nanodalelių su įterptu QU morfologiją ir nanostruktūrą galime padaryti peržiūrėjus krio-TEM nuotraukas (pav. 3.19) ir SAXD profilius (pav. 3.20). Pirmiausia, tiriamų dalelių dydžio parametrai sutampa su dalelių dydžio pasiskirstymo matavimų duomenimis. Kai SPC/GDO svorio santykis 60/40, susiformavusios dalelės yra didesnės ir

pašižymi tankesne vidine šerdimi, o „žiedlapiais“ išsidėsčiusios lamelės ir „kempinės“ fazės sudaro plonytį viršutinį sluoksnį (pav. 3.19 a -b).



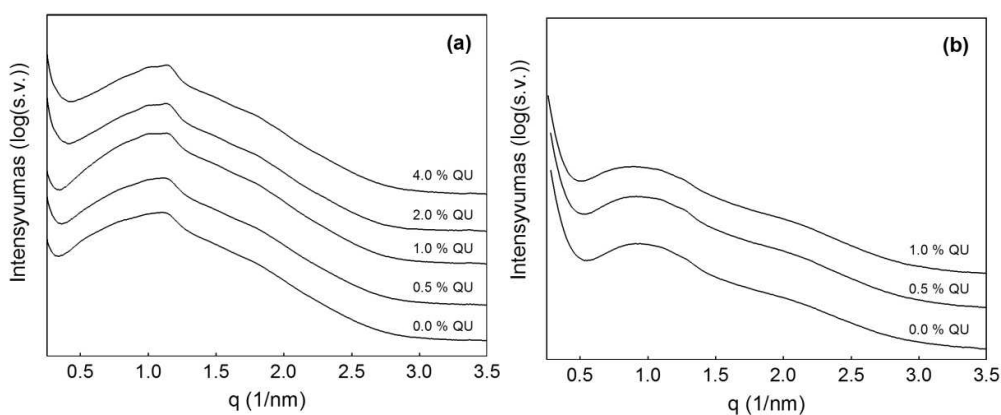
3.19 pav. LSKN su įterptu QU krio-TEM nuotraukos

LSKN įterptas QU kiekis – 1 %, o SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 (a ir b) ir 35/65 (c ir d). Dispersijos buvo paruoštos 82,5 % vandens, lipido ir P80 svorio santykis išlaikytas fiksuotas – 75/15.

Šiuos duomenis palyginome su prieš tai atlikta studija, kurios metu analizuotos panašių svorio santykių lipidų SPC/GDO ir stabilizatoriaus P80 sistemos, tik be kvercetino [124]. Atlikta rentgenostruktūrinė analizė parodė nežymią QU įtaką disperguotoms dalelėms (3.20 pav.) Galima pažymėti, kad gautuose SAXD profiliuose užfiksuotos neryškios platėjančios difrakcijos juostos. Tai buvo gana tikėtina, nes yra žinoma, kad dispersijų stabilizatorius

P80 gali deorganizuoti lipidų SPC/GDO skystakristalių nanodalelių vidinę struktūrą [121]. Pastebėta nežymi modelinio junginio įtaka nanostruktūrai ir morfologijai dispersijose su didesne dalimi SPC lipido sutapo su 3.2.2 skyriuje aptartais SK fazinės elgsenos tyrimų rezultatais (pav. **3.13 a-d**).

Kaip matome **3.19 c** ir **d** pav. nuotraukose, dalelės, kai dispersijose SPC/GDO svorio santykis buvo 35/65, yra mažesnio dydžio, bet tankis daugiau ar mažiau vienodas visame dalelės tūryje. Tai matyti **3.20 b** pav. pavaizduotame SAXD profilyje, kuriame nėra užfiksuota Brego difrakcijos smailių. Peržiūrėjus ir išanalizavus keliasdešimt krio-TEM nuotraukų galime daryti išvadą, kad dalelės, paruoštos su didesne dalimi GDO ir įterptu QU, neturi aiškių/ryškių hidratuotų dvisluoksnių vainikų, kurie yra matomi SPC/GDO/P80 LSKN dispersijose [124, 125]. Šie pastebėti skirtumai gali būti susiję su fazine elgsena, kai įterptos mažos QU koncentracijos sukelia $Fd\bar{3}m$ transformaciją į atvirkščių micelių L_2 fazę (pav. **3.13 e-d**). Labiausiai tikėtina, kad būtent mažas kiekis įterpto QU disperguotose SK fazėse ir nulemia, jog būtų gautas homogeniškas komponentų pasiskirstymas nanodalelėse ir inicijuotas lamelių vainiko susiformavimas paviršiuje.



3.20 pav. Lipidų SPC/GDO skystakristalių nanodalelių SAXD profiliai Lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių 60/40 (a) ir 35/65 (b) SAXD profiliai išmatuoti 25 °C temperatūroje. Įterpto kvercetino koncentracija nurodyta kiekviename SAXD profilyje.

3.2.4 Kvercetino stabilumo tyrimai lipidų SPC/GDO pirmtakuose, SK fazėse ir disperguotose LSKN

Viena svarbiausių lipidų pagrindu sukurtų nešiklių funkcijų yra veikliosios medžiagos apsauga nuo degradacijos. Įterpto kvercetino trijose lipidų SPC/GDO pagrindu sukurtose sistemose t. y. pirmtakuose, SK fazėse ir disperguotose LSK nanodalelėse, cheminio stabilumo studija trūko 90 dienų. Modelinio junginio įvertinimui buvo naudojamas jau optimizuotas ESCh metodas (3.1.1 skyrius), kurį šiek tiek modifikavome (3.4 lentelė).

3.4 lentelė. ESCh judrios fazės gradiento formavimo programa lipidų pagrindu sukurtoms sistemoms analizuoti

Trukmė, min.	Metanolis, parūgštintas 0,5% skruzdžių rūgštimi, %
0,0	30
7,0	50
12,0	60
16,0	70
18,0	70
20,0	100
25,0	100

3.5 lentelė. Pagrindinės analizinės charakteristikos kvercetino kiekybiniam įvertinimui skirtingose lipidinėse sistemose (n=3)

SPC/GDO, %	Mėginio tipas	r ²	AR	NR	SSN, %
35/65	Pirmtakas	0,998	5,0	15,3	< 4,1
	LSK fazė	0,995	9,6	29	< 4,1
	LSKN dispersija	0,999	2,6	8,1	< 2,7
60/40	Pirmtakas	0,998	4,2	12,8	< 6,1
	LSK fazė	0,995	9,0	27,3	< 6,6
	LSKN dispersija	0,997	5,1	15,4	< 5,0

* – AR ir NR apskaičiuotos pagal PDA duomenis.

Iškėlėme prielaidą, kad įterpto junginio degradavimui įtakos gali turėti lipidų komponentų sudėtis ir (arba) lipidinių sistemų vidinė erdvinė nanostruktūra. Stabilumo stebėsenai pasirinkome 35/65 ir 60/40 lipidų

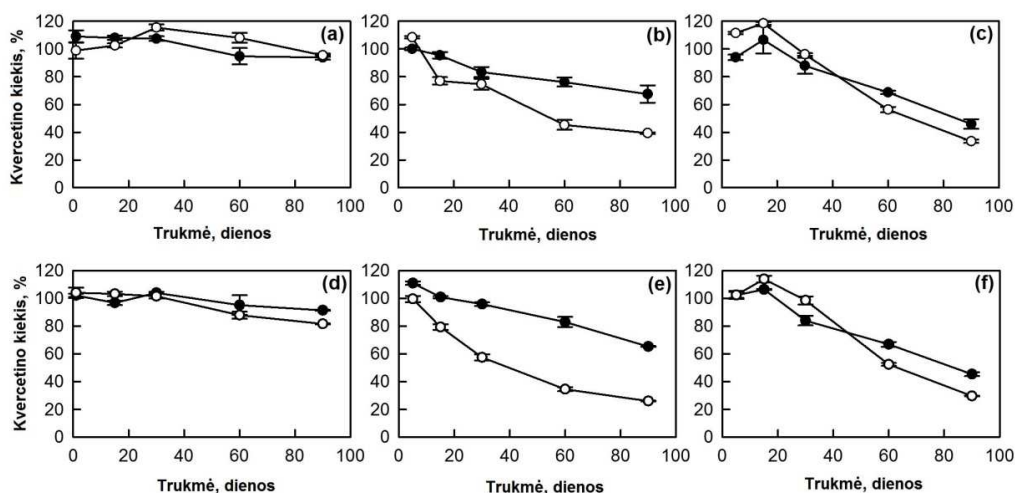
santykius, kuriuose pirmuoju atveju susiformuoja atvirkščių micelių kubinė $Fd\bar{3}m$ fazė, o antruoju – 2D atvirkštinė heksagoninė (H_2). Į šias savitvarkes struktūras buvo imodilizuota 0,5 ir 1,0 % QU.

Pirmiausia įvertinome analizines charakteristikas skirtingose sistemose, esant skirtingiems lipidų santykiams (**3.5** lentelė). Kalibracinių kreivių tiesiškumo intervalai kvercetinui buvo matuojami su šešiomis skirtingomis koncentracijomis, intervale nuo 1,0 iki 100 $\mu\text{g/g}$. Modelinis junginys visose tirtose sistemose parodė gerą tiesiškumą ($r^2 > 0,995$). Aptikimo ribos buvo nustatomos esant signalo/fono triukšmų santykiui 3, o nustatymo ribos – esant signalo/fono triukšmų santykiui 10.

Per 90 dienų labai gerą stabilumą QU parodė abiejų SPC/GDO svorio santykių pirmtakuose (pav. **3.21 a ir d**). Modelinio junginio išlieka apie 85–90 % nepriklausomai nuo įterpto junginio kiekio ir nuo lipidų santykio mišinyje. Sistemų suformuotų visiškos hidratacijos būdu, kurio metu susidarė pilnai hidratuotos SK fazės (pav. **3.21 b ir e**) ir LSKN dispersijos (pav. **3.21 c ir f**), turėjo didesnę įtaką QU stabilumui. Šiose sistemose užfiksuotas tolygus ir žymus QU koncentracijos mažėjimas. SK fazėje, kai SPC/GDO svorio santykis buvo 35/65, po 90 dienų laikotarpio QU lieka tik apie 60 %, o SK fazėje, kai SPC/GDO svorio santykis – 60/40, QU išgava tesiekė 25–40 %. Kaip matome, mažamolekulinio junginio interpoliacijai labiau tinka sistema, kurioje susidaro atvirkštinė kubinė $Fd\bar{3}m$ fazė. Ši žymų skirtumą galėtume paaiškinti tuo, kad šiuose tyrimuose naudotame SPC sudėtyje yra nemažai linoleino rūgšties (C18:2) riebiųjų rūgščių grandinių. Yra žinoma, kad didėjant lipidų neprisotinimo laipsniui greitėja lipidų autooksidacijos procesai, kurių metu susidaro aukšto reaktingumo pirminiai ir antriniai oksidacijos produktai [126]. SK fazėse, kuriose dominuoja SPC lipidai, gali susidaryti dideli kiekiai reaktantų, kurie sąveikauja ir inicijuoja cheminį QU degradavimą. Priešingą situaciją stebime SK fazėse, kai dominuoja GDO lipidai, kurių sudaro oleino rūgšties esterio sočiosios rūgščių liekanos.

Mažiausias QU stabilumas užfiksuotas LSKN dispersijose, kuriose po 90 dienų modelinio junginio liko 30–45 % (pav. **3.21 c ir f**). Dispersijose, kuriose

dominavo GDO lipidas, gauti šiek tiek geresni rezultatai, nei dispersijose su didesniu kiekiu SPC. Labiausiai tikėtina, kad P80, kuris buvo naudojamas LSKN dispersijų stabilizavimui, taip pat galėjo veikti kompleksinius lipidų autooksidacinius procesus, dėl ko sumažėjo QU stabilumas. Kita vertus, vandens penetracija ir difuzija į lipidų nanodaleles yra mažiau apribota mažų dalelės tūriu, jei palyginsime su makroskopine SK faze, ir tai, ko gero, paspartina QU degradaciją.



3.21 pav. Įterpto QU cheminio stabilumo įvertinimas SPC/GDO pagrindu sukurtuose pirmtakuose (a ir d), SK fazėse (b ir e) ir LSKN dispersijose (c ir f) Paruoštose sistemose lipidų SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 (tuščiaviduriai rutuliukai) ir 35/65 (pilnaviduriai rutuliukai), įterpto QU koncentracija – 0,5 (a–c) ir 1 % (d–f) (pagal sausą QU kiekį). Paveiksle pateikti matavimų rezultatai: aritmetinis vidurkis ± standartinis nuokrypis (n=3).

3.2.5 Lipidų skystakristalių sistemų su įterptu kvercetinu apibendrinimas

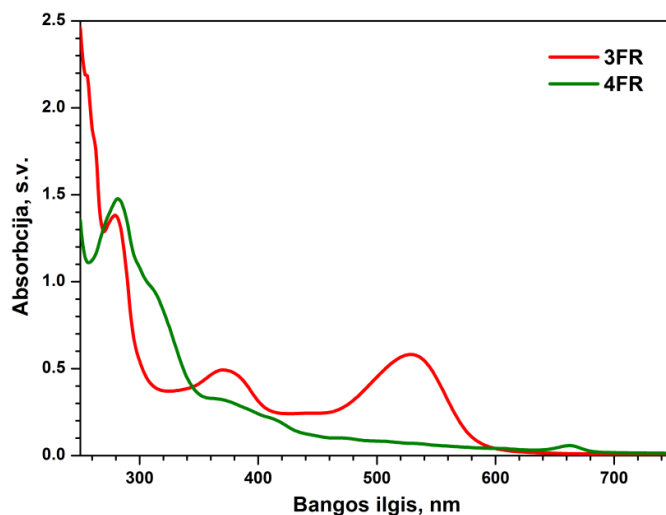
Lipidų sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato pagrindu suformuotos lipidų skystakristalės sistemos gali būti sėkmingai pritaikytos kvercetino įterpimui ir pernašai. Tyrimų rezultatai parodė, kad lipidų SPC/GDO mišinyje, su nedideliu kiekiu etanolio, ištirpo net 5 % kvercetino. Lipidų pagrindu paruoštos sistemos yra stabilios ir turi minimalų poveikį QU chemiam stabilumui, praėjus keliems mėnesiams. Po pilnos hidratacijos SK pirmtakai gali lengvai sudaryti savitvarkes nelamelines SK sistemas su skirtingomis nanostruktūromis. Nustatyta, kad QU daro įtaką SK fazių struktūrai,

priklausomai nuo lipidų svorio santykio. Sistemoje esant dideliame kiekiui SPC lipido, įterptas QU praktiškai nedaro įtakos H_2 fazės struktūroms. Esant mažam SPC kiekiui, QU nežymiai padidina atvirkščių micelių kubinės $Fd\bar{3}m$ fazės dalelių gardelės parametrus ir pagreitina fazinį perėjimą į L_2 fazę aukštesnėje temperatūroje. Galiausiai, nelamelinės SPC/GDO pagrindu pagamintos LSKN dispersijos, kuriose galima įterpti virš 2 % QU, suformuotos pasitelkus stabilizatorių P80, yra koncentruotos ir pasižymi koloidiniu stabilumu. Dispersijų dalelių dydį galime keisti intervale nuo 80 iki 210 nm, keičiant lipidų svorio santykį ir įterpto QU koncentraciją.

3.3 Spanguolių flavonoidų įterpimas į lipidų skystakristales sistemas ir sistemų charakterizavimas

3.3.1 Natūraliųjų flavonoidų įterpimas į lipidų skystakristales sistemas

Optimizavę kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos metodą, iš liofilizuotų spanguolių miltelių išskyrėme III frakcijos flavonoidus. Kaip minėta, III frakcijoje (3FR) atskiriami flavonoliai – miricetinas, kvercetinas ir jų glikozidai (eliuentas – 60 % MeOH) (žr. 3.1 skyrių). Taip pat buvo pastebėta, kad tuo metu kai per tą patį disperguotą su C18 sorbentu spanguolių mėginį leidžiamas 4 frakcijos eliuentas – 100 % MeOH, išsiplauna dar vieno flavonoidų poklasio junginiai. Kadangi IV frakcijoje (4FR) esančių junginių MS identifikavimas nebuvo atliktas, informacijos ieškojome literatūroje. Skaitytoje literatūroje autoriai pateikia skirtingą informaciją, bet daugeliu atvejų 4FR priskirtume antocianinams arba proantocianidinams [32, 37, 38, 48]. 3.22 pav. pateikti 3FR ir 4FR flavonoidų absorbcijos spektrai, iš kurių matyti, kad šiose frakcijose yra skirtingų pogrupių flavonoidai.



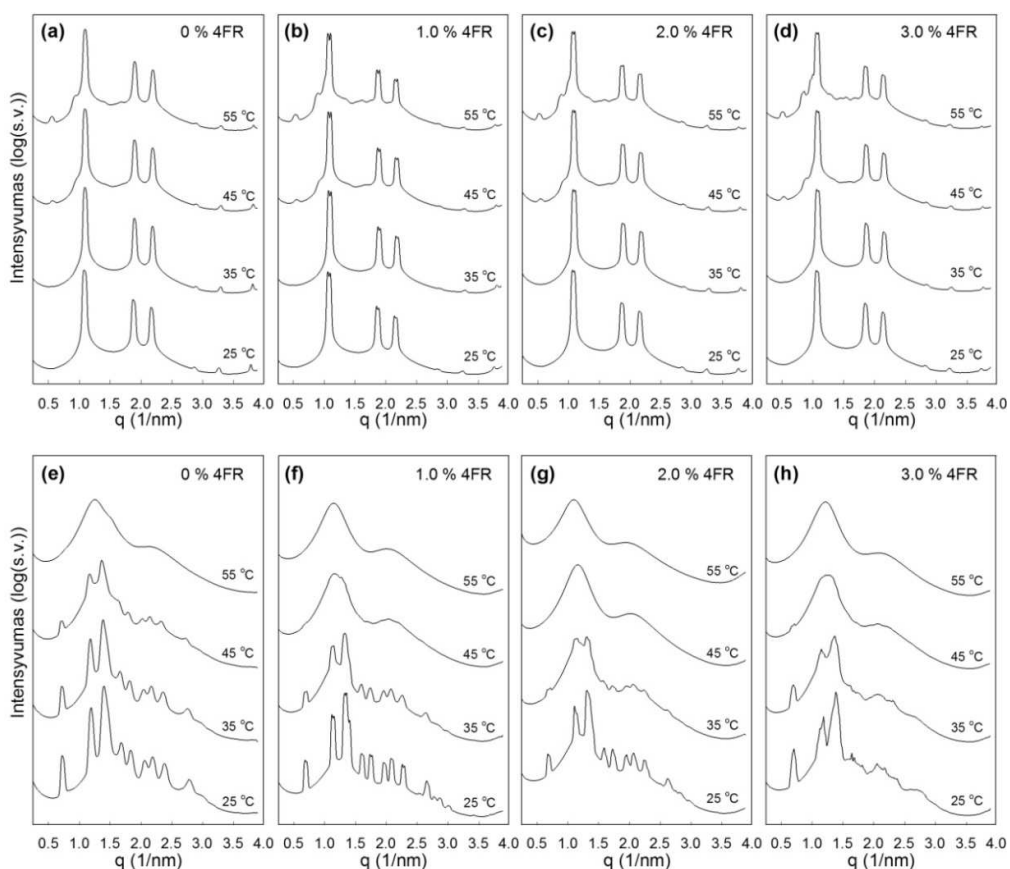
3.22 pav. III ir IV frakcijų flavonoidų (0,5 %) absorbcijos spektrai

3.2 skyriuje rašėme, kad lipidų sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato pagrindu suformuotos lipidų skystakristalės sistemos gali būti sėkmingai pritaikytos kvercetino įterpimui ir pernašai. Tyrimams su natūraliais flavonoidais buvo parinkti du šių lipidų santykiai – 60/40 ir 35/65 %. Pirmiausia, buvo įvertinta SPC/GDO lipidų SK fazių pirmtakų geba tirpinti abiejų frakcijų flavonoidus. Rezultatai parodė, kad nepriklausomai nuo lipidų santykio, 3FR flavonoidų ištirpo tik 1 %, o 4FR – 3 % sauso ekstrakto. Greičiausiai, tai yra susiję su 3FR esančiais kvercetino ir miricetino aglikonų glikozidais, bet tai pagrįsti reikėtų papildomų tyrimų.

Kadangi 4FR flavonoidų ištirpo tris kartus daugiau, nanostruktūriniams tyrimams su lipidų nelamelinėmis skystakristalėmis fazėmis pasirinkome būtent šią frakciją. **3.23** paveiksle pateikti visiškai hidratuotų lipidų SPC/GDO dviejų svorio santykių 60/40 ir 35/65 SK fazių su įterptais 4FR junginiais (įterpto sauso ekstrakto koncentracijos: 0, 1,0, 2,0 ir 3,0 %) gauti SAXD tyrimų profiliai.

Visiškai hidratuotoje sistemoje SPC/GDO, kai lipidų svorio santykis yra 60/40, o temperatūra – 25 °C, formuojasi 2D atvirkštinė heksagonalinė fazė (H₂) (žr. pav. **3.23 a**), kurią charakterizuoja trys Brego smailių santykinės pozicijos 1: $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$. 45 °C temperatūroje pradeda formotis kita SK fazė, greičiausiai kubinė $Fd\bar{3}m$ – atsiranda papildomų pikų. Tačiau, nepriklausomai

nuo temperatūros įtakos ir įterptų skirtingų 4FR flavonoidų koncentracijų, visose difraktogramose vaizdas išlieka vienodas. Tai parodo, kad mišiniuose su didele SPC dalimi gaunamos H₂ fazės yra visiškai tvirtos ir gali talpinti didelius kiekius natūralių flavonoidų, nekeičiant skystakristalės fazės nanostruktūros.



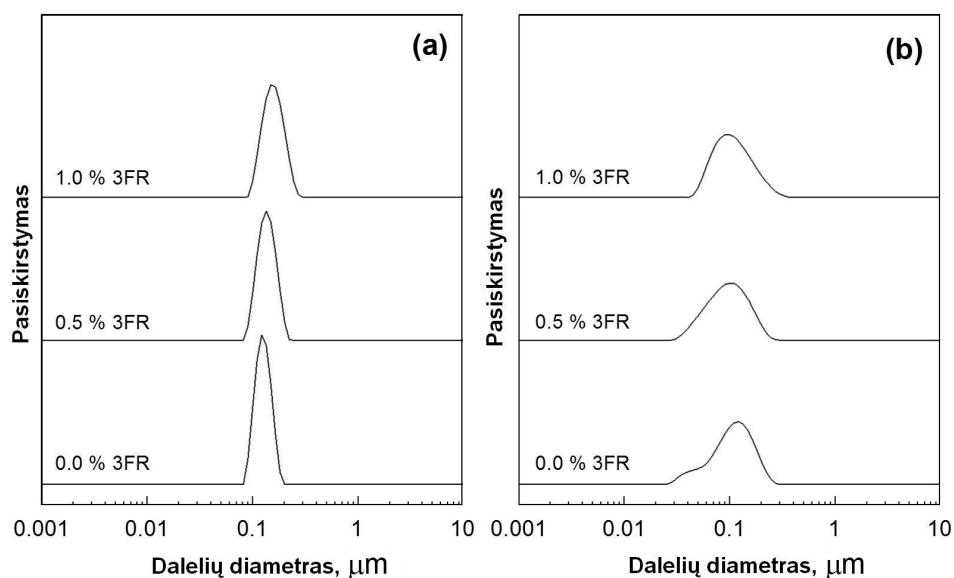
3.23 pav. Visiškai hidratuotų (95 % dejonizuoto vandens) lipidų SPC/GDO SK fazių su įterptu 4 frakcijos spanguolių flavonoidų ekstraktu (4FR) SAXD profiliai skirtingose temperatūrose

Lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių 60/40 (a–d) ir 35/65 (e–h) SAXD profiliai temperatūrų 25–55 °C intervale. Įterpto ekstrakto koncentracija nurodyta kiekviename SAXD profilyje.

Esant lipidų SPC/GDO tarpusavio svorio santykiui 35/65 (25 °C temperatūroje) susiformuoja atvirkštinė kubinė $Fd\bar{3}m$ fazė, kurią aiškiai charakterizuoja pirmosios 9 Brego smailių santykinės padėties, esančios $\sqrt{3}$: $\sqrt{8}$: $\sqrt{11}$: $\sqrt{12}$: $\sqrt{16}$: $\sqrt{19}$: $\sqrt{24}$: $\sqrt{27}$: $\sqrt{32}$ (žr. pav. 3.23 e). Priešingai nei H₂ fazė,

kubinė $Fd\bar{3}m$ fazės vidinė struktūra yra jautri tiek įterptų 4FR junginių koncentracijai, tiek temperatūrai. 45 °C temperatūroje ji pradeda „tirpti“, o 55 °C temperatūroje tiesiogiai pereina į netvarkingą atvirkštinių micelių (L_2) fazę, kurią patvirtina Brego smailių išnykimas. 4FR flavonoidų koncentracijos įtaką hidratuotų fazių struktūrai įrodo tai, kad fazėse su 1, 2 ir 3 % biojunginių tvarkinga kubinė $Fd\bar{3}m$ struktūra pereina į netvarkingą fazę 35 °C temperatūroje (pav. 3.23 f-h).

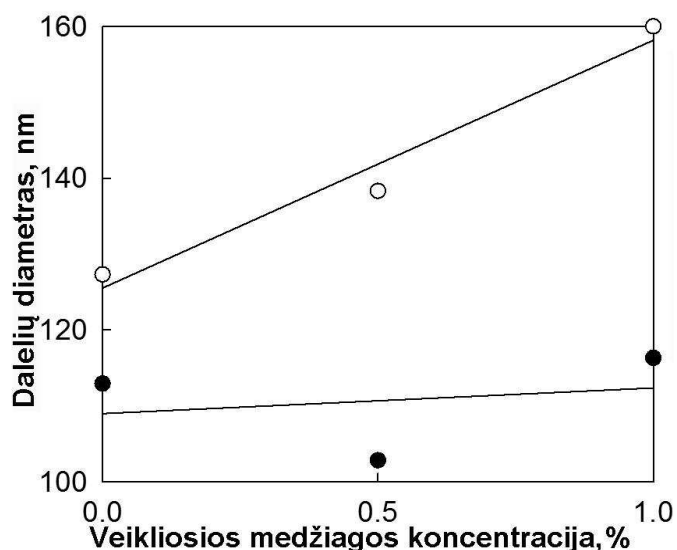
Taip pat buvo ištirta abiejų frakcijų flavonoidų įtaka lipidų skystakristalių nanodalelių (LSKN) dydžiui. Disperguotos LSKN gaunamos SK fazes išskaidant vandeninės terpės pertekliuje su stabilizuojančiu agentu „Polisorbatas P80“ (P80). Tyrimai buvo atliekami su dvejais lipidų SPC/GDO pirmtakų santykiais – 60/40 ir 35/65 %, o stabilizatoriaus ir lipido santykis išlaikomas fiksuotas visų eksperimentų metu (detalesnė LSKN gamybos eiga aprašyta skyriuje „Eksperimento metodika“ 2.2.4 dalyje). Dalelių dydis buvo matuojama dispersijose, kuriose buvo įterpta 0,5 ir 1 % sauso flavonoidų ekstrakto (4FR atveju – 0,5, 1, 2 ir 3 %), išskirto iš natūralių spanguolių.



3.24 pav. Dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybė nuo 3 frakcijos spanguolių flavonoidų ekstrakto (3FR) koncentracijos ką tik paruoštose LSKN LSKN dispersijose SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 (a) ir 35/65 (b). Dispersijos buvo paruoštos 82,5 % vandens, lipido ir P80 svorio santykis išlaikytas fiksuotas – 75/15.

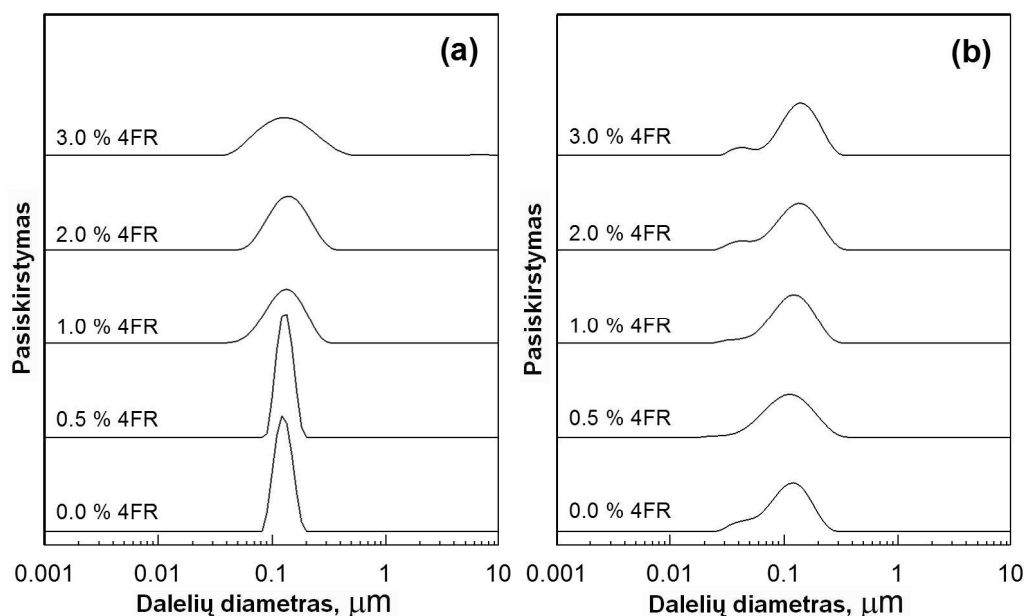
3.24 paveiksle pateiktos dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybės nuo 3FR flavonolių koncentracijos. Paveikslo **3.24 a**, kai SPC/GDO svorio santykis lygus 60/40, LSKN dispersijose labai gerai matomi monomodaliniai dalelių dydžio pasiskirstymai, kurių polidispersiškumo indeksai svyravo intervale nuo 0,03 iki 0,04. Paveikslo **3.24** dalyje **b**, kai SPC/GDO svorio santykis lygus 35/65, LSKN dispersijose dalelių dydžio pasiskirstymas labiau išsibarstęs ir polidispersiškumo indeksai svyravo platesniame intervale.

Iš **3.25** paveikslo kreivių matome, kad vidutinis dalelių dydis priklauso ir nuo lipidų svorio santykio, ir nuo veikliosios medžiagos koncentracijos. Taigi, kai lipidų SPC/GDO svorio santykis yra 60/40, dispersijų nanodalelės yra šiek tiek didesnės ir apskaičiuoti dalelių dydžio vidurkiai yra nuo 140 iki 160 nm, didėjant 3FR koncentracijai nuo 0 iki 1 %. Kai dispersinė LSKN sistema sudaryta iš 35/65 lipidų svorio santykio, dalelių dydžio parametrų pokytis yra minimalus. Panašią tendensiją stebėjome, kai buvo atliekami disperguotų LSKN su įterptu kvercetinui tyrimai (**3.18** pav.). Greičiausiai, tai gali būti susiję su lipido agregato atsparumu įterpiamam junginiui.



3.25 pav. Vidutinio dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybės nuo 3 frakcijos flavonoidų koncentracijos (3FR) LSKN dispersijose Paruoštose dispersijose SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 (tuščiaviduriai rutuliukai) ir 35/65 (pilnaviduriai rutuliukai). Geresniam duomenų supratimui nubrėžtos kreivės.

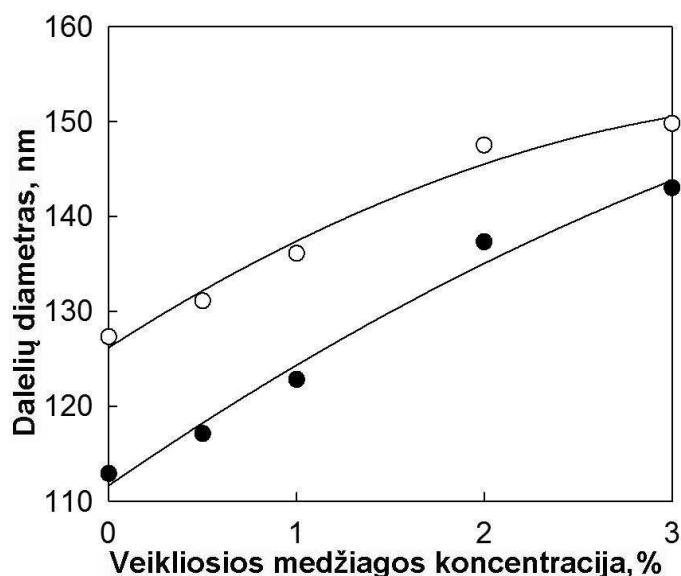
3.26 paveiksle pateiktos dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybės nuo 4FR flavonoidų koncentracijos. Paveikslo **3.26 a** dalyje, LSKN dispersijose monomodaliniai dalelių dydžio pasiskirstymai išliko tik esant įterptoms mažoms 4FR koncentracijoms – polidispersiškumo indeksai svyravo intervale nuo 0,11 iki 0,13. Kai lipidų sistemose yra ištirpinta po 2 ir 3 % 4FR spanguolių ekstrakto, šis indeksas pasiskirsto platesniame intervale. Paveikslo **3.26 b** dalyje, kai SPC/GDO svorio santykis lygus 35/65, LSKN dispersijose dalelių dydžio pasiskirstymas labiau išsibarstęs ir polidispersiškumo indeksai svyravo nuo 0,16 iki 0,2.



3.26 pav. Dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybė nuo 4 frakcijos spanguolių flavonoidų ekstrakto (4FR) koncentracijos ką tik paruoštos LSKN LSKN dispersijose SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 (a) ir 35/65 (b). Dispersijos buvo paruoštos 82,5 % vandens, lipido ir P80 svorio santykis išlaikytas fiksuotas – 75/15.

Iš **3.27** paveikslo kreivių matome, kad vidutinis dalelių dydis priklauso ir nuo lipidų svorio santykio, ir nuo veikliosios medžiagos koncentracijos. Taigi, kai lipidų SPC/GDO svorio santykis yra 60/40, dispersijų nanodalelės yra šiek tiek didesnės ir apskaičiuoti dalelių dydžio vidurkiai yra nuo 130 iki 150 nm, didėjant 4FR flavonoidų koncentracijai nuo 0 iki 3 %. Priešingai, kai dispersinė LSKN sistema sudaryta iš 35/65 lipidų svorio santykio, dalelės yra

mažesnės ir jų dydis kinta nuo 115 iki 140 nm. Deja, mes negalime paaiškinti flavonoidų daromos įtakos dalelių parametrams vien tik fazine elgsena ir SK fazių nanostruktūrinėmis savybėmis. Atsižvelgiant į dalelių dydį ir paviršiaus ploto bei tūrio santykį, galima teigti, kad dalelių paviršiaus krūvio tankis yra panašus abiemis tiriamiems lipidų SPC/GDO svorio santykiams.



3.27 pav. Vidutinio dalelių dydžio pasiskirstymo priklausomybės nuo 4 frakcijos flavonoidų koncentracijos (4FR) LSKN dispersijose

Paruoštose dispersijose SPC/GDO svorio santykis buvo 60/40 (tuščiaviduriai rutuliukai) ir 35/65 (pilnaviduriai rutuliukai). Geresniam duomenų supratimui nubrėžtos kreivės.

Lipidų sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato pagrindu suformuotos lipidų skystakristalės sistemos gali būti sėkmingai pritaikytos ne tik kvercetino, bet ir spanguolėse esančių flavonoidų įterpimui ir pernašai. Tyrimų rezultatai parodė, kad lipidų SPC/GDO mišinyje, su 10 % etanolio, ištirpo net 3 % 4FR ir 1 % 3FR flavonoidų. Po pilnos hidratacijos SK pirmtakai gali lengvai sudaryti savitvarkes nelamelines SK sistemas su skirtingomis nanostruktūromis. Galiausiai, nelamelinės SPC/GDO pagrindu pagamintos LSKN dispersijos, kuriose galima įterpti virš 2 % 4FR flavonoidų, suformuotos pasitelkus stabilizatorių P80.

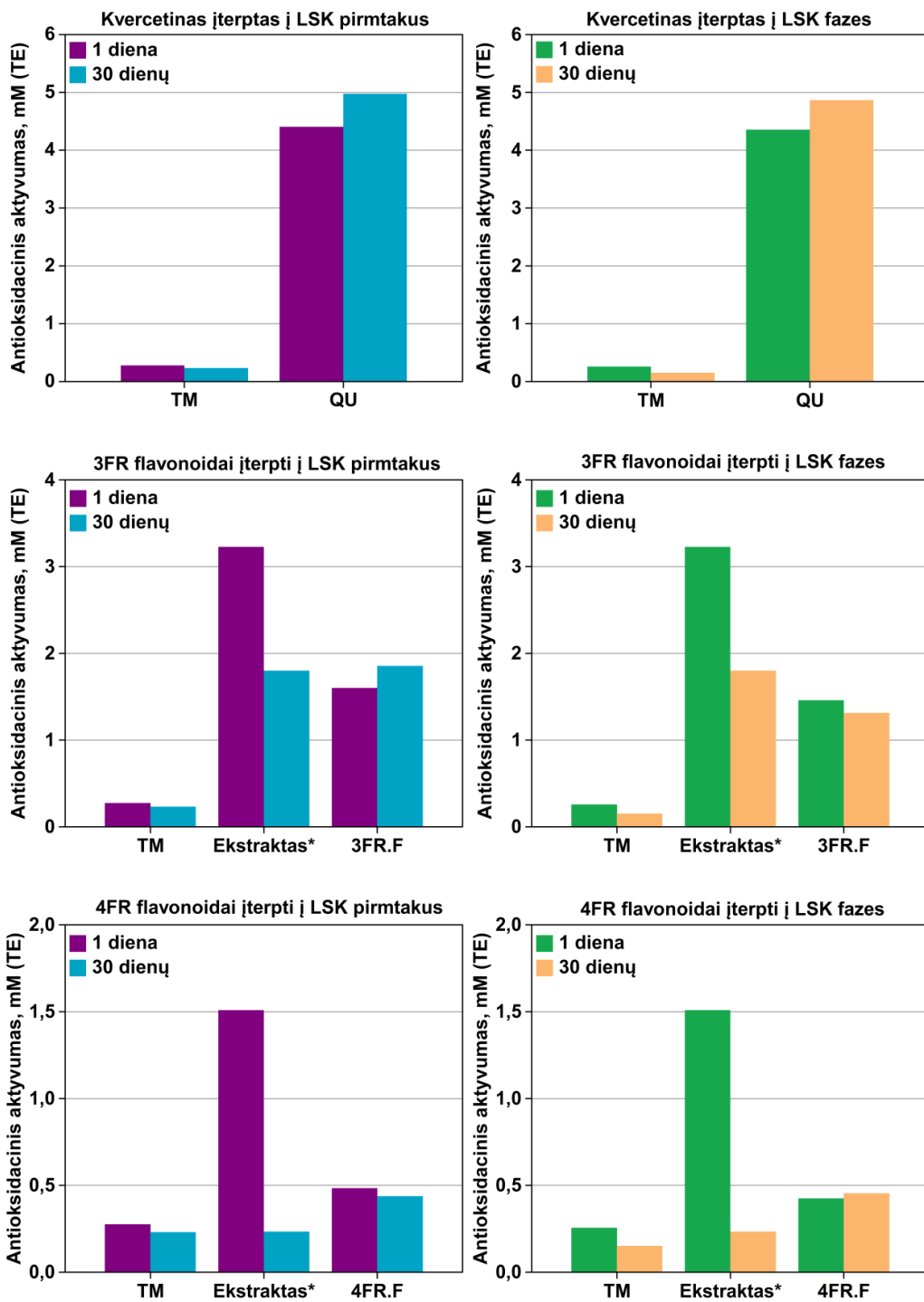
3.3.2 Antioksidacinio aktyvumo palyginimas skirtingose lipidinėse pernašos sistemose su įterptais flavonoidais

Antioksidantai – junginiai, apsaugantys biologines sistemas nuo laisvųjų radikalų sukeliama oksidacinio poveikio. Šie junginiai yra svarbūs mitybos komponentai, kurie neleidžia susidaryti laisviesiems radikalams, juos slopina ar dalyvauja jų suardymo procese. Antioksidantus pagal kilmę galima skirstyti į sintetinius ir natūralius. Natūralūs, augaliniai flavonoidai, pasižymintys stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, gali būti vartojami kaip funkcinis maistas arba nutraceutikai, turintys teigiamą poveikį žmogaus sveikatai. Šiam tikslui gali pasitarnauti naujos lipidinės pernašos sistemos su įterptais natūraliais spanguolių flavonoidais. Į lipidų SPC/GDO pagrindu sukurtas savitvarkes sistemas buvo įterptas kvercetas, III ir IV frakcijos flavonoidai ir palyginti šiose sistemose esančių biojunginių antioksidaciniai aktyvumai. Paruoštose SK pirmtakuose ir fazėse lipidų SPC/GDO svorio santykis buvo 35/65 %, o įterpto QU, 3FR ir 4FR flavonoidų koncentracija – 0,5 %. Šių lipidų santykį pasirinkome todėl, kad po atliktų cheminio stabilumo tyrimų buvo gauti geriausi rezultatai (3.2.4 skyrius, 3.21 pav.). Skirtingų LSK sistemų, t. y. pirmtakų ir fazių, antioksidacinis aktyvumas nustatytas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH[•]) radikalo sujungimo metodu. Tokie pat tyrimai atlikti ir su spanguolių III ir IV frakcijų metanoliniais ekstraktais.

Iš atliktų tyrimų (3.28 pav.) matyti, kad nepriklausomai nuo lipidinės sistemos, pirmą dieną stipriausiu laisvuosius radikalus surišančiu aktyvumu pasižymėjo kvercetas (TEAC = 4,40 ± 0,07 pirmtakuose ir TEAC = 4,35 ± 0,09 fazėse). Pagal aktyvumą minėtų sistemų išsidėstymas būtų toks (1 dieną): kvercetas (QU) įterptas į lipidų SK sistemas > 3FR flavonoidų ekstraktas > 4FR flavonoidų ekstraktas > 3FR flavonoidų ekstraktai įterpti į lipidų SK sistemas > 4FR flavonoidų ekstraktas įterptas į lipidų SK sistemas.

Po 30 dienų ši eilutė šiek tiek pasikeičia: kvercetas (QU) įterptas į lipidų SK sistemas > 3FR flavonoidų ekstraktai įterpti į lipidų SK sistemas > 3FR flavonoidų ekstraktas > 4FR flavonoidų ekstraktas įterptas į lipidų SK sistemas > 4FR flavonoidų ekstraktas (3.28 pav.).

Nors spanguolių ekstraktuose esančių biojunginių antioksidacinis aktyvumas yra didesnis už įterptus į lipidų SK agregatus, tačiau, po 30 dienų šis parametras žymiai sumažėja – 3FR ekstrakto TEAC sumažėjo 46 %, o 4FR ekstrakto – 84 %. O lipidų pagrindu sukurtuose pirmtakuose ir fazėse šie parametrai mažai pakinta. Antioksidacinių tyrimų duomenys gauti ištyrus lipidų SK sistemų su įterptu kvercetinu siejasi su cheminio stabilumo tyrimais, kurie pateikti 3.2.4 skyriuje, **3.21** paveikslo **a** ir **b** dalyse, ir dar kartą patvirtina atliktų tyrimų rezultatus. Todėl sukurtas lipidų SPC/GDO skystakristales sistemas galime taikyti, kaip flavonoidų patalpinimo ir apsaugos nuo degradacijos matricą.



3.28 pav. Flavonoidų antioksidacinis aktyvumas lipidų SK sistemose

TM – „tuščias“ mėginys, t. y. pirmtakas arba fazė be įterptos veikliosios medžiagos, 3FR.F – 3 frakcijos flavonoidai, 4FR.F – 4frakcijos flavonoidai, QU – kvercetas. * – 3FR ir 4FR spanguolių metanoliniai ekstraktai. *Pastaba:* antioksidaciniai aktyvumai apskaičiuoti pagal Trolokso ekvivalentus (TE) 100 mg mėginio, kuriame veikliosios medžiagos koncentracija 0,5 %.

IŠVADOS

1. KDE metodas pirmą kartą pritaikytas flavonoidų ekstrakcijai iš natūralių liofilizuotų spanguolių, šių uogų pagrindu pagamintų maisto produktų ir maisto papildų. Flavonolių chromatografinis atskyrimas trunka tik 17 min., tuo pačiu galima vykdyti ir šių junginių masių spektrometrinę detekciją.
2. Palyginus skirtingos prigimties (oktadecilsilikagelio ir silikagelio) sorbentus flavonolių išskyrimui iš liofilizuotų spanguolių KDE metodu, nustatyta, kad tikslinė junginių grupė išekstrahuojama disperguojant mėginius su oktadecilsilikageliu. Pilna ir atranki flavonolių ekstrakcija pasiekama atliekant frakcionavimą su 10 ml skirtingos sudėties metanolio/vandens eliuentais.
3. Įvertinus optimizuoto KDE-ESCh metodo analizes charakteristikas miricetinui, kvercetinui ir kaempferoliui nustatyta, kad ekstrakcijos išgava buvo didesnė nei 97,7 % miricetinui, 111,5 % kvercetinui ir 59,1 % kaempferoliui. Metodo atkuriamumo sąlygomis apskaičiuoti santykiniai standartiniai nuokrypiai buvo mažesni nei 9,5 %.
4. Įvertinta lipidų skystakristalių fazių pirmtakų geba tirpinti modelinį junginį kvercetiną. Nepriklausomai nuo lipidų santykio, visuose mono- ir digliceridų pagrindu pagamintuose mišiniuose, ištirpusio kvercetino kiekis svyravo nuo 0,3 iki 0,4 %. Į lipidų sistemą pridėjus sojos fosfatidilcholino (SPC), kvercetino tirpumas padidėjo 10–20 kartų.
5. Kvercetino įtaka SPC/GDO fazių nanostruktūrai priklauso nuo lipidų svorio santykio. Kai sistemą sudarančių lipidų svorio santykis yra 60/40, H₂ SK fazės struktūros nedaro įtakos įterptas QU. Kai lipidų svorio santykis yra 35/65, kubinė $Fd\bar{3}m$ fazė yra labai jautri įterptai QU koncentracijai – fazinis virsmas prasideda esant 35 °C temperatūrai ir 4 % QU.

6. Nelamelinės SPC/GDO pagrindu pagamintos LSKN dispersijos, kuriose galima įterpti virš 2 % QU, suformuotos pasitelkus stabilizatorių P80, yra koncentruotos ir pasižymi koloidiniu stabilumu. Dispersijų dalelių dydį galime keisti intervale nuo 80 iki 210 nm, keičiant lipidų svorio santykį ir įterpto QU koncentraciją.
7. Pagrindinis lipidų SPC/GDO pagrindu paruoštų sistemų privalumas yra jų stabilumas ir funkcija apsaugoti įterptas veikliąsias medžiagas nuo degradavimo. Įterpto kvercetino cheminis stabilumas sistemose mažėja šia seka: LSK pirmtakai > LSK fazės > LSKN dispersijos.
8. Skirtingos lipidų SPC/GDO pernašos sistemos su įterptu kvercetinu ir natūraliais flavonoidais išlaiko antioksidacines savybes. Tuo tarpu natūralių spanguolių ekstraktai bėgant laikui antioksidacines savybes praranda.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS

MOKSLINIAI STRAIPSNIAI:

1. **A. Linkevičiūtė**, R. Butkienė, E. Naujalis. Optimization of matrix solid-phase dispersion extraction for the chromatographic analysis of flavones in cranberries. *Chemija*, **2013**. Vol. 24. No. 3. P. 217-222.

2. **A. Linkevičiūtė**, A. Misiūnas, E. Naujalis, J. Barauskas. Preparation and characterization of quercetin-loaded lipid liquid crystalline systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, Doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.001 (in press).

KONFERENCIJŲ MEDŽIAGOS IR TEZĖS:

1. **A. Linkevičiūtė**, R. Butkienė, E. Naujalis. Investigation of Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction for the Analysis of Flavones in Natural Cranberries and Health Supplements. Tarptautinio simpoziumo „MS and Related Techniques in Advanced Analytical Science“ stendinio pranešimo medžiaga, Mančesteris, Didžioji Britanija. 2013 m. balandžio 23-24 d.

2. **A. Linkevičiūtė**, V. Kintaitė, E. Naujalis. Determination of flavones in cranberry drinks using optimized matrix solid-phase dispersion extraction and liquid chromatography. 11-osios Lietuvos chemikų tarptautinės konferencijos „Chemija 2013“ stendinio pranešimo medžiaga, Vilnius. 2013 rugsėjo 27 d. ISBN 978-609-95511.

3. **A. Linkevičiūtė**, J. Barauskas, A. Misiūnas, E. Naujalis. „Preparation and characterization of quercetin-loaded lipid liquid crystalline systems“. Tarptautinės konferencijos „Chemistry and chemical technology“ stendinio pranešimo medžiaga, Kaunas, 2014 m. balandžio 25 d., p. 30–33, ISSN 2351–5643.

PADĖKA

Dėkoju moksliniam vadovui doc. dr. E. Naujaliui ir moksliniam konsultantui dr. J. Barauskui už galimybę atlikti disertacinį darbą bei už suteiktas žinias, patarimus ir skatinimą tobulėti.

Esu dėkinga Vilniaus universiteto bei FTMC Organinio skyriaus, Medžiagų analizės laboratorijos ir Metrologijos skyriaus, Cheminės metrologijos laboratorijos kolegoms už pagalbą praktiniais ir teoriniais klausimais.

Pačius šilčiausius padėkos žodžius skiriu savo šeimai ir draugams už nuolatinį palaikymą, kantrybę ir supratimą.

Dėkoju už Lietuvos mokslo tarybos projekto „Studentų mokslinės veiklos skatinimas“ (VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-003) paramą. Projektas yra finansuojamas pagal Žmogiškųjų išteklių plėtros veiksnių programos 3 prioritetą „Tyrėjų gebėjimų stiprinimas“ iš Europos socialinio fondo ir Lietuvos Respublikos valstybės biudžeto lėšų.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Haller, C.A., *Nutraceuticals: Has There Been Any Progress?* Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2010. **87**(2): p. 137-+.
2. Bernal, J., et al., *Advanced analysis of nutraceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **55**(4): p. 758-774.
3. Espin, J.C., M.T. Garcia-Conesa, and F.A. Tomas-Barberan, *Nutraceuticals: Facts and fiction*. Phytochemistry, 2007. **68**(22-24): p. 2986-3008.
4. Andersen, O.M. and N.R. Markham, *Flavonoids Chemistry Biochemistry and Applications*. 2006.
5. Hurst, W.J., *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. 2002(CRC PRESS).
6. Tsuda, T., et al., *Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice*. Journal of Nutrition, 2003. **133**(7): p. 2125-2130.
7. Hsiao, Y.C., et al., *The tumor-growth inhibitory activity of flavanone and 2'-OH flavanone in vitro and in vivo through induction of cell cycle arrest and suppression of cyclins and CDKs*. Journal of Biomedical Science, 2007. **14**(1): p. 107-119.
8. Vanamala, J., et al., *Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit*. Carcinogenesis, 2006. **27**(6): p. 1257-1265.
9. Zhang, G., et al., *A novel semisynthesized small molecule icaritin reduces incidence of steroid-associated osteonecrosis with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition in a dose-dependent manner*. Bone, 2009. **44**(2): p. 345-356.
10. Carusio, N., et al., *Oral administration of polyphenolic compounds from Cognac decreases ADP-induced platelet aggregation and reduces chronotropic effect of isoprenaline in rats*. Physiological Research, 2008. **57**(4): p. 517-524.
11. De la Lastra, C.A. and I. Villegas, *Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications*. Molecular Nutrition & Food Research, 2005. **49**(5): p. 405-430.
12. Balasundram, N., et al., *Antioxidant properties of palm fruit extracts*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2005. **14**(4): p. 319-324.
13. Vermerris, W. and R. Nicholson, *Phenolic Compound Biochemistry*, ed. Spirger. 2006: Springer.
14. Bravo, L., *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews, 1998. **56**(11): p. 317-333.
15. Treutter, D., *Significance of flavonoids in plant resistance: a review*. Environmental Chemistry Letters, 2006. **4**(3): p. 147-157.
16. Galati, G. and P.J. O'Brien, *Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties*. Free Radical Biology and Medicine, 2004. **37**(3): p. 287-303.
17. Meyer, A.S., et al., *Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (Vitis vinifera)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(5): p. 1638-1643.
18. Kahkonen, M.P., et al., *Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(10): p. 3954-3962.
19. Cushnie, T.P.T. and A.J. Lamb, *Antimicrobial activity of flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005. **26**(5): p. 343-356.
20. Orhan, D.D., et al., *Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids*. Microbiological Research, 2010. **165**(6): p. 496-504.
21. O. Ragažinskienė, S.R., V. Sasnauskas *Vaistinių augalų enciklopedija*. 2005: LUTUTĖ.

22. Kripaitis, P., *Spanguoles ziedai*, <http://www.zolininkas.lt/uzrasai/paskui-zydincias-spanguoles/>, Editor 2013-05-07: www.zolininkas.lt.
23. Ziaugaite, *Spanguoles*, <http://ziaugaite.blogspot.com/2014/08/spanguoles.html>, Editor 2014-08-09: <http://ziaugaite.blogspot.com/>.
24. Chen, H., Y.G. Zuo, and Y.W. Deng, *Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2001. **913**(1-2): p. 387-395.
25. Vinson, J.A., et al., *Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(11): p. 5315-5321.
26. Zuo, Y.G., C.X. Wang, and J. Zhan, *Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(13): p. 3789-3794.
27. Cote, J., et al., *Bioactive Compounds in Cranberries and their Biological Properties*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2010. **50**(7): p. 666-679.
28. Neto, C.C., *Cranberry and its phytochemicals: A review of in vitro anticancer studies*. Journal of Nutrition, 2007. **137**(1): p. 186s-193s.
29. Neto, C.C., *Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases*. Molecular Nutrition & Food Research, 2007. **51**(6): p. 652-664.
30. Foo, L.Y., et al., *The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated Escherichia coli in vitro*. Phytochemistry, 2000. **54**(2): p. 173-181.
31. Ruel, G. and C. Couillard, *Evidences of the cardioprotective potential of fruits: The case of cranberries*. Molecular Nutrition & Food Research, 2007. **51**(6): p. 692-701.
32. White, B.L., L.R. Howard, and R.L. Prior, *Proximate and Polyphenolic Characterization of Cranberry Pomace*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(7): p. 4030-4036.
33. John Shi, G.M., Marc Le Maguer, *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. FUNCTIONAL FOODS AND NUTRACEUTICALS SERIES, ed. G. Mazza. Vol. Volume 2. 2002: CRC PRESS. 436.
34. Sun, J., et al., *Antioxidant and anti proliferative activities of common fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(25): p. 7449-7454.
35. Porter, M.L., et al., *Cranberry proanthocyanidins associate with low-density lipoprotein and inhibit in vitro Cu²⁺-induced oxidation*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001. **81**(14): p. 1306-1313.
36. Youdim, K.A., et al., *Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**(5): p. 282-288.
37. Neto, C.C., et al., *MALDI-TOF MS characterization of proanthocyanidins from cranberry fruit (Vaccinium macrocarpon) that inhibit tumor cell growth and matrix metalloproteinase expression in vitro*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. **86**(1): p. 18-25.
38. Caillet, S., et al., *Cancer chemopreventive effect of fractions from cranberry products*. Food Research International, 2012. **45**(1): p. 320-330.
39. Yan, X.J., et al., *Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (Vaccinium macrocarpon)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(21): p. 5844-5849.
40. Cote, J., et al., *Effect of juice processing on cranberry antibacterial properties*. Food Research International, 2011. **44**(9): p. 2922-2929.

41. Labarbe, B., et al., *Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(7): p. 2719-2723.
42. Skrede, G., R.E. Wrolstad, and R.W. Durst, *Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (Vaccinium corymbosum L.)*. Journal of Food Science, 2000. **65**(2): p. 357-364.
43. Lu, Y.R. and L.Y. Foo, *The polyphenol constituents of grape pomace*. Food Chemistry, 1999. **65**(1): p. 1-8.
44. Vvedenskaya, I.O., et al., *Characterization of flavonols in cranberry (Vaccinium macrocarpon) powder*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(2): p. 188-195.
45. Karadeniz, F., R.W. Durst, and R.E. Wrolstad, *Polyphenolic composition of raisins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(11): p. 5343-5350.
46. Heinonen, I.M., A.S. Meyer, and E.N. Frankel, *Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(10): p. 4107-4112.
47. Vvedenskaya, I.O. and N. Vorsa, *Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, Vaccinium macrocarpon Ait.* Plant Science, 2004. **167**(5): p. 1043-1054.
48. Singh, A.P., et al., *Isolation of specific cranberry flavonoids for biological activity assessment*. Food Chemistry, 2009. **116**(4): p. 963-968.
49. Tarascou, I., et al., *Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESI-MS*. Food Chemistry, 2011. **128**(3): p. 802-810.
50. Wang, C.J. and Y.G. Zuo, *Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography-mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products*. Food Chemistry, 2011. **128**(2): p. 562-568.
51. Chatterjee, S., et al., *Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (Piper nigrum L.) and fresh nutmeg mace (Myristica ftagrans)*. Food Chemistry, 2007. **101**(2): p. 515-523.
52. Shadkani, F., S. Estevez, and R. Helleur, *Analysis of catechins and condensed tannins by thermally assisted hydrolysis/methylation-GC/MS and by a novel two step methylation*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2009. **85**(1-2): p. 54-65.
53. Zadernowski, R., S. Czaplicki, and M. Nacz, *Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (Garcinia mangostana)*. Food Chemistry, 2009. **112**(3): p. 685-689.
54. Berli, F., et al., *Phenolic composition in grape(Vitis vinifera L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(9): p. 2892-2898.
55. Capote, F.P., J.M.L. Rodriguez, and M.D.L. de Castro, *Determination of phenolic compounds in grape skin by capillary electrophoresis with simultaneous dual fluorescence and diode array absorption detection after dynamic superheated liquid leaching*. Journal of Chromatography A, 2007. **1139**(2): p. 301-307.
56. Orlandini, S., et al., *Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical*. Talanta, 2008. **74**(4): p. 570-577.
57. Manthey, J.A., *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of the polymethoxylated flavone content of orange oil residues*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(9): p. 3215-3218.
58. Rodriguez-Meizoso, I., et al., *A systematic study on the interactions between carnosic acid and ethylpyrrolidine methacrylate-methyl methacrylate copolymer in supercritical media*. Journal of Supercritical Fluids, 2007. **41**(3): p. 452-460.

59. Zou, T., et al., *Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles*. *Food Hydrocolloids*, 2012. **27**(2): p. 293-300.
60. Zhang, Y.Y., et al., *Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008. **107**(2): p. 891-897.
61. Zhang, K. and Y.G. Zuo, *GC-MS determination of flavonoids and phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(2): p. 222-227.
62. Barker, S.A., *Matrix solid-phase dispersion*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **885**(1-2): p. 115-127.
63. Barker, S.A., *Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **880**(1-2): p. 63-68.
64. Barker, S.A., *Matrix solid phase dispersion (MSPD)*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007. **70**(2): p. 151-162.
65. Barker, S.A., A.R. Long, and C.R. Short, *Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion*. *Journal of Chromatography*, 1989. **28**(475): p. 353-61.
66. Minuti, L. and R. Pellegrino, *Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1185**(1): p. 23-30.
67. Dopico-Garcia, M.S., et al., *Solid-phase extraction versus matrix solid-phase dispersion: Application to white grapes*. *Talanta*, 2007. **74**(1): p. 20-31.
68. Visnevschi-Necrasov, T., et al., *Optimization of matrix solid-phase dispersion extraction method for the analysis of isoflavones in Trifolium pratense*. *Journal of Chromatography A*, 2009. **1216**(18): p. 3720-3724.
69. Yin, J.J., et al., *Matrix Solid-phase Dispersion Extraction for Chromatographic Analysis of Labdane Diterpenoids in Coleus forskohlii*. *Phytochemical Analysis*, 2013. **24**(2): p. 117-123.
70. Shi, X.L., et al., *Lignan Extraction from the Roots of Sinopodophyllum emodi Wall by Matrix Solid-Phase Dispersion*. *Chromatographia*, 2010. **72**(7-8): p. 713-717.
71. Garcia-Lopez, M., P. Canosa, and I. Rodriguez, *Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **391**(3): p. 963-974.
72. Valenzuela, A.I., et al., *Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **839**(1-2): p. 101-107.
73. Sandeep, K., M. Mohanvarma, and P. Veerabhadhraswamy, *Oral lipid-based drug delivery systems – an overview*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2013. **3**(6): p. 361-372.
74. Larsson, K., et al., *Lipids: Structure, Physical Properties and Functionality*. Vol. Vol. 19. 2006: Oily Press. 288.
75. Mozafari, M.R., et al., *Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006. **86**(13): p. 2038-2045.
76. Malmsten, M., *Soft drug delivery systems*. *Soft Matter*, 2006. **2**(9): p. 760-769.
77. Schmidt, C., *Nanotherapeutics Chapter 1. Nanocarriers in Drug Delivery - Design, Manufacture and Physicochemical* 2008: Pan Stanford Publishing.
78. Zhao, Y.Z., et al., *Epirubicin loaded with propylene glycol liposomes significantly overcomes multidrug resistance in breast cancer*. *Cancer Letters*, 2013. **330**(1): p. 74-83.
79. Amar-Yuli, I., et al., *Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesophases*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009. **14**(1): p. 21-32.

80. Zeng, N., et al., *Lipid-based liquid crystalline nanoparticles as oral drug delivery vehicles for poorly water-soluble drugs: cellular interaction and in vivo absorption*. International Journal of Nanomedicine, 2012. **7**: p. 3703-3718.
81. Seddon, J.M., *Lyotropic phase behaviour of biological amphiphiles*. Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics, 1996. **100**(3): p. 380-393.
82. Tiberg, F. and M. Johnsson, *Drug delivery applications of non-lamellar liquid crystalline phases and nanoparticles*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2011. **21**(1): p. 101-109.
83. Matulis, D., *Baltymų fizikinė chemija* 2008. 149.
84. Guinier, A., *X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals, and amorphous bodies*. 1994, Inc.: New York: Dover Publication. 375.
85. Warren, B.E., *X-ray diffraction*. 1990, Inc.: New York: Dover Publications.
86. Stout GH, J.L., *X-Ray structure determination. A practical guide*. 1989, New York: John Wiley and Sons.
87. Bonina, F., et al., *Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **145**(1-2): p. 87-94.
88. Santos, A.C., et al., *Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria*. Free Radical Biology and Medicine, 1998. **24**(9): p. 1455-1461.
89. Kaldas, M.I., et al., *Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(10): p. 4194-4197.
90. Nuengchamng, N., A. Hermans-Lokkerbol, and K. Ingkaninan, *Separation and Detection of the Antioxidant Flavonoids, Rutin and Quercetin, Using HPLC Coupled on-line With Colorimetric Detection of Antioxidant Activity*. Naresuan University Journal, 2004. **12**(2): p. 25-37.
91. Formica, J.V. and W. Regelson, *Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids*. Food and Chemical Toxicology, 1995. **33**(12): p. 1061-1080.
92. Zheng, Y., et al., *Physicochemical and structural characterization of quercetin-beta-cyclodextrin complexes*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **94**(5): p. 1079-1089.
93. Hansen, R.K., et al., *Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **239**(3): p. 851-856.
94. Elia, G., et al., *Modulation of prostaglandin A(1) induced thermotolerance by quercetin in human leukemic cells: Role of heat shock protein 70*. Cancer Research, 1996. **56**(1): p. 210-217.
95. Koishi, M., et al., *Quercetin, an Inhibitor of Heat-Shock Protein-Synthesis, Inhibits the Acquisition of Thermotolerance in a Human Colon-Carcinoma Cell-Line*. Japanese Journal of Cancer Research, 1992. **83**(11): p. 1216-1222.
96. Pralhad, T. and K. Rajendrakumar, *Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. **34**(2): p. 333-339.
97. Lee, D.H., et al., *Preparation and characterization of quercetin-loaded polymethyl methacrylate microcapsules using a polyol-in-oil-in-polyol emulsion solvent evaporation method*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2007. **59**(12): p. 1611-1620.
98. Casagrande, R., et al., *In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **328**(2): p. 183-190.

99. Vicentini, F.T.M.C., et al., *Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **69**(3): p. 948-957.
100. Jain, S., et al., *Novel self-emulsifying formulation of quercetin for improved in vivo antioxidant potential: Implications for drug-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **65**: p. 117-130.
101. Tran, T.H., et al., *Quercetin-Containing Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Improving Oral Bioavailability*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. **103**(3): p. 840-852.
102. Gao, L., et al., *Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **404**(1-2): p. 231-237.
103. Li, H.L., et al., *Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2009. **133**(3): p. 238-244.
104. Tan, Q., et al., *Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery*. International Journal of Nanomedicine, 2011. **6**: p. 1621-1630.
105. Guo Chen-yua, et al., *Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **430**: p. 292– 298.
106. Bose, S. and B. Michniak-Kohn, *Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **48**(3): p. 442-452.
107. Singh, D., et al., *Rutin-Phospholipid Complex: An Innovative Technique in Novel Drug Delivery System- NDDS*. Current Drug Delivery, 2012. **9**(3): p. 305-314.
108. Alexopoulou, E., et al., *Preparation and characterization of lyophilized liposomes with incorporated quercetin*. Journal of Liposome Research, 2006. **16**(1): p. 17-25.
109. Priprem, A., et al., *Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats*. Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 2008. **4**(1): p. 70-78.
110. Date, A.A., et al., *Lecithin-Based Novel Cationic Nanocarriers (Leciplex) II: Improving Therapeutic Efficacy of Quercetin on Oral Administration*. Molecular Pharmaceutics, 2011. **8**(3): p. 716-726.
111. Landi-Librandi, A.P., et al., *Study of quercetin-loaded liposomes as potential drug carriers: in vitro evaluation of human complement activation*. Journal of Liposome Research, 2012. **22**(2): p. 89-99.
112. Cadena, P.G., et al., *Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2013. **1828**(2): p. 309-316.
113. Caddeo, C., et al., *Topical Anti-Inflammatory Potential of Quercetin in Lipid-Based Nanosystems: In Vivo and In Vitro Evaluation*. Pharmaceutical Research, 2014. **31**(4): p. 959-968.
114. Mu, H.L., R. Holm, and A. Mullertz, *Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **453**(1): p. 215-224.
115. Larsson, K. and F. Tiberg, *Periodic minimal surface structures in bicontinuous lipid-water phases and nanoparticles*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2005. **9**(6): p. 365-369.
116. Sagalowicz, L. and M.E. Leser, *Delivery systems for liquid food products*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2010. **15**(1-2): p. 61-72.
117. Angelova, A., et al., *Self-Assembled Multicompartment Liquid Crystalline Lipid Carriers for Protein, Peptide, and Nucleic Acid Drug Delivery*. Accounts of Chemical Research, 2011. **44**(2): p. 147-156.

118. Rizwan, S.B., et al., *Bicontinuous cubic liquid crystals as sustained delivery systems for peptides and proteins*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010. **7**(10): p. 1133-1144.
119. Tiberg, F., et al., *Phase Behavior, Functions, and Medical Applications of Soy Phosphatidylcholine and Diglyceride Lipid Compositions*. *Chemistry Letters*, 2012. **41**(10): p. 1090-1092.
120. Barauskas, J., et al., *Bioadhesive Lipid Compositions: Self-Assembly Structures, Functionality, and Medical Applications*. *Molecular Pharmaceutics*, 2014. **11**(3): p. 895-903.
121. Wadsater, M., et al., *Formation of Highly Structured Cubic Micellar Lipid Nanoparticles of Soy Phosphatidylcholine and Glycerol Dioleate and Their Degradation by Triacylglycerol Lipase*. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2014. **6**(10): p. 7063-7069.
122. Wadsater, M., et al., *Nonlamellar lipid liquid crystalline model surfaces for biofunctional studies*. *Soft Matter*, 2013. **9**(37): p. 8815-8819.
123. Murgia, S., et al., *Drug-Loaded Fluorescent Cubosomes: Versatile Nanoparticles for Potential Theranostic Applications*. *Langmuir*, 2013. **29**(22): p. 6673-6679.
124. Chang, D.P., et al., *Adsorption of Lipid Liquid Crystalline Nanoparticles: Effects of Particle Composition, Internal Structure, and Phase Behavior*. *Langmuir*, 2012. **28**(29): p. 10688-10696.
125. Chang, D.P., et al., *Adsorption of Lipid Liquid Crystalline Nanoparticles on Cationic, Hydrophilic, and Hydrophobic Surfaces*. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2012. **4**(5): p. 2643-2651.
126. Morales, A., et al., *Quantitation of Hydroperoxy-, Keto- and Hydroxy-Dienes During Oxidation of FAMES from High-Linoleic and High-Oleic Sunflower Oils*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2010. **87**(11): p. 1271-1279.