



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Gedas Šaulinskas

**GELTONŽIEDŽIO BARKŪNO (*MELILOTUS OFFICINALIS*) EKSTRAKTŲ CHEMINĖS
SUDĖTIES, ANTIOKSIDACINIŲ IR ANTIMOKROBINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAI**

Baigiamasis Magistro projektas

Vadovas

Doc. dr. Audrius Pukalskas

KAUNAS, 2016

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**GELTONŽIEDŽIO BARKŪNO (*MELILOTUS OFFICINALIS*) EKSTRAKTŲ CHEMINĖS
SUDĖTIES, ANTIOKSIDACINIŲ IR ANTIMOKROBINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAI**

Baigiamasis Magistro projektas
Maisto mokslas ir sauga (621E40001)

Vadovas

Doc. dr. Audrius Pukalskas

Recenzentas

Lekt. dr. Aušra Šipailienė

Projektą atliko

Gedas Šaulinskas

KAUNAS, 2016



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos

(Fakultetas)

Gedas Šaulinskas

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga (621E40001)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„GELTONŽIEDŽIO BARKŪNO (*MELILOTUS OFFICINALIS*) EKSTRAKTŲ CHEMINĖS
SUDĖTIES, ANTIOKSIDACINIŲ IR ANTIMOKROBINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAI“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 16 m. birželio 13 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Gedo Šaulinsko**, baigiamasis projektas tema „GELTONŽIEDŽIO BARKŪNO (*MELILOTUS OFFICINALIS*) EKSTRAKTŲ CHEMINĖS SUDĖTIES, ANTIOKSIDACINIŲ IR ANTIMOKROBINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAI“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1. Augalo charakteristika ir tyrimų apžvalga.....	12
1.2. Geltonžiedžio barkūno (<i>Melilotus officinalis</i>) augale randamų junginių apžvalga.....	16
1.2.1. Kumarinas.....	16
1.2.2. Hiperozidas.....	17
1.2.3. Rutinas	17
1.2.4. Kamferolis	17
1.2.5. Arbutinas	18
1.2.6. Hesperidinas	18
1.2.7. Herniarinas.....	18
1.2.8. Umbeliferonas	19
1.2.9. Viteksinas	19
1.2.10. Ferulio rūgštis.....	19
1.2.11. Chlorogeno rūgštis.....	19
1.2.12. Kavos rūgštis	20
1.2.13. Cinamono rūgštis.....	20
1.2.14. Cis-3-heksen-1-olis.....	20
1.2.15. α - Linoleno rūgštis.....	21
1.2.16. Linolo rūgštis.....	21
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	24
2.1. Žaliavos ir reagentai	24
2.2. Augalo paruošimas bei ekstraktų gamyba.....	24
2.3 Tyrimų metodai	28
2.3.1. Bendrojo fenolinių junginių kiekio (BFJK) nustatymas Folin-Ciocalteu metodu	28
2.3.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH [•]) radikalų sujungimas	
2.3.3. 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) (ABTS ^{•+}) radikalų-katijonų sujungimas	29
2.3.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP metodu.....	30
2.3.5 Peroksidų skaičiaus nustatymas.....	31
2.3.6. Antrinių riebalų oksidacijos produktų nustatymas Tiobarbitūrinės rūgšties (TBR) metodu. 31	

2.3.7. Antimikrobinio aktyvumo kiekybinis nustatymas mikroorganizmų sėjimo į terpę metodu .	32
2.3.8. Ekstraktų ir trigliceridų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESCh-Q-TOF)	33
2.3.9. Riebalų rūgščių (RR) sudėties nustatymas dujų chromatografijos (DC-LJD) metodu	34
2.3.10. Lipidų oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipreso metodu	35
2.3.11 Lipidų oksidacinio stabilumo nustatymas Rancimato metodu	35
2.4. Rezultatų statistinis apdorojimas	36
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	37
3.1. Augalo lapų ir stiebų ekstrakcijos bei jų metu gautos išėigos	37
3.2. Augalo sėklų ekstrakcijos bei jų metu gautos išėigos	38
3.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas BFJK (Folin-Ciocalteu), DPPH [•] , ABTS ^{•+} ir FRAP metodais	40
3.4. Pirminių ir antrinių riebalų oksidacijos produktų nustatymas kiaulienos riebaluose	43
3.5. Antimikrobinio aktyvumo nustatymas kiaulienos riebaluose	48
3.6. Oksidacinio stabilumo kiaulienos riebaluose nustatymas	50
3.7. Kokybinė ekstraktų analizė (UESCh-Q-TOF)	51
3.8. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas geltonžiedžio barkūno sėklose	53
3.9. Trigliceridų sudėties nustatymas geltonžiedžio barkūno sėklose	54
3.10. Oksidacinio stabilumo ir peroksidų skaičiaus nustatymas aliejiniuose ekstraktuose	55
4. IŠVADOS	57
5. BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS	59
PRIEDAI	68

Šaulinskas, Gedas. Geltonžiedžio barkūno (*Melilotus Officinalis*) ekstraktų cheminės sudėties, antioksidacinių ir antimikrobinių savybių tyrimai. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Audrius Pukalskas; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *Melilotus officinalis*, antioksidantas, antimikrobinis

Kaunas 2016. 06. 13

SANTRAUKA

Baigiamajame magistro projekte atliekta išsami augalo literatūros apžvalga, apžvelgiant mokslines publikacijas, kuriose atlikti tyrimai panaudojant geltonžiedį barkūną.

Darbe atlikta keletas skirtingų ekstraktų: Soksleto ekstrakcija, pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais, ekstrakcija karštu vandeniu bei vis dažniau pradedama taikyti superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu. Didžiausia išeiga buvo gauta iš augalo lapų bei stiebų, atliekant pagreitintą ekstrakciją organiniais tirpikliais, naudojant metanolį, o atliekant augalo sėklų ekstraktus, didžiausia išeiga buvo gauta Soksleto ekstrakcijos metu, naudojant heksaną. Nustatyti svarbiausi junginiai augalo lapų, stiebų bei sėklų ekstraktuose: kumarinas, rutinas, anisatinas, citrinos rūgštis, furano rūgštis, nepakeičiamos riebalų rūgštys – α – linoleno rūgštis (omega – 3), linolo rūgštis (omega – 6), stearino rūgštis, palmitino rūgštis ir oleino rūgštis. Taip pat atlikta trigliceridų analizė, naudojant augalo sėklų ekstraktus bei nustatyti 8 trigliceridai: LnLnLn(OH), L(OH)LnLn, L(OH)LLn, LnLnLn, LLnLn, LLLn, OlnL, PLL. Atliekant antioksidacinio aktyvumo tyrimus (Bendrą fenolinių junginių kiekio nustatymą, DPPH[•], ABTS^{•+} ir FRAP) geriausias aktyvumas nustatytas vandeniniame, metanoliniame, pagreitintos ekstrakcijos organiniais tirpikliais bei etanoliniame, Soksleto ekstrakcijos metu gautuose ekstraktuose. Antimikrobiniai, pirminių bei antrinių riebalų oksidacijos produktų tyrimai parodė, kad etanolinis augalo stiebų bei lapų ekstraktas pasižymi antimikrobiniu aktyvumu bei stabdo pirminių ir antrinių riebalų oksidacijos produktų susidarymą.

Šaulinskas, Gedas. Investigation of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of extracts of common melilot (*Melilotus Officinalis*). *Master's thesis in Food Science and Safety / supervisor assoc. doc. dr. Audrius Pukalskas. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: *Melilotus officinalis*, antioxidant, antimicrobial.

Kaunas 2016. 06. 13

SUMMARY

The finishing *Master's thesis* contains of the investigation of the plant characteristic and thorough analysis of the literature, reviewing the scientific data bases, as well as scientific articles, which describe studies using melilot (lot. *Melilotus officinalis*).

Extracts were made in few different ways: Soxhlet extraction, Accelerated solvent extraction, Hot water extraction and Supercritical Fluid Extraction. The highest yield was obtained for Methanol Accelerated solvent extract (plant leaves and stems) and Soxhlet extract (plant seeds). The most important compounds found in the investigated plant were: Coumarin, Rutin, Anisatin, Citric acid, Furoic acid and other compounds in plant leaves and stems as well as linolenic acid (omega – 3), linoleic (omega – 6) acid, stearic acid, palmitic acid and oleic acid in plant seeds. Also triglycerides analysis showed LnLnLn(OH), L(OH)LnLn, L(OH)LLn, LnLnLn, LLnLn, LLLn, OlnL, PLL triglycerides in plant seeds. Using antioxidant activity methods: TPP (Folin-Ciocalteu), DPPH[·], ABTS^{·+} and FRAP the best activity showed Water extract, Methanol Accelerated solvent extract and Ethanol Soxhlet extract. Antimicrobial, Peroxides Value and Secondary oxidation products tests showed, that Ethanol Soxhlet extract have good antimicrobial activity and inhibit formation of primary and secondary fat oxidation products.

SANTRUMPOS

- *SK – CO₂** – aliejinis augalo sėklų ekstraktas
- AC (ASE)** – acetoninis augalo lapų ir stiebų ekstraktas, gautas pagreitinotos ekstrakcijos organinius tirpikliais metu
- AC (SOK)** – acetoninis augalo lapų ir stiebų ekstraktas, gautas soksleto ekstrakcijos metu
- AF** – apsaugos faktorius
- ASE** – pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais
- BFJK** – bendras fenolinis junginių kiekis
- BHT** – sintetinis antioksidantas (2,6-Di-tert-butyl-4-metilfenolis)
- DC – LJD** – dujų chromatografija su liepsnos jonizacijos detektoriumi
- EtOH (SOK)** – etanolinis augalo lapų ir stiebų ekstraktas, gautas soksleto ekstrakcijos metu
- ESI** – jonizacijos metodas, paremtas elektriniu krūviu sukurtų jonų
- GRE** – galo rūgšties ekvivalentai
- Hex – S** – heksaninis ekstraktas, gautas soksleto ekstrakcijos metu iš augalo sėklų
- Hex (SOK)** – heksaninis augalo lapų ir stiebų ekstraktas, gautas soksleto ekstrakcijos metu
- HPLC** – didelio efektyvumo skysčių chromatografija
- IP** – indukcinis periodas
- LOG** – skaičiaus logaritmas (atvirkštinė pagrindo kėlimo laipsniu funkcija)
- MDA** – malondialdehididas
- MeOH (ASE)** – metanolis augalo lapų ir stiebų ekstraktas, gautas pagreitinotos ekstrakcijos organinius tirpikliais metu
- MeOH/H₂O (ASE)** – metanolio ir vandens mišinio (80/20 %) augalo lapų ir stiebų ekstraktas, gautas pagreitinotos ekstrakcijos organinius tirpikliais metu
- MRS** – piebarūgščių bakterijų agaras
- PCA** – aerobinių mezofilinių bakterijų agaras
- PSY** – aerobinių psichrofilinių bakterijų agaras
- RR** – riebalų rūgštys
- Sabouraud** – mielių ir pelėsių agaras
- SK – CO₂ (EtOH 5%)** – aliejinis augalo sėklų ekstraktas su 5 % etanolio priedu
- SK – CO₂ (EtOH 10%)** – aliejinis augalo sėklų ekstraktas su 10 % etanolio priedu
- SK – CO₂ (K)** – aliejinis kanapių sėklų ekstraktas

SOK – soksleto ekstrakcija

TBR – tiobarbitūrinė rūgštis

TCA – trichloracto rūgštis

UESCH – ultra efektyvioji skysčių chromatografija

VE – vandeninė ekstrakcija

VRBG – enterobakterijų agaras

ĮVADAS

Įvairių augalų rinkimas, jų ruošimas ir naudojimas įvairiems negalavimams gydyti, žinomas jau nuo senų laikų. Laikui bėgant, tobulėjant mokslui, buvo sukurta daug įvairausios technikos sintetinių junginių gamybai ir naturalūs produktai buvo nustumti į šalį.

Šiai dienai, žmogus, matydamas aplink tik sintetinius produktus, nori natūralumo. Daugelis mieliau renkasi gydytis vaistais ar stiprinti savo organizmą maisto papildais, pagamintais iš natūralių šaltinių. Tam mokslas kryptingai dirba. Tyrimai, siekiant iš augalų išskirti natūralius, naudingus junginius ir juos panaudoti maisto produktų gamyboje bei medicinoje, atliekami jau ilgą laiką įvairiose pasaulio šalyse. Siekiama surasti vertingus augalus, kurie pasižymėtų antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis ir kitomis, organizmą apsaugančiomis ir jo veiklą gerinančiomis savybėmis.

Oksidaciniai procesai vyksta visur: maisto produktuose, mūsų organizme, o visų šių procesų esmė yra laisvieji radikalai, kurie nuolat atakuoja organizmo ląsteles, norėdami gauti trūkstamus elektronus iš svarbių mūsų organizmo komponentų, todėl sutrinka normali mūsų organizmo veikla. Antioksidantai tokiems procesams užkerta kelią, atiduodami savo laisvuosius elektronus ir neutralizuodami laisvuosius radikalus. Dabartiniu laiku siekiama, kad kuo daugiau antioksidantų, būtų ne sintetiniai, o iš natūralių šaltinių, pvz. augalų ir būtų kuo labiau priimtinesni mūsų organizmui [1].

Per pastarąjį dešimtmetį, natūralių antimikrobinių medžiagų paklausa taip pat didėja, dėl didėjančio mikrobu atsparumo vienam ar net keliems antibiotikams [2]. Dalis augalų yra natūralūs antimikrobinių medžiagų šaltiniai. Remiantis moksliniais duomenimis, augalų antimikrobinis aktyvumas yra susijęs su gynybiniu mechanizmu prieš mikroorganizmus [3]. Dažnai gydant nedidelias mikroorganizmų sukeltas ligas yra naudojami ganėtinai stiprūs antibiotikai, kurie kartu turi ir neigiamą poveikį mūsų organizmui, atsižvelgiant į tai, natūralios, antimikrobiniu mechanizmu pasižyminčios medžiagos ateityje gali tapti vis didesne alternatyva sintetiniams antibiotikams.

Pagrindinės šių dienų mokslo aktualijos, kaip surasti kuo tinkamesnius, naudingomis savybėmis pasižymičius augalus, kuo efektyviau atlikti augalų ekstrakcijas, nustatyti jų sudėtį bei aktyvumą. Atsižvelgiant į tai, **šio darbo tikslas** buvo išanalizuoti geltonžiedžio barkūno (lot. *Melilotus officinalis*) ekstraktų cheminę sudėtį ir ištirti šio augalo antioksidacinį bei antimikrobinį aktyvumą.

Tiksliui pasiekti buvo išsikelti tokie **uždaviniai**:

1. Atlikti skirtingas geltonžiedžio barkūno lapų, stiebų bei sėklų ekstrakcijas, naudojant skirtingus tirpiklius bei nustatyti efektyviausią iš jų;
2. Įvertinti geltonžiedžio barkūno lapų ir stiebų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą *in vitro*;

3. Nustatyti geltonžiedžio barkūno augalo lapų, stiebų bei sėklų ekstraktų cheminę sudėtį;
4. Atlikti pasirinktų geltonžiedžio barkūno ekstraktų antioksidacinio aktyvumo bei stabilumo tyrimus riebaluose;
5. Atlikti pasirinktų geltonžiedžio barkūno ekstraktų antimikrobinius tyrimus riebaluose;
6. Įvertinti geltonžiedžio barkūno aliejinių ekstraktų oksidacinį stabilumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Augalo charakteristika ir tyrimų apžvalga

Geltonžiedis barkūnas (lot. *Melilotus officinalis*) – pupinių (lot. *Fabaceae*) šeimos, barkūnų (*Melilotus*) genties augalų rūšis. Tai nektaringas augalas, kuris žydi visą vasarą iki rugsėjo pabaigos. Augalas yra dvimetis, pirmais metais užauga iki 80cm., antrais iki 250 cm aukščio. Paplitęs visuose Lietuvos rajonuose. Geltonžiedis barkūnas kur kas geriau auga derlingesnėje neutralioje ir sunkesnėje dirvoje, todėl smėlinio tipo dirvose sutinkamas retai, o optimali vieta šiam augalui augti – kalkėti dirvožemiai, nemėgsta šlapių dirvų, pakenčia sausras.



1.1 pav. Geltonžiedis barkūnas

Dygstant augalo sėkloms ir vegetacijos pradžioje reikia daug drėgmės. Augalą rekomenduojama sėti vėlai rudenį arba ankstyvą pavasarį, 70 cm tarpueiliais, įterpiančiam 1 – 2 cm gyliu, palankiomis sąlygomis sudygsta per 6 – 20 dienų, pirmais metais žydi negausiai. Žiedai išskiria daug nektaro, lankomi bičių ir kitų vabzdžių. Vaisius išnešioja vėjas. Gyvuliai ėda tik jauną žolę. Kartais sėjamas kaip sideralinė kultūra. Nuo senų laikų žinoma vaistažolė. Džiovinata žolė atbaido kandis, todėl jos galima dėti tarp drabužių. Tinka muilui, įvairiems kosmetikos gaminiams, taip pat tabakui aromatizuoti.

Medicinoje yra naudojami augalo žiedai ir lapai. Augalas negali būti varojamas nenormuojant, nes savo sudėtyje turi medžiagų (kumarinų) iš kurių susidaro nuodingų medžiagų, tokių kaip dikumarolas (angl. dicoumorol) [4]. Dikumarolas mažina kraujo krešėjimą, todėl tinka gydyti trombozę. Geltonžiedis barkūnas taip pat vartojamas lytinių organų, prostatos, šlapimo sistemos organų onkologinėms ligoms gydyti. Išoriškai vartojamas gydant sumušimus, žaizdas. Į vidų barkūno preparatai vartojami, kai yra didesnis organizmo jautrumas, kamuoja nemiga, sergant podagra, reumatu. Iš lapų ir žiedų yra gaminami homeopatiniai vaistai galvos skausmui malšinti.

Didelis barkūno kiekis gali sukelti neigiamą poveikį, kuris pasireiškia tokiais simptomais, kaip vėmimas, viduriavimas, neįprastai žemas kraujo spaudimas [5].

Melilotus officinalis Prancūzijoje yra naudojamas kraujagyslėms apsaugoti, taip pat nestipraus poveikio raminamiesiems gaminti. Ištirtame augale akcentuojami kumarinai, flavonoidai ir fenolinės rūgštys [6].

Graikijos mokslininkai nustatė, kad dėl sudėtyje esančių kumarinų geltonžiedis barkūnas turi išorinių gydomųjų savybių, jis lengvina odos senėjimą, gydo spuogus, o svarbiausia turi teigiamą poveikį gydant diabetines pėdų opas, siekiant išvengti amputacijos [7].

Rumunijoje buvo atlikti tyrimai su triušiais, kuriems buvo sukeltas ūmus uždegimas. Daliai jų buvo sušvirksčiama *Melilotus officinalis* ekstrakto, kuriame buvo 0.25 % kumarino. Tyrimas buvo įvertintas matuojant citruliną kraujo serume, fagocitozę in vitro ir bendrą leukocitų skaičių. Barkūnas turėjo priešuždegiminį poveikį, sumažindamas cirkuliuojančių fagocitų aktyvumą ir citrulino gamybą [8].

Turkijoje atlikti tyrimai parodė, kad *Melilotus officinalis* lapų ekstraktas iš 15 tirtų rūšių augalų, pasižymi geriausiu fumigaciniu toksiškumu prieš straublinius kenkėjus (lot. *S. Zeamais*), kurie kenkia grūdams, ryžiams, kukurūzams [9].

Turkijoje užaugintas geltonžiedis barkūnas, kartu su 16 skirtingų augalų buvo panaudotas antibakteriniams ir priešvėžiniams tyrimams atlikti. Tam buvo ruošiami visų augalų metanoliniai, etanoliniai ir vandeniniai ekstraktai. Geriausiais slopinantis aktyvumas prieš *P. aeruginosa* pastebėtas vandeniniame *Melilotus officinalis* ekstrakto (22,5 mm), augalas pasižymėjo geresniu slopinančiu poveikiu už 7 kontrolinius antibiotikus (20 mm) [10].

Lahoros universitete, Pakistane, buvo atlikti tyrimai įvertinant alelopatinį potencialą (vienų augalų poveikis kitiems, kurį sukelia išskiriamos tam tikros medžiagos), tam buvo panaudoti kviečių ir žirnių vandeniniai ekstraktai. Rezultatai parodė, kad geltonžiedis barkūnas stimuliuoja kviečių (lot. *Triticum aestivum*) augimą, padidindamas procentinį daigelių dydį iki 150 % ir šaknelių iki 40 % [11].

Geltonžiedis barkūnas buvo užaugintas Kolumbijoje ir ištirta jo cheminė sudėtis, taikant dujų chromatografiją – masių spektrometriją (GC-MC). Buvo identifikuoti 35 junginiai iš kurių daugiausiai buvo kumarino (35.3 %) ir cis-3-heksen-1-olio (25.9 %) [12].

Rumunijoje buvo atlikti izoflavonų tyrimai, kuriuose buvo naudoti pupinių šeimos (lot. *Fabaceae*) augalai, kuriems priklauso ir geltonžiedis barkūnas. Kokybiniai ir kiekybiniai tyrimai buvo atlikti taikant skysčių chromatografiją – masių spektrometriją (LC-MS). Nors geltonžiedis barkūnas nepasižymėjo izoflavonų gausa, jame buvo nustatyta daidzeino (567.2 ng/ml) (palyginimui apyninėje liucernoje (lot. *Medicago lupulina*) – 246,7 ng/ml) [13].

Rumunijos Medicinos ir farmacijos universitete buvo atlikti geltonžiedžio barkūno makroskopiniai, mikroskopiniai ir cheminiai tyrimai. Sudėtyje buvo rasta flavonų (0.180 – 0.185 g % išreiškiant rutinu), polifenolinių karboksirūgščių (0.956 – 1.066 g % išreiškiant kofeino rūgštimi) taip pat kumarinų, triterpenų, taninų, sterolių, karotinoidų ir polisacharidų [14].

Italijoje, buvo atlikti tyrimai panaudojant geltonžiedį barkūną. Buvo norima nustatyti kokia ekstrakcija efektyviausia norint išgauti ekstraktą iš barkūno lapų ir stiebų. Tam buvo pasirinktos trys

ekstrakcijos: klasikinė soksleto ekstrakcija, ekstrakcija ultragarsu ir ekstrakcija taikant mikrobangas. Gauti ekstraktai buvo analizuojami taikant chromatografinę HPLC procedūrą. Atsižvelgiant į ekstraktų sudėtį, ekstrakcijos kainą ir laiką, geriausi rezultatai buvo gauti taikant mikrobangas (išeiga 50 %, naudojant vandeninį etanolio tirpalą (50/50 %), 2 kaitinimo ciklai po 5 min. esant 50 °C temperatūrai) [15].

Japonijoje atlikus spektroskopinius ir cheminius tyrimus buvo nustatyta, kad geltonžiedžio barkūno sudėtyje yra oleano gliukuronido, junginiui buvo suteiktas pavadinimas (barkūno saponinas) [16].

Gruzijoje buvo atliktas flavonoidų nustatymas, šioje šalyje uždaugintame *Melilotus officinalis* augale. Buvo nustatyta, kas sudėtyje yra kamferolio, robinino. Tyrimams buvo naudojami augalo lapai ir žiedai, kurie buvo ekstrahuojami etanoliu 80 °C temperatūroje. Alkoholis buvo distiliuotas, o vandeninis ekstraktas buvo gryninamas panaudojant CHCl₃. Atliekant vandeninio sluoksnio frakcionavimą ant poliamidinės plokštelės, buvo gauti 7g flavonoidų [17].

Vokietijoje buvo atlikti geltonžiedžio barkūno tyrimai, kurie buvo palyginti su tonka pupelėmis, kadangi jau anksčiau buvo nustatyta, kad tonka pupelės savo sudėtimi yra labai panašios į geltonžiedį barkūną. Rezultatai parodė, kad junginių kiekiai barkūne ir tonka pupelėse labai skiriasi ir kad kumarinas geltonžiedžiame barkūne nėra atskiras junginys. Kaip ir buvo tikėtasi, atlikus ekstrakcijas su etanoliu, acetonitrilu, dichlormetanu ir superkritiniu CO₂, junginiai ir jų kiekiai kiekvienoje ekstrakcijoje buvo skirtingi [18].

HPLC analizė šiam augalui buvo atlikta ir Rusijoje. Augalas buvo ekstrahuojamas 70 % vandeniniu etanolio tirpalu virinant panaudojus grįžtamąjį šaldytuvą vandens vonelėje. Po ekstrakcijos buvo atlikta HPLC analizė, kurios metu buvo identifikuota 18 procentaliai svarbiausių junginių, tarp kurių Ferulio rūgštis (25.05 %), Arbutinas (14.91 %), kavos rūgštis (12.57 %) ir kiti junginiai, tokie kaip: chlorogeno rūgštis (~7 %), rutinas (~6 %), hiperozidas (~6 %), kumarinas (~4 %), hesperidinas (~2 %), herniarinas (~2 %) [19].

Ukrainoje buvo atlikti tyrimai su žiurkėmis, kuriuose buvo panaudotas *Melilotus officinalis* ekstraktas. Suleidus ekstrakto žiurkėms, nustatyta, kad jų fizinė ištvermė padidėjo (atlikus plaukimo bandymą), kraujodara tapo geresnė, o imunitetas sustiprėjo [20].

JAV atlikti tyrimai, kurių tikslas buvo nustatyti, kokį poveikį turi žiema, pavasarį augantiems augalams, kaip keičiasi cukraus ir krakmolo koncentracija augaluose. Tam buvo atliekami sėjimai, atitinkamais laikais. Visos tirtos augalų rūšys, tarp kurių ir barkūnas, daugiausia krakmolo šaknyse sukaučia rudenį. Žiemą cukrų ir krakmolo koncentracijos būna mažiausios [21].

Prancūzijoje buvo atlikta išsami kumarinų analizė. Buvo nustatyta, kad kumarinai iš geltonžiedžio barkūno geriausiai išsiskiria naudojant polinius tirpiklius, tokius kaip vanduo, metanolis ar etanolis.

Taikant vandeninę ekstrakciją, kumarinų kiekiai buvo didžiausi. Atsižvelgiant į furanokumarino atvejį, geriausi rezultatai buvo gauti panaudojus verdantį metanolį [22].

Lenkijoje buvo atlikti išsamūs tyrimai, kuriuose buvo panaudoti geltonžiedis ir baltažiedis barkūnai. Abiejose rūšyse buvo nustatyti 66 fenoliniai junginiai. Chromatografiniai tyrimai parodė, kad barkūnų morfologinė sudėtis šiek tiek skiriasi. Daugelis bendrų junginių patvirtina glaudų ryšį tarp abiejų barkūnų [23].

Vokietijoje atlikti lakiųjų junginių tyrimai geltonžiedžiame barkūne. Buvo nustatyta, kad augale yra 84 lakieji junginiai [24].

Triterpenų ir steroidinių glikozidų tyrimai buvo atlikti Ukrainoje. Barkūne buvo nustatyti trys nauji oleano tipo glikozidai, kurie buvo pavadinti melitozidais, A1 (sojasapogenolio B 3-O-beta-D-ksilopiranozidas), B1 (sojasapogenolio B 3-O-[beta-D-galaktopiranozil-(1-2)-beta-D-ksilopiranozidas]) ir C1 (sojasapogenolio B 3-O-[alfa-L-ramanopiranozil-(1-2)-beta-D-galaktopiranozil(1-2)-beta-D-ksilopiranozidas]). Analizės buvo atliktos naudojant geltonžiedžio barkūno šaknis [25].

Kiti tyrimai, kiekybiniai ir kokybiniai, buvo atlikti Ukrainoje, analizuojant geltonžiedžio barkūno ekstrakto chloroformo frakciją, taikant GC/MS analizę. Iš visų nustatytų lipofilinių junginių, pagrindiniai buvo šie: 1,3-di-O-metil-mio inozitolis (75.503 %), acetalis (5.874), palmitino rūgštis (2.252), ir linolo rūgštis (1.958). Dihidroksumarinas ir kumarinas sudarė 2.066 %. Bendras riebalų rūgščių ir jų darinių kiekis - 5,854 %. Šie junginiai augale buvo nustatyti pirmą kartą: 1,3-di-O-metil-mio-inozitolis, acetalis, aldehydai, ketonai, angliavandeniai ir jų esteriai [26].

Irane atlikti sunkiųjų metalų kaupimosi tyrimai, miškingose vietose, kurios drėkinamos šulinio ir nuotekų vandenimis, užaugintame barkūne. Zn, Pb, Cr ir Ni buvo nustatomi dirvose ir miškingose vietose. Sunkiųjų metalų bendra koncentracija (mg/kg) molio dirvožemiuose, kurių pH 7,95 - 7,93 drėkinant nuotekomis buvo: Zn (187.3), Pb (78.4), Cr (82.83) ir Ni (46), 0 – 15 cm dirvožemio gylyje. Koncentracija miške buvo žymiai didesnė, lyginant su kontrolėmis dirvose. Zn, Pb ir Ni viršijo leistinas normas dirvožemyje, Pb, Cr ir Ni viršijo leistinas ribas augalų šaknyse [27].

Danijos Arhus universitete buvo atlikti riebalų rūgščių, α – tokoferolio, β – karoteno ir luteino nustatymas keletoje augalų rūšių, tarp kurių ir geltonžiedis barkūnas. Barkūne nustatyti tokie kiekiai šių junginių: α -tokoferolio (23 mg/kg DM⁻¹), β -karoteno (33 mg/kg), luteino (131 mg/kg). Iš riebalų rūgščių svarbiausios buvo šios riebalų rūgštys: linolo rūgštis (C18:2n6) – 17.88 (g/100g RR), linoleno rūgštis (C18:3n3) – 41.52 (g/100g), palmitino rūgštis (C16:0) – 23.24 (g/100g), oleino rūgštis (C18:1n-9) – 3,19 (g/100g) ir stearino rūgštis (C18:0) – 3.29 (g/100g) [28].

JAV buvo atlikti tyrimai panaudojant 40 medicininių augalų, prieš *Haemonchus contortus* parazitines kirmėles, kurios sukelia anemiją ir edemą avims bei ožkoms. *Melilotus officinalis* kartu su

dar 6 augalais, turėjo didžiausią poveikį stabdant šių parazitų vystimąsi bei dauginimąsi virškinamajame trakte [29].

Lenkijoje buvo atlikti mikro- ir makro- maistinių medžiagų tyrimai vaistažoliniuose augaluose, tarp kurių ir barkūnas. Nustatyta, kad geltonžiedis barkūnas turi poveikį gydant širdies ir kraujagyslių sutrikimus, širdies neurozę, kraujagyslių neurozę, bendrą išsekimą ir silpnumą [30].

Australijoje buvo atlikti kumarino tyrimai *Melilotus* rūšies augaluose. *Melilotus officinalis* augale kumarino koncentracija siekė ~ 0.332 %, tai buvo vidutinio didumo koncentracija lyginant su kitomis *Melilotus* rūšimis, mažiausiai kumarino turinčiose rušyse ji siekė tik 0.113 %, o daugiausiai kumarino turinčiose rušyse net 0.753 % [31].

Laisvųjų radikalų sujungimas ir fenolinių junginių kiekis geltonžiedžiame barkūne buvo nustatytas Lietuvoje, panaudojant DPPH[•] (laisvųjų radikalų) ir ABTS^{•+} (laisvųjų radikalų – katijonų) sujungimo metodus. DPPH absorbcijos slopinimas (%) barkūne (naudojant ekstraktą ir DPPH reagentą santykiu 3:1): Etilacetato ekstrakto - 8.1 ± 1.7 %, acetoniniame ekstrakto - 7.6 ± 5.2 , metanoliniame ekstrakto - 75.9 ± 1.8 . ABTS^{•+} metodu gauti rezultatai labai panašūs. Bendras fenolinių junginių kiekis mg/g ekstrakto 4.3 ± 1.6 (GRE) [32].

1.2. Geltonžiedžio barkūno (*Melilotus officinalis*) augale randamų junginių apžvalga

1.2.1. Kumarinas

Kumarinas – aromatingas organinis junginys. Tai vienas iš pagrindinių junginių, randamų geltonžiedžio barkūno, bei kitų *Melilotus* rūšies augalų lapų ir stiebų ekstraktuose. Šis junginys pasižymi saldžiu kvapu, kuriuo dažnai pasižymi kava tik nupjautas šienas.

Kumarinas plačiai naudojamas farmacijos pramonėje, kaip sintetinių antikoagulantų, vaistuose, pirmtakas. Preparatai, kurių sudėtyje yra kumarino, naudojami stabdyti nereikalingą kraujo krešėjimą kraujagyslėse, sergant giliųjų venų tromboze, plaučių embolizmu, miokardo infarktu [33]. Kumarinas turi daug darinių, kurie pasižymi analogiškomis savybėmis ir taip pat gali būti vadinami kumariniais, tai: bromatrolas, fumarinas, auraptenas, esakulinas, falitromas, skopoletinas ir vienas svarbiausių varfarinas. Iš kumarino susidaro nuodingų medžiagų, tokių kaip dikumarolas (angl. dicoumorol) [4]. Dikumarolas mažina kraujo krešėjimą. Junginio formulė pateikiama 1.2 pav.

1.2.2. Hiperozidas

Hiperozidas – flavonoidams priklausantis junginys. Hiperozidas dar gali būti žinomas kaip (angl. Hyperasid, Hyperosid, Hyperin, quercetin galactoside, Quercetin-3-galactoside, Quercetin-3-O-galactoside). Hiperozido randama: *Leonurus cardiaca L.* [34], *Vaccinium myrtillus*, o taip pat nedideli jo kiekiai randami ir *Melilotus officinalis* augale [19].

Hiperozidas pasižymi antioksidaciniu, antimikrobiniu aktyvumu, o taip pat ir neuroapsauginiu, priešūždegiminiu, kraujagysles apsaugančiu poveikiu ir medicinoje naudojamas širdies ligų bei kraujagyslių gydymui [35]. Junginio formulė pateikiama 1.5 pav.

1.2.3. Rutinas

Rutinas – bioflavonoidų grupei priskiriamas junginys. Pagrindinis rutino šaltinis yra rūtos (lot. *Ruta graveolens*). Nemaži rutino kiekiai randami citrusiniuose vaisiuose, erškėtrožėse, grikių žolėje [36]. Rutinas taip pat buvo išekstrahuotas iš geltonžiedžio barkūno [19].

Rutinas pasižymi antioksidacinėmis, priešvėžinėmis ir priešūždegiminėmis savybėmis. Organizme rutinas yra linkęs jungtis su geležies jonais, taip sudarydamas apsaugą nuo peroksidacijos ir laisvųjų radikalų susidarymo [37]. Medicinoje rutinas plačiai vartojamas maisto papildų gamyboje, derinant jį su vitaminu C, nes vitaminas C skatina jo pasisavinimą. Nemaži rutino kiekiai išskiriami iš žaliosios arbatos ir naudojami RNR veiklos stiprinimui [38]. Junginio formulė pateikiama 1.5 pav.

1.2.4. Kamferolis

Tai dar vienas flavonoidų gupei priskiriamas junginys. Kamferolis yra geltona kristalinė medžiaga, išskiriama iš daugelio augalų rūšių. Kamferolis yra paplitęs *Pteridophyta*, *Pinophyta*, *Angiospermae* ir daugelyje kitų augalų, taip pat jis išskiriamas iš kamelijos (*Camellia oleifera*) sėklų [39].

Kamferolis ir kamferolio glikozidai, kaip ir būdinga flavonoidams, pasižymi antioksidaciniu aktyvumu [40]. Nemažai atlikta tyrimų, kurie parodė kamferolio antimikrobinį, antidiabetinį aktyvumą, naudą siekiant sumažinti vėžinių susirgimų riziką, leukemiją [41]. Junginio formulė pateikiama 1.5 pav.

1.2.5. Arbutinas

Junginys, kuris priskiriamas fenoliniams glikozidams – arbutinas. Nemaži arbutino kiekiai randami bruknėse, mairūnuose, raudonėliuose [42]. Rusijoje atlikus HPLC analizę, arbutino buvo rasta ir geltonžiedžio barkūno lapų ekstraktuose [19].

Arbutinas pasižymi antioksidacinėmis, antiseptinėmis savybėmis, naikina bakterijas, pasižymi šlapimą skatinančiu poveikiu, slopina uždegimus, nors yra atlikta tyrimų, rodančių, kad arbutinas, žarnyne virsta į hidrochinoną ir sukuria palankią aplinką susidaryti vėžinėms ląstelėms [43]. Junginio formulė pateikiama 1.5 pav.

1.2.6. Hesperidinas

Hesperidinas – flavonoidų glikozidas, kuris daugiausiai randamas citrusiniuose vaisiuose [44]: citrinose, apelsinuose, laimo citrinose, taip pat nedideli kiekiai randami ir pipirmėtėse [45].

Hesperidinas, kaip ir daugelis flavonoidų, pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, kaip ir kiti antioksidantai, hesperidinas didina vitamino C aktyvumą, gerina kraujotaką, pasižymi neuroprotekciniu poveikiu prieš nitropropioninės rūgšties sukeltą toksiškumą, antiuždegiminiu, ląsteles apsaugančiu poveikiu [46]. Junginio formulė pateikiama 1.5 pav.

1.2.7. Herniarinas

Tai natūralus cheminis junginys, kuris yra kumarino metoksi darinys ir priklauso grupei antrinių metabolitų augaluose. Herniarinas randamas *Herniaria glabra*, *Ayapana triplinervis* ir *Prunus* augalų rušyse (*P. mahaleb*, *P. pensylvanica*, *P. Maximowiczii*) [47].

Herniarinas yra biologiškai aktyvus junginys, atliktais moksliniais tyrimais įrodyta, kad herniarinas sumažina cisplatinos (kiaušidžių ir sėklidžių vėžio) toksiškumą [48]. Junginio formulė pateikiama 1.2 pav.

1.2.8. Umbeliferonas

Tai junginys, kuris dar žinomas, kaip 7-hidroksi-kumarinas, natūralus kumarinų šeimos junginys. Šis junginys randamas daugelyje augalų rūšių: Apiaceae augaluose, morkose, kalendrose, *Hieracium pilosella*, *Hydrangea macrophylla* ir daugelyje kitų augalų [49].

Umbeliferonas pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, bet tai nėra jo pagrindinis efektas, svarbiausia jo savybė, apsauga nuo ultravioletinių spindulių, šis junginys veikia, kaip saulės agentas [50]. Junginio formulė pateikiama 1.2 pav.

1.2.9. Viteksinas

Tai flavonų glikozidas, kuris randamas *Vitex agnus-castus*, *Phyllostachys nigra* augaluose [51].

Viteksinas pasižymi priešuždegiminiu poveikiu, mažina oksidacinį stresą [52], veikia kaip antidepresantas[53]. Junginio formulė pateikiama 1.5 pav.

1.2.10. Ferulio rūgštis

Ferulio rūgštis yra organinis junginys, tai fenolinis fitochemiklas daugiausiai randamas augalų ląstelių sienelėse. Kaip lignino komponentas, ferulio rūgštis yra daugelio aromatinių junginių gamybos pirmtakas. Ferulio rūgštis aptinkama medicininėse vaistažolėse, tokiose kaip: *Angelica sinensis*, *Cimicifuga heracleifolia*, *Lignosticum chuangxiong*, *Centaurium erythraea*, ir daugelyje kitų augalų [54].

Ferulio rūgštis, kaip ir daugelis natūralių fenolių yra antioksidantas. Tyrimai su gyvūnais rodo, kad ferulio rūgštis turi priešvėžinių savybių [55], taip pat gali sumažinti oksidacinį stresą [56]. Junginio formulė pateikiama 1.3 pav.

1.2.11. Chlorogeno rūgštis

Chlorogeno rūgštis yra vienas iš pagrindinių, žaliosios kavos sudėtyje esančių junginių. Tai yra svarbus tarpinis biosintezės produktas [57].

Ši rūgštis pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, o taip pat, sulėtina gliukozės patekimą į kraują po valgio [58]. Chlorogeno rūgštis yra atsakinga už kvėpavimo takų reagavimą į alergiją, tam tikroms

augalų medžiagoms [59]. Taip pat įtraukiama į vidurius laisvinantį efektą, kurį sukelia slyvos [60]. Junginio formulė pateikiama 1.3 pav.

1.2.12. Kavos rūgštis

Rūgštis, kuri yra randama praktiškai visuose augaluose, nes tai yra tarpinis lignino biosintezės produktas. Kavos rūgštis yra viena pagrindinių augalinės biomasės sudedamųjų dalių [57].

Kavos rūgštis yra antioksidantas *in vitro* ir *in vivo* [61]. Ši rūgštis turi priešuždegiminį poveikį, kavos rūgštis aplenkė daugelį antioksidantų, sumažindama aflatoksinų gamybą 95 %. Ji taip pat slopina vėžinių ląstelių proliferaciją žmogaus HT-1080 fibrosarkomos ląstelėse, sumažina oksidacinį stresą [62]. Junginio formulė pateikiama 1.3 pav.

1.2.13. Cinamono rūgštis

Tai nesočioji karboksi rūgštis, kuri natūraliai susidaro daugelyje augalų.

Cinamono rūgštis pasižymi antimikrobinėmis savybėmis ir yra plačiai naudojama infekcijų gydymui. Rūgštis slopina daugelį bakterinių ir grybelinių rūšių. Ypač įdomus yra stiprus šios rūgšties antituberkuliozinis aktyvumas ir ateityje cinamono rūgštis gali būti plačiai naudojama vaistų, skirtų tuberkuliozės gydymui, gamybai [63]. Junginio formulė pateikiama 1.3 pav.

1.2.14. Cis-3-heksen-1-olis

Šio junginio daugiausiai randama žaliuosiuose lapuose. Nemaži šio junginio kiekiai buvo aptikti ir kolumbijoje užaugintame geltonžiedžio barkūno augale [12]. Cis-3-heksen-1-olis tiesiogiai ir netiesiogiai apsaugo augalų lapus nuo vabzdžių – kenkėjų. Šis junginys yra pripažintas kaip feromonas, kuris veikia vabzdžius ir žinduolius, tačiau poveikis žmoniemis nėra nustatytas [64]. Taip pat nustatyta, kad šis junginys turi poveikį *Fusarium* genties grybams ir stabdo jų augimą [65]. Junginio formulė pateikiama 1.5 pav.

1.2.15. α - Linoleno rūgštis

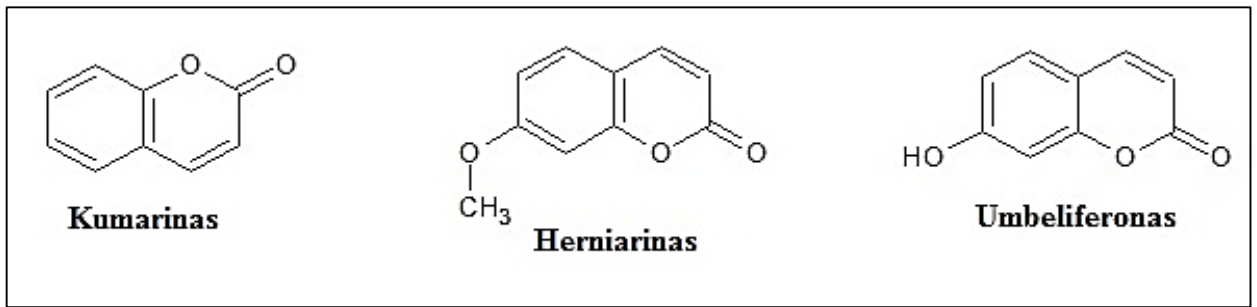
Tai viena svarbiausių, nepakeičiamų, polinesočiųjų riebalų rūgščių, dar žinoma kaip omega-3, kuri dalyvauja susidarant svarbiems biologiniams junginiams. Augalinėse žaliavose šios riebalų rūgštis pagrindinai randama aliejingose sėklose, tokiose kaip chia, sėmenų sėklose, kanapių sėklose, sojose ir t.t., alfa-linoleno rūgštis taip pat randama tilakoidų membranose, žirnių lapuose [66], o taip pat ši rūgštis yra viena iš pagrindinių, kalbant apie riebalų rūgščių kompoziciją geltonžiedžio barkūno sėklose [28].

Ši rūgštis yra svarbi daugeliui organizmo funkcijų palaikyti, mažina uždegimines reakcijas, mažina trigliceridų kiekį kraujyje [67], daugelis atliktų tyrimų parodė, kad ši rūgštis mažina prostatos vėžio riziką [68] ir atlieka dar daugybę naudingų funkcijų. Junginio formulė pateikiama 1.4 pav.

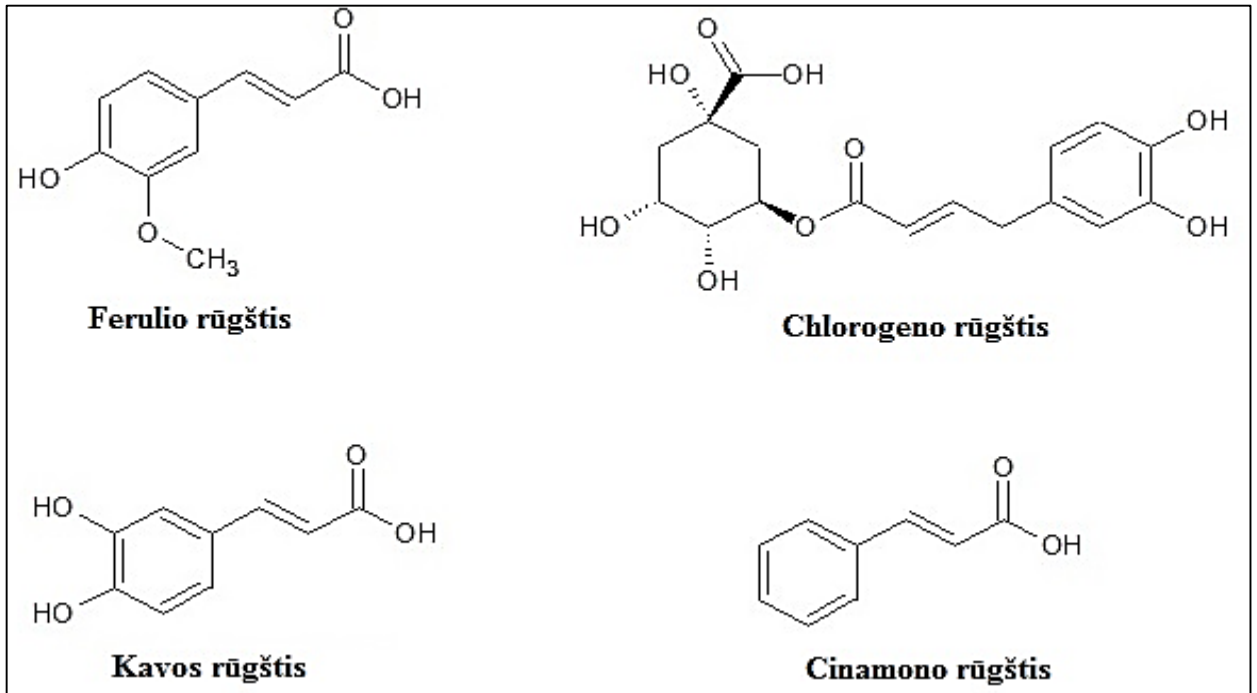
1.2.16. Linolo rūgštis

Tai taip pat labai svarbi nepakeičiama riebalų rūgštis, dar žinoma, kaip omega-6. Jos taip pat randama įvairiose sėklose, o geltonžiedžio barkūno sėklose randamų riebalų rūgščių kompozicijoje, šios rūgštis kiekis yra antras po alfa-linoleno rūgštis [28].

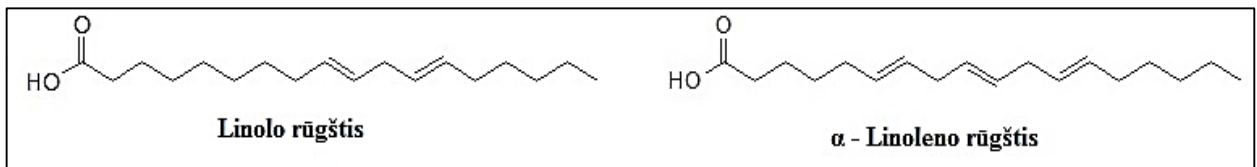
Ši rūgštis dalyvauja įvairiuose biologiniuose procesuose, vysktančiuose organizme. Ji pasižymi itin naudingomis savybėmis odai, todėl yra naudojama grožio pramonėje. Tyrimai rodo, kad linolo rūgštis veikia, kaip priešuždegiminė [69]. Linolo rūgštis lipidų radikalai gali būti naudojami parodyti antioksidacinį poveikį gamtiniuose fenoliuose ir nustatyti, kurie iš jų skatina riebalų autooksidaciją aliejuose [70]. Junginio formulė pateikiama 1.4 pav.



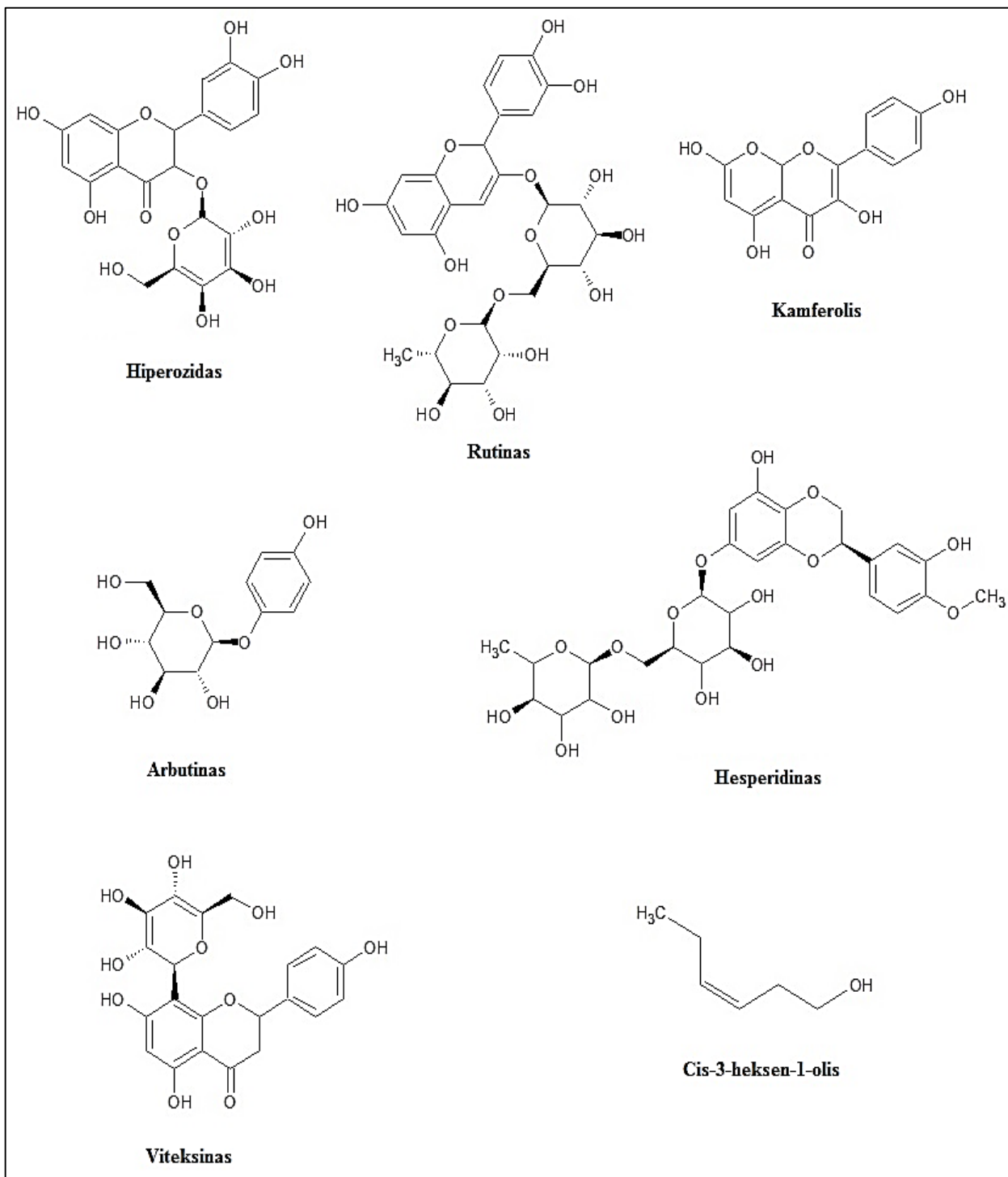
1.2 pav. Geltonžiedžio barkūno augale randami kumarinai



1.3 pav. Geltonžiedžio barkūno augale randamos fenolinės rūgštys



1.4 pav. Geltonžiedžio barkūno augale randamos nepakeičiamos riebalų rūgštys



1.5 pav. Geltonžiedžio barkūno augale randami flavonoidai ir kiti aromatiniai junginiai

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Žaliavos ir reagentai

Žaliavos

Tyrimams buvo naudoti geltonžiedžio barkūno lapai, stiebai ir sėklos (lot. *Melilotus officinalis*) (UAB „Wilara“, Birutės g. 3., Prienai, 2013 m).

Dalis tyrimų buvo atliekami panaudojant kiaulienos riebalus („Campofrio“, Poligono Gamonal, La Bureba, s/n, 09007 Burgos, Ispanija).

Reagentai

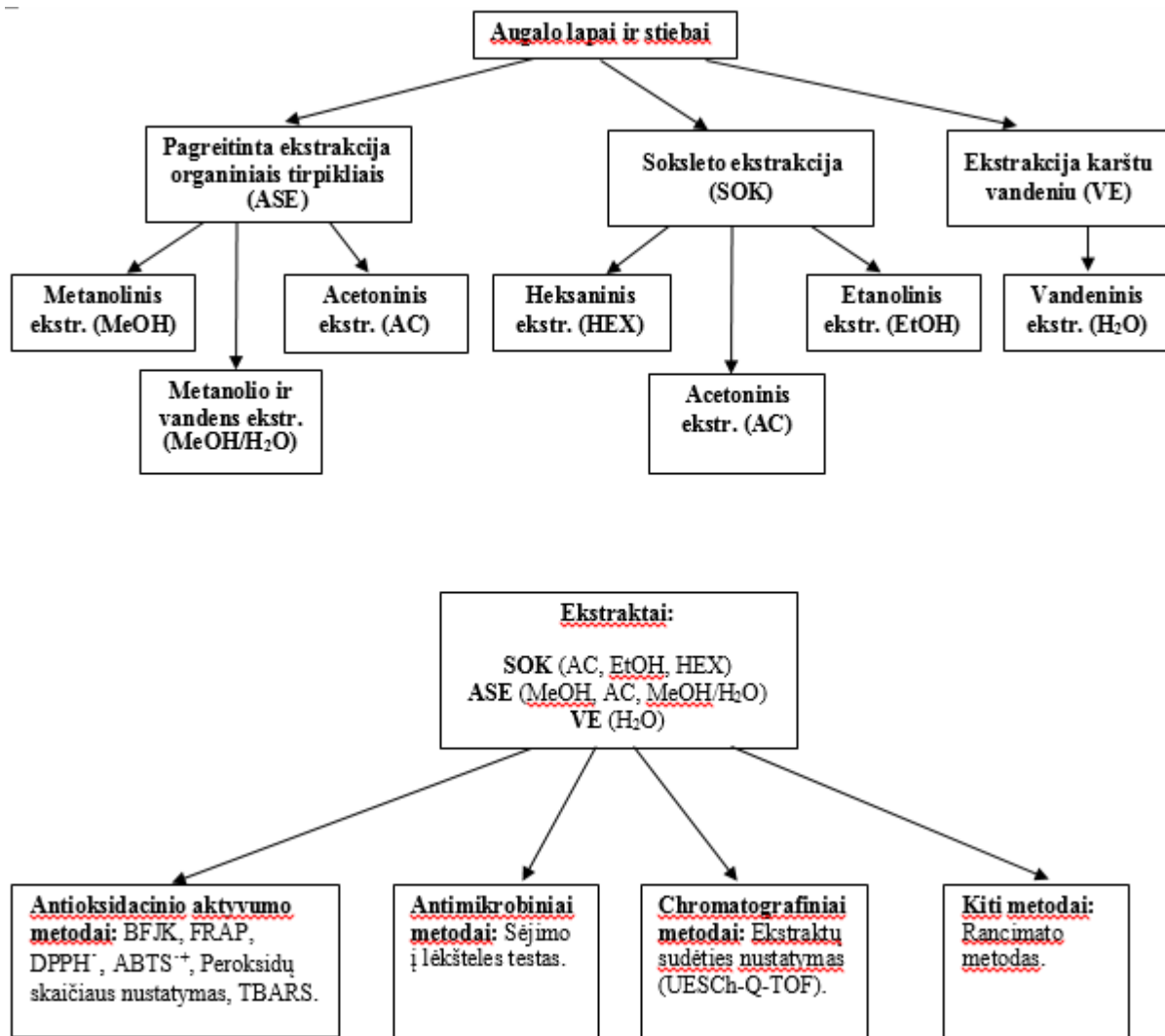
- Analitinio grynumo reagentai: metanolis (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Vokietija), acetonas (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Vokietija), heksanas (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Vokietija), etanolis (Stumbras, Kaunas, Lietuva), acto r, amonio acetatas, folin ciocalteu (Sigma Aldrich, Darmstadt, Vokietija), krakmolai, celiuliozė, chloroformas, tiobarbitūrinė r., trichloracto r. (Sigma Aldrich, Darmstadt, Vokietija), Na₂S₂O₃, FeCl₃, HCl, Na₂CO₃, PBS (NaCl, KH₂PO₄, KCl, Na₂HPO₄), DPPH[·], ABTS^{·+}, BHT (Sigma Aldrich, Darmstadt, Vokietija), TPTZ (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Vokietija),
- ESCh grynumo reagentai: metanolis, acetonitrilias, izopropanolis (Sigma Aldrich, USA).
- Kiti reagentai: Agaro milteliai (PCA, MRS, Sabouraud, VRBG (Oxoid, Jungtinė Karalystė)).

2.2. Augalo paruošimas bei ekstraktų gamyba

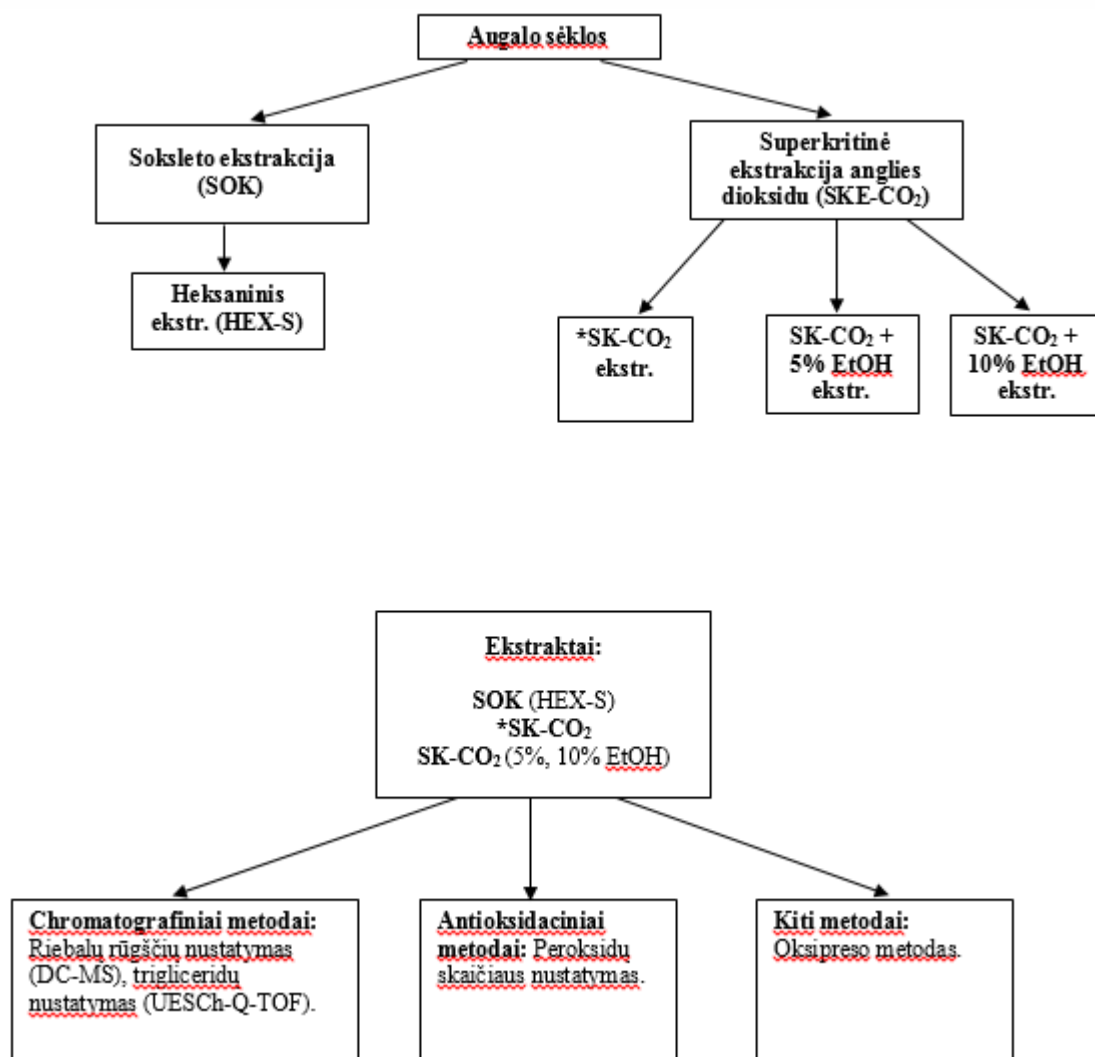
Ekstraktų paruošimui buvo naudojami geltonžiedžio barkūno (lot. *Melilotus officinalis*) lapai, stiebai ir sėklos.

Lapai, stiebai ir sėklos buvo smulkinami naudojant laboratorinį malūnėlį PM – 200 (Retsch, Marselis, Prancūzija) iki 0.5 mm dydžio dalelių. Susmulkintos augalo dalys iki ekstrakcijų buvo laikomos sausuose ir sandariai uždarytuose stikliniuose induose, o vėliau augalas buvo ekstrahuojamas naudojant kelių tipų ekstrakcijas bei atitinkamus tirpiklius. Gauti ekstraktai sudedami į stiklinius buteliukus ir laikomi šaldiklyje iki jų panaudojimo tyrimams.

Atliktų ekstraktų schemos pateikiamaos 2.1 ir 2.2 pav.



2.1 pav. Augalo lapų ir stiebų ekstraktų bei ekstraktų tyrimų schema



2.2 pav. Augalo sėklų ekstrakcijos ir ekstraktų tyrimų schema

Soksleto ekstrakcija (SOK)

Soksleto ekstrakcija atliekama naudojant kelis skirtingus tirpiklius: acetoną, heksaną, bei etanolį. Bandiniai pirmiausiai buvo kaitinami iki užvirimo, toliau ekstrakcija vykdoma sumažinus temperatūrą iki 80 °C tris valandas. Po ekstrakcijos bandiniai atvėsunami, filtruojami, koncentruojami rotaciniu garintuvu BUCHI R-114 (Buchi labortechnik AG, Konstanz, Šveicarija), bei išdžiovinami panaudojant azotą.

Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE)

Pagreitinta aukšto slėgio ekstrakcija organiniais tirpikliais buvo atliekama panaudojant kelis skirtingus tirpiklius (acetoną, metanolį bei metanolio ir vandens mišinį). Aukšto slėgio ekstrakcija buvo vykdoma naudojant aukšto slėgio ekstraktorių ASE 350 (The Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, JAV). su metanoliumi (40 °C temp., 3 ciklai po 15min.), su acetonu (130 °C., 3 ciklai po 15 min) ir taip pat su metanolio vandens mišiniu (130 °C., 3 ciklai po 15 min). Po ekstrakcijos tolimesnė seka analogiška, kaip ir po soksleto ekstrakcijos.

Ekstrakcija karštu vandeniu (VE)

Ekstrakcija buvo atliekama tiriamąją medžiagą kaitinant ant šildomos magnetinės maišyklės (80 °C temp., 30 min.). Po ekstrakcijos buvo atliekamas filtravimas, šaldymas azotu ir po to užšaldytas bandinys buvo liofilizuojamas.

CO₂ superkritinė ekstrakcija (SK-CO₂)

CO₂ superkritinei ekstrakcijai (aliejaus išgavimui iš žaliavos) buvo naudojamos geltonžiedžio barkūno sėklos.

Superkritinė ekstrakcija buvo atliekama STF-110 (Supercritical fluids technologies, INC, Niuarkas, JAV) ekstraktoriumi. Ekstrakcija buvo optimizuojama pagal tris parametrus atitinkamose ribose: temperatūrą (45 – 60 °C), slėgį (180 – 450 bar) bei laiką (60 – 120 min.). Ekstrakcijos modelis sudarytas pagal statistinės programos Design–expert 7.0.0 („Stat–Ease Inc“, Mineapolis, MN, JAV) matematinį centriškai kompozicinį eksperimento planavimo metodą (Central composite design).

25 g sumaltų sėklų buvo patalpinama į 25 cm³ tūrio celą, kuri sandariai uždaroma. CO₂ dujos leidžiamos palaikant pastovų 2 l/min srautą, ekstrakcijos slėgis ir temperatūra nustatomi prieš pradėdant ekstrakciją, ekstraktoriaus valdymo blokuose. Ekstrakcijos atlikimo laikas priklaudomas nuo modelio sudarymo metu gautų parametrų ir kontroliuojamas rankiniu būdu.

Aliejaus surinkimui naudojami stikliniai buteliukai, kurie po ekstrakcijos sandariai uždaromi ir patalpinami į šaldytuvą, kuriame laikomi 4 °C temperatūroje iki sekančio jų panaudojimo tyrimams.

2.3 Tyrimų metodai

Antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodams atlikti paruošiami 1% koncentracijų ekstraktų tirpalai, kurie tirpinami tirpikliuose, pasirenkamuose atsižvelgiant į jų tirpumą. Priklausomai nuo konkrečių metodų, ekstraktų tirpalai skiedžiami keletą kartų.

2.3.1. Bendrojo fenolinių junginių kiekio (BFJK) nustatymas Folin-Ciocalteu metodu

Bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktuose buvo nustatytas pagal Singleton ir Rossi [71], panaudojant Folin-Ciocalteu reagentą (Sigma–Aldrich, Darmstadt, Vokietija).

Metodui atlikti ruošiamas 7.5% Na₂CO₃ tirpalas. Folin-Ciocalteu reagentas maišomas su distiliuotu vandeniu santykiu 1/9.

Į mikrolėkštes pilama po 30 µl ekstrakto, 130 µl Folin-Ciocalteu reagento ir 120 µl Na₂CO₃ tirpalo. Kontroliniam bandiniui naudojama 30 µl MeOH/H₂O mišinio (4/1). Paruošti bandiniai 15s maišomi, po to dedami į skaitytuvą FLUOstar Omega (BMG Labtech, Vokietija) ir purtomi 30 s esant 100rpm greičiui. Inkubacijos periodas trunka 30 min, o po jo atliekami matavimai esant 765 nm bangos ilgiui FLUOstar Omega tipo spektrofotometru.

Galo r. kalibracinė tiesinė priklausomybės lygtis sudaroma 0.025 – 0.2 mg/ml koncentracijų ribose, naudojant etaloninį galo r. tirpalą. Bendras fenolinių junginių kiekis apskaičiuojamas pagal formulę (1) ir išreiškiamas galo r. ekvivalentais (mg/g GRE).

$$C = c_1 \times V \times m^{-1} \quad (1)$$

C – fenolinių junginių kiekis (mg/g GRE);

c₁ – galo r. koncentracija (nustatyta pagal kalibracinę kreivę) mg/ml;

V – ekstrakto tūris ml;

m – mėginio masė naudota ekstrakcijai.

2.3.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH[•]) radikalų sujungimas

Laisvųjų radikalų sujungimo (DPPH[•]) tyrimas atliekamas pagal Brand-Williams ir kt. metodiką [72]. Metodas pagrįstas reakcija tarp antioksidanto ir DPPH[•] radikalo.

Paruošiamas 6×10^{-5} M DPPH[•] tirpalas, 0.0059g DPPH[•] radikalo ištirpinant 250 ml MeOH. DPPH[•] tirpalas skiedžiamas metanolio kol gaunama 0.7 ± 0.03 absorbcija, esant 515 nm bangos ilgiui.

DPPH[•] radikalų sujungimui į kiuvetes pilama 2 ml DPPH tirpalo ir 50 µl ekstrakto. Kiuvetės sandarioje dėžutėje laikomos 15min. tamsoje, po to spektrofotometru GENESYS 8 (Spectronic instruments, Rocester, JAV) matuojama absorbcija esant 515 nm bangos ilgiui. Tuščiam bandiniui pamatuoti vietoj ekstrakto naudojama 50 µl metanolio.

Kalibracinė kreivė sudaroma naudojant etaloninius Trolokso tirpalus (0,1 – 0,3 mg/ml) ribose. Mėginių antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas Trolokso ekvivalentais (µmol/g ekstrakto). Laisvųjų radikalų sujungimui nustatyti naudojama formulė (2). Laisvieji radikalai išreiškiami procentais.

$$SA (\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \% \quad (2)$$

SA – laisvųjų radikalų sujungimo aktyvumas (%);

A₁ - DPPH[•] reakcijos sistemos optinis tankis;

A₂ – sistemos su antioksidantu optinis tankis.

2.3.3. 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) (ABTS^{•+}) radikalų-katijonų sujungimas

Laisvųjų radikalų-katijonų surišimo metodas (ABTS^{•+}) atliekamas pagal Re ir kt., metodiką [73]. Metodas pagrįstas reakcija tarp (ABTS^{•+}) radikalo ir antioksidanto.

Metodui atlikti ruošiamas PBS tirpalas (8.18 g NaCl, 0.27 g KH₂PO₄, 1.78 g Na₂HPO₄, 0.15 g KCl) visos medžiagos ištirpinamos 1 l tūrio kolboje ultra švarumo vandenyje. Gauta tirpalo pH turi būti 7.4, jeigu jis mažesnis, tada įdedama NaOH. ABTS^{•+} tirpalas ruošiamas 0.0549 g ABTS^{•+} reagento ištirpinant 50 ml PBS tirpalo. Kitas tirpalas ruošiamas 0.0038 g K₂S₂O₈ ištirpinant 200 µl ultra švarumo vandenyje. Abu paruošti tirpalai sumaišomi ir laikomi tamsoje apie ~15 valandų, kambario temperatūroje.

Radikalų sujungimui į kiuvetę pilama 2 ml ABTS^{•+} tirpalo ir 20 µl ekstrakto. Nuliniam taškui nustatyti ABTS^{•+} tirpalas maišomas su 20 µl PBS tirpalo. Kiuvetės iki matavimo laikomos 10 min tamsoje, po to atliekami matavimai GENESYS 8 (Spectronic instruments, Rocester, JAV) spektrofotometru esant 734 nm bangos ilgiui.

Kalibracinė kreivė sudaroma naudojant etaloninius Trolokso tirpalus 0,07 – 0,3 mg/ml koncentracijų ribose. Mėginių antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas Trolokso ekvivalentais

($\mu\text{mol/g}$ ekstrakto). Laisvųjų radikalų sujungimui nustatyti naudojama formulė (3). Laisvieji radikalai išreiškiami procentais.

$$SA (\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \% \quad (3)$$

SA – laisvųjų radikalų sujungimo aktyvumas (%);

A_1 - ABTS^{•+} reakcijos sistemos optinis tankis;

A_2 – sistemos su antioksidantu optinis tankis.

2.3.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP metodu

Šis metodas atliekamas pagal Benzie ir Strain [74]. Metodas pagrįstas antioksidanto gebėjimu redukuoti geležies Fe(III) jonus į Fe(II). FRAP metodas paremtas 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-traizino (TPTZ) turinčio trivalentės geležies (Fe³⁺) atomą redukcija į spalvotą (TPTZ) turintį divalentės geležies (Fe²⁺) atomą.

Metodui atlikti ruošiamas FRAP reagentas (25 ml buferinio natrio acetato tirpalo (0.3 M pH 3.6), 2.5 ml TPTZ reagento (10 mM), 2.5 ml geležies chlorido (FeCl₃) (20 mM) ir 3 ml vandens.

30 μl ekstrakto sumaišoma su 970 μl FRAP reagento ir inkubuojama vandens vonelėje 37 °C temperatūroje 30 min. Kontroliniam bandininiui imama 30 μl vandens. Absorbcija matuojama spektrofotometru GENESYS 10S (Spectronic instruments, Rocester, JAV) esant 593 nm bangos ilgiui ir palyginama su kontroliniu FRAP reagento bandiniu. Koncentracijos apskaičiuojamos remiantis kalibracine kreive, kuri sudaroma naudojant žinomos koncentracijos FeSO₄ tirpalus. Rezultatai išreiškiami milimoliais Fe (II) ir skaičiuojami pagal formulę (4).

$$\text{mM Fe(II)} = 1.535 \Delta\text{Abs}_{593\text{nm}} - 0.0137 \quad (4)$$

$$\Delta\text{Abs}_{593\text{nm}} = \Delta\text{Abs}_{593\text{nm}} \text{ b} - \Delta\text{Abs}_{593\text{nm}} \text{ c}.$$

$\Delta\text{Abs}_{593\text{nm}} \text{ b}$ – bandinio su ekstraktu absorbcija;

$\Delta\text{Abs}_{593\text{nm}} \text{ c}$ – kontrolinio bandinio absorbcija.

2.3.5 Peroksidų skaičiaus nustatymas

Peroksidų skaičius nustatomas remiantis (LT EN ISO 3960:2010) standartu [75]. Šis metodas naudojamas pirminiams riebalų oksidacijos produktams (peroksidams) nustatyti. Peroksidacijos skaičius (PS) parodo tikrąjį peroksidų kiekį riebaluose.

Metodo esmė – reakcija rūgščioje terpėje, kurios metu reaguoja toje terpėje esantys peroksidai ir kalio jodidas, reakcijos metu atskilęs jodo kiekis prilyginamas peroksidų kiekiui. Susidaręs laisvas jodas nutitruojamas natrio tiosulfatu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Metodas atliekamas į kūginę kolbą pasveriant 2.5 g riebalų, kurie sumaišomi su 30 ml chloroformo ir ledinės acto rūgšties (2:3) mišiniu, pridėjus 0.5 ml sočiojo KJ tirpalo, bandinys maišomas 1 minutę ir paliekamas tamsoje 5 min. Po 5 min. į bandinį įpilama 30 ml vandens ir 4-5 lašai krakmolo tirpalo, bandinys išmaišomas ir titruojamas 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ tirpalu kol tamsiai mėlyna spalva išnyksta. Analogiškai atliekamas kontrolinis bandinys (be riebalų).

Peroksidų skaičius apskaičiuojamas pagal formulę (5) ir išreiškiamas mekv/kg riebalų.

$$PS = \frac{(V-V_1) \times N \times 1000}{m} \quad (5)$$

V – 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ kiekis, sunaudotas tiriamajam mėginiui nutitruoti, (ml);

V_1 - 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ kiekis, sunaudotas tuščiam bandiniui nutitruoti, (ml);

m – tyrimui paimtas riebalų kiekis, (g);

N – 0,01269 – jodo kiekis, atitinkantis 1 ml 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, (mol/l).

2.3.6. Antrinių riebalų oksidacijos produktų nustatymas Tiobarbitūrinės rūgšties (TBR) metodu

Antriniai riebalų oksidacijos produktai nustatomi TBR metodu pagal Vynke 1970 m., Soreseną ir Jorgenseną 1996 m., [76, 77] ir išreiškiami malono-di-aldehido (MDA) ekvivalentais.

Viena iš pagrindinių vykstančių reakcijų šio proceso metu yra malono-di-aldehido ir tiobarbitūrinės rūgšties (MDA-TBA_2) spalvoto junginio susiformavimas.

Šiam metodui paruošiamas mišinys, kuriame 0.86 g TBR (Sigma-Aldrich, Šveicarija), ištirpinama 100ml 10% Tri-chlor-acto rūgšties (TCA) (Sigma-Aldrich, Šveicarija). 0.2 g riebalų sumaišoma su 10 ml mišiniu, kontroliniam bandiniui naudojama 10 ml TCA.

Paruošti mėginiai inkubuojami vandens vonelėje palaikant 90 °C temperatūrą 1 h, kas 15 min. pamaišant. Po to bandiniai atšaldomi ir filtruojami. Toliau atliekamas bandinių absorbcijos matavimas

532 nm ir 600 nm ribose, kambario temperatūroje naudojant spektrofotometrą GENESYS 10S (Spectronic instruments, Rocester, JAV). Rezultatams panaudojamas skirtumas tarp 600 nm ir 532 nm absorbcijos, kuri apskaičiuojama pagal formulę (6) ir išreiškiama (mg MDA/kg bandinio).

$$TBR = \frac{A}{1.56 \times 10^5} \times V \times M_{MDA} \times \frac{m}{1000000} \quad (6)$$

A – Absorbcijos skirtumas pamatuotas (600 – 532 nm ribose);

V – TBA-TCA mišinio tūris, (l);

M_{MDA} - malono-di-aldehido molinė masė;

m – paimtas riebalų kiekis, (g).

2.3.7. Antimikrobinio aktyvumo kiekybinis nustatymas mikroorganizmų sėjimo į terpę metodu

Metodui atlikti bandiniai (9-10 g) pasveriami į plastikinius maišelius (angl. Stomacher bag) ir 10 kartų praskiedžiami ringerio tirpalu (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Jungtinė Karalystė). Maišeliai steriliai uždaromi ir bandinys su ringerio tirpalu homogenizuojamas naudojant homogenizatorių Stomacher 400 (Colworth, London, Jungtinė Karalystė). Po homogenizavimo bandiniai (1 ml) pipete paimami iš maišelių ir pilami į stiklinius buteliukus su ringerio tirpalu (9 ml), toliau imant iš pirmo buteliuko 1ml bandinio atliekami tolimesni skiedimai į sekančius mėginius su ringerio tirpalu, priklausomai nuo reikiamo skiedimo.

Bandymui atlikti taip pat ruošiami agaro tirpalai, agaro milteliai tiksliai atsveriami į butelius, užpilami distiliuotu vandeniu ir ištirpinami kaitinant juos ant elektrinės magnetinės krosnelės iki užvirimo, po užvirimo agaro tirpalai atvėsunami iki ~ 50 °C temperatūros ir iki panaudojimo laikomi termostate 30 °C temperatūroje.

Sėjimai atliekami naudojant petri lėkšteles, kaip atliekami sėjimai, kokie naudojami agaro tirpalai ir kokioje temperatūroje inkubuojamos užsėtos Petri lėkštelės su konkrečiais agaro tirpalais, pateikiama 1 lentelėje.

1 lentelė. Mikrobiologijos eksperimento atlikimo eiga

Bakterijų kultūros (agaras)	Sėjimas į Petri lėkšteles	Inkubavimas
<i>Aerobinės mezofilinės</i> (PCA)	1 ml (bandinio) + 20 ml PCA	30 °C 2-3 dienas
<i>Aerobinės psichrofilinės</i> (PSY)	1 ml + 20 ml PSY	8 °C 7-8 dienas
<i>Pienarūgštės bakterijos</i> (MRS)	1 ml + 20 ml MRS	30 °C 2-3 dienas
<i>Mielės ir pelėsiai</i> (Sabouraud)	0.1 ml (Pirmiausiai agarų tirpalas (20 ml) išpilstomas į lėkšteles ir kai jis sukietėja, pridedama 0.1 ml bandinio, kuris išlyginamas lėkštelėje naudojant lyginimo lazdelę.)	22-25 °C 7 dienas
<i>Enterobakterijos</i> (VRBG)	1 ml + 20 ml VRBG (kai terpė sukietėja, pridedama dar 10 ml VRBG)	35 °C 1 dieną

Po inkubavimo atitinkamą dienų kiekį, lėkštelės išimamos iš termostatų ir skaičiuojamos išaugusios bakterijų kolonijos. Rezultatai išreiškiami bakterijų kolonijų skaičiaus logaritmu.

2.3.8. Ekstraktų ir trigliceridų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESCh-Q-TOF)

Ekstraktų analizė buvo atliekama chromatografinė Waters Acquity sistema (Waters, Milford, JAV) sujungta su hibridiniu – kvadrupoliniu-skriejimo laiko masių spektrometru (Q-TOF).

Analičių skirstymui buvo naudota Acquity BEH C18, 2,1 × 100 mm kolonėlė, sorbento dalelių dydis - 1,7 μm (Waters, Milford, JAV). Skirstymas buvo vykdomas 40 °C temperatūroje. Eliuentų sistema buvo sudaryta iš 0.4 % skruzdžių rūgšties vandeninio tirpalo (A) ir acetonitrilo (B). Taikytas šis gradiento kitimas: 0 min. – 0 % (B), 100 % (A), 9 min. – 100 % (B), 0 % (A), 10 min. – 100 % (B), 0 % (A), 11 – 12 min. – 0 % (B), 100 % (A). Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 1 μL. Iš kolonėlės išeinantys junginiai buvo aptinkami diodų matricos detektoriumi (DMD) esant 230 – 500 nm bangos ilgiui. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas neigiamos elektrinės-išpurškiamosios jonizacijos režimu, kurio parametrai buvo kontroliuojami HyStar programine įranga. Jonizacija buvo atlikta naudojant + 4000 V įtampą, fragmentavimo celės įtampa 3 eV, azoto dujos buvo naudotos kaip išpurškiančios (slėgis 2 bar) ir džiovinančios dujos, kurių tėkmės greitis 10 l/min.

Tarpusavyje derinant pilno skenavimo ir MS/MS modelius buvo nustatytos tikslios junginių molekulinės formulės intervale - m/z 100 – 1500, kai skenavimo greitis buvo 2,5 Hz. Taikant MS/MS modelį buvo patvirtinti junginiai, kurių negalima vienareikšmiškai identifikuoti. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės, standartinių junginių masių spektrus, eliucijos trukmės sutapimą, MS/MS režimu gautus fragmentus bei lyginant juos su literatūros duomenimis. Nežinomų junginių identifikavimui buvo taikytas MS/MS režimas, kai fragmentavimo įtampa celėje buvo 35 eV.

Taip pat buvo atlikta ir trigliceridų analizė iš sėklų gautame aliejuje, pagal Alam Zeb ir Michael Murkovic (Grazas, Austrija, 2010 m.) [84]. Išskirstymui atlikti buvo naudojama Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 \times 50 mm kolonėlė (Waters, Milford, JAV), kurioje buvo palaikoma 350 °C temperatūra. Analizės trukmė 4 min. Analizei buvo naudota mobili fazė (250 ml) paruošta iš 0.05 % amonio acetato, 0.10 % acto rūgšties, 18.0 % 2-propanolio ir 81.85 % metanolio. Eliuento srauto greitis 0.4 ml/min.

Masių spektrometras veikė ESI režimu, fragmentavimo potencialas 150 V, džiovinimo dujų temperatūra 350 °C, kapiliarų įtampa 4000 V. ESI – MS spektrai buvo gauti m/z intervale nuo 200 iki 1000. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal molekulinės mases, MS/MS režimu gautus fragmentus bei lyginant juos su literatūros duomenimis, o procentinė trigliceridų sudėtis apskaičiuojama pagal smailių plotų procentus.

2.3.9. Riebalų rūgščių (RR) sudėties nustatymas dujų chromatografijos (DC-LJD) metodu

Prieš atliekant dujų chromatografijos analizę, vykdomas riebalų peresterinimas. Pasveriami 0.5 g riebalų ir užpilama 0.5 ml metanolinio NaOH tirpalo, visas mišinys gerai supurtomas ir 30 min. kaitinamas 60 °C temperatūroje, kol dingsta riebalinė fazė. Po riebalų esterifikavimo pridedama 4 ml NaCl (sotaus) tirpalo ir viskas gerai sumaišoma, po sumaišymo pridedama 1 ml heksano ir vėl gerai sumaišoma, badinys centrifuguojamas, kol susidaro skirtingos fazės (sluoksniai). Viršutinė (heksano fazė) paimama naudojant pipetę (bandinys gali būti centrifuguojamas keletą kartų, kol fazės nebeišsiskiria) ir iki analizės laikoma 4 °C temperatūroje. Galutiniam bandiniui paimama 50 μl heksano fazės, kuri praskiedžiama 450 μl heksano.

RR kompozicijai nustatyti naudojamas dujų chromatografas (LST EN ISO 12966-1:2015) [78]. Šiuo metodu nustatomi 8-24 anglies atomus turinčių RR metilo esteriai.

Chromatografas sudarytas iš liepsnos jonizuojančio detektoriaus su poline BP20 kolonėle. Termostato temperatūra nustatoma 140 °C išlaikant 5min., o po to temperatūra keliami iki 240 °C 4 °C/min greičiu ir pabaigoje 240 °C temperatūroje išlaikoma 30min.

Rūgščių metilo esteriai identifikuojami pagal gautus sulaikymo laikus, lyginant juos su žinomų RR standartais, o procentinė riebalų rūgščių sudėtis apskaičiuojama pagal smailių plotų procentus.

2.3.10. Lipidų oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipreso metodu

Oksidacijos stabilumo įvertinimas buvo atliktas naudojant ML Oksipres („Mikrolab Aarhus A/S“, Danija) matavimo prietaisą. Matavimo esmė, deguonies naudojimas esant aukštai temperatūrai ir veikiant slėgiui.

Metodas atliekamas į oksipres stiklinėlę pasveriant 5 g aliejaus. Stiklinė su aliejumi patalpinama į metalinę ceļę, kuri įstatoma į „ML Oksipres“ įrenginį, sisteminiame bloke nustatoma 110 °C temperatūra, bei sistemoje sudaromas 0.5 Mpa slėgis. Oksidacija fiksuojama kompiuteriu.

Pagal gautus duomenis nustatomas indukcinis periodas (IP), kuris parodo riebalų stabilumą vykdant oksidaciją, valandomis. Rezultatai apskaičiuojami pagal Oksipresu užrašytą kinetikos kreivę ir indukcinio periodo nustatymo liestines.

2.3.11 Lipidų oksidacinio stabilumo nustatymas Rancimato metodu

Oksidacijos stabilumo įvertinimas buvo atliktas panaudojant Rancimat 743 (Metrohm, Šveicarija) prietaisą. Metodas pagrįstas riebalų oksidacijos produktų (peroksidų) susidarymo pabaiga.

Metodas atliekamas į stiklinius mėgintuvėlius pasveriant 2.5 g riebalų į kuriuos pridedama 0.5% ir 1% ekstrakto, kaip kontrolė naudojami du bandiniai, vienas tuščias, kuriame tik riebalai, o į kitą pridedama sintetinio antioksidanto BHT (2,6-Di-tret-butyl-4-methylphenol, minimum 99% GC, powder), (Sigma-Aldrich, Šveicarija), kuris naudojamas pagal europos sąjungos reglamentą (EB Nr. 1331/2008) skirtą maisto priedams [80].

Kompiuteryje nustatoma proceso temperatūra (110 °C). Oras leidžiamas 20 L/h srautu per mėginį ir kylant temperatūrai vyksta riebaluose esančių riebalų rūgščių oksidacija. Bandymo pabaigoje susiformuoja antriniai riebalų oksidacijos produktai. Tiriamųjų mėginių elektrinis laidumas didėja dėl reakcijos produktų absorbcijos.

Laikas per kurį aptinkami antriniai oksidacijos produktai vadinamas indukcijos periodas (IP).

Rezultatai išreiškiami AF (Apsaugos faktoriumi) ir apskaičiuojami pagal formulę (7)

$$AF = \frac{IP_{TB}}{IP_K} \quad (7)$$

AF – apsaugos faktorius;

IP_{TB} – indukcinis periodas mėginiuose su bandiniu;

IP_K – kontrolinio mėginio indukcinis periodas.

2.4. Rezultatų statistinis apdorojimas

Rezultatų apdorojimui buvo naudotos MS Excel (Redmondas, Vašingtonas, JAV) bei Design–expert 7.0.0 („Stat–Ease Inc“, Mineapolis, MN, JAV) statistinės programos. Naudojant Design–expert 7.0.0 buvo atliktas superkritinės CO₂ ekstrakcijos optimizavimas pagal tris parametrus: temperatūrą - A (45 – 60, °C, laiką - B (60 – 120, min)), slėgį - C (180 – 450, bar).

Tiksliems rezultatams gauti visi eksperimentai buvo atliekami juos pakartojant po 2-3 kartus.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

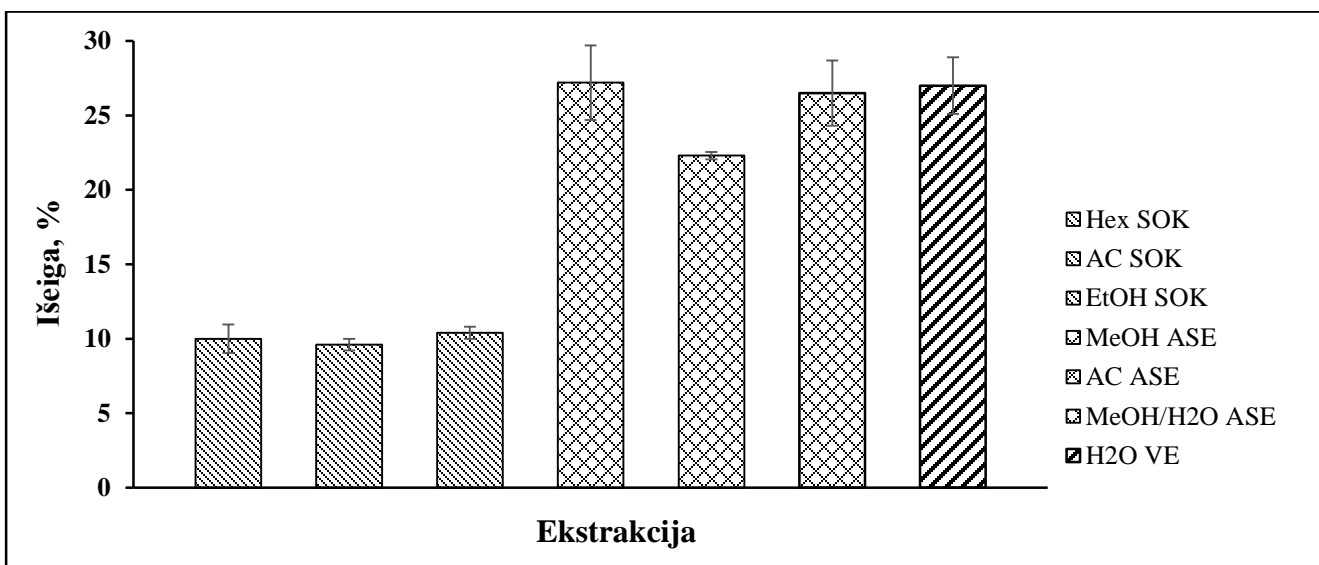
3.1. Augalo lapų ir stiebų ekstrakcijos bei jų metu gautos išeigos

Ekstraktams iš augalo išgauti, buvo atliktos: soksleto, pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais bei vandeninė ekstrakcijos.

Ekstrakcijos, jų salygos ir gautos išeigos pateikiamos atitinkamai 2 lentelėje ir 3.1 pav.

2 lentelė. Ekstrakcijos ir jų salygos

Ekstrakcija	Tirpiklis	Ekstrakcijos sąlygos	Paimtos medžiagos kiekis, g	Gauto ekstrakto kiekis, g
Soksleto (SOK)	Etanolis (EtOH)	15 min. 100 °C temp., 3 h 80 °C temp.	12.0	1.2
	Acetonas (AC)	15 min. 100 °C temp., 3 h 80 °C temp.	12.0	1.1
	Heksanas (HEX)	15 min. 100 °C temp., 3 h 80 °C temp.	12.0	1.3
Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE)	Metanolis (MeOH)	40 °C., 3 ciklai po 15min.	5.0	1.3
	Acetonas (AC)	130 °C., 3 ciklai po 15min.	5.0	1.0
	Metanolis / Vanduo (MeOH/H ₂ O)	130 °C., 3 ciklai po 15min.	5.0	1.2
Ekstrakcija karštu vandeniu (VE)	Vanduo (H ₂ O)	80 °C., 30min.	10.0	2.5



3.1 pav. Ekstrakcijų metu gautos išeigos, geltonžiedžio barkūno lapų ir stiebų ekstraktuose.

Matome, kad didžiausi ekstraktų kiekiai buvo gauti atliekant MeOH (ASE) ekstrakciją – 27.2 %, H₂O (VE) – 27 % ir MeOH/H₂O (ASE) – 26.5 %. Palyginimui, geltonžiedžio barkūno lapų ir stiebų ekstrakcijos buvo atliktos Turkijoje, kiekvienai ekstrakcijai panaudojant 50 g medžiagos, atliekant

vandeninę ekstrakciją, buvo gauta 33.8 %, soksleto ekstrakciją etanoliu – 5 % ir pagreitintą ekstrakciją organiniais tirpikliais metanoliu – 20 % [10]. Galima teigti, kad rezultatai ganėtinai panašūs.

3.2. Augalo sėklų ekstrakcijos bei jų metu gautos išeigos

Panaudojant augalo sėklas, buvo atliktos dvi ekstrakcijos: klasikinė soksleto ekstrakcija ir superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu. Atlikus ekstrakcijas buvo gautas aliejus.

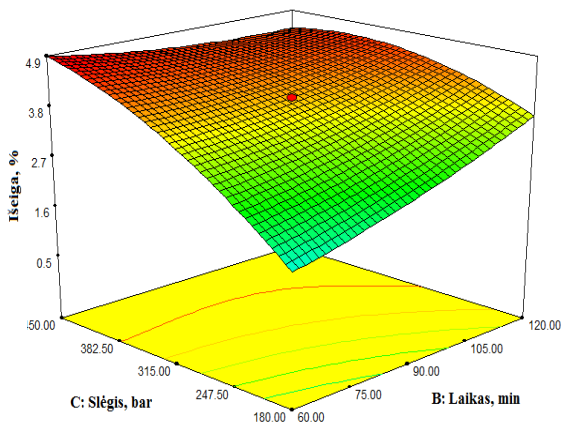
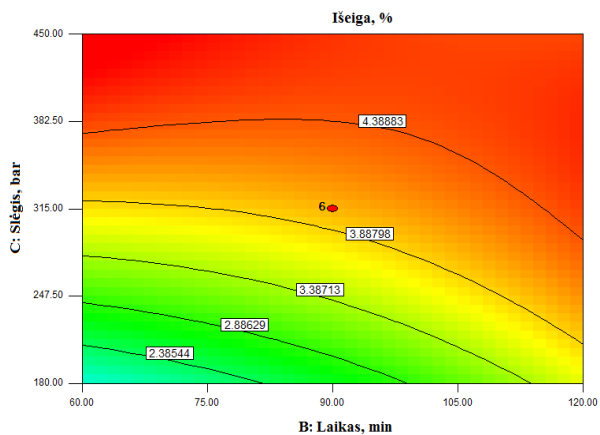
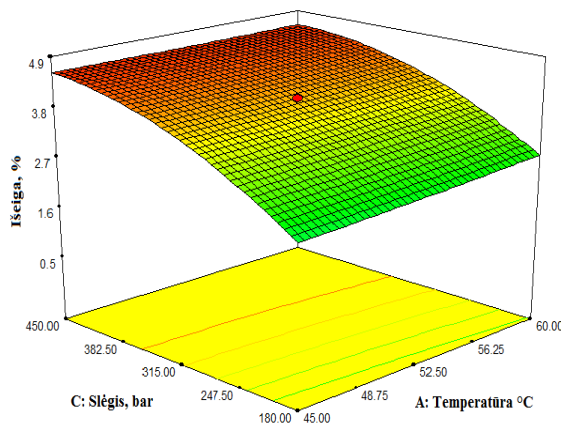
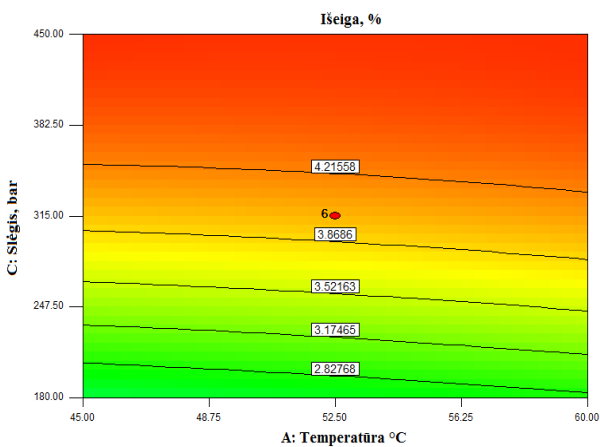
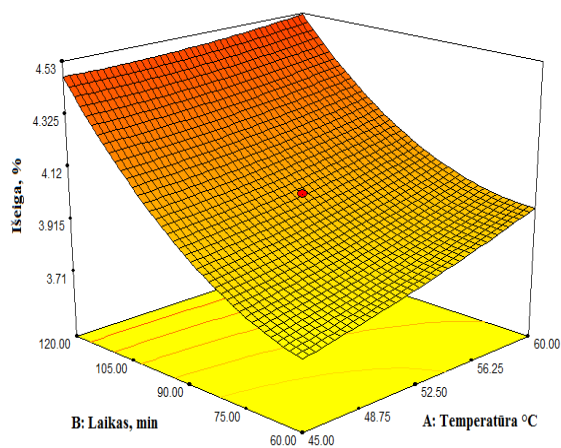
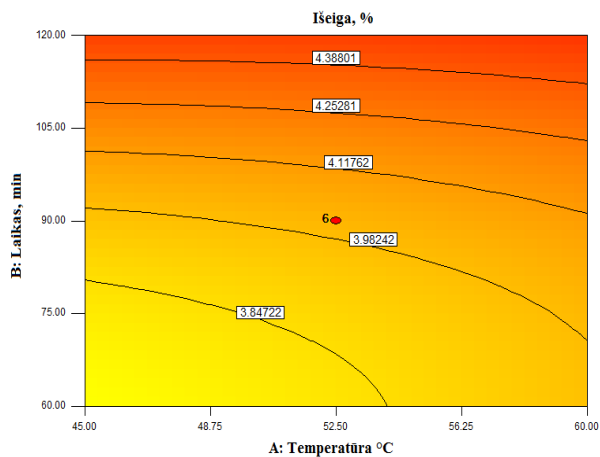
Soksleto ekstrakcijai atlikti, 25 g augalo sėklų buvo ekstrahuojami panaudojant heksaną (15 min. 100 °C temp., 3 h 80 °C temp.). Iš **25 g** bandinio buvo gauta **2.2 g** ekstrakto, kas sudarė **8.9 %** išeią.

CO₂ ekstrakcijai atlikti buvo naudojamas analogiškas medžiagos kiekis (25 g), kaip ir soksleto ekstrakcijoje. Naudojantis statistine (Design–expert 7.0) programa, buvo sudarytas ekstrakcijų modelis, pagal kurį buvo atlikta 20 ekstrakcijų, taikant skirtingus parametrus, kuriuos galite matyti 3 lentelėje.

3 lentelė. Ekstrakcijų atlikimo parametrai ir gautos išeigos, ekstrahuojant geltonžiedžio barkūno sėklas.

Ekstrakcijos numeris	Parametrai			Išeią, %
	A: Temperatūra, °C	B: Laikas, min	C: Slėgis, bar	
1	52.5	90.0	315.0	4.02
2	60.0	120.0	180.0	4.20
3	52.5	90.0	315.0	4.02
4	52.5	90.0	315.0	4.02
5	45.0	120.0	180.0	4.00
6	52.5	90.0	315.0	4.02
7	45.0	60.0	450.0	4.55
8	52.5	90.0	88.0	0.60
9	52.5	90.0	315.0	4.02
10	40.0	90.0	315.0	3.85
11	45.0	60.0	180.0	1.75
12	60.0	60.0	450.0	4.65
13	52.5	140.5	315.0	4.38
14	60.0	120.0	450.0	4.55
15	52.5	90.0	315.0	4.02
16	60.0	60.0	180.0	2.20
17	45.0	120.0	450.0	4.60
18	65.1	90.0	315.0	4.05
19	52.5	39.5	315.0	4.20
20	52.5	90.0	542.0	4.75

Grafiškai pateikiama geltonžiedžio barkūno superkritinės CO₂ ekstrakcijos metu iš sėklų gautų išeių priklausomybė nuo parametrų (temperatūros, slėgio bei laiko) (3.2 pav).



3.2 pav. Geltonžiedžio barkūno superkritinės CO₂ ekstrakcijos metu iš sėklų gautų išeigų priklausomybė nuo temperatūros, slėgio bei laiko

Matematinis modelis, žymintis ekstrakcijos išeigą, kaip nepriklausomų kintamųjų reikšmę, išreiškiamas pagal lygtį (10):

$$I(\%) = 4.01 + 0.076 \times A + 0.33 \times B + 0.97 \times C - 0.050 \times A \times B - 0.075 \times A \times C - 0.54 \times B \times C + 0.017 \times A^2 + 0.14 \times B^2 - 0.43 \times C^2 \quad (10)$$

Koeficientas R^2 parodo visos sistemos variacijų kitimo santykį, maža šio koeficeinto reikšmė rodo prastą priklausomų kintamųjų modelį (Wang ir kt. 2008 m.). Pagal dispersinę analizę koeficientas R^2 šiame modelyje yra lygus 0.93, kas parodo, kad regresijos modelis sistemoje yra aukštas ir patikimas.

Atsižvelgiant į gautas išeigas (3 lentelė), programa sudarė 3 taškų optimalų modelį (4 lentelė), pagal kurį buvo nustatyti tinkamiausi parametrai optimaliausiai išeigai iš geltonžiedžio barkūno sėklų gauti.

4 lentelė. Optimaliausi parametrai didžiausiai išeigai gauti iš geltonžiedžio barkūno sėklų.

Ekstrakcijos numeris	Parametrai			Išeiga, %
	A: Temperatūra, °C	B: Laikas, min	C: Slėgis, bar	
1	49.7	67.6	449.0	4.2
2	56.0	66.5	442.0	4.6
3	53.0	67.0	440.0	4.5

Taip pat buvo atlikta superkritinė CO_2 ekstrakcija su etanolio priedu, optimaliomis sąlygomis. Ekstrakcijai atlikti buvo naudota 5 % (0.2279 ml/min) ir 10 % (0.4558 ml/min) etanolio priedas. Gautos išeigos pateikiamos 5 lentelėje.

5 lentelė. Geltonžiedžio barkūno sėklų ekstrakcijų su etanolio priedu rezultatai.

Ekstrakcijos numeris	Sėklų kiekis, g	Etanolio kiekis, %	Išeiga, %
1	25.0	5.0	8.5
2	25.0	10.0	9.8

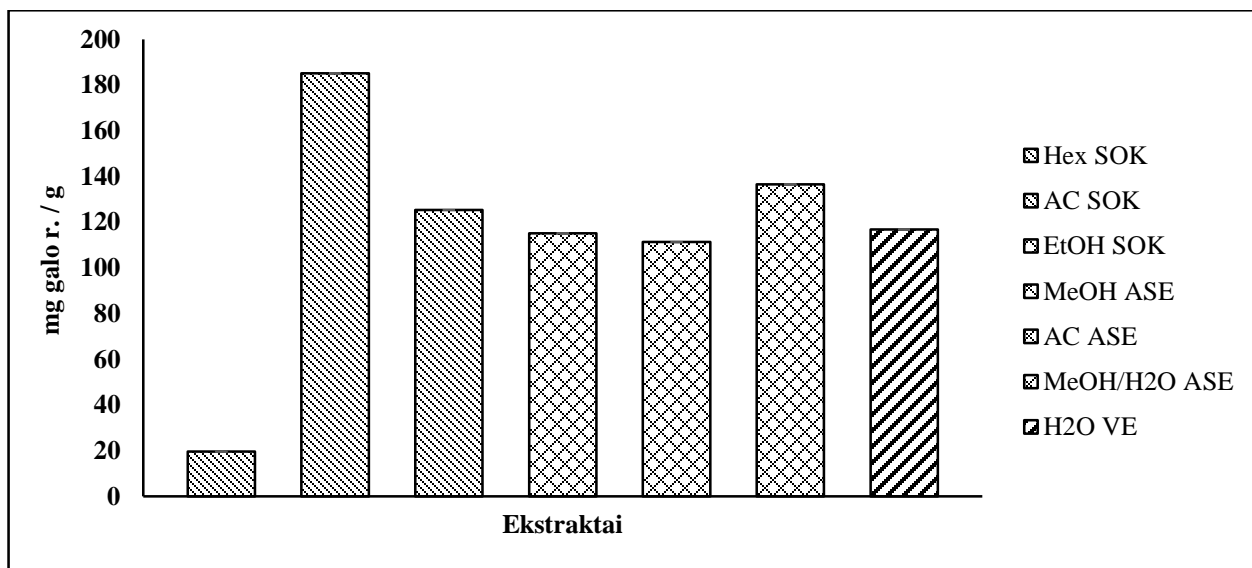
Atlikus ekstrakcijas, buvo nustatyta, kad optimalios sąlygos didžiausiai aliejaus išeigai iš barkūno sėklų gauti yra: temperatūra – 56 °C, slėgis – 442 bar ir laikas – 66.5 min., šiomis sąlygomis buvo gauta didžiausia 4.6 % išeiga. Atsižvelgiant į išeigos priklausomybę nuo parametrų (3.2 pav), galima teigti, kad geriausios išeigos gaunamos, kai optimizuojama pagal slėgį ir temperatūrą arba pagal slėgį ir laiką, mažiausią poveikį išeigai turi optimizavimas pagal temperatūrą ir laiką.

Soksleto ekstrakcijos metu gauta beveik dvigubai (8.9 %) didesnė išeiga, negu taikant CO_2 superkritinę ekstrakciją.

Mokslinėse publikacijose nėra pateikiama informacijos apie superkritinę CO_2 ekstrakciją, naudojant geltonžiedžio barkūno sėklas, tačiau palyginimui atliekant rugių sėlenų superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (77 °C, 550 bar, 120 min.) buvo gauta 2.5 % išeiga [79].

3.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas BFJK (Folin-Ciocalteu), DPPH[•], ABTS^{•+} ir FRAP metodais

Fenolinių junginių kiekis (mg/g) ekstraktuose (0.1%), buvo nustatytas pagal kalibravimo kreivę, atlikus standartinių galo r. tirpalų matavimus ($Y = 3.3217x + 0.0109$, $R^2 = 0.9991$) ir išreikštas galo rūgšties ekvivalentais (GAE). Rezultatai pateikiami 3.3 pav.

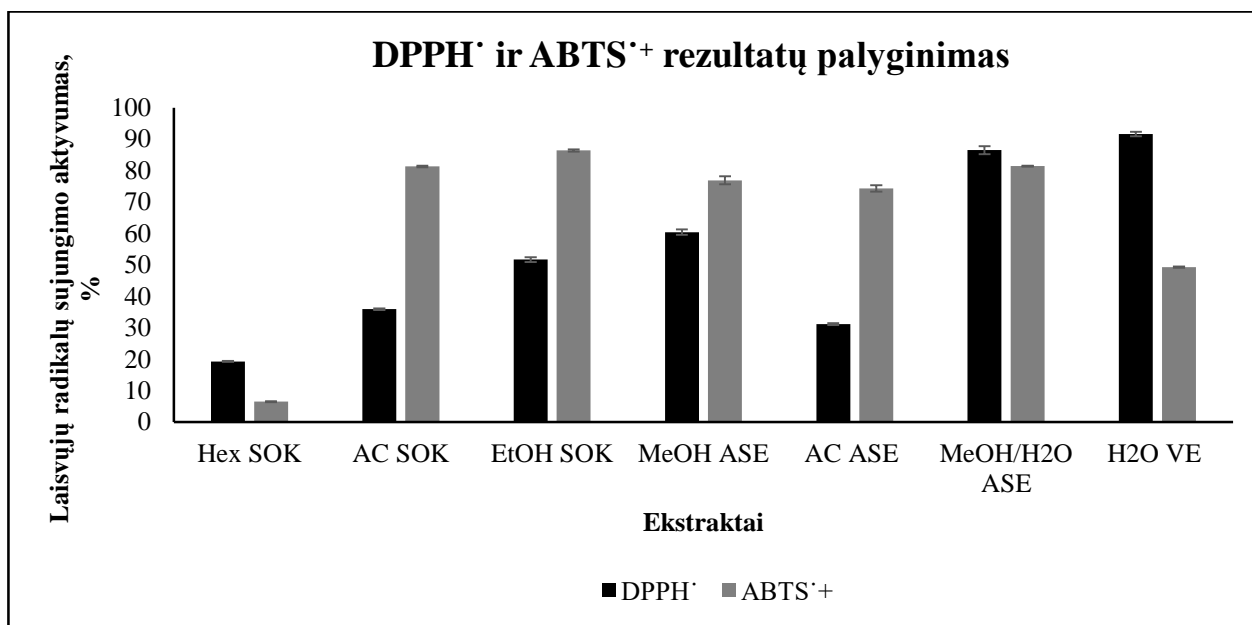


3.3 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis geltonžiedžio barkūno lapų bei stiebų ekstraktuose

Didžiausias fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas acetoniniame (SOK) ekstrakto (185.2 mg/g), MeOH / H₂O (136.6 mg/g) ir etanoliniame (125.4 mg/g).

Laisvųjų radikalų bei laisvųjų radikalų – katijonų sujungimui nustatyti buvo taikyti DPPH[·] ir ABTS^{·+} metodai. Laisvųjų radikalų sujungimas išreiškiamas procentais.

Gauti rezultatai pateikiami 3.4 pav. Reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad ABTS^{·+} metodui atlikti buvo naudoti 1% ekstraktų koncentracijos, o DPPH[·] metodas buvo atliekamas naudojant 2% ekstraktų koncentracijas dėl ganėtinai nedidelio antioksidacinio aktyvumo 1% ekstraktuose.



3.4 pav. Laisvųjų radikalų bei laisvųjų radikalų – katijonų sujungimas (%) geltonžiedžio barkūno lapų bei stiebų ekstraktuose

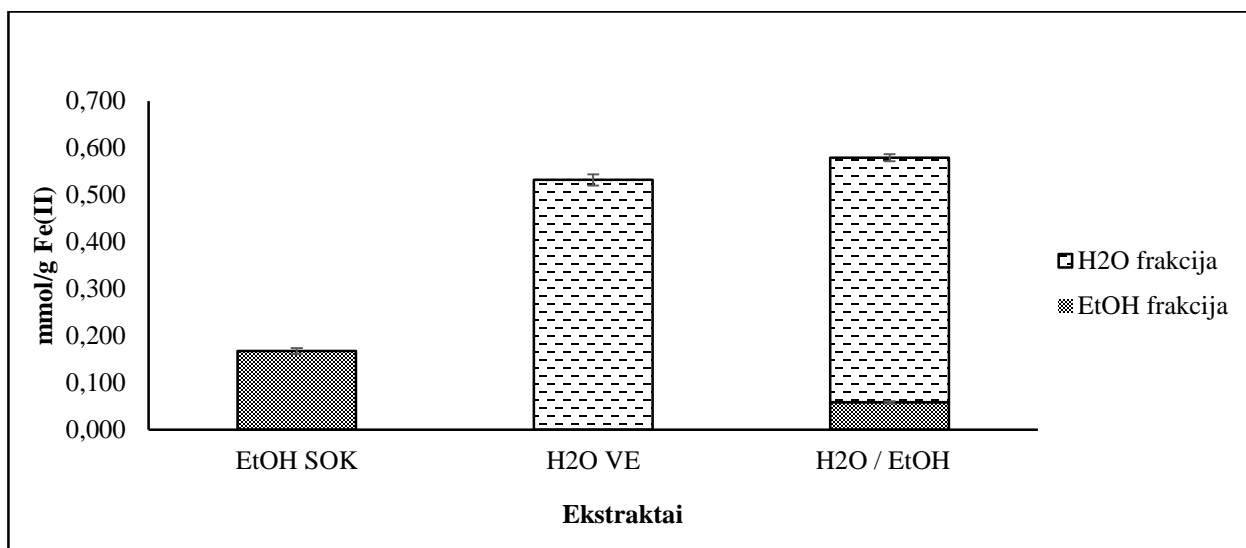
Kalbant apie DPPH[·] metodą, didžiausiu laisvųjų radikalų sujungimu pasižymi H₂O (VE) (91.6 %) bei MeOH / H₂O ekstraktai (86,5 %). Laisvųjų radikalų – katijonų (ABTS^{·+}) – EtOH (SOK) (86.4 %), MeOH / H₂O (81.4 %) bei AC (SOK) – 81.3 %.

Literatūroje nurodoma, kad laisvųjų radikalų sujungimas atliekant DPPH[·] metodą ($M_{DPPH} : M_{Extract} = 1:3$) metanoliniame ekstrakte siekia 76 %, etilo acetato ir acetono ekstraktai pasižymi mažesniu aktyvumu, taip pat gana panašūs rezultatai gaunami atliekant ABTS^{·+} metodą geltonžiedžio barkūno ekstraktuose [32].

Įvertinus ekstraktų aktyvumą, atliekant BFJK, DPPH[·] ir ABTS^{·+} tyrimus ir atsižvelgiant į leidžiamą ekstraktų naudojimą maisto produktuose, tolimesniems tyrimams buvo pasirinkti EtOH bei H₂O (VE) ekstraktai.

FRAP metodas buvo atliktas naudojant EtOH (SOK) bei H₂O (VE) ekstraktus.

Gauti rezultatai išreiškiami milimoliais Fe (II) ir apskaičiuojami remiantis kalibracine kreive ($mM Fe(II) = 1.535 \Delta Abs_{593nm} - 0.0137$). Rezultatai pateikiami 3.5 pav.



3.5 pav. Fe (II) radukuojantis antioksidacinis poveikis geltonžiedžio barkūno EtOH (SOK) bei H₂O (VE) ekstraktuose

Atlikus tyrimą galima matyti, kad vandeninis ekstraktas rodo kelis kartus didesnę aktyvumą, negu etanolinis ekstraktas, tačiau atlikus fracionavimą, kuriame vandeninis ekstraktas buvo ištirpinamas etanolyje ir separuojant etanolio frakcija atskiriama, o likęs ekstraktas ištirpinamas vandenyje, trečiame grafiko stulpelyje galime matyti, kad didžioji dalis frakcijos yra netirpi etanolyje. Atsižvelgiant į tai, kad fenoliniai junginiai yra tirpūs alkoholyje, galima daryti prielaidą, kad vandeninis ekstraktas turi nemažai ne fenolinių junginių, tai gali būti cukrūs ir kiti junginiai, kurie maiste skatins oksidacijos procesus, todėl po šio tyrimo buvo nuspręsta tolimesnius tyrimus su riebalais atlikti naudojant tik EtOH (SOK) ekstraktą.

Mokslinėse publikacijose nėra pateikiama informacijos apie geltonžiedžio barkūno antioksidacinį aktyvumą atliekant FRAP metodą.

3.4. Pirminių ir antrinių riebalų oksidacijos produktų nustatymas kiaulienos riebaluose

Šiems eksperimentams atlikti buvo naudoti kiaulienos riebalai. Kiaulienos riebalai buvo pasirinkti atsižvelgiant į tai, kad riebaluose autooksidacija yra svarbiausias procesas lemiantis jų juslines savybes.

Šio eksperimento tikslas buvo nustatyti, ar įterpiant geltonžiedžio barkūno etanolinį EtOH (SOK) 1 % ekstraktą, pavyks sulėtinti oksidacijos procesus riebaluose.

Į susmulkintus kiaulienos riebalus buvo pridedama:

- **1% *Melilotus officinalis* lapų ir stiebų etanolinio ekstrakto (EtOH SOK);**

- **75 mg/kg sintetinio antioksidanto BHT (2,6-Di-tret-butyl-4-methylphenol, minimum 99% GC), (Sigma-Aldrich, USA);**
- **1% Raudonųjų vynuogių ekstraktas;**
- **Kontroliniam bandiniui buvo naudoti kiaulienos riebalai be priedų.**

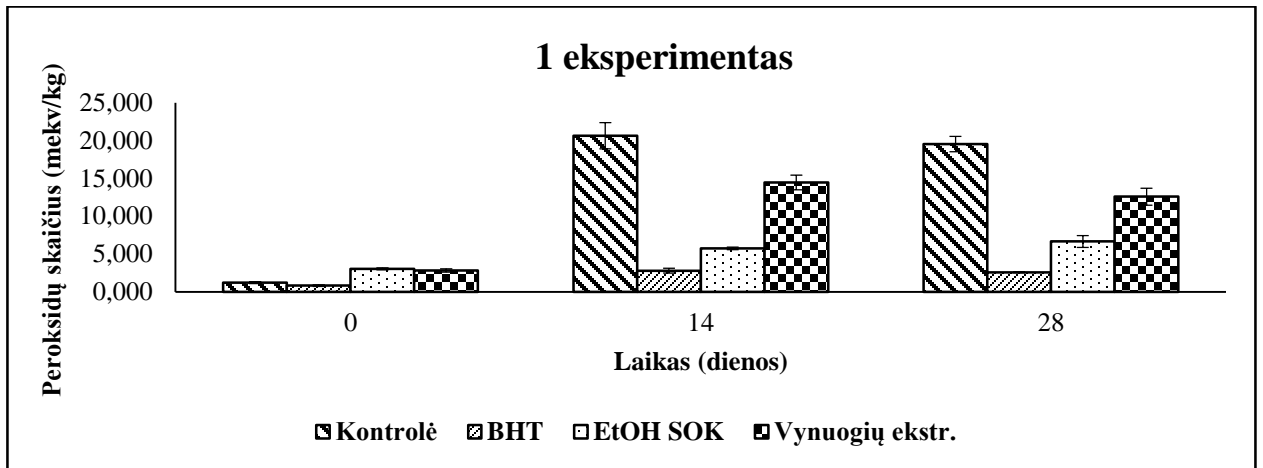
Tokie bandiniai buvo pasirinkti tam, kad aiškiai būtų palygini skirtingi priedai. BHT žinomas kaip sintetinis antioksidantas yra naudojamas maisto pramonėje, dėl šio antioksidanto kyla prieštaringų nuomonių, vieni šaltiniai teigia, kad BHT yra kenksmingas sveikatai (Bekhit, 2003 m.) kiti pabrėžia jo tinkamumą maisto produktuose (Moure, 2001 m.), tačiau kaip bebūtų, palyginimui BHT antioksidantas yra tinkamas [80]. BHT buvo naudotas pagal reglamentą (EB Nr. 1331/2008) [81]. Raudonųjų vynuogių ekstraktas buvo pasirinktas, kaip prooksidantas, kuris priešingai nei minėtasis BHT, skatina oksidacijos procesus maiste [82].

Paruošti bandiniai buvo laikomi šaldytuve iki jų panaudojimo. Eksperimentai buvo atliekami tokia seka (viso buvo atlikti trys eksperimentai):

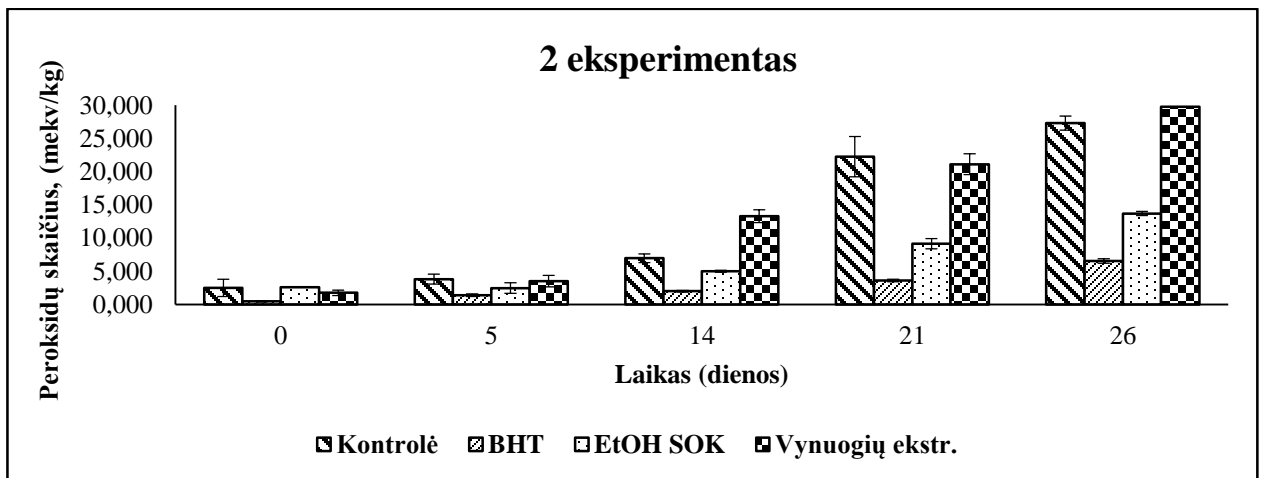
- **1. Matavimai buvo atliekami pirmąją paruošimo dieną, po 14 ir 28 dienų.**
- **2. Matavimai buvo atliekami pirmąją paruošimo dieną, po 5, 14, 21 ir 26 dienų.**
- **3. Matavimai buvo atliekami pirmąją paruošimo dieną, po 5, 13 ir 21 dienų.**

Eksperimentų metu buvo nustatomas pirminių oksidacijos produktų (peroksidų) ir antrinių oksidacijos produktų (aldehidų, ketonų ir kt.) kiekiai riebaluose, atitinkamomis eksperimentų dienomis.

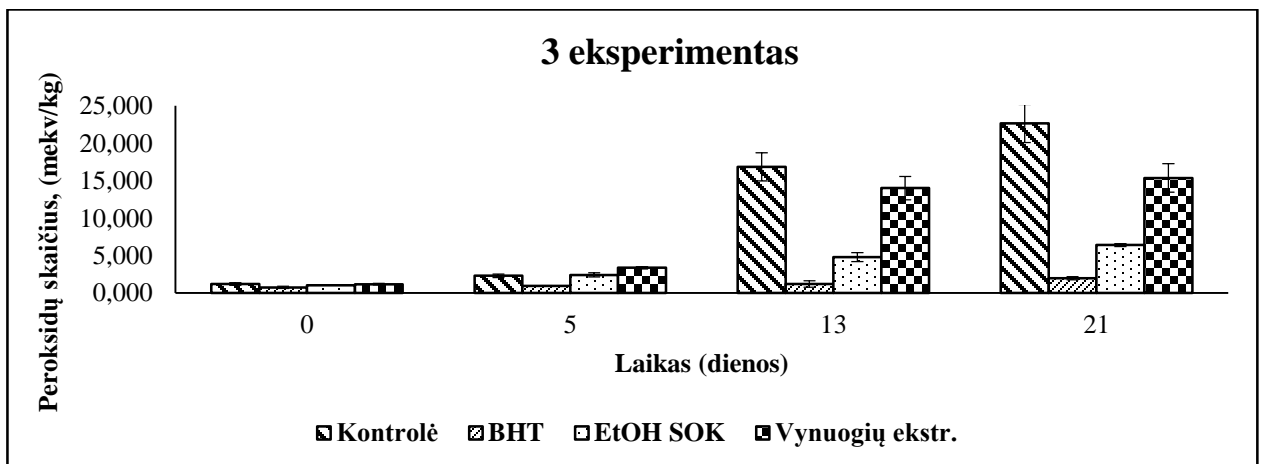
Per mėnesį buvo atliekama po vieną eksperimentą, toks eksperimentų kiekis buvo pasirinktas kad būtų gauti patikimesni rezultatai. Gauti peroksidų skaičiaus rezultatai pateikiami 3.6, 3.7 ir 3.8 pav. Antrinių riebalų oksidacijos produktų kiekiai pateikiami 3.9, 3.10 ir 3.11 pav.



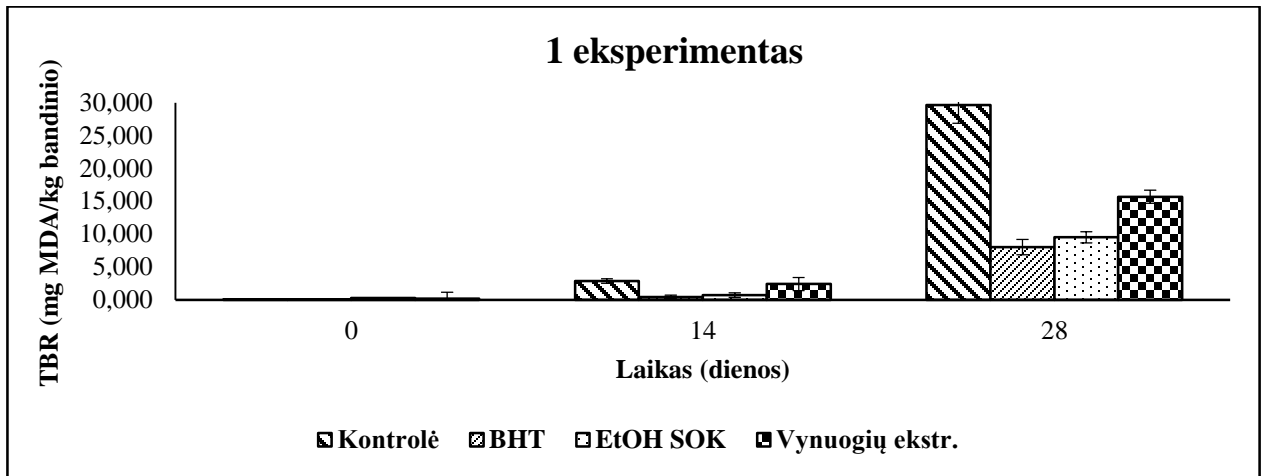
3.6 pav. Peroksidų skaičius kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose 0, po 14 ir 28 d.



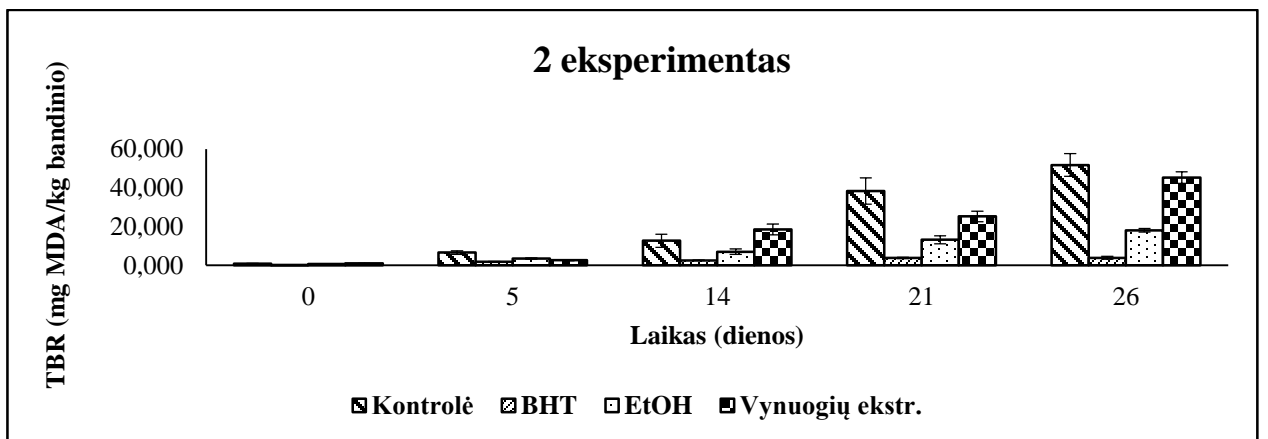
3.7 pav. Peroksidų skaičius kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose, 0 po 5, 14, 21 ir 26 d.



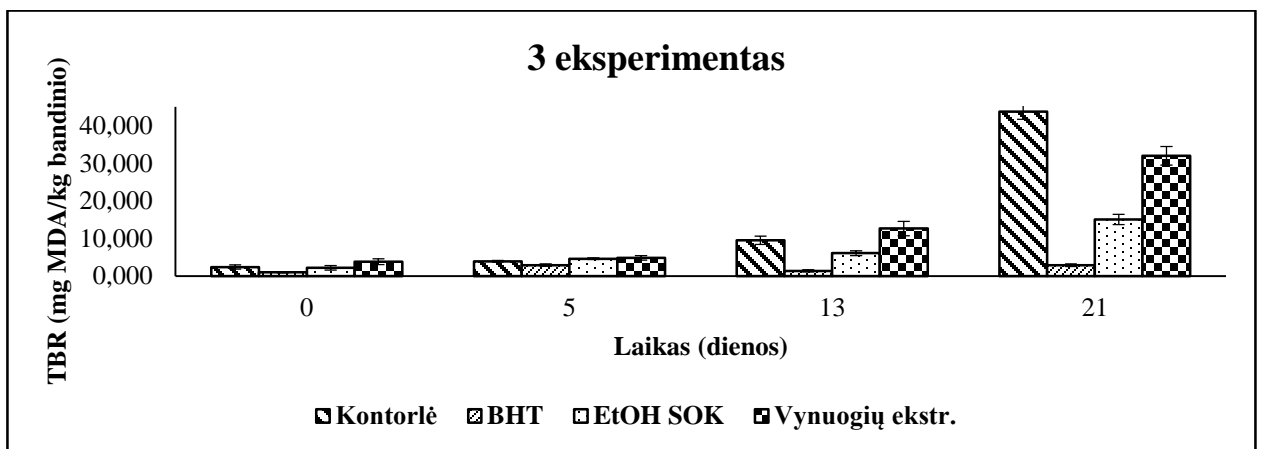
3.8 pav. Peroksidų skaičius kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose, 0 po 5, 13 ir 21 d.



3.9 pav. Antrinių riebalų oksidacijos produktų kiekis kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose, 0 po 14 ir 28 d.



3.10 pav. Antrinių riebalų oksidacijos produktų kiekis kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose, 0 po 5, 14, 21 ir 26 d.



3.11 pav. Antrinių riebalų oksidacijos produktų kiekis kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose, 0 po 5, 13 ir 21 d.

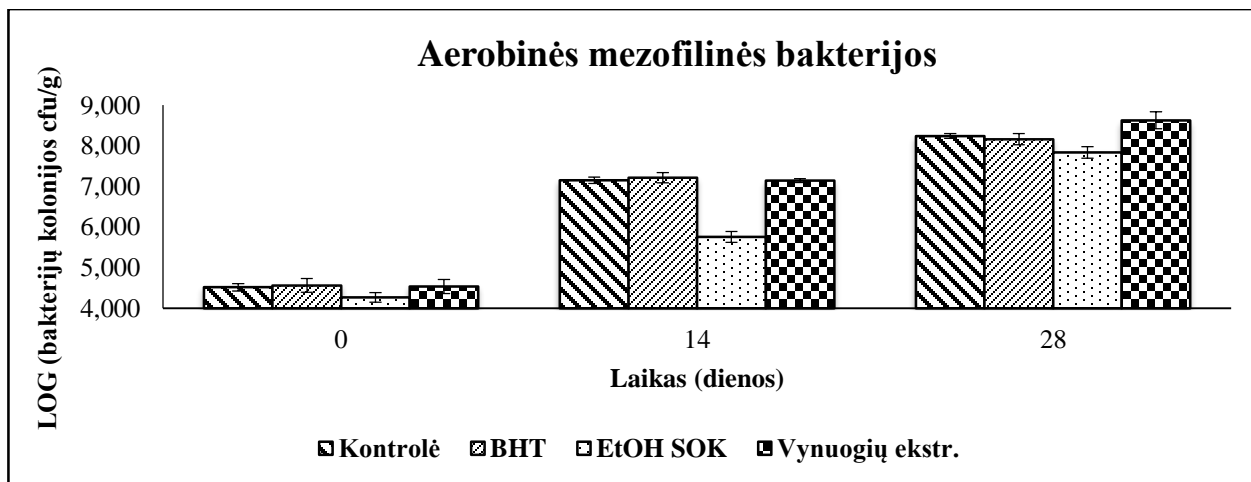
Kalbant apie peroksidų skaičių, galime matyti, kad visuose trijuose eksperimentuose rezultatai išlieka panašūs, didžiausi peroksidų kiekiai susidaro kontroliniame bandinyje ir bandinyje su vynuogių ekstraktu. Atitinkamomis eksperimentų dienomis peroksidų kiekis proporcingai didėja visuose ekstraktuose, tačiau mažiausiai jų susidaro BHT bandinyje, kas yra logiška, nes tai bandinys su sintetiniu antioksidantu, tačiau bandinyje EtOH (SOK) taip pat susidaro pakankamai nedideli peroksidų kiekiai, lyginant su BHT bandiniu, pvz.: pažvelgus į 2 eksperimentą, pirmąją eksperimento dieną peroksidų skaičius BHT bandinyje siekia tik 0.5 mekv/kg bandinio, o EtOH (SOK) bandinyje 2.5 mekv/kg, 14-tą eksperimento dieną BHT bandinyje susidaro 2 mekv/kg peroksidų, o EtOH (SOK) bandinyje 5 mekv/kg paskutinę dieną BHT bandinyje susidaro 6.5 mekv/kg, o EtOH (SOK) – 13 mekv/kg. Palyginimui tomis pačiomis dienomis kontroliniame bandinyje susidaro 2.5, 7 ir 27 mekv/kg o bandinyje su vynuogių ekstraktu – 1.7, 13 ir 29 mekv/kg. Svarbu pabrėžti, kad nors pirmomis dienomis rezultatai panašūs kontroliniame, EtOH (SOK) ir vynuogių ekstrakto bandiniuose, po atitinkamo dienų skaičiaus rezultatai stipriai skiriasi. Galima teigti, kad geltonžiedžio barkūno EtOH (SOK) ekstraktas riebalų laikymo eigoje sumažina peroksidų susidarymą.

Pažvelgus į antrinių oksidacijos produktų susidarymą, galime matyti panašią seką, kaip ir peroksidų skaičiaus nustatyme. Didesnis antrinių oksidacijos produktų susidarymas pastebimas tik po 13-14 dienų, nuo bandinių paruošimo. Tiek peroksidų, tiek ir antrinių oksidacijos produktų daugiausiai susidaro kontroliniame bandinyje ir bandinyje su vynuogių ekstraktu. Lyginant BHT ir EtOH (SOK) bandinių rezultatus, jie išlieka tendencingi, kaip ir peroksidų susidaryme, Pažvelgus į 2 eksperimentą, po 14 dienų BHT bandinyje antrinių riebalų oksidacijos produktų kiekis siekia 2.6 mg MDA/kg bandinio, o EtOH (SOK) bandinyje 7 mg MDA/kg, 26-tą eksperimento dieną, BHT bandinyje susidaro 4 mg MDA/kg, o EtOH (SOK) bandinyje 18 mg MDA/kg. Palyginimui, tomis pačiomis dienomis kontroliniame bandinyje susidaro 12 ir 51 mg MDA/kg, o bandinyje su vynuogių ekstraktu 18.5 ir 45 mg MDA/kg. Nors BHT bandiniuose susidaro mažiau antrinių riebalų oksidacijos produktų, EtOH (SOK) ekstraktas matomai taip pat stabdo jų susidarymą. Galima daryti išvadą, kad geltonžiedžio barkūno EtOH (SOK) ekstraktas gali būti nebloga alternatyva sintetiniam antioksidantui, žinant, kad tai natūralus antioksidantų šaltinis.

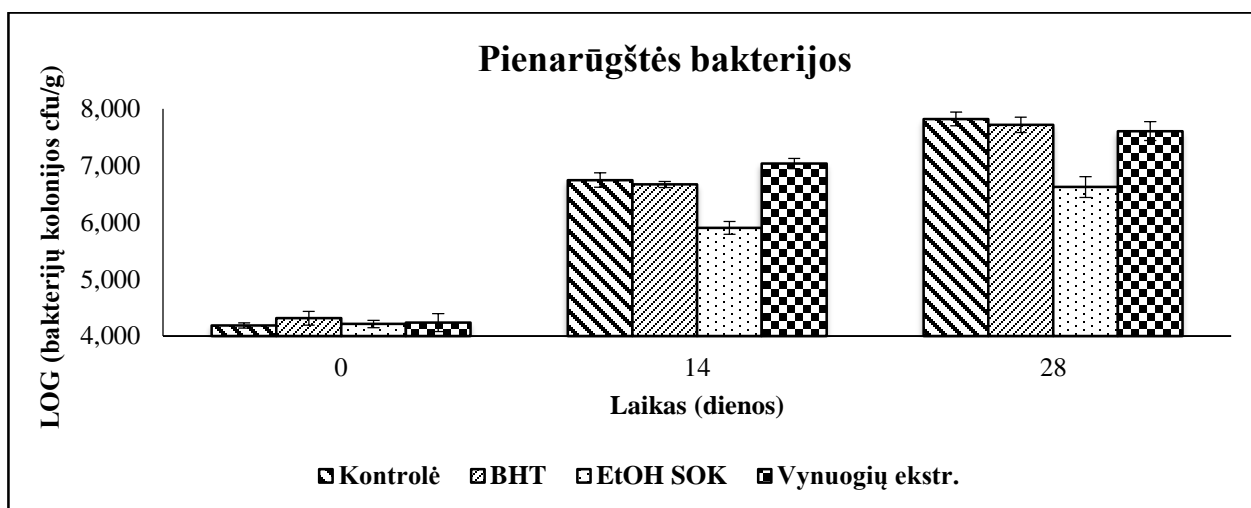
3.5. Antimikrobinio aktyvumo nustatymas kiaulienos riebaluose

Šiam eksperimentui atlikti buvo naudoti kiaulienos riebalai. Kaip ir prieš tai atliktuose pirminių bei antrinių oksidacijos produktų tyrimuose, taip ir atliekant antimikrobinio aktyvumo testą, buvo atliekamas analogiškas eksperimentų kiekis tomis pačiomis dienomis, naudojant tuos pačius bandinius.

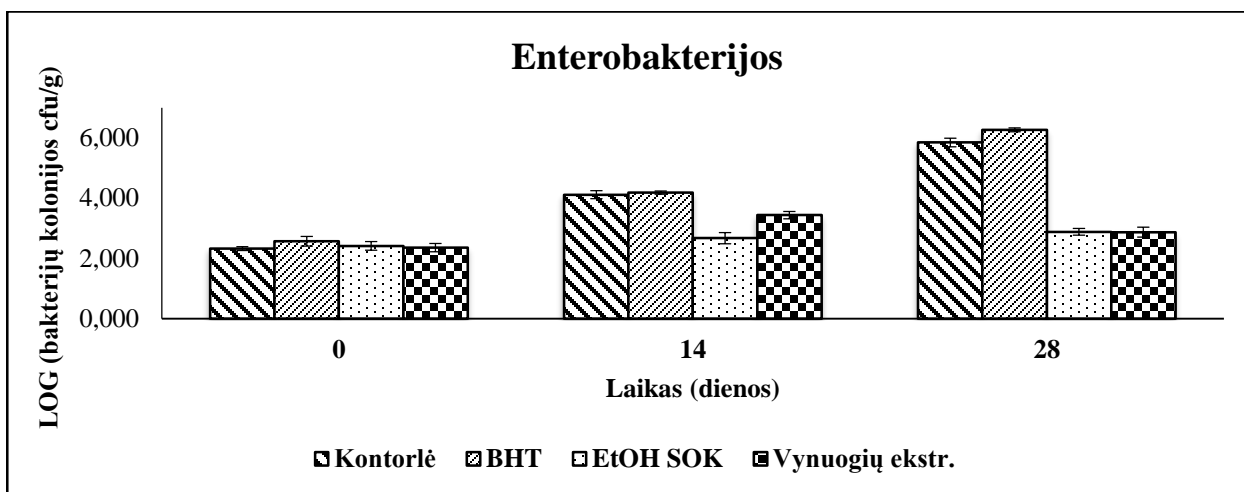
Pirmojo eksperimento rezultatai pateikiami 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 ir 3.16 pav. Kitų eksperimentų rezultatai pateikiami priedų skyriuje (I – II priedai).



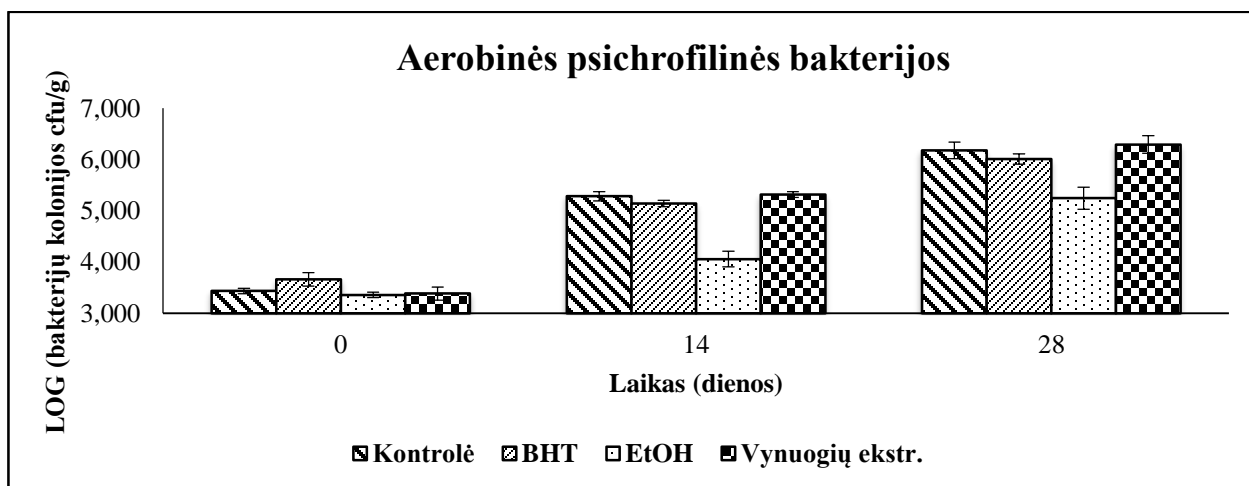
3.12 pav. Aerobinių mezofilinių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose



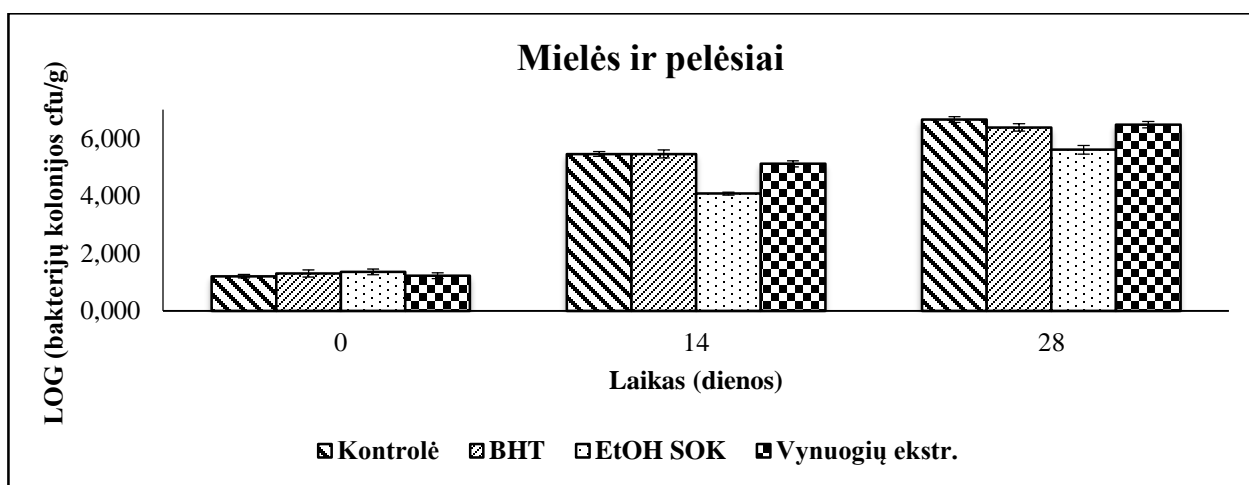
3.13 pav. Pienarūgščių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose



3.14 pav. Enterobakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose



3.15 pav. Aerobinių psichrofilinių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose



3.16 pav. Mielių ir pelėsių skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose

Atlikus eksperimentą galime matyti, kad geltonžiedžio barkūno EtOH (SOK) ekstraktas pasižymi antimikrobinu aktyvumu ir stabdo mikroorganizmų augimą geriau negu kiti bandiniai.

Kalbant apie pirmąjį antimikrobinio aktyvumo eksperimentą, galime pastebėti, kad didžiausias skirtumas tarp bandinio EtOH (SOK) ir kitų bandinių išryškėja po 14 dienų nuo bandinių paruošimo. Jeigu pirmąjį eksperimento dieną rezultatai panašūs visuose bandiniuose, tai po 14 d., bandinyje EtOH (SOK) susiformuoja mažiausias bakterijų skaičius, kalbant apie visus eksperimentus. Paskutinę eksperimento dieną bakterijų skaičius ženkliai padidėja visuose bandiniuose, tačiau mažiausiai jų susiformuoja bandinyje EtOH (SOK), išskyrus enterobakterijas, kurių panašus kiekis susiformuoja ir raudonųjų vynuogių ekstrakto.

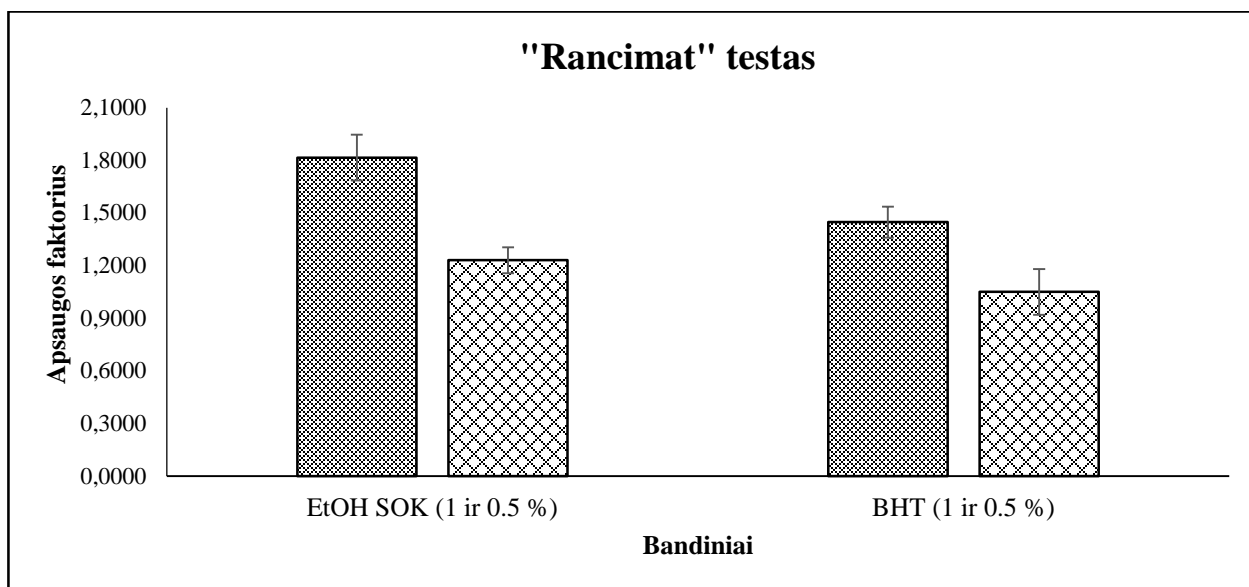
Kituose eksperimentuose (I – II priedai) rezultatai panašūs, kaip ir pirmajame. Ypač gerą antimikrobinį aktyvumą galima pastebėti pažvelgus į 3 eksperimentą, kuriame bandinys EtOH (SOK) stipriai išsiskiria iš kitų bandinių savo antimikrobinu aktyvumu prieš bakterijas.

Mokslinėse publikacijose pateikiama informacijos apie geltonžiedžio barkūno antimikrobinį aktyvumą. Turkijoje atlikus antimikrobinus tyrimus su geltonžiedžiu barkūnu, buvo nustatyta, kad etanolinis bei vandeninis *Melilotus officinalis* ekstraktai, pasižymi geresne antimikrobine veikla negu 7 antibiotikai. Ypač geras poveikis buvo pastebėtas prieš *Pseudomonas aeruginosa* enterobakterijas [10].

Serbijoje ir Juodkalnijoje buvo atlikti antimikrobiniai tyrimai, panaudojant geltonžiedį barkūną. Augalo etilacetato ekstraktas pasižymėjo geru antimikrobinu aktyvumu prieš patogeninius mikroorganizmus (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Staphylococcus aureus*) [83].

3.6. Oksidacinio stabilumo kiaulienos riebaluose nustatymas

Taip pat buvo įvertintas kiaulienos riebalų oksidacinis stabilumas, pridėdant į juos EtOH (SOK) ekstrakto ir palyginant su sintetiniu antioksidantu BHT. Gauti rezultatai pateikiami 3.17 pav.



3.17 pav. Oksidacinis stabilumas bandiniuose, atliekant „Rancimat“ testą.

Pirmasis grafiko stulpelis parodo oksidacinį stabilumą bandiniuose su 1 % ir 0.5 % priedo.

Oksidacinis stabilumas riebaluose, buvo nustatytas pagal indukcinį periodą ir išreikštas apsaugos faktoriumi. Galime matyti, kad tiek 1 % tiek 0.5 % bandiniuose su EtOH (SOK) ekstraktu riebalų skilimas įvyksta po ilgesnio laiko, negu bandiniuose su sintetiniu antioksidantu BHT, kuriuose riebalų oksidacija prasideda greičiau. Galima daryti išvadą, kad riebalai su EtOH (SOK) ekstraktu išlieka stabilūs ilgesnį laiką, negu su sintetiniu antioksidantu BHT.

Palyginimui, „Rancimat“ testas buvo atliktas panaudojant vyno išspaudų produktus, pridėdam juos į alyvuogių aliejų bei kiaulienos riebalus, apsaugos faktorius bandinyje su alyvuogių aliejumi buvo 1.087, o bandinyje su kiaulienos riebalais 1.145 [84]. Šiuo atveju apsaugos faktorius kiaulienos riebaluose su geltonžiedžio barkūno EtOH (SOK) ekstraktu siekia 1.8 (1 %) ir 1.145 (0.5 %). Matome, kad apsaugos faktorius atliktame bandyme aukštesnis, lyginant su literatūros duomenimis, panaudojant vynuogių išspaudas.

3.7. Kokybinė ekstraktų analizė (UESCh-Q-TOF)

Junginių identifikavimas buvo atliktas panaudojant augalo lapų, stiebų bei sėklų ekstraktus. Gauti rezultatai pateikiami 6 lentelėje. Atskirų ekstraktų chromatogramos pateikiamos priedų skyriuje (III priedas).

6 lentelė. Geltonžiedžio barkūno cheminės sudėties nustatymo rezultatai

Nr.	Junginys	Ekstraktas	Jono formulė (m/z)	Junginio formulė (+H)	Junginio molinė masė, M	Sulaikymo laikas, min
1.	Arabinozė	MeOH (ASE), MeOH/H ₂ O (ASE)	C ₅ H ₉ O ₅	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.12	0.4
2.	Sacharozė	MeOH (ASE), MeOH/H ₂ O (ASE)	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.29	0.4
3.	Arabono rūgštis	MeOH/H ₂ O (ASE)	C ₅ H ₉ O ₆	C ₅ H ₁₀ O ₆	166.12	0.4
4.	Gliukono rūgštis	MeOH/H ₂ O (ASE)	C ₆ H ₁₁ O ₇	C ₆ H ₁₂ O ₇	196.15	0.4
5.	Benzotetrafen-3-olis	MeOH/H ₂ O (ASE)	C ₂₂ H ₁₃ O	C ₂₂ H ₁₄ O	294.34	0.4
6.	Pentahidroksiheptano rūgštis	MeOH (ASE)	C ₁₃ H ₂₃ O ₁₃	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₃	388.32	0.4
7.	Malio rūgštis	MeOH/H ₂ O (ASE), H ₂ O (VE)	C ₄ H ₅ O ₅	C ₄ H ₆ O ₅	134.08	0.5
8.	Citrinos rūgštis	MeOH/H ₂ O (ASE), H ₂ O (VE)	C ₆ H ₇ O ₇	C ₆ H ₈ O ₇	192.12	0.8
9.	2 – Furano rūgštis	H ₂ O (VE)	C ₅ H ₃ O ₃	C ₅ H ₄ O ₃	112.08	0.9
10.	Hekspiranozidas	MeOH (ASE), MeOH/H ₂ O (ASE)	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₃	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₃		1.7
11.	4 – (β-D- Gliukopiranoziloksi) benzoinė rūgštis	H ₂ O (VE)	C ₁₃ H ₁₅ O ₈	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	300.26	1.7
12.	Bilobalidas	MeOH (ASE), MeOH/H ₂ O (ASE), EtOH (SOK), AC (SOK), AC (ASE), H ₂ O (VE)	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326.29	1.8
13.	Hidrosminas	AC (SOK), AC (ASE), H ₂ O (VE)	C ₃₀ H ₃₅ O ₁₆	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₆	652.59	1.8
14.	Rutinas	MeOH (ASE), MeOH/H ₂ O (ASE), EtOH (SOK)	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.52	2.0
15.	Anisatinas	MeOH (ASE), MeOH/H ₂ O (ASE), EtOH (SOK)	C ₁₅ H ₁₉ O ₈	C ₁₅ H ₂₀ O ₈	328.31	2.1
16.	Kamferolio robinozidas	EtOH (SOK)	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	740.65	2.1
17.	p – Kumarino rūgštis	EtOH (SOK), AC (SOK)	C ₉ H ₇ O ₃	C ₉ H ₈ O ₃	164.15	2.2
18.	Paenolis	MeOH (ASE), MeOH/H ₂ O (ASE), EtOH (SOK), AC (SOK), AC (ASE), H ₂ O (VE), Hex (SOK)	C ₉ H ₉ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.17	2.7
19.	Azelaino rūgštis	Hex (SOK)	C ₉ H ₁₅ O ₄	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.22	2.8
20.	Salicilo rūgštis	EtOH (SOK), MeOH/H ₂ O (ASE)	C ₇ H ₅ O ₃	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	3.0
21.	(9E) – 9 – Oktadeceno rūgštis	Hex-S (SOK), *SK-CO ₂ , SK-CO ₂ (5%, 10% EtOH)	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	312.44	5.0
22.	Koriolio rūgštis	Hex-S (SOK), *SK-CO ₂ , SK-CO ₂ (5%, 10% EtOH)	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	296.44	6.3
23.	Trinonil – 1,2,4 – benzentrikarboksilata s	Hex-S (SOK), *SK-CO ₂ , SK-CO ₂ (5%, 10% EtOH)	C ₃₆ H ₅₉ O ₆	C ₃₆ H ₆₀ O ₆	588.85	6.4
24.	2,6 – di-tert-butil fenolis	Hex-S (SOK), *SK-CO ₂ , SK-CO ₂ (5%, 10% EtOH)	C ₁₄ H ₂₁ O	C ₁₄ H ₂₂ O	200.32	6.8
25.	α – Linoleno rūgštis	Hex (SOK), AC (SOK), Hex-S (SOK), *SK-CO ₂ , SK-CO ₂ (5%, 10% EtOH)	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.43	7.7
26.	Linolo rūgštis	Hex-S (SOK), *SK-CO ₂ , SK-CO ₂ (5%, 10% EtOH)	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.44	8.2

Atlikus kokybinę ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos analizę, geltonžiedžio barkūno ekstraktuose buvo nustatyti 26 junginiai tarp kurių dominuojantys: flavonoidai, fenolines rūgštys (augalo lapų bei stiebų ekstraktuose), aliejiniuose ekstraktuose Hex-S (SOK), *SK-CO₂, SK-CO₂ (5%, 10% EtOH)) buvo nustatytos ypač svarbios nepakeičiamos riebalų rūgštys α – linoleno (Omega – 3) ir linolo (Omega – 6).

Gauti rezultatai palyginti su literatūros duomenimis. Daugelis junginių atitinka minimumus literatūroje, mokslinėse duomenų bazėse pateikiama informacijos apie geltonžiedžio barkūno ekstraktuose nustatytus flavonoidus, fenolines rūgštis, riebalų rūgštis, palyginus jų išsiskyrimo laikus galima pastebėti, kad rezultatai sutampa [12, 14, 19, 26, 28].

3.8. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas geltonžiedžio barkūno sėklose

RR sudėtis dujų chromatografijos (DC – LJD) metodu, buvo nustatyta superkritinės CO₂ ekstrakcijos metu, optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis gautame aliejuje. Rūgštys buvo nustatytos lyginant jų sulaikymo laikus su žinomų rūgščių (standartų) sulaikymo laikais, o jų procentinė sudėtis išreikšta, pagal gautus smailių plotus. Rezultatai pateikiami 7 lentelėje.

7 lentelė. RR sudėtis geltonžiedžio barkūno (*SK-CO₂) sėklų ekstrakto

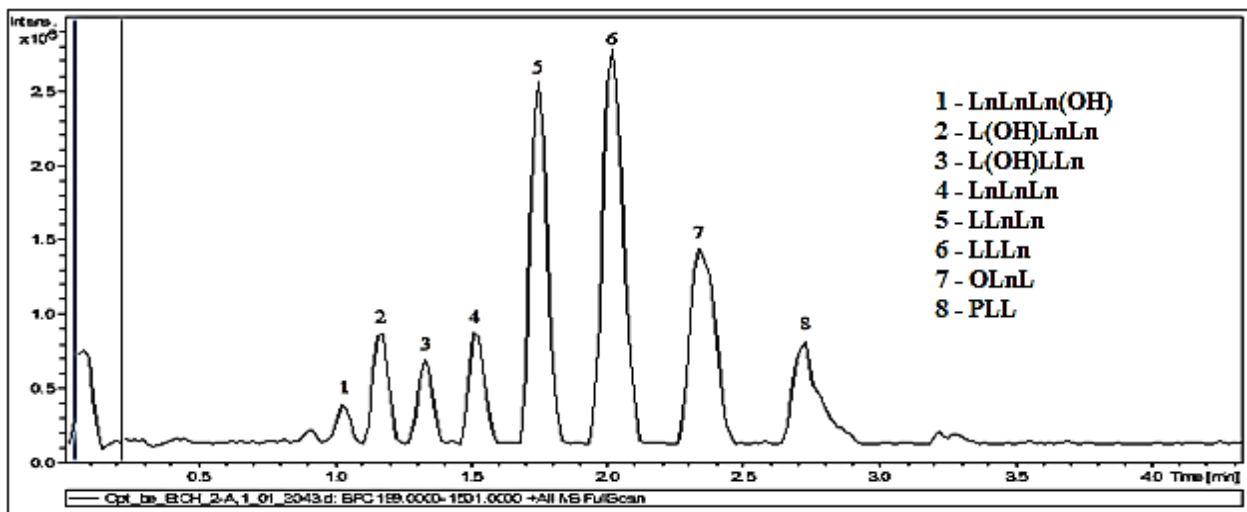
Nr.	Junginys	Junginio kiekis (%)	Sulaikymo laikas, min
1.	Miristo rūgštis (C14:0)	0.10	36.56
2.	Pentadekano rūgštis (C15:0)	0.13	38.68
3.	Palmitino rūgštis (C16:0)	8.63	40.67
4.	Stearino rūgštis (C18:0)	1.65	44.38
5.	Oleino rūgštis (C18:1n9c)	7.99	45.58
6.	Linolo rūgštis (C18:2n6c)	43.92	47.39
7.	γ – Linoleno rūgštis (C18:3n6)	0.54	47.90
8.	α – Linoleno rūgštis (C18:3n3)	34.76	49.65
9.	Cis-8, 14 – Eikozadieno rūgštis (C20:2)	0.10	50.91
10.	Beheno rūgštis (C22:0)	0.23	51.34
11.	Arachidono rūgštis (C20:4n6)	0.12	53.13
12.	Cis – 11, 14, 17 – Eikozatrieno rūgštis (C20:3n3)	0.14	53.13
13.	Lignocerino rūgštis (C24:0)	0.12	55.05
14.	Kitos rūgštys	~2	-

Atlikus riebalų rūgščių sudėties analizę, galime matyti, kad geltonžiedžio barkūno sėklose dominuoja 5 RR. Daugiausiai (43.92 %) sudėtyje randama linolo rūgštis (omega – 6) bei α – linoleno (34.76 %) (omega – 3). Taip pat palmitino (8.63 %), oleino (7.99 %) ir stearino (1.65 %) rūgščių. Kitų rūgščių kiekiai labai maži ir nesiekia 1 %. Dujų chromatografijos metodas patvirtina ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu gautus rezultatus, aliejinių ekstraktų sudėtyje taip pat randamos linolo

bei α – linoleno rūgštys. Lyginant gautus rezultatus su literatūros duomenimis galime teigti, kad rūgštys nustatytos tiksliai, nes mokslinėse domenų bazėse pateikiamuose straipsniuose apie geltonžiedį barkūną, dominuojančios yra būtent šios rūgštys [26, 28].

3.9. Trigliceridų sudėties nustatymas geltonžiedžio barkūno sėklose

Trigliceridų analizė buvo atlikta taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografiją – masių spektrometriją. Analizei buvo naudoti visi iš sėklų superkritinės CO₂ ekstrakcijos metu gauti ekstraktai (*SK-CO₂, SK-CO₂ (5%, 10% EtOH)). *SK-CO₂ chromatograma pateikiama 3.18 pav., kitos chromatogramos pateikiamos priedų skyriuje (IV priedas).



3.18 pav. Trigliceridai aptikti geltonžiedžio barkūno sėklų *SK-CO₂ ekstrakto

Pagal gautas junginių mases bei atsižvelgiant į riebalų rūgščių sudėties nustatymo rezultatus, buvo nustatyti 8, geltonžiedžio barkūno aliejuose esantys trigliceridai. Gauti trigliceridų analizės rezultatai pateikiami 8 lentelėje, trigliceridų formulės pateikiamos priedų skyriuje (IV priedas).

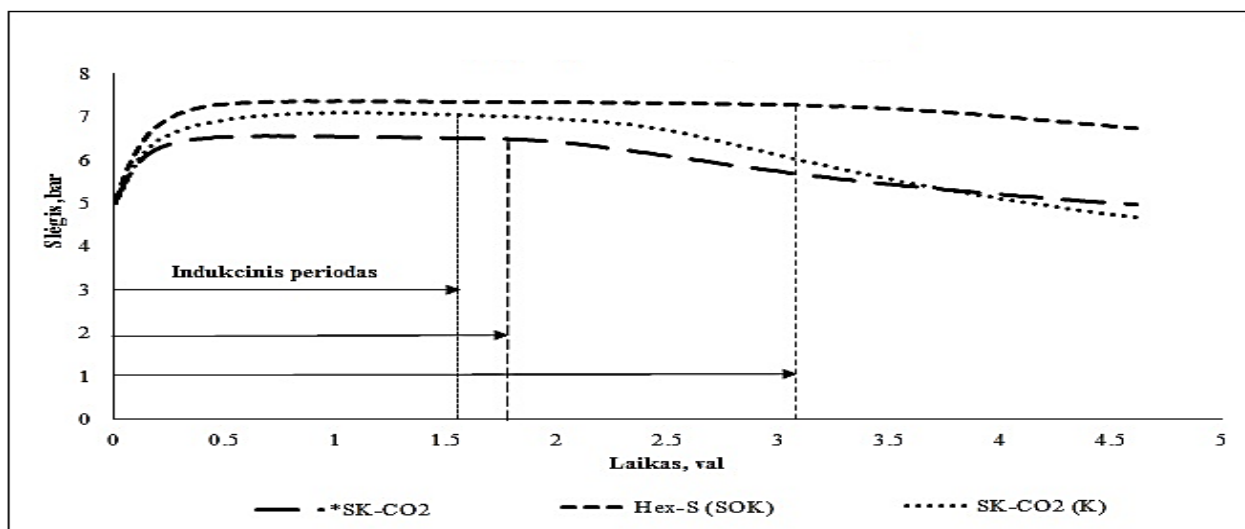
8 lentelė. Trigliceridų kompozicija geltonžiedžio barkūno *SK-CO₂ ekstrakte

Smailės nr.	Sulaikymo laikas, min	Trigliceridas	M +	Jonų fragmentai (m/z)	Trigliceridų kiekis, %
1.	1.0	LnLnLn(OH)	906	LnLn 595	1.8
2.	1.2	L(OH)LnLn	908	LLn 597, LnLn 595	6.0
3.	1.3	L(OH)LLn	910	LL 599, LLn 597	4.7
4.	1.5	LnLnLn	890	LnLn 595	6.4
5.	1.7	LLnLn	892	LLn 597, LnLn 595	23.3
6.	2.0	LLLn	894	LL 599, LLn 597	30.3
7.	2.3	OLnL	896	OL 601, Oln 599, LnL 597	17.6
8.	2.7	PLL	872	PL 575, LL 599	9.9

Trigliceridų sudėtyje aptiktos riebalų rūgštys: palmitino (P), linolo (L), α – linoleno (Ln), oleino (O), hidroksi linolo (L(OH)) ir hidroksi – α – linoleno (Ln(OH)). Pagal gautus fragmentus ir trigliceridų molines mases buvo nustatytos tikslios jų formulės, remiantis mokslinėmis publikacijomis [85, 86, 87, 88, 89].

3.10. Oksidacinio stabilumo ir peroksidų skaičiaus nustatymas aliejiniuose ekstraktuose

Oksidacinis stabilumas, panaudojant ML „Oxipres“ įrangą buvo nustatytas aliejiniuose ekstraktuose, gautuose atlikus superkritinę CO₂ ekstrakciją *SK-CO₂ optimaliomis sąlygomis bei klasikinę soksleto ekstrakciją Hex-S SOK. Ekstraktai buvo palyginti su kanapių sėklų (*Cannabis sativa* L.) ekstraktu, gautu atliekant superkritinę CO₂ ekstrakciją [90]. Kanapių sėklų aliejus palyginimui buvo pasirinktas dėl panašios riebalų rūgščių kompozicijos, kaip ir geltonžiedžiame barkūne [90, 91]. Gauti rezultatai pateikiami 3.19 pav.



3.19 pav. Aliejinių ekstraktų (*SK-CO₂, Hex-S (SOK) ir SK-CO₂ (K) stabilumo kreivės

Atlikus eksperimentą galime matyti, kad ekstrakto *SK-CO₂ oksidacinis skilimas įvyksta praėjus ~ 1.8 val. nuo eksperimento pradžios, SK-CO₂ (K) oksidacinis skilimas prasideda praėjus ~ 1.6 val. nuo eksperimento pradžios, o ekstrakto, gauto soksleto ekstrakcijos metu iš augalo sėklų, panaudojant heksaną Hex-S (SOK) tik po ~3.1 val. Lyginant abu ekstraktus gautus atliekant superkritinę ekstrakciją, galime pastebėti, kad jų stabilumas panašus ir beveik dvigubai mažesnis, negu soksleto ekstrakcijos metu iš geltonžiedžio barkūno sėklų gauto aliejinio ekstrakto.

Peroksidų skaičius bandiniuose pateikiamas 9 lentelėje.

9 lentelė. Peroksidų skaičius ekstraktuose.	
Ekstraktas	Peroksidų skaičius, mekv/100 g. riebalų
*SK-CO ₂	0.14
*SK-CO ₂ (K)	0.13
Hex-S (SOK)	0.15

Pagal (LST EN ISO 3960:2010) standartą [75], augaliniai riebalai laikomi šviežiais, kai peroksidų skaičius juose ne didesnis kaip 0.15 mekv/100g, salyginai šviežiais – 0.15 – 0.5 mekv/100g, apkartusiais, kai peroksidų skaičius didesnis nei 0.5 mekv/100g riebalų. Galima teigti, kad tyrimams buvo naudotas šviežias aliejus ir oksidacinis stabilumas buvo nustatytas vienodo šviežumo aliejuose.

4. IŠVADOS

1. Ekstraktams iš augalinės žaliavos išgauti buvo atliktos dažniausiai naudojamos ir laiko patikrintos, klasikinės, soksleto, vandeninė, pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais ir vis dažniau pradedama taikyti superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu. Didžiausios išeigos atliekant augalo lapų ir stiebų ekstrakcijas buvo gautos: MeOH (ASE) – 27.2 %, H₂O (VE) – 27 % ir MeOH/H₂O (ASE) – 26.5 % ekstrakcijose. Mažiausio išeigos buvo gautos EtOH (SOK) – 10.4 %, AC (SOK) – 9.6 % , HEX (SOK) – 10 %. Ekstrahuojant augalo sėklas: *SK-CO₂ – 4.6 %, SK-CO₂ (EtOH 5 %) – 8.5 %, SK-CO₂ (EtOH 10 %) – 9.8 %, Hex – S (SOK) – 8.9 %. Efektyviausia ekstrakcija – ASE, panaudojant MeOH ir MeOH/H₂O tirpiklius.

2. Atlikti išsamūs antioksidacinio aktyvumo tyrimai, taikant visame pasaulyje naudojamus BFJK (Folin-Ciocalteu), DPPH[·], ABTS^{·+} ir FRAP metodus, nustatyta, kad geriausiu aktyvumu pasižymi MeOH (ASE) (115.2 mg/g, BFJK), MeOH/H₂O (ASE) (136 mg/g, BFJK, 86.5 % DPPH[·], 81.4 % ABTS^{·+}), EtOH (SOK) (86.4 %, ABTS^{·+}) bei H₂O (VE) (96.1 % DPPH[·]). Tyrimams su riebalais pasirinktas EtOH (SOK) ekstraktas dėl savo tinkamumo naudoti maiste, bei ganėtinai gero aktyvumo.

3. Atliekant kokybinę augalo lapų, stiebų bei sėklų ekstraktų analizę nustatyti 26 junginiai iš kurių daugiausia flavonoidai (rutinas, anisatinas, kamferolis), fenolinės rūgštys (p – kumaro r., arabono r., salicilo r.), nepakeičiamos RR alfa linoleno (omega – 3) bei linolo (omega – 6).

Nustatyta RR sudėtis sėklų ekstraktuose. Analizės metu buvo nustatyta 13 RR, Daugiausiai (43.92 %) sudėtyje randama linolo rūgštis (omega – 6) bei α – linoleno (34.76 %) (omega – 3). Taip pat palmitino (8.63 %), oleino (7.99 %) ir stearino (1.65 %) rūgščių. Aliejus pagal savo sudėtį panašus į kanapių aliejų.

Geltonžiedžio barkūno sėklų ekstraktuose buvo nustatyti 8 trigliceridai: LnLnLn(OH), L(OH)LnLn, L(OH)LLn, LnLnLn, LLnLn, LLLn, OlnL, PLL.

4. Atlikti išsamūs pirminių bei antrinių riebalų oksidacijos produktų tyrimai, į kiaulienos riebalus pridendant EtOH (SOK) ekstrakto, bei palyginant bandinį su kitais bandniais. Nustatyta, kad EtOH (SOK) ekstraktas stabdo riebalų oksidaciją. Įvertintas kiaulienos riebalų oksidacinis stabilumas, atliekant „Rancimat“ metodą ir nustatyta, kad riebalų bandinys su etanoliniu geltonžiedžio barkūno ekstraktu pasižymi geresniu stabilumu nei bandinys su sintetiniu antioksidantu (BHT).

5. Atlikti mikrobiologiniai tyrimai, kokybiškai įvertiant bandniuose esančias aerobines mezofilines, pienarūgštes, aerobines psichrofilines, enterobakterijas bei mielių ir pelėsių bakterijas. Nustatyta, kad EtOH (SOK) ekstraktas pasižymi antimikrobiniu poveikiu prieš visas šias bakterijas.

6. Įvertintas oksidacinio stabilumas, bei nustatytas peroksidų skaičiaus aliejiniuose ekstraktuose: *SK-CO₂, Hex – S (SOK), SK-CO₂ (K). Geltonžiedžio barkūno ekstraktai palyginti su panašiu riebalų rūgščių sudėtimi pasižyminčių kanapių sėklų aliejumi SK-CO₂ (K). Nustatyta, kad Hex – S (SOK) yra stabilesnis negu *SK-CO₂ ir SK-CO₂ (K) ekstraktai. Peroksidų skaičiaus nustatymas patvirtino, kad stabilumas buvo vertinamas vienodo šviežumo aliejuose.

7. Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad geltonžiedžio barkūno ekstraktai dėl savo sudėtyje esančių fenolinių junginių, nepakeičiamų riebalų rūgščių bei gero antioksidacinio bei antimikrobinio aktyvumo tinka naudojimui maisto produktuose bei maisto papildų gamyboje.

5. BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS

- (1) VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, MT., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007 m, 39 (1), 44–84.
- (2) FEHRI, L. F., WROBLEWSKI, H., BLANCHARD, A. Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrobial agents and chemoteraphy*. 2007 m, 51 (2), 468-474.
- (3) FUKUYAMA, N., SHIBUYA, M., ORIHARA, J. Antimicrobial polyacetylenes from *Panax ginseng* hairy root culture. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2012 m, 60 (3), 377-380.
- (4) BEAMAND, J. A., BARTON, P. T., PRICE, R. J., & LAKE, B. G. Lack of effect of coumarin on unscheduled DNA synthesis in precision-cut human liver slices. *Food chem. Toxicol*, 1998 m, 36.
- (5) ANVER SOHAIL, M., SHAMIN, S., SALMAN. A., HASAN, M., M., AZHAR, I. Hypotensive Activity of *Melilotus Officinalis* (L.) Pallas. *European Journal of Medicine*. 2015 m, 3 (2), 80-85.
- (6) TROUILLASA, P., CALLISTEA, C. A., ALLAISC, D. P., SIMONB, A., MARFAKA, A., DELGEB, C., DUROUXA, J. L. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*. 80, 2003 m, 399–407.
- (7) CHOREPSIMA, S., TENTOLOURIS, K., DIMITROULIS, D., TENTOLOURIS, N. Melilotus: Contribution to wound healing in the diabetic foot. *Journal of herbal medicine*, 2013 m, 3 (3) 81-86.
- (8) PLESCA-MANEA, L.; PAVRU, A. E., PAVRU, M., TAAMAS, M., BUIA, R., PUIA, M. Effects of *Melilotus officinalis* on acute inflammation. *Phytoteraphy research*. 2002 m, 16 (4), 316-319.
- (9) KORDALI, S., EMSEN, B., YILDIRIM, E. Fumigant Toxicity of Essential Oils from Fifteen Plant Species against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian journal of biological pest control*. 2013 m, 23 (3), 241-246.
- (10) KARAKAS, F. P., YILDIRIM, A., TURKER, A. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish journal of biology*. 2012 m, 36 (6), 641-652.

- (11) UMER, A., YOUSAF, Z., KHAN, F., HUSSAIN, U., ANJUM, A., NAYYAB, Q., YOUNAS, A. Evaluation of allelopathic potential of some selected medicinal species. *African journal of biotechnology*. 2010 m, 9 (37), 6194-6206.
- (12) QUIJANO-CELIS, C. E., PINO, J. A., MORALES, G. Chemical Composition of the Leaves Essential Oil of *Melilotus officinalis* (L.) Pallas. *Journal of essential oil bearing plants*. 2010 m, 13 (3), 313-315.
- (13) HANGANU, D., VLASE, L., OLAH, N. LC/MS analysis of isoflavones from *Fabacea* species extracts. *Farmacia*. 2010 m, 58 (2), 177-183.
- (14) GIRD, C. E., DUTU, L. E., POPESCU, M. L., PAVEL, M., STERIE, A. T. Experimental research regarding the active extracts, polyphenols-standardized. Note II. *Meliloti herba* - pharmacognostic analysis of the raw material. *Farmacia*. 2009 m, 57 (2), 184-191.
- (15) MARTINO E., RAMAIOLA, I., URBANO, M., BRACCO, F., a, COLLINA, S. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of chromatography A*. 2006 m, 1125 (2), 147-151.
- (16) HIRAKAWA, T., OKAWA, M., KINJO, J., NOHARA, T. A new oleanene glucuronide obtained from the aerial parts of *Melilotus officinalis*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2000m, 48 (2), 286-287.
- (17) SUTIASHVILI, M. G., ALANIYA, M. D. Flavonoids of *Melilotus officinalis*. *Chemistry of natural compounds*. 1999 m, 35 (5), 584-584.
- (18) EHLERS, D., PLATTE, S., BORK, W. R., GERARD, D., QUIRIN, K. W. HPLC analysis of sweet clover extracts. *Deutsche lebensmittel – rundschau*. 1997 m, 93 (3), 77-79.
- (19) BUBENCHIKOVA, V. N., DROZDOVA, I., L. HPLC analysis of phenolic compounds in yellow sweet clover. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2004 m, 38 (4), 24-25.
- (20) PODKOIZIN, A. A., DONTSOV, V. I., SYEHEV, I. A., KOBELEVA, G. YU., ARCHENKO, O. N. I. Immunomodulating, Antianemic, and Adaptogenic Effects of Polysaccharides from Plaster Clover (*Melilotus officinalis*). *Bulletin of experimental biology and medicine*. 1996 m, 121 (6), 597-599.
- (21) LI, R., VOLENEC, J. J., JOERN, B. C., CUNNINGHAM, S. M. Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein, and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover, and birdsfoot trefoil. *Crop science*. 1996 m, 36 (3), 617-623.
- (22) BOURGAUD, F., POUTARAUD, A., GUCKERT, A. Extraction of coumarins from plant – material (*Leguminosae*). *Phytochemical analysis*. 1994 m, 5 (3), 127-132.

- (23) KRZAKOWA, M., GRZYWACZ, E. Phenolic compounds pattern in sweet clover (*Melilotus officinalis*) vs white clover (*M. alba*) revealed by 2D TLC (two-dimensional thin-layer chromatography) and its taxonomic significance. *Kerba polonica*. 2010 m, 56 (3), 54-62.
- (24) WORNER, M., SCHREIER, P. Volatile constituents of sweet clover (*Melilotus officinalis*, L-Lam). *Food control and research journal*. 1990 m, 190 (5), 425-428.
- (25) KHODAKOV, G. V. Triterpene and steroidal glycosides from the Genus *Melilotus* and their genins. V. Melitosides A-1, B-1, and C-1 from *Melilotus officinalis* roots. *Chemistry of natural compounds*. 2010 m, 46 (4), 572-575.
- (26) KOVALENKA, A. M., GRUD'KO, I. V., ALEKSANDROV, A. N., KOMISSARENKO, A. N. GC/MS study of the chloroform fraction of *Melilotus officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009 m, 45 (4), 585-586.
- (27) AMIRI, S. S., MARALIAN, H., AGHABARATI, A. Heavy metal accumulation in *Melilotus officinalis* under crown *Olea europaea* L forest irrigated with wastewater. *African journal of biotechnology*. 2008 m, 7 (21), 3912-3916.
- (28) ELGERSMA, A., SOEGAARD, K., JENSEN, S. K. Fatty Acids, α -Tocopherol, β -Carotene, and Lutein Contents in Forage Legumes, Forbs, and a Grass-Clover Mixture. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013 m, 61, 11913-11920.
- (29) ACHARYA, J., HILDRETH M. B., REESE, R. N. In vitro screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 2014 m, 201, 75-81.
- (30) LESNIEWICZ, A., JAWORSKA, K., ZYRNICKI, W. Macro- and micro-nutrients and their bioavailability in polish herbal medicaments. *Food Chemistry* 99. 2006 m, 670-679.
- (31) NAIRA, R. M., WHITTALLB, A., HUGHESA, S. J., CRAIGA, A. D., REVELLB D. K., MILLERA, S. M., POWELLA, T., AURICHTA, G. C. Variation in coumarin content of *Melilotus* species grown in South Australia. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 2010 m, 53 (3), 201-213.
- (32) MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P. R., VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 2004m, 85, 231-237.
- (33) BECKLEY-KARTEY, S. A., HOTCHKISS, S, A., CAPEL, M. Comparative in vitro skin absorption and metabolism of coumarin (1,2-benzopyrone) in human, rat, and mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997 m, 145 (1), 34-42.

- (34) BERNATONIENĖ, J., KOPUSTINSKIENĖ, D. M., JAKŠTAS, V., MAJIENĖ, D., BANIENĖ, R., KURŠVIETIENĖ, L., MASTEIKOVA, R., SAVICKAS, A., TOLEIKIS, A., TRUMBECKAITĖ, S. The effect of *Leonurus cardiaca* herb extract and some of its flavonoids on mitochondrial oxidative phosphorylation in the heart. *Planta med.* 2014 m, 80 (7), 525-532.
- (35) ZHANG, N., YING, M. D., WU, Y. P., ZHOU, Z. H., YE, Z. M. HANG, L., LIN, D. S. Hyperoside, a Flavonoid Compound, Inhibits Proliferation and Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Osteosarcoma Cells. *PLoS ONE*. 2014 m, 9 (7), 1-8.
- (36) BANDYUKOVA, V. A., SERGEEVA, N. V. Rutin in some cultivated plants. *Chemistry of Natural Compounds*. 1974 m, 10 (4), 535-536.
- (37) KERDUDO, A., DINGAS, A., FERNANDEZ, X., FAURE, C. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food chemistry*. 2014 m, 159, 12-19.
- (38) TRIPATHY, D. R., ROY, A. S., DASGUPTA, S. Complex formation of rutin and quercetin with copper alters the mode of inhibition of Ribonuclease A. *Febs letters*. 2011 m, 585 (20), 3270-3276.
- (39) CHEN, J-H., LIAU, B-C., JONG, T-T., CHANG, C-M. J. Extraction and purification of flavanone glycosides and kaemferol glycosides from defatted *Camellia oleifera* seeds by salting-out using hydrophilic isopropanol. 2009 m, 67 (1), 31-37.
- (40) PEKKARINEN, S., MARINA HEINONE, I., HOPIA, I. A. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999 m, 74 (4), 499-506.
- (41) CALDERON-MONTANO, J. M., BURGOS-MORON, E., PEREZ-GUORERO, C., LOPEZ-LOZARO, M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*. 2011 m, 11 (4), 298-344.
- (42) LUKAS, B., SCHMIDERRER, C., MITTERGERER, U., NOVAK, J. Arbutin in marjoram and oregano. *Food chemistry*. 2010 m, 121 (1), 185-190.
- (43) BLAUT, M., BRAUNE, A., WUNDERLICH, S., SAUER, P., SCHNEIDER, H., GLATT, H. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 2006 m, 44 (11), 1940-1947.
- (44) PETERSON, J. J., BEECHER, G. R., BHAGWAT, S. A., DWYER, J. T., GEBHARDT, S. E., HAYTOWITZ, D. B., HOLDEN, J. M. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* 19. 2006 m, 74-80.

- (45) DOLZHENKO, Y., BERTEA, C. M., OCCHIPINTI, A., BOSSI, S., MAFFEI, M. E. UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha × piperita L.*). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010 m, 100 (2), 67–75.
- (46) MANZE, E. T., TADROS, M. G., ABDEL-TAWAB, A. M., KHALIFA, A. E. Potential neuroprotective effects of hesperidin on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *NeuroToxicology*. 2012 m, 33 (5), 1265-1275.
- (47) SANTAMOUR F. S., RIEDEL L. G. H. Distribution and inheritance of scopolin and herniarin in some Prunus species. *Biochemical systematics and ecology*. 1994 m, 22 (2), 197–201.
- (48) AZADEH, H., MAYMAR, M., AHMED, B., MEHRDAD, I., FERESHTEH, H., HASSAN, P. Enhancement of cisplatin cytotoxicity in combination with herniarin in vitro. *Drug & Chemical Toxicology*. 2014 m, 37 (2), 156-162.
- (49) LEAL, L. K. A. M., FERREIRA, A. A. G., BEZERRA, G. A., MATOS F. J. A., VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000 m, 70 (2), 151–159.
- (50) LUPEI, D. Rational design of a fluorescent hydrogen peroxide probe based on the umbelliferone fluorophore. *Tetrahedron Letters*. 2008 m, 49 (19), 3045–3048.
- (51) ZHANGA, Yu., JIAOA, J., LIUB, C., WUA, X., ZHANGA, Y. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Food chemistry*. 2008 m, 107 (3), 1326-1336.
- (52) BORGHI, S. M., CARVALHO, T. T., STAURRENGO, L., HOHMANN, M. S. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *Journal of natural products*. 2013 m, 76 (6), 1141-1149.
- (53) CAN, O. D., OZKAY, U. D., UCEL, U. I. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. *European Journal of Pharmacology*. 2013 m, 699 (1-3), 250-257.
- (54) SAKAI, S., KAWAMATA, H., KOGURE, T., MANTANI, N., TERASAWA, K., UMATAKE, M., OCHIAI, H. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in RAW264.7 cells. *Mediators of Inflammation*. 1999 m, 8 (3), 173–175.

- (55) SAULNIER, L.,; THIBAUT, J-F. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999 m, 79 (3), 396–402.
- (56) LUTHRIA, L. D., PASTOR-CORRALES, M., A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris L.*) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006 m, 19, 205–211.
- (57) BOERJAN, W., RALPH, J., BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003 m, 54, 519–46.
- (58) JOHNSTON, K. L., CLIFFORD, M. N., MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am. J. Clin. Nutrit.* 2003 m, 78 (4), 728–733.
- (59) FREEDMAN, S. O., SHULMAN, R., KRUPPEY, J., SEHON, A. H. Antigenic properties of chlorogenic acid. *Journal of Allergy*. 1964 m, 35 (2), 97–107.
- (60) STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M., BOVEN, PE., HUSSAIN, EA., DAMAYANTI-WOOD, BI., FARNSWORTH, NR. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001 m, 41 (4), 251–286.
- (61) OLTHOF, M. R., HOLLMAN, P. C., KATAN M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of nutrition*. 2001 m, 131 (1), 66–71.
- (62) RAJENDRA PRASAD, N., KARTHIKEYAN, A., KARTHIKEYAN, S., REDDY, BV. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2011 m, 349 (1), 11–19.
- (63) GUZMAN, J. D., Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules*. 2014 m, 19, 19292-19349.
- (64) WEI, J., KANG, LE. Roles of (Z)-3-hexenol in plant-insect interactions. *Plant Signaling & Behavior*. 2011 m, 6 (3), 369-371.
- (65) CRUZ, A. F., Hamel, C., YANG, C., MATSUBARA, T., GAN, Y., SINGH, A. K., KUWADA, K., ISHII, T. Phytochemicals to suppress Fusarium head blight in wheat–chickpea rotation. *Phytochemistry*. 2012 m, 78, 72-80.
- (66) CHAPMAN, D. J., DE-FELICE, J., JAMES, B. Growth temperature effects on thylakoid membrane lipid and protein content of pea chloroplasts 1. *Plant Physiol*. May 1983 m, 72 (1), 225–228.
- (67) HARRIS, W. S. N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *The american journal of clinical nutrition*. 1997 m, 65 (5), 1645-1654.

- (68) DE STEFANI, E; DENEIO-PELLEGRINI, H., BOFFETA, P., RONCO, A. Alpha-linolenic acid and risk of prostate cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2000 m, 9 (3), 335–338.
- (69) LETAWE, C., BOONE, M., PIERRARD, GE. Digital image analysis of the effect of topically applied linoleic acid on acne microcomedones. *Clinical & Experimental Dermatology*. 1998 m, 23 (2), 56–58.
- (70) PEYRAR-MAILLARD, M. N., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003 m, 80 (10), 1007–1012.
- (71) SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphofungistic acid reagents. 1965 m, 144–158.
- (72) BONDET, V., BRAND-WILLIAMS, W., BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmitt Wissenschaft Technologie Food Sci Technol*. 1997 m, 30, 609–615.
- (73) RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*. 1999 m, 26 (9-10), 1231-1237.
- (74) BENZIE, I. F., STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996 m, 239 (1), 70-76.
- (75) LST EN ISO 3960:2010. *Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Gyvūniniai ir augaliniai riebalai ir aliejus. Peroksidų skaičiaus nustatymas. Jodometrinis (vizualus) nustatymas pagal ekvivalentinį tašką (ISO 3960:2007, pataisyta 2009-05-15 versija). Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination (ISO 3960:2007, corrected version 2009-05-15)*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2010.
- (76) VYNCKE, W., Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel*. 1970 m, 72 (12), 1084–1087.
- (77) SORENSEN, G., JORGENSEN, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 1996 m, 202 (3), 205–210.
- (78) LST EN ISO 12966-1:2015. *Gyvūniniai ir augaliniai riebalai ir aliejus. Riebalų rūgščių metilesterių nustatymas. 4 dalis. Nustatymas naudojant kapiliarinę dujų chromatografiją (ISO*

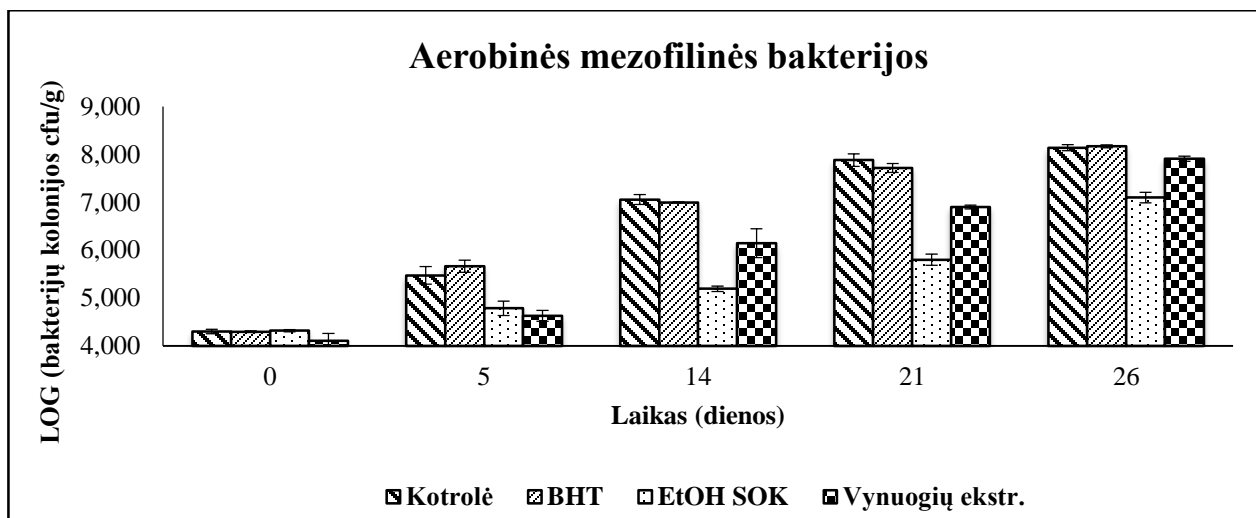
12966-4:2015). *Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 4: Determination by capillary gas chromatography (ISO 12966-4:2015)*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2015 m.

- (79) POVILAITIS, D., VENSKUTONIS, P. R. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of rye bran using response surface methodology and evaluation of extract properties. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2015 m, 100, 194-200.
- (80) KAHL, R., KAPPUS, H. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1993 m, 196 (4), 329-338.
- (81) EB Nr. 1331/2008. *Maisto priedų naudojimą reglamentuoja Europos Sąjungos teisės aktai, pagrįsti daugiamėčiais specialistų stebėjimais bei tyrimais. Pagrindiniai maisto priedų reikalavimai išdėstyti 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 1333/2008 dėl maisto priedų. (OL L 354, 2008 12 31, p. 16—33)*
- (82) CHEDEA, V. S., PELMUS, R. S., CALIN, G. L. Antioxidant / Prooxidant and Antibacterial / Probacterial Effects of a Grape Seed Extract in Complex with Lipoxygenase. *BioMed Research International*. 2014 m, 2014, Article ID 313684, 9.
- (83) ACAMOVIC-DJOKOVIC, G., DJUKIC, D., MANDIC, L., KALINIC, S. & BOSKOVIC, T. Antimicrobial activity of the petrol-ether and ethyl-acetate extracts of *Melilotus officinalis* (L.) Pall, *Melilotus albus* Medic. and *Melitis melissophyllum* L. *Lekovite sirovine*. 2002 m, 22, 59-63.
- (84) GARCIA-LOMILLO, J., LUISA GONZALEZ-SANJOSE, M. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry. *J. Agric. Food Chem*. 2014, 62, 12595–12602.
- (85) ZEB, A., MURKOVIC, M. Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2010, 112, 844–851.
- (86) WANG, W., TIAN, S., STARK, R. E. Isolation and Identification of Triglycerides and Ester Oligomers from Partial Degradation of Potato Suberin. *J. Agric. Food Chem*. 2010 m, 58, 1040–1045.
- (87) MALONE, M., EVANS, J. J. Determining the Relative Amounts of Positional Isomers in Complex Mixtures of Triglycerides Using Reversed-Phase High- Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Lipids*. 2004 m, 39, 273–284 .
- (88) BYRDWELL, W. C., NEFF, W. E. Autoxidation products of normal and genetically modified canola oil varieties determined using liquid chromatography with massspectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2001 m, 905, 85–102.

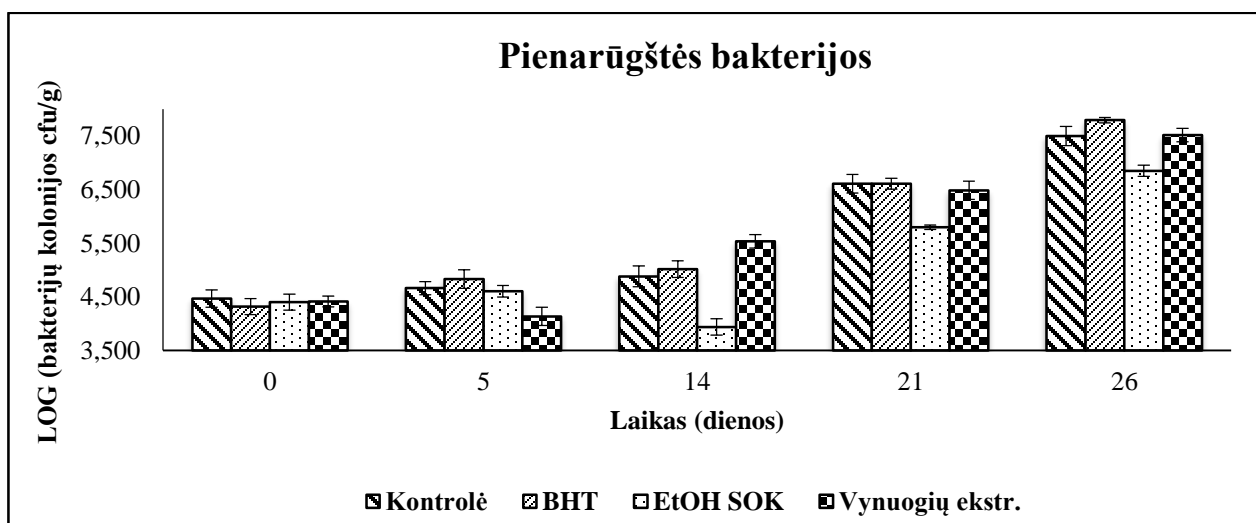
- (89) DORSCHER, C. A. Characterization of the TAG of Peanut Oil by Electrospray LC-MS-MS. *JAACS*. 2002 m, 79 (8), 749–753.
- (90) ALADIC, K., JARNI, T. B., VIDOVIC, S., VLADIC, J., BILIC, M., JOKIC. S. Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Industrial Crops and Products*. 2015 m, 76, 472–478.
- (91) RASHID, U., BHATTI, S. G., ANSARI, T. M. Biodiesel production from *Cannabis sativa* oil from Pakistan. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. 2016 m, 38 (6), 865-875.

PRIEDAI

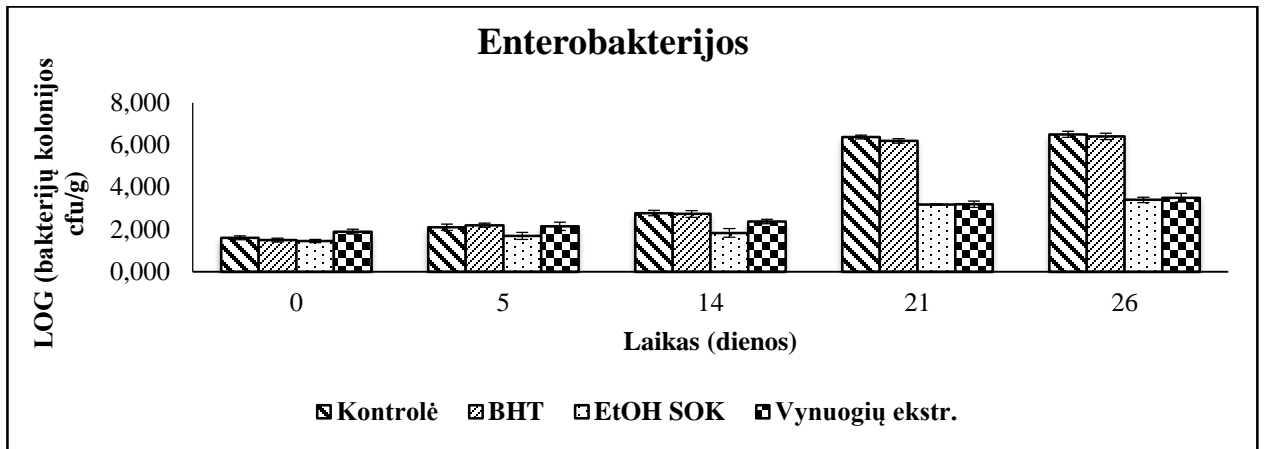
I priedas



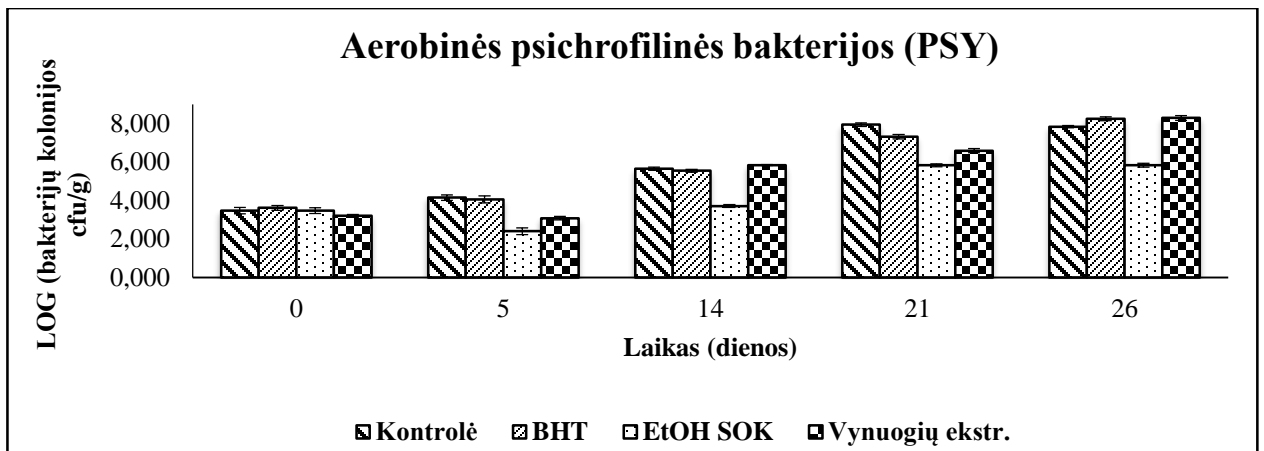
1 pav. Aerobinių mezofilinių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (2 eksperimentas)



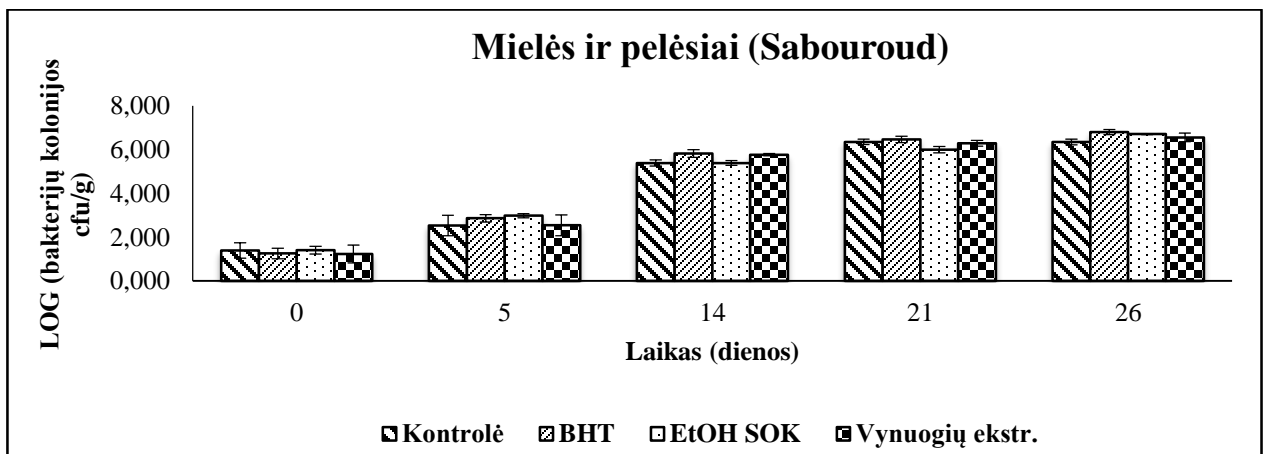
2 pav. Pienarūgščių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (2 eksperimentas)



3 pav. Enterobakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (2 eksperimentas)

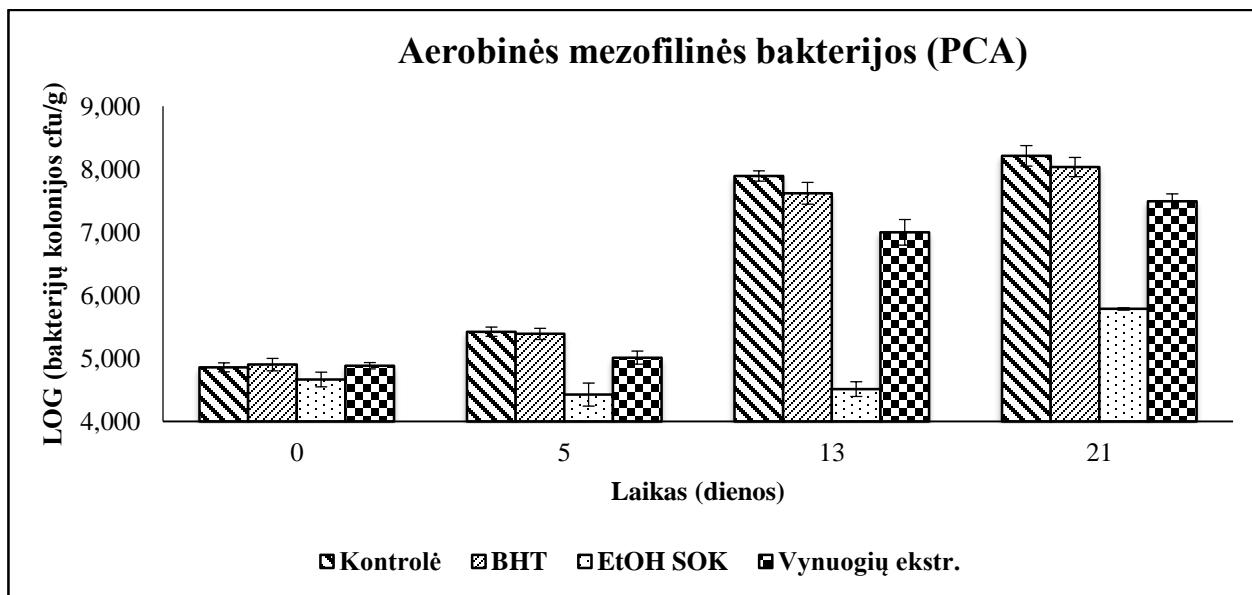


4 pav. Aerobinių psichrofilinių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (2 eksperimentas)

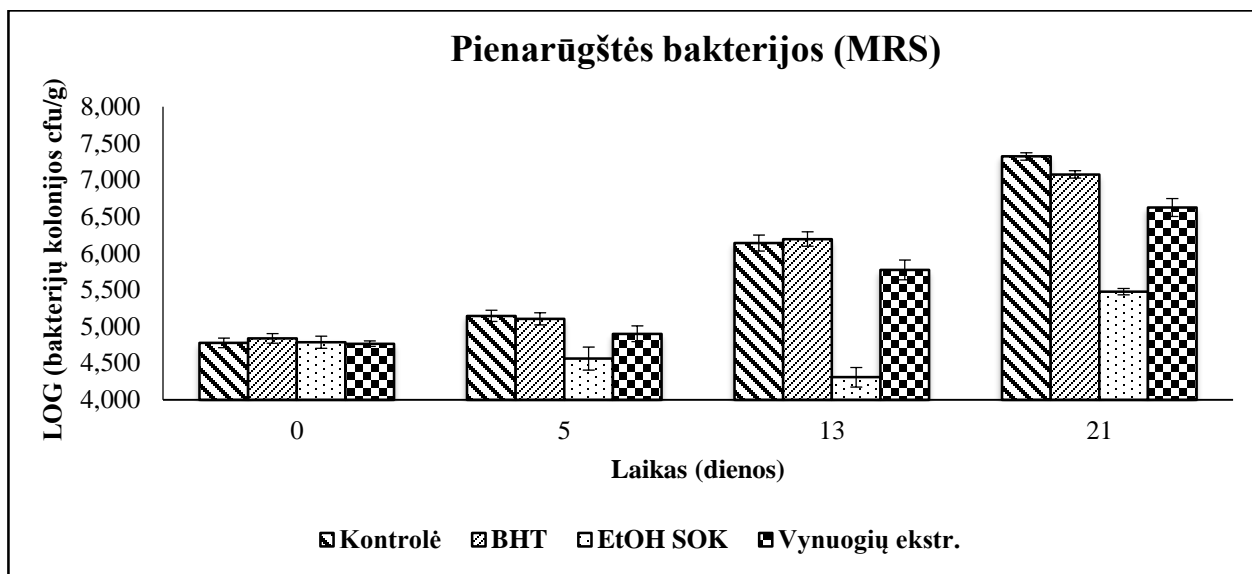


5 pav. Mielių ir pelėsių skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (2 eksperimentas)

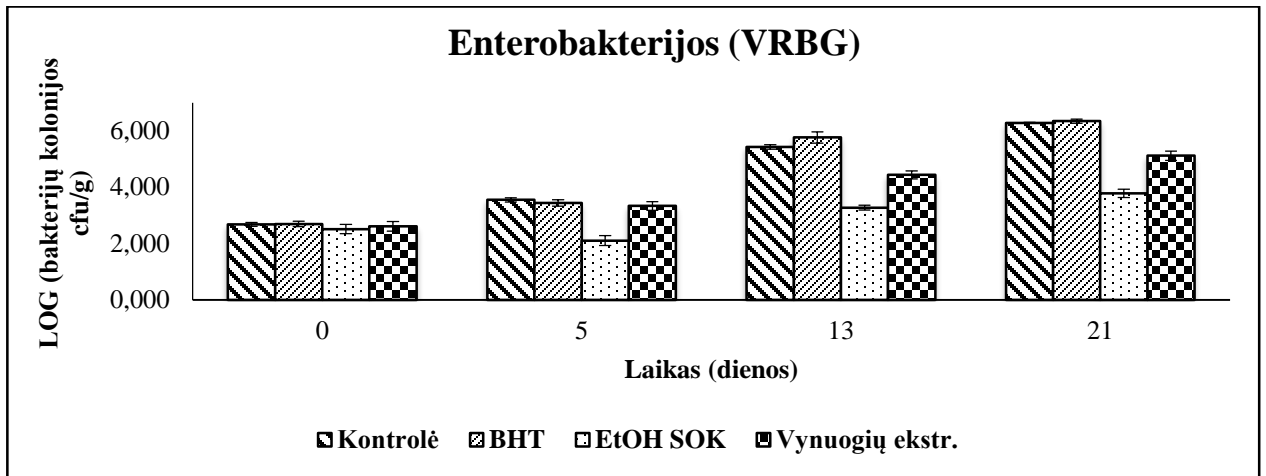
II priedas



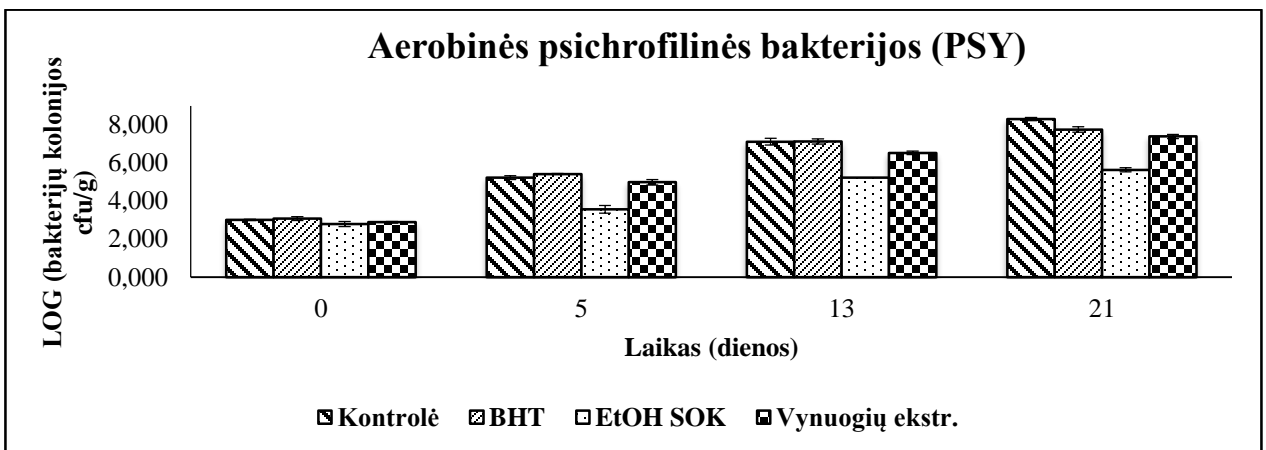
1 pav. Aerobinių mezofilinių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (3 eksperimentas)



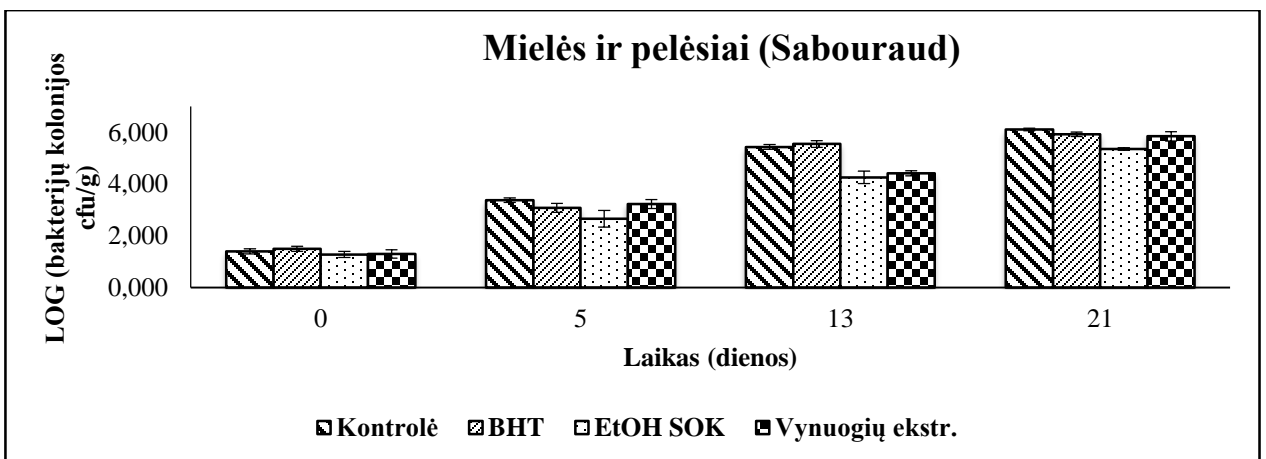
2 pav. Pienarūgščių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (3 eksperimentas)



3 pav. Enterobakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (3 eksperimentas)

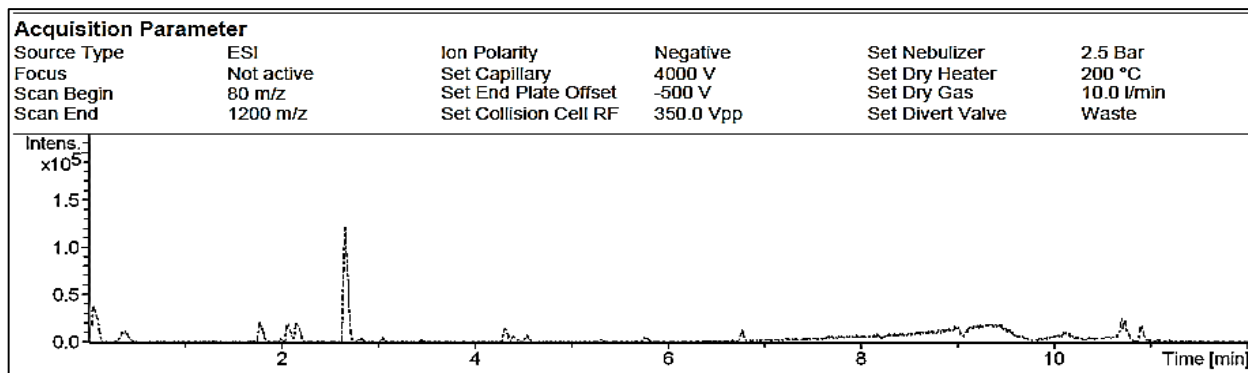


4 pav. Aerobinių psichrofilinių bakterijų skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (3 eksperimentas)

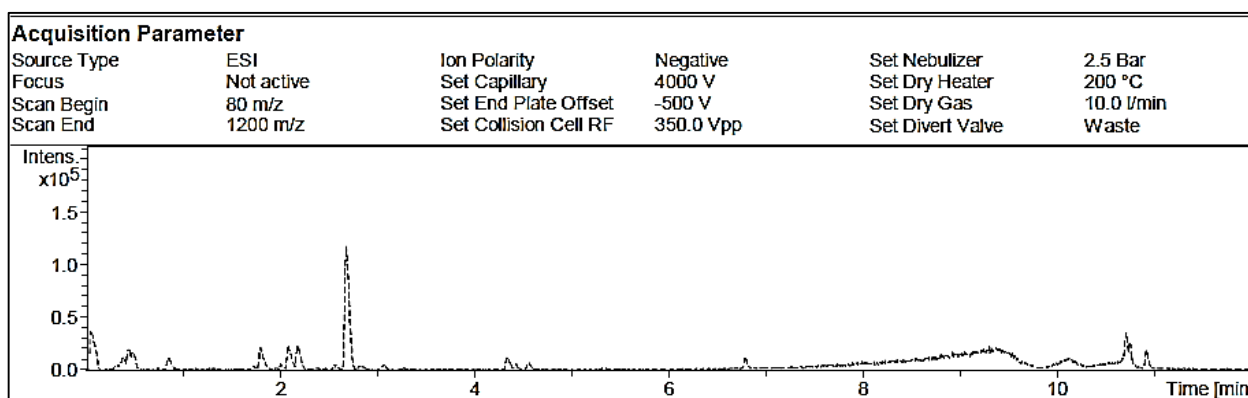


5 pav. Mielių ir pelėsių skaičius (LOG) kontroliniame, BHT, EtOH (SOK), Vynuogių ekstr. bandiniuose (3 eksperimentas)

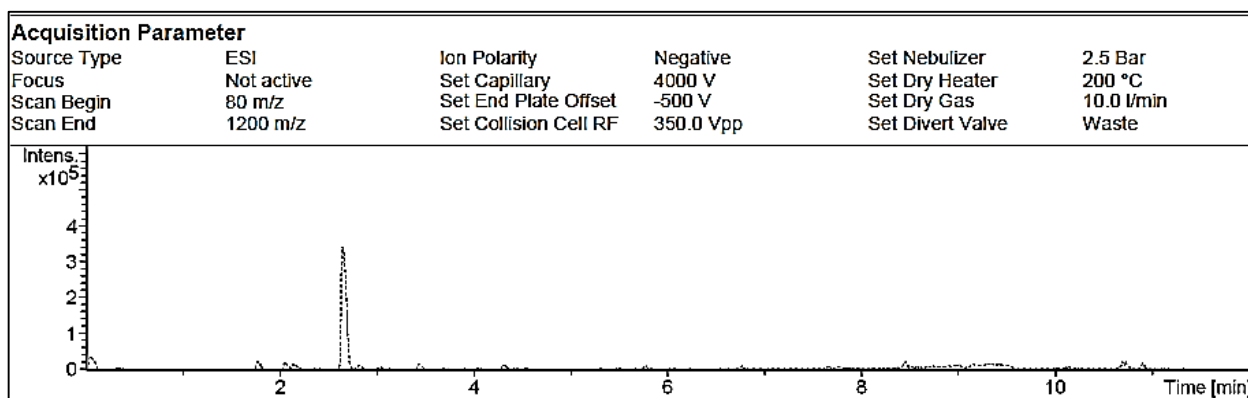
III priedas



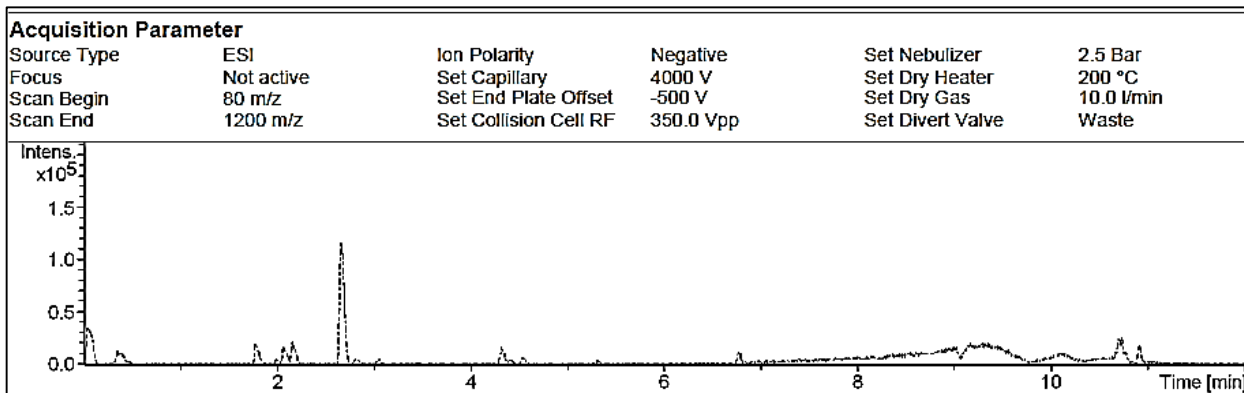
1 pav. MeOH (ASE) ekstrakro chromatograma



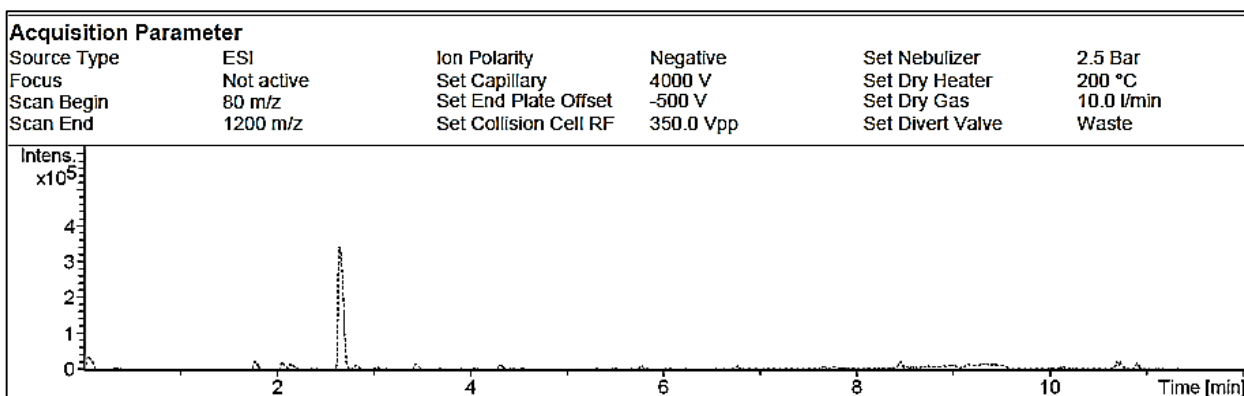
2 pav. MeOH/H₂O (ASE) ekstrakro chromatograma



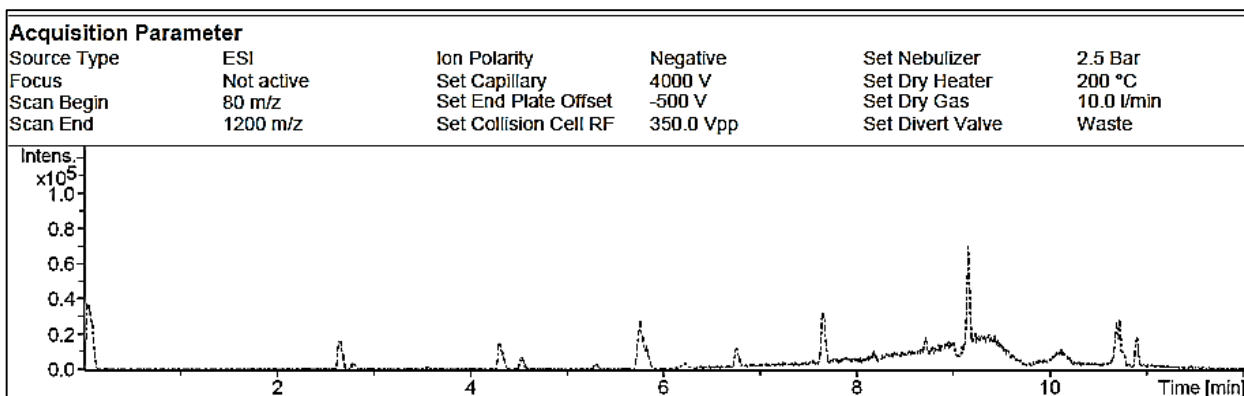
3 pav. AC (ASE) ekstrakro chromatograma



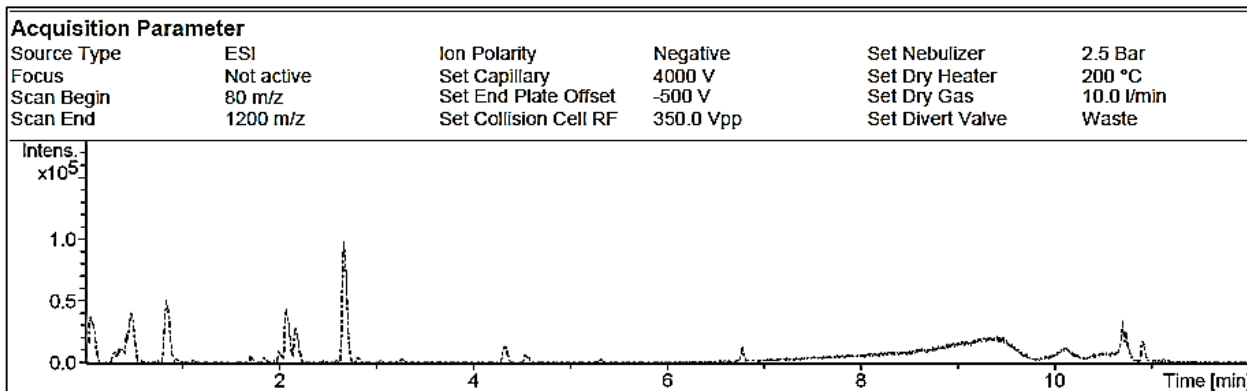
4 pav. EtOH (SOK) ekstrakro chromatograma



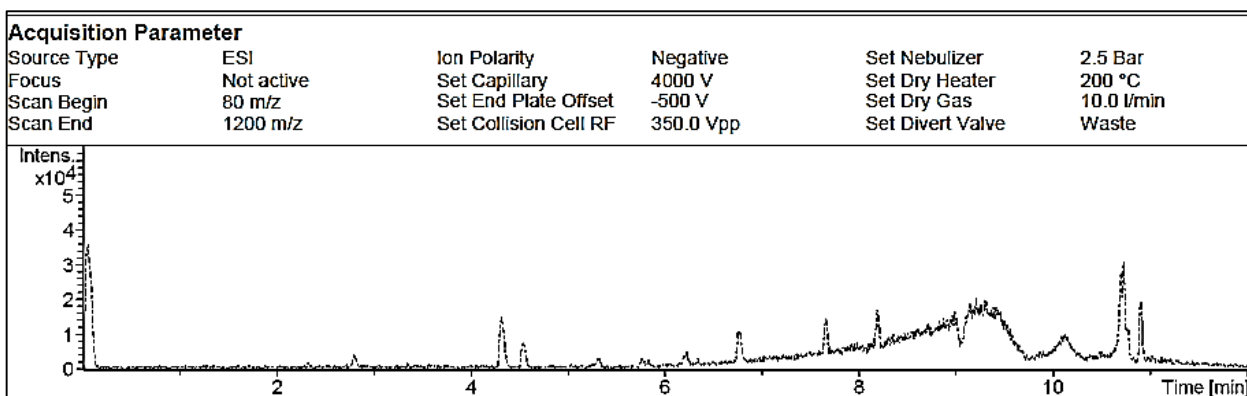
5 pav. AC (SOK) ekstrakro chromatograma



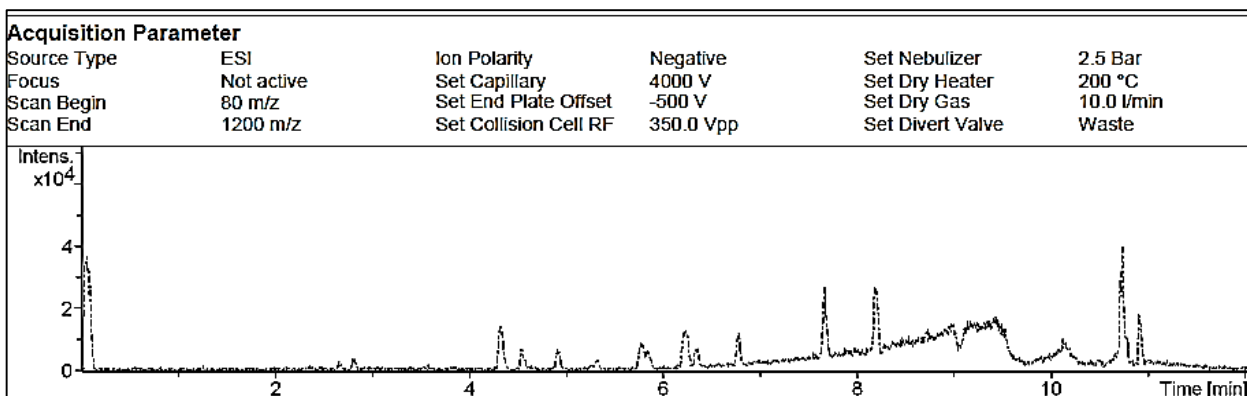
6 pav. Hex (SOK) ekstrakro chromatograma



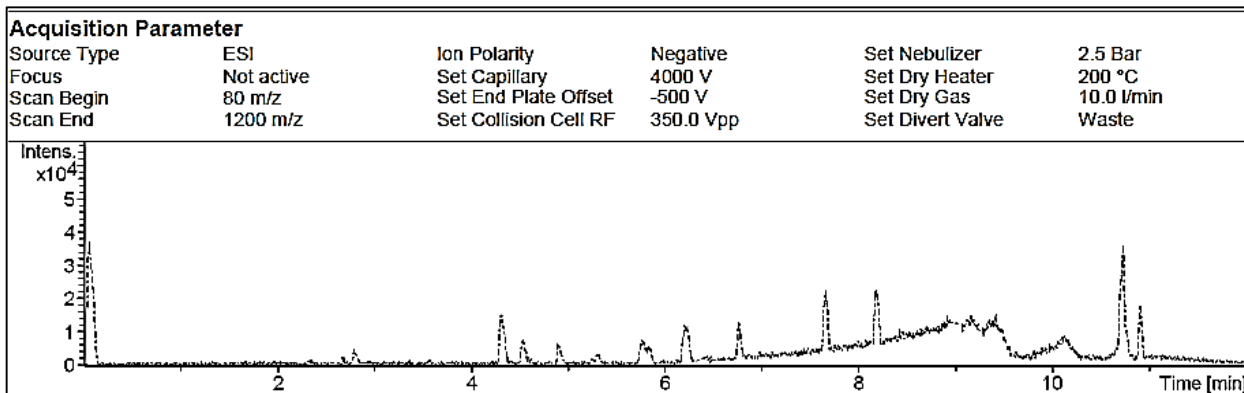
7 pav. H₂O (VE) ekstrakro chromatograma



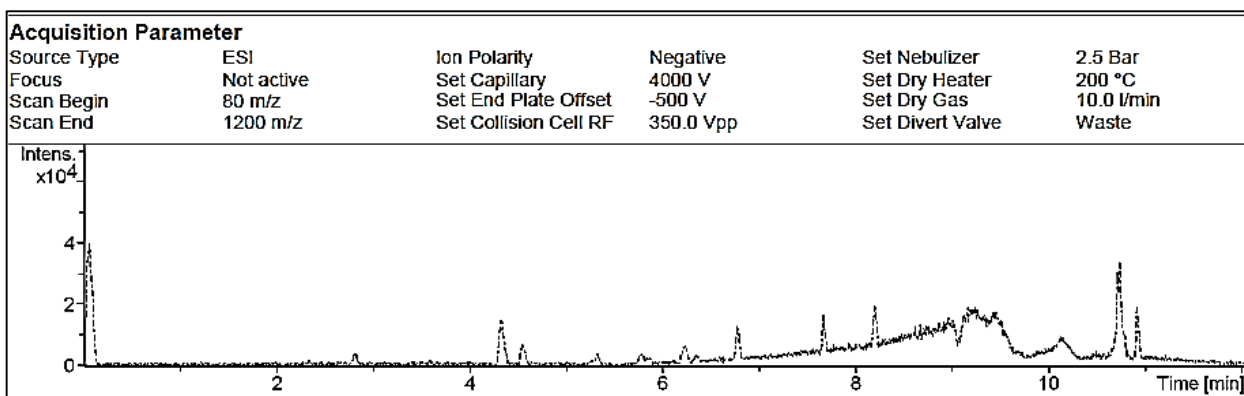
8 pav. *SK-CO₂ ekstrakro chromatograma



9 pav. SK-CO₂ (5 % EtOH) ekstrakro chromatograma

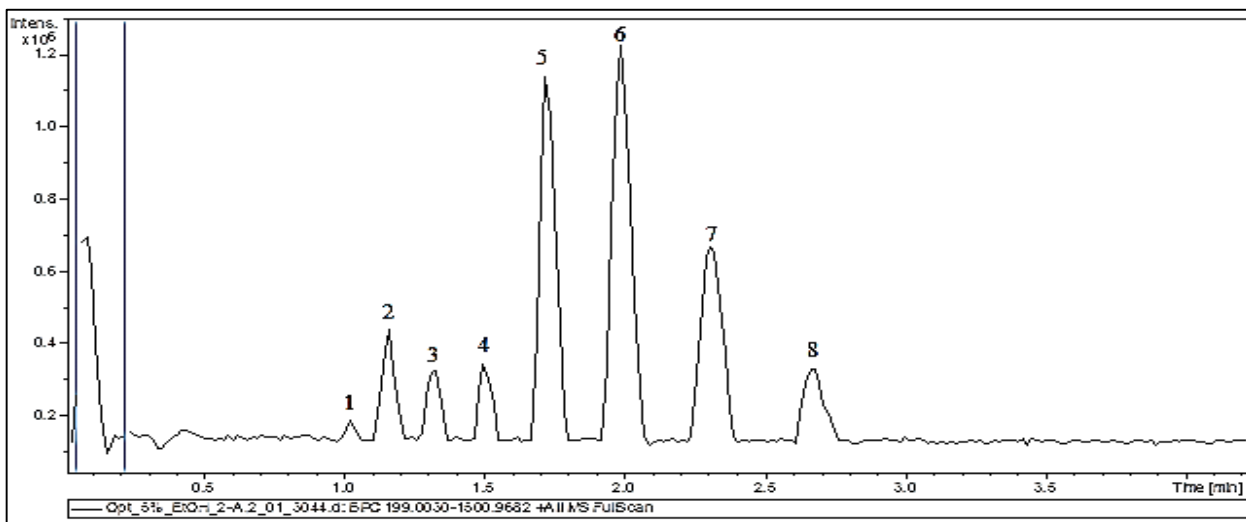


10 pav. SK-CO₂ (10 % EtOH) ekstrakro chromatograma

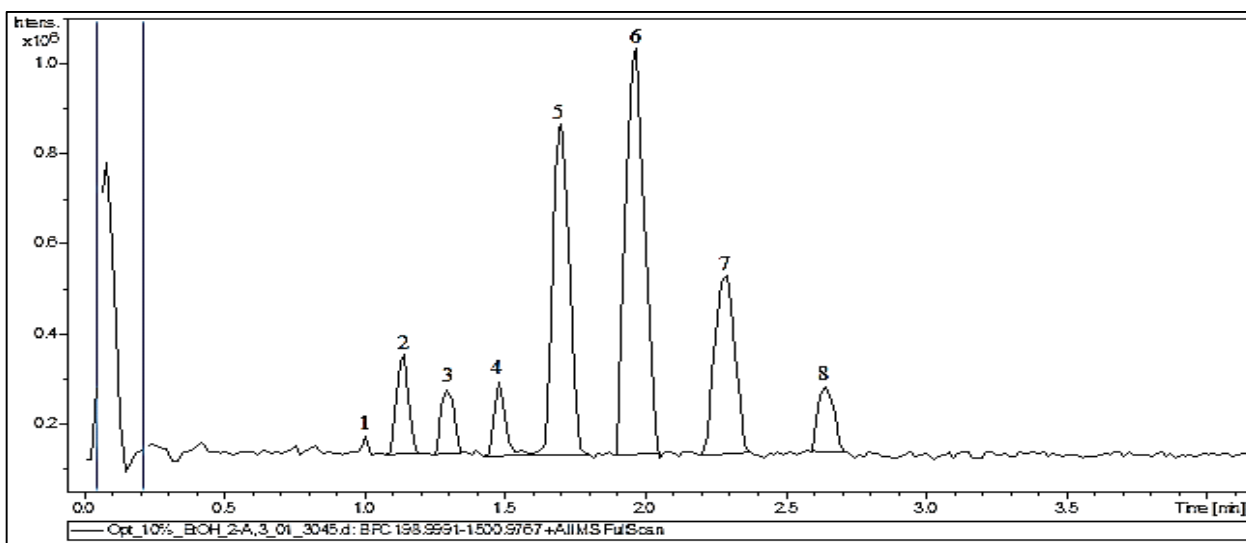


11 pav. Hex-S (SOK) ekstrakro chromatograma

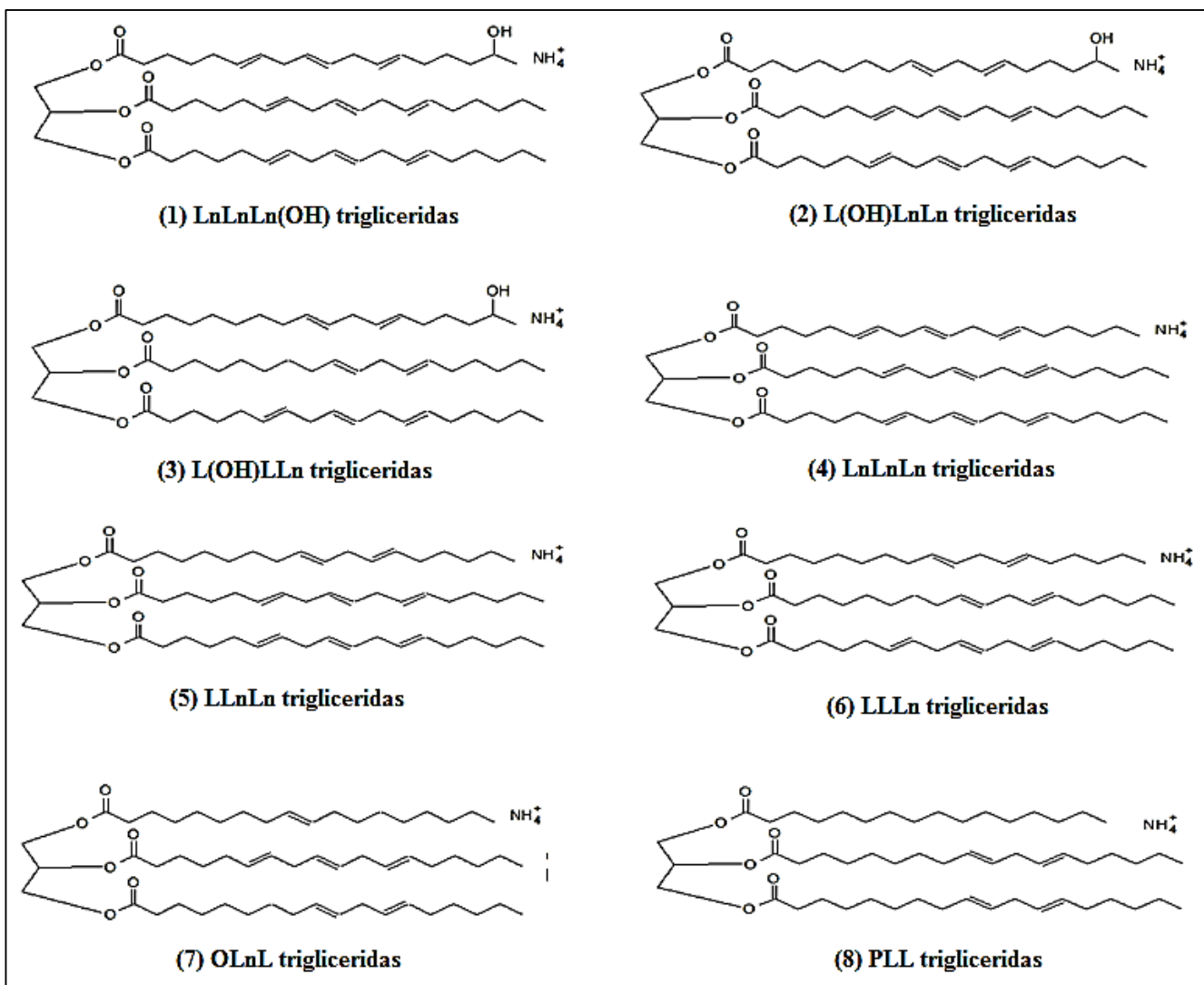
IV priedas



1 pav. Trigliceridų smailės chromatogramoje, analizei naudojant SK-CO₂ (5 % EtOH) ekstraktą



2 pav. Trigliceridų smailės chromatogramoje, analizei naudojant SK-CO₂ (10 % EtOH) ekstraktą



3 pav. Trigliceridų junginiai susidarantys augalo sėklų ekstraktų analizės metu spektrometre