

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Giedrius Miliauskas

STAMBIAŠAKNIO SNAPUČIO (*GERANIUM
MACRORRHIZUM*) IR KRŪMINĖS SIDABRAŽOLĖS
(*POTENTILLA FRUTICOSA*) ANTIOKSIDANTAI IR JŲ
SAVYBĖS

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai, chemija (03P)

Kaunas, 2004

Disertacija rengta 2000–2004 metais Kauno technologijos universiteto Chemijos technologijos fakultete, Maisto produktų technologijos katedroje ir Vageningeno Universitete (Nyderlandai).

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija-03P).

Chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

Prof. habil. dr. Zigmuntas Jonas BERESNEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija-03P);

Prof. habil. dr. Juozas Vidas GRAŽULEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija-03P);

Prof. habil. dr. Audrius Sigitas MARUŠKA (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, chemija-03P);

Prof. habil. dr. Algirdas ŠAČKUS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija-03P) – **pirmininkas**;

Dr. Olga KORNYŠOVA (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, chemija-03P).

Oficialieji oponentai:

Prof. habil. dr. Valdas Stanislovas LAURINAVIČIUS (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, chemija-03P);

Doc. dr. Dainora GRUZDIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija-05T).

Disertacija bus ginama 2004 m. spalio 28 d. 10 val. viešajame Chemijos mokslo krypties tarybos posėdyje, kuris įvyks Kauno technologijos universiteto, Centrinių rūmų Disertacijų gynimo salėje (K. Donelaičio g. 73-403, Kaunas).

Adresas: K. Donelaičio g. 73, LT-44029, Kaunas, Lietuva.
Tel.: (370) 37 30 00 42; faksas: (370) 37 32 41 44; el. paštas:
mok.grupe@adm.ktu.lt

Daktaro disertacijos santrauka išsiųsta 2004-09-28.

Su daktaro disertacija galima susipažinti Kauno technologijos universiteto bibliotekoje.

ĮVADAS

Temos aktualumas. Maisto molekulių oksidacija (riebalų, baltymų, angliavandenių) gali sukelti įvairius nepageidaujamus maisto produktų pakitimus: skonio, kvapo, tekstūros pablogėjimą, mitybinės vertės sumažėjimą ar visišką produkto sugedimą. Oksidacinis stresas, kurį sukelia reakingos deguonies rūšys (laisvieji radikalai, singletinis deguonis, ozonas ar kt.) ląstelėje, gali būti įvairių susirgimų priežastis (koronarinių širdies ligų, kataraktos, vėžinių susirgimų, senėjimo procesu).

Vienas iš būdų apsaugoti maisto produktus nuo sugedimo yra antioksidantų naudojimas. Vaistiniai ir aromatiniai augalai, kaip atsinaujinantis natūralių antioksidantų šaltinis, pastaraisiais metais labai intensyviai tyrinėjami. Smarkiai padidėjęs vartotojų poreikis natūraliems maisto priedams ar papildams, abejonės dėl plačiai naudojamų sintetinių antioksidantų saugos, taip pat didžiulė, nepakankamai ištirta augalų pasaulio, drauge ir augaluose susidarančių antrinių metabolitų įvairovė yra pagrindinis tokių tyrimų impulsas. Klimatinės sąlygos, vegetacijos fazių įtaka, genetinės modifikacijos ir kiti faktoriai dar labiau praplečia augalų tyrinėjimo perspektyvas.

Kauno technologijos universiteto Maisto produktų technologijos katedroje jau 15 metų atliekami cheminiai ir technologiniai prieskoninių, aromatinių ir vaistinių augalų tyrimai. Gauti įdomūs rezultatai skatina tolesnius tyrinėjimus ir biologiškai vertingų medžiagų paieškas šioje srityje.

Darbo tikslas. Darbo tikslas yra natūralių antioksidantų iš Lietuvoje išaugintų vaistinių ir aromatinių augalų paieška, jų struktūrų nustatymas, augalų ekstraktų cheminių savybių tyrimas ir pritaikymo galimybių įvertinimas.

Uždaviniai: 1) Įvertinti kai kurių Lietuvoje augančių aromatinių ir vaistinių augalų, įvairiais tirpikliais paruoštų ekstraktų antiradikalinį aktyvumą ir tolesnei analizei atrinkti perspektyviausius augalus; 2) Ištirti atrinktų stambiašaknio snapučio (*Geranium macrorrhizum* L.) ir krūminės sidabražolės (*Potentilla fruticosa* L.) pagrindinių antiradikaliųjų junginių sudėtį, modeliniais metodais įvertinti jų aktyvumą ir palyginti jį su etaloninių antioksidantų aktyvumu; 3) Kiekybiškai palyginti stambiašaknio snapučio ir krūminės sidabražolės pagrindinių nustatytų antiradikaliųjų junginių sudėtį skirtingose augalų botaninėse dalyse; 4) Įvertinti įvairių stambiašaknio snapučio ir krūminės sidabražolės ekstraktų ir frakcijų antioksidacines savybes tiriant jas aliejaus oksidacijos metu, taip pat įvairiais modeliniais metodais; 5) Atlikti preliminarius atrinktų ekstraktų iš stambiašaknio snapučio ir krūminės sidabražolės saugos tyrimus (geno-, citotoksiškumo įvertinimas).

Mokslinio darbo naujumas. Antioksidacinės stambiašaknio snapučio ir krūminės sidabražolės savybės iki šiol beveik nebuvo tirtos. Darbe pirmą kartą pateikti išsamūs tyrimų rezultatai apie stambiašaknio snapučio antioksidacines savybes, pirmą kartą nustatyti šių augalų pagrindiniai antioksidacinėmis

savybėmis pasižymintys junginiai. Dauguma jų pirmą kartą nustatyti kaip šių augalų komponentai.

Teorinė ir praktinė darbo vertė. Nustatyta, kad Lietuvoje augančių stambiašaknio snapučio ir krūminės sidabražolės ekstraktuose yra gausu antiradikalinių junginių, pasižyminčių stipriomis antioksidacinėmis savybėmis poliškose terpėse. Tokie ekstraktai gali būti lengvai ir efektyviai išskiriami pigiais ir saugiais tirpikliais – etanoliu ir vandeniu. Šis faktas, taip pat ištirtos ekstraktų savybės, preliminarus jų saugos įvertinimas parodė, kad šie ekstraktai galėtų būti perspektyvūs natūralių maisto priedų ar papildų šaltiniai.

Disertacijos apimtis ir struktūra. Disertacija parašyta anglų kalba. Ją sudaro įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų metodai, rezultatai, išvados, naudotos literatūros sąrašas, kurį sudaro 260 šaltinių, disertacijos tema skelbtų publikacijų sąrašas. Disertacijos apimtis – 119 psl., 13 lentelės ir 33 paveikslai.

TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

Tyrimų objektai. Tyrimams panaudoti šie augalai: kvapnūs šalavijas (*Salvia sclarea*, lapai ir stiebai), lipnūs šalavijas (*Salvia glutinosa*, lapai), pievinis šalavijas (*Salvia pratensis*, lapai ir stiebai), tikroji levanda (*Lavandula angustifolia*, lapai, stiebai ir žiedai), vaistinė medetka (*Calendula officinalis*, žiedlapiai), vaistinė ramunėlė (*Matricaria recutita*, žiedai), rausvažiedė ežiuolė (*Echinacea purpurea*, lapai, stiebai ir žiedai), tikrasis rapontikas (*Rhaponticum carthamoides*, lapai ir stiebai), graikinis riešutmedis (*Juglans regia*, lapai), geltonžiedis barkūnas (*Melilotus officinalis*, lapai, stiebai ir žiedai), stambiašaknis snaputis (*Geranium macrorrhizum*, lapai), krūminė sidabražolė (*Potentilla fruticosa*, žiedai) ir vaistinis šalavijas (*Salvia officinalis*, lapai ir stiebai).

Tyrimų metodai. Pirminei perspektyvių augalų atrankai, ekstraktai paruošti šaltos ekstrakcijos būdu. Augalų sudėties tyrimams snapučio ir sidabražolės žaliava pirmiausiai šaltos ekstrakcijos būdu buvo ekstrahuojama *tert*-butilmetileteriu (TBME ekstraktas). Likutis po šios ekstrakcijos išdžiovintas ir toliau ekstrahuotas etanoliu, o po šios ekstrakcijos likusi dalis dar ekstrahuota karštu vandeniu. Gauti etanolio ir vandens ekstraktai frakcionuoti tarp butanolio ir vandens dalijamuosiuose piltuvuose. Gautos šios frakcijos: etanolinė-butanolinė (EB), etanolinė-vandeninė (EW), vandeninė-butanolinė (WB) ir vandeninė-vandeninė (WW).

Tam, kad būtų *augalų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas* greitai įvertintas, naudoti modeliniai DPPH radikalų ir ABTS radikalų katijonų sujungimo metodai (W. Brand-Williams ir kt., 1995; R. Re ir kt., 1999). Šių metodų esmė yra spektrofotometrinis reakcijos tirpalo spalvos pokyčio matavimas, redukuojantis DPPH• ar ABTS^{•+}, t. y. reaguojant su antioksidantais, galinčiais atiduoti protoną. Ekstraktų aktyvumas išreikštas DPPH• ar ABTS^{•+} tirpalų optinio tankio sumažėjimu.

Atskirų junginių antiradikalinis aktyvumas palygintas su trolokso (etaloninio antioksidanto) savybėmis, nustatant troloksui ekvivalentišką antioksidacinę galią (TEAC). Junginių aktyvumas taip pat palygintas su plačiai žinomo gamtinio antioksidanto – rozmarinų rūgštis – aktyvumu.

Antioksidantų aptikimas kombinuotais ESC-DPPH/ABTS metodais. Aptikimas atliktas pagal A. Dapkevičiaus ir kt. (2000) ir I. Kolevos ir kt. (2001) aprašytą metodiką. Po chromatografinio ekstraktų junginių paskirstymo ir aptikimo UV detektoriumi, papildomas siurblys įveda DPPH (ABTS) radikalų tirpalą į tekantį eliuentą. Jeigu jame esantys ekstrakto junginiai redukuoja laisvus DPPH ar ABTS radikalus, eliuento absorbcija sumažėja. Toks pakitimas nustatytas papildomu UV ar matomos šviesos detektoriumi.

Fenolinių junginių kiekis metanoliniuose ekstraktuose nustatytas spektrofotometriškai Folin-Ciocalteu metodu ir išreikštas galo rūgštis ekvivalentu (GRE).

Junginių išskyrimas ir nustatymas. Junginių atskyrimas ir išgryninimas atliktas skysčių chromatografijos (SC) būdu, naudojant įvairias nejudančias fazes (silikagelį, C18, poliamidą, sefadeksą LH-20), atvirkščių fazių (C18) ESC būdu (analitinės ir pusiau-paruošiamosios), vidutinio slėgio SC būdu (C18), plonasluoksnės SC būdu (C18, silikagelis).

Junginiai nustatomi remiantis spektrometriniais duomenimis: UV, masių spektrometrijos (cheminės [APCI] ar elektrinės [ESI] jonizacijos būdu), BMR (^1H , ^{13}C , 2D BMR: COSY, TOCSY, COLOC ir HMBC), taip pat pagal sulaikymo kolonėlėje laikus (ESC).

Kai kurie sidabražolės etanolinio ekstrakto junginiai išskirti ir nustatyti kombinuotu ESC – kietosios fazės ekstrahavimo – BMR aptikimo metodu.

Kiekybinis pagrindinių antiradikaliųjų junginių palyginimas stambiašaknio snapučio lapų ir šaknų bei krūminės sidabražolės žiedų ir lapų ekstraktuose atliktas naudojant ESC-MS (ESI) sistemą. Santykiniai junginių kiekiai nustatyti pagal MS signalo smailių plotus.

Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimo metodai.

Superoksido anijono radikalų sujungimo gebėjimas. Bandymai atlikti pagal M. Wettasinghe ir kt. (1999) aprašytą metodiką. Šis spektrofotometrinis metodas pagrįstas fermentinėje ksantino/ksantino oksidazės sistemoje susidariusių superoksido anijono radikalų reakcija su nitro žydruoju tetrazolo (NBT) indikatoriumi. Pagal redukuoto NBT indikatoriaus mėlynos spalvos intensyvumą buvo sprenžiama apie reakcijos tirpale esančių augalų ekstraktų gebėjimą sujungti superoksido anijono radikalus.

Vandenilio peroksido sujungimo gebėjimas. Metodas pagrįstas vandenilio peroksido šviesos absorbcijos, kai bangos ilgis - 230 nm, matavimu. Pagal liekamąją absorbciją buvo sprenžiama apie reakcijos mišinyje esančių ekstraktų aktyvumą sujungiant vandenilio peroksidą.

β -karotino blukinimo testas. Eksperimentas atliktas pagal G. J. Marco (1968) metodiką. Linoleno rūgštis oksidacijos metu emulsijoje susidarę

reakcijos produktai oksiduoja β -karotiną. Pagal liekamąją reagento absorbciją nustatytas nesusioksidavusio β -karotino kiekis ir pridėtų į reakcijos mišinį ekstraktų (0,1 % m/m) aktyvumas.

Oksidacinio aktyvumo įvertinimo metodai aliejuje atlikti dinaminiu *Oven* metodu (oksidacijos procesai paspartinami, pakeliant terpės temperatūrą).

Peroksidų skaičiaus (PS) kitimo tyrimas rapsų aliejuje nustatytas pagal oficialią AOCS metodiką. Hidrofiliški augalų ekstraktai (0,1 % m/m) blogai tirpstantys aliejuje, todėl pirmiausiai buvo tirpinami mažame etanolio kiekyje (apie 5 % aliejaus masės). Šis tirpalas buvo sumaišytas su aliejumi. Aliejaus bandiniai su ekstraktų priedais ir be jų laikyti atvirose stiklinėse, esant 55 °C temperatūrai. Iš PS kitimo kreivių nustatyti aliejaus bandinių su priedais indukcijos periodai (IP, laikas, per kurį tiriamojo bandinio PS pasiekia 20 mekv/kg) ir apskaičiuotas priedų antioksidacinis efektyvumas (AE):

$AE = IP_A/IP_0$; čia $IP_{A,0}$ – tiriamojo ir tuščiojo bandinių indukcijos periodai.

Ekstraktų įtakos konjuguotiems dienams ir trienams susidaryti aliejuje tyrimas. Aliejaus bandiniai su ekstraktų priedais buvo paruošti taip pat kaip ir PS matuoti. Konjuguotųjų dienų (pirminių oksidacijos produktų) kiekio kitimas išmatuotas UV spektrofotometru, kai $\lambda = 232$ nm, konjuguotųjų trienų (antrinių oksidacijos produktų) kiekio kitimas išmatuotas, kai $\lambda = 268$ nm.

Heksanolio kiekio kitimas aliejaus viršerdvėje. Bandiniuose su ekstraktų priedais heksanolio (antrinio oksidacijos produkto) kiekis aliejaus viršerdvėje nustatytas dujų chromatografijos būdu. Bandiniai su priedais (0,1 %, m/m) buvo laikomi 10 ml tūrio uždarytuose buteliukuose, esant 55 °C temperatūrai. Viršerdvės mėginiai (2000 μ l) buvo paimami mėginių ėmikliu, sukonzentruojami šaltu kaupikliu ir įpurškiami į koloną, esant 240 °C temperatūrai. Junginiai aptikti liepsnos jonizacijos detektoriumi ir pagal gautų smailių plotus apskaičiuotas heksanolio kiekis bandinių viršerdvėje. Iš heksanolio kiekio kitimo kreivių (pagal IP trukmę) apskaičiuotas bandinių su ekstraktų priedais antioksidacinis efektyvumas.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Preliminarus medicininių ir aromatinių augalų ekstraktų antiradikalinių savybių įvertinimas ir perspektyviausių augalų atrinkimas

Radikalų sujungimo gebėjimo įvertinimas modelinėse sistemose.

Metanolinių, etilacetatinių ir acetoninių ekstraktų radikalų sujungimo aktyvumas (RSA) įvertintas modeliniais DPPH radikalų ir ABTS radikalų katijonų sujungimo testais (rezultatai pateikti 1–2 lentelėse ir 1 paveiksle).

Metanoliniai augalų ekstraktai efektyviausiai sujungė DPPH radikalus. Sprendžiant pagal reakcijos sistemos optinio tankio sumažėjimą (87,6–93,9 %), kvapniojo šalavijo, lipniojo šalavijo, pievinio šalavijo, paprastojo rapontiko ir stambiašaknio snapučio ekstraktai efektyviausiai sujungė DPPH radikalus.

Kadangi galutinė redukuoto DPPH tirpalo spalva yra gelsva, todėl absorbcijos sumažėjimas, palyginti su bespalviu metanolium, negali būti lygus 100 %. Graikinio riešutmedžio ir geltonžiedžio barkūno ekstraktai taip pat efektyviai sujungė DPPH radikalus (optinis tankis sumažėjo atitinkamai 67,8 % ir 75,9 %). Rausvažiedės ežiulės ir vaistinės medetkos ekstraktai buvo silpnesni radikalų sujungėjai.

1 lentelė. Metanolinių, etilacetatinių ir acetoninių ekstraktų radikalų sujungimo aktyvumas (RSA), išreikštas DPPH tirpalo absorbcijos sumažėjimu (%)

Augalinė žaliava	DPPH tirpalo absorbcijos sumažėjimas, %		
	Etilacetatinis ekstraktas	Acetoninis ekstraktas	Metanolinis ekstraktas
<i>Salvia officinalis</i>	91,7 ± 0,5	92,6 ± 0,6	92,3 ± 0,5
<i>Salvia sclarea</i>	21,5 ± 1,8	17,8 ± 3,4	92,9 ± 0,4
<i>Salvia glutinosa</i>	16,2 ± 1,5	41,0 ± 0,9	91,5 ± 0,5
<i>Salvia pratensis</i>	17,2 ± 1,4	26,0 ± 0,3	93,0 ± 0,5
<i>Lavandula angustifolia</i>	2,5 ± 1,4	7,4 ± 1,3	35,4 ± 1,7
<i>Calendula officinalis</i>	1,6 ± 1,4	2,6 ± 1,0	12,9 ± 0,8
<i>Matricaria recutita</i>	6,4 ± 1,7	8,2 ± 1,1	44,7 ± 2,6
<i>Echinacea purpurea</i>	3,5 ± 0,1	14,2 ± 1,8	6,8 ± 1,5
<i>Rhaponticum carthamoides</i>	11,4 ± 1,8	30,0 ± 0,3	87,6 ± 1,1
<i>Juglans regia</i>	33,9 ± 2,3	25,3 ± 1,6	67,8 ± 0,2
<i>Melilotus officinalis</i>	8,1 ± 1,7	7,6 ± 5,2	75,9 ± 1,8
<i>Geranium macrorrhizum</i>	26,9 ± 1,4	44,6 ± 1,2	91,7 ± 0,6
<i>Potentilla fruticosa</i>	46,3 ± 0,5	93,0 ± 0,2	93,9 ± 0,7

Galutinis ekstraktų ir DPPH[•] masių santykis buvo apie 3:1.

Daugelio augalų etilacetatinių ir acetoninių ekstraktų RSA buvo gerokai silpnesnis nei metanolinių ekstraktų. Tačiau vaistinio šalavijo etilacetatinio ir acetoninio ekstraktų bei krūminės sidabražolės acetoninio ekstrakto aktyvumas buvo artimas šių augalų metanolinių ekstraktų aktyvumui. Ežiulės acetoninio ekstrakto RSA buvo didesnis nei metanolinio ekstrakto, nors, palyginti su kitų augalų ekstraktais, jis buvo labai mažas.

Lyginant acetoninius ir etilacetatinius ekstraktus nustatyta, kad acetoninių ekstraktų RSA buvo didesnis nei etilacetatinių ekstraktų RSA (išskyrus graikinio riešutmedžio ir kvapniojo šalavijo). Kadangi šių dviejų tirpiklių poliškumas yra labai panašus, galima teigti, kad naudoti etilacetatą radikalų sujungėjams ekstrahuoti iš minėtų augalų nėra tikslinga.

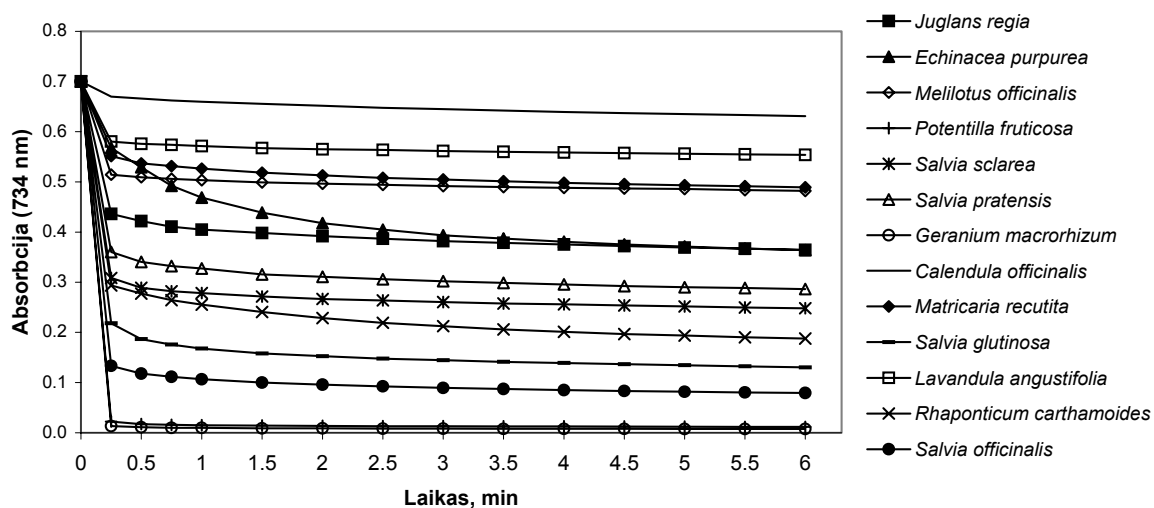
Norint toliau palyginti DPPH[•] sujungimo efektyvumą, aktyviausi augalų ekstraktai praskiesti du ar keturis kartus. Galutinis ekstraktų ir DPPH[•] masių santykis buvo apie 1,5:1 ar 0,75:1 (žr. 2 lentelę).

Iš pateiktų rezultatų matome, kad efektyviausiai radikalus sujungė metanolinis snapučio ir acetoninis sidabražolės ekstraktai. Dideliu radikalų sujungimo gebėjimu taip pat pasižymėjo ir metanolinis sidabražolės ekstraktas.

2 lentelė. Metanolinių ir acetoninių ekstraktų įtaka DPPH tirpalo absorbcijos sumažėjimui (%)

Augalinė žaliava	DPPH tirpalo absorbcijos sumažėjimas, %			
	Metanolinis ekstraktas	Acetoninis ekstraktas	Metanolinis ekstraktas	Acetoninis ekstraktas
	[M _{ekstr}]:[M _{DPPH}] = 1,5:1		[M _{ekstr}]:[M _{DPPH}] = 0,75:1	
<i>Salvia officinalis</i>	91,1	87,8	57,5	45,9
<i>Salvia sclarea</i>	74,5	n.a. ^a	n.a.	n.a.
<i>Salvia pratensis</i>	80,3	n.a.	n.a.	n.a.
<i>Salvia glutinosa</i>	77,6	n.a.	n.a.	n.a.
<i>Potentilla fruticosa</i>	92,5	92,4	79,6	91,4
<i>Geranium macrorrhizum</i>	92,3	n.a.	89,0	n.a.
<i>Rhaponticum carthamoides</i>	66,9	n.a.	n.a.	n.a.

^a n.a. – reikšmės neįvertintos.



1 pav. Metanolinių ekstraktų antiradiklinis aktyvumas išmatuotas ABTS^{•+} reakcijos sistemoje

ABTS^{•+} sujungimo įvertinimo metu gauti panašūs rezultatai kaip ir DPPH sistemoje. Snapučio ir sidabražolės ekstraktai efektyviausiai surišo ABTS^{•+} (liekamoji absorbcija po 6 min. buvo artima 0). Vaistinio šalavijo aktyvumas buvo šiek tiek mažesnis (absorbcija po 6 min. sumažėjo iki 0,08, t. y. 89 %). Lipniojo šalavijo, paprastojo rapontiko ir kvapniojo šalavijo ekstraktai taip pat

pasižymėjo dideliu antiradikaliu aktyvumu: absorbcijos sumažėjimas buvo atitinkamai 81 %, 72 % ir 64 %.

Reikia pažymėti, kad antiradikaliniai ekstraktų junginiai gana greitai reagavo su ABTS^{•+} (0,25–0,5 min.). Likusio reakcijos laiko metu išmatuotas absorbcijos pakitimas visais atvejais (išskyrus rausvažiedės ežiuolės atvejį) buvo labai nežymus.

Lyginant abu radikalų sujungimo testus, tarp jų nustatytas tvirtas koreliacinis ryšys: DPPH ir ABTS testų koreliacijos koeficientai metanoliniams ekstraktams buvo 0,76. Snapučio ir sidabražolės ekstraktų antiradikalinis aktyvumas buvo didžiausias abiejose reakcijų sistemose.

Fenolinių junginių kiekis ekstraktuose.

Augalų fenoliniai junginiai yra gausiausia junginių grupė, pasižyminti antiradikalinėmis ar antioksidacinėmis savybėmis. Taigi buvo tikslinga nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį tirtuose augalų ekstraktuose (3 lentelė). Ekstraktuose taip pat nustatytas flavonoidų ir flavonolių kiekis.

Augalų ekstraktai	Bendras fenolinių junginių kiekis, mg/g ekstrakto (GRE)
<i>Salvia officinalis</i>	22,6 ± 0,9
<i>Salvia sclarea</i>	24,0 ± 1,1
<i>Salvia glutinosa</i>	17,1 ± 0,6
<i>Salvia pratensis</i>	9,7 ± 0,4
<i>Lavandula angustifolia</i>	5,4 ± 0,2
<i>Calendula officinalis</i>	6,6 ± 0,3
<i>Matricaria recutita</i>	7,5 ± 0,1
<i>Echinacea purpurea</i>	4,1 ± 1,2
<i>Rhaponticum carthamoides</i>	13,3 ± 0,3
<i>Juglans regia</i>	11,5 ± 1,0
<i>Melilotus officinalis</i>	4,3 ± 0,6
<i>Geranium macrorrhizum</i>	25,9 ± 0,2
<i>Potentilla fruticosa</i>	37,9 ± 2,1

3 lentelė. Bendras fenolinių junginių kiekis augalų ekstraktuose, išreikštas galo rūgšties ekvivalentu (GRE)

Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas iš kalibracinės kreivės regresijos lygties: $y = 10,738x + 0,061$, $R^2 = 0,98$. Fenolinių junginių kiekis ekstraktuose vyravo nuo 4,1 iki 37,9 GRE. Daugiausiai jų nustatyta sidabražolės ir snapučio ekstraktuose, truputį mažiau - šalavijų ir paprastojo rapontiko ekstraktuose. Fenolinių junginių kiekis koreliavo su ekstraktų antiradikaliu aktyvumu: pvz. dviejų duomenų grupių (ekstraktų ABTS^{•+} sujungimo aktyvumo ir šių ekstraktų fenolinių junginių kiekio) koreliacijos

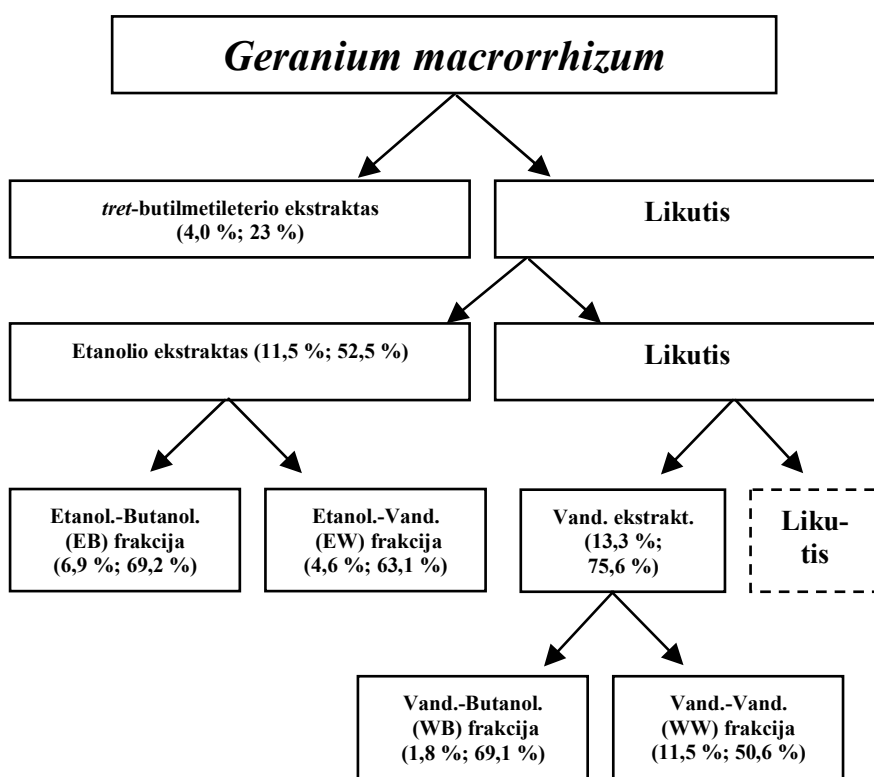
koeficientas buvo 0,84. Tai rodo, kad fenoliniai junginiai yra labai svarbūs, lemiant šių ekstraktų antiradikalines savybes.

Po pirminio įvertinimo, tolesniems tyrimams atrinkti stambiašaknis snaputis (*Geranium macrorrhizum*) ir krūminė sidabražolė (*Potentilla fruticosa*), kaip stipriausiomis antiradikalinėmis savybėmis pasižymėję augalai.

Stambiašaknio snapučio antiradikalinių junginių išskyrimas ir nustatymas

Ekstrakcijos schema ir ekstraktų antiradikalinis aktyvumas.

Stambiašaknio snapučio lapų ekstrakcijos schema, ekstraktų išeigos ir atskirų ekstraktų ar frakcijų antiradikalinis aktyvumas parodyti 2 paveiksle.



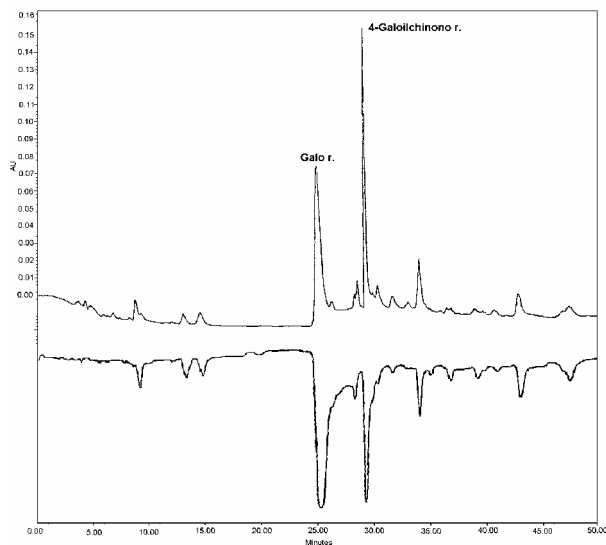
2 pav. Stambiašaknio snapučio lapų ekstrahavimo ir frakcionavimo schema ir gautų frakcijų antiradikalinio aktyvumo įvertinimas; skliaustuose – išeiga, %; absorbcijos sumažėjimas (%) DPPH^{*} reakcijos sistemoje, išmatuotas 30 min. po radikalo ir ekstraktų tirpalų sumaišymo; galutinis masių santykis tarp jų buvo 3:1 *tert*-butilmetileterio frakcijai ir 0,75:1 kitoms frakcijoms

Tert-butilmetileteris išekstrahavo mažiau aktyvių medžiagų iš augalo lapų nei etanolis ar vanduo. Tai reiškia, kad augalo lapuose vyrauja poliški junginiai. Matavimai parodė, kad didžiausiu antiradikaliniu aktyvumu pasižymėjo vandeninis ir etanolinis ekstraktai; išmatuotas absorbcijos sumažėjimas (atitinkamai 75,6 % ir 52,5 %) buvo gerokai didesnis nei *tert*-butilmetileterinio ekstrakto. Toliau tirtas atskirų etanolinių ir vandeninių frakcijų antiradikalinis

aktyvumas buvo gana panašus ($I = 63,1 - 69,2 \%$). WW frakcijos aktyvumas buvo šiek tiek mažesnis ($I = 50,6 \%$).

Antioksidantų aptikimas kombinuotu ESC-DPPH/ABTS metodu.

Taikant šį metodą, ekstraktas skirstomas chromatografinėje kolonėlėje, ir preliminariai įvertinamas atskirtų komponentų antiradikalinis aktyvumas. Visos stambiašaknio snapučio frakcijos tirtos šiuo metodu. Chromatografinis pavyzdys pateiktas 3 pav. Neigiamos smailės chromatogramoje parodo aktyvius, su $ABTS^{\bullet+}$ reaguojančius junginius.



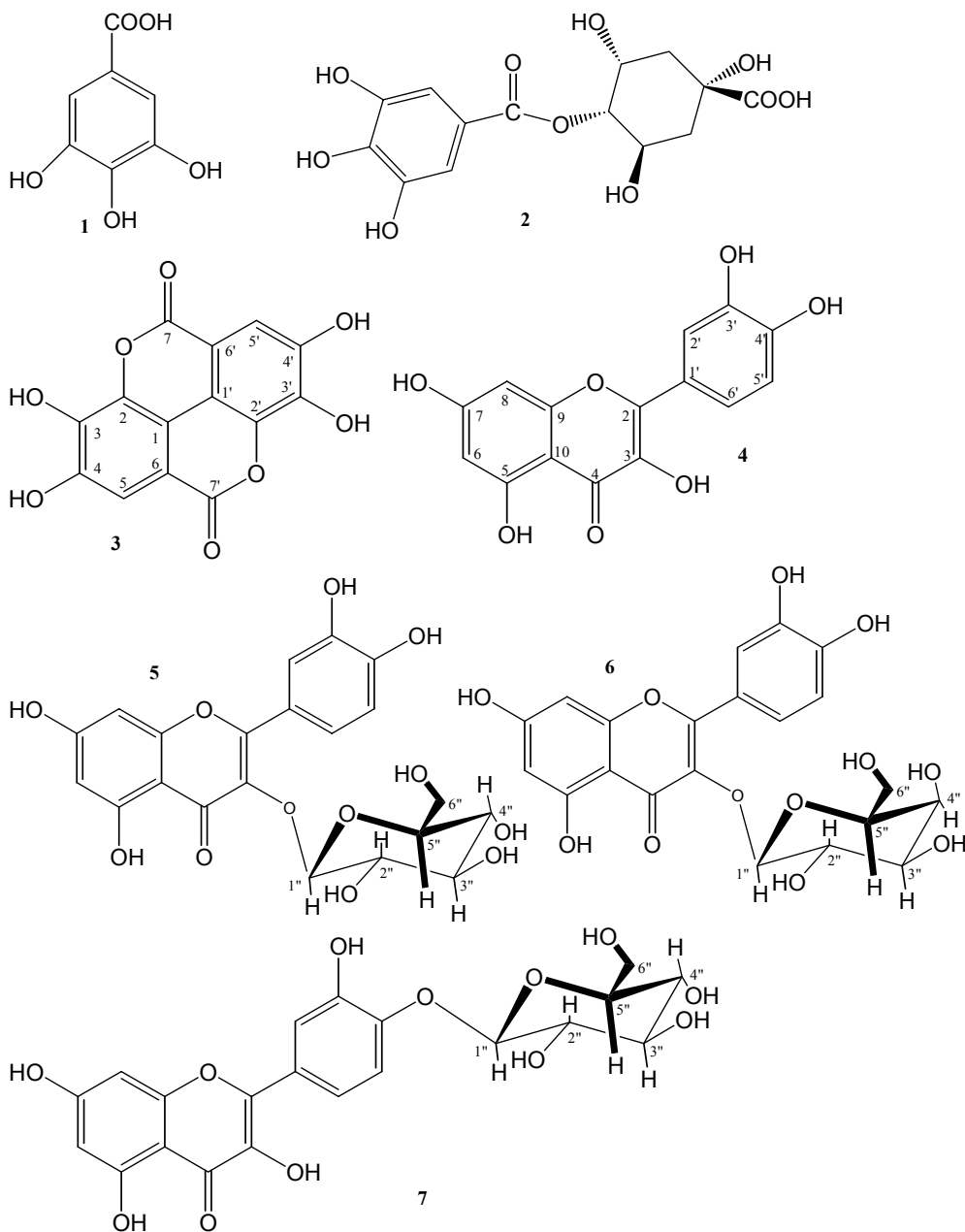
3 pav. Antiradikaliųjų junginių iš stambiašaknio snapučio WW frakcijos aptikimas ESC-ABTS metodu; viršutinė chromatograma: UV signalas (254 nm), apatinė chromatograma: $ABTS^{\bullet+}$ redukcijos signalas (734 nm)

Tyrimai parodė, kad aktyvūs antiradikaliniai junginiai yra susikcentravę etanolio ir vandens frakcijose, ypač EB ir WW. Du pagrindiniai junginiai aptikti WW frakcijoje (3 pav.) ir abu, sprendžiant iš atitinkamų neigiamų smailių intensyvumo, pasižymi stipriomis antiradikalinėmis savybėmis.

Aktyviųjų junginių išskyrimas, išgryninimas ir nustatymas.

Naudojant įvairius spektrometrinius metodus, septyni junginiai nustatyti įvairiose snapučio frakcijose (4 pav.). Du iš jų – galo rūgštis **1** ir kvercetas **4** – buvo žinomi šio augalo komponentai, o **2**, **3**, **5**, **6** ir **7** nustatyti stambiašaknio snapučio sudėtyje pirmą kartą.

Poliškiausi junginiai – galo rūgštis **1** ir 4-galoilchino rūgštis **2** – nustatyti WW frakcijoje, remiantis 1H BMR, 1H - ^{13}C BMR (HMBC), ESI-MS ir UV spektriniais duomenimis. Taip pat remiantis įvairiais spektrometriniais duomenimis EB frakcijoje nustatyti kvercetas **4**, kvercetin-3- β -gliukopiranozidas **5**, kvercetin-3- β -galaktopiranozidas **6** ir kvercetin-4'- β -gliukopiranozidas **7**. Elago rūgštis **3** nustatyta WB frakcijoje. Visų nustatytų junginių, išskyrus 4-galoilchino rūgštį, antioksidacinės savybės yra žinomos iš anksčiau skelbtų darbų.



4 pav. Antiradikaliniai junginiai, nustatyti stambiašaknio snapučio lapų ekstraktuose

Galo rūgštis (1): UV (MeCN) λ_{maks} 270 nm; ESI-MS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 169 [M-H]⁻; ¹H BMR duomenys: (D₂O) δ (ppm) 6,88 (2H, s, H-2 ir H-6);

4-galoilchino rūgštis (2): UV (MeCN) λ_{maks} 273 nm; ESIMS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 343 [M-H]⁻; ¹H BMR duomenys: (D₂O) δ (ppm) 7,00 (2H, s, H-2 galoil ir H-6 galoil), 4,76 (1H, dd, $J = 3,1, 9,1$ Hz, H-4), 4,08-4,20 (2H, m, H-3 ir H-5), 1,80-2,08 (4H, m, H-2 ir H-6); ¹³C BMR duomenys: (D₂O) δ 178,5 (COOH), 168,0 (-COO-), 144,9 (2C, C-3 galoil ir C-5 galoil), 138,8 (C-4 galoil), 120,5 (C-1 galoil),

110,5 (2C, C-2 galoil ir C-6 galoil), 78,0 (C-4), 75,7 (C-1), 68,0 (C-5), 64,8 (C-3), 40,4 (C-6), 37,3 (C-2);

Elago rūgštis (3): UV (MeOH) λ_{maks} 253, 367; ESI-MS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 301 [M-H]⁻; ¹H BMR duomenys: (CD₃OD) δ (ppm) 7,53 (2H, s, H-5 ir H'-5);

Kvercetas (4): UV(MeOH) λ_{maks} 254, 354; ESI-MS (teigiamas jonizacijos režimas) m/z 303 [M+H]⁺; ¹H BMR duomenys: (CD₃OD) δ (ppm) 7,73 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 7,62 (1H, dd, $J = 2,1, 8,5$ Hz, H-6'), 6,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,37 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-8), 6,17 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-6);

Kvercetin-3-O- β -gliukopiranozidas (5): UV(MeOH) λ_{maks} 254, 356; ESI-MS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 463 [M-H]⁻; ¹H BMR duomenys: (CD₃OD) δ (ppm) 7,84 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 7,58 (1H, dd, $J = 2,2, 8,5$ Hz, H-6'), 6,86 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 6,38 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-8), 6,19 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-6), 5,24 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-1" gliukozil), 3,77-3,18 (6H, m, H-2", H-3", H-4", H-5", H-6" _{A,B}); ¹³C BMR duomenys: (CD₃OD) δ 179,4 (C-4), 166,6 (C-7), 163,1 (C-5), 158,9 (C-2), 158,5 (C-9), 149,9 (C-4'), 145,9 (C-3'), 135,6 (C-3), 123,2 (C-6'), 123,1 (C-1'), 117,5 (C-5'), 116,0 (C-2'), 105,6 (C-10), 104,3 (C-1"), 100,1 (C-6), 94,8 (C-8), 78,4 (C-5"), 78,1 (C-3"), 75,7 (C-2"), 71,2 (C-4"), 62,6 (C-6");

Kvercetin-3-O- β -galaktopiranozidas (6): UV(MeOH) λ_{maks} 254, 356; ESI-MS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 463 [M-H]⁻; ¹H BMR duomenys: (CD₃OD) δ (ppm) 7,70 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-2'), 7,58 (1H, dd, $J = 2,2, 8,5$ Hz, H-6'), 6,86 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 6,38 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-8), 6,19 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-6), 5,16 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-1" galaktozil), 3,87-3,18 (6H, m, H-2", H-3", H-4", H-5", H-6" _{A,B}); ¹³C BMR duomenys: (CD₃OD) δ 179,3 (C-4), 167,6 (C-7), 162,9 (C-5), 158,8 (C-2), 158,6 (C-9), 149,9 (C-4'), 145,8 (C-3'), 135,7 (C-3), 123,0 (C-6'), 122,9 (C-1'), 117,7 (C-5'), 116,1 (C-2'), 105,6 (C-10), 105,2 (C-1"), 100,4 (C-6), 95,1 (C-8), 77,1 (C-5"), 75,1 (C-3"), 73,2 (C-2"), 70,1 (C-4"), 61,9 (C-6");

Kvercetin-4'-O- β -gliukopiranozidas (7): UV(MeCN) λ_{maks} 252, 365; ESI-MS (teigiamas jonizacijos režimas) m/z 465 [M+H]⁺; ¹H BMR duomenys: (CD₃OD) δ (ppm) 7,79 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 7,74 (1H, dd, $J = 2,4, 8,8$ Hz, H-6'), 7,32 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-5'), 6,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), 6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 4,97 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-1" gliukozil), 3,96-3,32 (6H, m, H-2", H-3", H-4", H-5", H-6" _{A,B}); ¹³C BMR duomenys: (CD₃OD) δ 177,4 (C-4), 165,7 (C-7), 161,5 (C-5), 157,4 (C-9), 147,1 (C-2), 147,0 (C-3'), 146,8 (C-4'), 137,9 (C-3), 126,7 (C-1'), 120,2 (C-6'), 116,7 (C-5'), 115,5 (C-2'), 103,4 (C-10), 102,5 (C-1"), 98,6 (C-6), 93,6 (C-8), 77,4 (C-5"), 76,6 (C-3"), 73,8 (C-2"), 70,3 (C-4"), 61,4 (C-6").

Išskirtų junginių antiradikalinio aktyvumo įvertinimas.

Išgrynintų junginių antiradikalinis aktyvumas išmatuotas DPPH[•] ir ABTS^{•+} sujungimo metodais. Gauti rezultatai palyginti su etaloninių antioksidantų – trolokso ir rozmarinų rūgšties aktyvumu (4 lentelė).

ABTS^{•+} sistemoje (TEAC reikšmės) nustatyta, kad aktyviausiomis antiradikalinėmis savybėmis pasižymėjo kvercetin-3-gliukozidas, o DPPH sistemoje – galo rūgštis. Rezultatai taip pat parodė, kad laisva 4' pozicija flavonoido kvercetino struktūroje svarbi antioksidaciniam junginio aktyvumui, o 3 pozicija tokios didelės reikšmės neturi.

Nustatyta, kad galo rūgštis **1** aktyvumas buvo panašus kaip ir rozmarinų rūgštis. Dideliu antiradikaliniu aktyvumu taip pat pasižymėjo abu kvercetin-3-glikozidai ir elago rūgštis **3**. 4-galoilchino rūgštis **2** taip pat yra aktyvus antiradikalinis junginys, nors šio junginio aktyvumas buvo mažesnis negu kitų išskirtų junginių.

4 lentelė. Stambiašaknio snapučio junginių antiradikalinis aktyvumas

Junginys	TEAC reikšmė po:		I _{DPPH} [•] % esant:	
	1 min.	6 min.	[M _{DPPH}]/ [M _{TC}]=2	[M _{DPPH}]/ [M _{TC}]=10
Rozmarinų rūgštis	1,48	1,52	95	95
Galo rūgštis (1)	1,51	1,63	94	93
4-Galoilchino rūgštis (2)	0,99	1,01	68	8
Elago rūgštis (3)	1,58	1,81	95	75
Kvercetas (4)	1,61	1,74	96	36
Kvercetin-3-gliukozidas (5)	1,64	1,84	93	85
Kvercetin-3-galaktozidas (6)	1,64	1,84	93	85
Kvercetin-4'-gliukozidas (7)	1,42	1,49	86	35

Troloksui ekvivalentiškas antioksidacinis gebėjimas TEAC, išmatuotas po $t = 1$ min. ir $t = 6$ min.; I_{DPPH}[•] – DPPH radikalo redukcija (%); [M_{DPPH}]/[M_{TC}] – DPPH[•] reagento ir tirtų junginių koncentracijų santykis

Krūminės sidabražolės antiradikalinių junginių išskyrimas ir nustatymas

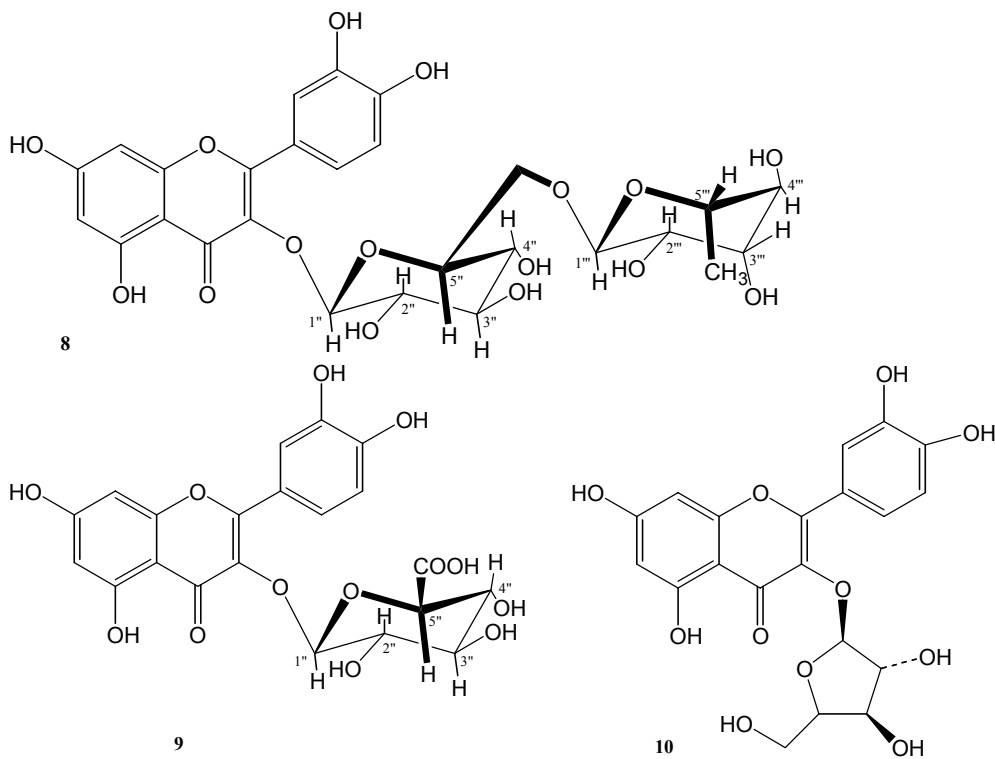
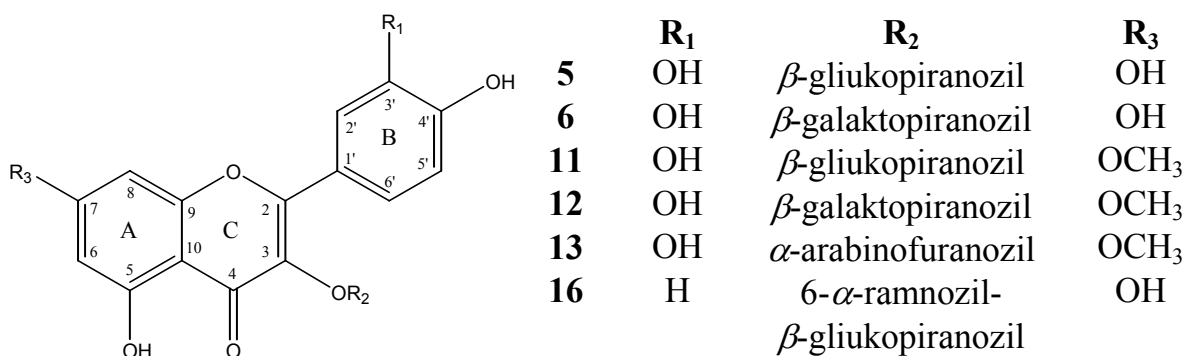
Ekstrakcijos schema ir ekstraktų antiradikalinio aktyvumo įvertinimas.

Krūminės sidabražolės ekstrahavimo ir frakcionavimo schema buvo tokia pati kaip ir stambiašaknio snapučio (2 pav.). Gautos tokios ekstraktų ir frakcijų išeigos: *tret*-butilmetileterinio ekstrakto – 2,6 %, etanolinio ekstrakto – 22,3 %, vandeninio ekstrakto – 20,3 %, etanolinės-butanolinės frakcijos – 10,1 %, etanolinės-vandeninės frakcijos – 12,2 %, vandeninės-butanolinės frakcijos – 4,5 %, vandeninės-vandeninės frakcijos – 15,8 %. Išeigos parodė, kad krūminės sidabražolės žiedai turi daug poliškų junginių. Įvertinus frakcijas nustatyta, kad didžiausiu aktyvumu pasižymėjo etanolinės frakcijos (EB ir EW) ir vandeninė-butanolinė frakcija (WB), šiek tiek mažesniu aktyvumu – vandeninė-vandeninė frakcija (WW). Šių ekstraktų DPPH[•] absorbcijos slopinimas po 30 min. buvo atitinkamai 93,6 %, 94,9 %, 92,3 % ir 55,1 % (galutinis masių santykis tarp radikalų ir ekstraktų tirpaluose buvo 1,5:1). Eterinio ekstrakto antiradikalinis aktyvumas buvo apie 8 kartus silpnesnis nei kitų tirtų frakcijų.

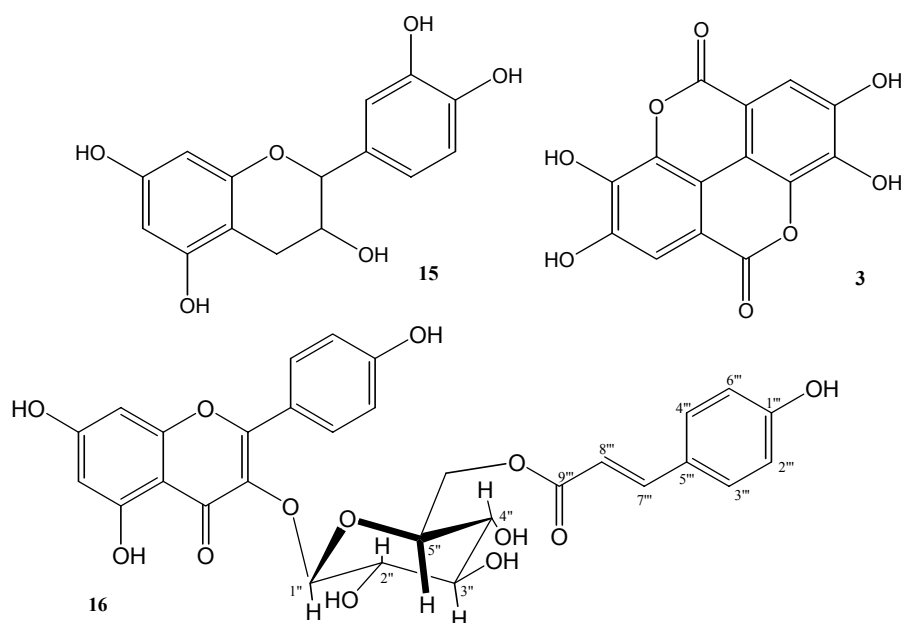
Atskiriems antiradikaliniams junginiams aptikti aktyviausios frakcijos toliau tirtos kombinuotais ESC-DPPH/ABTS metodais. Daugiausiai aktyvių junginių rasta EB ir WB frakcijose. Šios frakcijos atrinktos tolesnei analizei.

Aktyviųjų junginių išskyrimas, išgryninimas ir nustatymas.

Naudojant įvairius spektrometrinius metodus (MS, UV, ¹H BMR, 2D BMR – HMBC, COSY, TOCSY), iš krūminės sidabražolės žiedų išskirta ir nustatyta 12 junginių: kamferol-3-O-β-(6''-O-(E)-*p*-kumaril) gliukopiranozidas **16**, kamferol-3-β-(6''-α-ramnozil) gliukopiranozidas **14**, kvercetin-3-O-β-(6''-α-ramnozil)gliukopiranozidas (rutinas) **8**, kvercetin-3-β-gliukopiranozidas **5**, kvercetin-3-β-galaktopiranozidas **6**, kvercetin-3-β-gliukuronopiranozidas **9**, kvercetin-3-α-arabinofuranozidas **10**, katechinas **15**, elago rūgštis **3**, ramnetin-3-β-gliukopiranozidas **11**, ramnetin-3-β-galaktopiranozidas **12**, ramnetin-3-α-arabinofuranozidas **13** (5 pav.).



5 pav (1/2). Krūminės sidabražolės antiradikalinių junginių struktūros



5 pav (2/2). Krūminės sidabražolės antiradikalinių junginių struktūros

Visi junginiai, išskyrus **3**, **15** ir **6**, nustatyti šiame augale pirmą kartą. **5**, **6** ir **15** junginiai papildomai išskirti ir nustatyti kombinuotu ESC-BMR metodu, naudojant kietos fazės ekstraktorių. Dalis pagrindinių junginių, nustatytų sidabražolėje (**3**, **5**, **6**, **8** ir **15**), yra gerai žinomi kaip antioksidantai.

5 lentelė. Ramnetin-3- β -gliukopiranozido **11**, ramnetin-3- β -galaktopiranozido **12** ir ramnetin-3- α -arabinofuranozido **13** ^1H bei ^{13}C BMR cheminiai poslinkiai ($\delta = \text{ppm}$). Tirpiklis – $\text{DMSO-}d_6$

Pozi- cija	^1H δ , multiplėtiškumas; sujungimo konstantos J (Hz)			^{13}C		
	11	12	13	11	12	13
2				156,8	156,8	157,2
3				133,3	133,1	133,6
4				177,2	177,2	177,5
5				160,7	160,7	160,6
6	6,37, d; 2,0	6,37, d; 2,0	6,38, d; 1,9	97,6	97,6	97,9
7				164,8	164,8	165,2
8	6,71, d; 2,4	6,71, d; 2,4	6,71, d; 2,4	91,9	91,9	92,2
9				156,0	156,0	156,3
10				104,7	104,7	105,1
1'				120,6	120,6	120,7
2'	7,62, d; 2,0	7,58, d; 2,0	7,54, d; 2,0	116,0	115,8	115,7
3'				144,7	144,7	145,3
4'				148,6	148,6	148,9
5'	6,84, d; 8,8	6,82, d; 8,8	6,86, d; 8,4	114,9	114,9	115,8
6'	7,61, dd; 2,0, 8,4	7,69, dd; 2,0, 8,4	7,56, dd; 2,0, 8,4	121,4	121,8	121,8

1"	5,48, d; 7,2	5,40, d; 7,6	5,61, s	100,8	101,4	107,9
2"	3,27, m	3,56, m	4,17, d; 3,3	73,8	70,9	82,0
3"	3,23, m	3,41, m	3,72, m	76,5	72,8	77,0
4"	3,09, m	3,65, m	3,59, m	69,6	67,8	85,9
5"	3,10, m	3,32, m	3,27, dd; 5,0, 12,0 3,34, dd; 3,5, 12,0	77,4	75,6	60,7
6"	3,30, dd; 7,6, 9,6 3,56, dd; 7,6, 9,6	3,31, dd; 5,2, 9,6 3,46, dd; 5,2, 9,6		60,7	59,9	

Kvercetin-3-O- β -rutinozidas (8): UV (MeCN) λ_{maks} 254, 355 nm; ESI-MS (teigiamas jonizacijos režimas) m/z 611 $[M+H]^+$; ^1H BMR duomenys: (CD_3OD) δ 7,67 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H-2'), 7,64 (1H, dd, $J = 2,0, 8,4$ Hz, H-6'), 6,85 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5') 6,39 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-8), 6,21 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H-6), 5,10 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-1'' glukozil), 4,52 (1H, s, H-1''' ramnozil), 3,81-3,26 (10H, m, cukrų protonai), 1,12 (3H, d, $J = 6,1$ Hz, H-6''); ^{13}C BMR duomenys: (DMSO d_6) δ 177,6 (C-4), 165,4 (C-7), 160,9 (C-5), 156,4 (C-2), 156,3 (C-9), 144,7 (C-3'), 140,5 (C-4'), 133,0 (C-3), 121,4 (C-6'), 120,7 (C-1'), 115,9 (C-2'), 115,1 (C-5'), 103,2 (C-10), 101,5 (C-1''), 100,8 (C-1'''), 98,9 (C-6), 93,6 (C-8), 77,5 (C-5''), 76,7 (C-3''), 74,4 (C-2''), 72,1 (C-4''), 70,8 (C-3'''), 70,4 (C-2'''), 70,2 (C-4''), 68,2 (C-5'''), 67,1 (C-6''), 17,6 (C-6''');

Kvercetin-3-O- β -gliukuronopiranozidas (9): UV (MeCN) λ_{maks} 254, 353 nm; ESI-MS (teigiamas jonizacijos režimas) m/z 479 $[M+H]^+$; ^1H BMR duomenys: (CD_3OD) δ 7,98 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,49 (1H, dd, $J = 2,2, 8,5$ Hz, H-6'), 6,84 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5') 6,36 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-8), 6,17 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-6), 5,40 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'' gliukuronozil), 3,28-3,60 (4H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''); ^{13}C BMR duomenys: (DMSO d_6) δ 177,2 (C-4), 172,2 (C-6''), 166,2 (C-7), 160,7 (C-5), 157,0 (C-2), 156,4 (C-9), 148,3 (C-4'), 144,7 (C-3'), 133,8 (C-3), 120,2 (C-6'), 120,2 (C-1'), 117,8 (C-2'), 115,3 (C-5'), 102,3 (C-10), 102,3 (C-1''), 99,2 (C-6), 93,8 (C-8), 76,5 (C-4''), 73,9 (C-2''), 73,9 (C-5''), 71,6 (C-3'');

Kvercetin-3-O- α -arabinofuranozidas (10): UV (MeCN) λ_{maks} 254, 352 nm; ESI-MS (teigiamas jonizacijos režimas) m/z 435 $[M+H]^+$; ^1H BMR duomenys: (CD_3OD) δ 7,52-7,45 (2H, m, H-2', H-6'), 6,89 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-5') 6,37 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-8), 6,18 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-6), 5,45 (1H, s, H-1'' arabinozil), 4,33 (1H, m, H-2''), 3,93-3,80 (2H, m, H-3'', H-4''), 3,49 (1H, m, H-5''); ^{13}C BMR duomenys: (CD_3OD) δ 179,9 (C-4), 166,0 (C-7), 163,0 (C-5), 159,4 (C-2), 158,5 (C-9), 149,8 (C-4'), 146,3 (C-3'), 134,8 (C-3), 123,0 (C-6'), 123,0 (C-1'), 116,8 (C-2'), 116,4 (C-5'), 109,4 (C-1''), 105,6 (C-10), 99,9 (C-6), 94,8 (C-8), 87,8 (C-4''), 83,3 (C-2''), 78,6 (C-3''), 62,4 (C-5'');

Ramnetin-3-O- β -gliukopiranozidas (11): UV (MeCN) λ_{maks} 256, 353 nm; ESI-MS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 477 $[M-H]^-$; ^1H BMR ir ^{13}C BMR cheminius poslinkius žr. 5 lentelėje;

Ramnetin-3-O- β -galaktopiranozidas (12): UV (MeCN) λ_{maks} 256, 353 nm; ESI-MS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 477 $[M-H]^-$; ^1H BMR ir ^{13}C BMR cheminius poslinkius žr. 5 lentelėje;

Ramnetin-3-O- α -arabinofuranozidas (13): UV (MeCN) λ_{maks} 256, 351 nm; ESI-MS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 447 [M-H]⁻; ¹H BMR ir ¹³C BMR cheminius poslinkius žr. 5 lentelėje;

Kamferol-3-O- β -rutinozidas (14): UV (MeCN) λ_{maks} 265, 361 nm; ESI-MS (teigiamas jonizacijos režimas) m/z 595 [M+H]⁺; ¹H BMR duomenys: (CD₃OD) δ 8,06 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, H-2', H-6'), 6,80 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, H-3', H-5'), 6,37 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8) 6,18 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 5,10 (1H, d, $J = 7,3$ Hz, H-1'' gliukozil), 4,50 (1H, s, H-1''' ramnozil), 3,81-3,21 (10H, m, cukrų protonai), 1,11 (3H, d, $J = 6,2$, H-6''' ramnozil);

Katechinas (15): UV (MeCN) λ_{maks} 278 nm; ESI-MS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 289 [M-H]⁻; ¹H BMR duomenys: (CD₃OD) δ 6,84 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,75 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-5'), 6,72 (1H, dd, $J = 2,0, 8,2$ Hz, H-6') 5,93 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-8), 5,86 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H-6), 4,56 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-2), 3,98 (1H, m, H-3), 2,85 (1H, dd, $J = 5,4, 16,1$, H-4), 2,51 (1H, dd, $J = 5,4, 16,1$, H-4_A);

Kamferol-3-O- β -(6''-O-(E)-p-kumaril) gliukopiranozidas (16): UV (MeCN) λ_{maks} 265, 313 nm; ESIMS (neigiamas jonizacijos režimas) m/z 593 [M-H]⁻; ¹H BMR duomenys: (CD₃OD) δ 7,98 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, H-2', H-6'), 7,39 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7''' kumaril), 7,30 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-2''', H-6'''), 6,81 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, H-3', H-5'), 6,79 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-3''', H-5'''), 6,30 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), 6,12 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,07 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-8'''), 5,22 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1''), 4,27 (1H, dd, $J = 2,2, 11,8$ Hz, H-6''_A), 4,18 (1H, dd, $J = 6,6, 11,8$ Hz, H-6''_B), 3,47-3,29 (4H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''); ¹³C BMR duomenys: (DMSO d_6) δ 180,0 (C-4), 168,9 (C-9'''), 167,2 (C-7), 163,0 (C-5), 161,4 (C-4', C-4'''), 159,3 (C-2), 158,6 (C-9), 146,7 (C-7'''), 135,2 (C-3), 132,2 (C-2', C-6'), 131,3 (C-2''', C-6'''), 127,2 (C-1'''), 122,8 (C-1'), 116,9 (C-3', C-5'), 116,1 (C-3''', C-5'''), 114,8 (C-8'''), 105,4 (C-10), 104,1 (C-'), 100,5 (C-6), 95,2 (C-8), 78,1 (C-3''), 75,8 (C-2'', C-5''), 71,8 (C-4''), 64,5 (C-6'').

Išskirtų junginių antiradikalinio aktyvumo įvertinimas.

Junginių antiradikalinis aktyvumas, vertinant DPPH[•] ir ABTS^{•+}, sistemose buvo panašus. Didesnis nesutapimas pastebėtas kamferol-3-O- β -(6''-O-(E)-p-kumaril) gliukopiranozido atveju, kurio aktyvumas ABTS^{•+} sujungimo metodu buvo gerokai didesnis nei DPPH[•] metodu. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo katechinas **15** ir elago rūgštis **3**. Iš chromatografijos analizės smailių plotų nustatyta, kad šie junginiai kartu su kvercetino glikozidais **5**, **6** ir **8** yra pagrindiniai augalo antiradikaliniai komponentai.

6 lentelė. Išskirtų iš krūminės sidabražolės junginių antiradikalinis aktyvumas

Junginys	TEAC reikšmė po:		I _{DPPH} % esant:	
	1 min.	6 min.	[M _{DPPH} /M _{TC}]=2	[M _{DPPH} /M _{TC}]=10
<i>Troloksas</i>	1	1	96	38
<i>Rozmarinų rūgštis</i>	1,37	1,44	97	38
Kvercetin-3- β -gliukopiranozidas (5)	1,53	1,95	91	27
Kvercetin-3- β -galaktopiranozidas (6)	1,53	1,95	91	27

Kvercetin-3- β -rutinozidas (8)	1,25	1,63	89	10
Kvercetin-3- β -gliukuronopiranozidas (9)	0,26	0,38	36	6,6
Kvercetin-3- α -arabinofuranozidas (10)	0,91	1,18	80	17
Ramnetin-3- β -gliukopiranozidas (11)	0,85	1,22	92	16
Ramnetin-3- β -galactopiranozidas (12)	0,85	1,22	92	16
Ramnetin-3- α -arabinofuranozidas (13)	0,49	0,65	81	5,2
Kamferol-3- β -rutinozidas (14)	0,84	1,13	26	6,3
Katechinas (15)	1,54	1,57	96	80
Elago rūgštis (3)	1,4	1,83	95	77
Kamferol-3-O- β -(6"-O-(E)- <i>p</i> -kumaril)gliukopiranozidas (16)	1,12	1,43	1,2	0,1

Tų pačių junginių, išskirtų iš snapučio ir sidabražolės ekstraktų, nežymaus aktyvumo skirtumų priežastis (5, 6 ir 15) galėjo būti nevienodas šių išskirtų junginių grynumas.

Antiradikalinių junginių kiekio stambiašaknio snapučio ir krūminės sidabražolės skirtingose botaninėse dalyse palyginimas

Nustačius pagrindinius antiradikalinius junginius augalų ekstraktuose, kitas darbo etapas buvo kiekybiškai palyginti šių junginių pasiskirstymą skirtingose augalų dalyse: snapučio lapuose ir šaknyse bei sidabražolės žieduose ir lapuose. Toks palyginimas atliktas pagal atskirų junginių TIC signalo intensyvumą ESC-MS analizės metu (7 ir 8 lentelės).

7 lentelė. Pagrindinių antiradikalinių junginių smailių plotai ir jų santykis etanoliniuose snapučio lapų ir šaknų ekstraktuose

Junginys	TIC plotas (sąlyginiais vienetais)		
	Lapų ekstraktuose	Šaknų ekstraktuose	Santykis (lapų/šaknų)
Kvercetin-3-gliukozidas ir galaktozidas (5,6)	219 648	4 886	45
Elago rūgštis (3)	207 010	34 024	6
Kvercetas (4)	1 535 179	37 172	41

Nustatyta, kad stambiašaknio snapučio lapų etanoliniame ekstrakte pagrindinių antiradikalinių junginių kiekis yra 6 – 45 kartus didesnis nei šaknų ekstrakte.

8 lentelė. Pagrindinių antiradikalinių junginių smailių plotai ir jų santykis sidabražolės žiedų EB ir lapų etanoliniame ekstraktuose

Junginys	TIC plotas (sąlyginiais vienetais)		
	Žiedų ekstraktuose	Lapų ekstraktuose	Santykis (žiedų/lapų)
Katechinas (15)	1 862 556	977 177	1,91
Kvercetin-3-rutinozidas (8)	131 418	51 974	2,53
Kvercetin-3-gliukozidas ir galaktozidas (5,6)	722 730	275 809	2,62
Kvercetin-3-gliukuronozidas (9)	438 333	229 410	1,91
Kvercetin-3-arabinozidas (10)	402 420	217 373	1,85
Kamferol-3-rutinozidas (14)	21 374	13 639	1,57
Kamferol-3-kumrilgliukozidas (16)	149 680	-	-
Ramnetin-3-gliukozidas ir galaktozidas (11, 12)	177 978	237 361	0,75
Ramnetin-3-arabinozidas (13)	110 769	114 140	0,97

Lyginant sidabražolės skirtingų botaninių dalių ekstraktus, antiradikalinių junginių kiekio skirtumai buvo gerokai mažesni nei snaputyje. Reikia pastebėti, kad palyginimui paimti žiedų etanolinė-butanolinė frakcija ir lapų etanolinis ekstraktas yra šiek tiek skirtingai paruošti, todėl šis palyginimas nėra visiškai objektyvus. Vis tik matyti, kad netgi pirminis etanolinis lapų ekstraktas turėjo mažiau pagrindinių antiradikalinių junginių nei fracionuotas žiedų ekstraktas.

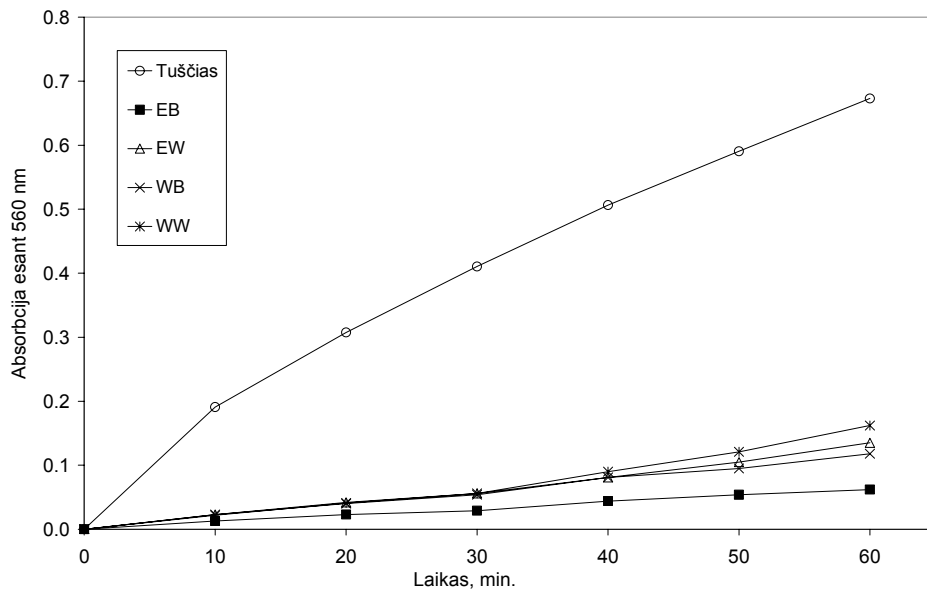
Snapučio ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Maisto produktų oksidacijos procesai yra labai sudėtingi. Jų metu susidaro įvairūs pirminiai ir antriniai oksidacijos produktai. Šioms reakcijoms įtakos turi įvairūs veiksniai: temperatūra, šviesa, metalų jonų buvimas ir kt. Dėl šių priežasčių, norint visapusiškai ištirti antioksidantus, naudojamus maisto produktams apsaugoti, yra tikslinga taikyti metodus, kurie skirti skirtingoms oksidacijos stadijoms ar susidarantiems produktams.

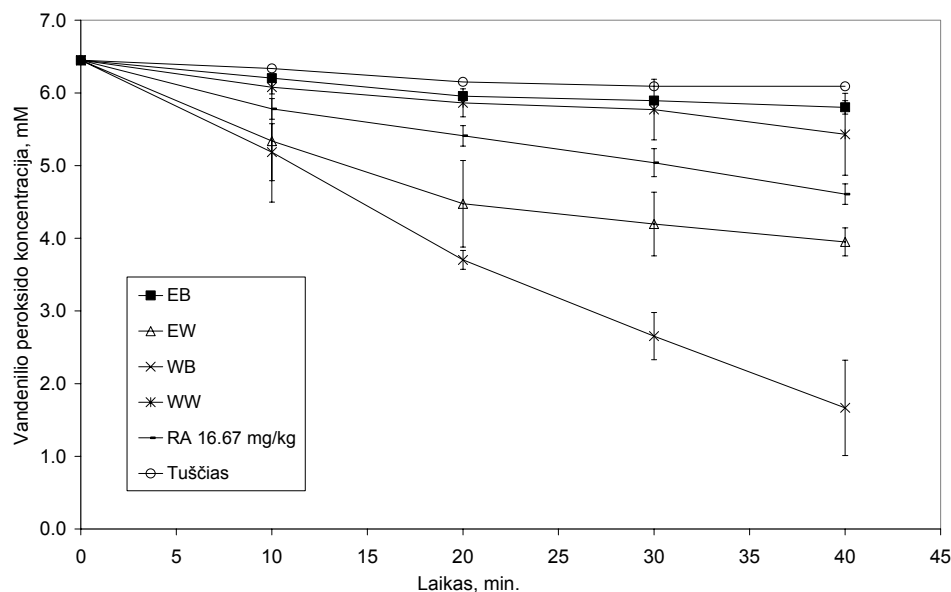
Superoksido radikalo ir vandenilio peroksido sujungimo pajėgumas.

Superoksido radikalo anijonas ($O_2^{\bullet-}$) – vienas iš reaktingų deguonies rūšių, daugiausiai susidarantis gyvoje ląstelėje. Atliekant tyrimus, superoksido radikalas buvo gaminamas ksantino ir ksantino oksidzės fermentinėje sistemoje.

Visi 200 mg/kg koncentracijos snapučio ekstraktai efektyviai sujungė superoksido anijono radikalus (6 pav.). Poveikis buvo beveik toks pat ekstraktus praskiedus 4 kartus (50 mg/kg). Tuščio bandymo metu būdinga redukuotam NBT reagentui mėlyna spalva palaipsniui intensyvėjo, o bandiniuose su snapučio ekstraktų priedais šis intensyvumo didėjimas buvo nežymus.



6 pav. Snapučio ekstraktų (50 mg/kg) gebėjimas sujungti superoksido radikalo anijonus, išreikštas redukuoto NBT indikatoriaus intensyvumu



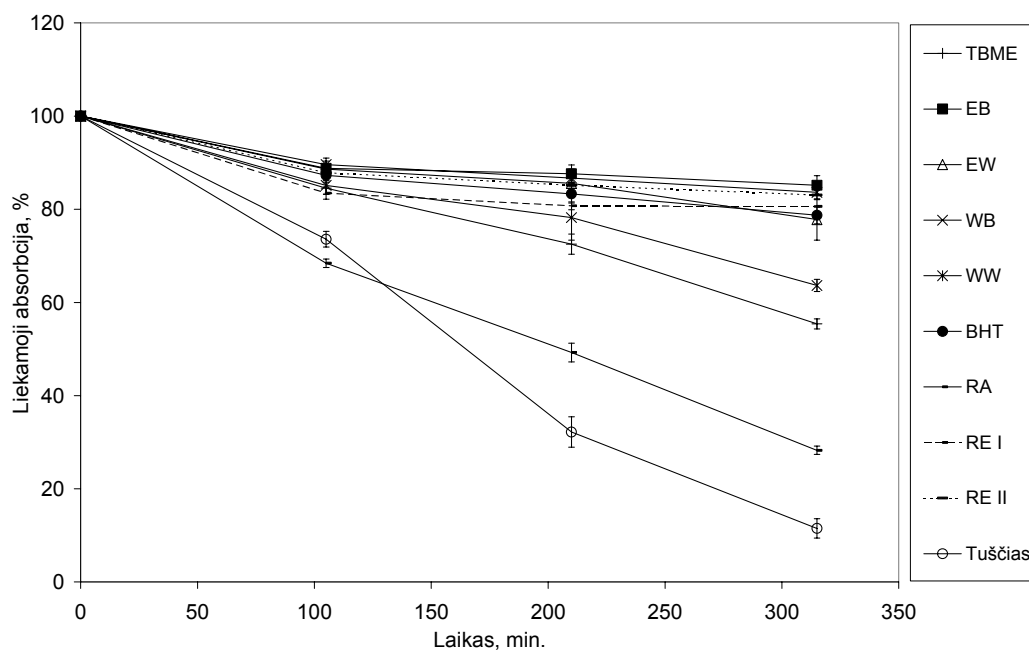
7 pav. Snapučio ekstraktų (33,3 mg/kg) gebėjimas sujungti vandenilio peroksida

Atliekant sujungimo testą, atskirų ekstraktų gebėjimas sujungti vandenilio peroksida, kito esant platesnėms riboms, nei superoksido radikalo teste (7 pav.):

WB ir EW frakcijos buvo efektyviausios. Reikia pastebėti, kad labiausiai poliškios snapučio frakcijos (WW ir EW) geriau tirpo reakcijos terpėje (vandeniniame buferyje) nei kitos mažiau hidrofilinės frakcijos (pvz., EB). Dėl šios priežasties tikėtina, kad mažiau poliškų frakcijų aktyvumas, atliekant šį testą, ir buvo silpnesnis. Atliekant aliejaus oksidacijos matavimus, šių frakcijų aktyvumas buvo stipresnis, nes jų tirpumas aliejuje buvo geresnis.

β-karotino blukinimo testas.

Visi tirti snapučio ekstraktai sulėtino linoleno rūgšties oksidaciją ir drauge β-karotino spalvos intensyvumo mažėjimą reakcijos sistemoje. Rezultatai, išreikšti liekamąja karotino absorbcija emulsijoje, pavaizduoti 8 paveiksle. Palyginimui panaudotų antioksidantų – rozmarinų rūgšties (RA) ir BHT – koncentracijos emulsijoje buvo 10 kartų mažesnės. Matyti, kad RA tirpalas nebuvo efektyvus ir neapsaugojo β-karotino nuo išblukimo, o BHT koncentracija buvo pakankama. Visi snapučio ekstraktai stabdė oksidacijos procesus reakcijos sistemoje. TBME ir WW frakcijos pasižymėjo silpniausiomis savybėmis, o kiti ekstraktai buvo labai efektyvūs: liekamoji emulsijų su šių ekstraktų priedais absorbcija po 320 min. buvo apie 80 % pirminės absorbcijos. Norint palyginti, išmatuotas komercinių rozmarino ekstraktų (RE I ir II) aktyvumas, kuris buvo panašus į snapučio ekstraktų aktyvumą.

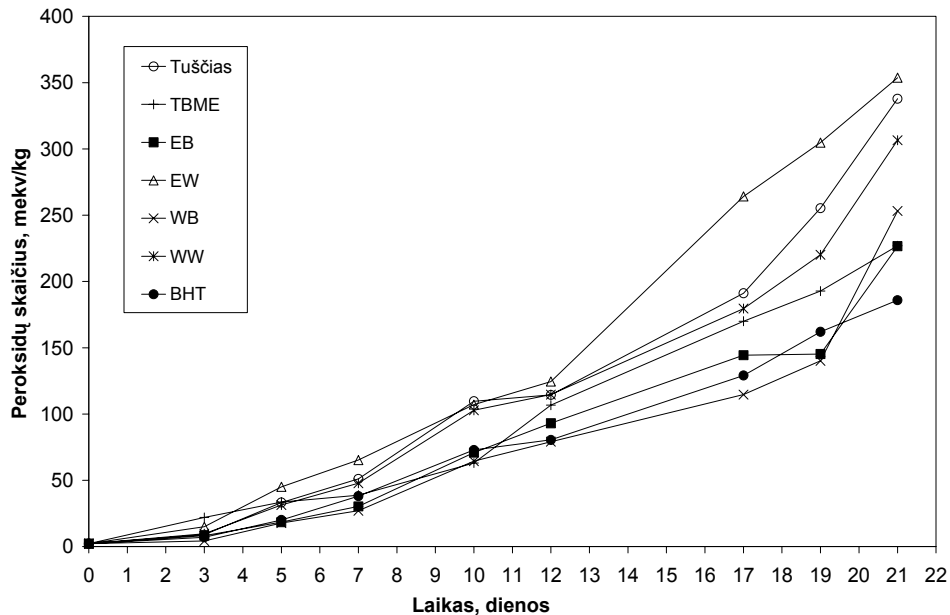


8 pav. Snapučio ekstraktų efektyvumas β-karotino-linoleno rūgšties sistemoje

Ekstraktų įtaka peroksidams susidaryti aliejuje.

Rapsų aliejaus su įvairiais snapučio ekstraktų priedais oksidacijos procesas buvo vertinamas pagal peroksidų skaičiaus kitimą (9 pav.). Pagal gautas kreives

apskaičiuoti ekstraktų indukcijos periodai ir antioksidaciniai efektyvumai (9 lentelė).



9 pav. PS kitimas bandiniuose su stambiašaknio snapučio ekstraktų priedais rapsų aliejaus oksidacijos metu, esant 55 °C temperatūrai

Reikia vėl pabrėžti, kad visi tirti snapučio ekstraktai buvo gana poliški, todėl jų tirpumas ir drauge aktyvumas nepoliškame aliejuje buvo gana silpnas. Poliškiausios WW ir EW frakcijos neturėjo jokio poveikio aliejui, tiriant jas šiuo metodu. Nors abi butanolinės frakcijos taip pat silpnai tirpo aliejuje, jos slopino oksidacijos reakciją (antioksidacinis efektyvumas lygus 1,33). Sintetinio antioksidanto BHT efektyvumas (esant 10 kartų mažesnei koncentracijai) taip pat buvo nedidelis – 1,25.

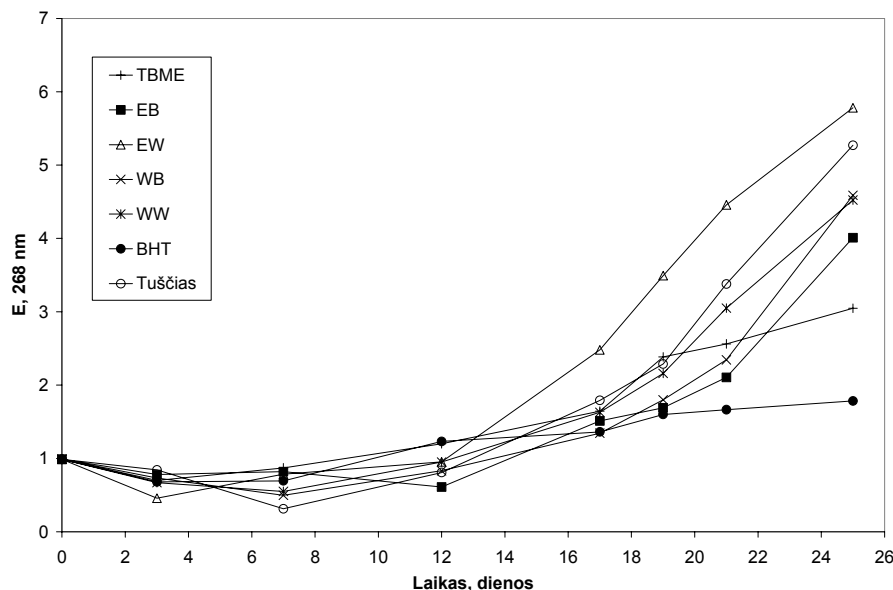
9 lentelė. Rapsų aliejaus su stambiašaknio snapučio ekstraktų priedais indukcijos periodai ir ekstraktų antioksidacinis efektyvumas ($IP_0 = 96$ val., $AE = 1$)

Ekstraktai	IP (val.)	AE
TBME	79	0,83
EB	127	1,33
EW	84	0,88
WB	127	1,33
WW	96	1,00
BHT	120	1,25

Ekstraktų įtaka konjuguotiesiems dienams ir trienams susidaryti aliejuje.

Matuojant konjuguotųjų dienų, kaip pirminių oksidacijos produktų, kitimą aliejaus oksidacijos metu, ryškių skirtumų tarp mėginių su įvairiais snapučio ekstraktų priedais, sintetiniu antioksidantu BHT ir tuščiu bandiniu nebuvo

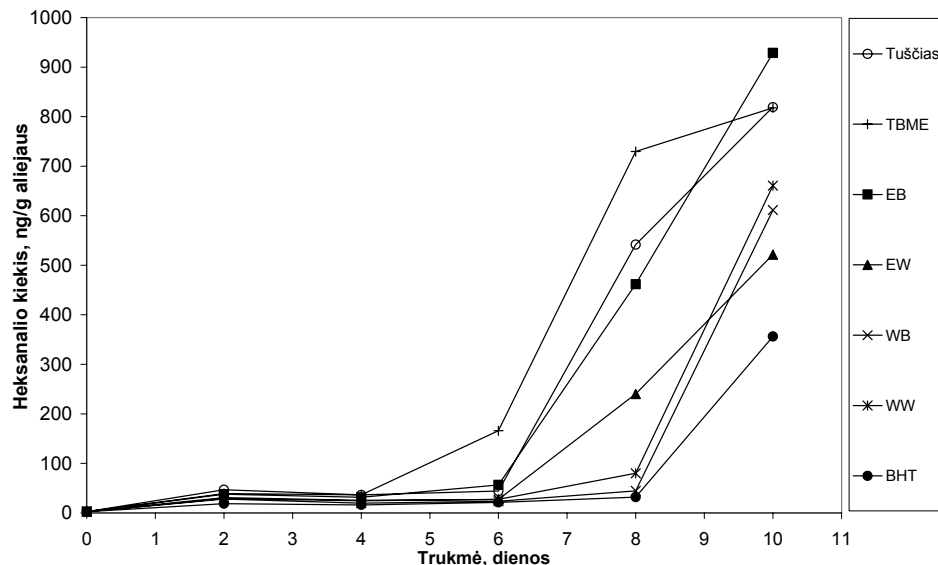
pastebėta. Konjuguotųjų trienų, kaip antrinių oksidacijos produktų, didėjimas aliejaus oksidacijos metu pastebėtas tik maždaug po 12 dienų IP laiko (10 pav.). Lėčiausias konjuguotųjų trienų susidarymas išmatuotas mėginyje su BHT priedu. Visi snapučio ekstraktai (išskyrus EW frakciją) taip pat pasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu šiame teste – susiformavusių konjuguotųjų trienų kiekis aliejaus oksidacijos metu buvo mažesnis nei tuščiame mėginyje.



10 pav. Snapučio ekstraktų įtaka konjuguotiesiems trienams formuotis rapsų aliejaus oksidacijos metu, esant 55 °C temperatūrai

Ekstraktų įtaka susidariusio heksanolio kiekiui aliejaus viršerdvėje.

Didesnis susiformavusio heksanolio kiekis aliejaus viršerdvėje pastebimas tik po tam tikro indukcinio periodo (11 pav.).



11 pav. Stambiašaknio snapučio ekstraktų įtaka susiformavusio heksanolio kiekiui dygminių aliejaus viršerdvėje oksidacijos metu, esant 55 °C temperatūrai

Ekstraktų antioksidacinis efektyvumas apskaičiuotas, dalinant išmatuotų bandinių IP iš tuščio bandinio IP (10 lentelė). Iš pateiktų rezultatų matyti, kad etanolinės snapučio frakcijos buvo efektyvesnės už kitas frakcijas (AE = 1,33, toks pats kaip mėginyje su sintetiniu BHT). TBME ekstraktas pasižymėjo prooksidacinėmis savybėmis šiame teste.

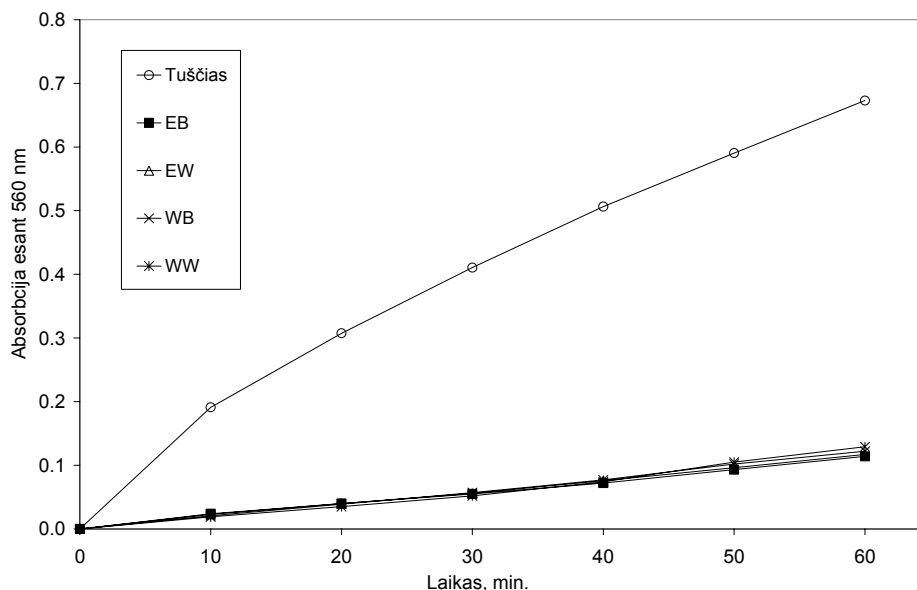
10 lentelė. Snapučio ekstraktų antioksidacinis efektyvumas, apskaičiuotas pagal oksidacijos kreives.

Bandinys	Antioksidacinis efektyvumas (AE)
TBME	0,83
EB	1,33
EW	1,33
WB	1,00
WW	1,00
BHT	1,33
Tuščias	1,00

Sidabražolės ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

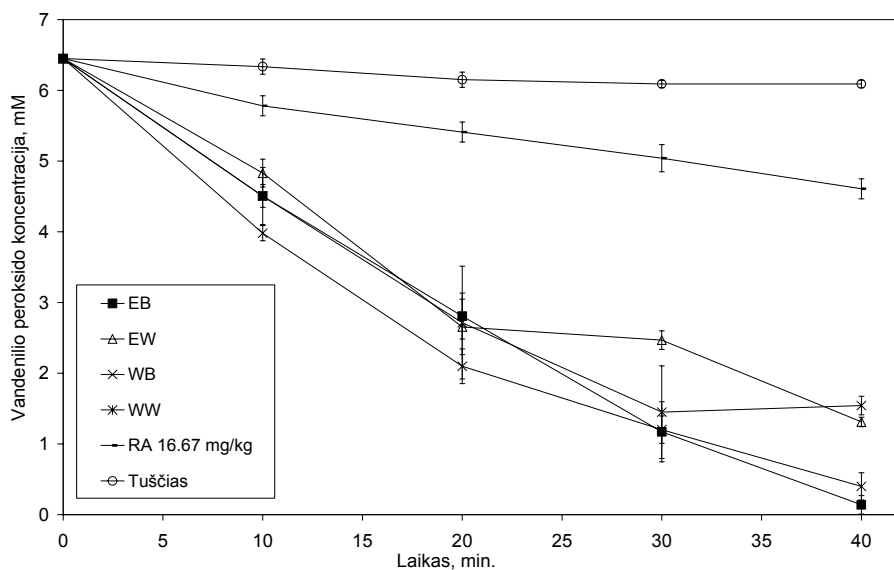
Superoksido radikalo ir vandenilio peroksido sujungimo pajėgumas.

Panašiai kaip ir stambiašaknio snapučio atveju, krūminės sidabražolės ekstraktai efektyviai sujungė superoksido anijono radikalus (12 pav.).



12 pav. Krūminės sidabražolės ekstraktų (50 mg/kg) gebėjimas sujungti superoksido anijono radikalus

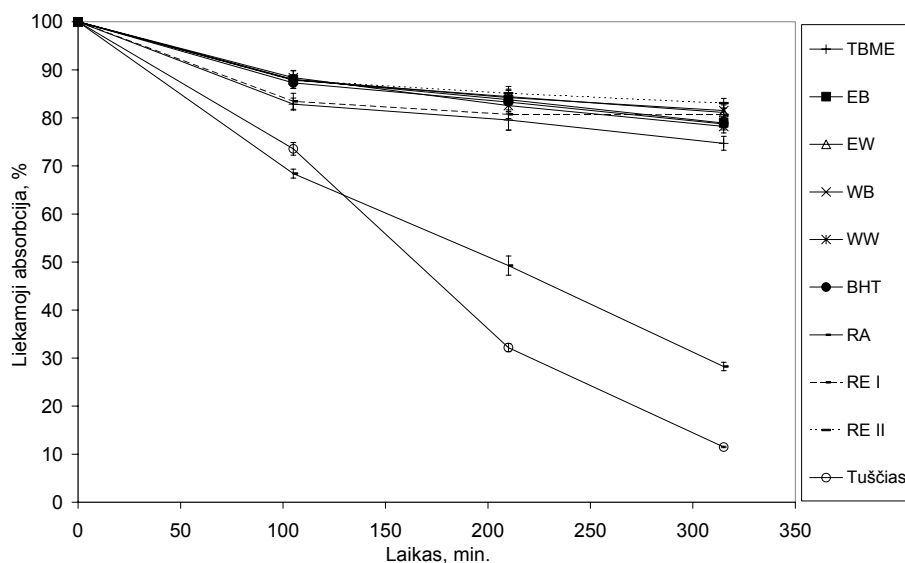
Reikia taip pat paminėti galimybę, kad tirti snapučio ir sidabražolės ekstraktai galėjo tiesiogiai veikti kaip fermento, dalyvaujančio susidarant superoksido anijono radikalui, inhibitoriai.



13 pav. Krūminės sidabražolės ekstraktų (33,3 mg/kg koncentracijos) vandenilio peroksido sujungimo gebėjimas

Vandenilio peroksido sujungimo kreivės bandiniuose su sidabražolės ekstraktų priedais pavaizduotos 13 paveiksle. Iš jų matyti, kad sidabražolės ekstraktai efektyviai sujungė vandenilio peroksida. Tam, kad būtų galima palyginti, tirtas rozmarinų rūgšties aktyvumas (16,6 mg/kg), kuris buvo silpnas.

β -Karatino blukinimo testas.



14 pav. Sidabražolės ekstraktų efektyvumas β -karotino-linoleno rūgšties sistemoje

Krūminės sidabražolės ekstraktų gebėjimas stabdyti linoleno rūgšties, drauge ir β -karotino oksidaciją pavaizduotas 14 paveiksle. Iš jo matyti, kad visi bandiniai su augalo žiedų ekstraktų priedais buvo efektyvūs tirtoje sistemoje

(liekamoji absorbcija po 315 min. buvo 78–81 %). Silpnesnėmis savybėmis pasižymėjo TBME ekstraktas.

Ekstraktų įtaka peroksidams susidaryti aliejuje.

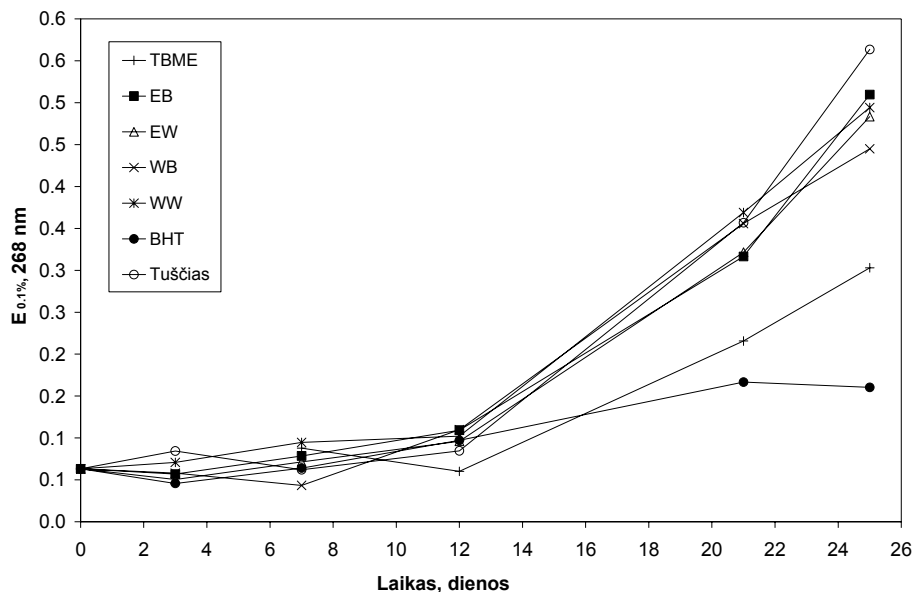
Poliškos sidabražolės žiedų frakcijos (EW, WW ir WB) neturėjo žymesnių antioksidacinių savybių atlikus testą (11 lentelė). Labiausiai tikėtina, kad tai taip pat susiję su nepakankamu šių frakcijų tirpumu aliejuje. Nepoliškas TBME ekstraktas gerai tirpo aliejuje ir pasižymėjo geriausiu antioksidaciniu efektyvumu iš tirtų frakcijų (AE = 1,13).

Ekstraktas	IP (val.)	AE
TBME	108	1,13
EB	101	1,05
EW	98	1,03
WB	113	1,18
WW	96	1,00
BHT	120	1,25

11 lentelė. Rapsų aliejaus su krūminės sidabražolės ekstraktais indukcijos periodai ir ekstraktų antioksidacinis efektyvumas (IP₀ = 96 val., AE = 1)

Ekstraktų įtaka konjuguotiesiems dienams ir trienams susidaryti aliejuje.

Ryškių konjuguotųjų dienų kitimo skirtumų tarp visų bandinių (be ekstraktų priedų ir su jais) aliejaus oksidacijos metu nebuvo pastebėta.



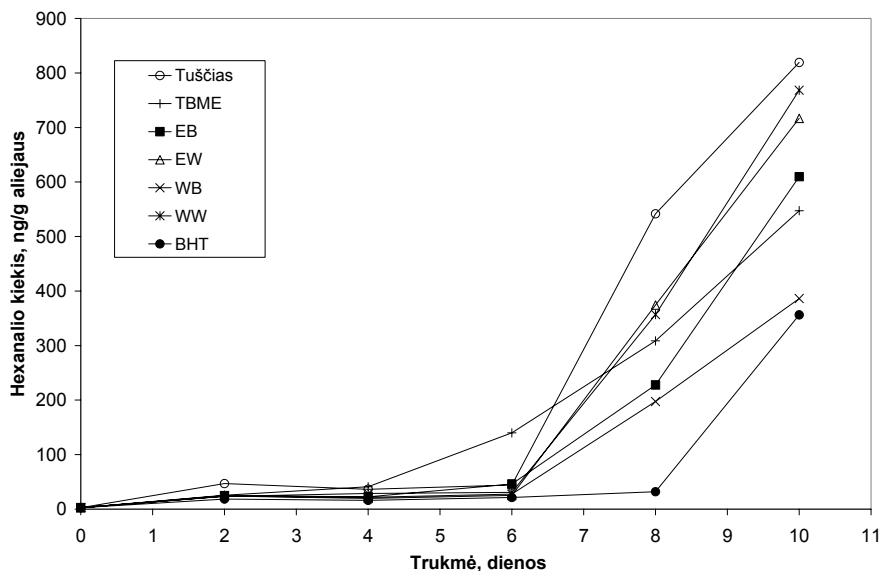
15 pav. Krūminės sidabražolės ekstraktų įtaka konjuguotiesiems trienams formuotis rapsų aliejaus oksidacijos metu, esant 55 °C temperatūrai

Eksperimento metu užfiksuotas bendras konjuguotųjų dienų kiekio didėjimas, tačiau skirtumai tarp atskirų bandinių buvo labai nežymūs. Lėčiausias konjuguotųjų trienų formavimasis nustatytas bandiniuose su BHT priedu. TBME ekstraktas pasižymėjo didžiausiu aktyvumu, nors jokių

antiradikalinių junginių šiame ekstrakte nebuvo nustatyta (15 pav.). Tai taip pat reikėtų sieti su geru šio ekstrakto tirpumu aliejuje.

Ekstraktų įtaka susidariusio heksanalio kiekiui aliejaus viršerdvėje.

Dujų chromatografijos būdu išmatuotas heksanalio kiekio kitimas aliejaus viršerdvėje oksidacijos metu pavaizduotas 16 paveiksle.



16 pav. Krūminės sidabražolės ekstraktų įtaka heksanalio kiekiui dygminių aliejaus viršerdvėje oksidacijos metu, esant 55 °C temperatūrai

Iš kreivių matyti, kad beveik visų frakcijų IP buvo vienodi – 6 dienos. TBME ekstrakto IP buvo trumpesnis (4 dienos), netgi trumpesnis už tuščio bandinio IP. Šis rezultatas, rodantis TBME ekstrakto prooksidacinį efektą, nesutapo su kitų oksidacijos testų aliejuje rezultatais, kur šis ekstraktas turėjo tam tikrą aktyvumą. Tai taip pat patvirtina oksidacinio proceso sudėtingumą, ypač jo vėlesnėse stadijose. Daugumos sidabražolės frakcijų IP šiame teste buvo tokie patys kaip ir tuščio bandinio, tačiau iš kreivių matyti, kad heksanalio formavimasis po indukcinio periodo bandiniuose su priedais buvo lėtesnis nei tuščiam bandinyje. Ilgiausias IP ir didžiausias AE užfiksuotas bandiniuose su BHT priedu.

Preliminarus ekstraktų saugos įvertinimas*

Stambiašaknis snaputis ir krūminė sidabražolė yra gana menkai žinomi augalai. Literatūroje rasta labai mažai duomenų apie šių augalų panaudojimą maiste. Dėl šios priežasties, svarstant apie snapučio ir sidabražolės ekstraktų

* Preliminarūs saugos įvertinimo eksperimentus atliko dr. Audronė Marozienė ir dr. Narimantas Čėnas iš Biochemijos instituto bei dr. Gražina Slapšytė, dr. Liucija Dimanskienė ir prof. Juozas Lazutka iš Vilniaus universiteto. Apibendrinti tyrimų rezultatai pateikiami autoriams sutikus.

kaip antioksidantų, praktinį pritaikymą maiste, buvo labai svarbu preliminariai įvertinti šių augalų ekstraktų saugą.

Darbe tirtas sidabražolės (EB) ir snapučio (EB ir WW) ekstraktų frakcijų reakingumas peroksidazės ir tirozinazės atžvilgiu. Fermentai peroksidazės, oksidatoriumi naudojantys H_2O_2 , arba tirozinazės, naudojantys deguonį, gali oksiduoti polifenolinius junginius ir susidarę oksidacijos produktai ląstelėje gali būti geno- ar citotoksiški. Nustatyta, kad, palyginti su gryno junginio flavonoido kvercetino reakingumu, ekstraktų komponentai peroksidazės atžvilgiu reaguoja daug lėčiau. Tačiau pastarieji daug greičiau gali būti oksiduojami tirozinaze.

Toliau tirtas polifenolinių ekstraktų gebėjimas neutralizuoti singletinį deguonį. Al-ftalocianino tetrasulfonato švitinimo metu susidaręs singletinis deguonis (1O_2) lizuoja eritrocitus, o polifenoliniai junginiai lėtina šį procesą, reaguodami su 1O_2 ir taip ilgindami eritrocitų lizio puslaidį ($t_{1/2}$). Nustatyta, kad tirti snapučio ir sidabražolės ekstraktai efektyviai neutralizavo singletinio deguonies poveikį eritrocitams. Todėl šie ekstraktai gali būti perspektyvūs kaip maisto molekulių fotooksidaciją sulėtinantys agentai.

Kitas darbo tikslas buvo ištirti stambiašaknio snapučio ir krūminės sidabražolės ekstraktų frakcijų genotoksiškumą somatinių mutacijų ir rekombinacijų (SMART) *Drosophila melanogaster* sparnų ląstelėse metodu. Nustatyta, kad nei vienas iš tirtų snapučio ir sidabražolės ekstraktų mėginių neindukavo patikimo somatinių mutacijų kiekio padidėjimo, taigi jie nėra genotoksiški šiame *in vivo* teste. Tai rodo, kad tirtos frakcijos yra potencialiai saugios ir jų praktinio panaudojimo tyrimai gali būti tęsiami.

IŠVADOS

1. Įvertinus Lietuvoje užaugintų vaistinio šalavijo (*Salvia officinalis*), kvapniojo šalavijo (*Salvia sclarea*), lipniojo šalavijo (*Salvia glutinosa*), pievinio šalavijo (*Salvia pratensis*), tikrosios levandos (*Lavandula angustifolia*), vaistinės medetkos (*Calendula officinalis*), vaistinės ramunėlės (*Matricaria recutita*), rausvažiedės ežiulės (*Echinacea purpurea*), tikrojo rapontiko (*Rhaponticum carthamoides*), graikinio riešutmedžio (*Juglans regia*), geltonžiedžio barkūno (*Melilotus officinalis*), stambiašaknio snapučio (*Geranium macrorrhizum*) ir krūminės sidabražolės (*Potentilla fruticosa*) metanolinių, etilacetatinių ir acetoninių ekstraktų antiradikalinį aktyvumą modeliniais radikalų sujungimo testais, nustatyta, kad stambiašaknio snapučio ir krūminės sidabražolės ekstraktai pasižymėjo stipriausiomis savybėmis.

Bendras fenolinių junginių kiekis, nustatytas metanoliniuose augalų ekstraktuose, gerai koreliavo su tirtų augalų ekstraktų antiradikaliniu aktyvumu.

2. Atrinktų augalų ekstraktuose nustatytos pagrindinių antiradikalinų junginių struktūros. Stambiašaknio snapučio ekstraktuose nustatyti septyni junginiai: galo rūgštis, 4-galoilchino rūgštis, elago rūgštis, flavonoidas kvercetas, kvercetin-3- β -gliukopiranozidas, kvercetin-3- β -

galaktopiranozidas, kvercetin-4'- β -gliukopiranozidas. Penki iš šių junginių nustatyti augale pirmą kartą. Krūminės sidabražolės ekstraktuose nustatyta dvylika junginių: elago rūgštis, katechinas, kvercetin-3- β -gliukopiranozidas, kvercetin-3- β -galaktopiranozidas, kvercetin-3- β -rutinozidas, kvercetin-3- β -gliukuronopiranozidas, kvercetin-3- α -arabinofuranozidas, kamferol-3- β -rutinozidas, kamferol-3-O- β -(6"-O-(E)-p-kumaril) gliukopiranozidas, ramnetin-3- β -gliukopiranozidas ir ramnetin-3- β -galaktopiranozidas. Devyni iš jų nustatyti augale pirmą kartą.

3. Modeliniais radikalų sujungimo metodais, įvertinus išskirtų junginių antiradikalinį aktyvumą, nustatyta, kad kvercetin-3-glikozidai ir elago rūgštis buvo stipriausi snapučio antiradikaliniai junginiai; flavonoidas katechinas ir kvercetin-3-glikozidai buvo aktyviausi sidabražolės junginiai. Šių junginių aktyvumas buvo panašus į etaloninio antioksidanto rozmarinų rūgšties aktyvumą ir 1,4–1,95 kartus stipresnis, palyginti su troloksu.

4. Realiose sistemose (aliejaus oksidacijos metu) ir modeliniais metodais įvertinus augalų ekstraktų ir frakcijų antioksidacinės savybes, nustatyta, kad etanolinė-butanolinė ir vandeninė-butanolinė snapučio frakcijos pasižymėjo stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu. Kitos snapučio frakcijos buvo mažiau efektyvios aliejaus oksidacijos sistemose, tačiau efektyvios modelinėse sistemose. Sidabražolės frakcijos taip pat pasižymėjo stipriomis antioksidacinėmis savybėmis poliškoje terpėje (modelinėse sistemose), tačiau veikė silpniau aliejaus oksidacijos sistemose.

5. Dėl didelio hidrofilinių junginių kiekio snaputyje ir sidabražolėje, šių augalų ekstraktai gali būti lengvai paruošiami naudojant pigius ir saugius maisto gamyboje tirpiklius, kaip etanolis ar vanduo. Šie ekstraktai gali būti efektyviai panaudoti kaip antioksidantai hidrofiliinėse sistemose.

6. Lyginant antiradikalinių junginių kiekį skirtingose snapučio ir sidabražolės botaninėse dalyse, nustatyta, kad etanoliniai snapučio lapų ekstraktai yra turtingesni antioksidaciniais junginiais nei augalo šaknų ekstraktai. Sidabražolės žiedų ekstraktai turi daugiau antioksidacinių junginių nei augalo lapų ekstraktai.

7. Darbe preliminariai įvertinta snapučio ir sidabražolės ekstraktų sauga (citotoksiškumas ir genotoksiškumas).

7.1. Ištyrus ekstraktų fermentinę oksidaciją peroksidaze ir tirozinaze nustatyta, kad ekstraktų reakingumas peroksidazės atžvilgiu yra palyginti mažas, tačiau didelis tirozinazės atžvilgiu.

7.2. Augalų ekstraktai buvo efektyvūs, neutralizuojant singletinio deguonies sukeltą eritrocitų hemolizę, todėl gali būti perspektyvūs kaip maisto molekulių fotooksidaciją sulėtinantys agentai.

7.3 Snapučio ir sidabražolės ekstraktų frakcijos nėra genotoksiškos *Drosophila melanogaster* testo sistemoje *in vivo*. Tai rodo, kad tirtos frakcijos yra potencialiai saugios ir jų tolimesni praktinio panaudojimo tyrimai yra perspektyvūs.

NAUDOTOS SANTRUMPOS

ABTS – 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sieros rūgštis) diamonio druska
AE – antioksidacinis efektyvumas
APCI – cheminė jonizacija (atmospheric pressure chemical ionization)
BHT - butilhidroksitoluenas
BMR – branduolių magnetinis rezonansas
DPPH – 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil hidratas
EB – etanolinė-butanolinė
ESC – efektyvioji skystinė chromatografija
ESI – elektrinė jonizacija (electrospray ionization)
EW – etanolinė vandeninė
GRE – galo rūgštis ekvivalentas
I – absorbcijos sumažėjimas (inhibition)
IP – indukcinis periodas
MS – masių spektrometrija
NBT – nitro žydysis tetrazolas (nitro blue tetrazolium)
PS – peroksidų skaičius
RA – rozmarinų rūgštis
RE I, II – rozmarinų ekstraktai
RSA – radikalų sujungimo aktyvumas
SC – skystinė chromatografija
TBME – *tert*-butilmetileteris
TEAC – troloksui ekvivalentiška antioksidacinė galia (trolox equivalent antioxidant capacity)
TIC – bendra jonų srovė (total ion current)
WB – vandeninė-butanolinė
WW – vandeninė-vandeninė

MOKSLINIŲ STRAIPSNIŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS **Straipsniai, publikuoti leidiniuose, įrašytuose į Mokslinės informacijos** **instituto (ISI) sąrašą**

1. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231–237.
2. Miliauskas, G., van Beek, T. A., Venskutonis, P. R., Linssen, J. P. H. and de Waard, P. 2004. Antioxidant activity of *Geranium macrorrhizum* L. *European Food Research and Technology*, 218, 253–261.
3. Miliauskas, G., van Beek, T. A., Venskutonis, P. R., Linssen, J. P. H. and de Waard, P. 2004. Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (spaudoje).

Pranešimai konferencijų leidiniuose

1. Miliauskas, G., van Beek, T. A., de Waard, P. and Venskutonis, R. 2004. Identification of radical scavenging compounds in *Rhaponticum carthamoides*

- by means of LC-DAD-SPE-NMR. „A young scientists symposium: Future trends in phytochemistry“. Symposium proceedings, P29, Gargnano, Italy.
2. Miliauskas, G., van Beek, T. A., Venskutonis, P. R., Linssen, J. P. H. and de Waard, P. 2003. Radical scavenging compounds in *Potentilla fruticosa*. „1st International Conference on Polyphenols and Health“, Conference proceedings, p 224, Vichy, France.
3. Miliauskas, G., van Beek, T. A., Venskutonis, R., Linssen, J. P. H. 2002. Radical scavenging compounds in *Geranium macrorrhizum*. „A young scientists symposium: Future trends in phytochemistry“. Symposium proceedings, P15, Gargnano, Italy.
4. Miliauskas, G., Venskutonis, R. and Sivik, B. 2000. Aromatinių ir vaistinių augalų ekstraktų išėigų, išskirtų skirtingais būdais, palyginimas [Isolation of extracts from different aromatic herbs by various methods]. *Maisto Chemija ir Technologija*. 107–111.

Kiti straipsniai ir publikacijos

1. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and Sivik, B. 2003. Extraction of Aromatic and Medicinal Plants with Supercritical Carbon Dioxide. pp. 209–213. In: R. Dris and A. Sharma (eds). *Food Technology and Quality Evaluation*. Science Publishers Inc, New Hampshire.
2. Miliauskas, G. and Venskutonis, P. R. 2004. Investigation of Lemon Balm (*Melissa officinalis*) extracts by LC-MS. *Maisto Chemija ir Technologija*. 121–125.
3. Miliauskas, G. and Venskutonis, P. R. 2001. Įvairiais metodais išskirtų melisos ir katžolės ekstraktų sudėtis [Composition of Lemon Balm and Catnip extracts obtained by various methods]. *Maisto Chemija ir Technologija*. 47–51.
4. Vinauskienė, R., Venskutonis, R. and Miliauskas, G. 1999. Lakiųjų vištienos junginių tyrimo metodų įvertinimas [Evaluation of analysis methods of volatile poultry compounds]. *Maisto Chemija ir Technologija*, 73–74.

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė	Giedrius Miliauskas
Gimimo data ir vieta	1976 02 23, Kaunas
Gyvenamoji vieta	Kaunas

Studijos ir įgytas išsilavinimas:

1983–1994 m.	Kauno 38-oji vidurinė mokykla. Mokyklos baigimo atestatas.
1994–1998 m.	KTU Cheminės technologijos fakultetas. Maisto produktų technologijos mokslo bakalauro laipsnis.
1998–2000 m.	KTU Cheminės technologijos fakultetas. Maisto chemijos ir technologijos mokslo magistras.
2000–2004 m.	KTU Cheminės technologijos fakultetas. Doktorantūros studijos.

Kita informacija:

Mokslinės veiklos sritys: maisto chemija, fitochemija, analitinė chemija.
 Mokslinės stažuotės: 15 mėn. Vageningeno Universitete (Nyderlandai)
 Užsienio kalbos: anglų, rusų.

ANTIOXIDANTS FROM ROCK CRANE'S-BILL (*GERANIUM MACRORRHIZUM* L.) AND SHRUBBY CINQUEFOIL (*POTENTILLA FRUTICOSA* L.) AND THEIR PROPERTIES

ABSTRACT

Topic and relevance of work. Food molecules (lipids, proteins, carbohydrates) can be widely involved in oxidation reactions. These reactions, caused by so called reactive oxygen species (ROS) are major cause of food (especially lipid containing) products deteriorations, commonly defined as rancidity. Significant changes can occur in product colour, texture, nutritive value; progressing oxidation results in complete spoilage of foods. Oxidation reactions caused by ROS also play an important role in the ageing processes of living organisms and are associated with numerous diseases, like coronary heart disease, cancer, cataracts, ageing. Although protective mechanisms exist both in living cells and in foods in many cases there is a need to strengthen this mechanism. Use of antioxidants becomes the necessity to solve problems caused by ROS. During recent years an increasing interest in natural formulations of food antioxidants and other additives has been observed in food market. At the same time, the use of synthetic antioxidants in food products is under strict regulation due to uncertainty of their safety.

A great number of aromatic, spicy, medicinal and other plants contain chemical compounds exhibiting antioxidant properties. However, scientific information on antioxidant properties of various plants, particularly those that are less widely used in culinary and medicine is still rather scarce. Therefore, the assessment of such properties remains an interesting and useful task, particularly for finding new sources for natural antioxidants, functional foods and nutraceuticals.

Ojectives of the work. Biodiversity of plant resources, scarce information on bioactive compounds and their properties in many species, including those growing in Lithuania, as well as increasing demand for naturalness of food were the main motivation aspects of the present study.

The studies of aromatic and medicinal plants grown in Lithuania by using various methods so far resulted in the evaluation of antioxidant properties of some less investigated plants and identification of new antioxidants. These findings also encouraged to initiate this work. Preliminary it was aimed at screening of radical scavenging activities of the extracts isolated from some plants growing in Central and Eastern Europe. Screening studies pointed out further investigations steps, as couple of very promising plant materials with strong radical scavenging properties have shown up. They were leaves of *Geranium macrorrhizum* and blossoms of *Potentilla fruticosa*. So the second task was aimed to determine the composition of radical scavenging compounds from these plants, to determine their individual activity and to compare it to the

reference antioxidant rosmarinic acid. After the compositional analysis of the chosen plant extracts the third task of our study was to perform quantitative comparison of major antioxidant compounds in plant different botanical parts. The fourth task of this work was to assess antioxidant properties of selected extracts from *Geranium* and *Potentilla*. Safety evaluation of our chosen plant extracts was the fifth task of the work.

Scientific novelty of the work. Antioxidant properties of *Geranium macrorrhizum* and *Potentilla fruticosa* has been little investigated before. In this work the composition of major radical scavenging compounds in *Geranium macrorrhizum* and *Potentilla fruticosa* and the properties of extracts of these plants are presented for the first time. The majority of identified compounds has not been reported to be constituents of the plant before.

Scientific and applied significance of the work. Conducted experiments have showed that *Geranium macrorrhizum* and *Potentilla fruticosa* grown in Lithuania are plants rich in radical scavenging compounds. These compounds show very strong properties in polar medias, and can be effectively extracted with cheap and food grade solvents, like ethanol and water. This fact, also their preliminary safety evaluation tests indicates that these plants can be perspective source of new natural food additives or supplements.

UDK 66.094.382:633.88 (043)

SL 344. 2004-09-27. leidyb. apsk. I. Užsakymas 362. Tiražas 70 egz.
Išleido leidykla „Technologija“, K. Donelaičio g. 73, 44029 Kaunas
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas