



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Tadas Brazdauskas

**ARONIŲ UOGŲ IR ĮVAIRIŲ ELEUTEROKOKO RŪŠIŲ LAPŲ
BIORAFINAVIMAS Į FUNKCIONALIUOSIUS INGREDIENTUS
TAIKANT TRADICINIUS IR AUKŠTO SLĖGIO
EKSTRAKCIJOS METODUS**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis

KAUNAS, 2016

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**ARONIŲ UOGŲ IR ĮVAIRIŲ ELEUTEROKOKO RŪŠIŲ LAPŲ
BIORAFINAVIMAS Į FUNKCIONALIUOSIUS INGREDIENTUS
TAIKANT TRADICINIUS IR AUKŠTO SLĖGIO
EKSTRAKCIJOS METODUS**

Baigiamasis magistro projektas
Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

Vadovas

Prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis

2016 06 __

Recenzentas

Lekt. dr. Paulius Kraujalis

2016 06 __

Projektą atliko

Tadas Brazdauskas

2016 06 __

KAUNAS, 2016



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖ TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

(Fakultetas)

Tadas Brazdauskas

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga, 621E40001

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Aronijų uogų ir įvairių eleuterokoko rūšių lapų biorafinavimas į funkcionaliuosius ingredientus taikant tradicinius ir aukšto slėgio ekstrakcijos metodus“

AKADEMINIO SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

20 16 m. birželio mėn. 06 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Tado Brazdausko**, baigiamasis projektas tema „Aronijų uogų ir įvairių eleuterokoko rūšių lapų biorafinavimas į funkcionaliuosius ingredientus taikant tradicinius ir aukšto slėgio ekstrakcijos metodus“ 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

IVADAS.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. JUODAVAIŠĖ ARONIJA	14
1.1.1. Botaninis apibūdinimas, paplitimas ir panaudojimas.....	14
1.1.2. Aronijos uogų cheminė sudėtis	15
1.1.3. Fenoliniai junginiai ir cukrūs aronijos vaisiuose.....	15
1.1.4. Aronijos uogų fenolinių junginių farmakologinės savybės	18
1.2. ELEUTEROKOKAS	19
1.2.1. Eleuterokoko botaninis apibūdinimas, paplitimas ir panaudojimas.....	19
1.2.2. Eleuterokoko rūšių cheminė sudėtis.....	19
1.2.3. Eleuterokoko (<i>senticosus</i>) farmakologinės savybės.....	20
1.3. TRADICINIAI IR AUKŠTO SLĖGIO EKSTRAKCIJOS METODAI	21
1.3.1. <i>Soksleto</i> ekstrakcija	21
1.3.2. Ekstrakcija purtant (maceracija).....	22
1.3.3. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje	22
1.3.4. Ekstrakcija superkritiniais skysčiais.....	24
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	27
2.1. MEDŽIAGOS	27
2.1.1. Juodavaisės aronijos uogų išspaudos	27
2.1.2. Įvairių eleuterokoko rūšių lapai.....	27
2.1.3. Cheminiai reagentai ir medžiagos	27
2.2. TYRIMŲ METODAI.....	29
2.2.1. Tyrimų schemas	29
2.2.1. Pirminis paruošimas	30
2.2.2. Eksperimentų planavimas ir analizavimas	30
2.2.3. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje	32
2.2.4. Pakopinė ekstrakcija <i>Soksleto</i> aparate ir purtant.....	33
2.2.5. Bendrasis fenolinių junginių kiekis (<i>Folin</i> ir <i>Ciocalteu</i> metodu)	34
2.2.6. TEAG nustatymas ABTS ^{•+} radikalo katijono sujungimo metodu.....	35
2.2.7. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH [•] radikalų sujungimo metodu.....	37
2.2.8. Ekstrakto sudėties analizė dviejų dimensijų skysčių chromatografijos metodu	39

2.2.9. Frakcijų sudėties analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos–masių spektrometrijos metodu	40
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	41
3.1. JUODAVAISĖS ARONIJS UOGŲ IŠSPAUDŲ BIORAFINAVIMO IR EKSTRAKTŲ TYRIMŲ REZULTATAI IR APTARIMAS	41
3.1.1. Priklausomų kintamųjų nustatymas ir optimizavimas	41
3.1.2. ETPS metodo optimizavimas ir optimalusis ekstraktas	48
3.1.3. Juodavaisės aronijos uogų išspaudų optimaliojo ekstrakto sudėties analizė	50
3.2. ĮVAIRIŲ ELEUTEROKOKO RŪŠIŲ LAPŲ BIORAFINAVIMO IR FRAKCIJŲ TYRIMŲ REZULTATAI IR APTARIMAS	57
3.2.1. Frakcijų kintamųjų nustatymas	57
3.2.2. Atrinktų lapų frakcijų preliminarinė sudėties analizė	61
IŠVADOS.....	63
BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS	64
PRIEDAI	70

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Dujų, skysčių ir superkritinių skysčių fizikocheminės savybės.	25
2 lentelė. Tyrimams pasirinkti trijų eleuterokoko rūšių lapai.	27
3 lentelė. Eksperimentinio plano tiesioginiai nepriklausomi kintamieji bei jų vertės.	31
4 lentelė. Eksperimentinio plano priklausomų kintamųjų išraiškos ir metodai.	31
5 lentelė. Kvadratinio modelio dispersinė analizė (<i>Statgraphics Centurion XVI</i>).....	48
6 lentelė. Spėjamosios ir eksperimentinės išspaudų optimalios faktorių ir atsakų vertės.	49
7 lentelė. Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ekstrakto, gauto optimaliomis ETPS sąlygomis (E – 46%, R – 1,8%, T – 165 °C) kokybinė sudėties analizė.	54
8 lentelė. Atrinktos įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijos sudėties analizei.	61
9 lentelė. Preliminariai identifikuoti junginiai atrinktose įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijose.	62
10 lentelė. Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ETPS ir ekstraktų tyrimų rezultatai.	70
11 lentelė. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų ekstrakcijos tradiciniais metodais ir ekstraktų tyrimų rezultatai.	71

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Juodavaisė aronija	14
2 pav. Antocianinai aronijos uogose.....	16
3 pav. Proantocianidinių monomerai ir polimerai aronijos uogose.	16
4 pav. Hidroksicinamono rūgštys aronijos uogose.	17
5 pav. Flavonoidai aronijos uogose.	17
6 pav. Cukrūs aronijos uogose.	17
7 pav. Eleuterokokas <i>senticosus</i>	19
8 pav. Eleuterokoko <i>henryi</i> junginiai.....	20
9 pav. <i>Soksleto</i> aparatas.	21
10 pav. ETPS aparatūros schema.....	23
11 pav. Grynų medžiagos fazių diagrama.	24
12 pav. ESS aparatūros principinė schema.	25
13 pav. Juodavaisės aronijos uogų išspaudų tyrimų schema.	29
14 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų tyrimų schema.....	29
15 pav. Ekstrakcinės celės užpildymas bandiniu.	33
16 pav. Kintamųjų reikšmingumas ekstrakcijos išėgai Pareto diagramoje.	41
17 pav. Ekstrakcijos priklausomybė nuo tiesioginių nepriklausomų kintamųjų.	41
18 pav. Išspaudų ekstrakcijos išėgos trimatis paviršiaus grafikas.	42
19 pav. Kintamųjų reikšmingumas BFJK Pareto diagramoje.....	43
20 pav. BFJK priklausomybė nuo tiesioginių kintamųjų.	43
21 pav. Išspaudų ekstraktų BFJK trimatis paviršiaus grafikas.	44
22 pav. Kintamųjų reikšmingumas TEAG Pareto diagramoje.	45
23 pav. TEAG priklausomybė nuo tiesioginių kintamųjų.	45
24 pav. Išspaudų ekstraktų TEAG trimatis paviršiaus grafikas.	45
25 pav. Kintamųjų reikšmingumas DPPH (EC ₅₀) Pareto diagramoje.	46
26 pav. DPPH (EC ₅₀) priklausomybė nuo tiesioginių nepriklausomų kintamųjų.	46
27 pav. Išspaudų ekstraktų DPPH (EC ₅₀) trimatis paviršiaus grafikas.....	47
28 pav. Optimizavimo trimatis atsako paviršiaus grafikas.	49
29 pav. Optimaliojo ekstrakto kokybinės sudėties analizės dvimatis grafikas.....	51
30 pav. Optimaliojo ekstrakto kokybinės sudėties analizės trimatis grafikas.	52
31 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų pakopinės ekstrakcijos didėjančio poliškumo tirpikliais išėgos rezultatai.	58
32 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų BFJK rezultatai.....	59
33 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų TEAG rezultatai.	60
34 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų DPPH rezultatai.....	61
35 pav. Atrinktų įvairių eleuterokoko rūšių lapų ekstraktų UESCH-MS chromatogramos.	72

Brazdauskas, Tadas. Aronijų uogų ir įvairių eleuterokoko rūšių lapų biorafinavimas į funkcionaliuosius ingredientus taikant tradicinius ir aukšto slėgio ekstrakcijos metodus. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai; Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *juodavaisė aronija; eleuterokokas; ekstrakcija; optimizavimas; fenoliniai junginiai*

Kaunas, 2016. 69 p.

SANTRAUKA

Šio projekto tikslas buvo nustatyti efektyvius juodavaisės aronijos uogų išspaudų ir įvairių eleuterokoko rūšių lapų biorafinavimo į funkcionaliuosius ingredientus parametrus, siekiant racionalaus ir tausojančio augalinės žaliavos panaudojimo.

Juodavaisės aronijos uogų išspaudos buvo biorafinuojamos į funkcionaliuosius ingredientus taikant aukšto slėgio ekstrakcijos metodus. Pirmiausia, buvo taikyta ekstrakcija superkritiniais skysčiais naudojant anglies dioksidą, kad pašalinti išspaudų lipofilinę frakciją. Toliau buvo suplanuoti ir įvykdyti išspaudų ekstrakcijos tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS) eksperimentai. Šių eksperimentų rezultatų analizavimas ir optimizavimas buvo atliktas taikant atsako paviršiaus metodologiją. Nustatytos optimalios ETPS faktorių vertės, kurių metu gaunama didžiausia išspaudų ekstrakcijos išeiga, bendrasis fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas.

Įvairių eleuterokoko rūšių lapai buvo biorafinuojami į funkcionaliuosius ingredientus taikant tradicinius ekstrakcijos metodus. Buvo atlikta šių lapų pakopinė ekstrakcija didėjančio poliškumo tirpikliais *Soksleto* aparate (heksanu, acetonu) ir purtant (etanolio ir vandens mišiniu (70/30, v/v)). Buvo įvertintos euleuterokoko rūšys (*henryi*, *senticosus* ir *sessiliflorus*), jų surinkimas dvejose skirtingose augimo stadijose (birželį ir rugsėjį) ir tirpiklio įtaka frakcijos išeigai, bendrojo fenolinių junginių kiekiui ir antioksidaciniam aktyvumui.

Išspaudų ekstraktuose ir lapų frakcijose bendrasis fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas *Folin–Ciocalteu* metodu, o antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas taikant *in vitro* modelines ABTS^{•+} laisvųjų radikalų (arba *Troloks*o ekvivalento antioksidacinės gebos) ir DPPH[•] radikalų sujungimo metodus. Optimaliojo išspaudų ekstrakto sudėties preliminarinė kokybinė analizė buvo atlikta taikant dviejų dimensijų skysčių chromatografiją su diodų matricos detektoriumi ir masių spektrometru. Atrinktų lapų frakcijų preliminarinė sudėties kokybinė analizė buvo atlikta taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografiją su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi.

Įvykdžius juodavaisės aronijos uogų išspaudų ETPS 29 eksperimentų planą ir jo optimizavimą buvo gautos optimalios faktorių vertės (temperatūra – 165 °C, etanolis – 46 %, skruzdžių rūgštis – 1,8 %). Optimaliomis faktorių vertėmis gautas išspaudų ETPS ekstraktas pasižymėjo labai aukšta išeiga ($72,53 \pm 0,02$ %), bendruoju fenolinių junginių kiekiu ($236,64 \pm 3,72$ mg GRE/g ekstrakto) bei antioksidaciniu aktyvumu – *Trolokso* ekvivalento antioksidacinės geba ($4,346 \pm 0,241$ mmol TE/g ekstrakto) ir DPPH(EC_{50}) ($5,92 \pm 0,23$ µg/ml). Optimizavimo modelis buvo patvirtintas tinkamu numatyti išspaudų ETPS optimalias faktorių vertes. Be to, buvo sudaryti kiekvieno priklausomo kintamojo ir optimizavimo trimačiai atsako paviršiaus grafikai, kurie ateityje leis greičiau numatyti šių išspaudų funkcionaliųjų ingredientų pritaikymą kuriant įvairius produktus. Atlikus išspaudų optimaliojo ekstrakto sudėties kokybinę analizę preliminariai identifikuoti skirtingi antocianinų, proantocianidinų, flavonoidų ir fenolinių rūgščių junginiai. Iš jų, cianidino gliukozidai, kvercitino dariniai, eriodiktiolio gliukoronidas, taip pat keletas procianidinų buvo intensyviausi.

Įvertinus įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijas nustatyta, jog didžiausia išeiga ($18,77 \pm 0,19$ %), bendruoju fenolinių junginių kiekiu ($108,90 \pm 0,26$ mg GRE/g frakcijos), antioksidaciniu aktyvumu – *Trolokso* ekvivalento antioksidacinė geba ($208,43 \pm 4,29$ mg TE/g frakcijos), DPPH ($248,13 \pm 4,98$ mg TE/g frakcijos) pasižymėjo etanolio ir vandens mišinio (70/30, v/v) frakcijos *henryi* rūšies lapai. Šios frakcijos tirpiklis taip pat buvo reikšmingiausias faktorius vykdant kitų rūšių lapų ekstrakciją. Žemas heksano frakcijos antioksidacinis aktyvumas parodė, jog lipofiliškų antioksidantų šiose įvairių rūšių lapuose beveik nėra. Be to, įvertinus lapų surinkimą dvejose skirtingose augimo stadijose nepastebėti skirtumai, išskyrus antioksidacinį aktyvumą, kuris buvo rugsėjį surinktuose lapuose. Atlikus atrinktų lapų frakcijų kokybinę analizę preliminariai identifikuotos fenolinės rūgštys (chino, chlorogeno), flavonoidai (kvercetrinas, kvercitino gliukozidas, rutinas ir kt.), taip pat saponinas (ginsenozidas *Ro*).

Brazdauskas, Tadas. *Biorefining of Chokeberries and Eleutherococcus Leaves into Functional Ingredients by using Traditional and High Pressure Extraction Methods: Master's thesis in Food Science and Safety* / supervisor prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Science of Technology, Food and Beverage Technology

Key words: *black chokeberry; eleutherococcus; extraction; optimization; phenolics*

Kaunas, 2016. 69 p.

SUMMARY

The aim of this project is to determine the effective parameters of black chokeberry pomace and biorefining of *Eleutherococcus* leaves into functional ingredients in order to obtain rational and sustainable use of plant material.

Black chokeberry pomace have been biorefined into functional ingredients with an application of high pressure extraction methods. First of all, extraction by supercritical fluids has been applied using carbon dioxide to eliminate lipophilic fraction from the pomace. Furthermore, experiments of pressurized liquid extraction (PLE) were planned and completed. Analysis and optimization of experimental results were accomplished by applying response surface methodology. Optimal PLE factorial values have been established by which maximum pomace extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity are obtained.

Eleutherococcus leaves have been biorefined into functional ingredients with an application of traditional extraction methods. The extraction of the leaves was performed sequentially using the solvents of increasing polarity in Soxhlet device (using hexane and acetone) and by shaking (using mixture of ethanol and water (70/30, v/v)). *Eleutherococcus* species (*henryi*, *senticosus* and *sessiliflorus*), their collection in two different growth phases (June and September) and solvent influence on fraction yield, total phenolic content and antioxidant activity has been evaluated.

In pomace extracts and fractions of leaves total phenolic content has been established by Folin–Ciocalteu method and antioxidant activity has been evaluated by applying *in vitro* ABTS^{•+} free radical (or Trolox equivalent antioxidant capacity) and DPPH[•] radical scavenging methods. Preliminary qualitative analysis of optimal pomace extract content was done with the help of two-dimensional liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometer. Preliminary

qualitative analysis of collected leaves fractions has been done with ultra high performance liquid chromatography coupled with quadruple time of flight mass detector.

After completing 29 PLE experiments design of black chokeberry pomace and its optimization, optimal factorial values were established (*temperature* – 165 °C, *ethanol* – 46 %, *formic acid* – 1,8 %). PLE pomace extract which has been produced by these optimal factorial values was exclusive of its high yield (72,53±0,02 %), total phenolic content (236,64±3,72 mg GAE/g extract) and antioxidant activity: *Trolox* equivalent antioxidant capacity – (4,346±0,241 mmol TE/g extract) and DPPH (EC₅₀) – (5,92±0,23 µg/ml). Optimization model has been confirmed suitable to foresee PLE pomace optimal factor values. Moreover, 3D surface graphs of each responsible variable and optimization response have been made which in the future will facilitate to foresee the use of these pomace functional ingredients in producing various products. After completing qualitative analysis of pomace optimal extract, different anthocyanins, proanthocyanidins, flavonoids and phenolic acids compounds have been preliminarily identified. Among these compounds: cyanidin glucoside, quercetin derivatives, eriodictyol glucuronide as well as several procyanidins were the most intense.

After evaluating *Eleutherococcus* leave fractions, it was found that mixture of ethanol and water (70/30, v/v) fraction *henryi* species of leaves were rich in the highest yield (18,77±0,19 %), total phenolic content (108,90±0,26 mg GAE/g fraction) and antioxidant activity – *Trolox* equivalent antioxidant capacity (208,43±4,29 mg TE/g fraction) and DPPH (248,13±4,98 mg TE/g fraction). This fraction solvent has also been the most significant factor in extraction of other species of leaves. Moreover, after evaluating collection of leaves in two different growth phases no differences have been found except for antioxidant activity which was in leaves collected in September. After completing qualitative analysis of collected leave fractions phenolic acids (quinic, chlorogenic), flavonoids (quercitrin, quercetin glucosides, rutin etc) also saponin (ginsenoside *Ro*) preliminarily identified.

SANTRUMPOS

TEAG	Trolokso ekvivalento antioksidantinė galia (<i>angl.</i> Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TE	Trolokso ekvivalentai (<i>angl.</i> Trolox Equivalents)
BFJK	Bendrasis fenolinių junginių kiekis (<i>angl.</i> Total Phenolic Content)
GRE	Galo rūgšties ekvivalentai (<i>angl.</i> Gallic Acid Equivalents)
APM	Atsako paviršiaus metodologija (<i>angl.</i> Response Surface Methodology)
CT	Centriniai taškai (<i>angl.</i> Central Points)
KT	Kintamųjų lygiai (<i>angl.</i> Levels of Variables)
ETPS	Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje (<i>angl.</i> Pressurized Liquid Extraction)
ESS	Ekstrakcija superkritiniais skysčiais (<i>angl.</i> Supercritical Fluid Extraction)
ESS-CO₂	Ekstrakcija superkritiniu skysčiu naudojant anglies dvidegenį (<i>angl.</i> Supercritical Fluid Extraction using carbon dioxide)
SN	Standartinis nuokrypis
EVM	Etanolio ir vandens mišinys
PEDPT	Pakopinė ekstrakcija didėjančio poliškumo tirpikliais (<i>angl.</i> sequentially extraction using the solvents of increasing polarity)
SCH×SCH	Dviejų dimensijų skysčių chromatografija (<i>angl.</i> Two-Dimensional Liquid Chromatography)
DMD-MS	Diodų matricos detektorius ir masių spektrometras (<i>angl.</i> Diode Array Detector and Mass Spectrometer)
¹D	Pirmoji dimensija (<i>angl.</i> First Dimension)
²D	Antroji dimensija (<i>angl.</i> Second Dimension)
PL	Polimerizacijos laipsnis

IVADAS

Per pastaruosius dešimtmečius maisto švaistymas įgavo tokį mastą, kad turėtų būti laikomas globaline problema, išskylančia visuose maisto grandinės etapuose – nuo lauko iki stalo. *Jungtinių Tautų Maisto ir žemės ūkio organizacijos* duomenimis, pasaulyje išmetama apie trečdalis viso maisto – maždaug apie 1,3 mlrd. tonų per metus [1]. Vien Europos Sąjungoje kasmet iššvaistoma maisto maždaug 89 mln. tonų arba 179 kg vienas gyventojas. Šią problemą lemiančios priežastys nėra siejamos vien tik su blogais vartotojų įpročiais, nes maistas virsta atliekomis net nepasiekus jų, kadangi 39 % viso išvaistomo maisto susidaro maisto produktų ir gėrimų gamybos pramonėje.[2]

Vaisiai, uogos, daržovės ir kitos augalinės kilmės žaliavos yra sudarytos iš įvairių anatominių dalių ir medžiagų. Maisto produktų ir gėrimų pramonėje spaudžiant sultis ar gaminant produktus kosmetikos ir farmacijos pramonei dažnai panaudojama tik tam tikra šių žaliavų dalis – lieka daug šalutinių atliekų: išspaudų, kitų anatominių augalo dalių. Gautos šalutinės atliekos dažniausiai panaudojamos labai neefektyviai arba tiesiog išmetamos [3]. Pasak daugelio mokslinių literatūros šaltinių vaisių ir uogų išspaudos yra vertingų maisto komponentų ir bioaktyvių medžiagų šaltinis, tokių kaip baltymų, riebalų, taip pat maistinių skaidulų, pektinų, ląstelės sienelės polisacharidų, vitaminų, polifenolių, fosfolipidų [4]. O augalų anatomicinės dalys galėtų būti tiriamos kaip maistui tinkamos žaliavos. Vienas iš inovatyvių tokių atliekų utilizavimo metodų yra jų biorafinavimas į funkcionaliuosius ingredientus, kurie gali rasti pritaikymą kuriant padidintos biologinės vertės maisto produktus, natūralius maisto priedus, maisto papildus, kosmetikos gaminius bei medicinos preparatus[5].

Šiaurės ir Vidurio Europos šalių sulčių ir kitų produktų gamybos pramonėje plačiai naudojamos aronijos uogos [6]. Pavyzdžiui, Lenkijoje per 2009 – 2012 m. aronijos uogų metinis vidurkis – 45 tūkst. tonų. Dauguma šių uogų, tiksliau, 90 % sunaudojamos sulčių gamyboje, o likusi dalis – vaisinių arbatų, maisto papildų ir kosmetikos produktų gamyboje [7]. Buvo nustatyta, jog aronijos uogos yra vienos turtingiausių polifenolinių junginių šaltinis, kurių sudėtyje esantys antocianinai, proantocianidinai ir fenolinės rūgštys pasižymi aukštu antioksidaciniu aktyvumu [8, 9]. Be to, atlikta tyrimų, įrodančių teigiamą poveikį žmogaus sveikatai, šios uogos turi antidiabetinį, hepaprotekcinį, kardioprotekcinį, antimutageninį ir antikancerogeninį veikimą [10]. Po sulčių spaudimo proceso daugelis polifenolinių ir kitų bioaktyvių junginių nepereina į sultis ir lieka išspaudose [11].

Augalų karalystėje yra priskaičiuojama kelios dešimtys tūkstančių augalų rūšių. Daugelis jų, įskaitant atskiras anatomines jų dalis yra labai mažai ištirtos. Pavyzdžiui, eleuterokoko gentį

sudaro 40 augalų rūšių, augančių Šiaurės Rusijoje, Kinijoje, Korėjoje ir Japonijoje. Keletas šių augalų rūšių yra auginamos Europos botanikos soduose.[12] Labiausiai žinoma rūšis yra *Eleutherococcus senticosus*, dar vadinama Sibiro ženšeniu, kurio tik šaknys efektyviai naudojamos kraujo spaudimą ir cukraus kiekį mažinančių, uždegimą slopinančių ir organizmo imunitetą stiprinančių preparatų gamybai [13]. O šio augalo kitos anatomicinės dalys dažniausiai tampa augalinės kilmės šalutinėmis atliekomis. Atlikus literatūros duomenų paiešką, nustatyta, kad įvairių eleuterokoko rūšių lapų antioksidacinės savybės ir fitocheminė sudėtis iki šiol beveik netirta.

Projekto tikslas – nustatyti efektyvius juodavaisės aronijos uogų išspaudų ir įvairių eleuterokoko rūšių lapų biorafinavimo į funkcionaliuosius ingredientus parametrus, siekiant racionalaus ir tausojančio augalinės žaliavos panaudojimo.

Projekto tikslui pasiekti buvo sprendžiami šie uždaviniai:

1. Pašalinti juodavaisės aronijos uogų išspaudų lipofilinę frakciją, taikant ekstrakciją superkritiniais skysčiais naudojant anglies dvidegenį. Po to, suplanuoti ir įvykdyti išspaudų ekstrakcijos tirpikliais padidintame slėgyje eksperimentus.
2. Išskirti įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijas, taikant pakopinę ekstrakciją didėjančio poliškumo tirpikliais *Soksleto* aparate ir purtant.
3. Įvertinti išspaudų ekstraktų ir lapų frakcijų bendrąjį fenolinių junginių kiekį *Folin–Ciocalteu* metodu ir antioksidacines savybes, taikant antioksidacinio aktyvumo *in vitro* metodus.
4. Numatyti optimalias išspaudų ekstrakcijos tirpikliais padidintame slėgyje faktorių vertes su kuriomis išeiga, bendrasis fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas būtų didžiausias. Išskirti optimaliomis faktorių vertėmis išspaudų ekstraktą, įvertinti ir palyginti jo spėjamąsias ir eksperimentines priklausomų kintamųjų vertes.
5. Įvertinti įvairių rūšių lapų ir jų surinkimą dvejose skirtingose augimo stadijose bei frakcijos tirpiklio įtaką išeigos, bendrojo fenolinių junginių kiekio ir antioksidacinio aktyvumo atžvilgiu.
6. Atlikti išspaudų optimaliojo ekstrakto preliminarą sudėties kokybinę analizę, taikant dviejų dimensijų skysčių chromatografiją su diodų matricos detektoriumi ir masių spektrometru.
7. Atlikti atrinktų lapų frakcijų preliminarą sudėties kokybinę analizę, taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografiją su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. JUODAVAISĖ ARONIJA

1.1.1. Botaninis apibūdinimas, paplitimas ir panaudojimas

Juodavaisė aronija (*lot. Aronia melanocarpa* (Mich.) Elliot; *angl. black chokeberry*)



1 pav. Juodavaisė aronija

priskiriama erškėtinių (*lot. Rosaceae*) šeimos obelinių (*lot. Maloideae*) pošeimio aronijos augalų genčiai. Kitos šios genties rūšys yra raudonvaisė aronija (*lot. Aronia arbutifolia* [L.] Elliot; *angl. red chokeberry*) ir purpurinė aronija (*lot. Aronia prunifolia*; *angl. purple chokeberry*). Pastaroji dar įvardijama išvestu hibridu sukryžminus kitas dvi.[14]

Juodavaisė aronija yra kilusi iš Šiaurės Amerikos rytinės dalies ir 1900 metais migravo į Europą per Vokietiją į Rusiją ir atgal [15]. Juodavaisės aronijos krūmas užauga iki 80–90 cm aukščio su 3–7 cm ilgio lygiais, blizgančiais lapais ir žydi baltais žiedais (žr. 1 pav.) gegužės–birželio mėnesiais. Vaisiai prinoksta rugpjūčio–rugsėjo mėnesiais. Vaisių kekę sudaro 8-14 uogų (Ø 6-13

mm, 0,5–2 g) (žr. 1 pav.). Jų sultingą saldžiarūgštį minkštimą su 3–5 sėklomis dengia juodai violetinės spalvos plona odelė [14]. Uogos šiek tiek pasižymi burną sutraukiančiu pojūčiu. Apytiksliai po penkerių metų krūmo brandos iš 1 ha plantacijos galima sulaukti iki 12 tonų uogų [16]. Neseniai atlikti moksliniai tyrimai rodo, kad tręšimas gali daryti įtaką juodavaisės aronijos uogų cheminei sudėčiai, greitesniam uogų sunokimui, ypač daro įtaką cukraus bei fenolinių junginių kiekiui [17]. Pastaruoju metu juodavaisės aronijos uogos plačiai naudojamos Šiaurės ir Vidurio Europos šalių sulčių ir kitų produktų (uogienių, drebučių, arbatų) gamybos pramonėje. Taip pat šios uogos ir jų išspaudų ekstraktai gali būti panaudojami kaip natūralus maisto dažiklis ir tuo tikslu pakeisti sintetinius maisto dažiklius. Aronijos uogos naudojamos alkoholinių gėrimų (vyno, likerio, spirito) gamyboje, kurios įeina kaip pagrindinis sudedamasis ingredientas [18]. Buvo rasta daug mokslinių duomenų, kad aronijos uogose esantys antocianinai galėtų pakeisti sintetinius dažus, kurie pasižymi kancerogeniniu veikimu žmonių sveikatai [19]. Šiandien juodavaisės aronijos uogos yra vienos iš žymiausių mokslinių tyrimų objektų.

1.1.2. Aronijos uogų cheminė sudėtis

Aronijos uogų cheminė sudėtis priklauso nuo įvairių aplinkos ir genetinių faktorių, tokių kaip rūšis, augimo vieta (plantacija), klimatinės sąlygos, krūmo subrendimas ir vaisių derliaus nuėmimo laikas [20].

Skaidulinių medžiagų kiekis siekia iki 5,62 g/100 g šviežiuose uogose [21]. O uogų išspaudos yra geras skaidulinių medžiagų šaltinis, kurių sudėtyje gan nemaži kiekiai celiuliozės (35 %), hemiceliuliozės (34 %) ir pektininių medžiagų (7 %) [5]. Be to, skaidulinių medžiagų milteliai, gauti iš šių uogų, turi didelį kiekį antocianinų, kurie ir apsprendžia tamsiai violetinę miltelių spalvą [22].

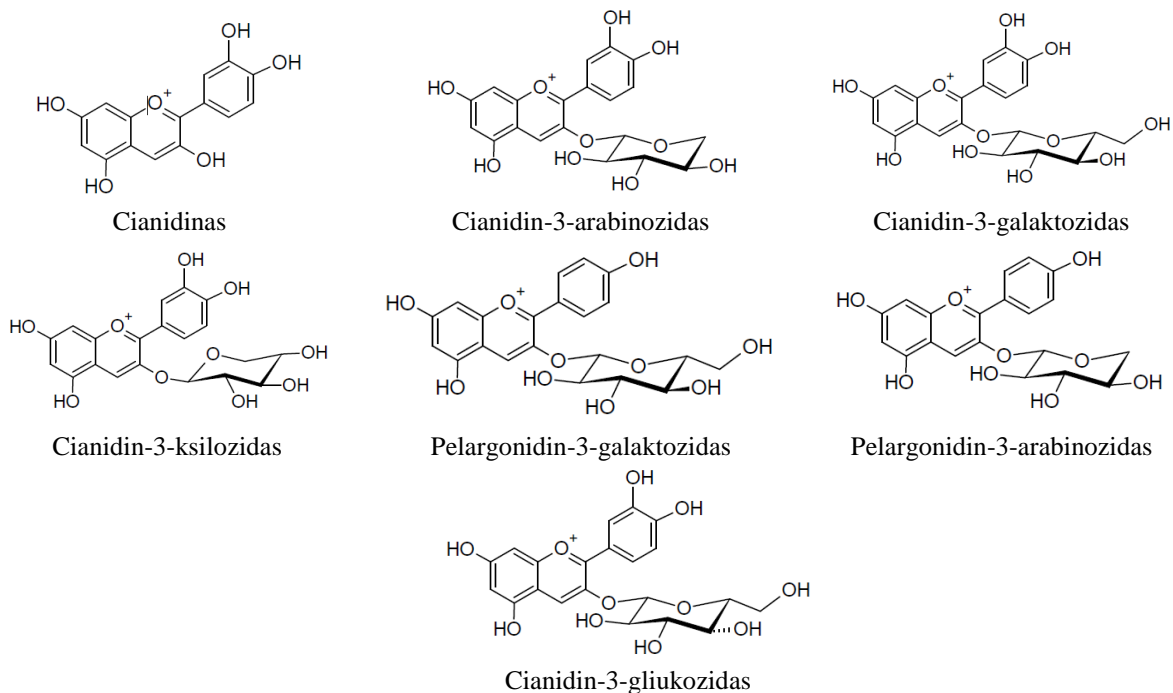
Bendrasis organinių rūgščių kiekis šviežiuose aronijos uogose yra palyginti mažas (1–1,5 %) su kitomis uogomis. Pagrindinės identifikuotos rūgštys yra obuolių ir citrinų.[21] Toliau pateikiama apžvalga apie fenolinius junginius ir cukrūs juodavaisės aronijos uogose.

1.1.3. Fenoliniai junginiai ir cukrūs aronijos vaisiuose

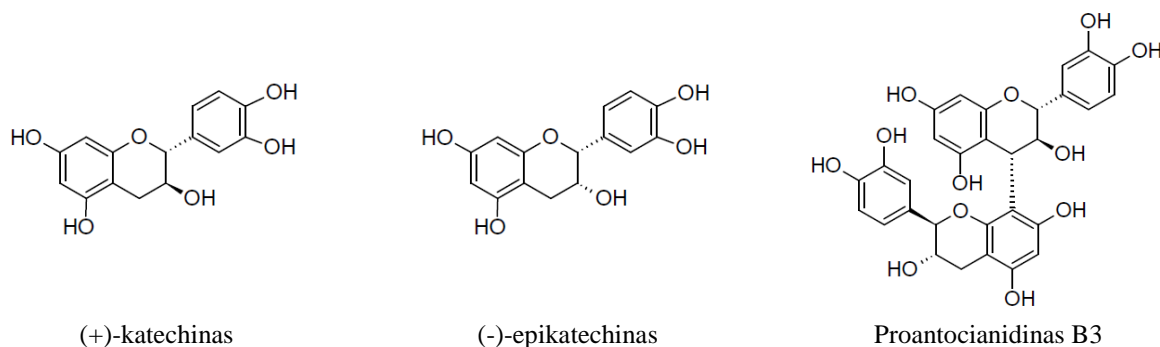
Pagrindiniai aronijos uogose esantys fenoliniai junginiai pavaizduoti struktūrinėmis formulėmis 2, 3, 4 ir 5 pav. Tai antocianinai ir proantocianidinai, hidroksicinamono rūgštys, flavonoidai. Šie fenoliniai junginiai apsprendžia juodavaisės aronijos uogų, sulčių ir išspaudų farmakologines savybes.

Juodavaisės aronijos uogos yra auginamos dėl jų sudėtyje didelio antocianinų kiekio. Ši flavonoidų klasė apsprendžia šių uogų tamsiai violetinę spalvą. Juodavaisės aronijos uogos yra vienos iš turtingiausių antocianinų šaltinių. Uogos antocianinų gali sukaupti netgi iki 25 % visų fenolinių junginių. Dominuoja cianidinas, cianidin-3-arabinozidas, cianidin-3-galaktozidas, cianidin-3-ksilozidas, pelargonidin-3-galaktozidas, pelargonidin-3-arabinozidas, cianidin-3-gliukozidas (žr. 2 pav.). Buvo nustatyta, jog antocianinų kiekis sultyse sudaro 1173 mg/100 g, o išspaudose – 1837 mg/100 g SM. [23, 24, 25]

Kita viena iš pagrindinių fenolinių junginių klasių, randamų juodavaisės aronijos uogose yra proantocianidinai. Randami proantocianidinų monomerai ir polimerai: (+)-katechinas, (-)-epikatechinas, proantocianidinas B3 (žr. 3 pav.). Moksliniais tyrimais buvo nustatytas skirtingas proantocianidinų kiekis juodavaisės aronijos uogose – 5182 mg/ g SM (PL=23), 3992 mg/100 g SM (PL=14) ir 664 mg šviežiuose uogose. Polimerinių proantocianidinų kiekis šių uogų sultyse nustatytas 1579 mg/100 g SM (PL=23) ir 3652 mg/100 g SM, išspaudose – 8192 mg/100 g SM (PL=34) ir 5611 mg/100 g SM. [14]



2 pav. Antocianinai aronijos uogose.



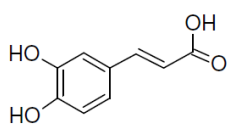
3 pav. Proantocianidinų monomerai ir polimerai aronijos uogose.

Moksliniais tyrimais buvo nustatyta, jog juodavaisės aronijos uogos pasižymi vienos iš geriausių hidroksicinamono rūgščių šaltinių. Jų kiekis šviežiuose uogose sudaro 96 mg/100 g. Hidroksicinamono rūgštys, randamos juodavaisės aronijos uogose, yra kavos, ferulo, chlorogeno ir neochlorogeno rūgštys (žr. 4 pav.). Pastarosios dvi buvo nustatytos kaip pagrindinis šių uogų rūgštys. Buvo nustatyta, jog chlorogeno ir neochlorogeno rūgščių koncentracija sudaro atitinkamai 302 mg/100 g ir 291 mg/100g uogų SM, 416 mg/100 g ir 393 mg/100 g sulčių SM bei 204 mg/100 g ir 169 mg/100 g išspaudų SM.[8, 26]

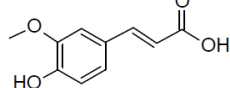
Juodavaisės aronijos uogose taip pat buvo nustatyti flavonoidų klasės kvercetas ir jo dariniai: kvercetin-3-galaktozidas, kvercetin-3- gliukozidas ir kvercetin-3-rutinozidas (žr. 5 pav.). Šių junginių kiekis šviežiuose uogose sudaro 71 mg/100 . Trijų kvercetino darinių (kvercetin-3-ramnozil-gliukozido, kvercetin-3-galaktozido ir kvercetin-3-gliukozido) koncentracijos buvo nustatytos: varijavo nuo 13 iki 27 mg/100 g uogų SM, varijavo nuo 21 iki 31 mg/100 g sulčių SM

ir varijavo nuo 36 iki 50 mg/100 g išspaudų SM. Kiti neidentifikuoti kvercetino dariniai varijavo nuo 27 – 82 mg/100 g uogų SM. [8, 27, 28]

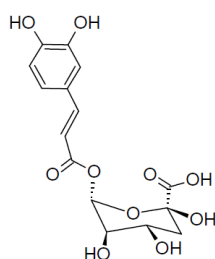
Dominuojantys cukrūs juodavaisės aronijos uogose yra gliukozė, sacharozė, fruktozė ir sorbitolis (žr. 6 pav.). Redukuojančių cukrų koncentracija šviežiuose juodavaisės aronijos uogose sudaro nuo 16 iki 18 %. Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog bendra fruktozės ir gliukozės kiekis šiose šviežiuose uogose varijuoja nuo 13 iki 17,6 g/100 g. Šviežiai spaustose juodavaisės aronijos uogų sultyse gliukozės koncentracija varijavo nuo 30 iki 60 g/l ir fruktozės koncentracija varijavo nuo 28 iki 58 g/l. Taip pat buvo nustatyta, jog šiose uogose sorbitolio kiekis yra vienas iš didžiausių lyginant su kitomis uogomis. Nustatytas vidutinis sorbitolio kiekis yra 80 g/l šviežiuose sultyse, o pasterizuotose jo kiekis sumažėja iki 56g/l.[14, 29]



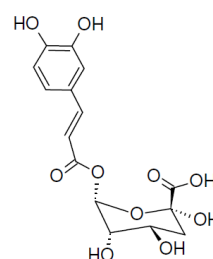
Kavos rūgštis



Ferulo rūgštis

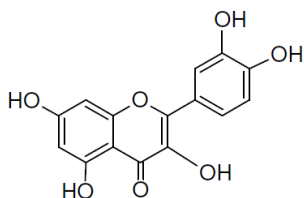


Chlorogeno rūgštis

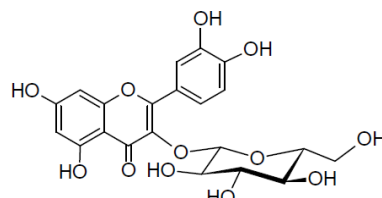


Neochlorogeno rūgštis

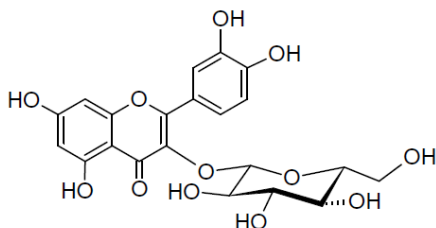
4 pav. Hidroksicinamono rūgštys aronijos uogose.



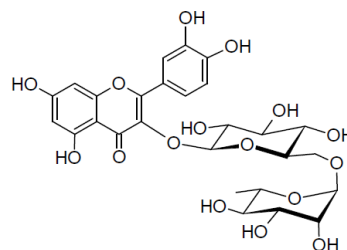
Kvercitas



Kvercitin-3-galaktozidas

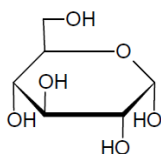


Kvercitin-3-gliukozidas

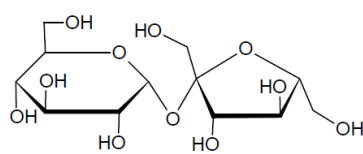


Kvercitin-3-rutinozidas

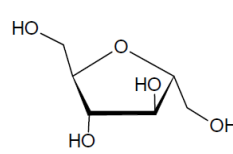
5 pav. Flavonoidai aronijos uogose.



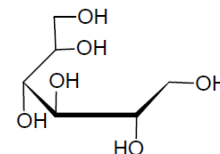
Gliukozė



Sacharozė



Fruktozė



Sorbitolis

6 pav. Cukrūs aronijos uogose.

1.1.4. Aronijos uogų fenolinių junginių farmakologinės savybės

Juodavaisės aronijos uogos yra vienos turtingiausių polifenolinių junginių šaltinis, kurių sudėtyje esantys antocianinai, proantocianidinai ir fenolinės rūgštys pasižymi aukštu antioksidaciniu aktyvumu. Didelis antioksidacinis aktyvumas būdingas flavonoidams, kurie yra viena geriausiai ištirtų fenolinių junginių grupių ir kuriems priskiriami antocianinai. Nustatyta, jog šių uogų sulčių TEAG vertės yra keturgubai didesnės už spanguolių ar mėlynių sultis. Taip pat buvo ištirta šviežiai spaustų juodavaisės aronijos uogų sulčių deguonies radikalų absorbcijos geba, šio tyrimo vertės parodė, jog uogose esantys antocianinai daro 33 % įtaką antioksidaciniam aktyvumui [14]. Be to, buvo pastebėta monomerinių ir oligomerinių proantocianidinų didelė įtaka antioksidacinėms savybėms [30].

Buvo atlikta tyrimų, įrodančių teigiamą poveikį žmonių sveikatai, juodavaisės aronijos uogos turi antidiabetinį, hepaprotekcinį, kardioprotekcinį, antimutageninį ir antikancerogeninį veikimą. Juodavaisės aronijos uogose esantys antocianinai turėjo įtakos cukrinio diabeto ligos prevencijai ir su šia liga susijusių komplikacijų įveikimui. Atlikti tyrimai su gyvūnais parodė, jog juodavaisės aronijos uogų sultys sumažino hiperglikemiją ir hipertrigliceridemiją cukriniu diabetu sergančioms žiurkėms. O tyrimai su žmonėmis parodė, kad kiekvieną dieną suvartojus bent 200 ml šių uogų sulčių per trijų mėnesių trukmę gali žymiai sumažinti gliukozės koncentraciją kraujyje. Taip pat tyrimai su žmonėmis rodė ir kūno masės mažėjimą, todėl šių sulčių įvedimas į dietą galėtų būti susietas su nutukimo problemos mažinimu [31].

Kiti *in vitro* tyrimai parodė, jog šios uogos turi apsauginį poveikį širdžiai ir kraujagyslėms. Tyrimai su gyvūnais parodė, kad aronijos uogų sultys sumažina aukštą bendrąją plazmos cholesterolio koncentraciją, taip pat mažo tankio lipoproteinų cholesterolio ir pačių lipidų koncentraciją. Taip pat buvo pastebėtas teigiamas sulčių poveikis žmonėms po miokardo infarkto.

Tyrimai su gyvūnais patvirtino, šiose uogose randamų antocianinų gebėjimą sujungti metalo jonus. Mat, šie junginiai sumažino kadmio kaupimąsi žiurkių instuose ir kepenyse. Buvo pastebėtas teigiamas aronijos uogų sulčių poveikis kepenų ligų prevencijai, kai žiurkės buvo veikiamos toksiška medžiaga – CCl₄ (anglies tetrachloridas). Saugant biologines sistemas nuo laisvųjų radikalų sukeliama osidacinio streso juodavaisės aronijos uogų antocianinai turi didelį poveikį.[14] Daugelis mokslinių tyrimų patvirtino šių uogų antikancerogeninį veikimą. Uogose esantys cianidino dariniai turi chemoprolifaktinį poveikį. Aronijos vaisių fenoliniai junginiai turi antimutageninį veikimą. Vaisių antocianinai mažina benzpireno sukeliama mutagenėzes. Be to, buvo įrodyta, kad šių uogų sulčių vartojimas mažina N-nitrozaminų generavimąsi žiurkėse.

Būtina pabrėžti, jog literatūroje rasta duomenų, kad šios uogos santykinai neturi neigiamo poveikio žmonių sveikatai, nebent tai būtų susiję su uogų kokybe [10].

1.2. ELEUTEROKOKAS

1.2.1. Eleuterokoko botaninis apibūdinimas, paplitimas ir panaudojimas

Eleuterokoko (*lot. Eleutherococcus* arba *Acanthopanax*) genčiai priklauso apie 40 rūšių augalų, dažniausiai dygliuotų krūmų, paplitusių Rytų ir Pietryčių Azijoje. Jų lapai sudėtiniai,



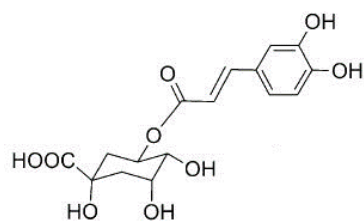
7 pav. Eleuterokokas *senticosus*.

pirštuoti, trilapiai arba penkialapiai. Žiedai smulkūs, susitelkę paprastuose arba sudėtinuose rutuliškų skėčių ar galvučių pavidalo žiedynuose. Kaip ir kiti aralinių šeimos augalai, eleuterokokai žydi vasaros pabaigoje ir rudenį. Vaisiai būna nedideli melsvai juodi su kauliuku. Šie augalai gerai auga laidžioje, derlingoje, rūgštokoje dirvoje. Žiemai, ligoms ir kenkėjams yra atsparūs, tik labai šaltomis žiemomis gali truputi apšalti ūgliai. Todėl keletas šių rūšių augalų yra auginami Europos botanikos soduose.[32] Labiausiai žinoma rūšis yra *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim, dar vadinama Sibiro ženšeniu (žr. 7 pav.) [33]. Šios eleuterokoko augalo rūšies šaknys yra naudojamos

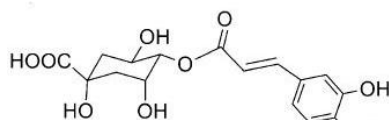
kraujo spaudimą ir cukraus kiekį mažinančių, uždegimą slopinančių ir organizmo imunitetą stiprinančių preparatų gamybai. O liaudies medicinoje eleuterokoko augalai vartojami sveikatai ir gerai savijautai palaikyti ir susprinti. [34, 35] Atlikus literatūros duomenų paiešką, nustatyta, kad projekte pasirinktų eleuterokoko rūšių lapų antioksidacinės savybės ir fitocheminė sudėtis iki šiol beveik netirta. Pavyzdžiui, *TR WOS* duomenų bazėje raktiniams žodžiams “*E. henryi* + antioxidant” nerasta nei vieno įrašo; *E. sessiliflorus* – tik 3.

1.2.2. Eleuterokoko rūšių cheminė sudėtis

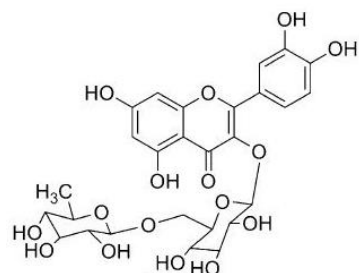
Remiantis publikacijomis eleuterokoko *senticosus* augalo šaknyse yra aptinkamos tokios biologiškai aktyvios medžiagos: eleuterozidai, sentikozidai, galaktozidai, siringininas, hiperinas, saponinai, β -karoteno, vitamino E, β -sitosterolio, polisacharidų, lignanų [36]. Kitame moksliniame straipsnyje rasta informacijos apie eleuterokoko *henryi* lapuose aptinkamus junginius: 5-O-kafeoil-chino rūgštis, 4-O-kafeoil-chino rūgštis, 3,4-di-kafeoil chino rūgštis, 1,5-di-kafeoil chino rūgštis, 3,5-di-kafeoil chino rūgštis, 4,5-di-kafeoil chino rūgštis, rutinas, kvercetin-3-O-gliukozidas, kamferol-3-rutinozidas, kvercetin-3,7-di- β -gliukozidas, kvercitas [37]. Šių išvardintų junginių struktūrinės formulės pateikiamos 8 pav.



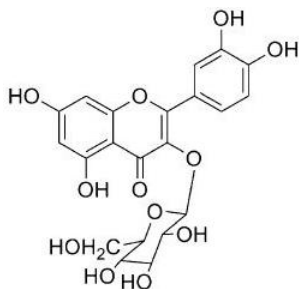
5-O-kafeoil-chino rūgštis



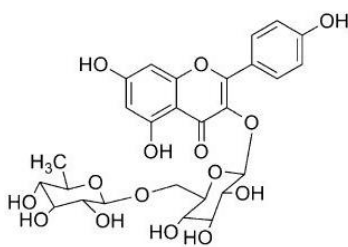
4-O-kafeoil-chino rūgštis



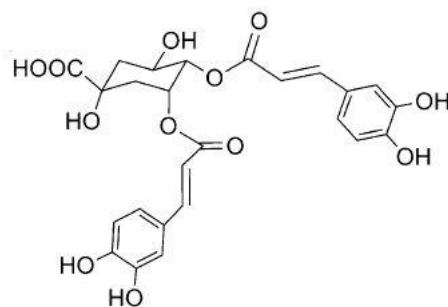
Rutinas



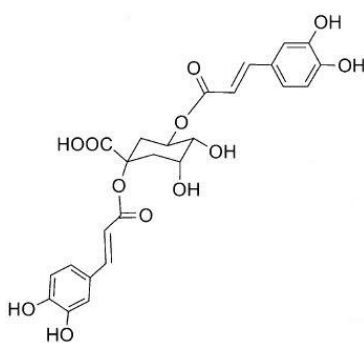
Kvercetin-3-O-gliukozidas



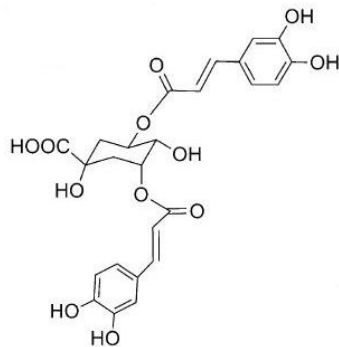
Kamferol-3-rutinozidas



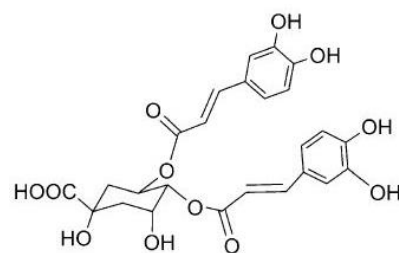
3,4-di-kafeoil chino rūgštis



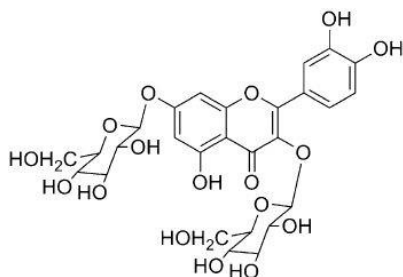
1,5-di-kafeoil chino rūgštis



3,5-di-kafeoil chino rūgštis



4,5-di-kafeoil chino rūgštis



Kvercetin-3,7-di-β-gliukozidas



Kvercitas

8 pav. Eleuterokoko *henryi* junginiai.

1.2.3. Eleuterokoko (*senticosus*) farmakologinės savybės

Eleuterokokas *senticosus* pasižymi adaptogeninėmis, streso metu organizmą balansuojančiomis savybėmis, reguliuoja kraujo spaudimą, aktyvina imuninės sistemos veiklą. Farmokologinis eleuterokoko *senticosus* aktyvumas labiausiai siejamas su biologiškais aktyviaisiais junginiais – saponiniais, vadinamais ginsenozidais. Šie junginiai turi didelę perspektyvą medicinoje, nes yra atlikta daug mokslinių tyrimų, įrodančių jų teigiamą

farmakologinį poveikį. Kiekvienas ginsenozidas turi skirtingą farmakologinį poveikį, o vienas jų gali sukelti keletą poveikių į tą patį audinį. Tam tikri ginsenozidai gali veikti priešingai vienas kito atžvilgiu, pavyzdžiui, vienas kelti kraujospūdį ir stimuliuoti centrinę nervų sistemą, o kitas mažinti kraujospūdį ir slopinti centrinės nervų sistemos veiklą. Be to, kai kurių ginsenozidų farmakologinis poveikis yra įrodytas ne tik klinikiniais tyrimais, bet ir molekuliniam lygmenyje. Manoma, jog eleuterokoko *senticosus* farmakologinis poveikis gali būti siejamas su ginsenozidų cheminės struktūros identiškuoju steroidinius hormonus.[33, 38]

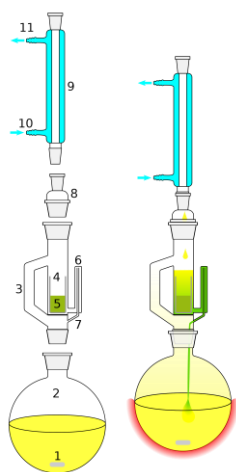
Eleuterokoko *senticosus* junginiai turi vėžinių ląstelių citoksinį ir augimo slopinimąjį poveikį. Tyrimais buvo įrodyta, jog ginsenozidai turi stiprų priešvėžinį poveikį, o profilaktiškai vartojant jo preparatus mažiau tikėtina susirgti įvairiomis vėžio formomis. [38]

1.3. TRADICINIAI IR AUKŠTO SLĖGIO EKSTRAKCIJOS METODAI

Šiame projekte yra pateikiama taikytų tradicinių (Soksleto ekstrakcija ir ekstrakcija purtant) ir aukšto slėgio (ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje ir ekstrakcija superkritiniais skysčiais) ekstrakcijos metodų literatūros apžvalga.

1.3.1. Soksleto ekstrakcija

1879 m. Soksletas sukūrė aparatą, kuris ilgą laiką buvo plačiausiai naudojamas tam, kad išskirti funkcionaliuosius ingredientus iš kietųjų medžiagų. Ši ekstrakcija yra laikoma tradiciniu



metodu. Ekstrakcijos tirpiklis yra parenkamas taip, kad būtų galima išskirti tikslinius junginius. Todėl įvairių ekstrakcijos tirpiklių parinkimas sudaro galimybę iš tos pačios kietosios medžiagos išgauti skirtingas frakcijų išeigas ir, žinoma, tų frakcijų sudėtis skiriasi.

Soksleto aparatas pavaizduotas 9 pav. Jame ekstrakcijos tirpiklis (1) yra garinamas, kondensuojasi šaldytuve (9) ir teka per ekstrahuojamą kietąją medžiagą (5). Ekstrakcijos tirpiklio grįžimas į apvaliadugnę kolbą (2) vyksta ciklais – tirpiklis grįžta į ją, kai

9 pav. Soksleto aparatas. ekstrakcijos kameroje (3) susikaupia tam tikras tirpiklio kiekis. 00 pav. taip pat pavaizduotas sifonas (6), įdėklas (4), šaldančiojo agento (pvz. vandens) įtekėjimo (11) į šaldytuvą ir ištekėjimo (12). iš jo angos. Remiantis moksline literatūra, Soksleto ekstrakcijoje plačiausiai naudojamas tirpiklis yra heksanas, kuris gerai pasižymi nepolinių junginių ekstrahavimu, pavyzdžiui, augalinio aliejaus. Be to, Soksleto aparatu išskiriami junginiai

turi pasižymėti dideliu patvarumu parinkto ekstrakcijos tirpiklio virimo temperatūroje, nes ekstrahuojama frakcija kaupiasi apvaliadugnėje kolboje su pačiu tirpikliu. Išties heksanas nėra aplinką tausojantis tirpiklis, todėl mokslininkai bandė ieškoti sprendimų ir panaudoti kitus tirpiklius, kurie būtų netoksiški. Soksleto ekstrakciją labai sąlygoja ekstrahuojamos medžiagos savybės ir dalelių dydis, nes lėtas tirpiklio prasiskverbimas į kietąją medžiagą riboja ekstrahavimo efektyvumą.[39]

Pagrindiniai Soksleto ekstrakcijos privalumai yra tai, kad palaikoma gan aukšta ekstrakcijos temperatūra distiliavimo kolboje, nėra reikalingas frakcijos perfiltravimo procesas, metodą galima neprižiūrėti, kadangi trunka ilgai, bei šis metodas yra paprastas ir nereikalaujantis brangios aparatūros. Taip pat literatūroje įvardijami Soksleto ekstrakcijos trūkumai: per ilgas ekstrahavimo laikas, naudojami tirpikliai yra toksiški, brangūs, sunaudojami jų dideli kiekiai, taip pat frakcijoje susidaro didelis tirpiklio kiekis, kurį nugarinti sunaudojami papildomi ištekliai ir, žinoma, laikas. Be to, vienas iš svarbių šios ekstrakcijos trūkumų yra tam tikrų junginių skilimas aukštoje tirpiklio virimo temperatūroje. Pastaruoju metu, šio tradicinio ekstrakcijos metodo naudojimas yra labai sumažėjęs dėl kitų perspektyvių aukšto slėgio ekstrakcijos metodų.[40]

1.3.2. Ekstrakcija purtant (maceracija)

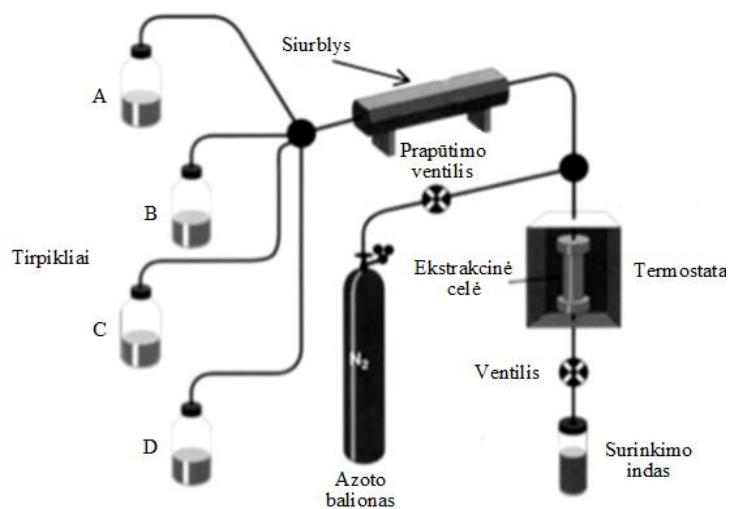
Ekstrakcija purtant (maceracija) yra vienas iš tradicinių ekstrakcijos metodų, kai augalinė žaliava yra purtoma (maišoma) su organiniu tirpikliu. Tai plačiai taikomas metodas dėl paprasto naudojimo ir pataus pritaikomumo. Ekstrakcijai paprastai naudojama džiovinta medžiaga. Visų pirmausia džiovinta medžiaga yra susmulkinama ir sumaišoma su organiniu tirpikliu, pavyzdžiui, etanolio, metanolio, heksanu ir kt., kolboje, kuri vėliau patalpinama į purtyklę. Organinio tirpiklio parinkimas priklauso nuo keletos pagrindinių veiksnių: ekstrahuojamų medžiagų savybių, kainos, poveikio aplinkai. Dažniausiai šiuo metodu išekstrahuoti junginius pasirenkami etanolio ir vandens skirtingo santykio mišinių tirpiklis. Ekstrakcija dažnai užtrunka nuo 2 iki 48 val, kambario temperatūroje. Po ekstrakcijos likusi augalinė žaliava yra pašalinama filtruojant ar centrifuguojant, o EVM pašalinamas rotaciniu garintuvu ir liofilizuojant. Pagrindinis šio metodo trūkumas yra tas, kad ne visi junginiai yra efektyviai išekstrahuojami.[41]

1.3.3. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje

ETPS – tai ekstrakcija įprastiniais tirpikliais, tik naudojant padidintą temperatūrą (50 – 200 °C) ir slėgį (1500 – 2000 psi) [42]. Bendras terminas ETPS apima ekstrakcijos metodų pavadinimus, kurie literatūroje dar nurodomi, kaip ekstrakcija fluidais padidintame slėgyje,

ekstrakcija karštu tirpikliu padidintame slėgyje arba pagreitinoto tirpiklio ekstrakcija. Kai ekstrakcijos tirpiklis yra vanduo, šis metodas taip pat vadinamas subkritinio vandens ekstrakcija, perkaitinto vandens ekstrakcija arba ekstrakcija karštu vandeniu padidintame slėgyje.[43] ETPS yra greitesnė, naudoja mažesnius tirpiklių kiekius, negu tradiciniai ekstrakcijos metodai, pavyzdžiui, *Sokseleto* ekstrakcija. Padidinta temperatūra ir slėgis turi poveikį ekstrakcijos tirpikliui, ekstrahuojamai medžiagai ir jų sąveikai. Padidintame slėgyje padidėja ekstrakcijos tirpiklio virimo temperatūra, todėl ETPS galima atlikti aukštoje temperatūroje. Padidintas slėgis taip pat palengvina ekstrakcijos tirpiklio skverbimąsi į ekstrahuojamą medžiagą ir taip palengvina medžiagos porose sulaikytų junginių ekstrakciją.[44] Aukštose temperatūrose taip pat padidėja ekstrahuojamų junginių tirpumas ir greičiau vyksta masės perdavimas. Be to, aukštose temperatūrose sumažėja ekstrakcijos tirpiklio paviršiaus įtempimas ir klampa, o tai taip pat palengvina ekstrakcijos tirpiklio skverbimąsi į ekstrahuojamą medžiagą [45]. Visos šios išvardintos priežastys palengvina ETPS ir didina biorafinavimo į funkcionaliuosius junginius išeigą.

Aparatūros reikalavimai naudojant ekstrakcijai vandenį (subkritinio vandens ekstrakcija) ar kitus įprastinius tirpiklius (pagreitinoto tirpiklio ekstrakcija) yra tie patys. ETPS aparatūrą (žr. 10



10 pav. ETPS aparatūros schema.

pav.) sudaro ekstrakcijos tirpiklio (ar kelių ekstrakcijos tirpiklių) talpyklą, siurblys, ekstrakcinė celė, termostatas, surinktuvas ir azoto dujomis pripildytas balionas. ETPS aparatūra yra automatizuota: ekstrakcinė celė yra automatiškai pernešama į termostatą, tirpikliai paduodami siurbliu, termostatas kaitinamas, ekstraktai surenkami į surinkimo indą.[42] Plačiau ETPS

metodo pritaikymai išgauti biologiškai aktyvius junginius iš augalinės žaliavos yra kumarino, flavonoidų ir kitų fenolinių junginių, saponinų, fosfolipidų, inozitolių ir kt. Apžvelgiant mokslinius straipsnius, susijusius su šiuo metodu, labai dažnai naudojama aukšta ekstrakcijos temperatūra (aukščiau 150 °C), ypač kai ekstrahavimo tirpiklis yra vanduo [48]. Didinant temperatūrą sumažinamas vandens poliškumas ir tai padidina tikslinių komponentų tirpumą ir geresnę ekstrakcijos išeigą. Nepaisant to, vandens taikymas šiame metode gali būti ribotas ir siekiant pašalinti šį trūkumą buvo siūloma reguliuoti vandens pH, pavyzdžiui, kurkumino ekstrakcija iš ciberžolės. Nors kurkumino tirpumas yra labai ribotas, bet naudojant ETPS metodą,

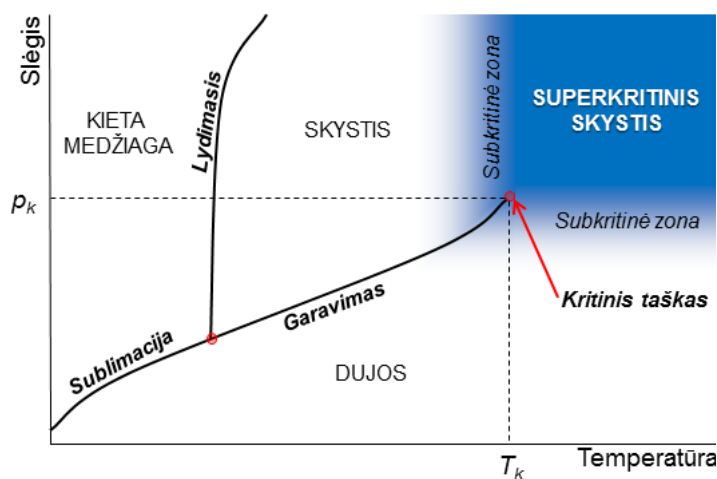
esant 197 °C, vandens pH=1,6 sąlygomis davė reikšmingą kurkumino ekstrakcijos išeigos padidėjimą. Todėl ekstrakcijos tirpiklių pH turi būti glaudžiai tiriamas, kad optimizuoti ekstrakcijos parametrus. Be to, šis pH parametras yra labai reikšmingas biologiškai aktyvių junginių degradavimo atveju, kai degradacija vyksta aukštoje temperatūroje, pavyzdžiui, antocianinų. Kitas svarbus SVE atvejis naudojant aukštą temperatūrą (iki 200 °C) yra susijęs su kai kuriomis įvykstančiomis reakcijomis, pavyzdžiui, Majaro ir karamelizacijos, ekstrakcijos metu, todėl būtina rūpestingai įvertinti tokių ekstraktų saugumą, nepaisant to, jei antioksidacinis aktyvumas ir būtų aukštesnis. [43, 46]

ETPS naudoja gana mažai tirpiklių, yra greita, automatizuota ir paprasta. Vykiant ekstrakciją yra atliekama ir mėginio filtracija, kad nepatektų augalinės žaliavos į ekstraktą, todėl dažniausiai pakartotinė filtracija nėra reikalinga. Kitas metodo privalumas yra tas, kad tirpiklius galima keisti bet kuriuo ekstrakcijos metu. Šis metodas tinka įvairių junginių ekstrakcijai iš įvairių augalinių žaliavų. [43]

1.3.4. Ekstrakcija superkritiniais skysčiais

Ekstrakcijos superkritiniais skysčiais metodas yra paremtas medžiagų naudojimu, kai slėgis ir temperatūra yra virš jų kritinio taško. Šis aukšto slėgio ekstrakcijos metodas yra naudojamas ekstrahavimui iš kietų medžiagų.

11 pav. yra pavaizduota grynos medžiagos fazių diagrama. Matyti, kad medžiaga virsta superkritiniu skysčiu, kai temperatūra (T_k) ir slėgis (p_k) yra virš jos kritinio taško. Medžiaga yra



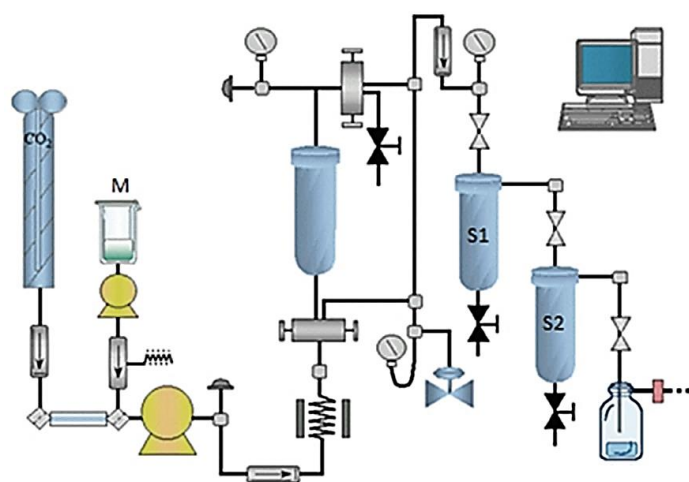
subkritinėje zonoje, kai vienas iš parametru yra virš jos kritinio taško. Kritiniame taške, kai temperatūra yra didesnė už kritinę, didinant slėgį dujos nebeskystėja, bet yra suspaudžiamos į superkritinį skystį. Kritinis taškas yra specifinis kiekvienai medžiagai. Superkritinių skysčių tankiai yra sąlyginai artimi skysčių tankiams, klampa beveik

11 pav. Grynos medžiagos fazių diagrama. artima dujoms, o difuzijos koeficientai yra tarpiniai tarp dujų ir skysčių.[49] Dėl šių priežasčių ESS yra žymiai efektyvesnė, nei ekstrakcija įprastiniais tirpikliais.

1 lentelė. Dujų, skysčių ir superkritinių skysčių fizikocheminės savybės.

Būsena	Sąlygos	Tankis ρ , g/cm ³	Klampa μ , g·s/c	Difuzijos koeficientas D_{AB} , cm ² /s
Dujos	$p=1$ atm; $T=21$ °C	10^{-3}	10^{-4}	10^{-1}
Skystis	$p=1$ atm; $T=15-30$ °C	1	10^{-2}	$<10^{-5}$
Superkritinis skystis	$p=p_k$; $T=T_k$	0,3 – 0,8	$10^{-4}-10^{-3}$	$10^{-3}-10^{-4}$

ESS dažniausiai yra naudojamas anglies dioksidas (CO₂). CO₂ pasižymi lengvai pasiekiamu kritiniu tašku, jo kritinė temperatūra yra 31,3 °C, o kritinis slėgis – 72,9 bar. Dėl CO₂ žemos kritinės temperatūros galima išekstrahuoti aukštomis temperatūroms jautrius junginius. Superkritinis CO₂ pasižymi dar viena svarbia savybe – selektyvumu. Keičiant slėgį ir temperatūrą, keičiasi superkritinio CO₂ gebėjimas išskirti tam tikrus junginius. Tokiu būdu yra išgaunamos atrankiosios frakcijos ar visų CO₂ frakcijų junginiai. Parinkus ekstrakcijos temperatūrą artimą CO₂ kritinei temperatūrai ir slėgio sąlygas (90–120 bar) išgaunami lakieji aromatiniai aliejai



12 pav. ESS aparatūros principinė schema.

(atrankiosios frakcijos), o didesnio slėgio sąlygomis (250–500 bar) – riebieji aliejai, vašakai, pigmentai ir kitos lipofilinės medžiagos – visų CO₂ frakcijų junginiai. Atrankiosios frakcijos yra lakios, skystos ir labiau panašios į eterinius aliejus, o visų CO₂ frakcijų junginių konsistencija yra panaši į tiršto skysčio, sviesto ar vaško medžiagos. Taip pat facionavimas gali būti naudojamas pašalinti

kenksmingus junginius, tokius, kaip toksinės medžiagos, pesticidai, iš augalinės žaliavos.[50] Kadangi superkritinis CO₂ pasižymi gebėjimu selektyviai ekstrahuoti mažos molekulinės masės (<250) junginius arba nepolines ir mažai polines junginių grupes, todėl būtina atsižvelgti į ekstrahuojamų junginių prigimtį ir poliškumą, nes supekritinio CO₂ naudojimas polinių junginių ekstrahavimui yra visiškai neefektyvus. Kitos medžiagos, pavyzdžiui, N₂O ar CHClF₂, yra efektyvesnės polinių junginių ekstrahavimui šiuo metodu, bet retai naudojamos dėl žalingo poveikio aplinkai. Dažniausiai poliniai junginiai šiuo metodu ekstrahuojami pridėjus į CO₂ mažus kiekius (1–10 %) organinių tirpiklių kaip modifikatorių. Metanolis ($T_k=239,4$ °C, $p_k=81$ bar) ir etanolis ($T_k=243,0$ °C, $p_k=63,8$ bar) yra vieni dažniausiai naudojamų modifikatorių. Nors metanolio poliškumo indeksas siekia iki 5,1, bet dažniau pasirenkamas etanolis su mažesniu poliškumo indeksu 4,3, kadangi pastarasis organinis tirpiklis yra mažiau toksiškas. Vienas iš trūkumų naudojant modifikatorius yra tas, kad blogina ekstrahavimo selektyvumą [49].

12 pav. pavaizduota ESS aparatūros principinė schema (M – modifikatoriaus įvedimas, S1 ir S2 – atitinkamai pirmasis ir antrasis separatorius, kiti – CO₂ dujų balionas, siurbiai, termostatas, slėgio reguliatorius, ekstrakcinė celė ir surinktuvas). ESS gali būti atliekama statišku ir dinamišku režimu. Svarbiausi šios ekstrakcijos parametrai yra slėgis ir temperatūra bei superkritinio skysčio tekėjimo greitis. Medžiagos prigimtis ir jos fizikinės savybės (dalelių dydis, poringumas) turi taip pat svarbią reikšmę ESS efektyvumui. [50]

ESS svarbiausi privalumai yra tokie, kad tai greita, automatizuota, beveik nekenksminga aplinkai, nei ekstrahuojant įprastiniais organiniais tirpikliais, ekstrakcija, ją galima atlikti esant žemai temperatūrai, taip išsaugant termolabilius junginius, keičiant slėgį ir temperatūrą ar įvedant modifikatorių galima selektyvi ekstrakcija, superkritinis skystis po ekstrakcijos lengvai atskiriamas mažinant temperatūrą ir/arba slėgį. Tačiau šio metodo pagrindinis trūkumas yra – brangiai kainuojanti aparatūra.[51]

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. MEDŽIAGOS

2.1.1. Juodavaisės aronijos uogų išspaudos

Tyrimams naudotos juodavaisės aronijos uogų išspaudos, gautos išdžiovintos 2014 m. rugpjūčio mėn. iš sulčių gamybos įmonės UAB „Obuolių namai“ (Akademija, Kauno r.). Uogos buvo surinktos 2014 m. rugpjūčio mėn. Lietuvoje netoli Kauno esančiose plantacijose, kur kultivuojama *Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliott.

Išspaudos iki tyrimų laikytos popieriniame maiše, ne aukštesnėje kaip 25 °C temperatūroje, sausoje, gerai vėdinamoje vietoje.

2.1.2. Įvairių eleuterokoko rūšių lapai

Tyrimams pasirinkti Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sode užauginti trijų eleuterokoko (*lot. Eleutherococcus*) rūšių lapai ir surinkti skirtingo augimo metu – birželį ir rugsėjį (žr. 2 lent.). Lapai buvo išdžiovinti kambario temperatūroje ventiliuojamoje patalpoje, apsaugotoje nuo tiesioginių saulės spindulių ir iki tyrimų laikyti popieriniuose maišeliuose, ne aukštesnėje kaip 25 °C temperatūroje, sausoje, gerai vėdinamoje vietoje.

2 lentelė. Tyrimams pasirinkti trijų eleuterokoko rūšių lapai.

Botaninis augalo pavadinimas	Surinkimo data	Koduojamas žymėjimas projekte
<i>Eleutherococcus henryi</i> Oliv.	2014 06 10	henryi'6
	2013 09 13	henryi'9
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Maxim.	2014 06 10	senticosus'6
	2013 09 13	senticosus'9
<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i> (Rupr. & Maxim.) S. Y. Hu	2014 06 10	sessiliflorus'6
	2013 09 13	sessiliflorus'9

2.1.3. Cheminiai reagentai ir medžiagos

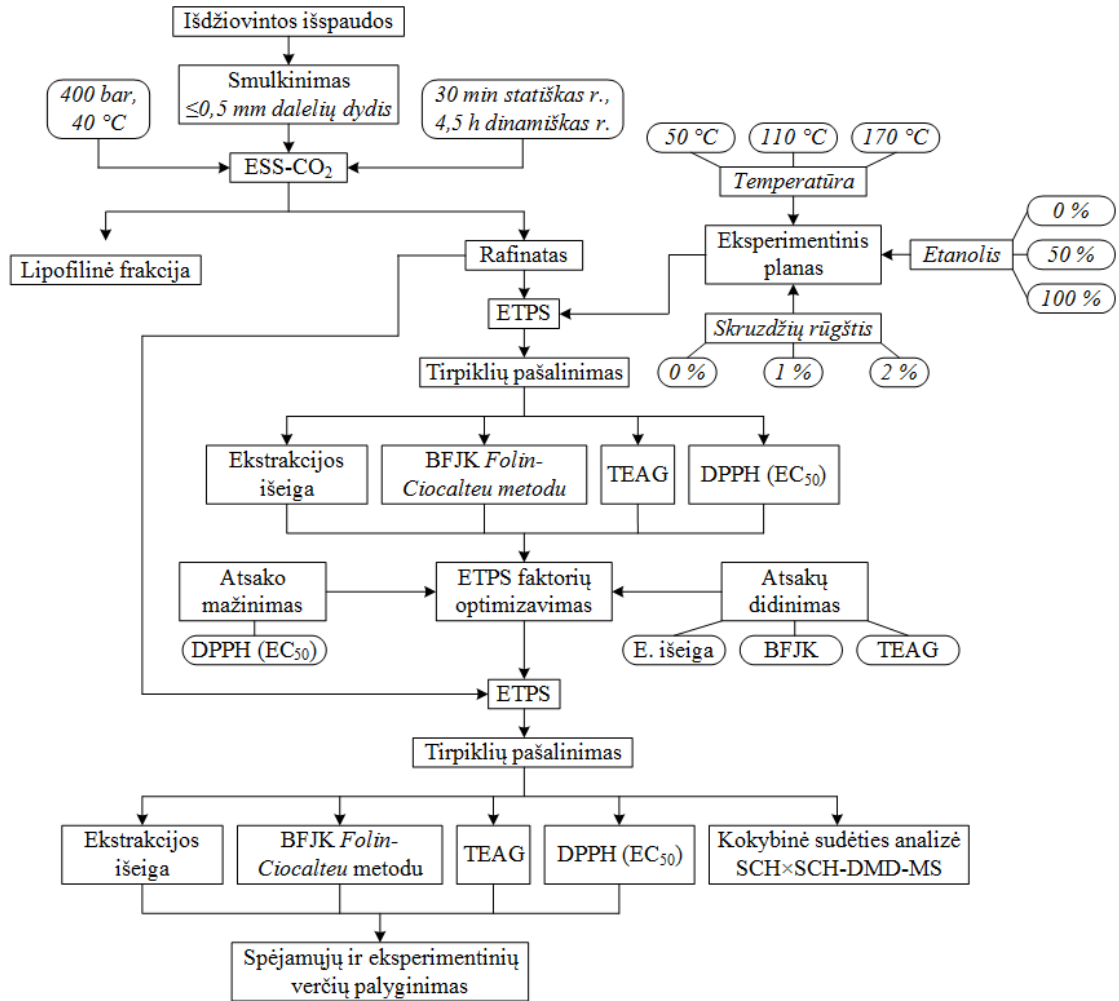
Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ekstraktijai, ekstraktų bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymui, antioksidacinio aktyvumo įvertinimui, optimaliojo ekstrakto sudėties analizei naudoti cheminiai reagentai ir medžiagos: anglies dioksido dujos (99,9 %) gautos iš *Gaschema* (Jonavos r., Lietuva), ultra grynas vanduo ruošiamas vandens gryninimo sistemoje *Millipore* (Billerica, MA, JAV), etanolis (99,5 %) gautas iš *VWR Chemicals* (Fontenay-sous-Bois, Prancūzija), skruzdžių rūgštis (98 %) gauta iš *Sigma-Aldrich* (Mousa, Sent Luisas, JAV), plautas

jūros smėlis gautas iš *Fisher Scientific* (JAV), celiuliozės filtro popieriukai gauti iš *Dionex* (Ahlstrom, JAV), buvo naudotos azoto dujos, dimetilsulfoksidas (DMSO) gautas iš *Sigma-Aldrich* (Mousa, Sent Luisas, JAV), *Folin–Ciocalteu* fenolinis reagentas gautas iš *Merck* (Darmstadt, Vokietija), galo rūgštis (>99 %) ir natrio karbonatas (98 %, bevandenis) gauti iš *Sigma-Aldrich* (Mousa, Sent Luisas, JAV), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (*Troloksas*, ≥97 %), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH[•], radikalas, 99 %), 2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgštis (ABTS^{•+}, radikalas, 98 %), kalio persulfatas, kalio dihidrofosfatas, vandeninis natrio hidrofosfatas gauti iš *Sigma-Aldrich* (Mousa, Sent Luisas, JAV), acetonitrilas gautas iš *VWR Chemicals* (Fontenay-sous-Bois, Prancūzija).

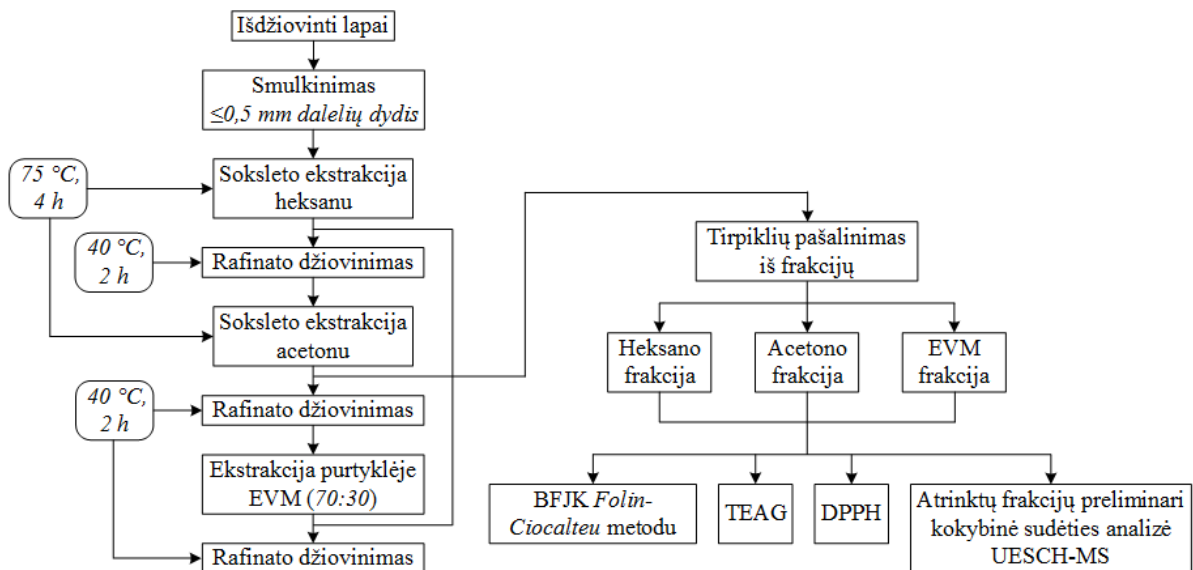
Ivairių eleuterokoko rūšių ekstrakcijai, frakcijų bendrojo fenolinių junginių kiekios nustatymui, antioksidacinio aktyvumo įvertinimui, atrinktų frakcijų sudėties analizei naudoti cheminiai reagentai ir medžiagos: analitinio grynumo heksanas, acetonas, etanolis buvo gauti iš *Chempur* (Lenkija), distiliuotas vanduo paruoštas vandens gryninimo sistemoje *Millipore* (Bedford, MA, JAV), metanolis (≥99,9 %) gautas iš *Sigma-Aldrich* (Vokietija), azoto dujos gautos iš *Gaschema* (Jonavos r., Lietuva), galo rūgštis (>99 %) gauta iš *Fluka* (Lenkija), *Folin–Ciocalteu* fenolinis reagentas gautas iš *Sigma-Aldrich* (Buchs, Šveicarija), natrio karbonatas (98 %, bevandenis) gautas iš *Chempur* (Lenkija), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (*Troloksas*, 97 %), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH[•], radikalas, 95 %) gauti iš *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Vokietija), natrio chloridas, kalio chloridas, kalio dihidrofosfatas, vandeninis natrio hidrofosfatas, kalio persulfatas, natrio hidroksidas buvo gauti iš *StanLab* (Liublinas, Lenkija), 2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgštis (ABTS^{•+}, radikalas, 98 %) buvo gautas iš *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Vokietija), skruzdžių rūgštis (98 %) gauta iš *Sigma-Aldrich* (Vokietija), UESCH tirpalai – acetonitrilas ir metanolis gauti iš *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Vokietija).

2.2. TYRIMŲ METODAI

2.2.1. Tyrimų schemas



13 pav. Juodavaisės aronijos uogų išspaudų tyrimų schema.



14 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų tyrimų schema.

2.2.1. Pirminis paruošimas

Juodavaisės aronijos uogų išspaudų smulkinimas ir ESS-CO₂

Juodavaisės aronijos uogų išspaudos buvo smulkinamos cikloniniu malūnu *Resch* (Haan, Vokietija) naudojant 0,5 mm sieta, tokiu būdu sudarant vienalytį išspaudų mišinį bei užtikrinant efektyvesnę ekstrakciją. Paprastai pasirinktas $\leq 0,5$ mm dalelių dydžio laipsnis yra labai reikšmingas faktorius ekstrakcijos išeigai, nes greičiau vyksta masės perdavimas. Išspaudų smulkinimo metu temperatūra nepakilo aukščiau 30 °C. Susmulkintos išspaudos laikytos –18 °C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

Nepolinių junginių išvalymas iš susmulkintų išspaudų buvo atliktas taikant ekstrakciją superkritiniais skysčiais naudojant anglies dvidegenį (ESS-CO₂) pagal Grunovaitę ir kt. (2016) metodinį aprašymą su nedideliais pakeitimais [15]. ESS-CO₂ atlikta automatizuota sistema *Helix* (PA, JAV). Naudotos 99,9 % grynumo CO₂ (Gaschema, Jonava, Lietuva) dujos. 20 g susmulkintų išspaudų buvo patalpinta 50 cm³ tūrio ekstrakcinę celę, kurios apačioje ir viršuje dedama absorbuojanti vata. CO₂ srautas visos ekstrakcijos metu išliko pastovus 2 l/min įprastomis sąlygomis. Statinio režimo ekstrakcija užtruko 10 min. Ekstrakcijos slėgis ir temperatūra buvo keičiami automatiškai, o laikas – rankiniu būdu. Slėgis buvo keičiamas nuo 15 iki 40 MPa, laikas – nuo 60 iki 150 min., temperatūros nuo 30 iki 40 °C. Nepolinių junginių frakcija buvo surinkta į stiklinį surinkimo indą, palaikoma aplinkos sąlygose, kad pasišalintų CO₂. Po to, frakcija pasverama ir apskaičiuojamas procentinis kiekis. Likusios juodavaisės aronijos išspaudos po ESS-CO₂ (rafinatas) laikomos polietileno maišelyje –18 °C temperatūroje iki ETPS eksperimentinio plano faktorių vertėmis.

Įvairių rūšių eleuterokoko lapų smulkinimas

Įvairių rūšių eleuterokoko lapų smulkinimas atliktas analogiškai, kaip ir juodavaisės aronijos uogų išspaudų. Susmulkinti lapai laikyti polietileno maišeliuose –18 °C temperatūroje iki pakopinės ekstrakcijos didėjančio poliškumo tirpikliais *Soksleto* aparate ir purtant.

2.2.2. Eksperimentų planavimas ir analizavimas

Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ETPS eksperimentai buvo planuojami ir rezultatai analizuojami atsako paviršiaus metodologijos (APM) įrankį turinčia *Statgraphics Centurion XVI* programa. Šį ETPS eksperimentų planavimą ir rezultatų analizavimą galima išskirti į tris dalis: 1)

eksperimentinio plano sudarymas; 2) eksperimentinio plano rezultatų analizavimas ir atitinkamo modelio įvertinimas; 3) optimizavimas.

Eksperimentinio plano sudarymas

Eksperimentinis planas buvo sudarytas taikant trijų lygių faktorialinį dizainą: 3^3 , kurį apimė 27 eksperimentai su 2 pakartojimais. Eksperimentinių faktorių (temperatūra (T), etanolis (E) ir skruzdžių rūgštis (R)) vertės užkoduotos trijų tiesioginių nepriklausomų kintamųjų lygiais (-1, 0, +1), kurie pavaizduoti 3 lentelėje. Išsamus ir nuoseklus rafineto ETPS eksperimentinis planas su tiesioginių nepriklausomų kintamųjų vertėmis pateikiamas prieduose (1 priedas).

3 lentelė. Eksperimentinio plano tiesioginiai nepriklausomi kintamieji bei jų vertės.

Eksperimentiniai faktoriai	Koduojami simboliai	Kintamųjų lygiai*		
		-1	0	+1
Temperatūra, °C	T	50	110	170
Etanolis, %	E	0	50	100
Skruzdžių rūgštis, %	R	0	1	2

* ETPS proceso faktorių (tiesioginių nepriklausomų kintamųjų) lygiai: -1, +1 – atitinkamai mažiausios ir didžiausios eksperimentinio plano vertės, 0 – eksperimentinio plano centrinės vertės.

Eksperimentinio plano rezultatų analizavimas ir atitinkamo modelio įvertinimas

Eksperimentiniame plane buvo numatytas 4 priklausomų kintamųjų (atsakų) eksperimentinis analizavimas, kurių išraiška ir parinktas metodas pateikti 4 lentelėje. Vertinant kiekvieno priklausomo kintamojo modelio tinkamumą, buvo skaičiuojamas determinacijos koeficientas (R^2). Šis koeficientas parodė, kokią dalį tiriamojo požymio dispersijos apima naudojamas modelis. Nepriklausomų kintamųjų reikšmingumas buvo aprašytas p -verte (nepriklausomojo kintamojo ir atitinkamo modelio dispersija lyginama su paklaidos dispersija)[54].

4 lentelė. Eksperimentinio plano priklausomų kintamųjų išraiškos ir metodai.

Priklausomi kintamieji	Išraiška	Metodo pavadinimas
Ekstrakcijos išeiga	%	Svėrimas
BFJK	mg GRE/g ekstrakto	Folin-Ciocalteu
TEAG	mmol TE/g ekstrakto	ABTS \bullet^+ laisvųjų radikalų sujungimas
DPPH (EC_{50})	μ g/ml	DPPH \bullet radikalų sujungimas

Parinkus eksperimentinių faktorių vertes atitinkantį modelį, buvo nustatytos tokios tiesioginių nepriklausomų kintamųjų vertės, kurios lėmė pageidaujamą priklausomo kintamojo (atsako) vertę. *Statgraphics Centurion XVI* programa buvo siekiama maksimizuoti ekstrakcijos išeigos, BFJK ir TEAG vertes, o DPPH (EC₅₀) vertes – minimizuoti, kadangi kuo mažesnė EC₅₀ vertė, tuo didesnis antioksidacinis aktyvumas.

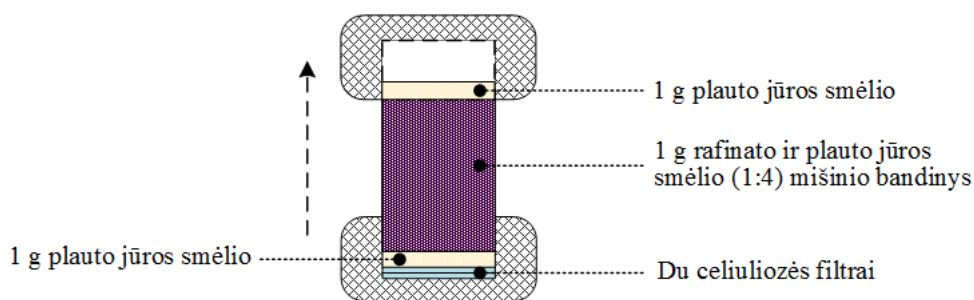
Optimizavimas atliktas apjungiant atsakų tikslus į vieną siekiamybės funkciją, bei siekiant optimizuoti kiekvieną atskirai visame modeliu aprašomame nepriklausomų kintamųjų intervale.

2.2.3. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje

Suplanuoti juodavaisės aronijos uogų išspaudų ekstrakcijos tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS) eksperimentai buvo atlikti automatizuotame ekstraktoriuje *ASE 200, Dionex, Sunnyvale* (CA, JAV). Eksperimentai ir jų faktorių vertės pateikiamos prieduose (1 priedas). Ekstrakcijai buvo naudojami ultragryno vandens, etanolio ir skruzdžių rūgšties tirpikliai ar jų mišiniai. Tirpiklių mišiniai maišomi ultragarsinėje vonelėje *Ultrasonics, Astra-SonTM* (JAV) 10 min. Kiekvieno eksperimento metu ruošiamas 1 g rafinoto ir disperguojančio agento – plauto jūros smėlio (1:4) mišinio bandinys.

11 ml nerūdijančio plieno ekstrakcinės celės užpildymas bandiniu pateiktas 15 pav., siekiant išvengti kietų dalelių patekimo į ekstraktą ir celės galų užsiteršimo (užsiblokavimo) atitinkamai buvo dedami du celiuliozės filtrai apačioje ir po 1 g plauto jūros smėlio virš filtrų ir bandinio.

Patalpinta celė į ekstraktoriaus karuselę užpildoma tirpikliu ar tirpiklių mišiniu siurbliu ir kaitinama iki 50 °C, 110 °C ar 170 °C temperatūros. Statinė ekstrakcija vykdoma 20 min, 1500 psi (10,3 MPa) slėgyje. Pradinis celės įkaitinimo laikas priklauso nuo ekstrakcijos temperatūros (5 min, kai 50 °C, 6 min – 110 °C ir 8 min – 170 °C) ir nėra įskaičiuojamas į statinės ekstrakcijos laiką [52]. Po statinės ekstrakcijos ekstraktas išstumiamas su 60 % celės tūrio šviežiu tirpikliu ar tirpiklių mišiniu ir prapučiama 60 s azoto dujų srautu į 40 ml surinkimo indą. Etanolis iš ekstraktų pašalinamas naudojant vakuuminį rotacinį garintuvą *Büchi R-210, Flawil*, (Šveicarija), o vanduo – liofilizatorių *Telstar, LyoQuest* (JAV). Ekstraktai baigiami džiovinti azoto dujų sraute, pasveriami iki pastovios masės ir laikomi sandariai uždaryti tamsaus stiklo buteliukuose –18 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.



15 pav. Ekstrakcinės celės užpildymas bandiniu.

2.2.4. Pakopinė ekstrakcija Soksleto aparate ir purtant

Susmulkintų įvairių eleuterokoko rūšių lapų pakopinė ekstrakcija atlikta didėjančio poliškumo tirpikliais (heksanu, acetonu, etanolio ir vandens mišiniu (70:30)) tradiciniais metodais: Soksleto aparate ir purtant (maceracija).

Soksleto ekstrakcija

Soksleto ekstrakcija buvo atlikta automatinio ekstraktoriaus sistema *Behr Labor Technik* (Düsseldorf, Vokietija) remiantis standartiniu *AOAC* metodiniu aprašymu [53].

20 g susmulkintų lapų medžiagos buvo įdedama į celiuliozės tūbelę ir užkemšama vata. Po to, tūbelė patalpinama į *Soksleto* aparatą ir per šaldytuvo viršų užpildoma 200 ml heksano tirpikliu. Ekstrakcija vykdoma 3 val. 75 °C temperatūroje. Pasibaigus ekstrakcijai heksanu, tūbelė su medžiaga džiovinama 40 °C temperatūroje džiovinimo spintoje iki pastovios masės ir dedama ekstrakcijos vykdymui acetonu tomis pačiomis sąlygomis. Įvykdžius šios pakopos ekstrakciją medžiaga džiovinama analogiškai ir paliekama tolimesnei ekstrakcijai purtant. Frakcijos buvo surinktos apvaliadugnėse kolbose ir iš jų tirpikliai pašalinti vakuuminiu rotaciniu garintuvu (Biuchi labortechnik AG, Konztanz, Šveicarija) esant 40 °C temperatūrai. Frakcijos baigiamos džiovinti azoto dujų sraute, pasveriamos iki pastovios masės ir laikomos sandariai uždarytos tamsaus stiklo buteliukuose –18 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.

Ekstrakcija purtant (maceracija)

Medžiagos, likusios po *Soksleto* ekstrahavimo acetono tirpikliu, ekstrakcija buvo atlikta purtant purtykle *Titer–Tek* (Hunsville, Alabama, JAV).

Pradžioje, paruošiamas etanolio ir vandens mišinys (70/30, v/v) maišant ultragarsinėje vonelėje *Ultrasonics, Astra-SonTM* (JAV) 10 min. Išdžiovinta lapų medžiaga iš tūbelės perkeliama

į plokščiadugnę kolbą, papildoma 200 ml EVM (70:30) ir purtoma 3 val. purtykle kambario temperatūroje. Etanolis iš frakcijos pašalinamas vakuuminiu rotaciniu garintuvu (Biuchi labortechnik AG, Konzanz, Šveicarija) esant 40 °C temperatūrai, o vanduo – liofilizatoriuje *Maxi Dry* (Lyø ,Danija). Frakcijos pasveriamos iki pastovios masės ir laikomos sandariai uždarytos tamsaus stiklo buteliukuose –18 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų

2.2.5. Bendrasis fenolinių junginių kiekis (*Folin ir Ciocalteu* metodu)

BFJK juodavaisės aronijos uogų ekstraktuose nustatymo Folin ir Ciocalteu metodu aprašymas

Bendrasis fenolinių junginių kiekis (BFJK) ekstraktuose buvo nustatytas pagal *Folin ir Ciocalteu* (1927) metodo aprašymą su pakeitimais naudojant standartinį *Folin–Ciocalteu* fenolinį reagentą [55]. Bendras reakcijos tūris buvo sumažintas iki 1 ml ir siekiant padidinti ekstraktų tirpumą metanolis pakeistas į dimetilsulfoksidą (DMSO).

Pirmiausia, 10 µl šviežiai pagaminto ekstrakto tirpalo (5 mg/ml) buvo sumaišyta su 600 µl ultragrynu vandeniu ir 50 µl gryno *Folin–Ciocalteu* fenolinio reagento. Po 1 min, įpilta 150 µl 20 % Na₂CO₃ ir reakcijos tūris iki 1 ml papildytas ultragrynu vandeniu. Taip pat paruošiamas 10 µl ekstrakto tirpalo, 150 µl 20 % Na₂CO₃ ir 840 µl ultragryno vandens mišinys, kuris naudojamas kaip tuščiasis bandinys. Paruošti bandiniai maišomi 15 s ir inkubuojami tamsoje 2 h 25 °C temperatūroje. Po to, 300 µl reakcijos mišinio perkeliama į 96 šulinėlių mikroplokštelę, kuri dedama į mikrolėkštelių spektrofotometrinį skaitytuvą *Bio Tek Instruments* (Winooski VT, JAV), purtoma 45 s ir absorbcija matuojama 25 °C temperatūroje, kai 760 nm bangos ilgis. Rezultatams suskaičiuoti kalibracinės kreivės lygtis buvo sudaryta naudojant etaloninį galo rūgšties tirpalą (koncentracijų ribos: 0,031–2 mg/ml).

BFJK nustatytas galo rūgšties ekvivalentais (mg GRE/g ekstrakto), pagal (1) formulę. BFJK rezultatai pateikti kaip trijų pakartojimų vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN).

$$C = \frac{c \times V}{M}, \quad (1)$$

kur C – polifenolių kiekis, išreikštas GRE, mg/g; c – pagal kalibracinę kreivę nustatyta GR koncentracija, mg/ml; V – tiriamojo ekstrakto tūris, ml; M – ekstrakto masė, g.

Bendrasis fenolinių junginių kiekis (BFJK) frakcijose buvo nustatytas pagal *Folin* ir *Ciocalteu* (1927) metodo aprašymą su pakeitimais naudojant standartinį *Folin–Ciocalteu* fenolinį reagentą [55].

Pirmiausia, standartinis *Folin–Ciocalteu* fenolinis reagentas buvo skiedžiamas su distiliuotu vandeniu santykiu 1:9. Po to, 30 µl tiriamos frakcijos tirpalo arba metanolio/vandens mišinio (4:1) (kuris buvo naudojamas kaip tuščiasis bandinys), buvo sumaišyta su 150 µl atskiestu *Folin–Ciocalteu* fenoliniu reagentu ir 120 µl Na₂CO₃ tirpalu (75 g/l) 96 šulinėlių mikroplokštelėje. Paruošti bandiniai buvo maišomi automatine pipete. Po sumaišymo 96 šulinėlių mikroplokštelė dedama į mikrolėkštelių spektrofotometrinį skaitytuvą *Fluostar Omega* (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Vokietija), purtoma 30 s, inkubuojama 30 min ir absorbcija matuojama esant 765 nm bangos ilgiui. Rezultatams suskaičiuoti kalibracinės kreivės lygtis buvo sudaryta naudojant etaloninį galo rūgšties tirpalą (koncentracijų ribos: 0,00625–0,2 mg/ml).

BFJK nustatytas galo rūgšties ekvivalentais (mg GRE/g ekstrakto), pagal aukščiau nurodytą (1) formulę. BFJK rezultatai pateikti kaip trijų pakartojimų vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN).

2.2.6. TEAG nustatymas ABTS^{•+} radikalo katijono sujungimo metodu

TEAG juodavaisės aronijos uogų ekstraktuose įvertinimo ABTS^{•+} radikalo katijono sujungimo metodu aprašymas

Trolokso ekvivalento antioksidacinė galia (TEAG) ekstraktuose buvo įvertinta pagal Re ir kt. (1999) ABTS^{•+} katijono radikalo sujungimo metodo aprašymą su nedideliais pakeitimais [56].

Pirmiausia ruošiamas 50 mM (pH=7,4) PBS, kurį ruošiant 1,2928 g KH₂PO₄ ir 5,7502 g Na₂HPO₄ ištirpinama ultragryname vandenyje 1 l matavimo kolboje ir pridedama fosforo rūgšties tirpalo iki pH 7,4. Pagamintas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje ir naudojamas visų TEAG ekstraktuose įvertinimui.

Darbinis 5 mM (pH=7,4) PBS paruošiamas skiedžiant 50 ml 50 mM (pH=7,4) PBS ultragrynu vandeniu 500 ml matavimo kolboje ir, jei reikia, pridedama fosforo rūgšties tirpalo iki pH 7,4. Pagamintas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

Pradžioje pradinis 7 mM ABTS^{•+} tirpalas paruošiamas 0,0096 g ABTS^{•+} reagento ištirpinant 2,5 ml ultragryno vandens ir sumaišant su 44 µl 139,8 mM kalio persulfato tirpalu, kuris buvo pagamintas 0,0378 g K₂S₂O₈ druskos ištirpinant 1 ml ultragryno vandens. Po 16 valandų tirpalo laikymo tamsoje kambario temperatūroje gaminamas darbinis ABTS^{•+} tirpalas, kurį ruošiant

imamas 1 ml šio tirpalo ir praskiedžiamas su 70 ml darbinio 5 mM (pH=7,4) PBS, kad išmatavus absorbciją gautųsi $0,7 \pm 0,02$ optinio tankio vienetų, kai bangos ilgis 734 nm.

Šviežiai paruoštas ekstrakto tirpalas skiedžiamas darbinio 5 mM (pH=7,4) PBS, kad gauti 5 skirtingas koncentracijas (varijavo nuo 0,0938 iki 1,5 mg/ml ir nuo 0,0436 iki 0,7 mg/ml), po to, imama po 10 μ l ir sumaišoma su 1 ml darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Analogiškai paruošiami tuštieji bandiniai, tik maišoma su 1 ml darbinio 5 mM (pH=7,4) PBS. Reakcijos mišiniai ikubuojami 45 min tamsoje 30 °C temperatūroje. Pabaigoje, 300 μ l reakcijos mišinio perkeliama į 96 šulinėlių mikroplokštelę, kuri dedama į mikrolėkštelių spektrofotometrinių skaitytuvą *Bio Tek Instruments* (Winooski, VT, JAV), purtoma 30 s ir absorbcija matuojama 30 °C temperatūroje esant 734 nm bangos ilgiui.

Rezultatai išreiškiami standartinio antioksidanto TEAG (mmol TE/g ekstrakto) pagal išraiškos (2) formulę iš kalibracinės kreivės, kuri sudaryta naudojant Trolokso etaloninius įvairių koncentracijų (0,25–2 mM) tirpalus. Šie TEAG rezultatai buvo gauti iš 5 skirtingų koncentracijų tiriamojo ekstrakto laisvųjų radikalų sujungimo 20 – 80 % ribinių verčių linijinio grafiko.

TEAG rezultatai pateikti kaip trijų pakartojimų vidurkis \pm standartinis nuokrypis (SN).

$$TEAG = \frac{\frac{1 \text{ mmol Trolokso}}{1000 \text{ ml}}}{\frac{\text{mg ekstrakto}}{\text{ml}} \times \frac{\text{g}}{1000 \text{ mg}}} = \frac{\frac{\text{mmol}}{1000 \text{ ml}}}{\frac{\text{g}}{1000 \text{ ml}}} = \text{mmol} / \text{g ekstrakto} \quad (2)$$

TEAG įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijose įvertinimo ABTS^{•+} radikalo katijono sujungimo metodu aprašymas

Trolokso ekvivalento antioksidacinė galia (TEAG) frakcijose buvo įvertinta pagal Re ir kt. (1999) ABTS^{•+} katijono radikalo sujungimo metodo aprašymą su nedideliais pakeitimais [56].

Pirmiausia ruošiamas PBS tirpalas, kurį ruošiant 8,18 g NaCl, 0,27 g KH₂PO₄, 3,58 g Na₂HPO₄×12H₂O ir 0,15 g KCl ištirpinama distiliuotame vandenyje 1 l matavimo kolboje ir pridedama fosforo rūgšties tirpalo iki pH 7,4. Pagamintas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje ir naudojamas visų TEAG frakcijose įvertinimui.

Pradžioje, paruošiami du tirpalai: pradinis ABTS^{•+} tirpalas ruošiamas 0,0549 g ABTS^{•+} reagento ištirpinant 50 ml paruoštame PBS tirpale ir 0,0038 g K₂S₂O₈ druskos ištirpinant 200 μ l distiliuoto vandens. Po to, šie tirpalai sumaišomi ir laikomi tamsoje kambario temperatūroje apie 16 valandų. Darbinis ABTS^{•+} tirpalas buvo praskiestas paruoštu PBS tirpalu, kad gauti absorbciją $0,8 \pm 0,03$ optinio tankio vienetų, kai nustatytas bangos ilgis buvo 734 nm.

ABTS^{•+} radikalams sujungti 96 šulinėlių mikrolėkštelėje buvo sumaišyta 6 µl tiriamos frakcijos tirpalo ir 294 µl darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Reakcijos mišiniai ikubuojami 40 min tamsoje 30 °C temperatūroje, po to, dedama į mikrolėkštelių spektrofotometrinių skaitytuvą *Fluostar Omega* (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Vokietija), purtoma 30 s ir absorbcija matuojama 30 °C temperatūroje esant 734 nm bangos ilgiui.

Rezultatams suskaičiuoti kalibracinės kreivės lygtis buvo sudaryta naudojant Trolokso etaloninius įvairių koncentracijų (0,05–0,25 mg/ml) tirpalus. Rezultatai išreiškiami standartinio antioksidanto TEAG (mg TE/g frakcijos).

TEAG rezultatai pateikti kaip trijų pakartojimų vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN).

2.2.7. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH• radikalų sujungimo metodu

Antioksidacinio aktyvumo EC₅₀ juodavaisės aronijos uogų ekstraktuose įvertinimo DPPH• radikalų sujungimo metodu aprašymas

Antioksidacinio aktyvumo DPPH (EC₅₀) vertės ekstraktuose buvo nustatytos pagal Brand–Williams ir kt. (1995) DPPH• radikalų sujungimo metodo aprašymą su nedideliais pakeitimais [57].

Pirmiausia pagaminamas DPPH• tirpalas, kurį ruošiant 0,0235 g DPPH• radikalo ištirpinama metanolyje 100 ml matavimo kolboje, kuris toliau skiedžiamas metanolio 1:10 santykiu, kad gauti darbinį DPPH• tirpalą. Abu šie tirpalai laikomi tamsioje vietoje 4 °C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

Šviežiai paruoštas ekstrakto tirpalas skiedžiamas metanolio, kad gauti 5 skirtingas koncentracijas (varijavo nuo 0,0469 iki 0,75 mg/ml ir nuo 0,0563 iki 0,45 mg/ml), po to, imama po 10 µl ir 96 šulinėlių mikroplokštelėje sumaišoma su 290 µl darbinio DPPH• tirpalu, kad gauti 300 µl reakcijos tūrį. Analogiškai paruošiami tuštieji bandiniai, tik maišoma su 290 µl metanolio.

Reakcijos mišiniai ikubuojami 4 h tamsoje kambario temperatūroje. Pabaigoje, 96 šulinėlių mikroplokštelė dedama į mikrolėkštelių spektrofotometrinių skaitytuvą (Bio Tek Instruments, Winooski, VT, JAV), purtoma 30 s ir absorbcija matuojama 25 °C temperatūroje esant 516 nm bangos ilgiui. Rezultatams suskaičiuoti kalibracinės kreivės lygtis buvo sudaryta naudojant Trolokso etaloninius įvairių koncentracijų ($0,75 \times 10^{-5}$ – 9×10^{-5} M) tirpalus. DPPH• radikalų sujungimo rezultatai pateikiami kaip efektyvi koncentracija (EC₅₀) ir išreikšta µg/ml, šios vertės gautos iš 5 skirtingų koncentracijų tiriamojo ekstrakto laisvųjų radikalų sujungimo 20–80 %

ribinių verčių linijinio grafiko. Procentinis laisvųjų radikalų sujungimas buvo apskaičiuotas pagal (3) formulę. Taigi, gauta žemesnė EC₅₀ vertė rodo aukštesnį antioksidacinį aktyvumą.

Antioksidacinio aktyvumo DPPH (EC₅₀) rezultatai pateikti kaip trijų pakartojimų vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN).

$$DPPH_{Inhib} = \frac{A_b - A_a}{A_b} \cdot 100, \quad (3)$$

kur $DPPH_{Inhib}$ – laisvųjų radikalų sujungimas, %; A_b – tuščiojo mėginio absorbcija; A_a – tiriamojo mėginio absorbcija.

Antioksidacinio aktyvumo įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijose įvertinimo DPPH• radikalų sujungimo metodu aprašymas

Antioksidacinio aktyvumo vertės frakcijose buvo nustatytos pagal Brand–Williams ir kt. (1995) DPPH• radikalų sujungimo metodo aprašymą su nedideliais pakeitimais [57].

Pirmiausia pagaminamas DPPH• tirpalas, kurį ruošiant 0,0059 g radikalo ištirpinama metanolyje 250 ml kolboje iki žymės. Po to, darbinis DPPH• tirpalas skiedžiamas metanoliumi, kad gauti absorbciją $0,7 \pm 0,03$ optinio tankio vienetų, kai nustatytas bangos ilgis buvo 515 nm.

Pradžioje, DPPH• radikalams sujungti sumaišoma 8 µl tiriamo ekstrakto tirpalo ir 292 µl darbinio tirpalo 96 šulinėlių mikrolėkštelėje. Reakcijos mišiniai ikubuojami 40 min tamsoje kambario temperatūroje, po to, dedama į mikrolėkštelių spektrofotometrinį skaitytuvą *Fluostar Omega* (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Vokietija), purtoma 30 s ir absorbcija matuojama 25 °C temperatūroje esant 515 nm bangos ilgiui.

Rezultatams suskaičiuoti kalibracinės kreivės lygtis buvo sudaryta naudojant Trolokso etaloninius įvairių koncentracijų (0,05–0,25 mg/ml) tirpalus. Antioksidacinio aktyvumo vertės frakcijose išreikštos Trolokso ekvivalentais (mg TE/g frakcijos). Procentinis laisvųjų radikalų sujungimas buvo apskaičiuotas pagal anksčiau pateiktą (3) formulę.

Antioksidacinio aktyvumo rezultatai pateikti kaip trijų pakartojimų vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN).

2.2.8. Ekstrakto sudėties analizė dviejų dimensijų skysčių chromatografijos metodu

Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ekstrakto, gauto optimaliomis ETPS sąlygomis (E – 46%, R – 1,8%, T – 165 °C) išsami dviejų dimensijų skysčių chromatografijos (SCH×SCH) analizė buvo atlikta dėl kokybinio junginių identifikavimo.

Aparatūra

Dviejų dimensijų skysčių chromatografijos su diodų matricos detektoriumi ir masių spektrometru (SCH×SCH-DMD-MS) pirmoji dimensija (¹D) buvo atlikta sistema *Agilent 1200* (Agilent Technologies, Santa Clara, Kanada, JAV), kuri buvo sujungta su automatinio bandinio padavikliu. Tam, kad išgauti labiau re produktyvius žemo tekėjimo greičius ir gradientus buvo naudojamas dažnio skirstytuvas *Protecol* (SGE Analytical Science, Milton Keynes, UK), kuris buvo pastatytas tarp ¹D pompos ir automatinio bandinio padaviklio. O antroji dimensija (²D) buvo atlikta skysčių chromatografijos pompa *Agilent 1290 Infinity*. Abi dimensijos buvo sujungtos su elektroniskai valdomu dviejų pozicijų ir dešimties jungčių jungiamuoju ventiliu (moduliatoriaus veikimas) su dvejomis analogiškoms injekcinėms vijomis. Jungiamojo ventilio nustatytas moduliacijos laikas buvo 1,3 min. Diodinės matricos detektorius buvo prijungtas po ²D, kad registruoti kiekvieną šios dimensijos analizę. Be to, *Agilent 6320 Ion Trap* masės spektrometras su įrengtu elektrinio purškiklio įtaisu, veikiančiu teigiamu ir neigiamu jonizacijos režimu, buvo sujungtas vienas po kito šiomis sąlygomis: 350 °C džiovinanti temperatūra; 12 l/min džiovinančių dujų tekėjimo greitis; 35 psi purškimo slėgis, *m/z* 90-2200 Da masės diapozonas.

Skysčių chromatografijos duomenys buvo patikslinti ir iliustruoti naudojant programą *LC Image software* (version 1.0, Zoex Corp., Houston, TX).

Dviejų dimensijų skysčių chromatografijos atskyrimo sąlygos

Pirmosios dimensijos (¹D) atskyrimas atliktas analitine kolonėle *Hypersil GOLD, amino column* (150×1 mm, 3 μm sorbento dalelių dydis), (Thermo Scientific, Waltham, MA, JAV). Eliuentų sistema: (A) acetonitrilas (ACN)/skruzdžių rūgštis, 99:1 (v/v); (B) – H₂O/ skruzdžių rūgštis, 95:5 (v/v). Taikytas šis gradiento kitimas: 0 min, 1 % B; 60 min, 30 % B; 65 min, 40 % B; 75 min, 90 % B. Mabilios fazės tekėjimo greitis buvo 18 μl/min ir injekcijos tūris sudarė 7 μl. Moduliacijos laikas buvo 1,3 min, kaip ir ²D analizėje.

Antrosios dimensijos (²D) atskyrimo pasikartojanti 1,3 min analizė buvo atlikta visą SCH×SCH laiką, naudojant analitinę kolonėlę *Ascentis Express C₁₈* (50×4,6 mm, 2,7 μm sorbento

dalelių dydis) (Supelco, Bellefonte, CA, JAV). Eliuentų sistema: (A) H₂O + 0,1 % skruzdžių rūgštis; (B) acetonitrilas (ACN). Taikytas šis gradiento kitimas: 0 min, 0 % B; 0,1 min, 5 % B, 0,3 min, 15 % B; 0,7 min, 40 % B; 0,9 min, 50 % B, 1 min, 90 % B. Eliucijos tekėjimo greitis buvo 3 ml/min ir injekcijos tūris sudarė 7 µl.

Iš kolonėlių išseinantys junginiai aptikti diodų matricos detektoriumi (DMD), esant 280 ir 254 nm bangos ilgiui, tuo tarpu, *UV-Vis* spektras buvo surinktas esant 190–550 nm bangos ilgiui. Bandinio skenavimo greitis buvo 20 Hz. Tekėjimo eliucija iš ²D kolonėlės buvo padalinta prieš įtekant į masės spektrometro detektorių laikant, kad 0,4 ml/min tekėjimo greitis įvedamas ESI šaltinyje. Masės spektrometrijos detekcija buvo atliekama teigiamu ir neigiamu jonizacijos režimu pagal anksčiau įvardintas sąlygas.

2.2.9. Frakcijų sudėties analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos–masių spektrometrijos metodu

Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų preliminarini kokybinė sudėties analizė buvo atlikta ultra efektyviosios skysčių chromatografijos *Waters Acquity* sistema (Waters, Milford, JAV), kuri buvo aprūpinta diodų matricų detektoriumi ir hibridiniu masės spektrometru (kvadrupolio ir skriejimo trukmės (Bruker Daltonic, Brėmenas, Vokietija). Junginių skirstymas atliktas atvirkščių fazių analitine kolonėle *Acquity BEH C18* (Amide, 2,1×100 mm, dalelių dydis – 1,7 µm) (Waters, Milford, JAV). Skirstymo metu buvo palaikoma 40 °C temperatūra. Mobilų fazių sistema: (A) – 1 % skruzdžių rūgštis, (B) – 100 % acetonitrilas. Mobilios fazės tekėjimo trukmė buvo 17 min. Taikytas šis gradiento kitimas: 0 min, 1 % B; 4,5 min, 10 % B; 7,5 min., 26 % B; 13 min, 100 % B; 15 min, 80 % B; 16 min, 50 % B; 17 min, 99 % B. Mobilios fazės tekėjimo greitis – 0,4 ml/min ir injekcijos tūris sudarė 2 µl. Iš kolonėlės išseinantys junginiai aptikti diodų matricos detektoriumi (DMD) esant 100 – 500 nm bangos ilgiui. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas neigiamos elektrinės jonizacijos režimu ir parametrai buvo kontroliuojami *HyStar* programine įranga. Jonizacija buvo atlikta naudojant +4000 V įtampą, fragmentavimo celės įtampa 3 eV, azoto dujos buvo naudotos kaip džiovinančios dujos, kurių tėkmės greitis 10 l/min. Derinant pilno skenavimo ir MS/MS modelius buvo apskaičiuotos tikslios junginių molekulinės formulės intervale *m/z* 100 – 1500, kai skenavimo greitis – 2,5 Hz. Smailių preliminarus identifikavimas buvo atliktas pagal apskaičiuotas tikslias junginių molekulinės formules bei lyginant juos su literatūra.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. JUODAVAISĖS ARONIJOS UOGŲ IŠSPAUDŲ BIORAFINAVIMO IR EKSTRAKTŲ TYRIMŲ REZULTATAI IR APTARIMAS

3.1.1. Priklausomų kintamųjų nustatymas ir optimizavimas

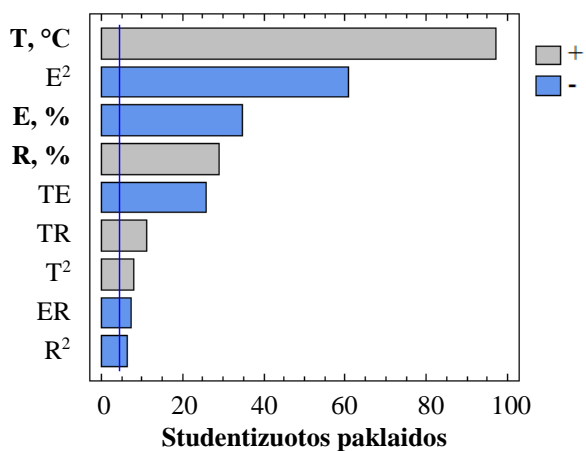
ETPS išeiga

Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ekstraktai buvo išskirti aukšto slėgio ekstrakcijos metodu, ekstrahuojant tirpikliais padidintame slėgyje eksperimentinio plano faktorių vertėmis.

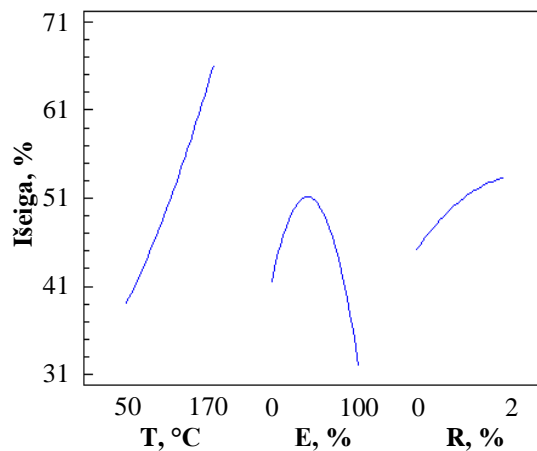
Nepriklausomų kintamųjų įtakos ekstrakcijos išeigai apskaičiuotosios studentizuotos paklaidos yra apibendrintos ir išdėstytos mažėjančia svarbos tvarka Pareto diagramoje, pavaizduotoje 16 pav.

Šiuo atveju, visi nepriklausomi kintamieji yra reikšmingi ekstrakcijos išeigai, o temperatūra buvo reikšmingiausias faktorius ($p=0,0001$), labiausiai įtakojantis ją (žr. 5 lent.). Taip pat didelį reikšmingumą turėjo netiesioginis nepriklausomas kintamasis E^2 ($p=0,0003$), etanolis ($p=0,0008$) ir skruzdžių rūgštis ($p=0,0012$) (žr. 5 lent.).

Pagal determinacijos koeficientą ($R^2=95,6$) galime teigti, jog modelyje pasirinkti nepriklausomi kintamieji paaiškina 95,6 % ekstrakcijos išeigos variacijos, 4,4 % – kiti neįvertinti faktoriai (žr. 5 lent.). O remiantis koreguotuoju determinacijos koeficientu ($R_{kor.}^2=93,5$), galime tiksliau patvirtinti ekstrakcijos išeigos modelio tinkamumą numatyti optimalias ETPS faktorių vertes (žr. 5 lent.).



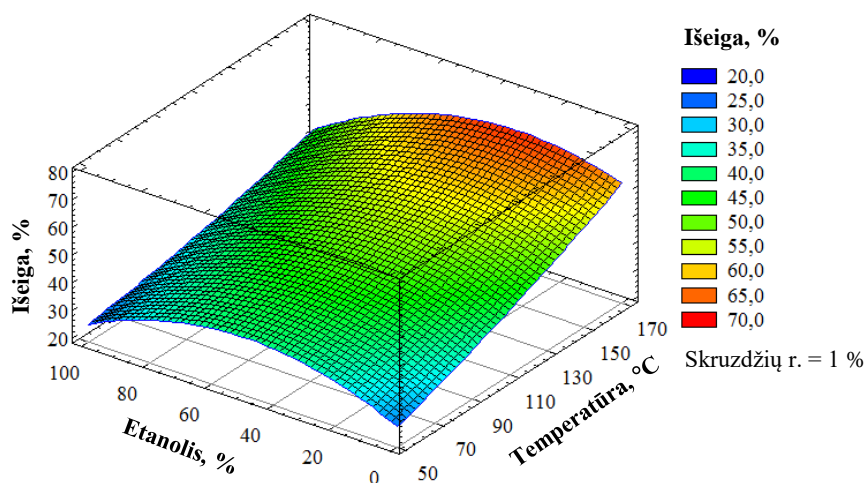
16 pav. Kintamųjų reikšmingumas ekstrakcijos išeigai Pareto diagramoje.



17 pav. Ekstrakcijos priklausomybė nuo tiesioginių nepriklausomų kintamųjų.

Sudarytas modelis buvo grafiškai išreikštas 18 pav. kaip trimatis atsako paviršius, vaizduojantis temperatūros, etanolio ir skruzdžių rūgšties tarpusavio sąveiką, kuri daro įtaką priklausomam kintamajam – ekstrakcijos išeigai. Trimatis atsako paviršiaus grafikas gautas pasirenkant vieną iš trijų faktorių kaip konstantą, o kiti du – kintantys ir prognozuojantys ekstrakcijos išeigą. Esant skruzdžių rūgšties 1 % vertės konstantai, ekstrakcijos išeigą didina temperatūros kėlimas visame eksperimentinio plano verčių intervale nuo 50 iki 170 °C (taip pat žr. 17 pav.). Be to, iš 17 pav. matyti, jog etanolio (0–100 %) ir skruzdžių rūgšties (0–2 %) didinimas jų verčių intervale didino ekstrakcijos išeigą tik iki tam tikros faktorių vertės, po to, mažino.

Visų išeigos ETPS eksperimentų išeigos variavo nuo 20,82 iki 75,66 %. Didžiausia ekstrakcijos išeiga (75,66 %) buvo gauta, esant tokioms faktorių vertėms: T – 170 °C; E – 50 % ir R – 2 %. Mažiausia ekstrakcijos išeiga (20,82 %) buvo gauta, esant tokioms faktorių vertėms: T – 50 °C; E – 100 % ir R – 0 %. Be to, eksperimentinio plano trijų pakartojimų centrinių taškų eksperimentai (T – 110 °C; E – 50 % ir R – 1 %) parodė mažą išeigos sklaidą nuo vidurkio (SN), kadangi atitinkamai ekstrakcijos išeiga buvo 49,56 %; 49,57 %; ir 50,59 %.



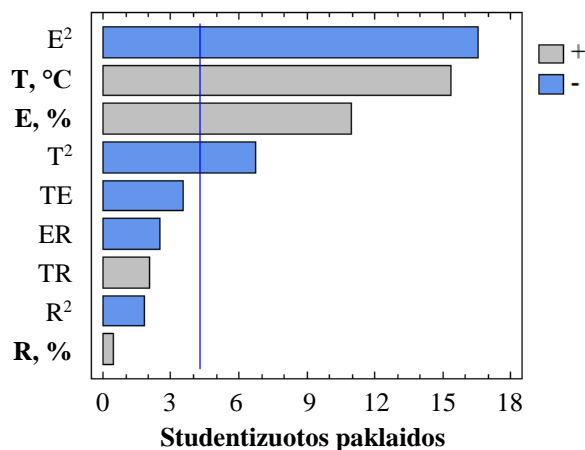
18 pav. Išspaudų ekstrakcijos išeigos trimatis paviršiaus grafikas.

Atlikus ekstrakcijos išeigos optimizavimą, kai buvo siekiama maksimizuoti šio atsako vertę, nustatyta, jog optimali vertė yra 72,53 %, esant tokioms ETPS sąlygoms: T – 170 °C; E – 31 % ir R – 2 %.

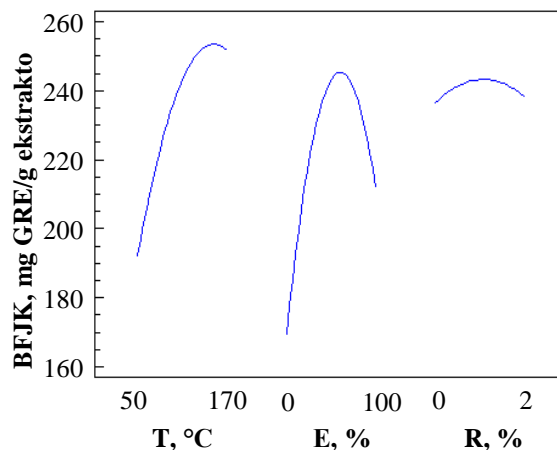
Nepriklausomų kintamųjų įtakos ekstraktų BFJK apskaičiuotosios studentizuotos paklaidos yra apibendrintos ir išdėstytos mažėjančia svarbos tvarka Pareto diagramoje, pavaizduotoje 19 pav.

Šiuo atveju, keturi kintamieji yra reikšmingi ekstraktų BFJK, iš jų: du tiesioginiai kintamieji temperatūra ($p=0,0042$) ir etanolis ($p=0,0082$), kurie turėjo didžiausią teigiamą reikšmingumą, bei du netiesioginiai – E^2 ($p=0,0036$) ir T^2 ($p=0,0215$) (žr. 5 lent.).

Pagal determinacijos koeficientą ($R^2=88,8$) galime teigti, jog modelyje pasirinkti nepriklausomi kintamieji paaiškina 88,8 % BFJK variacijos, 11,2 % – kiti neįvertinti faktoriai (žr. 5 lent.). O remiantis koreguotuoju determinacijos koeficientu ($R_{kor.}^2=83,7$), galime tiksliau patvirtinti ekstraktų BFJK modelio tinkamumą numatyti optimalias ETPS faktorių vertes (žr. 5 lent.).



19 pav. Kintamųjų reikšmingumas BFJK Pareto diagramoje.

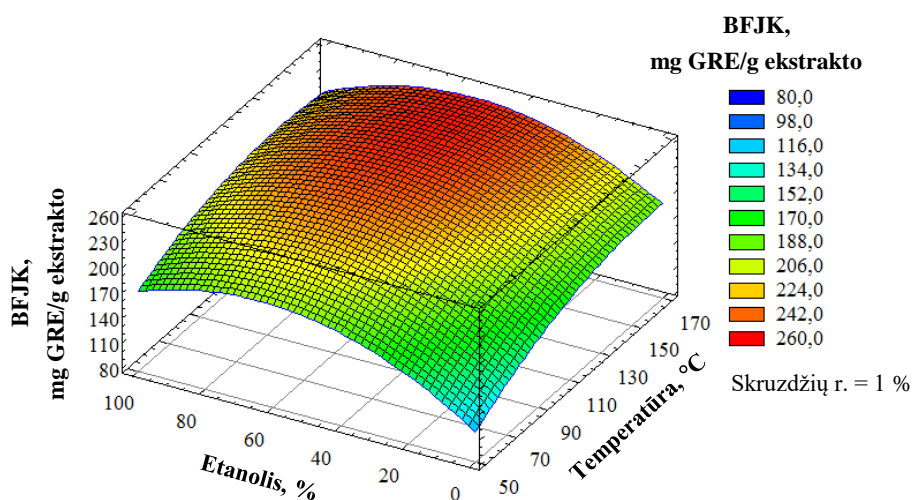


20 pav. BFJK priklausomybė nuo tiesioginių kintamųjų.

Sudarytas modelis buvo grafiškai išreikštas 21 pav. kaip trimatis atsako paviršius, vaizduojantis temperatūros, etanolio ir skruzdžių rūgšties tarpusavio sąveiką, kuri daro įtaką priklausomam kintamajam – BFJK. Trimatis atsako paviršiaus grafikas buvo gautas pasirenkant vieną iš trijų faktorių kaip konstantą, o kiti du – kintantys ir prognozuojantys ekstraktų BFJK. Esant skruzdžių rūgšties 1 % vertės konstantai, ekstraktų BFJK didina temperatūros kėlimas visame eksperimentinio plano verčių intervale nuo 50 iki 170 $^\circ C$ (taip pat žr. 20 pav.). Be to, iš 20 pav. matyti, jog etanolio (0–100 %) ir skruzdžių rūgšties (0–2 %) didinimas jų verčių intervale didino ekstraktų BFJK tik iki tam tikros faktorių vertės, po to, mažino.

Nustatytų visų eksperimentinių ekstraktų BFJK vertės varijavo nuo $86,69 \pm 3,34$ iki $258,31 \pm 13,34$ mg GRE/g ekstrakto. Didžiausias ekstrakto BFJK ($258,31 \pm 13,34$ mg GRE/g ekstrakto) buvo gautas, esant tokioms ETPS faktorių vertėms: $T - 170 ^\circ C$; $E - 50 \%$ ir $R - 0 \%$.

Mažiausias ekstrakto BFJK ($86,69 \pm 3,34$ mg GRE/g ekstrakto) buvo gautas esant tokioms faktorių vertėms: T – 50 °C; E – 0 % ir R – 0 %. Be to, eksperimentinio plano trijų pakartojimų centrinių taškų eksperimentai (T – 110 °C; E – 50 % ir R – 1 %) parodė mažą išeigos sklaidą nuo vidurkio (SN), kadangi atitinkamai BFJK buvo $254,89 \pm 13,17$ mg GRE/g ekstrakto; $253,28 \pm 19,00$ mg GRE/g ekstrakto; ir $239,98 \pm 11,07$ mg GRE/g ekstrakto.



21 pav. Išspaudų ekstraktų BFJK trimatis paviršiaus grafikas.

Atlikus ekstraktų BFJK optimizavimą, kai buvo siekiama maksimizuoti atsaką, nustatyta, jog optimali jo vertė yra 255,1 mg GRE/g ekstrakto, esant tokioms ETPS sąlygoms: T – 152 °C; E – 56 % ir R – 1,3 %.

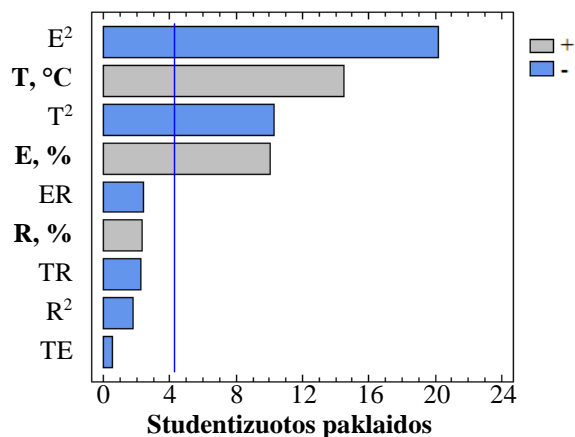
Antioksidacinis aktyvumas: TEAG

Nepriklausomų kintamųjų įtakos ekstraktų TEAG apskaičiuotosios studentizuotos paklaidos yra apibendrintos ir išdėstytos mažėjančia svarbos tvarka Pareto diagramoje, pavaizduotoje 22 pav.

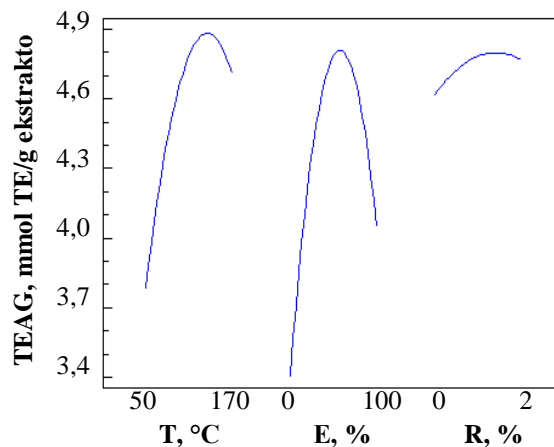
Šiuo atveju, keturi nepriklausomi kintamieji yra reikšmingi ekstraktų TEAG, iš jų: du tiesioginiai kintamieji temperatūra ($p=0,0047$) ir etanolis ($p=0,0097$), kurie turėjo didžiausią teigiamą reikšmingumą, bei du netiesioginiai – E^2 ($p=0,0024$) ir T^2 ($p=0,0093$) (žr. 5 lent.). Kiti nepriklausomi kintamieji (ER, R, TR, R^2 , TE) buvo statistškai nereikšmingi, kadangi jų p -vertė buvo didesnė negu 0,05 (žr. 5 lent.).

Pagal determinacijos koeficientą ($R^2=89,2$) galime teigti, jog modelyje pasirinkti nepriklausomi kintamieji paaiškina 89,2 % ekstraktų TEAG variacijos, 10,8 % – kiti neįvertinti faktoriai (žr. 5 lent.). O remiantis koreguotuoju determinacijos koeficientu ($R_{kor.}^2=84,1$), galime

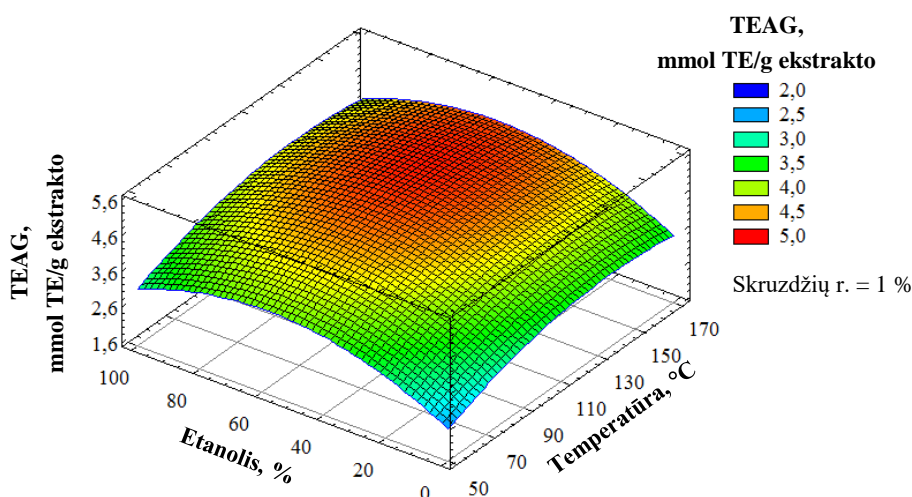
tiksliau patvirtinti ekstraktų TEAG modelio tinkamumą numatyti optimalias ETPS faktorių vertes (žr. 5 lent.).



22 pav. Kintamųjų reikšmingumas TEAG Pareto diagramoje.



23 pav. TEAG priklausomybė nuo tiesioginių kintamųjų.



24 pav. Išspaudų ekstraktų TEAG trimatis paviršiaus grafikas.

Sudarytas modelis buvo grafiškai išreikštas 24 pav. kaip trimatis atsako paviršius, vaizduojantis temperatūros, etanolio ir skrudžių rūgšties tarpusavio sąveiką, kuri daro įtaką priklausomam kintamajam – TEAG. Trimatis atsako paviršiaus grafikas buvo gautas pasirenkant vieną iš trijų faktorių kaip konstantą, o kiti du – kintantys ir prognozuojantys ekstraktų TEAG. Be to, iš 23 pav. matyti, jog temperatūros (50–170 °C), etanolio (0–100 %) ir skrudžių rūgšties (0–2 %) didinimas jų verčių intervale didina ekstraktų BFKJ tik iki tam tikros faktorių vertės, po to, mažino.

Visų įvertintų eksperimentinių ekstraktų TEAG vertės varijavo nuo $1,68 \pm 0,07$ iki $5,00 \pm 0,17$ mmol TE/g ekstrakto. Didžiausia ekstrakto TEAG ($5,00 \pm 0,17$ mmol TE/g ekstrakto) buvo gauta, esant eksperimentinio plano trijų pakartojimų centrinių taškų faktorių vertėms ($T - 110\ ^\circ\text{C}$; $E - 50$

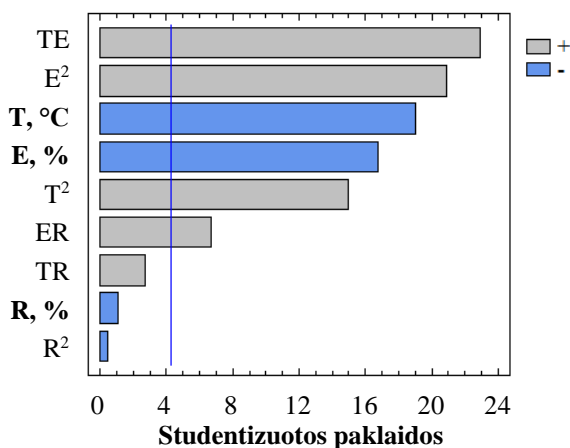
% ir $R - 1$ %), o šių kitų pakartojimų TEAG buvo $4,76 \pm 0,28$ mmol TE/g ekstrakto ir $4,76 \pm 0,14$ mmol TE/g ekstrakto, todėl galime patvirtinti mažą TEAG sklaidą nuo vidurkio (SN). Mažiausias ekstrakto TEAG ($1,68 \pm 0,07$ mmol TE/g ekstrakto) buvo gautas esant tokioms faktorių vertėms: $T - 50$ °C; $E - 0$ % ir $R - 0$ %.

Antioksidacinis aktyvumas: DPPH (EC_{50})

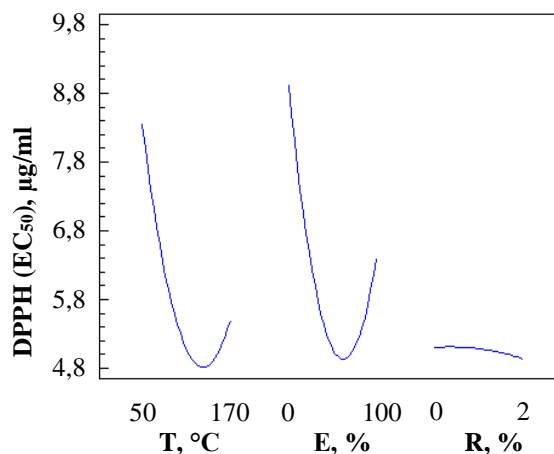
DPPH radikalų surišimo rezultatai pateikiami kaip efektyvi koncentracija (EC_{50}), tai yra antioksidanto kiekis reikalingas suriši 50 proc. pradinės DPPH koncentracijos.

Nepriklausomų kintamųjų įtakos ekstraktų DPPH (EC_{50}) apskaičiuotosios studentizuotos paklaidos yra apibendrintos ir išdėstytos mažėjančia svarbos tvarka Pareto diagramoje, pavaizduotoje 25 pav.

Šiuo atveju, šeši nepriklausomi kintamieji yra reikšmingi ekstraktų DPPH (EC_{50}), iš jų: du tiesioginiai kintamieji temperatūra ($p=0,0028$) ir etanolis ($p=0,0035$), kurie turėjo didžiausią reikšmingumą, bei keturi netiesioginiai – TE ($p=0,0019$), E^2 ($p=0,0023$), T^2 ($p=0,0044$) ir ER ($p=0,0215$) (žr. 5 lent.). Kiti nepriklausomi kintamieji (R , R^2) buvo statistškai nereikšmingi, kadangi jų p -vertė buvo didesnė negu 0,05 (žr. 5 lent.).



25 pav. Kintamųjų reikšmingumas DPPH (EC_{50}) Pareto diagramoje.

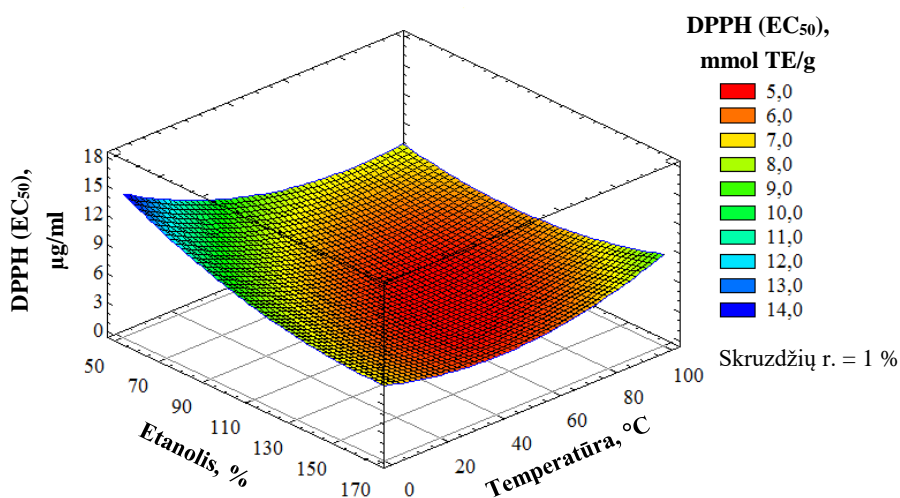


26 pav. DPPH (EC_{50}) priklausomybė nuo tiesioginių nepriklausomų kintamųjų.

Pagal determinacijos koeficientą ($R^2=76,9$) galime teigti, jog modelyje pasirinkti nepriklausomi kintamieji paaiškina 76,9 % ekstraktų DPPH (EC_{50}) variacijos, 23,1 % – kiti neįvertinti faktoriai (žr. 5 lent.). O remiantis koreguotuoju determinacijos koeficientu ($R_{kor}^2=65,9$), galime sąlyginai patvirtinti ekstraktų DPPH (EC_{50}) modelio tinkamumą numatyti optimalias ETPS faktorių vertes (žr. 5 lent.).

Sudarytas modelis buvo grafiškai išreikštas 27 pav. kaip trimatis atsako paviršius, vaizduojantis temperatūros, etanolio ir skruzdžių rūgšties tarpusavio sąveiką, kuri daro įtaką priklausomam kintamajam – DPPH (EC₅₀). Trimatis atsako paviršiaus grafikas buvo gautas pasirenkant vieną iš trijų faktorių kaip konstantą, o kiti du – kintantys ir prognozuojantys ekstraktų DPPH (EC₅₀). Be to, iš 26 pav. matyti, jog temperatūros (50–170 °C), etanolio (0–100 %) didinimas jų verčių intervale didino ekstraktų DPPH (EC₅₀) tik iki tam tikros faktorių vertės, po to, mažino. O skruzdžių rūgšties (0–2 %) didinimas jos verčių intervale labai nežymiai mažino DPPH (EC₅₀) (žr. 00 pav.).

Visų įvertintų eksperimentinių ekstraktų DPPH (EC₅₀) vertės varijavo nuo 17,85±0,35 iki 5,06±0,15 µg/ml. Didžiausias ekstrakto antioksidacinis aktyvumas pagal DPPH (EC₅₀) (5,06±0,15 µg/ml) buvo gautas, esant eksperimentinio plano trijų pakartojimų centrinių taškų faktorių vertėms (T – 110 °C; E – 50 % ir R – 1 %), o šių kitų pakartojimų DPPH (EC₅₀) vertės buvo 5,50 ± 0,21, todėl galime dar kartą patvirtinti, kad šis modelis sąlyginai tinkamas numatyti optimalias išspaudų ETPS faktorių vertes. Mažiausias ekstrakto antioksidacinis aktyvumas pagal DPPH (EC₅₀) (17,85±0,35 µg/ml) buvo gautas esant tokioms faktorių vertėms: T – 50 °C; E – 0 % ir R – 1 %.



27 pav. Išspaudų ekstraktų DPPH (EC₅₀) trimatis paviršiaus grafikas.

Kvadratinio modelio dispersinė analizė ir daugianario modelio lygtys

$$\text{Išeiga} = 11,5801 + 0,155864 \times T + 0,649167 \times E + 4,708 \times R + 0,000505397 \times T^2 - 0,00147033 \times T \times E + 0,031864 \times T \times R - 0,00558448 \times E^2 - 0,0254408 \times E \times R - 1,45787 \times R^2$$

$$\text{BFJK} = 24,2674 + 1,85589 \times T + 2,95245 \times E + 9,78927 \times R + 0,00591908 \times T^2 - 0,00279826 \times T \times E + 0,0798908 \times T \times R - 0,0210274 \times E^2 - 0,119786 \times E \times R - 5,84506 \times R^2$$

$$\begin{aligned} \text{TEAG} = & 0,288024 + 0,0424543 \times T + 0,0513162 \times E + 0,514798 \times R - 0,000149645 \times T^2 - \\ & - 0,00000693056 \times T \times E - 0,00148306 \times T \times R - 0,000422602 \times E^2 - 0,00187833 \times E \times R - \\ & - 0,0920228 \times R^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{DPPH (EC}_{50}) = & 22,639 - 0,175321 \times T - 0,217004 \times E - 1,03144 \times R + 0,000511415 \times T^2 + \\ & + 0,000699281 \times T \times E + 0,00415708 \times T \times R + 0,00102709 \times E^2 + 0,012277 \times E \times R - 0,0615715 \times R^2 \end{aligned}$$

5 lentelė. Kvadratinio modelio dispersinė analizė (*Statgraphics Centurion XVI*).

Koeficientas	Ekstrakcijos išeiga		BFJK		TEAG		DPPH (EC ₅₀)	
	Apskaič.	p-vertė	Apskaič.	p-vertė	Apskaič.	p-vertė	Apskaič.	p-vertė
Modelis	11,5801		24,2674		0,2880		22,6390	
T	0,1559	0,0001*	1,8559	0,0042*	0,0425	0,0047*	-0,1753	0,0028*
E	0,6491	0,0008*	2,9525	0,0082*	0,0513	0,0097*	-0,2170	0,0035*
R	4,708	0,0012*	9,7893	0,6873	0,5148	0,1465	-1,0314	0,3804
T ²	0,0005	0,0155*	-0,0059	0,0215*	-0,0000	0,0093*	0,0005	0,0044*
E ²	-0,0056	0,0003*	-0,0210	0,0036*	-0,0004	0,0024*	0,0010	0,0023*
R ²	-1,4579	0,0239*	-5,8451	0,2068	-0,0920	0,2209	-0,0616	0,6663
TE	-0,0015	0,0015*	-0,0028	0,0709	-0,0000	0,6471	0,0007	0,0019*
TR	0,0319	0,0079*	0,0799	0,1796	-0,0015	0,1499	0,0042	0,1125
ER	-0,0254	0,0175*	-0,1198	0,1267	-0,0019	0,1376	0,0123	0,0215*
Liktinė paklaida	15,2725**	0,0226*	358,689**	0,1686	0,1179**	0,1420	3,5025**	0,0283*
R ²	95,5986		88,8468		89,1930		76,8628	
R ² pakoreguotas	93,5137		83,7111		84,0738		65,9031	
Teorinė paklaida**	0,3495		66,9533		0,0182		0,1006	

* Statistiškai reikšmingas, kai $p < 0,05$; ** Vidurkio kvadratas

3.1.2. ETPS metodo optimizavimas ir optimalusis ekstraktas

Siekiant rasti eksperimentinių faktorių vertes, kurioms esant būtų galima gauti išspaudų didžiausią ETPS išeigą, jų ekstraktų BFJK ir antioksidacinį aktyvumą, buvo atliktas ETPS metodo tiesioginių nepriklausomų kintamųjų optimizavimas, tiksliau, buvo nustatytos šių kintamųjų vertės, kurioms esant būtų pasiektas projekte iškeltas uždavinys. Optimizavimo metu buvo siekiama patenkinti šiuos priklausomus kintamuosius (atsakus): maksimizuoti ekstrakcijos išeigą, BFJK, TEAG ir minimizuoti DPPH (EC₅₀) vertes. Pastarąjį buvo siekiama minimizuoti dėl to, nes kuo mažesnė EC₅₀ vertė, tuo didesnis antioksidacinis aktyvumas. Optimaliųjų eksperimentinių faktorių verčių spėjamumui buvo pasitelkta *Statgraphics Centurion XVI* programa.

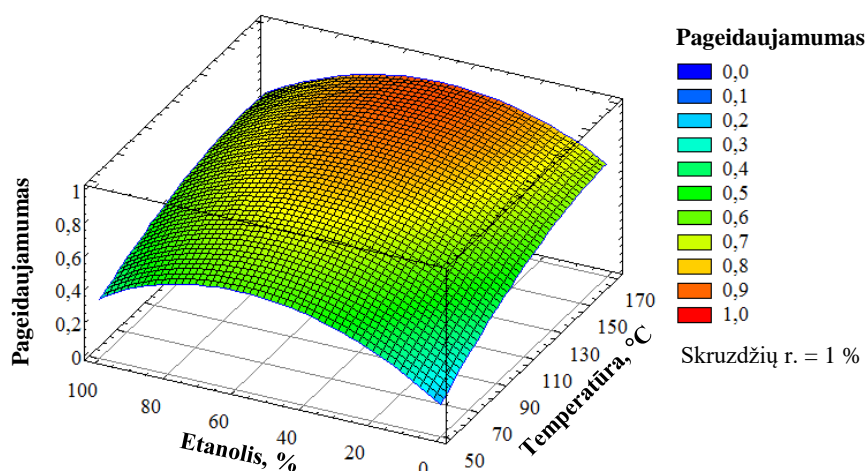
6 lentelėje yra pateikiamos šio optimizavimo rezultatai. Matome, jog pasitelkus programą spėjamosios ETPS metodo optimalios faktorių vertės yra T – 164,9 °C, E – 46,3 % ir R – 1,81 ir jos turėjo prognozuoti 69 % ekstrakcijos išeigą, 252,00 mg GRE/g ekstrakto BFJK, 4,667 mmol TE/g ekstrakto TEAG ir 5,33 µg/ml DPPH (EC₅₀) vertes.

Spėjamosios ETPS metodo optimalios faktorių vertės buvo labai nežymiai pakoreguotos, t.y. optimalusis ekstraktas buvo gautas esant tokiomis eksperimentinėmis vertėms: T – 165 °C, E

– 46% ir R – 1,8. Atlikus išspaudų ETPS šiomis faktorių vertėmis buvo nustatytos priklausomų kintamųjų (atsakų) vertės eksperimentiniu būdu ir palygintos su spėjamosiomis. Matome, jog nustatyta ekstrakcijos išeiga buvo 5,11 % didesnė už spėjamąją. Taip pat įvertinta DPPH (EC₅₀) vertė buvo 11,11 % didesnė už spėjamąją. O kitų atsakų vertės buvo mažesnės už spėjamasias, nes BFJK ir TEAG vertės atitinkamai mažesnės 6,10 % ir 6,89 %. Eksperimentinio plano sudarymo metu buvo užsibrėžta, kad optimaliomis išspaudų ETPS faktorių vertėmis priklausomų kintamųjų (atsakų) spėjamumo vertės palyginus su eksperimentinėmis gali sudaryti skirtumą ne didesnį kaip 15 %. Todėl galime daryti išvadą, jog šis ETPS faktorių verčių optimizavimas yra sėkmingas ir tinkamas modeliuoti.

6 lentelė. Spėjamosios ir eksperimentinės išspaudų optimalios faktorių ir atsakų vertės.

	ETPS optimalios faktorių vertės			Priklausomi kintamieji (atsakai)			
	Temperatūra, °C	Etanolis, %	Skrudžių rūgštis, %	Ekstrakcijos išeiga, %	BFJK, mg GRE/g ekstrakto	TEAG, mmol TE/g ekstrakto	DPPH (EC ₅₀), µg/ml
<i>Spėjamosios</i>	164,9	46,3	1,81	69,00	252,00	4,667	5,33
<i>Eksperimentinės</i>	165	46	1,8	72,53±0,02	236,64±3,72	4,346 ± 0,241	5,92 ± 0,23
			<i>Skirtumas, %</i>	+5,11	-6,10	-6,89	+11,11



28 pav. Optimizavimo trimatis atsako paviršiaus grafikas.

Optimizavimo modelis, pasitelkiant APM įrankį turinčią *Statgraphics Centurion XVI* programa buvo grafiškai išreikštas 28 pav. kaip trimatis atsako paviršius, vaizduojantis temperatūros, etanolio ir skrudžių rūgšties tarpusavio sąveiką, kuri daro įtaką atsakų santykiniam pageidaujamumui. Šis optimizavimo modelis leis ateityje parinkti juodavaisės aronijos uogų išspaudų biorafinavimo į funkcionaliuosius ingredientus pageidaujamas priklausomų kintamųjų (ekstrakcijos išeigos, BFJK, TEAG ir DPPH (EC₅₀)) vertes, taikant ETPS. Iš 28 pav. matyti, jog didžiausias atsakų santykinis pageidaujamumo intervalas nuo 0,8 iki 1,0 apsprendžia parinkti

tokias ETPS faktorių verčių intervalus, t.y. T nuo 150 iki 170 °C ir E nuo 40 iki 80 %, kai R yra laikomas konstanta, šiuo atveju, lygus 1 %. O mažiausias atsakų santykinis pageidaujamumas yra apibrėžtas esant E ribinėse vertėse, t. y. 0 % arba 100 %, ir T esant mažiausioje ribinėje vertėje – 50 °C.

Be to, optimizavimo modelis bus tinkamas greičiau numatyti juodavaisės aronijos uogų išspaudų pritaikymą kuriant padidintos biologinės vertės maisto produktus, natūralius maisto priedus, maisto papildus, kosmetikos gaminius bei medicinos preparatus.

3.1.3. Juodavaisės aronijos uogų išspaudų optimaliojo ekstrakto sudėties analizė

Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ekstrakto, gauto optimaliomis ETPS sąlygomis (T – 165 °C, E – 46% ir R – 1,8%) kokybinė sudėties analizė buvo atlikta taikant SCH×SCH-DMD-MS metodą. Atlikus mokslinės literatūros apžvalgą, nustatyta, jog SCH×SCH pirmą kartą buvo pritaikytas šių uogų ekstrakto sudėties analizei, todėl buvo reikalinga atlikti išsamų atskyrimo sąlygų optimizavimą kiekvienoje dimensijoje tam, kad išbandyti nejudriąją ir judriąją fazę. Galiausiai, naudojamose analitinėse sąlygose buvo įtraukta amino kolonėlė pirmoje dimensijoje (¹D) ir C₁₈ kolonėlė antroje dimensijoje (²D). Šių dviejų dimensijų kolonėlių reikalavimai ir ypatumai pagrįsti dviejų identiškų kontūrų panaudojimu jungiamajame ventilyje. Po kiekvienos dimensijos optimizavimo, dviejų dimensijų sistema buvo suderinta norint išgauti atskyrimo sąlygas, kuriose būtų lėtas eliucijos gradientas ¹D (18 μl/min) ir greitas atskyrimas ²D. Panaudojant šias analitines sąlygas kartu su DMD ir MS detektoriais buvo galima atlikti šių uogų išspaudų optimaliojo ekstrakto junginių atskyrimą išlaikant didelį smailių ortogonalumo laipsnį (žr. 29 ir 30 pav.). Be to, teoriškai smailių talpa buvo apskaičiuota pagal Li ir kt. (2009) [58].

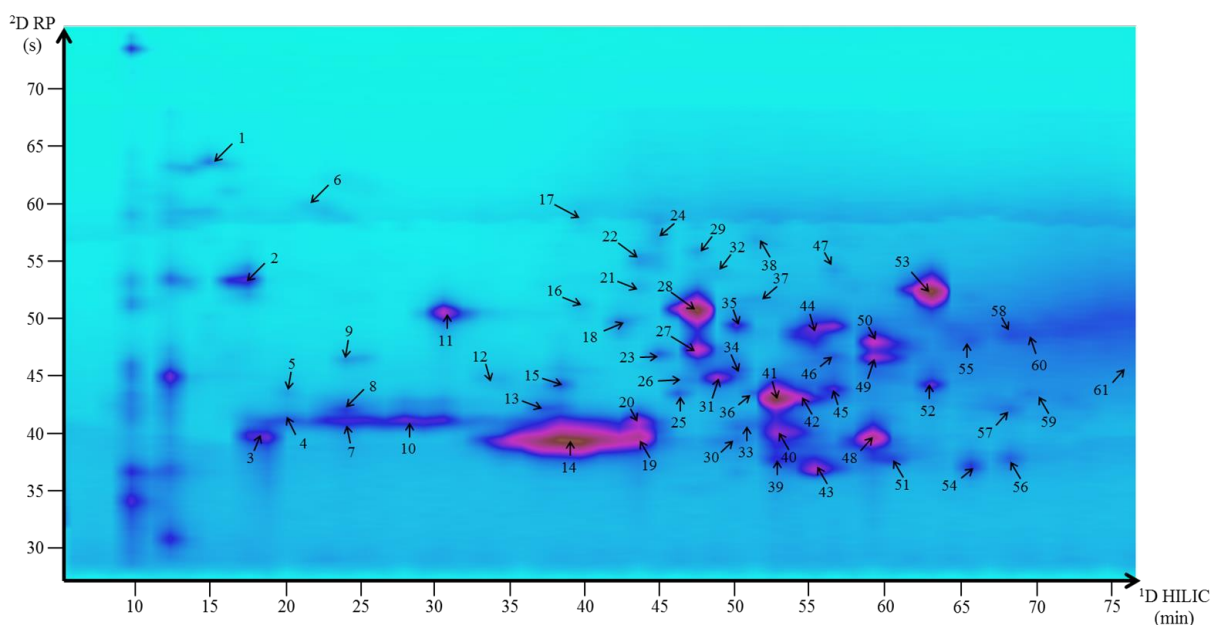
29 ir 30 pav. pavaizduotas juodavaisės aronijos uogų išspaudų optimaliojo ekstrakto atitinkamai dvimatis ir trimatis brėžinys, o 3 lentelėje apibendrinama šių brėžinių smailių identifikacija. Juodavaisės aronijos išspaudų optimaliajame ekstrakto buvo identifikuoti atocianinai, proantocianidinai, flavonoidai ir fenolinės rūgštys.

Antocianinai

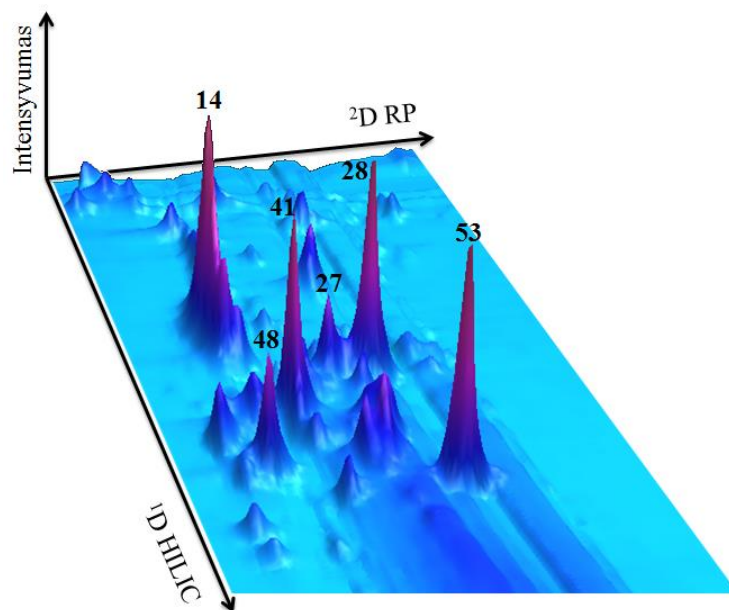
Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ETPS optimaliajame ekstrakto didžiausia identifikuotų junginių grupė buvo antocianinai [68]. Tarp jų, skirtingi cianidino glikozidai buvo preliminariai identifikuoti. Šių junginių smailių identifikacija buvo paremta molekulinį jonų *m/z* aptikimu po teigiamos jonizacijos sąlygų, kuriomis esant MS/MS fragmentacijos metu susidarė 162 arba 132 Da masės netekimas ir fragmentacijos jonas *m/z* buvo tipiškas cianidino aglikonui. Smailės **14**, **19**

ir **20** buvo vienos iš didžiausio intensyvumo. Šiuo atveju, molekulinis jonas m/z 449,3 buvo aptiktas su 162 Da masės netekimu ir buvo identifikuotas cianidino glikozidų arba galaktozidų buvimas ekstrakto. Kitos atskirtos smailės parodė tokį patį fragmentacijos modelį ir jos buvo priskirtos skirtingiems cianidino glikozidų izomerams (smailės **15** ir **26**).

Kita antocianinų grupė ekstrakto buvo sudaryta iš cianidino arabinozidų ir cianidino ksilozidų. Šiuo atveju, molekulinio jono m/z 419,5 aptikimas buvo rastas kartu su cianidino aglikono (m/z 287) fragmentiškais jonais (smailės **4**, **5**, **7**, **8**, **10** ir **13**). Deja, taikant šias analitines sąlygas nebuvo galima daryti išvados apie izomero identifikaciją. Kiti cianidino dariniai galimai buvo aptikti smailėse **3**, **25**, **30** ir **57** dėl fragmento m/z 287 buvimo, tačiau junginiai tiksliai nebuvo identifikuoti. Anksčiau cianidino glikozidai buvo išsamiai apibūdinti juodavaisės aronijos uogose ir yra įvardijami kaip vieni iš pagrindinių junginių šių uogų cheminėje sudėtyje. Be to, į cianidinus panašūs junginiai, bet kiti mažesni antocianinai nebuvo anksčiau identifikuoti, **21** smailėje buvo identifikuotas delfinidin-arabinozidas dėl aptikto molekulinio jono m/z 435,2 ir išgautų fragmentinių jonų, įskaitant delfinidin aglikono joną (m/z 258). Smailė **37** buvo priskirta petunidin-*p-coumaroyl* glikozidui dėl molekulinio jono m/z 625,5 ir charakteristiškų fragmentų m/z 479, 463 ir 317 aptikimo, o **45** smailė buvo preliminariai identifikuota kaip peonidin priklausantiems gliukozidams ((epi)-katechin-peonidin gliukozidas) dėl molekulinio jono m/z 751,4 aptikimo.



29 pav. Optimaliojo ekstrakto kokybinės sudėties analizės dvimatis grafikas.



30 pav. Optimaliojo ekstrakto kokybinės sudėties analizės trimatis grafikas.

Proantocianidinai

Proantocianidinai yra kita gausi fenolinių junginių grupė, identifikuota juodavaisės aronijos uogose ir šių junginių kiekis jose yra plačiai ištirtas. Proantocianidinai yra sudaryti iš skirtingų laipsnių polimerizacijos polimerų, kurie susiformavo dėl katechino ir epikatechino monomerų ir jiems priklausančių galato formų. Tarp identifikuotų proantocianidinų optimaliajame ekstrakto yra keletas procianidinų, kurie turi skirtingus polimerizacijos laipsnius esant teigiamam ir neigiamam jonizacijos režimui. Ypatingai, procianidino dimero (smailės **27** ir **31**, atitinkamai m/z 575,4 ir 577,3 neigiamame ir teigiamame jonizacijos režime), procianidino trimero (smailės **39**, **40**, **42**, kurių m/z 865), procianidino tetramero (smailė **55** su dvigubai įkrautu molekulinio jonu m/z 579,9) ir procianidino heksamero (smailė **61** su molekulinio jonu $[M-2H]^{2-}$ m/z 579,9) formos buvo priskirtos.

Toliau šioje optimaliojo ekstrakto sudėties analizėje buvo identifikuoti kiti proantocianidinų junginiai – prodelfinidinai, kurie nuo procianidinų skiriasi dėl epigalokatechinų ir galato formų jų struktūroje. Skirtingi prodelfinidinų dimerai buvo preliminariai identifikuoti dėl molekulinio jono m/z 593,5 aptikimo (smailės **22**, **32** ir **34**), jų fragmentiniai modeliai parodė molekulinio jono aptikimą m/z 575 (18 Da masės netekimas), 303 (katechino dalies netekimas) ir 289 (galokatechino dalies netekimas). Ankstesniuose moksliniuose tyrimuose šie junginiai nebuvo apibūdinti juodavaisės aronijos uogų bandiniuose, todėl šis pritaikytas chromatografijos metodas leido preliminariai juos identifikuoti. Be to, šių junginių buvimas priklauso nuo delfinidinų gliukozidų nustatymo ekstrakto. Be šių smailių, kitos gali būti priskiriamos proantocianinų grupei savo būdingos fragmentacijos modelių, tačiau nėra galimybės pilnai jų identifikuoti.

Juodavaisės aronijos uogų išspaudų optimaliajame ekstrakte buvo aptikti keletas flavonoidų. Epigalokatechinas (junginys **11**) buvo aptiktas vienoje iš intensyviausių smailių. Šis junginys buvo identifikuotas dėl molekulino jono m/z 305,1 aptikimo esant neigiamam jonizacijos režimui su būdingos fragmentacijos jonais (žr. 7 lent.). Tačiau didžiausias flavonoidų poklasis analizuotame išspaudų optimaliajame ekstrakte priklauso flavonoliams. Skirtingi kvercetino dariniai (smailės **23**, **28**, **29**, **44**, **46**, **47** ir **50**) buvo aptikti šiame ekstrakte. Tarp jų, kvercetin-glikozidas (smailė **28**) identifikuotas dėl molekulinio jono $[M-H]^-$ m/z 463,8 aptikimo, kvercetin-rutinozidas (smailė **44**) identifikuotas dėl molekulinio jono $[M-H]^-$ m/z 609,4 aptikimo ir kvercetin-vakcininas (smailė **50**) identifikuotas dėl molekulinio jono $[M+H]^+$ m/z 597,1 aptikimo.

Kiti flavonoidai buvo identifikuoti kaip flavanonai, tiksliau, eriodiktiol-gliukuronidas ir eriodiktiol-glikozidas (atitinkamai smailės 53 ir 54) buvo aptikti dėl molekulinį jonų atsiradimo esant teigiamai jonizacijai taip pat esant fragmentiniams jonams, kurie atitiko eriodiktiolį. Be to, išspaudų optimaliajame ekstrakte buvo rasta ir fenolinių rūgščių, jos buvo rastos neigiamame jonizacijos režime. Smailė **43** buvo preliminariai identifikuota kaip dikafeoil-chino rūgštis dėl molekulinio jono $[M-H]^-$ m/z 515,6 aptikimo ir MS/MS režimu gautų junginių fragmentų (aptinkant jonus m/z 498, 425 ir 353), tuo tarpu, **41** smailė buvo preliminariai priskirta chlorogeno rūgščiai dėl aptikto jono m/z 708,5 ir, kuris atitiko molekulinio jono $[2M-H]^-$ būdingam fragmentui m/z 353. Aptikti jonai esant teigiamam jonizacijos režimui (žr. 7 lent.) padėjo patvirtinti šią identifikaciją.

7 lentelė. Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ekstrakto, gauto optimaliomis ETPS sąlygomis (E – 46%, R – 1,8%, T – 165 °C) kokybinė sudėties analizė.

Smailės Nr.	t _r ^{1D} , min	t _r ^{2D} , s	Bendras t _r , min	Teigiama jonizacija		Neigiama jonizacija		Siūlomas identifikavimas	Fenolinių junginių klasė ar poklasis
				[M] ⁺ /[M+H] ⁺	Pagrindiniai MS/MS fragmentai	[M-H] ⁻	Pagrindiniai MS/MS fragmentai		
1	14,3	63,65	15,36	349,6	209, 131			N.j.	
2	16,9	53,05	17,79	499,8	481, 442, 347, 271			N.j.	
3	18,2	39,70	18,86	421,1	375, 288			N.j. (cianidino darinys)	Antocianinai
4	19,5	41,05	20,19	419,4	287			Cianidin-3-arabinozidas, cianidin-3-ksilozidas	Antocianinai
5	19,5	43,50	20,22	419,2	287, 259			Cianidin-3-arabinozidas, cianidin-3-ksilozidas	Antocianinai
6	20,8	59,90	21,80	453,5	301, 139			N.j.	
7	23,4	41,00	24,08	419,3	287			Cianidin-3-arabinozidas, cianidin-3-ksilozidas	Antocianinai
8	23,4	41,95	24,10	419,3	287			Cianidin-3-arabinozidas, cianidin-3-ksilozidas	Antocianinai
9	23,4	46,40	24,17	291,3	273, 165, 151, 139, 123	289,8	246, 206, 126	Epikatechinas	Flavonoidai
10	27,3	41,05	27,99	419,2	287			Cianidin-3-arabinozidas, cianidin-3-ksilozidas	Antocianinai
11	29,9	50,25	30,73			305,1	286, 259, 193, 167	Epigalokatechinas	Flavonoidai
12	32,5	44,65	33,25	439,5	393, 247, 203, 191, 135			N.j.	
13	36,4	42,05	37,10	419,2	287			Cianidin-3-arabinozidas, cianidin-3-ksilozidas	Antocianinai
14	37,7	39,35	38,36	449,3	287			Cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-galaktozidas	Antocianinai
15	37,7	44,25	38,43	449,2	287			Cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-galaktozidas	Antocianinai
16	39,0	51,15	39,85			550,3	503, 443, 383, 333, 259	N.j.	
17	39,0	58,45	39,98	577,3	559, 449, 425, 287			Procianidino dimeras	Proantocianidinai
18	41,3	49,60	42,13	479,4	419, 331, 299, 193			N.j.	
19	42,9	39,50	43,56	449,3	287			Cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-galaktozidas	Antocianinai
20	42,9	40,85	43,58	449,3	287			Cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-galaktozidas	Antocianinai
21	42,9	52,65	43,78	435,2	415, 367, 303, 285			Delfinidin-3-arabinozidas	Antocianinai
22	42,9	55,05	43,82			591,5	531, 465, 439, 303, 215	Prodelfinidino dimeras	Proantocianidinai
23	44,2	46,80	44,98			433,2	411, 385, 311, 301, 271	Kvercicino pentozidas	Flavonoidai

Smailės Nr.	t _r ¹ D, min	t _r ² D, s	Bendras t _r , min	Teigiama jonizacija		Neigiama jonizacija		Siūlomas identifikavimas	Fenolinių junginių klasė ar poklasis
				[M] ⁺ /[M+H] ⁺	Pagrindiniai MS/MS fragmentai	[M-H] ⁻	Pagrindiniai MS/MS fragmentai		
24	44,2	58,30	45,17	591,5	573, 465, 477, 438, 419, 287			N.j. (proantocianidino darinys)	Proantocianidinai
25	45,5	43,50	46,23	421,2	401, 383, 287			N.j. (cianidino darinys)	Antocianinai
26	45,5	44,50	46,24	450,4	287			Cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-galaktozidas	Antocianinai
27	46,8	47,15	47,59	577,4	409, 289	575,6	467, 449, 424, 330, 288	Procianidino dimeras	Proantocianidinai
28	46,8	50,65	47,65	465,2	303	463,8	301	Kvercetin-3-O-glikozidas arba kvercetin-3-O-galaktozidas	Flavonoidai
29	46,8	55,70	47,73	465,0	303	463,7	301	Kvercetin-3-O-glikozidas arba kvercetin-3-O-galaktozidas	Flavonoidai
30	48,1	39,20	48,75	451,7	287			N.j. (cianidino darinys)	Antocianinai
31	48,1	44,65	48,85	577,9	428	575,4	449, 423, 405, 287, 243	Procianidino dimeras	Proantocianidinai
32	48,1	54,10	49,00			593,5	523, 466, 423, 305, 245	Prodelfinidino dimeras	Proantocianidinai
33	49,4	40,50	50,08			835,5	773, 703, 581, 417, 284	N.j.	
34	49,4	45,50	50,16			593,7	575, 449, 421, 289, 247	Prodelfinidino dimeras	Proantocianidinai
35	49,4	49,35	50,22	735,4	573			N.j.	
36	50,7	43,45	51,43			476,4	431, 315, 271	N.j.	
37	50,7	51,50	51,56	625,5	479, 463, 317			Petunidin-p-coumaroyl gliukozidas (<i>neišversta junginio dalis</i>)	Antocianinai
38	50,7	56,75	51,65	404,8	209, 120			N.j.	
39	52,0	37,70	52,62			865,7	733, 447, 417, 285	Procianidino trimeras	Proantocianidinai
40	52,0	39,90	52,67			865,3	703, 573, 447, 417, 285	Procianidino trimeras	Proantocianidinai
41	52,0	43,00	52,72	355,7	163	708,5	353	Chlorogeno rūgštis	Fenolinė rūgštis
42	53,3	43,00	54,02			865,8	733, 703, 576, 447, 417, 285	Procianidino trimeras	Proantocianidinai
43	54,6	36,85	55,22			515,6	498, 425, 353	Dikafeoil-chino rūgštis	Fenolinė rūgštis
44	54,6	48,90	55,41	611,4	479, 465, 449, 317, 303	609,4	533, 464, 362, 346, 302	Kvercetin-3-O-rutinozidas, kvercetin-3-O-ramnozil-galaktozidas	Flavonoidai
45	55,9	43,75	56,63	751,4	589, 453			Epikatechin-peonidin-3-O-gliukozidas	Antocianinai
46	55,9	46,70	56,68	611,8	465, 449, 303	609,8		Kvercetin-3-O-rutinozidas, kvercetin-3-O-ramnozil-galaktozidas	Flavonoidai

Smailės Nr.	t _r ¹ D, min	t _r ² D, s	Bendras t _r , min	Teigiama jonizacija		Neigiama jonizacija		Siūlomas identifikavimas	Fenolinių junginių klasė ar poklasis
				[M] ⁺ /[M+H] ⁺	Pagrindiniai MS/MS fragmentai	[M-H] ⁻	Pagrindiniai MS/MS fragmentai		
47	55,9	54,20	56,80	611,2	465, 449, 303			Kvercetin-3-O-rutinozidas, kvercetin-3-O-ramnozil- galaktozidas	Flavonoidai
48	58,5	39,40	59,16			356,8	193, 181, 137	N.j.	
49	58,5	46,35	59,27	619,5	487, 317			N.j.	
50	58,5	47,80	59,30	597,1	465, 435, 303			Kvercetin-3-O-vakcininas	Flavonoidai
51	59,8	37,55	60,43	897,4	735	895,8	733, 447, 284	N.j. (cianidino heksozido darinys)	Antocianinai
52	62,4	44,15	63,14			595,4	577, 505, 475, 385, 355, 301	N.j. (proantocianidino darinys)	Proantocianidinai
53	62,4	52,35	63,27	465,3	289			Eriodiktolio-7-O-gliukuronidas	Flavanonai
54	65,0	37,10	65,62	452,1	365, 288			Eriodiktolio heksozidas	Flavanonai
55	65,0	47,90	65,80	579,9*	848, 803, 735, 451, 427, 289, 247, 179			Procianidino tetrameras	Proantocianidinai
56	67,6	37,80	68,23	482,8	463, 397, 305, 287, 153			N.j.	
57	67,6	42,00	68,30	452,0	288			N.j. (cianidino darinys)	Antocianinai
58	67,6	48,35	68,41	406,5	389, 319, 183, 139			N.j.	
59	68,9	43,30	69,62			1053,8	975, 957, 903, 861, 843, 801, 783, 687, 423	N.j.	
60	68,9	48,30	69,71			1035,6	975, 903, 861, 843, 729, 687	N.j.	
61	71,5	42,70	72,21			862,9**	1438, 1287, 1103, 801, 730, 669, 575	Procianidino heksameras	Proantocianidinai

N.j., neidentifikuotas; *, [M+2H]²⁺; **, [M-2H]²⁻

3.2. ĮVAIRIŲ ELEUTEROKOKO RŪŠIŲ LAPŲ BIORAFINAVIMO IR FRAKCIJŲ TYRIMŲ REZULTATAI IR APITARIMAS

3.2.1. Frakcijų kintamųjų nustatymas

Frakcijų išeiga

Įvairių eleuterokoko rūšių lapų biorafinavimui į funkcionaliuosius ingredientus buvo taikyti tradiciniai ekstrakcijos metodai – *Soksleto* aparate ir purtant (maceracija). Frakcijos išskirtos didėjančio poliškumo tirpikliais – heksanu, acetonu, EVM (70/30, v/v). Pirmiausia siekiant iš lapų išekstrahuoti lipofilinę frakciją, ekstrakcija buvo pradedama nepoliniu tirpikliu – heksanu. Toliau fenolinių junginių frakcijos išekstrahavimui buvo naudojamas acetonas ir EVM (70/30, v/v).

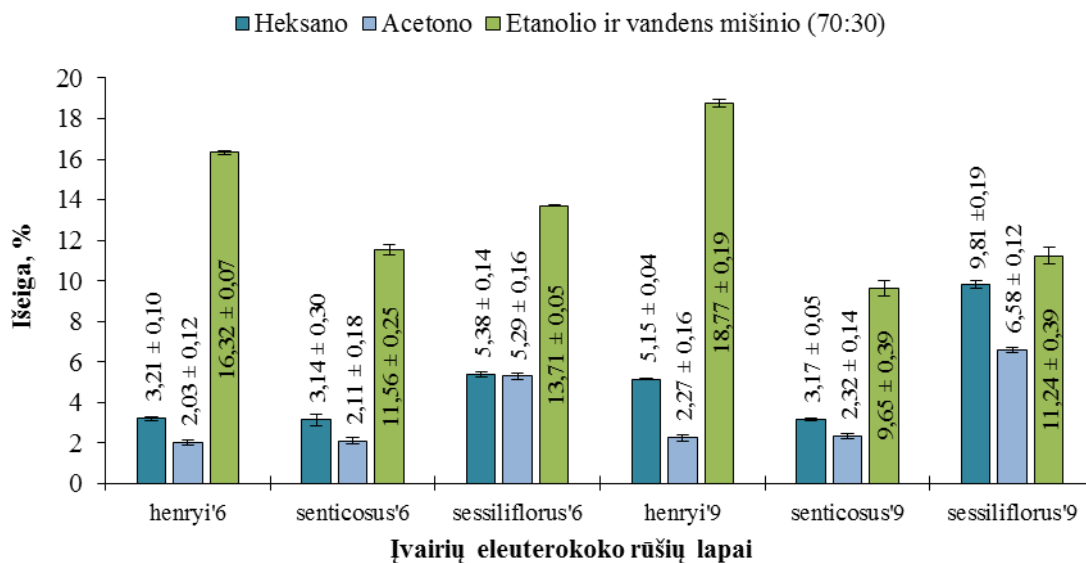
Nustatyta, jog didžiausios funkcionaliųjų ingredientų frakcijų išeigos buvo išekstrahuotos etanolio ir vandens mišiniu (70:30) purtant. Kadangi ekstrakcijai naudotas EVM (70:30) tirpiklis pasižymi didžiausiu poliškumu – tai rodo didžiausią polinių junginių buvimą lapuose. Iš 31 pav. matyti, jog didžiausia EVM (70:30) frakcija ($18,17 \pm 0,19$ %) buvo gauta iš eluterokoko *henryi* '9 lapų, kurie buvo surinkti rugsėjo augimo stadijoje. O lyginant tos pačios frakcijos ir rūšies lapus (*henryi* '6), matome, jog jų surinkimas birželio augimo stadijoje davė mažesnę išeigą ($16,32 \pm 0,07$ %). Tai daro prielaidą, jog eluterokoko *henryi* lapai geba sukaupti daugiau polinių junginių vėlyvesnėje augimo stadijoje. Bet būtina pabrėžti, jog ši prielaida nėra tinkama apibūdinti kitų dviejų eleuterokoko rūšių lapų gebėjimą sukaupti daugiau polinių junginių toje pačioje augimo stadijoje, anaiptol, eleuterokoko *senticosus* ir *sessiliflorus* lapų EVM (70:30) frakcijų išeigos yra didesnės ankstesnėje (birželio mėn.) augimo stadijoje.

Lipofilnės frakcijos, kuri buvo išekstrahuota nepoliniu tirpikliu – heksanu, išeiga buvo didžiausia ($9,81 \pm 0,19$ %) eluterokoko *sessiliflorus* '9 lapuose. Lyginant tos pačios frakcijos ir rūšies lapus (*sessiliflorus* '6) matome, jog jų surinkimas birželio mėnesio augimo stadijoje davė beveik perpus mažesnę išeigą ($5,38 \pm 0,14$ %).

Didžiausia acetono frakcijos išeiga ($6,58 \pm 0,12$ %) buvo gauta iš eluterokoko *sessiliflorus* '9 lapų, o mažiausia šios frakcijos išeiga ($2,03 \pm 0,12$ %) buvo gauta iš eleuterokoko *henryi* '6 lapų. Be to, norint įvertinti lapų surinkimo stadijos efektyvumą acetono frakcijų išeigoms, matome, jog palankiau surinkti lapus rugsėjo mėnesyje, nors žymus skirtumas nebuvo nustatytas (žr. 31 pav.)

Remiantis aukščiau išvardintu frakcijų išeigų rezultatų apatarimu ir 00 pav. galime bendrai įvertinti, jog šių lapų rugsėjo mėnesio surinkimo stadija yra šiek tiek efektyvesnė, kad gauti didesnę frakcijų išeigą biorafinuojant į funkcionaliuosius ingredientus. Be to, efektyviausias

įvairių rūšių eleuterokoko lapų biorafinavimo proceso tirpiklis yra EVM (70/30, v/v), kuris pasižymėjo didžiausiu poliškumu iš šiuose tyrimuose naudotų tirpiklių.



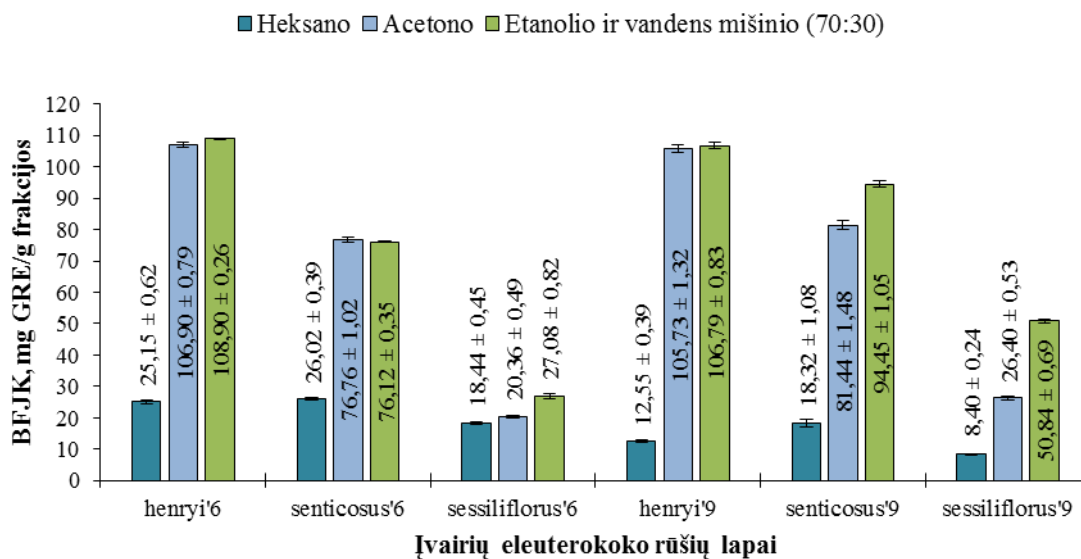
31 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų pakopinės ekstrakcijos didėjančio poliškumo tirpikliais išeigos rezultatai.

Frakcijų BFJK

Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų BFJK buvo nustatytas *Folin* ir *Ciocalteu* metodu. Iš 32 pav. matyti, jog didžiausias įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų BFJK buvo nustatytas, kai išekstrahuota acetono ir EVW (70/30, v/v) tirpikliais. Buvo tikėtina, jog šių tirpiklių frakcijos pasižymėjo aukščiausiu BFJK, negu heksano, kadangi šie du tirpikliai pasižymi gebėjimu išekstrahuoti polinius junginius, kurie ir yra fenoliniai junginiai.

Nustatyta, jog didžiausias frakcijos BFJK ($108,90 \pm 0,26$ mg GRE/g frakcijos) buvo ekstrahuojant EVM (70/30, v/v) tirpikliu eleuterokoko *henryi*'6 lapus ir šie lapai surinkti birželio augimo stadijoje. Bet, atlikus šios frakcijos BFJK palyginimą nebuvo pastebėtas žymus skirtumas surenkant tos pačios rūšies lapus rugsėjo augimo stadijoje. Taip pat įvertinimo, atsižvelgiant į lapų surinkimą, nebuvo galima daryti iš eleuterokoko *henryi* acetono frakcijos, kadangi BFJK skirtumas sudarė vos 1,17 mg GRE/g frakcijos skirtumą. Didžiausias BFJK acetono frakcijoje buvo nustatytas ekstrahuojant eleuterokoko *henryi*'6 lapus, kurių surinkimas yra birželio augimo stadijoje. Išties, BFJK kiek didesnis skirtumas tarp surinkimo dvejose augimo stadijose buvo pastebėtas eleuterokoko *sessiliflorus* lapų ekstrahuojant EVM (70/30, v/v) – surinktų birželį šių lapų BFJK buvo nustatytas $27,08 \pm 0,82$ mg GRE/g frakcijos, o rugsėjį – beveik dvigubai ($50,84 \pm 0,69$ mg GRE/g frakcijos).

Mažiausias frakcijos BFJK ($8,40 \pm 0,24$ mg GRE/g frakcijos) buvo nustatytas, kai eleuterokoko *sessiliflorus* '9 lapai ekstrahuoti heksano tirpikliu. O didžiausias BFJK ($26,02 \pm 0,39$ mg GRE/g frakcijos) šio tirpiklio frakcijoje gautas ekstrahuojant eleuterokoko *senticosus* '6 lapus.



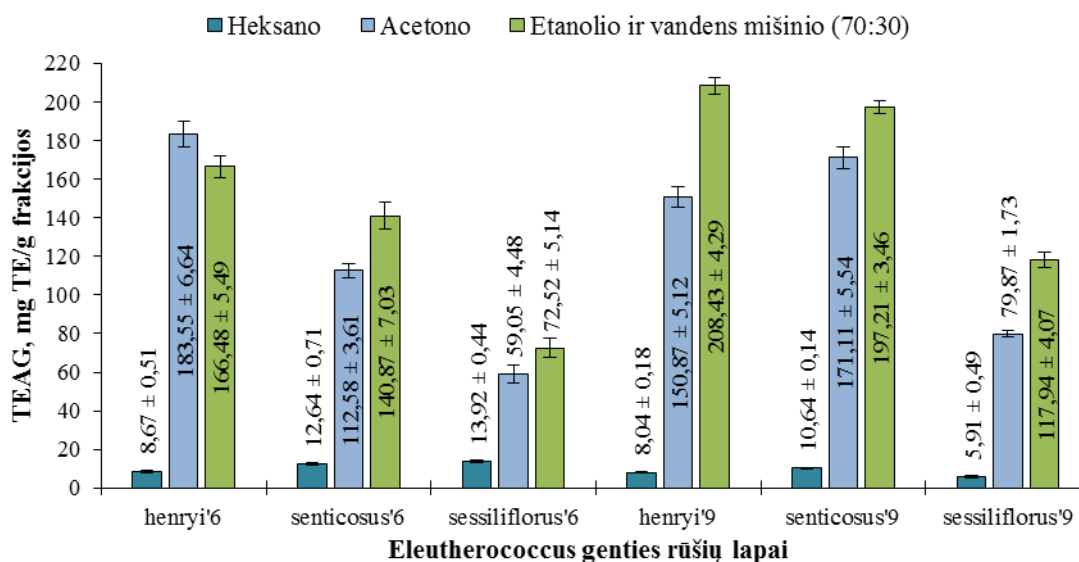
32 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų BFJK rezultatai.

Antioksidacinis aktyvumas: TEAG

Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų antioksidacinis aktyvumas TEAG buvo nustatytas ABTS⁺ radikalo katijono sujungimo metodu.

Iš 33 pav. matyti, jog šių lapų rūšių ekstrakcija heksano tirpikliu pasižymėjo mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu, varijavo nuo $5,9 \pm 0,49$ iki $12,64 \pm 0,71$ mg TE/g frakcijos, ir tai rodo, jog šiuose eleuterokoko lapuose lipofiliškų antioksidantų beveik nėra. Didžiausia nustatyta TEAG heksano frakcijoje buvo ekstrahuojant eleuterokoko *senticosus* '6 lapus, kurie surinkti birželio augimo stadijoje. Įvertinus acetono frakcijos TEAG, matome, jog eleuterokoko *henryi* '6 lapai, kurie surinkti birželio augimo stadijoje, pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu – $183,55 \pm 6,64$ mg TE/g frakcijos. O mažiausia ($59,05 \pm 4,48$ mg TE/g frakcijos) acetono frakcijos TEAG buvo eleuterokoko *sessiliflorus* '6, kurie surinkti birželio augimo stadijoje. Daryti objektyvių išvadų dėl surinkimo dvejose augimo stadijoje negalime, kai analizuojame TEAG šių lapų heksano ir acetono frakcijoje, bet iš 33 pav. matyti, jog akivaizdus TEAG skirtumas yra EVM (70/30, v/v) frakcijose. Galime daryti prielaidą, kad išekstrahavus šiuos lapus EVM (70/30, v/v) tirpikliu bus gautas didžiausias antioksidacinis aktyvumas (TEAG), kai lapai bus surinkti rugpjūčio augimo stadijoje. Bet šie TEAG rezultatai tik iš dalies koreliuoja su nustatytu antioksidaciniu aktyvumu DPPH[•] radikalo sujungimo metodu. Didžiausia ($208,43 \pm 4,29$ mg TE/g frakcijos) EVM (70/30, v/v) frakcijoje TEAG buvo nustatyta, kai išekstrahuoti eleuterokoko

henryi '9 lapai, kurie buvo surinkti rugpjūčio augimo stadijoje. O mažiausia ($72,52 \pm 5,14$ mg TE/g frakcijos) EVM (70/30, v/v) frakcijoje TEAG buvo nustatyta, kai išekstrahuoti eleuterokoko *sessiliflorus* '6 lapai, kurie buvo surinkti birželio augimo stadijoje. Be to, šių eleuteroko lapų rūšis (*sessiliflorus*) tiek acetono, tiek EVM (70/30, v/v) frakcijose pasižymėjo mažiausiu TEAG iš visų lapų rūšių.



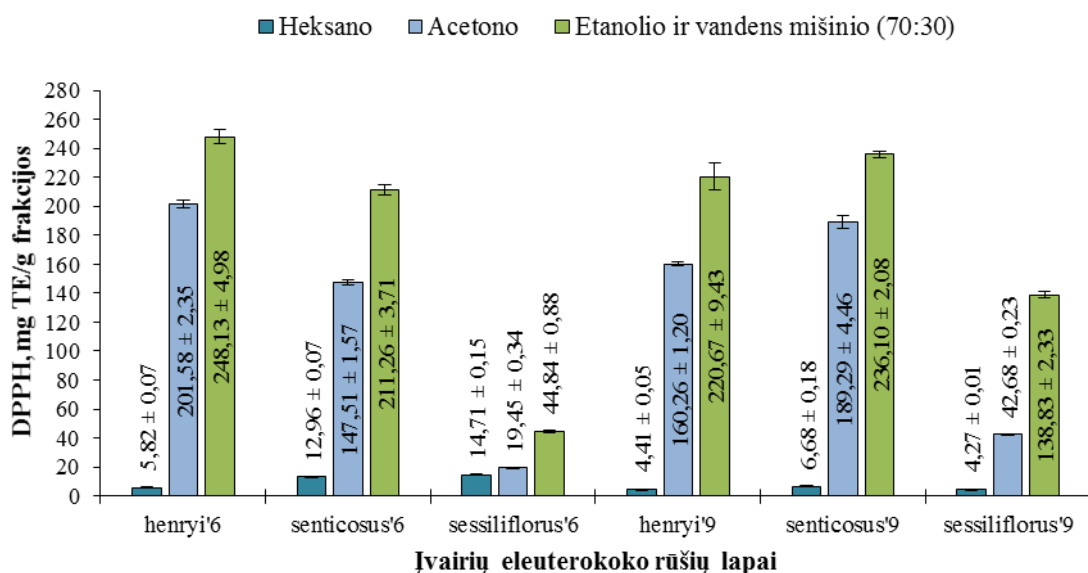
33 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų TEAG rezultatai.

Antioksidacinis aktyvumas DPPH

Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas DPPH• radikalo sujungimo metodu. Nustatyti įvairių eleuterokoko lapų heksano frakcijų antioksidacinio aktyvumo rezultatai šiuo metodu koreliuoja su prieš tai aprašytais TEAG rezultatais. Galime patvirtinti, jog šiuose lapuose lipofiliškų antioksidantų beveik nėra, nes šiuo metodu nustatyto antioksidacinio aktyvumo vertės varijuoja labai mažose ribose – nuo $4,27 \pm 0,01$ iki $14,71 \pm 0,15$ mg TE g/ frakcijos. Didžiausia ($14,71 \pm 0,15$ mg TE g/ frakcijos) heksano frakcijos antioksidacinio aktyvumo vertė buvo gauta ekstrahuojant eleuterokoko *sessiliflorus* '6 lapus, kurie surinkti birželio augimo stadijoje. Kadangi šių lapų heksano frakcija pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu ir rezultatai yra koreliuojantys su TEAG, galime daryti prielaidą, jog eleuteroko *sessiliflorus* lapai surinkti birželio augimo stadijoje, turi didžiausią lipofiliškų antioksidantų aktyvumą.

Iš 34 pav. matyti, jog įvairių eleuterokoko lapų acetono frakcijos antioksidacinis aktyvumas varijuoja nuo $19,45 \pm 0,34$ iki $248,13 \pm 4,98$ mg TE/g frakcijos. Didžiausias ($248,13 \pm 4,98$ mg TE/g frakcijos) antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas EVM (70/30, v/v) frakcijos eleuterokoko *henryi* '6 lapuose, kurie surinkti birželio augimo stadijoje. Taip pat aukštu antioksidaciniu

aktyvumu pasižymėjo kiti šio tirpiklio frakcijų eleuterokoko rūšių lapai – *senticosus* '9 ($236,10 \pm 2,08$ mg TE/g frakcijos), *henryi* '9 ($220,67 \pm 9,43$ mg TE/g frakcijos) ir *senticosus* '6 ($211,26 \pm 3,71$ mg TE/g frakcijos). Atsižvelgiant į EVM (70/30, v/v) frakcijų antioksidacinio aktyvumo rezultatus sąlyginai galime patvirtinti, jog lapų birželio surinkimo stadija davė didesnį antioksidacinį aktyvumą, kadangi *henryi* '6 lapų frakcija pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, nei *henryi* '9.



34 pav. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų DPPH rezultatai.

3.2.2. Atrinktų lapų frakcijų preliminarinė sudėties analizė

Įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų kokybinė sudėties analizė buvo atlikta ultra efektyviosios skysčių chromatografijos su diodų matricų detektoriumi ir hibridiniu masės spektrometru (kvadrupolio ir skriejimo trukmės) metodu. 8 lentelėje yra pateiktos frakcijos, kurios buvo panaudotos kokybinei sudėties analizei. Nebuvo pasirinkta analizuoti heksano frakcijų, kadangi šių frakcijų antioksidacinis aktyvumas buvo labai mažas. Šios kokybinės sudėties analizės chromatogramos pagal junginių sulaikymo laiką pateikiamos projekto prieduose (3 priedas).

8 lentelė. Atrinktos įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijos sudėties analizei.

Frakcija		Rūšių lapai	Išėiga, %	BFJK, mg GRE/g frakcijos	ABTS, mg TE/g frakcijos	DPPH, mg TE/g frakcijos
Nr.	Tirpiklis					
1.	Acetonas	<i>senticosus</i> '9	$2,32 \pm 0,14$	$81,44 \pm 1,48$	$171,11 \pm 5,54$	$189,29 \pm 4,46$
2.		<i>henryi</i> '6	$2,03 \pm 0,12$	$106,90 \pm 0,79$	$183,55 \pm 6,64$	$201,58 \pm 2,35$
3.	EVM (70/30, v/v)	<i>senticosus</i> '9	$9,65 \pm 0,39$	$94,45 \pm 1,05$	$197,21 \pm 3,46$	$236,10 \pm 2,08$
4.		<i>sessiliflorus</i> '9	$11,24 \pm 0,39$	$50,84 \pm 0,69$	$117,94 \pm 4,07$	$138,83 \pm 2,33$
5.		<i>henryi</i> '6	$16,32 \pm 0,07$	$108,90 \pm 0,26$	$166,48 \pm 5,49$	$248,13 \pm 4,98$
6.		<i>sessiliflorus</i> '6	$13,71 \pm 0,05$	$27,08 \pm 0,82$	$72,52 \pm 5,14$	$44,84 \pm 0,88$

9 lentelėje yra pateikti preliminariai identifikuoti junginiai atrinktose įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijose. Junginio **1** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 191,0564 atitiko molekulinę formulę $C_7H_{11}O_6$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip chino rūgštis ir aptikta visose sudėties analizei atrinktose frakcijose. Junginio **2** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 335,0771 atitiko molekulinę formulę $C_{16}H_{15}O_8$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip 5-kafeoil-šikimo rūgštis. Ši rūgštis buvo aptikta frakcijose Nr. 1, 2 ir 3. Junginio **3** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 353,0878 atitiko molekulinę formulę $C_{16}H_{17}O_9$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip chlorogeno rūgštis ir aptikta visose sudėties analizei atrinktose frakcijose. Junginio **4** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 447,0933 atitiko molekulinę formulę $C_{21}H_{19}O_{11}$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip kvercitrinas ir aptiktas frakcijoje Nr. 1 ir 3. Junginio **5** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 463,0881 atitiko molekulinę formulę $C_{21}H_{19}O_{12}$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip kvercetino-3-gliukozidas ir aptiktas visose sudėties analizei atrinktose frakcijose, išskyrus Nr. 5. Junginio **6** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 477,0673 atitiko molekulinę formulę $C_{21}H_{17}O_{13}$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip kvercetino-3-gliukoronidas. Šis junginys buvo aptiktas frakcijose Nr. 4 ir 6. Junginio **7** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 515,1192 atitiko molekulinę formulę $C_{25}H_{23}O_{12}$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip 1,5-dikafeoil-chino rūgštis ir aptikta visose sudėties analizei atrinktose frakcijose. Junginio **8** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 593,1511 atitiko molekulinę formulę $C_{27}H_{29}O_{15}$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip kemferolio-3-rutinozidas. Šis junginys buvo aptiktas eleuterokoko *henryi* '6 acetono ir EVM (70/30, v/v) frakcijose. Junginio **9** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 609,1461 atitiko molekulinę formulę $C_{27}H_{29}O_{16}$, todėl buvo preliminariai identifikuotas kaip rutinas frakcijose Nr. 1, 2, 3 ir 5. Junginio **10** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 955,4901 atitiko molekulinę formulę $C_{48}H_{74}O_{19}$ ir preliminariai identifikuotas kaip ginsenozidas *Ro*. Šis junginys yra pagrindinė ženšenio veiklioji medžiaga ir buvo aptikta tik vienoje iš atrinktų eleuterokoko *sessiliflorus* '6 EVM (70/30, v/v) frakcijų.

9 lentelė. Preliminariai identifikuoti junginiai atrinktose įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijose.

Nr.	Junginio pavadinimas	Formulė $[M-H]^-$	MS $[M-H]^-$, m/z	Frakcijos Nr.
1.	Chino rūgštis	$C_7H_{11}O_6$	191,0564	1, 2, 3, 4, 5, 6
2.	5-kafeoil-šikimo rūgštis	$C_{16}H_{15}O_8$	335,0771	1, 2, 3
3.	Chlorogeno rūgštis	$C_{16}H_{17}O_9$	353,0878	1, 2, 3, 4, 5, 6
4.	Kvercitrinas	$C_{21}H_{19}O_{11}$	447,0933	1, 3
5.	Kvercetino-3-gliukozidas	$C_{21}H_{19}O_{12}$	463,0881	1, 2, 3, 4, 6
6.	Kvercetino-3-gliukoronidas	$C_{21}H_{17}O_{13}$	477,0673	4, 6
7.	1,5-dikafeoil-chino rūgštis	$C_{25}H_{23}O_{12}$	515,1192	1, 2, 3, 4, 5, 6
8.	Kemferolio-3-rutinozidas	$C_{27}H_{29}O_{15}$	593,1511	2, 5
9.	Rutinas	$C_{27}H_{29}O_{16}$	609,1461	1, 2, 3, 5
10.	Ginsenozidas <i>Ro</i>	$C_{48}H_{74}O_{19}$	955,4901	4

IŠVADOS

1. Biorafinuoiant juodavaisės aronijos uogų išspaudas į funkcionaliuosius ingredientus buvo taikyti aukšto slėgio ekstrakcijos metodai. Taikant ekstrakciją superkritiniais skysčiais naudojant anglies dioksidą iš išspaudų pašalinta 3 % lipofilinė frakcija. O ekstrakcijos tirpikliais padidintame slėgyje išspaudų eksperimentų išeiga varijavo nuo 24,48 iki 75,66 % ir didžiausią reikšmingumą ekstrakcijos išeigai turėjo temperatūra.
2. Įvertinus juodavaisės aronijos uogų išspaudų eksperimentinių ekstraktų priklausomus kintamuosius, nustatyta, jog bendrasis fenolinių junginių kiekis varijavo nuo 86,69 iki 258,31 mg GRE/g ekstrakto, *Trolokso* ekvivalento antioksidacinė geba – nuo 1,68 iki 5,00 mmol TE/g ekstrakto ir DPPH (EC₅₀) – nuo 17,36 iki 5,06 µg/ml. Didžiausia reikšmingumą šiems priklausomiems kintamiesiems taip pat turėjo ekstrakcijos temperatūra.
3. Nustatyti optimalūs išspaudų biorafinavimo į funkcionaliuosius ingredientus parametrai taikant ekstrakciją tirpikliais padidintame slėgyje. Esant ekstrakcijos 165 °C temperatūrai, 46 % etanolui ir 1,8 % skruzdžių rūgščiai gaunamas optimalusis išspaudų ekstraktas, kuris pasižymi didžiausia ekstrakcijos išeiga – 72,53 %, bendruoju fenolinių junginių kiekiu – 236,64 mg GRE/g ekstrakto, *Trolokso* ekvivalento antioksidacine geba – 4,35 mmol TE/g ekstrakto ir DPPH (EC₅₀) – 5,92 µg/ml. Optimizavimo modelis yra tinkamas numatyti optimalias faktorių vertes.
4. Atlikus išspaudų optimaliojo ekstrakto sudėties kokybinę analizę preliminariai identifikuoti skirtingi antocianinų, proantocianidinų, flavonoidų ir fenolinių rūgščių junginiai. Iš jų, cianidino glikozidų, kvercitino darinių, eriodiktiolio gliukoronido, procianidinų smailės buvo intensyviausios.
5. Įvertinus įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijas, nustatyta, jog didžiausia išeiga (18,77 %), bendruoju fenolinių junginių kiekiu (108,90mg GRE/g frakcijos), antioksidaciniu aktyvumu – *Trolokso* ekvivalento antioksidacine geba (208,43 mg TE/g frakcijos), DPPH (248,13 mg TE/g frakcijos) pasižymėjo etanolio ir vandens mišinio (70/30, v/v) frakcijos *henryi* rūšies lapai. Šios frakcijos tirpiklis taip pat buvo reikšmingiausias faktorius vykdant kitų rūšių lapų ekstrakciją.
6. Žemas įvairių eleuterokoko rūšių lapų heksano frakcijos antioksidacinis aktyvumas parodė, jog lipofiliškų antioksidantų šiuose lapuose beveik nėra. Įvertinus lapų surinkimą dvejose skirtingose augimo stadijose nepastebėti dideli skirtumai, išskyrus antioksidacinį aktyvumą, kuris buvo sąlyginai didesnis rinktų lapų rugsėjį.
7. Atlikus atrinktų įvairių eleuterokoko rūšių lapų frakcijų kokybinę analizę preliminariai identifikuotos fenolinės rūgštys (chino, chlorogeno), flavonoidai (kvercetrinas, kvercitino gliukozidas, rutinas ir kt.), taip pat saponinas (ginsenozidas *Ro*).

BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS

1. FAO. Global food losses and food waste – extent, causes and prevention. [interaktyvus]. 2011 [žiūrėta 2016-04-02].
Prieiga per internetą: <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e.pdf>
2. EUROPEAN COMMISSION. Preparatory study on food waste across EU 27. [interaktyvus]. 2010 [žiūrėta 2016-04-02]. ISBN : 978-92-79-22138-5. Prieiga per: doi: 10.2779/85947
3. SAN MARTIN, D., S. RAMOS, and J. ZUFÍA. Valorisation of food waste to produce new raw materials for animal feed. *Food Chemistry*. 2016, 198, 68–74.
4. RAVINDRAN, R., and A.K. JAISWAL. Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*. 2016, 34(1), 58–69.
5. SÓJKA, M., K. KOŁODZIEJCZYK, and J. MILALA. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*. 2013, 51, 77–86.
6. D’ALESSANDRO, L.G., K. DIMITROV, P. VAUCHEL, and I. NIKOV. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*. 2014, 92(10), 1818–1826.
7. RAMICA, M., S. VIDOVIĆ, Z. ZEKOVIC, J. VLADIC, A. CVEJIN, and B. PAVLIC. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015, 23, 360–368.
8. OSZMIANSKI, J., and A. WOJDYLO. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 2005, 221, 809–813.
9. SLIMESTADA, R., K. TORSKANGERPOLL, H. S. NATELAND, T. JOHANNESSEN, and N. H. GISKED. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *Food Composition and Analysis*. 2005, 18, 61–68.
10. SCOTT, R. W., and R. M. SKIRVIN. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Michx.): a semi-edible fruit with no pests. American Pomological Society. 2007, 61(3), 135–137.
11. SÓJKA, M., K. KOŁODZIEJCZYK, and J. MILALA. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*. 2013, 51, 77–86.
12. HUANG, L., H. ZHAO, B. HUANG, C. ZHENG, W. PENG, and L. QIN. *Acanthopanax senticosus*: review of botany, chemistry and pharmacology. *Pharmazie*. 2011, 66, 83–97.

13. AROUCA, A., and M. G. GRASSI-KASSISSE. Eleutherococcus senticosus: studies and effects. *Health*. 2013, 5, 1509–1515.
14. KULLING, S.E., and H.M. RAWEL. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*. 2008, 74, 1625–1634.
15. GRUNOVAITĖ, L., M. PUKALSKIENĖ, A. PUKALSKAS, and P.R. VENSKUTONIS. Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *Functional Foods*. 2016, 24, 85–96.
16. BENVENUTI, S., F. PELLATI, M. MELEGARI, and D. BERTELLI. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Food Science*. 204, 69(3), 164–169.
17. SKUPIEŃ, K., and J. OSZMIANŃSKI. The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit. *Agricultural and Food Science*. 2007, 16(1), 46–45.
18. NOWAK, D., M. GOŚLIŃSKI, and E. WOJTOWICZ. Comparative analysis of the antioxidant capacity of selected fruit juices and nectars: chokeberry juice as a rich source of polyphenols. *International Journal of Food Properties*. 2016, 19(6), 1317–1324.
19. BRIDLE, P., and C.F. TIMBERLAKE. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. *Food Chemistry*. 1997, 58, 103–109.
20. DENEV, P.N., C.G. KRATCHANOV, M. CIZ, A. LOJEK, and M.G. KRATCHANOVA. Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: *in vitro* and *in vivo* evidences and possible mechanisms of action: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012, 11(5), 471–489.
21. TANAKA, T., and A. TANAKA. Chemical components and characteristics of black chokeberry. *Japanese Society for Food Science and Technology*. 2001, 48, 606–610.
22. WAWER, I., M. WOLNIAK, and K. PARADOWSKA. Solid state NMR study of dietary fiber powders from *Aronia*, bilberry, black currant and apple. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 2006, 30, 106–113.
23. MCKAY, S.A. Demand increasing for *Aronia* and elderberry in North America. [interaktyvus]. [žiūrėta 2016-04-08].
Prieiga per internetą: <http://www.fruit.cornell.edu/berry/production/pdfs/aroniaelderberry.pdf>
24. WU, X., L. GU, R. L. PRIOR, S. MCKAY. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(26), 7846–7856.

25. KRAUJALYTĖ, V., E. LEITNER, and P. R., VENSKUTONIS. Characterization of *Aronia melanocarpa* volatiles by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), simultaneous distillation/extraction (SDE), and gas chromatography-olfactometry (GC-O) methods. *Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(20), 4728–4736.
26. D’ALESSANDRO, L. G., K. KRIAA, I. NIKOV, and K. DIMITROV. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*. 2012, 93, 42–47.
27. ČUJIĆ, N., K. ŠAVIKIN, T. JANKOVIĆ, D. PLJEVLJAKUŠIĆ, G. ZDUNIĆ, and S. IBRIĆ, Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*. 2016, 194, 135–142.
28. SIMIĆ, V. M., K. M. RAJKOVIĆ, S. S. STOJIČEVIĆ, D. T. VELIČKOVIĆ, N. Č. NIKOLIĆ, M. L. LAZIĆ, and I. T. KARABEGOVIĆ, Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Separation and Purification Technology*. 2016, 160, 89–97.
29. THI, N. D., and E. S. HWANG. Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant activities of black chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *Food Science and Biotechnology*. 2016, 25, 55–61.
30. WAWER, I., M. WOLNIAK, and K. PARADOWSKA. Solid state NMR study of dietary fiber powders from *Aronia*, bilberry, black currant and apple. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 2006, 30, 106–113
31. KOKOTKIEWICZ, A., Z. JAREMICZ, and M. LUCZKIEWICZ. *Aronia* plants: a review of traditional use, biological activities and perspectives for modern medicine. *Medicinal Food*. 2010, 13(2), 255–269.
32. BACZEK, K. Diversity of *Eleutherococcus* genus in respect of biologically active compounds accumulation. *Herba Polonica*. 2014, 60(3), 34–43.
33. DAVYDOV, M., and A. D. KRIKORIAN. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (*Araliaceae*) as an adaptogen: a closer look. *Ethnopharmacology*. 2000, 72, 345–393.
34. ZALUSKI, D., and Z. JANECKO. Variation in phytochemicals and bioactivity of the fruits of *Eleutherococcus* species cultivated in Poland. *Natural Product Research*. 2015, 37–41.
35. HEO, S. J., H. Y. AHN, M. J. KANG, J. H. LEE, J. Y. CHA, and Y. S. CHO. Antioxidative activity and chemical characteristics of leaves, roots, stems and fruits extracts from *Acanthopanax senticosus*. *Life Sciences*. 2011, 21, 1052–1059.
36. PANOSSIAN, A., G. WIKMAN, and H. WAGNER. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine*. 1999, 6, 297–300.

37. ZHANG, X. D., X. Q. LIU, Y. H. KIM, and W. K. WHANG. Chemical constituents and their acetyl cholinesterase inhibitory and antioxidant activities from leaves of *Acanthopanax henryi*: potential complementary source against Alzheimer's disease. 2014, 37, 606–616.
38. ZALUSKI, D., H. D. SMOLARZ, and A. BOGUCKA-KOCKA. Cytotoxic activity of ethanolic extracts of *Eleutherococcus* species cultivated in Poland on HL60 leukemia cell line. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2014, 27(1), 41–45.
39. LUQUE DE CASTRO, M.D., and L. E. GARCÍA-AYUSO. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 369(1–2), 1–10.
40. LUQUE DE CASTRO, M. D., and F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: past and present panacea. *Chromatography A*, 2010, 1217(16), 2383–2389.
41. OLEJAR, K. J., B. FEDRIZZI, and P. A. KILMARTIN. Influence of harvesting technique and maceration process on aroma and phenolic attributes of *Sauvignon blanc* wine. *Food Chemistry*. 2015, 183, 181–189.
42. HERRERO, M., M. CASTRO-PUYANA, J.A. MENDIOLA, and E. IBÁÑEZ. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013, 43, 67–83.
43. HERRERO, M., A. D. P. SANCHEZ-CAMARGO, A. CIFUENTES, and E. IBÁÑEZ. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015, 71, 26–38.
44. BARBA, F.J., Z. ZHU, M. KOUBAA, A. S. SANT'ANA, and V. ORLIEN. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review. *Trends in Food Science and Technology*. 2016, 49, 96–109.
45. KRAUJALIS, P., P. R. VENSKUTONIS, E. IBÁÑEZ, and M. HERRERO. Optimization of rutin isolation from *Amaranthus paniculatus* leaves by high pressure extraction and fractionation techniques. *Supercritical Fluids*. 2015, 104, 234–242.
46. GILBERT-LÓPEZ, B., J.A. MENDIOLA, J. FONTECHA, L.A.M VAN DEN BROEK, L. SIJTSMA, A. CIFUENTES, M. HERRERO, and E. IBÁÑEZ. Downstream processing of *Isochrysis galbana*: a step towards microalgal biorefinery. *Green Chemistry*. 2015, 17(9), 4599–4609.
47. MACHADO, A. P. D. F., J. L. PASQUEL-REÁTEGUIA, G. F. BARBERO, and J. MARTÍNEZ. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*. 2015, 77(3), 675–683.

48. PAVLIĆA, B., S. VIDOVIĆA, J. VLADIĆA, R. RADOSAVLJEVIĆB, M. CINDRIĆB, and Z. ZEKOVI. Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products—Process optimization by response surface methodology. *Supercritical Fluids*. 2016, 116, 36–45.
49. HERRERO, M., J. A. MENDIOLA, A. CIFUENTES, and E. IBÁÑEZ. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Chromatography A*. 2010, 1217, 2495–2511.
50. HERRERO, M., A. D. P. SANCHEZ-CAMARGO, A. CIFUENTES, and E. IBÁÑEZ. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015, 71, 26–38.
51. PEREIRA, C. G., M. ANGELA, and A. MEIRLES. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Technology*. 2010, 3, 340–372.
52. THERMO SCIENTIFIC. ASE® 200 accelerated solvent extractor operator's manual. [interaktyvus]. 1999 [žiūrėta 2016-04-08]. Prieiga per internetą: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/57733-31149-04.pdf>
53. AOAC. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (15th ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington: DC, 1995.
54. QUA, Y., C. LIA, C. ZHANGA, R. ZENGB, and C. FU. Optimization of infrared–assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 148, 345–353.
55. FOLIN, O., AND V. CIOCALTEU. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Biological Chemistry*. 1927, 73, 627–650.
56. RE, R., N. PELLEGRINI, A. PROTEGGENTE, A. PANNALA, M. YANG, and C. RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, 26(9–10), 1231–1237.
57. BRAND-WILLIAMS, W., M.E. CUVELIER, and C. BERSET. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995, 28(1), 25–30.
58. LI, X., D.R STOLL, and P.W. CARR. Equation for peak capacity estimation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. 2009, 81(2), 845–850.
59. ROSELLÓ-SOTO, E., M. KOUBAA, A. MOUBARIK, R. P. LOPES, J. A. SARAIVA, N. BOUSSETTA, N. GRIMI, F. J. and BARBA. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science and Technology*. 2015, 45(2), 296–310.

60. CHEDEA, V.S., P. KEFALAS, and C. SOCACIU. Patterns of carotenoid pigments extracted from two orange peel wastes (*Valencia* and *Novel* var.). *Food Biochemistry*. 2010, 34(1), 101–110.
61. VERSPREET, J., E. DORNEZ, J. A. DELCOUR, S. J. HARRISON, and C. M. COURTIN. Purification of wheat grain fructans from wheat bran. *Cereal Science*. 2015, 65, 57–59.
62. NAVARRETE, A., M. HERRERO, A. MARTÍN, M. J. COCERO, and E. IBÁÑEZ. Valorization of solid wastes from essential oil industry. *Food Engineering*. 2011, 104, 196–201.
63. CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51(7), 1412–1421.
64. MONTERO, L., M. HERRERO, E. IBÁÑEZ, and A. CIFUENTES. Profiling of phenolic compounds from different apple varieties using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Chromatography A*. 2013, 1313, 275–283.
65. MONTERO, L., E. IBÁÑEZ, M. RUSSO, R. SANZO, L. RASTRELLI, A. L. PICCINELLI, R. CELANO, A. CIFUENTES, and M. HERRERO. Metabolite profiling of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different locations using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to diode array and tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*. 2016, 913, 145–159.
66. ATANASOVA–GORANOVA, V. K., P. I. DIMOVA, and G. T. PEVICHAROVA. Effect of food products on endogenous generation of N-nitrosamines in rats. *British Journal of Nutrition*. 1997, 335–45.
67. GASIOROWSKI, K., K. SZYBA, , B. BROKOS, B. J. KOLACZYNSKA, M. JANKOWIAK–WŁODARCZYK, and J. OSZMIANSKI. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Letters*. 1997, 119(1) 37–46.
68. TAHERI, R., A. CONOLLY, M. H. BRAND, and B. W. BOLLING, Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. *Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61, 8581–8588.

PRIEDAI

1 PRIEDAS

10 lentelė. Juodavaisės aronijos uogų išspaudų ETPS ir ekstraktų tyrimų rezultatai.

Eksperimento Nr.	Eksperimentiniai faktoriai						Ekstrakcijos išeiga, %	BFJK, mg GRE/g ekstrakto	TEAG, mmol TE/g ekstrakto	DPPH (EC ₅₀), µg/ml
	Temperatūra (T)		Etanolis (E)		Skrudžių r. (R)					
	°C	KL*	%	KL*	%	KL*				
1	50	-1	0	-1	0	-1	24,48	86,69 ± 3,34	1,68 ± 0,07	17,36 ± 0,62
2	110	0	0	-1	0	-1	36,09	183,02 ± 2,75	3,50 ± 0,07	6,95 ± 0,15
3	170	+1	0	-1	0	-1	48,94	152,14 ± 6,84	3,27 ± 0,14	8,10 ± 0,35
4	50	-1	0	-1	1	0	27,63	95,54 ± 0,75	1,86 ± 0,05	17,85 ± 0,35
5	110	0	0	-1	1	0	39,27	172,68 ± 0,46	3,75 ± 0,02	5,91 ± 0,12
6	170	+1	0	-1	1	0	62,67	199,38 ± 11,75	3,32 ± 0,21	7,48 ± 0,37
7	50	-1	0	-1	2	+1	28,40	97,18 ± 1,27	2,75 ± 0,01	11,66 ± 0,56
8	110	0	0	-1	2	+1	44,27	181,43 ± 1,04	3,44 ± 0,07	8,19 ± 0,37
9	170	+1	0	-1	2	+1	64,77	194,74 ± 4,92	3,29 ± 0,22	7,34 ± 0,08
10	50	-1	50	0	0	-1	33,24	200,29 ± 2,85	3,63 ± 0,04	7,16 ± 0,12
11	110	0	50	0	0	-1	42,00	219,19 ± 2,95	4,58 ± 0,02	5,47 ± 0,15
12	170	+1	50	0	0	-1	59,81	258,31 ± 13,34	4,52 ± 0,28	5,61 ± 0,12
13	50	-1	50	0	1	0	35,06	201,53 ± 5,40	4,03 ± 0,08	6,39 ± 0,16
14 (CT)**	110	0	50	0	1	0	49,56	254,89 ± 13,17	4,76 ± 0,14	5,50 ± 0,21
15 (CT)**	110	0	50	0	1	0	49,57	253,28 ± 19,00	4,76 ± 0,28	5,06 ± 0,15
16 (CT)**	110	0	50	0	1	0	50,59	239,98 ± 11,07	5,00 ± 0,17	5,67 ± 0,20
17	170	+1	50	0	1	0	73,49	221,99 ± 1,92	4,40 ± 0,34	5,93 ± 0,24
18	50	-1	50	0	2	+1	36,05	205,53 ± 6,10	4,19 ± 0,15	7,48 ± 0,24
19	110	0	50	0	2	+1	55,21	230,04 ± 4,84	4,65 ± 0,10	5,73 ± 0,22
20	170	+1	50	0	2	+1	75,66	227,24 ± 4,73	4,31 ± 0,25	6,62 ± 0,34
21	50	-1	100	+1	0	-1	20,82	181,96 ± 4,03	3,40 ± 0,21	6,33 ± 0,27
22	110	0	100	+1	0	-1	32,18	198,51 ± 3,09	3,45 ± 0,02	8,04 ± 0,49
23	170	+1	100	+1	0	-1	36,84	204,74 ± 3,53	3,95 ± 0,28	7,39 ± 0,31
24	50	-1	100	+1	1	0	26,35	167,84 ± 4,20	2,88 ± 0,08	6,72 ± 0,22
25	110	0	100	+1	1	0	31,79	198,15 ± 12,92	3,93 ± 0,07	7,43 ± 0,34
26	170	+1	100	+1	1	0	39,24	226,67 ± 3,06	4,35 ± 0,22	8,45 ± 0,44
27	50	-1	100	+1	2	+1	26,73	143,40 ± 2,55	2,74 ± 0,08	9,22 ± 0,21
28	110	0	100	+1	2	+1	35,03	193,55 ± 5,59	3,89 ± 0,01	7,03 ± 0,16
29	170	+1	100	+1	2	+1	40,75	227,90 ± 6,01	4,05 ± 0,20	7,65 ± 0,17

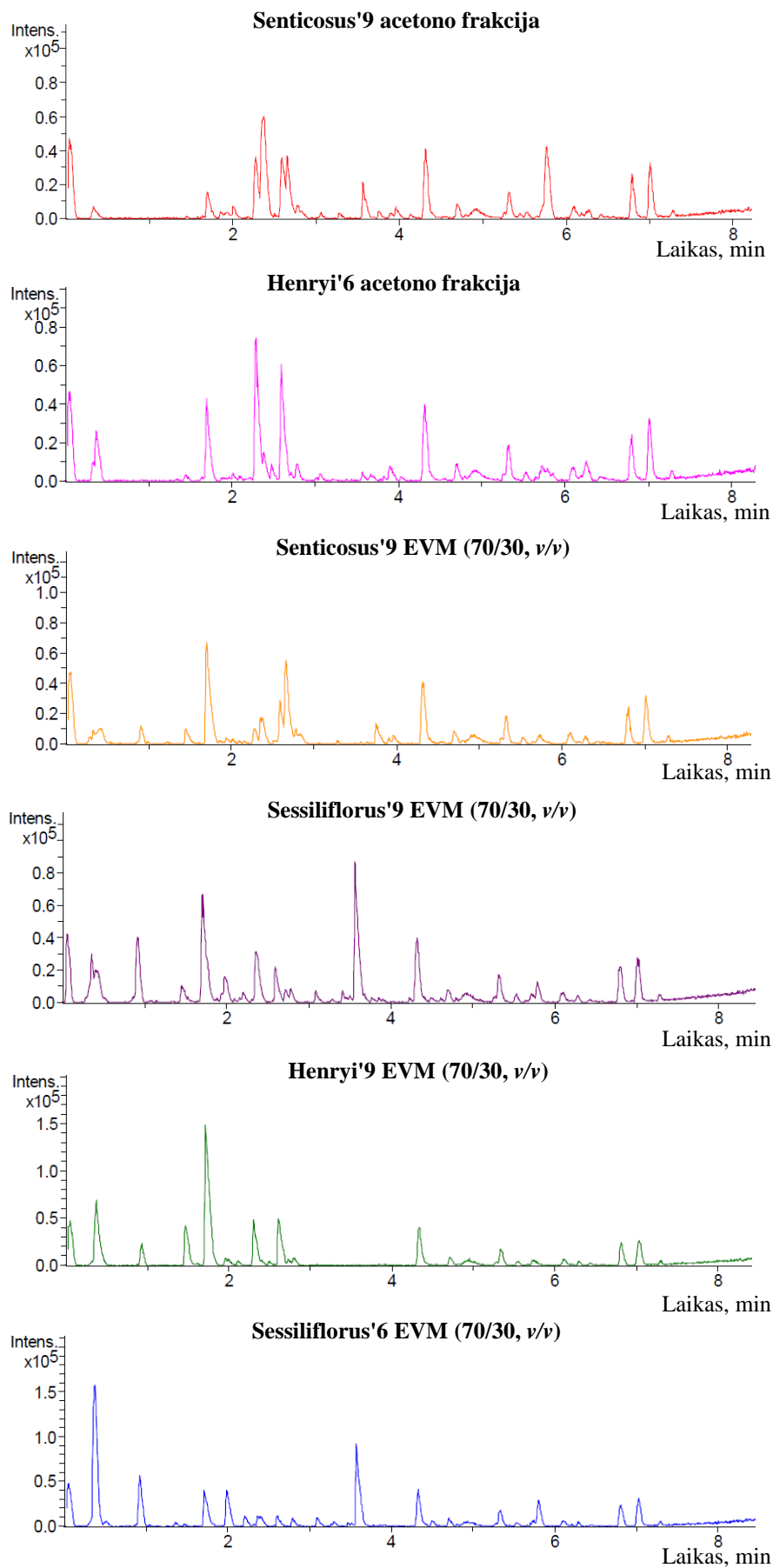
* KL – ETPS proceso eksperimentinių faktorių (kintamųjų) lygiai (žr. 3 lent.); ** (CT) – ETPS proceso eksperimentinio plano pakartojimų centriniai taškai.

2 PRIEDAS

11 lentelė. Įvairių eleuterokoko rūšių lapų ekstrakcijos tradiciniais metodais ir ekstraktų tyrimų rezultatai.

Eksperimento Nr.	Frakcija	Lapų bandinys	Išėiga, %	BFJK, mg GRE/g ekstrakto	TEAG, mg TE/ g ekstrakto	DPPH, mg TE/g ekstrakto
1	Heksano	henryi'6	3,21 ± 0,10	25,15 ± 0,62	8,67 ± 0,51	5,82 ± 0,07
2		senticosus'6	3,14 ± 0,30	26,02 ± 0,39	12,64 ± 0,71	12,96 ± 0,07
3		sessiliflorus'6	5,38 ± 0,14	18,44 ± 0,45	13,92 ± 0,44	14,71 ± 0,15
4		henryi'9	5,15 ± 0,04	12,55 ± 0,39	8,04 ± 0,18	4,41 ± 0,05
5		senticosus'9	3,17 ± 0,05	18,32 ± 1,08	10,64 ± 0,14	6,68 ± 0,18
6		sessiliflorus'9	9,81 ± 0,19	8,40 ± 0,24	5,91 ± 0,49	4,27 ± 0,01
7	Acetono	henryi'6	2,03 ± 0,12	106,90 ± 0,79	183,55 ± 6,64	201,58 ± 2,35
8		senticosus'6	2,11 ± 0,18	76,76 ± 1,02	112,58 ± 3,61	147,51 ± 1,57
9		sessiliflorus'6	5,29 ± 0,16	20,36 ± 0,49	59,05 ± 4,48	19,45 ± 0,34
10		henryi'9	2,27 ± 0,16	105,73 ± 1,32	150,87 ± 5,12	160,26 ± 1,20
11		senticosus'9	2,32 ± 0,14	81,44 ± 1,48	171,11 ± 5,54	189,29 ± 4,46
12		sessiliflorus'9	6,58 ± 0,12	26,40 ± 0,53	79,87 ± 1,73	42,68 ± 0,23
13	Etanolio ir vandens mišinio (70:30)	henryi'6	16,32 ± 0,07	108,90 ± 0,26	166,48 ± 5,49	248,13 ± 4,98
14		senticosus'6	11,56 ± 0,25	76,12 ± 0,35	140,87 ± 7,03	211,26 ± 3,71
15		sessiliflorus'6	13,71 ± 0,05	27,08 ± 0,82	72,52 ± 5,14	44,84 ± 0,88
16		henryi'9	18,77 ± 0,19	106,79 ± 0,83	208,43 ± 4,29	220,67 ± 9,43
17		senticosus'9	9,65 ± 0,39	94,45 ± 1,05	197,21 ± 3,46	236,10 ± 2,08
18		sessiliflorus'9	11,24 ± 0,39	50,84 ± 0,69	117,94 ± 4,07	138,83 ± 2,33

3 PRIEDAS



35 pav. Atrinktų įvairių eleuterokoko rūšių lapų ekstraktų UESCH-MS chromatogramos.

4 PRIEDAS

Downstream valorization and comprehensive two-dimensional liquid chromatography-based chemical characterization of bioactives from black chokeberries (*Aronia melanocarpa*) pomace

Tadas Brazdauskas¹, Lidia Montero², Petras Rimantas Venskutonis¹, Elena Ibáñez² and Miguel Herrero^{2*}

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology, Radvilenu pl. 19, LT-50254, Kaunas, Lithuania

²Foodomics Laboratory, Institute of Food Science Research (CIAL, CSIC), Nicolás Cabrera 9, 28049 - Madrid, Spain

ABSTRACT

In this work, a new alternative for the downstream processing and valorization of black chokeberry pomace (*Aronia melanocarpa*) which could be potentially coupled to a biorefinery process is proposed. This alternative is based on the application of pressurized liquid extraction (PLE) to the residue obtained after the supercritical fluid extraction (SFE) of the berry pomace. An experimental design is employed to study and optimize the most relevant extraction conditions in order to attain extracts with high extraction yields, total phenols content and antioxidant activity. Moreover, the PLE extracts were characterized by using a new method based on the application of two-dimensional comprehensive liquid chromatography (LC×LC) in order to correlate their activity with their chemical composition. Thanks to the use of this powerful analytical tool, 61 compounds could be separated being possible the tentative identification of different anthocyanins, proanthocyanins, flavonoids and phenolic acids. By using the optimized PLE approach (using pressurized 46% ethanol in water at 165 °C containing 1.8 % formic acid), extracts with high total phenols content (236.6 mg GAE g⁻¹ extract) and high antioxidant activities (4.35 mmol TE g⁻¹ extract and EC₅₀ 5.92 µg ml⁻¹) could be obtained with high yields (72.5 %).

Keywords: *Aronia melanocarpa*; Bioactive compounds; Biorefinery; Black chokeberry; Comprehensive LC; LC×LC; Phenolic compounds; Pressurized liquid extraction; Valorization

* Corresponding author. Tel.: + 34 910 017 946; Fax.: +34 910 017 905

E-mail address: m.herrero@csic.es (Miguel Herrero)

5 PRIEDAS

PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti baigiamojo magistro projekto vadovui prof. dr. Petriui Rimantui Venskutoniui už nuolatinį skatinimą tobulėti, aktualios temos idėją, įvairiapusę pagalbą bei vertingas konsultacijas rengiant šį darbą. Dėkoju KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros darbuotojams, kurie prisidėjo prie šio darbo įgyvendinimo. Dėkoju Maisto mokslo tyrimų instituto (*CIAL, CSIC, Ispanija*) prof. dr. Elena Ibáñez už suteiktą galimybę stažuotis jos mokslinėje grupėje, dr. Miguel Herrero už pagalbą rengiant mano pirmąjį mokslinį straipsnį viena iš šio projekto tema ir kitiems instituto darbuotojams už pagalbą atliekant mokslinius tyrimus.

Nuoširdžiai dėkoju tėvams, artimiesiems ir draugams už visapusišką palaikymą, meilę ir kantrybę.