



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

**Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų ištraukų
gamyba, biologiškai aktyvių junginių kiekio įvertinimas ir
biologinio aktyvumo tyrimas**

Baigiamasis magistro projektas

Evelina Sabastijanskaitė

Projekto autorius / autorė

Prof. dr. Kristina Ramanauskienė

Vadovas/ė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų ištraukų gamyba, biologiškai aktyvių junginių kiekio įvertinimas ir biologinio aktyvumo tyrimas

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Evelina Sabastijanskaitė

Projekto autorius / autorė

Prof. dr. Kristina Ramanauskienė

Vadovas / Vadovė

Prof. habil. dr. Valdimaras Janulis

Recenzentas / Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas
Farmacijos fakultetas

Evelina Sabastijanskaitė

Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų ištraukų gamyba, biologiškai aktyvių junginių kiekio įvertinimas ir biologinio aktyvumo tyrimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Evelinos Sabastijanskaitės, baigiamasis projektas tema „Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų ištraukų gamyba, biologiškai aktyvių junginių kiekio įvertinimas ir biologinio aktyvumo tyrimas“ 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)

Sabastijanskaitė, Evelina. Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų ištraukų gamyba, biologiškai aktyvių junginių kiekio įvertinimas ir biologinio aktyvumo tyrimas. Baigiamasis magistro projektas / vadovė prof. dr. Kristina Ramanauskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypties grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: tuopa, pumpurai, fenoliniai junginiai, flavonoidai, salicinas, p–kumaro rūgštis, antioksidacinis aktyvumas

Kaunas, 2019. 46 p.

Santrauka

Tuopų pumpurai yra viena iš galimų vaistinių žaliavų, kurių poveikis nėra plačiai tirtas. Siekiant surasti vis daugiau alternatyvų įvairiems vaistams, tikslinga iširti tuopų pumpurų bioaktyviuosius junginius bei tuopų pumpurų preparatų antioksidacines savybes.

Darbo tikslas: pagaminti balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų ištraukas ir įvertinti biologiškai aktyvių junginių kiekį jose bei jų biologinį aktyvumą.

Darbo uždaviniai: pagaminti balzaminių tuopų pumpurų ištraukas taikant skirtingus ekstrahavimo metodus ir tirpiklius; nustatyti tirpiklių daromą daromą įtaką pagamintų ištraukų kokybei; nustatyti ekstrahavimo metodo daromą įtaką ištraukų kokybei; įvertinti ištraukų antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą; nustatyti biologiškai aktyvius junginius ištraukose, taikant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą.

Naudojami tyrimo metodai: bendras fenolinių junginių ir flavonoidų kiekio nustatymas atliktas spektrofotometriniu metodu, antioksidacinis aktyvumas įvertintas taikant ABTS^{•+} radikalų – katijonų surišimo gebos nustatymo metodą bei deguonies radikalų surišimo gebos nustatyto metodą (ORAC). Antibakterinis ištraukų aktyvumas nustatytas difuzijos į agarą metodu *in vitro*. Skystosios ištraukos gamintos taikant maceracijos ir ekstrakcijos ultragarsu metodus. Siekiant sukcentruoti bioaktyviuosius junginius skystosios ištraukos liofilizuotos. Bioaktyvieji junginiai ištraukose kokybiškai ir kiekybiškai nustatyti efektyviosios skysčių chromatografijos.

Nustatyta, kad 70 proc (V/V) etanolis yra efektyvesnis tirpiklis nei 30 ir 50 proc. (V/V) etanoliniai tirpikliai bei vanduo. Nustatytas didesnis bioaktyviųjų junginių kiekis ištraukose gamintose, naudojant ekstrahentą 70 proc. (V/V) etanolį. Ultragarso ekstrakcijos metu išskiriamas panašus bioaktyviųjų junginių kiekis iš balzaminių tuopų pumpurų, kaip ir maceracijos metodu, tačiau ultragarso ekstrakcijos trukmė yra 30 minučių, o maceracijos metodo – 6 valandos (vandeninės ištraukos) arba 120 valandų (etanolinės ištraukos). Stipresniu antiradikaliu aktyvumu pasižymėjo liofilizuotos etanolinės ištraukos. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukos pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš gramteigiamas bakterijas (*S. aureus* ir *E. faecalis*). Tirtos ištraukos buvo efektyvios prieš referencinės ir klinikinės padermės *S. aureus* bakterijas bei referencinės padermės *E. faecalis* bakterijas. Ištraukos neslopino gramneigiamų bakterijų (*E. coli* ir *P. aeruginosa*) augimo. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukose nustatyti šie junginiai: apigeninas, kavos rūgštis, p-kumaro rūgštis, 3,5–dikafeoilchino rūgštis, hiperozidas, katechinas, chlorogeno rūgštis, floretinas, izokvercetas, ferulo rūgštis ir salicinas. Dominuojantis junginys – p–kumaro rūgštis.

Sabastijanskaite, Evelina. Extracts from Balsam Poplar (*Populus balsamifera* L.) Preparation, Quantification of Bioactive Compounds and Biological Activity Research. Master's Final Degree Project / supervisor prof. dr. Kristina Ramanauskiene; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: poplar, buds, phenolic compounds, flavonoids, salicin, p-coumaric acid, antioxidant activity

Kaunas, 2019. 46 pages.

Summary

Poplar buds are one of the alternative medicinal plants materials, whose effects have not been studied yet. In order to find more alternatives to various synthetic drugs, it is appropriate to investigate bioactive compounds and antioxidant properties of poplar buds extracts.

The aim of this study is to make an extraction of balsam poplar (*Populus balsamifera* L.) buds and evaluate amount of bioactive compounds and biological activity in extracts.

Tasks of this study: to make an extracts of balsam poplar buds in different methods and solvents, to determinate the influence of solvents on the quality of extracts, to determinate the influence of extraction method on the quality of extracts, to evaluate antioxidant and antibacterial properties in extracts, to identified bioactive compounds in extracts, using effective liquid chromatography.

Methods used in this study: total phenolic content by Folin–Ciocalteu's assay and total flavonoids content were carried out by spectrophotometric method; antioxidant activity was evaluated using the ABTS^{•+} radical – cation scavenging assay method and oxygen radical absorbance capacity assay method (ORAC). Antibacterial activity of extracts was determined by diffusion method in vitro. Liquid extracts were produced using maceration and ultrasonic extraction techniques. Liquid extracts were lyophilized to concentrate the bioactive compounds. Bioactive compounds in the extracts were quantitate by effective liquid chromatography.

In this study, 70 percent (V/V) ethanol is a more effective solvent than 30 and 50 percent (V/V) ethanol solvents and water. A higher amount of bioactive compounds in extracts was found using 70 percent ethanol as solvent. Amount of bioactive compounds from balsam poplar buds extracts using ultrasonic extraction method is a similar as using maceration method, although ultrasonic extraction time is 30 minutes and the maceration method is 6 hours (aqueous extracts) and 120 hours (ethanol extracts). Lyophilized ethanol extracts exhibited stronger antiradical activity. Extracts of balsam poplar buds had antibacterial activity against gram-positive bacteria (reference and clinical strains of *S. aureus* and reference strain of *E. faecalis*). Extracts did not inhibit the growth of gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*). The following compounds have been identified in the extracts: apigenin, caffeic acid, p-coumaric acid, 3,5 – dicaffeoylquinic acid, hyperoside, catechin, chlorogenic acid, phloretin, isoquercetin, ferulic acid and salicin. The dominant compound is p-coumaric acid.

Turinys

Santrumpos	8
Įvadas	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Tuopų rūšys ir paplitimas	10
1.1.1. Balzaminės tuopos apibūdinimas	10
1.1.2. Tuopų pumpurų panaudojimas medicinoje	11
1.1.3. Kaupiamos medžiagos tuopų pumpuruose	11
1.2. Fenoliniai junginiai ir antioksidacinis aktyvumas	12
1.2.1. Flavonoidai	12
1.2.2. Fenolinės rūgštys	14
1.2.3. Antioksidacinis aktyvumas.....	14
1.3. Tuopų pumpurų ištraukų gamybos būdai	15
1.3.1. Žaliavos paruošimas	15
1.3.2. Fenolinių junginių ekstrakcija	15
1.3.3. Maceravimas.....	16
1.3.4. Ekstrakcija ultragarsu	16
1.3.5. Kiti ekstrakcijos būdai	17
1.4. Tuopų pumpurų ekstraktų kokybės vertinimo metodai	18
1.5. Tuopų pumpurų kokybės ir biologinio aktyvumo tyrimai	19
2. Medžiagos ir metodai	21
2.1. Tyrimo objektas	21
2.2. Naudotos medžiagos ir aparatūra	21
2.2.1. Tyrimams naudotos medžiagos ir reagentai	21
2.2.2. Tyrimams naudota aparatūra:	22
2.3. Augalinės žaliavos vertinimas	22
2.3.1. Žaliavos nuodžiūvio nustatymas	22
2.3.2. Žaliavos sugerties koeficiento nustatymas	23
2.4. Ištraukų gamyba	23
2.4.1. Balzaminių tuopų pumpurų maceravimas	23
2.4.2. Balzaminių tuopų pumpurų ekstrakcija ultragarsu	24
2.4.3. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų liofilizavimas	24
2.5. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų kokybės vertinimas	24
2.5.1. Skystųjų ištraukų sausojo likučio nustatymas	24
2.5.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas balzaminių tuopų pumpurų ištraukose spektrofotometriniu metodu	25
2.5.3. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas balzaminių tuopų pumpurų ištraukose spektrofotometriniu metodu	25
2.5.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas balzaminių tuopų pumpurų ištraukose	26
2.5.5. Antibakterinio aktyvumo nustatymas.....	27
2.5.6. Bioaktyvių junginių identifikavimas ESC metodu balzaminių tuopų pumpurų ištraukose ..	28
2.6. Duomenų statistinė analizė	28
3. Rezultatai	29

3.1. Skystųjų ir liofilizuotų ištraukų gamyba	29
3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas balzaminių tuopų pumpurų ištraukose	30
3.3. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas balzaminių tuopų pumpurų ištraukose	31
3.4. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antioksidacinis aktyvumas	32
3.5. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antibakterinis aktyvumas	35
3.6. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties balzaminių tuopų pumpurų ištraukose įvairavimas	37
Išvados	41
Rekomendacijos	42
Literatūros sąrašas	43
Priedai.....	46
1 priedas. Publikacijos.....	46

Santrumpos

NVNU – nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo;

ROS – reaktyviosios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*);

UV – ultravioletinė spinduliuotė;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

SAR – struktūros–aktyvumo ryšys;

TROLOX - 6–hidroksi–2,5,7,8–tetrametilchroman–2–karboksirūgštis;

TEAC – TROLOX ekvivalento antioksidacinė geba (angl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*);

ABTS^{•+} – 2,2′–azino–bis(3–etilbenzotiazolino–6–sulfoninės rūgšties) diamoninė druskos radikalas;

ORAC – deguonies radikalų absorbcijos geba (angl. *oxygen radical absorbance capacity*);

DMSO – dimetilsulfoksidas (angl. *dimethyl sulfoxide*);

DPPH - 2,2–difetil–1–pikrihidrazilo radikalas;

HPLC – aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (angl. *high performance liquid chromatography*);

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija;

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (angl. *phosphate buffered saline*);

GRE – galo rūgšties ekvivalentas;

RE – rutino ekvivalentas;

TE – TROLOX ekvivalentas;

AV – absorbcijos vienetai.

Įvadas

Vykstant klimato kaitai aktyvėja įvairios žmonių ligos. Kartu su jomis auga įvairių vaistinių medžiagų, galinčių nuslopinti vienokią ar kitokią ligą, poreikis. Šiuo metu rinkoje yra begalė įvairių nesteroidinių vaistų nuo uždegimo (NVNU), kurių vartojimas pastaruoju metu pasaulyje ir Lietuvoje vis didėja. Tokie sintetiniai „kovotojai“ su ligomis ilgainiai pakenkia žmogaus organų funkcijoms ir sveikatai, todėl šiuo metu mokslininkai ypatingą dėmesį skiria natūraliems preparatams, išgaunamiems iš pačios gamtos.

NVNU turi įtakos virškinamojo trakto sutrikimams, kelia grėsmę širdies ir kraujagyslių sistemai. Dėl didelės NVNU sukiamų komplikacijų rizikos, siekiama ieškoti naujų augalinių šaltinių, kurių vartojimas esant uždegiminiams procesams galimai sukeltų mažesnius nepageidaujamus poveikius. Viena iš potencialių augalinių žaliavų – tuopų pumpurai.

Liaudies medicinoje tuopų pumpurai naudojami gana seniai. Jie pasižymi priešuždegiminiu, antimikrobiniu poveikiu, taip pat malšina skausmą, skatina diurezę bei žaizdų gijimą. Tuopų pumpurai gali būti vartojami karščiavimui mažinti, sergant kvėpavimo sistemos ligomis, ypač peršalus, taip pat gydant virškinamojo trakto negalavimus, nemigą. Vartojant augalinius vaistus, galima reguliuoti medžiagų apykaitos procesus bei organizmo homeostazę, koordinuoti imuninę sistemą. Augalų gydomosios savybės priklauso nuo to, kiek ir kokių biologiškai veiklių junginių jie sukaupia. Žinoma, kad tuopų pumpuruose gausu fenolinių rūgščių, flavonoidų, salicilo rūgšties darinių, taip pat eterinių aliejų, rauginių medžiagų, mineralų, dervų, glikozidų, antibiotinių medžiagų, organinių rūgščių, vaškų, įvairių vitaminų [1]. Tyrimais nustatyta, kad fenoliniai junginiai ir flavonoidai gerina medžiagų apykaitą, mažina širdies ir kraujagyslių ligų, diabeto, nutukimo ir vėžio riziką [2].

Tuopų pumpurai yra viena iš galimų vaistinių žaliavų, kurių poveikis nėra plačiai tirtas. Siekiant surasti vis daugiau alternatyvų įvairiems sintetiniams vaistams, tikslinga nustatyti tuopų pumpuruose esančius bioaktyvius junginius bei ištirti tuopų pumpurų ištraukų antioksidacines ir antibakterines savybes.

Darbo tikslas: pagaminti balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų ištraukas ir įvertinti biologiškai aktyvių junginių kiekį jose bei jų biologinį aktyvumą.

Darbo uždaviniai:

1. Pagaminti balzaminių tuopų pumpurų ištraukas taikant skirtingus ekstrahavimo metodus ir tirpiklius.
2. Nustatyti tirpiklių daromą įtaką pagamintų ištraukų kokybei.
3. Nustatyti ekstrahavimo metodo daromą įtaką ištraukų kokybei.
4. Įvertinti ištraukų antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą.
5. Nustatyti biologiškai aktyvius junginius ištraukose, taikant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Tuopų rūšys ir paplitimas

Tuopų rūšių pasaulyje yra daugiau nei šimtas. Šie medžiai labiausiai paplitę vidutinių platumų ir subtropiniuose regionuose (rytinė, vakarinė ir pietinė Europos dalis, vakarų Azija, šiaurės Afrika) [1]. Lietuvoje šis medis labiausiai paplitęs vidurinėje ir pietinėje dalyje, dažnai auginama parkuose, pakelėse, formuojant alėjas. Lietuvoje auga tik kelios tuopų rūšys – baltoji tuopa (lot. *Populus alba*), kvapioji tuopa (lot. *Populus suaveolens*), balzaminė tuopa (lot. *Populus balsamifera*), lieknoji tuopa (lot. *Populus bolleana*), juodoji tuopa (lot. *Populus nigra*), piramidinė tuopa (lot. *Populus pyramidalis*), pilkoji tuopa (lot. *Populus x canescens*) ir drebulė (lot. *Populus tremula*) [3].

1.1.1. Balzaminės tuopos apibūdinimas

Balzaminė tuopa – magnolijūnų skyriaus, magnolijainių klasės, gluosniažiedžių eilės, gluosninių šeimos tuopų genties augalas (1 lentelė) [1, 4].

1 lentelė. Augalo klasifikacija [1, 4]

Karalystė	Augalai (lot. <i>Plantae</i>)
Pokaralystė	Papartūnai (lot. <i>Tracheophyta</i>)
Skyrius	Magnolijūnai (lot. <i>Magnoliophyta</i>)
Klasė	Magnolijainiai (lot. <i>Magnoliopsida</i>)
Poklasis	Dilenijažiedžiai (lot. <i>Dilleniidae</i>)
Eilė	Gluosniažiedžiai (lot. <i>Salicales</i>)
Šeima	Gluosniniai (lot. <i>Salicaceae</i>)
Gentis	Tuopa (lot. <i>Populus</i>)
Rūšis	Balzaminė tuopa (lot. <i>Populus balsamifera</i>)

Šis medis, priklausomai nuo rūšies, gali užaugti iki 25 - 35 metrų aukščio, kamieno skersmuo gali siekti 2,5 m. Šakos paprastai būna nukrypusios į viršų [3]. Balzaminė tuopa žievė tamsiai pilka, sueižėjusi, lapai tamsiai žali, odiški, kiaušiniški, kotuoti.



1 pav. Balzaminė tuopa išdžiovininti pumpurai

Kaip vaistinė žaliava dažniausiai naudojami tuopų pumpurai, kurie yra rudi, kiaušiniški, smailiomis viršūnėmis, lipnūs, bei skleidžia stiprą kvapą (1 pav.) [3]. Tuopa yra dvinamis medis – turi vyriškus ir moteriškus žiedus, kurie telkiasi žirginėliuose. Medžio vaisiai – mažos dėžutės talpinančios sėklas, kurios taip pat telkiasi žirginėliuose.

1.1.2. Tuopų pumpurų panaudojimas medicinoje

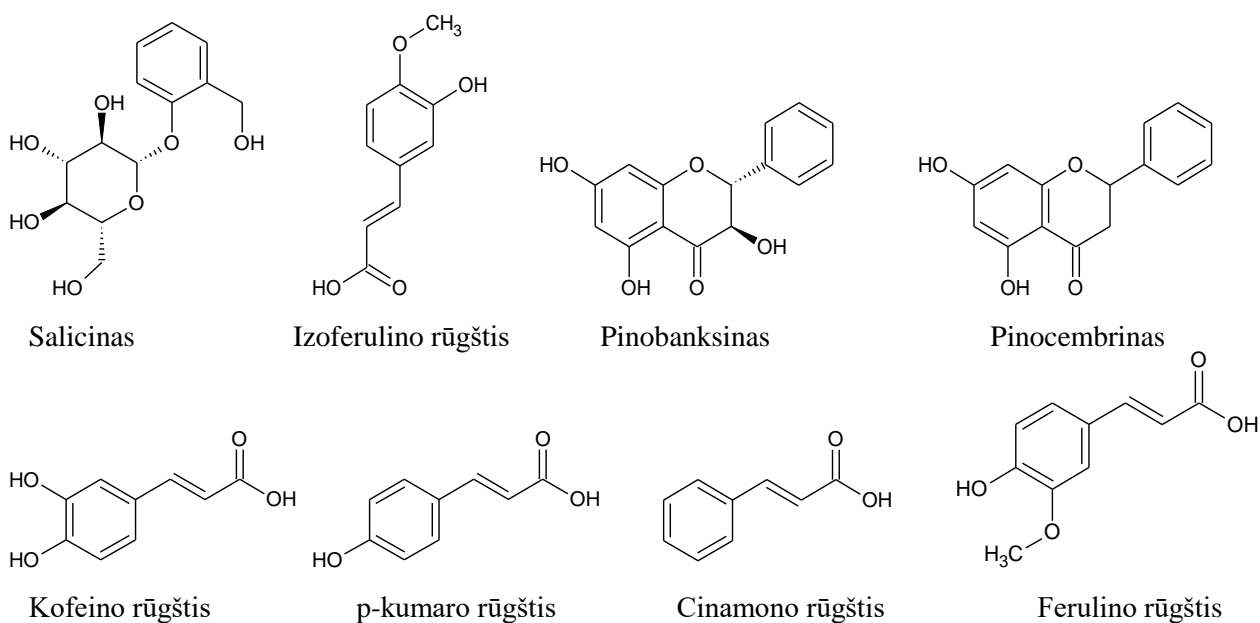
Liaudies medicinoje tuopų pumpurai naudojami gana seniai. Jų preparatai pasižymi priešūždegiminiu, antimikrobiniu poveikiu, taip pat malšina skausmą, skatina diurezę bei žaizdų gijimą [5]. Tuopų pumpurai gali būti vartojami karščiavimui mažinti, sergant kvėpavimo sistemos ligomis, ypač peršalus, taip pat gydant virškinamojo trakto negalavimus, nemigą. Iš išdžiovintų pumpurų padarytomis vandeninėmis ištraukomis ir tepalais gydomos žaizdos, podagra, hemorojus, nudegimai, reumatas. Tuopų pumpurų tepalu gali būti gydomas trichomonozinis kolpitas, įvairūs odos grybeliniai susirgimai, taip pat alopecijos, nes tuopų pumpurų preparatai skatina plaukų augimą. Pumpurų spiritinė ištrauka naudojama maliarijos, tuberkuliozės, skorbuto, cistito ir kai kurių šlapimo pūslės sutrikimų gydymui [6].

Iš tuopų pumpurų galima gaminti įvairius užpilus, vandenines bei spiritines ištraukas, nuovirus ar tepalus. Vaistinėse galima aptikti homeopatinių vaistų, kurių sudėtyje dažniausiai būna iš drebulės pumpurų, šviežių šakelių ir lapų išskirtos veikliosios medžiagos. Šie vaistai skirti priešinės liaukos ir šlapimo pūslės ligų simptomams lengvinti, inkstų funkcijai gerinti, lengvo apatinių šlapimo takų uždegimo papildomam pagalbiniam gydymui po veiksmingos specifinės terapijos [7]. Preparatų indikacijos pagrįstos tik homeopatijos principais.

Tuopų pumpurų preparatų negalima vartoti vaikams, jaunesniems nei 12 metų, peršalimo atveju ir esant karščiavimui, kadangi salicilatų junginiai esantys tuopų pumpurų preparatuose gali sukelti Reje sindromą – ligą pasireiškiančią smegenų ir kepenų ląstelių suirimu. Šių preparatų negalima vartoti nėštumo ir žindymo metu, esant alergijai salicilatams ar sergant astma, taip pat nerekomenduojama vartoti nepsitarus su gydytoju, esant inkstų bei kepenų funkcijos sutrikimams [7].

1.1.3. Kaupiamos medžiagos tuopų pumpuruose

Tuopų pumpuruose randama daug salicilo rūgšties darinių, taip pat apie 6 proc. eterinių aliejų, rauginių medžiagų, apie 0,25 proc. flavonoidų, mineralų, dervų, glikozidų (populinas ir salicinas), antibiotinių medžiagų, organinių rūgščių (galo ir obuolių rūgštys), vaškų, įvairių vitaminų [8].



2 pav. Dažniausiai aptinkamos fenolinės rūgštys tuopų pumpuruose

Pagrindiniai junginiai aptinkami tuopų pumpuruose yra fenolinės rūgštys: salicinas, kofeino rūgštis, para-kumaro rūgštis, ferulino ir izoferulino rūgštys, di-O-metilkofeino rūgštis, cinamono rūgštis; flavonoidai: pinobanksinas, pinobanksino 5-metilo eteris ir pinocebrinas (2 pav.) [1].

1.2. Fenoliniai junginiai ir antioksidacinis aktyvumas

Fenoliniai junginiai yra natūralūs antriniai augalų metabolitai, randami augaluose, vaisiuose, uogose ar daržovėse [9, 10]. Nepaisant to, kad antriniai metabolitai tiesiogiai nedalyvauja fotsintezėje ar augalų kvėpavime, jie yra svarbūs augalams, nes šie junginiai atsakingi už augalų apsaugą – apsaugo augalą nuo oksidantų ir ultravioletinės spinduliuotės [4].

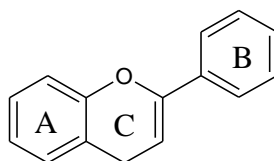
2 lentelė. Fenolinių junginių klasifikavimas [4]

Fenolinių junginių klasė	Struktūra
Paprastieji fenoliai, benzochinonai	C6
Hidroksibenzoinės rūgštys	C6–C 1
Hidroksicinamono rūgštys, fenilpropanoidai	C6–C3
Acetofenonai, fenilacetato rūgštys	C6–C2
Ksantonai	C6–C1–C6
Stilbenai, antrachinonai	C6–C2–C6
Flavonoidai, izoflavonoidai	C6–C3–C6
Lignanai, neolignanai	(C6–C3) ₂
Ligninai	(C6–C3) _n
Kondensuoti taninai (proantocianidinai ar flavolanai)	(C6–C3–C6) _n

Fenolinių junginių įvairovė labai didelė, pradedant paprastomis molekulėmis, tokiomis kaip vanilinas, galo rūgštis, kofeino rūgštis ir baigiant sudėtingais polifenoliais, tokiais kaip stilbenai (pvz. cinamono rūgštis) ir flavonoidai (pvz. rutinas) [11]. Fenoliniai junginiai randami prijungti prie mono ir polisacharidų, prie kurių prisijungusios viena ar kelios fenolinės grupės, taip pat šie junginiai gali būti randami kaip esterių ar metilo esterių dariniai [9]. Fenoliniai junginiai susideda iš aromatinio žiedo, prisijungusio vieną arba daugiau hidroksilo pakaitų. Šiuo metu žinoma daugiau kaip 8000 fenolinių junginių. Pagal savo struktūrą jie skirstomi į kelias klases (2 lentelė) [4]. Pagrindiniai fenoliniai junginiai randami augaluose yra fenolinės rūgštys, flavonoidai ir taninai [9].

1.2.1. Flavonoidai

Flavonoidai yra didžiausia fenolinių junginių grupė. Jie sudaro daugiau nei du trečdalius visų fenolių, randamų augaluose. Flavonoidai yra mažos molekulinės masės junginiai, kuriems būdingas C6-C3-C6 anglies atomų išsidėstymas bei prie jo prijungti įvairūs pakaitai. Šie junginiai sudaryti iš dviejų aromatinių žiedų, sujungtų trijų anglies atomų tilteliu, kuris dažnai yra heterociklinio žiedo formos (3 pav.) [4].



3 pav. Flavonoidų struktūra. A ir B – aromatiniai žiedai sujungti heterocikliniu žiedu C [4]

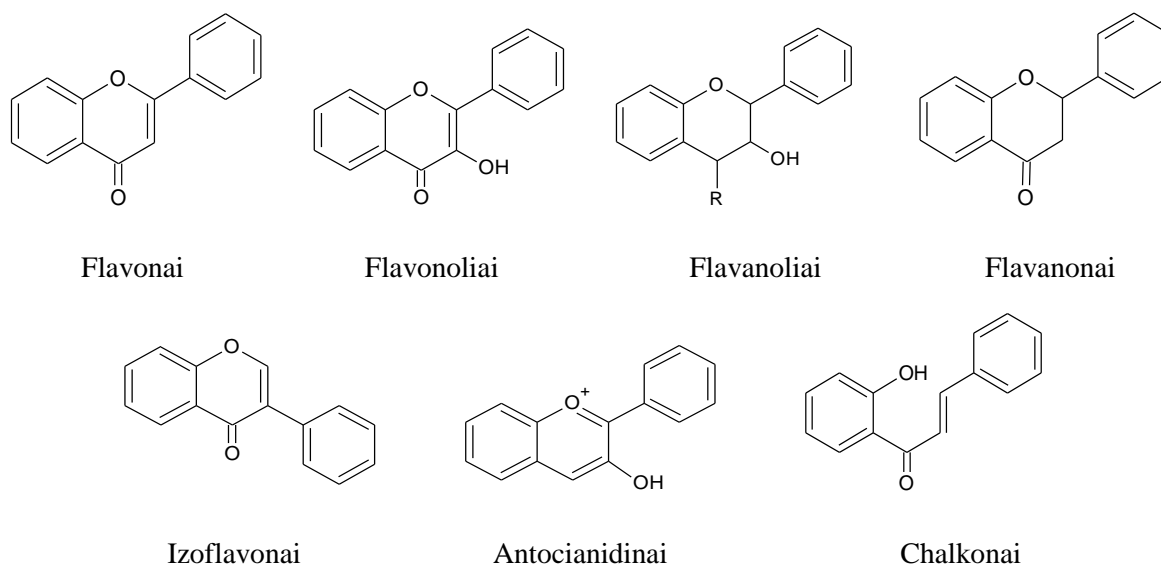
Dėl savo antioksidacinių savybių flavonoidai yra neatsiejama maisto mokslo, farmacijos, medicinos bei kosmetikos pramonės dalis. Šie junginiai pasižymi antioksidaciniu, priešuždegiminiu, antimutageniniu, antivirusiniu, antibakteriniu, hepatoprotekcinu, kardioprotekcinu, antitromboziniu, antialerginiu ir priešvėžiniu poveikiu. Taip pat geba moduluoti pagrindines ląstelių fermentų funkcijas, yra stiprūs inhibitoriai tokiems fermentams, kaip ksantino oksidazė (XO), ciklooksigenazė (COX), lipoksigenazė bei fosfoinozino 3–kinazė [12–15].

Flavonoidai gali būti klasifikuojami pagal biosintetinę kilmę. Pradinis daugumos flavonoidų biosintezės etapas yra vienos p–kumaroil–CoA molekulės (šikimato kilmės, B žiedo) kondensacija su trimis malonil–CoA molekulėmis (poliketidų kilmės, A žiedas), kurios metu gaunamas chalkonas. Ši reakcija atliekama dalyvaujant fermentui chalkono sintazei (CHS) [13]. Vėliau chalkonas izomerizuojamas į flavanoną padedant fermentui chalkono flavanono izomerazei (CHI). Iš šių tarpinių junginių biosintezės kelias skiriasi į keletą šakų, kurios nulemia skirtingą flavonoidų klasę [16].

Dėl skirtingos flavonoidų struktūros išskiriamos tokios šių junginių klasės (4 pav.):

- flavonoliai – kvercetas, kemferolis, myricetas;
- flavanonai – naringenas, hesperetas;
- flavanoliai – katechinas, epikatechinas, epigalokatechinas;
- izoflavonai – genisteinas, daidzeinas;
- flavonai – luteoninas, apigeninas, tangeretas;
- antocianidinai – cianidinas, pelargonidinas, malvidinas.

Taip pat gali būti skiriami kiti junginiai, pavyzdžiui, biflavonoidai (ginkgetinas), prenilflavonoidai, flavonglikanai (silibinas), glikozidinių esterių flavonoidai, chalkonai ir proantocianai [4, 17].



4 pav. Flavonoidų klasifikacija ir cheminė struktūra

Dėl savo antioksidacinių ir priešuždegiminių savybių flavonoidai susiję su širdies ir kraujagyslių ligų prevencija, nes šie junginiai gali sumažinti aterosklerozės riziką bei pagerinti kraujagyslių sienelių kokybę. Taip pat atlikta nemažai tyrimų, kad flavonoidai gali padėti apsisaugoti nuo neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio ir Parkinsono ligos [17, 18].

1.2.2. Fenolinės rūgštys

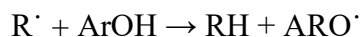
Fenolinės rūgštys – viena iš fenolinių junginių klasių – atsiranda augaluose kaip esteriai arba glikozidai, konjuguoti su kitais natūraliais junginiais, tokiais kaip flavonoidai, alkoholiai, hidroksi riebalų rūgštys, steroliai ir gliukozidai. Nors tyrimų apie fenolinių rūgščių vaidmenį augaluose yra nedaug, visgi ištirta, kad šie junginiai susiję su įvairiomis augalų funkcijomis: maistinių medžiagų įsisavinimu, baltymų sinteze, fermentų aktyvumu, fotosinteze, struktūriniais komponentais bei alelopatija [19].

Fenolinės rūgštys arba fenolkarboksirūgštys yra fenoliai, sudaryti iš fenolinio žiedo ir mažiausiai vienos prijungtos organinės karboksirūgšties. Pagrindiniai, natūraliai atsirandantys fenolinių rūgščių tipai yra hidroksibenzoinės ir hidroksicinamono rūgštys [10]. Dauguma fenolinių rūgščių yra susietos su esteriais, eteriais ar acetatinėmis jungtimis, taip pat randamos prijungtos prie struktūrinių augalo komponentų (celiuliozės, baltymų, lignino), prie didesnių polifenolių (flavonoidų) arba prie mažesnių organinių molekulių (gliukozės, chinino, maleino ar vyno rūgščių) [19]. Fenolinių rūgščių dariniai randami visuose augaluose ir augalinės kilmės maisto produktuose (vaisiuose, daržovėse, grūduose), bet tik nedidelė junginių dalis egzistuoja laisva forma [20].

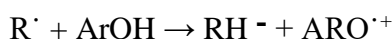
1.2.3. Antioksidacinis aktyvumas

Laisvieji radikalai ir reaktyviosios deguonies formos (ROS) yra labai reaktyvios molekulės, kurios generuoja įprastinius ląstelių procesus, aplinkos sukeliama stresą, UV spinduliuotę. ROS reaguoja su ląsteliniiais komponentais, kenkiančiais DNR molekulei. Padidėjusi ROS gamyba organizme gali sukelti uždegiminiuosius procesus, ankstyvo senėjimo sutrikimus, įskaitant vėžio, diabeto ir aterosklerozės sukėlimą [21]. Daugelyje organizmų yra susiformavusi antioksidacinė sistema, apsauganti ląsteles nuo oksidacinio streso, tačiau jei ROS kiekis yra per didelis, organizmui su oksidaciniu stresu susidoroti yra sunkiau, todėl ieškoma vis naujų antioksidantų šaltinių iš gamtos.

Fenoliniai junginiai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu dėl gebėjimo šalinti laisvuosius radikalus, atiduoti vandenilio atomus ar elektronus arba chelatinius metalų katijonus. Yra du pagrindiniai mechanizmai, kuriais antioksidantai inaktyvina laisvuosius radikalus ir vykdo elektronų perdavimą. Pirmuoju mechanizmu laisvasis radikalas (R[·]) gali pašalinti vandenilio atomą iš antioksidanto (ArOH), kuris tampa radikaliniu. Kuo mažesnė yra O–H ryšio disociacijos energija, tuo lengviau vyksta laisvojo radikalo inaktyvinimo reakcija.



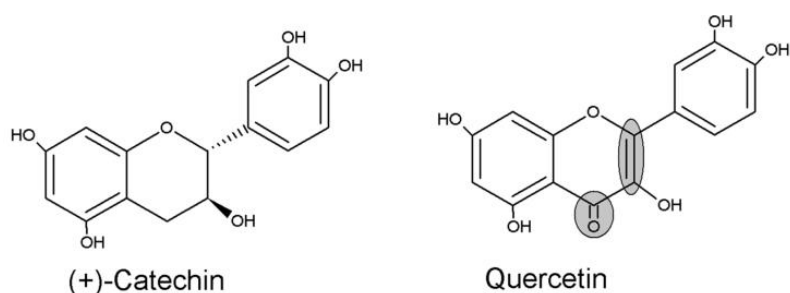
Pagal antrąjį mechanizmą antioksidantas gali duoti elektroną laisvajam radikalui, kuris tampa katijoniniu radikalumu. Kuo mažesnė potencinė jonizacija, tuo lengvesnis elektrono perdavimas, ko pasekoje antioksidacinis aktyvumas yra didesnis.



Fenolių struktūra yra esminis radikalų šalinimo veiksnys, kuris apibūdinamas kaip struktūros-aktyvumo ryšys (SAR) [9]. Pavyzdžiui, fenolinių rūgščių antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo hidroksilo grupių skaičiaus ir jų padėties karboksilo funkcinės grupės atžvilgiu. Monohidroksibenzoinės rūgštys, turinčios –OH grupę orto ar para padėtyse, nepasižymi antioksidaciniu aktyvumu, nors ši sąlyga netinka m–hidroksibenzoinėms rūgštims. Fenolinių rūgščių antioksidacinis aktyvumas didėja, didėjant hidroksilinimo laipsniui, pavyzdžiui trihidroksilinta galo

rūgštis pasižymi aukštu antioksidaciniu aktyvumu. Tačiau hidroksilo grupių, esančių 3-oje ir 5-oje padėtyse, pakeitimas metilo grupėmis (pvz., siringo rūgštyje) antioksidacinį aktyvumą sumažina [10].

Flavonoidams didelį antioksidacinį aktyvumą suteikia gretimų hidroksilo grupių vandenilio atomai, esantys įvairiose A, B ir C žiedų padėtyse, benzeno žiedo dvigubose jungtyse ir dvigubose -C=O funkcinės grupės jungtyje. Šią savybę galima stebėti kvercetino ir katechino junginiuose. Abu junginiai turi panašų hidroksilo grupių skaičių tose pačiose pozicijose, tačiau kvercetinas taip pat turi 2,3-dvigubą ryšį C žiede ir 4-okso grupę (5 pav.).



5 pav. Katechino ir kvercetino struktūros palyginimas. Pilkai pažymėti kvercetino dvigubasis ryšys ir okso grupė, dėl kurių kvercetinas pasižymi didesnėmis antioksidacinėmis savybėmis, lyginant su katechinu [9]

Šios struktūros pranašumas įvertinamas pagal TEAC (angl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) vertę, lyginant su prisotintu heterocikliniu katechino žiedu, kurio antioksidacinis aktyvumas pagal TEAC yra perpus mažesnis [9].

1.3. Tuopų pumpurų ištraukų gamybos būdai

1.3.1. Žaliavos paruošimas

Tuopų pumpurai (lot. *Populi gemmae*) renkami ankstyvą pavasarį – dažniausiai kovo ir balandžio mėnesiais, kol pumpurai dar nepradėjo sprogti. Pumpurai renkami kartu su šakelėmis, kurios nupjaunamos, po to surišamos į šluoteles ir džiovinamos vėsioje, gerai vėdinamoje patalpoje, šaltose palėpėse 1 – 2 mėn. Nuo nupjautų šakelių nuskabytus pumpurus galima džiovinti specialiose džiovyklėse ne aukštesnėje kaip 35 °C temperatūroje, dažnai vartant [6].

Vaistinei žaliai tinka tik lapiniai pumpurai, kurie yra mažesni, minkštesni, pailgesni už žiedinius pumpurus, taip pat stipriau laikosi ant šakelės. Perlaužus lapinį pumpurą matyti gelsvi lapeliai su gelsva, dervinga medžiaga tarp jų. Gerai išdžiovinti pumpurai spaudžiant tarp pirštų traška, bet nesubyra. Išdžiūvę pumpurai yra gelsvai rudi, su kvapia, lipnia mase viduje, kartoko skonio [6].

1.3.2. Fenolinių junginių ekstrakcija

Ekstrakcijos metodo naudojimas žinomas jau nuo seno. Egiptiečiai, finikiečiai, graikai, romėnai ir netgi majai ar actekai turėjo savus medžiagų išgavimo ir distiliavimo būdus, kuriuos naudojo kvėpalų, maisto ar kosmetikos gamyboje. Šiandien be ekstrakcijos neįsivaizduojama daugelis pramonės šakų, pavyzdžiui, maisto, chemijos ar farmacijos pramonėse ekstrakcija naudojama daugelio produktų gamybos etapuose. Iš augalinių žaliavų dažniausiai ekstrahuojami fenoliniai junginiai, todėl svarbu, kad ekstrakcijos metodas būtų pritaikytas tiek žaliavos rūšiai, tiek fenoliniams junginiams, kuriuos norima išekstrahuoti.

Fenolinių junginių ekstrakcija iš augalinių žaliavų priklauso nuo daugelio ekstrakcijos sąlygų:

- fenolinių junginių esančių augalinėje žaliavoje cheminės prigimties;
- taikomo ekstrahavimo metodo, nes tam tikriems junginiams gali netikti vienas ar kitas ekstrahavimo metodas;
- mėginių dalelių dydžio – augalinė žaliava gali būti nesmulkinta arba smulkinta, ekstrakcijos išeiga taip pat priklauso nuo žaliavos sumalimo laipsnio;
- laikymo laiko ir sąlygų – žaliava gali būti šviežia arba džiovinta, taip pat svarbu žinoti kokiomis sąlygomis buvo laikoma ir kiek laiko ji buvo džiovinama ar laikoma;
- balastinių medžiagų buvimo [20].

Cheminis fenolių randamų augaluose pobūdis gali būti nuo paprastų iki labai polimerizuotų medžiagų, tarp kurių yra įvairios fenolinių rūgščių, fenilpropanoidų, antocianų ir taninų proporcijos. Fenoliniai junginiai taip pat gali egzistuoti kaip kompleksai su angliavandeniais, proteinais ir kitais augalų komponentais, kai kurie didelės molekulinės masės fenoliai ir jų kompleksai gali būti sunkiai tirpūs. Tokiu atveju augalinių žaliavų fenoliniai ekstraktai dažniausiai yra įvairių klasių fenolių mišinys, kuris tirpus naudojamoje tirpiklio sistemoje ekstrakcijos metu [22].

Fenolinių junginių tirpumas priklauso nuo naudojamo tirpiklio poliškumo, fenolių polimerizacijos laipsnio, fenolių sąveikos su kitais maisto komponentais ir netirpių kompleksų susidarymo [23]. Dėl šių sąlygų nėra vieno ekstrahavimo metodo tinkamo visiems fenoliniams junginiams. Dažniausiai naudojami tirpikliai fenoliams ekstrahuoti yra metanolis, etanolis, acetonas, vanduo, etilacetatas, kiek mažiau propanolis ir dimetilformamidas [22, 23].

1.3.3. Maceravimas

Vienas seniausių ir ilgiausiai naudojamų ekstrakcijos metodų yra ekstrakcija organiniais tirpikliais, dar kitaip vadinama maceracija. Tai metodas, kuomet augalinė žaliava yra užpilama tam tikru tirpikliu ir laikoma pagal sąlygas (dažniausiai kambario temperatūroje) arba maišoma ant magnetinės maišyklės palaikant tam tikrą temperatūrą. Procesu metu augalinėje žaliavoje esantys bioaktyvieji junginiai pereina į tirpiklį, o gautas ekstraktas vėliau filtruojamas, valomas ir iš jo, tam tikrais metodais, išskiriami bioaktyvieji junginiai [24].

Šis ekstrakcijos metodas yra pigus, nes nereikalauja jokios ypatingos įrangos, tačiau laiko atžvilgiu tai gana ilgas procesas, dėl ilgai vykstančios junginių difuzijos, todėl maceracija vis mažiau naudojama įvairiuose tyrimuose. Taip pat šis metodas turi ir kitų trūkumų, pavyzdžiui, išnaudojama daug tirpiklio, kadangi kai kurios žaliavos linkusios jį sugerti arba tirpiklis lakus ir daug jo nugaruoja; taip pat žaliava nepilnai išiekstrahuoja, bei kartu su bioaktyviaisiais junginiais dažnai išgaunami ir didelės molekulinės masės junginiai, tokie kaip baltymai, riebalai, gleivės, pektinai ir kitos medžiagos [25].

1.3.4. Ekstrakcija ultragarsu

Ekstrakcija ultragarsu remiasi garso bangų taikymu, kurios migruoja per eilę suspaudimo ir retųjų tankinimo ciklų, sukeltų tirpiklio terpės. Šių ciklų metu susidaro nedideli garų pripildyti burbuliukai, kurie periodiškai didėja iki tam tikro skersmens ir sprogs, paverčiant garso bangas į mechaninę energiją. Ši energija suardo ląstelių sienelę ir palengvina bioaktyvių junginių gavybą. Mažų

burbuliukų susidarymas skystyje apibrėžiamas kaip kavitacija. Kavitacija sukuria didelės spartos tarpusavio susidūrimus ir mikroturbulenciją, kurie pagerina ekstrakcijos efektyvumą [26].

Žemo dažnio ultragarsas (<200 kHz) iššaukia didelius, bet nestabilius burbulus, kurie sprogsa suspaudimo ciklo metu, atpalaiduodami didelius šilumos ir smūginių bangų kiekius. Tai sukuria aukštą lokalizuotą temperatūrą (apie 5000 K), o aukšto dažnio ultragarsas (>1 MHz) sukuria nedidelius, bet stabilesnius burbulus, kurie atsidaro ir užsidaro, sukurdami lokalizuotus mikrostruktūrinius efektus. Kaip bebūtų, aukšta temperatūra ir slėgis, generuojami iš žemo dažnio bangų sukeltų nestabilių burbulų, yra naudingesni, nes tokie procesai ardo ląstelių struktūras ir lengvina fenolinių junginių ekstrahavimą [26, 27].

Ultragarso taikymas ekstrakcijoje yra paprastas, ekonomiškasis ir efektyvesnis už kitus tradicinius išgavimo metodus dėl didelės ekstrakcijos išeigos ir neilgo ekstrakcijos laiko. Ši ekstrakcija gali būti atliekama naudojant ultragarso vonelę, zondą, plokšteles ar vamzdinius įtaisus. Tačiau ekstrahavimo efektyvumas priklauso nuo daugelio parametų:

- ultragarso dažnio;
- ultragarso galios;
- ultragarso intensyvumo;
- ultragarso įtaiso/zondo dydžio;
- pasirinktų ekstrakcijos tirpiklių;
- ekstrahavimo laiko;
- pasirinktos ekstrahavimo temperatūros [27].

Be to, ultragarsinė ekstrakcija gali būti kombinuojama su kitomis technologijomis, pavyzdžiui, su mikrobangų krosnelėmis, siekiant didesnės junginių išeigos, jei molekulės yra atsparios karščiui [28].

Kadangi mechaninis ultragarso poveikis pagreitina ekstrahavimo procesą, dažnai organinių tirpiklių naudojimas tampa nereikalingu. Tai reiškia, kad ekstrakcijai ultragarsu dažnai kaip ekstrahavimo terpė naudojamas vanduo, kuris yra nebrangi, nepavojinga, lengvai prieinama ir ekologiška medžiaga [29]. Tačiau be organinių tirpiklių taip pat apsieiti negalima. Specifiniams bioaktyviems junginiams geriausius rezultatus galima pasiekti ekstrahuojant ultragarsu naudojant lakius tirpiklius. Norint pasirinkti tinkamą tirpiklį, reikia atsižvelgti į žaliavą ar ji šviežia ar džiovinta, smulkinta ar ne, ir tikslias medžiagas, kurias norima ekstrahuoti (ar tai lipofilinės ar hidrofiliinės medžiagos) [27, 29].

Ekstrakcija ultragarsu šiuo metu yra vienas iš perspektyviausių ekstrakcijos metodų, ypač fenoliniams junginiams, kadangi atliekant ekstrakciją šiuo metodu galima stebėti ir reguliuoti temperatūrą. Tačiau šis metodas turi ir trūkumų – ultragarsas gali pakeisti molekulių erdvinę orientaciją, savybes, struktūrinę konformaciją ir netgi suardyti molekulių grandinę į atskirus fragmentus [30].

1.3.5. Kiti ekstrakcijos būdai

Superkritinių skysčių ekstrakcija yra procesas, kurio metu vienas komponentas (ekstrahentas) atskiriamas nuo kito (matricos) naudojant superkritinius skysčius kaip ekstrahuojančius tirpiklius. Paprastai ekstrahavimas vyksta iš kietos matricos, bet taip pat gali būti ekstrahuojama ir iš skysčių. Ekstrakcija superkritiniais skysčiais gali būti naudojama kaip mėginio paruošimo etapas analitiniais tikslais arba svarbesniais tikslais, pavyzdžiui, atskirti nepageidaujamą medžiagą nuo produkto (pvz. kofeino pašalinimas) arba surinkti norimą produktą (pvz. eterinius aliejus) [31]. Superkritiniai

skysčiai gali sukelti reakcijas, kurias sunku ar net neįmanoma pasiekti įprastiniuose tirpikliuose. Ekstrakcija superkritiniais skysčiais yra greitas procesas, kuris užtrunka nuo 10 iki 60 minučių.

Dažniausiai naudojamas ekstrahentas yra CO₂ dujos, kartais modifikuojamos bendrų tirpiklių, tokių kaip etanolio ir metanolio. Superkritinės CO₂ ekstrakcijos sąlygos yra kritinė 31°C temperatūra ir 74 barų slėgis. Sąlygos gali šiek tiek keistis pridėjus modifikatorius. Superkritinė CO₂ ekstrakcija sukuria anglies dioksido fazių pokyčius, naudojant temperatūrą ir slėgį. CO₂ yra žinomas kaip „derinamas tirpiklis“, todėl jis yra labai universalus. Skirtingai nuo kitų procesų, superkritinė CO₂ ekstrakcijos procesas nepalieka tirpiklių likučių [32]. Be to, CO₂ tirpiklis yra netoksiškas, nedegus, bekvapis, beskonis, inertiškas ir nebrangus. Dėl naudojamos žemos kritinės temperatūros šis ekstrakcijos metodas yra tinkamas maisto, kosmetikos, kvėpalų, eterinių aliejų bei maisto pramonei, kuomet reikia išskyrinėti termolabilius junginius. Didžiausias metodo trūkumas yra labai brangi ir ne kiekvienam prieinama įranga.

Perkoliacijos metodu gaminamam ekstraktui augalinė žaliava (susmulkinta pagal poreikį) sumaišoma su atitinkamu kiekiu tirpiklio ir paliekama pastovėti. Po to mišinys perkeliamas į perkoliatorių ir paliekama filtruoti, vis patikrinant, kad ekstrahuojama medžiaga visada būtų padengta tirpikliu [24]. Šis metodas yra pranašesnis nei maceravimas, nes žaliava plaunama vis nauju tirpiklio kiekiu, todėl bioaktyviųjų junginių išekstrahuojama daugiau, tačiau metodas nėra ekonomiškai, trunka ilgai, naudojami dideli tirpiklių kiekiai [25].

1.4. Tuopų pumpurų ekstraktų kokybės vertinimo metodai

Efektvyioji skysčių chromatografija, pagal atskyrimo mechanizmą ar nejudančios fazės tipą, skirstoma į: pasiskirstymo, adsorbcinę chromatografiją, jonų mainų chromatografiją, gelchromatografiją, afininę ir chiralinę chromatografiją [33].

Efektvyioji skysčių chromatografija – vienas iš plačiausiai naudojamų analizės metodų. Vienas iš pagrindinių efektvyiosios skysčių chromatografijos metodo privalumų – su ta pačia įranga galima nustatyti daug skirtingų junginių [34]. Taip pat, privalumai nulėmę platų chromatografijos pritaikymą yra metodo jautrumas, automatizavimo paprastumas, tinka nelakiems ir termolabiliems junginiams atskirti, lengva pritaikyti tikslesnei kiekybinei sudėčiai nustatyti, galima tirti įvairias medžiagas, nuo neorganinių junginių iki angliavandenių ir baltymų [33]. Nors ši chromatografijos rūšis turi daug privalumų, tačiau yra ir keli trūkumai. Įranga dažnai yra brangi, o su ja dirbti gali tik kvalifikuotas personalas.

Spektrofotometrija – plačiai taikomas metodas nustatant įvairių komponentų kiekius atliekant tam tikras spalvines reakcijas. Ši spektroskopijos šaka tiria kiek šviesos sugeria tam tikra cheminė medžiaga. Tyrimas paremtas šviesos spindulio, kuris pereina per tiriamąjį tirpalą, intensyvumo analize, prie tam tikro bangos ilgio, nes medžiagos praleidžia arba sugeria šviesą tam tikrame bangos ilgyje [35]. Spektrofotometrija taip pat gali būti naudojama ir kiekybinei medžiagų analizei.

Fenolinių junginių nustatymui ekstraktuose plačiai naudojamas metodas su Folin–Ciocalteu reagentu. Fenoliniai junginiai augalų ekstraktuose reaguoja su specifiniais redokso reagentais (Folin–Ciocalteu reagentu), suformuodami mėlynos spalvos kompleksinius junginius, kurie gali būti kiekybiškai nustatyti, matuojant šviesos absorbciją esant 760 nm bangos ilgiui. Gaunamų kompleksinių junginių spalva priklauso nuo fenolinių junginių kiekio esančio ekstraktuose [36].

Bendrasis flavonoidų kiekis dažniausiai nustatomas atlikus reakciją su $AlCl_3$ rūgščioje aplinkoje. $AlCl_3$ rūgščioje aplinkoje reaguoja su flavonų ir flavonolių C4 keto grupe ir C3/C5 hidroksi grupe, taip susidaro spalvoti kompleksiniai junginiai, kuriuos galima išmatuoti spektrofotometriškai, esant 415 – 420 nm bangos ilgiui. Taip pat $AlCl_3$ su flavonoidais gali suformuoti nestabilius kompleksus su orto–dihidroksilo grupėmis flavonoidų A ir B žieduose [23].

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimui dažnai naudojamas ABTS^{•+} radikalų surišimo metodas. ABTS^{•+} radikalai reaguoja su antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčiais junginiais – taip mėlyna ABTS^{•+} tirpalo spalva blunka ir spalvos pokytį galima išmatuoti spektrofotometriškai [37].

1.5. Tuopų pumpurų kokybės ir biologinio aktyvumo tyrimai

Tuopų pumpurai, kaip vaistinė žaliava, vis labiau vertinama, tačiau tyrimų apie jų cheminę sudėtį, antioksidacinį bei antibakterinį aktyvumą yra nedaug.

Dudonné'o ir kitų mokslininkų atlikto tyrimo metu tuopų pumpuruose buvo nustatytas bendrasis fenolinių junginių kiekis bei antioksidacinis aktyvumas. Tyrimo metu gamintas vandeninis tuopų pumpurų ekstraktas. 100 kg žaliavos buvo ekstrahuojama vandeniu 50 °C temperatūroje, nuolat maišant. Po filtracijos tirpalas buvo sukonzentruotas 50 °C temperatūroje vakuume ir išdžiovintas naudojant išpurškiamąją džiovyklę. Bendrasis fenolinių junginių kiekis nustatytas naudojant Folin-Ciocalteu metodą, naudojant kofeino rūgštį kaip standartą. Taip pat buvo atliktas antioksidacinio aktyvumo tyrimas pagal ORAC metodą. Vandeninis tuopų pumpurų ekstraktas pasižymėjo dideliu fenolinių junginių kiekiu, kuris yra apie 180 mg kofeino rūgšties ekvivalento/g mėginio, ir antioksidaciniu aktyvumu – 2700 μ mol Trolox/g, kuris yra nedidelis palyginus su anksčiau ištirtais vandeniniais augalų ekstraktais [1].

2016 metais Alžyre atlikto tyrimo metu mokslininkai tyrė juodosios tuopos pumpurų savybes. Ekstraktai buvo ruošiami 10 g sumaltos augalinės žaliavos užpilant 100 ml tirpiklio (heksano, chloroformo, metanolio ar vandens) ir nuolat maišant 200 aps./min. greičiu, 24 valandas kambario temperatūroje (25 – 28 °C). Gautas tirpalas buvo nufiltruotas naudojant filtravimo popierių, filtratas išgarintas rotaciniu garintuvu. Gautas sausas ekstraktas buvo ištirpintas dimetilsulfoksido tirpale (DMSO) ir laikomas šaldytuve. Bendrasis fenolinių junginių kiekis nustatytas naudojant Folin-Ciocalteu reagentą ir galo rūgštį kaip standartą. Bendrasis flavonoidų kiekis nustatytas naudojant $AlCl_3$ bei katechiną kaip standartą. Taip pat nustatytas antioksidacinis aktyvumas naudojant DPPH radikalą. Tyrimas parodė, kad tuopų pumpurų ekstraktuose buvo didelis bendrasis fenolinių junginių kiekis, kuris siekė 674,66 mg GAE/g), taip pat nemažas flavonoidų kiekis – 162,5 mg CE/g. Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuotas pagal IC_{50} – ekstrakto koncentracija, kurios reikia norint surišti 50 proc. DPPH radikalų. Tai atvirkščiai proporcingas dydis laisvųjų radikalų kiekiui. Hidroalkoholinio tuopų pumpurų ekstrakto (IC_{50} – 220 μ g/ml) vertė yra panaši į beta-hidroksi rūgšties (230 μ g/ml) ir askorbo rūgšties (210 μ g/ml) [2].

Tuopų pumpurai pasižymi antimikrobinio poveikiu, todėl antimikrobinio aktyvumo tyrimai labai svarbūs norint įrodyti pumpurų veiksmingumą.

JAV ir Kinijoje, 2016 metais atlikto tyrimo metu, buvo tiriamas priešgrybelinis tuopų pumpurų poveikis prieš *Penicillium italicum* pelėsį. Pumpurai buvo sumalami į miltelius ir vėliau ekstrahuoti petrolio eteriu, dichlormetanu, etilo acetatu, etanolu ir vandeniu. Su gautomis penkiomis frakcijomis buvo atliekami priešgrybelinio poveikio tyrimai [38].

Taip pat buvo atliktas PBAF frakcijos cheminių sudedamųjų dalių identifikavimas, sporų dauginimo ir priešgrybelinio stabilumo tyrimai, ląstelių sienelių ir ląstelių membranų vientisumo tyrimai, stebėti mikroskopiniai *P.italicum* pasikeitimai, taip pat tirta PBAF frakcijos įtaka *P.italicum* pelėsio deguonies suvartojimui, sukcinato dehidrogenazės, malato dehidrogenazės bei ATPazės tyrimai.

Ištyrus visas pagamintas tuopų pumpurų frakcijas mokslininkai nustatė, kad didžiausias priešgrybelinis aktyvumas prieš *P. Italicum* pelėsį buvo frakcijos kuri išekstrahuota su dichlormetanu, taip pat frakcijos kuri buvo papildomai išgryninta kolonėlinės chromatografijos metodu naudojant 70 proc. (V/V) etanolį kaip eliuentą. Taip pat matyti, kad kuo didesnė naudojama PBAF frakcijos koncentracija, tuo didesnis pastebėtas priešgrybelinis poveikis. Žvelgiant į temperatūrinę priklausomybę, žemesnėje temperatūroje priešgrybelinis poveikis didesnis, tačiau perkopus 35 °C poveikis ima mažėti. Matuojant kolonijų diametrą taip pat pastebėta, kad kuo didesnė PBAF frakcijos koncentracija tuo mažesnis grybelinės kultūros diametras [38].

Priešuždegiminį tuopų pumpurų poveikį taip pat tyrė Kinijos mokslininkai. Tuopų pumpurų fitocheminė analizė buvo atliekama naudojant fenolinius ir flavonoidų kiekio matavimus, po kurių buvo atliekama aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (HPLC). Antioksidacinių savybių įvertinimui buvo naudojami DPPH ir ABTS laisvųjų radikalų šalinimo būdai. Priešuždegiminis poveikis buvo tirtas in vitro vertinant modulinius efektus pagrindiniams uždegiminiams citokinams ir tarpininkams LPS/IFN- γ stimuliuotose RAW 264.7 ląstelėse matuojant branduolinio faktoriaus aktyvaciją. Šis tyrimas parodė reikšmingus rezultatus tiriant priešuždegiminį tuopų pumpurų poveikį [39].

Merghache ir kiti mokslininkai tyrė tuopų pumpurų antibakterinį poveikį prieš šias bakterijas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* (gram-teigiamos bakterijos); *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* (gram-neigiamos bakterijos). Rezultatai parodė, kad ekstraktai pasižymėjo geru antimikrobiniu aktyvumu (sterili zona nuo 7 iki 36 mm). Didžiausia sterili zona buvo lėkštelėje su *E. faecalis* bakterijomis ir chloroforminiu tuopų pumpurų ekstraktu (36 mm) [2].

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimo objektas – balzaminių tuopų pumpurų etanolinės ir vandeninės ištraukos.

Augalinė žaliava – balzaminės tuopos pumpurai (lot. *Gemmae Populi balsamiferae*) – buvo įsigyta iš Jadvygos Balvočiūtės ekologinio vaistažolių ūkio. Naudojama išdžiovinta žaliava.

2.2. Naudotos medžiagos ir aparatūra

2.2.1. Tyrimams naudotos medžiagos ir reagentai

- Maistinis rektifikuotas etanolis, 96,3 proc. (AB „Vilniaus degtinė“, Lietuva);
- išgrynintas vanduo (LSMU universitetas);
- išgrynintas vanduo ESC analizei (LSMU universitetas);
- balzaminių tuopų pumpurų išdžiovinta augalinė žaliava („Jadvygos žolės“, Lietuva);
- aliuminio trichlorido heksahidratas ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- acto rūgštis $\geq 99,8$ proc. („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- rutino trihidratas („Sigma Aldrich“, Vokietija);
- 2,2'–azino–bis(3–etilbenzotiazolino–6–sulfoninės rūgšties) diamoninė druska (ABTS reagentas), ≥ 98 proc. („Sigma – Aldrich“, Kanada);
- natrio chloridas, 99,0 – 100,5 proc. („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- monobazinis kalio fosfatas 98 – 100,5 proc. („Riedel–de Haën“, Vokietija);
- dinatrio fosfatas 98 – 100,5 proc. („Riedel–de Haën“, Vokietija);
- kalio chloridas $\geq 99,5$ proc. „Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- kalio persulfatas 98 – 100,5 proc. („Riedel–de Haën“, Vokietija);
- 6–hidroksi–2,5,7,8–tetrametilchroman–2–karboksirūgštis (Trolox) („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- galo rūgšties monohidratas („Roth“, Vokietija);
- Folin – Ciocalteu's reagentas, 2 M („Sigma–Aldrich“, Šveicarija);
- Natrio karbonatas, 99,5 – 100,5 proc. („Sigma–Aldrich“, Prancūzija);
- „Prosolv smcc 50“ mišinys kapsulėms („Penwest“, Anglija);
- vandenilio chloridas $\geq 99,8$ proc. („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- salicino etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- apigenino etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- p–kumaro rūgšties etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- kavos rūgšties etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- 3,5–dikafeoilchino rūgšties etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- hiperozido etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- katechino etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- chlorogeno rūgšties etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- fluoretino etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- izokvercetino etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- ferulino rūgšties etaloninis standartas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- acetoni-trilas („Sigma–Aldrich“, Vokietija);
- 2,2'–azobio (2–amidinpropano) dihidrochloridas (AAPH) („Sigma-Aldrich“, Vokietija)

- 3',6'-dihidroksispiro(izobenzofuran1(3H),9'-(9H)ksanten)-3-onas (fluoresceinas), („Steinheim“, Vokietija)
- bakterijų kultūros: referentinės *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Escherichia coli* ATCC 25922; klinikinės *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* bei *Escherichia coli*.
- kolbos, matavimo kolbos, matavimo cilindrai, piltuvėliai, pirštinės, petri lėkštelės, automatinės pipetės, vienkartiniai automatinių pipetėlių antgaliai, chromatografiniai mėgintuvėliai, magnetai, kiuvetės, filtrinės membranos, švirkštai, popieriniai filtrai (porų dydis 8 – 12 μm), 96 šulinėlių mikrolėkštelės.

2.2.2. Tyrimams naudota aparatūra:

- Liofilizatorius „Telstar LyoQuest H-40“ („Beijer electronics“, Ispanija);
- laboratorinės elektroninės svarstyklės „Kern PBS/PBJ“ („Kern“, Vokietija);
- analitinės svarstyklės („Scaltec“, Vokietija);
- magnetinė maišyklė su kaitinimu „IKA C-MAG HS 7“ („IKA“, Vokietija);
- ultragarsinis homogenizatorius („Hielscher“, Vokietija);
- centrifuga „Universal 320“ („Hettich“, Vokietija);
- vandens vonelė („Harry Gestigkeit GmbH“, Vokietija);
- spektrofotometras „Spectronic Genesys 8“ („Thermo Scientific“, JAV);
- spektrofotometras su diodų matricos detektoriumi („Agilent Technologies“ 8453 UV-Vis, JAV);
- kolonėlė „YMC-Pack ODS-A“ (250×4,6 mm, C18, dalelių dydis 5 μm) su prieškolone „YMC-Triart“ (10×3,0, C18, dalelių dydis 5 μm) („YMC Europe GmbH“, Vokietija)
- chromatografinė sistema „Waters e2695“ su diodų matricos detektoriumi „Waters 2998“ („Waters“, JAV);
- vandens gryninimo sistema „Barnstead Pacific RO“ („Thermo scientific“, JAV);
- vandens gryninimo sistema ESC analizei („Merck“, Vokietija);
- drėgnomatis „Adam Nimbus“ („Thermoline scientific“, Australija);
- daugiafunkcinis mikroplokštelių skaitytuvas „FLUOstar Omega“ („BMG Labtech“, Vokietija).

2.3. Augalinės žaliavos vertinimas

2.3.1. Žaliavos nuodžiūvio nustatymas

Vaistinės augalinės žaliavos nuodžiūvis – tai vienas iš žaliavos kokybę apibūdinančių rodiklių. Žaliavos nuodžiūvis yra masės sumažėjimas, išgaravus higroskopinei drėgmei ir lakiesiems junginiams. Jis nustatomas augalinę žaliavą džiovinant iki pastovios masės. Farmakopėjos straipsniuose kiekvienai žaliai nustatytas didžiausias leistinas nuodžiūvis, negalintis viršyti 13 proc. [24].

5 g susmulkintos augalinės žaliavos atsveriami į iš anksto džiovinimo spintoje išdžiovinutus ir pasvertus biuksus. Po to žaliava džiovinama 100 – 105 °C temperatūroje iki pastovios masės. Džiovinimo pradžia – laikas, kai temperatūra džiovinimo spintoje vėl siekia 100 – 105 °C. Pirmą kartą pumpurai sveriami po 3 valandų. Sekantys svėrimai atliekami kas 30 min. Pastovi masė bus tada, kai du paskutiniai svėrimai, praėjus 30 min po džiovinimo ir 30 min po vėsinimo eksikatoriuje, skirsis ne daugiau kaip ± 0,001 g.

Žaliavos nuodžiūvis procentais apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Nuodžiūvis (\%)} = \frac{(m + m_1)}{m} \times 100,$$

čia: m – žaliavos masė gramais prieš džiovinimą;

m_1 – žaliavos masė gramais po džiovinimo.

Galutinis rezultatas yra trijų lygiagrečių svėrimo rezultatų aritmetinis vidurkis, skaičiuojamas dešimtųjų procento dalių tikslumu. Leidžiami rezultatų nuokrypiai tarp lygiagrečiai atliekamų bandinių turi neviršyti $\pm 0,5$ proc. [24].

2.3.2. Žaliavos sugerties koeficiento nustatymas

Žaliavos sugerties koeficientas K_S nustatomas norint apskaičiuoti reikalingą ekstrahento kiekį ruošiamam ekstraktui.

Augalinės žaliavos sugerties koeficientas nustatomas sumaltą augalinę žaliavą užpilant tiek pat mililitrų tirpiklio kiek gramų svėrė žaliava (2 g žaliavos užpilama 2 ml tirpiklio (96 proc. etanolio arba vandens)). Po 30 min, jei žaliava tirpiklį sugėrė, užpilama dar 1 ml. Po 1 valandos tirpiklis, kurio nesugėrė žaliava, atsargiai nupilamas, žaliava nusausinama filtriniu popieriumi ir pasverinama. Žaliavos sugerties koeficientas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$K_S = \frac{m_2}{m_1},$$

čia: K_S – žaliavos sugerties koeficientas;

m_2 – žaliavos masė gramais po išbrinkinimo;

m_1 – žaliavos masė gramais prieš išbrinkinimą.

2.4. Ištraukų gamyba

2.4.1. Balzaminių tuopų pumpurų maceravimas

Sumalta augalinė žaliava užpilama atitinkamu tirpiklio kiekiu, atsižvelgiant į žaliavos sugerties koeficientą. Gaminamos ištraukos santykiu 1:10. Vandeninės ištraukos maceruojamos 6 valandas skirtingomis sąlygomis (kambario temperatūroje ir 80 °C temperatūroje), etanolinės ištraukos – 5 paras (120 valandų) kambario temperatūroje. Ištraukų gaminimo sąlygos ir tirpikliai nurodyti 3 lentelėje. Po ekstrakcijos ištraukos centrifuguojamos, filtruojamos per popierinį filtrą ir laikomos šaldytuve tolimesniam naudojimui.

3 lentelė. Ištraukos pagamintos maceracijos būdu

Ištraukos	Ekstrakcijos laikas	Ekstrakcijos sąlygos	Žaliavos kiekis	Naudojamas tirpiklis	Tirpiklio kiekis
Vandeninė ištrauka	6 h	Kambario temperatūra	20 g	Išgrynintas vanduo	200 ml
Vandeninė ištrauka	6 h	80 °C temperatūra	20 g	Išgrynintas vanduo	200 ml
Etanolinė ištrauka	120 h	Kambario temperatūra	20 g	30 % etanolis	200 ml
Etanolinė ištrauka	120 h	Kambario temperatūra	20 g	50 % etanolis	200 ml
Etanolinė ištrauka	120 h	Kambario temperatūra	20 g	70 % etanolis	200 ml

2.4.2. Balzaminų tuopų pumpurų ekstrakcija ultragarsu

Sumalta augalinė žaliava į centrifuginį mėgintuvėlį užpilama tirpikliu, santykiu 1:10 (1 dalis žaliavos, 10 dalių tirpiklio). Vandeninės ir etanolinės ištraukos talpinamos į ledo vonelę ir į mėgintuvėlį įleidžiamas ultragarso aparato zondas. Ištraukos ekstrahuojamos tokiomis sąlygomis: ultragarso amplitudė 100 proc., ultragarso ciklas 50 proc. Ekstrahavimas vykdomas 30 minučių. Ištraukų gaminimo sąlygos ir tirpikliai nurodyti 4 lentelėje. Po ekstrakcijos ištraukos centrifuguojamos, filtruojamos per popierinį filtrą ir laikomos šaldytuve tolimesniam naudojimui.

4 lentelė. Ištraukos pagamintos ultragarsinės ekstrakcijos būdu

Ištraukos	Ekstrakcijos laikas	Ekstrakcijos sąlygos	Žaliavos kiekis	Naudojamas tirpiklis	Tirpiklio kiekis
Vandeninė ištrauka	30 min	A – 100 %, C – 50 %	4 g	Išgrynintas vanduo	40 ml
Etanolinė ištrauka	30 min	A – 100 %, C – 50 %	4 g	70 % etanolis	40 ml

2.4.3. Balzaminų tuopų pumpurų ištraukų liofilizavimas

Vandeninės ir etanolinės ištraukos (kurių gamybai naudojamas 70 proc. (V/V) etanolis) liofilizuotos, siekiant sukcentruoti gautus bioaktyviuosius junginius.

Prieš liofilizaciją, iš etanolinių ištraukų išgarinamas etanolis vandens vonelėje. Ištraukos liofilizuotos „Telstar LyoQuest H-40“ liofilizatoriumi. Į liofilizacines lėkšteles pilama skysta ištrauka, lėkštelės dedamos į liofilizatoriaus kondensatorių. Pirmame liofilizacijos etape mėginiai šaldomi -50 °C temperatūroje iki kol visiškai užšąla. Antrame etape, mėginiai išimami iš kondensatoriaus ir greitai dedami aparato viršuje į specialų orui nepralaidų cilindrą, įjungiamas džiovinimo vakuume režimas (0,05 bar). Po džiovinimo vakuume įjungiamas trečiasis režimas – lėkštelių pakaitinimas (40 °C, 30 min.) – tam, kad iš gautų miltelių išgaruotų visa dar likusi drėgmė. Visiškai išdžiūvę mėginiai pavaizduoti 6 paveiksle.



6 pav. Liofilizuota vandeninė ištrauka

Mėginiai pakuojami į sandarius buteliukus ir laikomi -20 °C temperatūroje.

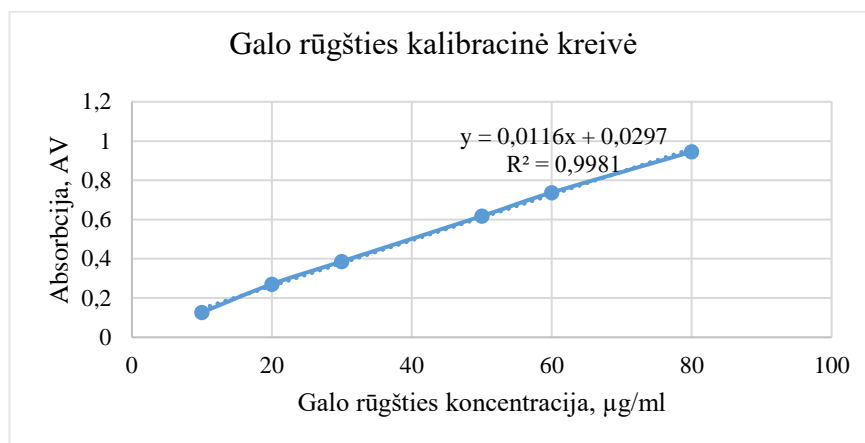
2.5. Balzaminų tuopų pumpurų ištraukų kokybės vertinimas

2.5.1. Skystųjų ištraukų sausojo likučio nustatymas

Skystųjų ištraukų sausasis likutis nustatytas gravimetriniu metodu. Tyrimams naudotas „Adam Nimbus“ drėgnomatis. Gauta sausa liekana apskaičiuota masės procentais [24].

2.5.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas balzaminų tuopų pumpurų ištraukose spektrofotometriniu metodu

Bendro fenolinių junginių kiekio tyrimas buvo atliktas pagal Singleton'o, Orthofer'io ir Lamuela-Raventos [40] metodiką, su tam tikromis modifikacijomis: 150 µl mėginio (kontroliniam mėginiui pilamas tirpiklis naudotas ištraukų gamyboje) 2 ml mėgintuvėlyje sumaišoma su 750 µl 2 M Folin-Ciocalteu reagentu. Po 3 min. pilama 600 µl 75 g/L koncentracijos Na₂CO₃ tirpalo ir mėginiai 2 valandas laikomi tamsoje. Mėginių absorbcija matuojama esant 760 nm bangos ilgiui. Kiekvienam mėginiui atlikta po 4 pakartojimus. Etaloniniai galo rūgšties mėginiai ruošiami pagal tą patį aprašą, naudojamos galo rūgšties vandeninių tirpalų koncentracijos: 10, 20, 30, 50, 60 ir 80 µg/ml.

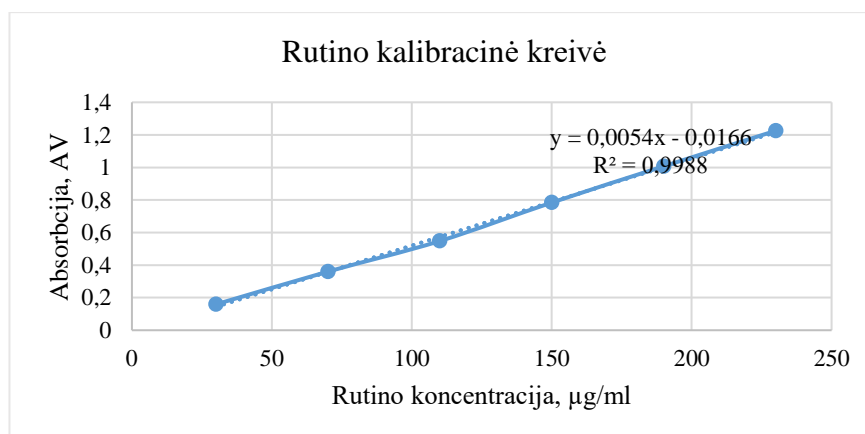


7 pav. Galo rūgšties kalibracinė kreivė

Mėginių fenolinių junginių kiekis apskaičiuojamas pagal galo rūgšties kalibracinės kreivės (7 pav.) tiesinės regresijos lygtį, rezultatai išreiškiami mg galo rūgšties ekvivalento 1 ml skystosios ištraukos (mg GRE/ml) arba mg galo rūgšties ekvivalento 1 g liofilizuotos ištraukos (mg GRE/g).

2.5.3. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas balzaminų tuopų pumpurų ištraukose spektrofotometriniu metodu

5 ml tuopų pumpurų ištraukos įpilama į 25 ml matavimo kolbutę ir praskiedžiama 96 proc. (V/V) etanolu iki žymės. Iš gauto tirpalo į 25 ml matavimo kolbutę atmatuojamas 1 ml tirpalo, įpilama 10 ml 96 proc. (V/V) etanolio, 2 ml AlCl₃ tirpalo, įlašinamas lašas praskiestos acto rūgšties. Kolbutės turinys išmaišomas ir po 20 minučių praskiedžiama 96 proc. (V/V) etanolu iki žymės. Kiekvienam mėginiui atlikta po 4 pakartojimus.



8 pav. Rutino kalibracinė kreivė

Bendras flavonoidų kiekis apskaičiuojamas pagal rutino kalibracinės kreivės (8 pav.) tiesinės regresijos lygtį ir išreiškiamas mg rutino ekvivalento 1 ml skystosios ištraukos (mg RE/ml) arba mg rutino ekvivalento 1 g liofilizuotos ištraukos (mg RE/g).

2.5.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas balzaminių tuopų pumpurų ištraukose

2.5.4.1. ABTS^{•+} radikalų – katijonų surišimo gebos nustatymas

ABTS^{•+} antiradikalinio aktyvumo tyrimas atliktas KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje, pagal Re ir kt. [41] metodą, su tam tikromis modifikacijomis:

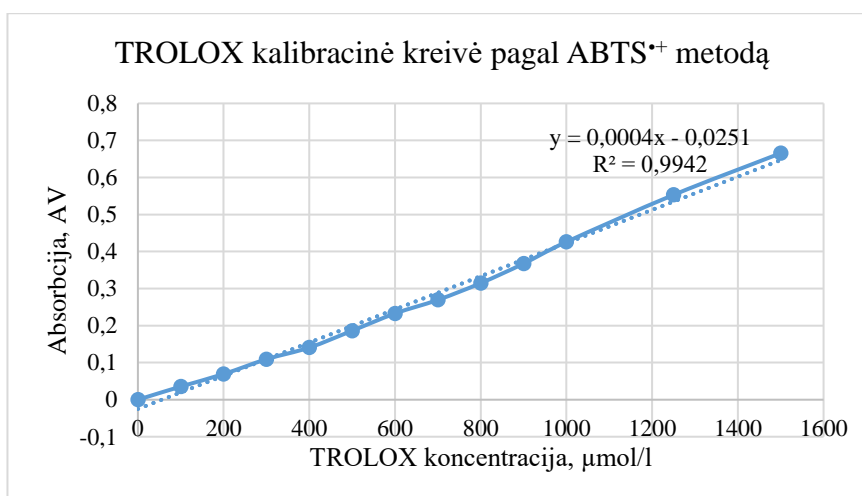
Paruošiamas fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) (75 mmol/L; pH 7,4) išgrynintame vandenyje ištirpinant reagentus nurodytus 5 lentelėje. ABTS^{•+} tirpalas ruošiamas 50 ml ABTS tirpalo (2 mmol/L PBS) sumaišant su 200 µl K₂S₂O₈ tirpalu (70 mmol/L). Šis ABTS^{•+} tirpalas prieš naudojimą laikomas tamsoje 16 valandų. Darbinis tirpalas ruošiamas skiedžiant pradinį ABTS^{•+} tirpalą su PBS iki 0,700 ± 0,010 absorbcijos, kuri matuojama esant 734 nm bangos ilgiui.

5 lentelė. PBS ruošimui naudojami reagentai

Reagentas	Reagento kiekis	Tirpiklio kiekis	Galutinė PBS koncentracija	PBS pH
NaCl	8,18 g	1000 ml išgrynintas H ₂ O	75 mmol/L	7,4
KH ₂ PO ₄	0,27 g			
Na ₂ HPO ₄	1,42 g			
KCl	0,15 g			

Analizei mėginiai ruošiami taip: į 1500 µl darbinio ABTS^{•+} radikalinio tirpalo pilama 25 µl tiriamojo mėginio (kontroliniam mėginiui pilamas tirpiklis naudotas ištraukų gamyboje) ir mėginiai laikomi 2 valandas tamsoje. Absorbcija matuojama esant 734 nm bangos ilgiui. Kiekvienam mėginiui atlikta po 4 pakartojimus.

Kalibracinės kreivės etaloninio standarto TROLOX tirpalų mėginiai ruošiami pagal tą patį aprašą, naudojamos etaloninės TROLOX tirpalo koncentracijos: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250 ir 1500 µM.



9 pav. TROLOX kalibracinė kreivė pagal ABTS^{•+} metodą

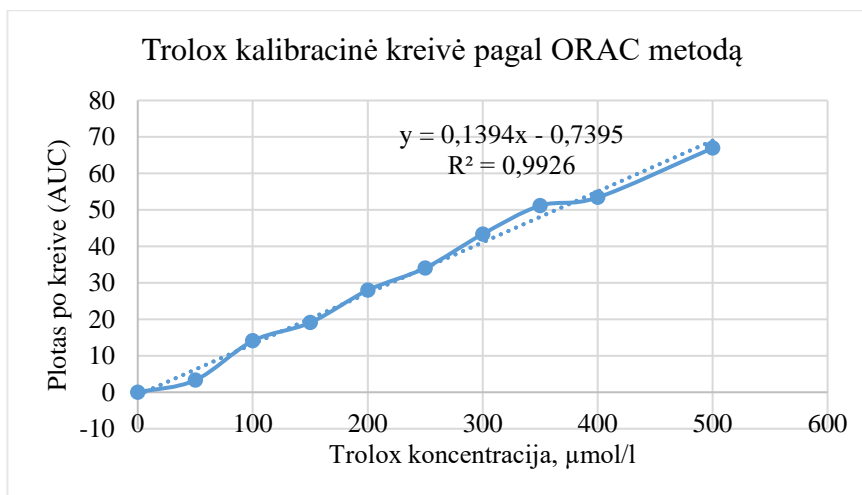
Laisvųjų radikalų surišimo geba (mėginių antiradikalinis aktyvumas) apskaičiuojama pagal TROLOX kalibracinės kreivės (9 pav.) tiesinės regresijos lygtį, rezultatai išreiškiami mmol TROLOX ekvivalento 1 ml skystosios ištraukos arba (mmol TE_{ABTS}/ml) arba mmol TROLOX ekvivalento 1 g liofilizuotos ištraukos (mmol TE_{ABTS}/g). TE atitinka TROLOX kiekį mmol, kuris tokiomis pat tyrimo sąlygomis turi identišką antioksidacinį aktyvumą, kaip 1 ml skystosios ištraukos arba 1 g liofilizuotos ištraukos. Taip pat apskaičiuotas ABTS radikalų surišimo kiekis procentais (inhibicija).

2.5.4.2. Deguonies radikalų absorbcijos gebos (ORAC) nustatymas

Antioksidacinis aktyvumas taip pat nustatytas ORAC metodu. Šiuo metodu nustatomas tam tikrų antioksidantų gebėjimas slopinti oksidacijos procesus, kuriuos sukelia peroksido radikalas. Mėginių deguonies radikalų absorbcijos geba (ORAC) nustatyta pagal Prior'o ir kt. [42] metodiką, naudojant fluoresceiną kaip fluorescensinį zondą. Tyrimas atliktas KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje.

Į 96 šulinėlių juodą nepermatomą lėkštelę su skaidriu dugnu pilama 25 µl tiriamojo mėginio (kontroliniam mėginiui pilamas tirpiklis naudotas ištraukų gamyboje) ir 150 µl fluoresceino tirpalo (14 µmol/l). Lėkštelė dedama į „FLUOstar Omega“ aparatą ir inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos į šulinėlius pilama 25 µl AAPH tirpalo (240 mmol/l). Lėkštelė greitai patalpinama į aparatą ir fluorescencija matuojama kas 66 sekundžių (iš viso 120 ciklų). Kiekvienam mėginiui atlikta po 6 pakartojimus. Naudojami 485–P sužadinimo ir 520–P emisijos filtrai.

Mėginių antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal TROLOX kalibracinės kreivės (10 pav.) tiesinės regresijos lygtį, rezultatai išreiškiami mmol TROLOX ekvivalento 1 ml skystosios ištraukos (mmol TE_{ORAC}/ml) arba mmol TROLOX ekvivalento mmol/g sausosios ištraukos (mmol TE_{ORAC}/g). Taip pat apskaičiuotas peroksido radikalų surišimo kiekis procentais (inhibicija).



10 pav. Trolox kalibracinė kreivė

2.5.5. Antibakterinio aktyvumo nustatymas

Tuopų pumpurų skystųjų ir liofilizuotų ištraukų antibakterinės savybės vertintos *in vitro*, difuzijos į agarą metodu (naudojamas Miulero – Hintono agaras). Antibakterinis tyrimas buvo atliktas naudojant gramteigiamas referentines bei klinikines *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ir gramneigiamas *Pseudomonas aeruginosa* bei *Escherichia coli* bakterijų padermes.

Tiriamieji tirpalai buvo ruošiami skystąsias ištraukas nufiltruojant popieriniais filtrais. Iš sausųjų ištraukų buvo gaminami tirpalai santykiu 1:10 (10 mg sausiosios ištraukos užpilama 100 ml tirpiklio naudoto ištraukų gamybai), kurie buvo naudoti tolimesniems antibakterinio aktyvumo tyrimams.

Paruoštas skystas Miulerio–Hintono agaras išpilstytas į Petri lėkšteles (35 ml į kiekvieną lėkštelę) ir paliktas sustingti horizontalioje padėtyje. Po to, ant paviršiaus paskleidžiamos bakterijų padermės. Petri lėkštelėse buvo padaryti 6 šulinėliai, į kiekvieną pilama po 0,1 ml tiriamojo tirpalo (kontroliniam mėginiui naudotas 70 proc. (V/V) etanolis). Kiekvienai tiriamajai ištraukai skirta po du šulinėlius. Lėkštelės inkubuojamos 24 val. 36 °C temperatūroje [43].

Norint iširti tuopų pumpurų skystųjų ir liofilizuotų ištraukų antibakterinį aktyvumą *in vitro*, po 24 valandas trukusio kultivavimo, buvo apskaičiuojamas inhibuotų zonų skersmuo (mm), kuris susidarė aplink šulinėlius [43].

2.5.6. Bioaktyvių junginių identifikavimas ESC metodu balzaminų tuopų pumpurų ištraukose

Bioaktyvių junginių kokybinis ir kiekinis nustatymas atliktas atvirkščių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu „Waters e2695“ chromatografine sistema su diodų matricos detektoriumi „Waters 2998“ (tyrimas vykdytas LSMU Farmakognozijos katedroje). Chromatografinio skirstymo valdymas, chromatogramų registravimas, duomenų kaupimas ir apdorojimas atliktas naudojantis „Empower 2 Chromatography Data Software“ programine įranga. Skirstymui naudota kolonėlė „YMC-Pack ODS-A“ (250×4,6 mm, C18, dalelių dydis 5 μm) su prieškolone „YMC-Triart“ (10×3,0, C18, dalelių dydis 5 μm). Optimizuotos chromatografinės metodikos eliuentų sistema sudaryta iš 2 proc. (v/v) acto rūgšties tirpalo vandenyje (eliuentas A) ir 100 proc. (v/v) acetonitrilo (eliuentas B). Gradiento kitimas: 0–30 min. 3–15 proc. B, 30–45 min. 15–25 proc. B, 45–50 min. 25–50 proc. B, 50–55 min. 50–95 proc. B. Judrios fazės tėkmės greitis – 1 ml/min., injekcijos tūris – 10 μl. Kolonėlė termostatuota 25°C temperatūroje. Chromatografinės smailės identifikuotos lyginant analizių ir etaloninių junginių sulaikymo laikus ir UV absorbcijos spektrines charakteristikas ($\lambda=200\text{--}400$ nm). Kiekinis balzaminų tuopų pumpurų ištraukose identifikuotų junginių nustatymas atliktas naudojantis penkių lygmenų kiekvienai analizei sudarytais etaloninių junginių kalibravimo grafikais. Katechino, fluoretino ir salicino kiekiai tiriamosiose ištraukose apskaičiuoti bangos ilgiui esant 280 nm, p-kumaro, kavos, 3,5-dikafeoilchino, chlorogeno ir ferulo rūgščių – 320 nm, apigenino, hiperozido ir izokvercetino – 360 nm [44].

2.6. Duomenų statistinė analizė

Norint įvertinti duomenų statistinį patikimumą, duomenys analizuoti naudojantis „Microsoft Office Excel 2016“ ir „IBM SPSS 20.0“ programinėmis įrangomis. Apskaičiuoti rezultatų aritmetiniai vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir santykiniai standartiniai nuokrypiai. Rezultatų skirtumų reikšmingumas įvertintas naudojant vieno faktoriaus dispersinės analizės modelį (one-way ANOVA), rezultatų skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p<0,05$. Rezultatų koreliacija įvertinta ranginės koreliacijos koeficientu.

3. Rezultatai

3.1. Skystųjų ir liofilizuotų ištraukų gamyba

Eksperimentinių tyrimų metu nustatytas balzaminių tuopų pumpurų žaliavos nuodžiūvis, kuris siekė 4,5 proc., o sugerties koeficientas buvo 2,04.

Tyrimams naudojamos skystosios ir liofilizuotos balzaminių tuopų pumpurų ištraukos. Jų kodavimas ir gamybos sąlygos nurodytos 6 lentelėje.

6 lentelė. Ištraukų sudėtys ir gamybos sąlygos

Ištraukos kodas	Ištrauka	Naudotas tirpiklis	Ekstrakcijos metodas	Ekstrakcijos laikas	Ekstrakcijos sąlygos	Žaliavos kiekis	Tirpiklio kiekis
VU	Liofilizuota vandeninė	Išgrynintas vanduo	Ultragarsinė ekstrakcija	30 min	A – 100 %, C – 50 %	4 g	40 ml
VM1	Liofilizuota vandeninė	Išgrynintas vanduo	Maceravimas	6 h	Kambario temp.	20 g	200 ml
VM2	Liofilizuota vandeninė	Išgrynintas vanduo	Maceravimas	6 h	80 °C temp.	20 g	200 ml
EU	Liofilizuota etanolinė	70 % etanolis	Ultragarsinė ekstrakcija	30 min	A – 100 %, C – 50 %	4 g	40 ml
EM	Liofilizuota etanolinė	70 % etanolis	Maceravimas	120 h	Kambario temp.	20 g	200 ml
EM30	Skystoji etanolinė	30 % etanolis	Maceravimas	120 h	Kambario temp.	20 g	200 ml
EM50	Skystoji etanolinė	50 % etanolis	Maceravimas	120 h	Kambario temp.	20 g	200 ml
EM70	Skystoji etanolinė	70 % etanolis	Maceravimas	120 h	Kambario temp.	20 g	200 ml

Liofilizuotų ištraukų išeiga pateikta 7 lentelėje. Išeiga apskaičiuota remiantis šia formule:

$$\text{Išeiga, \%} = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

m_2 – miltelių masė gramais po liofilizacijos;

m_1 – žaliavos masė naudota ištraukų gamybai.

7 lentelė. Liofilizuotų ištraukų išeigos

Ištraukos	Pradinis žaliavos kiekis	Miltelių kiekis po liofilizacijos	Išeiga
VU	4 g	0,39 g	9,75 %
VM1	20 g	1,2 g	6 %
VM2	20 g	1,62 g	8,1 %
EU	4 g	1,12 g	28 %
EM	20 g	4,58 g	22,9 %

Skystųjų ištraukų sausasis likutis apskaičiuotas remiantis šia formule:

$$\text{Išeiga, \%} = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

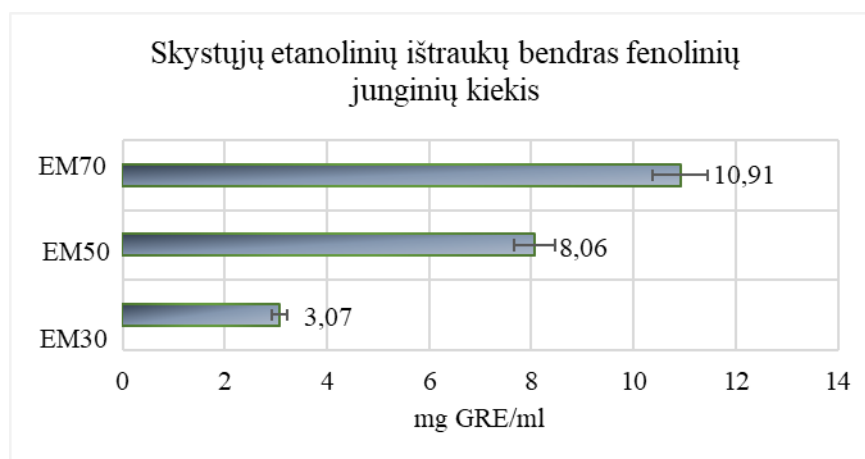
m_2 – miltelių masė gramais po liofilizacijos;

m_1 – žaliavos masė naudota ekstraktų gamybai.

30 proc. (V/V) etanolinės ištraukos sausasis likutis lygus 0,38 proc., 50 proc. (V/V) etanolinės ištraukos – 2,64 proc., o 70 proc. (V/V) etanolinės ištraukos – 5,29 proc..

3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas balzaminų tuopų pumpurų ištraukose

Pirmame tyrimų etape pagamintų ištraukų kokybė buvo vertinta nustatant bendrą fenolinių junginių kiekį. Bendras fenolinių junginių kiekis skystosiose ir liofilizuotose ištraukose buvo apskaičiuotas pagal galo rūgšties ekvivalentą. Skystųjų ištraukų bendras fenolinių junginių kiekis pavaizduotas 11 paveiksle.

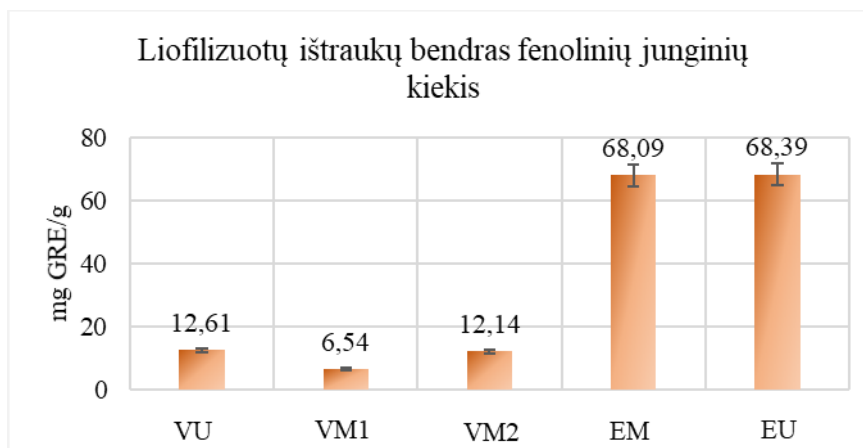


11 pav. Skystųjų etanolinių balzaminų tuopų pumpurų ištraukų bendras fenolinių junginių kiekis

Visos etanolinės skystosios ištraukos (EM30, EM50 ir EM70) buvo ruošiamos maceracijos būdu, maceruojant 5 paras, kambario temperatūroje. Daugiausiai fenolinių junginių iš žaliavos išekstrahavo 70 proc. (V/V) etanolis – šios ištraukos (EM70) bendras fenolinių junginių kiekis siekė $10,91 \pm 0,33$ mg GRE/ml. Su 50 proc. (V/V) etanoliumi (EM50) išekstrahavo $8,06 \pm 0,24$ mg GRE/ml fenolinių junginių, o mažiausiai jų išekstrahavo 30 proc. (V/V) etanolis (EM30 – $3,07 \pm 0,14$ mg GRE/ml). Lyginant skirtingų koncentracijų etanolines ištraukas, nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) tarp nustatyto bendro fenolinių junginių kiekio skystosiose ištraukose. Galima teigti, kad 70 proc. (V/V) etanolis kaip ekstrahentas yra efektyviausias iš naudotų tirpiklių tuopų pumpurų ištraukų gamybai ir fenolinių junginių išskyrimui iš žaliavos. Tyrimų rezultatai pagrindė mokslinės literatūros duomenis, kad fenolinių junginių tirpumas priklauso nuo naudojamo tirpiklio poliškumo [23]. 70 proc. (V/V) etanolis yra tinkama tirpiklio sistema siekiant išskirti iš žaliavos įvairaus lipofiliškumo fenolinius junginius [22].

Liofilizuotų ištraukų bendro fenolinių junginių kiekio augalinėje žaliavoje rezultatai pavaizduoti 12 paveiksle. Rezultatai tarp skirtingu ekstrakcijos būdu gamintų ištraukų statistiškai reikšmingai skyrėsi ($p < 0,05$). Etanolinės ištraukos (EM ir EU) išekstrahavo 6,5 karto daugiau fenolinių junginių nei vandeninės ištraukos (VU, VM1 ir VM2). Didžiausias fenolinių junginių kiekis yra etanolinėje ištraukoje paruoštoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (EU – $68,39 \pm 0,32$ mg GRE/g), beveik toks pats fenolinių junginių kiekis yra ir etanolinėje ištraukoje, maceruotoje 5 paras (EM – $68,09 \pm$

0,56 mg GRE/g). Lyginami šiuos du ekstrakcijos metodus galima manyti, kad ekstrakcijos efektyvumas yra panašus ar beveik identiškas, tačiau įvertinus ekstrahavimo laiką (ultragarsu ekstrahuota 30 min., maceruota 120 h) ženkliai efektyvesnė yra ekstrakcija ultragarsu.



12 pav. Liofilizuotų balzaminų tuopų pumpurų ištraukų bendras fenolinių junginių kiekis

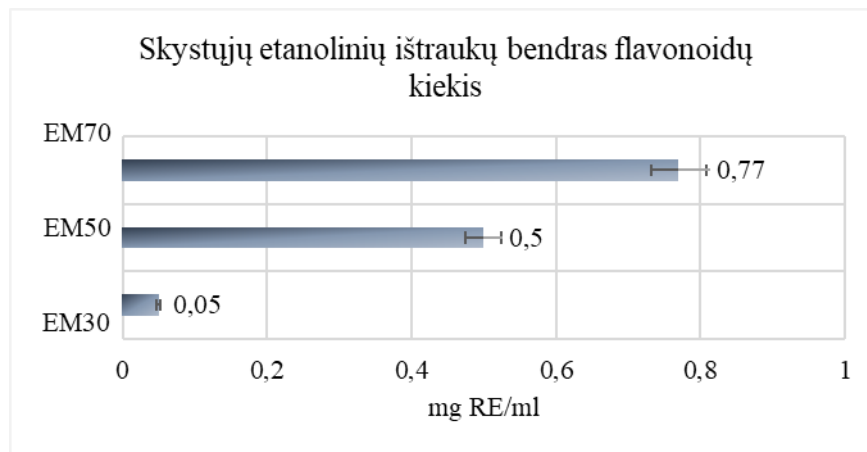
Lyginant vandenines ištraukas, daugiausiai fenolinių junginių nustatyta ištraukoje ekstrahuotoje ultragarsine ekstrakcija (VU – $12,61 \pm 0,12$ mg GRE/g), taip pat ištraukoje gamintoje maceravimo būdu, kai tirpiklio temperatūra $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (VM2 – $12,14 \pm 0,04$ mg GRE/g). Mažiausiai fenolinių junginių išsiekstrahavo iš žaliavos, vykdant ekstrakciją vandenyje, 6 valandas, kambario temperatūroje (VM1 – $6,54 \pm 0,04$ mg GRE/g). Lyginant ekstrakcijos metodus pagal vandeninių ištraukų bendrą fenolinių junginių kiekį, efektyvesnė yra ultragarsinė ekstrakcija.

Kitų mokslininkų aprašomi tyrimų rezultatai rodo, kad ekstraktų bendras fenolinių junginių kiekis svyruoja nuo $21,62$ iki $31,09$ μg GRE/mg (superkritinių skysčių ekstrakcija) [8]. Kitame tyrime aprašomas bendras fenolinių junginių kiekis siekė $145,54 \pm 5,89$ mg GAE/g (superkritinių skysčių ekstrakcija) [45] bei $674,66$ mg GRE/g (maceracija etanolium) [2]. Taip pat šaltiniuose minimas tuopų pumpurų bendras fenolinių junginių kiekis apskaičiuotas naudojant kavos rūgštį (180 mg CAE/g) bei katechiną ($51,78 \pm 4,56$ mg CE/g) kaip standartą [1]. Atlikto tyrimo duomenys sutampa su kitų mokslininkų tyrimų rezultatais. Galima teigti, jog skirtumams tarp skelbiamų išekstrahuotų fenolinių junginių kiekių turi įtakos pasirinktas ekstrakcijos metodas, tirpiklis, pasirinktas analizės metodas bei augalinės žaliavos kokybė.

3.3. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas balzaminų tuopų pumpurų ištraukose

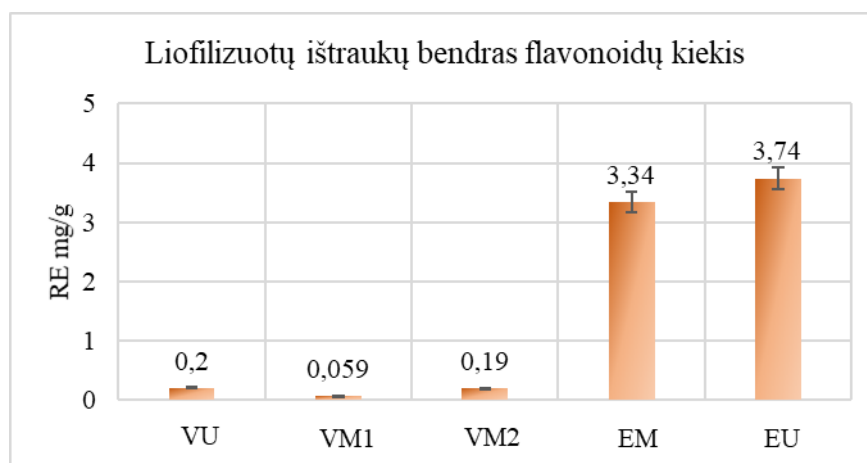
Siekiant įvertinti pagamintų ištraukų kokybę, eksperimentinių tyrimų metu nustatytas bendras flavonoidų kiekis jose. Bendras flavonoidų kiekis skystosiose balzaminų tuopų pumpurų ištraukose buvo apskaičiuotas pagal rutino ekvivalentą. Rezultatai pavaizduoti 13 paveiksle.

Didžiausias flavonoidų kiekis nustatytas 70 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje (EM70 – $0,77 \pm 0,01$ mg RE/ml). Šiek tiek mažesnis flavonoidų kiekis nustatytas 50 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje (EM50 – $0,5 \pm 0,003$ mg RE/ml), mažiausias kiekis – 30 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje (EM30 – $0,05 \pm 0,001$ mg RE/ml). Lyginant skystąsias etanolines ištraukas pagal bendrą flavonoidų kiekį, kaip ekstrahentas efektyviausias 70 proc. (V/V) etanolis. Gauti bendro flavonoidų kiekio ištraukose rezultatai skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$).



13 pav. Skystųjų etanolinių balzaminių tuopų pumpurų ištraukų bendras flavonoidų kiekis

Lyginant liofilizuotas ištraukas (14 pav.) didžiausias flavonoidų kiekis gautas ekstrahuojant žaliavą 70 proc. (V/V) etanoliu, ultragarsinės ekstrakcijos metodu (EU – $3,74 \pm 0,01$ mg RE/g). Taip pat didelis flavonoidų kiekis gautas ekstrahuojant 70 proc. (V/V) etanoliu, maceravimo būdu (EM – $3,34 \pm 0,007$ mg RE/g). Lyginant vandenines ištraukas daugiausiai flavonoidų išsiekstrahavo ultragarsinės ekstrakcijos metodu (VU – $0,2 \pm 0,003$ mg RE/m) ir maceravimo metodu, esant 80°C temperatūrai (VM2 – $0,19 \pm 0,003$ mg RE/g), mažiausiai iš visų ištraukų – maceruojant žaliavą kambario temperatūroje (VM1 – $0,059 \pm 0,007$ mg RE/g). Tarp gautų rezultatų nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$). Lyginant ekstrakcijos metodus pagal bendrą flavonoidų kiekį ir ekstrakcijos laiką – efektyvesnė yra ekstrakcija ultragarsu.



14 pav. Liofilizuotų balzaminių tuopų pumpurų ištraukų bendras flavonoidų kiekis

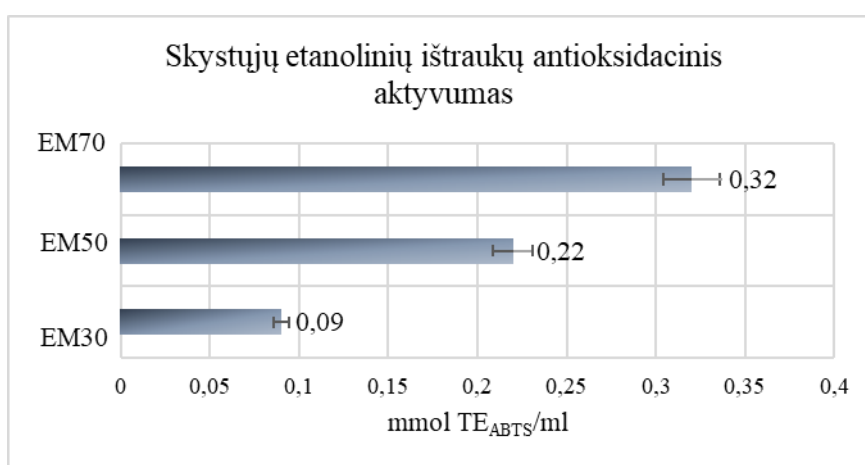
Kiti autoriai taip pat nustatė bendrą flavonoidų kiekį tuopų pumpuruose. Literatūroje aprašomas bendras flavonoidų kiekis siekia $162,5$ mg CE/g) [2]. Taip pat flavonoidų kiekis apskaičiuotas naudojant kvercetiną kaip standartą – flavonoidų kiekis tuopų pumpurų ekstraktuose įvairavo nuo $13,67 \pm 0,34$ mg QE/g [46] iki $126,23 \pm 8,46$ mg QE/g [45]. Palyginus šio tyrimo rezultatus su kitų mokslininkų rezultatais, galima sakyti, kad standarto pasirinkimas turi įtakos bendro flavonoidų kiekio nustatymui ištraukose. Taip pat tyrimų rezultatai patvirtino, kad mechaninis ultragarso poveikis pagreitina ekstrahavimo procesą [29].

3.4. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antioksidacinis aktyvumas

Naudojant tik vieną antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodą, būtų sunku įvertinti balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antioksidacinį aktyvumą. Siekiant detaliau įvertinti augalinių ištraukų

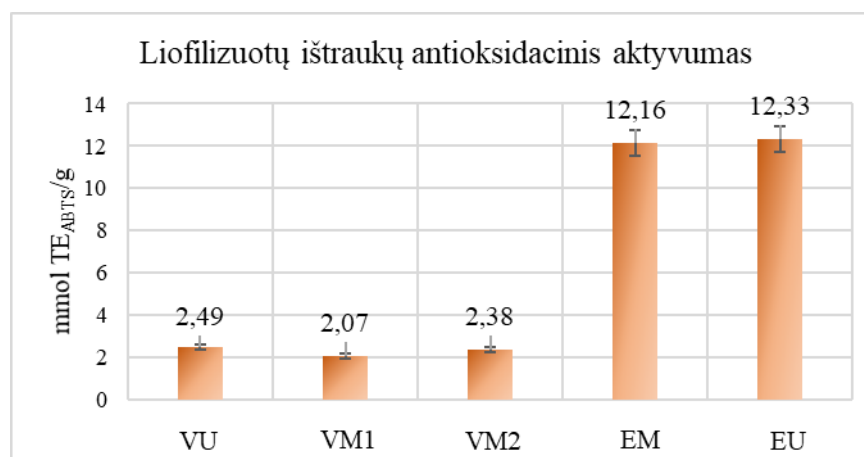
aktyvumą, tyrimus tikslinga vykdyti keletu *in vitro* metodų, kuriais būtų galima nustatyti gebėjimą funkcionuoti keletu antioksidacinio aktyvumo mechanizmų.

Balzaminių tuopų pumpurų skystųjų ir liofilizuotų ištraukų antioksidacinis aktyvumas tirtas dviem metodais. Pirmojo metodo – **ABTS⁺ radikalų – katijonų surišimo gebos nustatymo** – rezultatai pavaizduoti 15 ir 16 paveiksluose. Lyginant skystąsias etanolines ištraukas (15 pav.), didžiausias antiradikalinis aktyvumas pagal TROLOX ekvivalentą nustatytas ištraukoje ekstrahuotoje 70 proc. (V/V) etanoliumi (EM70 – $0,32 \pm 0,003$ mmol TE_{ABTS}/ml). Ištraukoje, kuri buvo ekstrahuota 50 proc. (V/V) etanoliumi (EM50), antiradikalinis aktyvumas siekė $0,22 \pm 0,005$ mmol TE_{ABTS}/ml. Mažiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas ištraukoje, kuri ekstrahuota 30 proc. (V/V) etanoliumi (EM30 – $0,09$ mmol TE_{ABTS}/ml). Gauti rezultatai statistiškai reikšmingai skyrėsi ($p < 0,05$). Sprendžiant pagal antiradikalinio aktyvumo rezultatus, geriausias ekstrahentas veikliųjų junginių išskyrimui iš žaliavos yra 70 proc. (V/V) etanolis.



15 pav. Skystųjų etanolinių balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antioksidacinis aktyvumas nustatytas ABTS⁺ radikalų – katijonų surišimo gebos nustatymo metodu

Lyginant liofilizuotas ištraukas (16 pav.), didžiausias antiradikalinis aktyvumas buvo ištraukos ekstrahuotos etanoliumi, ultragarsinės ekstrakcijos metodu (EU – $IC_{50} = 0,071 \pm 0,0002$ mg/ml; $12,33 \pm 0,04$ mmol TE_{ABTS}/g), šiek tiek mažesnis aktyvumas ištraukos ekstrahuotos etanoliumi, maceravimo būdu (EM – $IC_{50} = 0,072 \pm 0,0002$ mg/ml; $12,16 \pm 0,03$ mmol TE_{ABTS}/g).



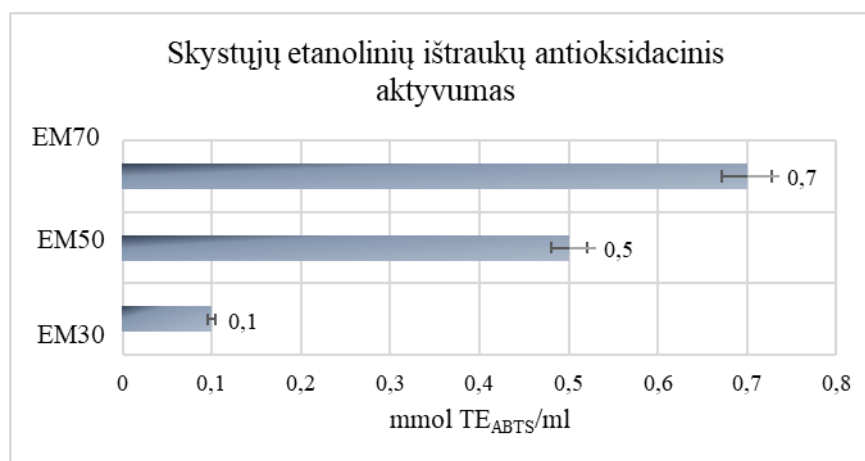
16 pav. Liofilizuotų balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antioksidacinis aktyvumas nustatytas ABTS⁺ radikalų – katijonų surišimo gebos nustatymo metodu

Liofilizuotų vandeninių ištraukų antiradikalinis aktyvumas buvo beveik 10 kartų mažesnis lyginant su liofilizuotomis etanolinėmis ištraukomis. Mažiausias antiradikalinis aktyvumas iš visų liofilizuotų ištraukų buvo vandeninės ištraukos maceruotos kambario temperatūroje (VM1 – $IC_{50}=0,42 \pm 0,004$ mg/ml; $2,38 \pm 0,02$ mmol TE_{ABTS}/g). Didžiausias antiradikalinis aktyvumas lyginant tik vandenines ištraukas buvo vandeninės ištraukos ekstrahuotos ultragarsinės ekstrakcijos metodu (VU – $IC_{50}=0,30 \pm 0,003$ mg/ml; $2,49 \pm 0,05$ mmol TE_{ABTS}/g), šiek tiek mažesnis – vandeninės ištraukos maceruotos 80 °C temperatūroje (VM2 – $IC_{50}=0,34 \pm 0,01$ mg/ml; $2,07 \pm 0,02$ mmol TE_{ABTS}/g). Tarp gautų rezultatų nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p<0,05$).

Pagal gautus rezultatus, galima sakyti, kad etanolis kaip ekstrahentas buvo efektyvesnis už vandenį. Lyginant ekstrakcijos būdus efektyvesnė buvo ekstrakcija ultragarsu, nors antiradikalinis aktyvumas lyginant EM ir EU ištraukas arba VU ir VM2 ištraukas buvo panašus, tačiau ultragarsinė ekstrakcija abiem atvejais buvo žymiai trumpesnė.

Panašus tuopų pumpurų antioksidacinis aktyvumas nustatytas Debbache ir kt., taikant $ABTS^{*+}$ radikalų – katijonų surišimo gebos nustatymo metodą, kuris įvairavo nuo 14,67 $\mu g/ml$ iki 17,09 $\mu g/ml$, priklausomai nuo pasirinkto ekstrahento ištraukų gamybai [46].

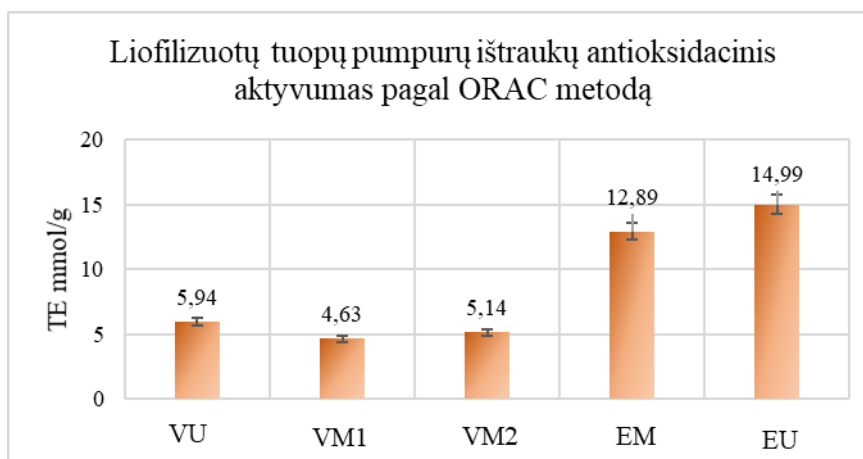
Antrasis metodas – **deguonies radikalų absorbcijos gebos (ORAC) nustatymas** – pasirinktas siekiant įvertinti antioksidacinio aktyvumo kinetiką imituojant organizmo sąlygas (reakcija vyksta 37 °C temperatūroje). Tyrimo rezultatai pateikti 17 ir 18 paveiksluose. Lyginant skystąsias etanolines ištraukas (17 pav.) didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas ištraukoje, gamintoje su 70 proc. (V/V) etanoliu (EM70 – 0,7 mmol TE/ml). Šiek tiek mažesnis antiradikalinis aktyvumas nustatytas 50 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje (EM50 – 0,5 mmol TE/ml), mažiausia laisvųjų $ABTS^{*+}$ radikalų surišimo geba nustatyta 30 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje (EM30 – 0,1 mmol TE/ml). Gauti tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingai skyrėsi ($p<0,05$).



17 pav. Skystųjų etanolinių balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antioksidacinis aktyvumas nustatytas ORAC metodu

Lyginant liofilizuotas balzaminių tuopų pumpurų ištraukas, didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas etanolinėje ištraukoje gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (EU – $14,99 \pm 3,7$ mmol TE_{ORAC}/g). Šiek tiek mažesnis antiradikalinis aktyvumas – etanolinėje ištraukoje gamintoje maceracijos metodu (EM – $12,89 \pm 1,49$ mmol TE_{ORAC}/g). Vandeninių ištraukų antiradikalinis aktyvumas buvo beveik 3 kartus mažesnis. Lyginant vandenines ištraukas, didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas vandeninėje ištraukoje gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos

metodu (VU – $5,94 \pm 0,58$ mmol TE_{ORAC}/g), šiek tiek mažesnis – vandeninėje ištraukoje maceruotoje 80 °C temperatūroje (VM2 – $5,14 \pm 0,28$ mmol TE_{ORAC}/g), mažiausias – vandeninėje ištraukoje maceruotoje kambario temperatūroje (VM1 – $4,63 \pm 0,22$ mmol TE_{ORAC}/g). Gauti rezultatai skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$).



18 pav. Liofilizuotų balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antioksidacinis aktyvumas nustatytas ORAC metodu

Tuopų pumpurų antioksidacinio aktyvumo tyrimų naudojant deguonies radikalų absorbcijos gebos (ORAC) nustatymo metodą yra mažai. Tirtosios ištraukos pasižymėjo stipresniu antioksidaciniu aktyvumu lyginant su mokslinėje literatūroje paskelbtais duomenimis. Dudonne ir kt. ištyrė juodųjų tuopų pumpurų antioksidacinį aktyvumą ORAC metodu, antioksidacinis aktyvumas siekė 2700 μ mol TE_{ORAC}/g [1]. Tuo tarpu šio tyrimo metu pagamintų ištraukų antioksidacinis aktyvumas pagal šį metodą siekė nuo 4630 μ mol TE_{ORAC}/g iki 14990 μ mol TE_{ORAC}/g. Skirtingus tyrimų rezultatus galėjo lemti žaliavos rūšies, jos kokybės ir naudojamo ekstrahavimo metodo skirtumai.

Tarp antioksidacinio aktyvumo tyrimų rezultatų ir bendro fenolinių junginių ir flavonoidų kiekio gauta stipri koreliacija – r reikšmė svyravo nuo 0,875 (koreliacija tarp ORAC tyrimo rezultatų ir bendro flavonoidų kiekio) iki 0,988 (koreliacija tarp ABTS tyrimo rezultatų ir bendro fenolinių junginių kiekio).

3.5. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antibakterinis aktyvumas

Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antibakterinis aktyvumas tirtas su gramteigiamomis bakterijomis bei gramneigiamomis bakterijomis (8 lentelė).

8 lentelė. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antibakterinis aktyvumas

Bakterijų tipas	Gram+ bakterijos				Gram– bakterijos			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Bakterijų rūšis	Referencinė	Klinikinė	Referencinė	Klinikinė	Referencinė	Klinikinė	Referencinė	Klinikinė
Sterili zona, mm								
VU	20±2,83	14,5±3,54	19±2,83	0	0	0	0	0
VM1	17,5±2,12	12±1,41	0	0	0	0	0	0

8 lentelė. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukų antibakterinis aktyvumas (*tęsinys*)

VM2	19±2,83	13,5±2,12	18±2,83	0	0	0	0	0
EM	27,5±1,41	24,5±3,54	20±2,83	0	0	0	0	0
EU	28±2,12	26,5±3,54	20,5±3,54	0	0	0	0	0
EM30	20,5±2,12	12,5±2,12	0	0	0	0	0	0
EM50	24,5±1,41	20,5±4,95	0	0	0	0	0	0
EM70	26±2,83	22,5±3,54	19±2,83	0	0	0	0	0

Balzaminių tuopų pumpurų ištraukos neslopino gramneigiamų bakterijų *E. coli* ir *P. aeruginosa* referencinių ir klinikinių padermių augimo. Kaip kontrolė naudotas 70 proc. (V/V) etanolis visų tiriamų bakterijų augimo neslopino.

Iš 8 lentelėje pateiktų duomenų matyti, jog *S. aureus* referencinės bei klinikinės padermės augimą visos tirtosios ištraukos. Referencinę *S. aureus* padermę gerai veikė liofilizuotos etanolinės ištraukos (EM ir EU), taip pat liofilizuota vandeninė ultragarsinė ištrauka (VU sterili zona nuo 18 iki 22 mm), 30 proc. (V/V) skystoji etanolinė tuopų pumpurų ištrauka (EM30 sterili zona nuo 19 iki 22 mm), šiek tiek mažiau bakterijas veikė liofilizuota vandeninė ištrauka, maceruota 80 °C temperatūroje (VM2 sterili zona nuo 17 iki 21 mm). Mažiausiai referencinės *S. aureus* bakterijas veikė liofilizuota vandeninė ištrauka, maceruota kambario temperatūroje (VM1 sterili zona nuo 16 iki 19 mm).

Klinikinės padermės *S. aureus* bakterijas visos liofilizuotos vandeninės ištraukos, taip pat skystoji 30 % etanolinė ištrauka (EM30) veikė palyginti silpnai: VU sterili zona svyravo nuo 12 iki 17 mm, VM1 sterili zona nuo 11 iki 13 mm, VM2 sterilios zonos skersmuo svyravo nuo 11 iki 14 mm ir EM30 sterili zona buvo nuo 11 iki 14 mm. Skystosios 50 ir 70 proc. (V/V) etanolinės ištraukos (EM50 ir EM70), taip pat liofilizuotos etanolinės ištraukos (EM ir EU) klinikinės *S. aureus* padermės veikė gerai ar labai gerai: EM50 sterilios zonos skersmuo svyravo nuo 17 iki 24 mm, EM70 – nuo 20 iki 25 mm, EM – nuo 22 iki 27 mm ir EU – nuo 24 iki 29 mm.

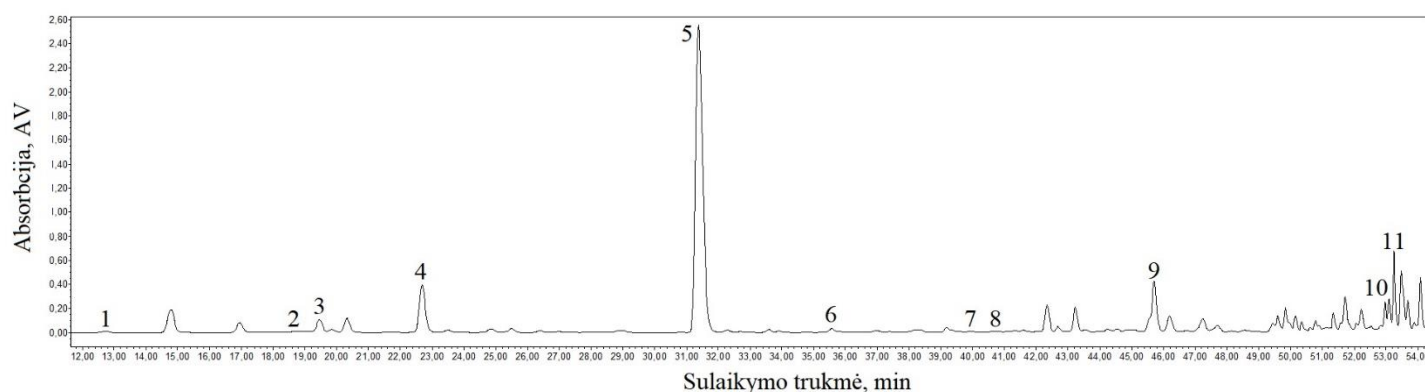
Liofilizuota vandeninė ištrauka, maceruota kambario temperatūroje (VM1) bei skystosios 30 ir 50 proc. (V/V) etanolinės ištraukos (EM30 ir EM50) neslopino *Enterococcus faecalis* referencinės ir klinikinės padermės bakterijų.

Referencinės *E. faecalis* bakterijų padermės gerai ir labai gerai veikė liofilizuotos vandeninės ištraukos (VU ir VM2) bei liofilizuotos etanolinės ištraukos (EM ir EU) ir skystoji 70 proc. (V/V) etanolinė ištrauka (EM70): lėkštelėse su VU ištrauka sterilios zonos skersmuo svyravo nuo 17 iki 21 mm, VM2 – nuo 16 iki 20 mm, EM – nuo 18 iki 22 mm, EU – nuo 18 iki 23 mm ir EM70 – nuo 17 iki 21 mm. Klinikinės padermės *E. faecalis* bakterijų augimo neslopino nei viena iš tirtų ištraukų.

Panašus antimikrobinis aktyvumas nustatytas Debbache ir kt. Etanolinis ekstraktas veikė gerai prieš *E.coli* bakterijas (sterili zona 14,26±0,61 mm), taip pat *S. aureus* (14,30±0,32 mm), *P.aeruginosa* (12,2 ±0,6 mm), *B. subtilis* (17,4±2,08 mm), *A. niger* (7,85±0,07 mm) ir *F. polyferatum* (6,9±1,21 mm) [46]. Taip pat Vardar-Ünlü ir kt. nustatė, kad tuopų pumpurai pasižymi didesniu antimikrobinio aktyvumu prieš gramteigiamas bakterijas, lyginant su gramneigiamomis bakterijomis, kurios pasižymi ribotu antimikrobinio aktyvumu [5].

3.6. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties balzaminių tuopų pumpurų ištraukose įvairavimas

Pritaikius Liaudansko ir kt. [44] ESC metodiką, atlikta balzaminių tuopų pumpurų ištraukų cheminės sudėties analizė. Tirtose ištraukose identifikuoti ir kiekiškai nustatyti šie fenoliniai junginiai: apigeninas, kavos rūgštis, p–kumaro rūgštis, 3,5–dikafeoilchino rūgštis, hiperozidas, (+)–katechinas, chlorogeno rūgštis, floretinas, izokvercetas, ferulo rūgštis bei salicinas. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukos chromatograma pateikiama 19 paveiksle.



19 pav. Balzaminių tuopų pumpurų 70 % skystosios etanolinės ištraukos chromatograma ($\lambda=320$ nm).

1 – salicinas, 2 – (+)–katechinas, 3 – chlorogeno rūgštis, 4 – kavos rūgštis, 5 – p–kumaro rūgštis, 6 – ferulo rūgštis, 7 – hiperozidas, 8 – izokvercetas, 9 – 3,5–dikafeoilchino rūgštis, 10 – floretinas, 11 – apigeninas

Lyginant skystąsias ištraukas didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis nustatytas 70 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje (EM70 – 1,46 mg/ml), mažesnis kiekis nustatytas 50 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje (EM50 – 1,29 mg/ml), mažiausias kiekis – 30 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje (EM30 – 0,92 mg/ml). Lyginant liofilizuotas balzaminių tuopų pumpurų ištraukas, didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis nustatytas etanolinėje ištraukoje gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (EU – 53,08 mg/g), šiek tiek mažesnis kiekis – etanolinėje ištraukoje gamintoje maceracijos būdu (EM – 47,84 mg/g). Liofilizuotų vandeninių ištraukų suminis fenolinių junginių kiekis buvo mažesnis nei etanolinių ištraukų. Didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis lyginant vandenines ištraukas nustatytas ištraukoje gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (VU – 44,64 mg/g), mažesnis kiekis ištraukoje, gamintoje maceracijos būdu 80 °C temperatūroje (VM2 – 31,96 mg/g), mažiausias kiekis – ištraukoje, gamintoje maceracijos būdu kambario temperatūroje (VM1 – 27,05 mg/g). Visų identifikuotų junginių kiekinė sudėtis skirtingose ištraukose pateikta 9 lentelėje.

9 lentelė. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas balzaminių tuopų pumpurų ištraukose

Junginys	Fenolinių junginių kiekis (mg/ml skystosios ištraukos arba mg/g sausosios ištraukos)							
	VU	VM1	VM2	EM	EU	EM30	EM50	EM70
Salicinas	9,67	5,06	7,78	0,3	0,47	0,04	0,05	0,13
(+)–katechinas	4,71	1,74	2,62	2,24	4,07	0,08	0,09	0,1
Chlorogeno r.	1,74	0,54	1,19	1,19	1,39	0,01	0,02	0,02
Kavos r.	3,02	1,69	2,79	2,02	2,8	0,10	0,12	0,13
p–kumaro r.	21,5	12,64	17,41	26,34	28,87	0,53	0,64	0,67

9 lentelė. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas balzaminių tuopų pumpurų ištraukose (*tęsinys*)

Ferulo r.	0,25	0,12	0,22	0,27	0,29	0,02	0,04	0,05
Hiperozidas	0,15	0,06	0,14	0,2	0,25	0,001	0,005	0,006
Izokvercetas	0,28	0,07	0,13	0,3	0,36	0,001	0,005	0,007
3,5–dikafeoilchino r.	3,02	1,82	2,42	3,12	3,66	0,1	0,2	0,21
Floretinas	-	-	-	6,94	7,62	0,02	0,12	0,15
Apigeninas	0,08	0,05	0,07	3,98	4,27	0,01	0,06	0,07

Lyginant skystąsias etanolines balzaminių tuopų pumpurų ištraukas, visų identifikuotų fenolinių junginių kiekiniam nustatyme pastebima ta pati tendencija: daugiausiai fenolinių junginių nustatyta etanolinėje ištraukoje, gamintoje naudojant 70 proc. (V/V) etanolį kaip ekstrahentą. Mažesnis visų fenolinių junginių kiekis nustatytas 50 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje, mažiausias kiekis – 30 proc. (V/V) etanolinėje ištraukoje. p–kumaro rūgštis buvo dominuojantis junginys visose trijose skystosiose etanolinėse ištraukose. Suminis p–kumaro rūgšties kiekis sudarė 48,36 proc. visų nustatytų fenolinių junginių kiekio šiose ištraukose. Skystosiose ištraukose mažiausiai nustatyta hiperozido ir izokvercetino, kurių suminis kiekis sudarė 0,32 ir 0,34 proc. atitinkamai, visų nustatytų fenolinių junginių kiekio skystosiose ištraukose.

p–kumaro rūgštis buvo vyraujantis junginys visose tirtose ištraukose. Lyginant liofilizuotas balzaminių tuopų pumpurų ištraukas, didžiausias p–kumaro rūgšties kiekis nustatytas etanolinėje ištraukoje, gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (VU – 28,87 mg/g). Jis buvo 2,28 karto didesnis už mažiausią p–kumaro rūgšties kiekį, nustatytą vandeninėje ištraukoje, gamintoje maceracijos metodu, kambario temperatūroje (VM1 – 12,64 mg/g). Didelis p–kumaro rūgšties kiekis nustatytas etanolinėje ištraukoje, gamintoje maceracijos metodu (EM – 26,34 mg/g), šiek tiek mažesnis kiekis nustatytas vandeninėje ištraukoje, gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (VU – 21,5 mg/g), taip pat vandeninėje ištraukoje gamintoje maceracijos būdu, 80 °C temperatūroje (VM2 – 17,41 mg/g).

Balzaminių tuopų pumpurų ištraukose nustatytas salicinas, kurio didžiausias kiekis nustatytas liofilizuotoje vandeninėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (VU – 9,67 mg/g), taip pat nemažas salicino kiekis nustatytas liofilizuotoje vandeninėje ištraukoje, gamintoje maceracijos būdu 80 °C temperatūroje (VM2 – 7,78 mg/g), mažiausias salicino kiekis nustatytas liofilizuotoje etanolinėje ištraukoje, gamintoje maceracijos būdu (EM – 0,3 mg/g), šiek tiek didesnis kiekis etanolinėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (EU – 0,47 mg/g). Šie rezultatai rodo, kad tirpiklio parinkimas salicino išskyrimui iš balzaminių tuopų pumpurų žaliavos yra svarbus technologinis etapas. Galima teigti, kad didesnę salicino kiekį vandeninėse ištraukose lėmė tai, kad salicino tirpumas vandenyje yra beveik 4 kartus didesnis (43 mg/ml), lyginant su tirpumu etanolyje (11 mg/ml).

Chlorogeno rūgšties daugiausiai nustatyta liofilizuotoje vandeninėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (VU – 1,74 mg/g). Jis buvo 3,22 karto didesnis už mažiausią chlorogeno rūgšties kiekį, nustatytą vandeninėje ištraukoje, gamintoje maceracijos metodu, kambario temperatūroje (VM1 – 0,54 mg/g). Nemažas chlorogeno rūgšties kiekis nustatytas etanolinėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (EU – 1,39 mg/g), taip pat etanolinėje ištraukoje, gamintoje maceracijos būdu (EM – 1,19 mg/g) bei vandeninėje ištraukoje, gamintoje maceracijos būdu 80 °C temperatūroje (VM2 – 1,19 mg/g).

Didžiausias kavos rūgšties kiekis nustatytas liofilizuotoje vandeninėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (VU – 3,02 mg/g), šiek tiek mažesnis kiekis nustatytas liofilizuotoje etanolinėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (EU – 2,8 mg/g) bei liofilizuotoje vandeninėje ištraukoje, gamintoje maceracijos būdu 80 °C temperatūroje (VM2 – 2,79 mg/g). Mažiausias kavos rūgšties kiekis nustatytas liofilizuotoje vandeninėje ištraukoje, gamintoje maceracijos metodu, kambario temperatūroje (VM1 – 1,69 mg/g).

Ferulo rūgšties kiekis nustatytas visose liofilizuotose ištraukose buvo panašus ir įvairavo nuo 0,2 mg/g (VM1) iki 0,29 mg/g (EU). Suminis ferulo rūgšties kiekis sudarė 0,56 proc. visų nustatytų fenolinių junginių kiekio liofilizuotose ištraukose.

Suminis 3,5–dikafeoilchino rūgšties kiekis liofilizuotose ištraukose sudarė 6,88 proc. visų nustatytų fenolinių junginių kiekio šiose ištraukose. Didžiausias šios rūgšties kiekis nustatytas liofilizuotoje etanolinėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (EU – 3,66 mg/g). Jis buvo 2 kartus mažesnis už mažiausią 3,5–dikafeoilchino rūgšties kiekį, nustatytą vandeninėje ištraukoje, gamintoje maceracijos metodu, kambario temperatūroje (VM1 – 1,82 mg/g). Nemažas 3,5–dikafeoilchino rūgšties kiekis nustatytas etanolinėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (EU – 3,12 mg/g), šiek tiek mažesnis kiekis – liofilizuotoje vandeninėje ištraukoje gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (VU – 3,02 mg/g).

Didžiausias apigenino kiekis nustatytas liofilizuotoje etanolinėje ištraukoje, ekstrahuotoje ultragarsu (EU – 4,27 mg/g). Šiek tiek mažesnis kiekis nustatytas liofilizuotoje etanolinėje ištraukoje, gamintoje maceracijos būdu (EM – 3,98 mg/g). Liofilizuotose vandeninėse ištraukose nustatytas labai mažas apigenino kiekis, kuris svyravo nuo 0,05 mg/g (VM1) iki 0,08 mg/g (VU).

Floretinas nustatytas tik etanolinėse ištraukose. Tai galėjo lemti floretino prastas tirpumas vandenyje. Liofilizuotoje etanolinėje ištraukoje, gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (EU), šio junginio nustatyta 7,62 mg/g, tai sudarė 14,09 proc. visų fenolinių junginių kiekio nustatyto šioje ištraukoje. Liofilizuotoje etanolinėje ištraukoje, gamintoje maceracijos metodu (EM), fluoretino nustatyta 1,07 karto mažiau – 3,98 mg/g.

Balzaminių tuopų pumpurų ištraukose nustatyti kvercetino glikozidų grupės junginiai – hiperozidas ir izokvercetas. Didžiausias suminis kvercetino glikozidų kiekis nustatytas liofilizuotoje etanolinėje ištraukoje, gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu (EU – 0,61 mg/g). Jis buvo 2 kartus mažesnis už mažiausią suminių kvercetino glikozidų kiekį, nustatytą vandeninėje ištraukoje, gamintoje maceracijos metodu, kambario temperatūroje (VM1 – 0,13 mg/g). Suminis kvercetino glikozidų kiekis sudarė 0,95 proc. visų nustatytų fenolinių junginių kiekio liofilizuotose ištraukose.

Mokslinėje literatūroje rasti du straipsniai, kuriuose nagrinėta tuopų pumpurų ištraukų fenolinė sudėtis [1, 8]. Eksperimentinio tyrimo rezultatai sutapo su mokslinėje literatūroje skelbiamais duomenimis. Ištraukose, pagamintose iš Lietuvoje augančių balzaminių tuopų pumpurų, nustatyta, kad dominuojantis fenolinis junginys yra p–kumaro rūgštis [1]. Kaip ir kitų mokslininkų skelbiamuose tyrimų duomenyse, šio tyrimo metu buvo identifikuoti ir kiekiškai nustatyti šie junginiai: salicinas, kavos rūgštis, apigeninas. Taip pat tyrimo rezultatai parodė, kad tirpiklio parinkimas daro įtaką veikliųjų junginių išsiskyrimui. Salicino, kuris geriau tirpus vandenyje nei etanolyje, didesnis kiekis nustatytas vandeninėse ištraukose. Floretinas dėl savo lipofilinių savybių nustatytas tik etanolinėse balzaminių tuopų pumpurų ištraukose. Tyrimo rezultatai patvirtino, kad etanolis ir vanduo yra tinkami tirpikliai fenoliniams junginiams ekstrahuoti iš augalinės žaliavos [14, 15]. Dėl riboto mokslinėje literatūroje skelbiamų duomenų kiekio apie tuopų pumpurų cheminę

sudėtį, eksperimentinio tyrimo metu pirmą kartą ištraukose identifikuoti ir kiekiškai nustatyti šie junginiai: (+)-katechinas, chlorogeno rūgštis, hiperozidas, izokvercetas, 3,5-dikafeoilchino rūgštis bei floretinas. Mokslinėje literatūroje yra duomenų apie šiuos identifikuotus fenolinius junginius tuopų pumpurų ištraukose: izoferulo rūgštį, di-O-metilkoфеino rūgštį, pinobanksino 5-metilesterį, cinamono rūgštį, pinobanksiną, pinocembriną, resveratrolį, kemferolį, chriziną, galanginą ir kavos rūgšties fenilo esterį [1, 8]. Eksperimentinio tyrimo metu pasirinkta tyrimo metodika bei turimi standartai nesuteikė galimybės identifikuoti visus literatūroje minimus junginius. Šio tyrimo rezultatai patvirtino, kad ekstrakcijos metodas daro įtaką fenolinių junginių išskyrimui iš augalinės žaliavos. Taikant maceracijos metodą žaliava nepilnai išsiekstrahuoja [22], todėl maceruotose ištraukose nustatytas mažesnis kiekis bioaktyviųjų junginių, lyginant su ištraukomis pagamintomis taikant ultragarsą.

Išvados

1. Ultragarsinės ekstrakcijos ir maceracijos metodai yra tinkami balzaminių tuopų pumpurų ištraukų gamybai. Pagamintos kokybiškos skystosios etanolinės ir vandeninės balzaminių tuopų pumpurų ištraukos, kai žaliavos ir ekstrahento santykis yra 1:10. Liofilizacija yra tinkamas metodas skystųjų ištraukų sukonzentravimui – taikant šį metodą, pagamintos koncentruotos sausosios vandeninės ir etanolinės (kai ekstrahentu naudotas 70 proc. (V/V) etanolis) ištraukos.
2. Tirpikliai daro įtaką bioaktyviųjų junginių kiekiui ištraukose. Nustatyta, kad 70 proc. (V/V) etanolis yra efektyvesnis tirpiklis balzaminių tuopų pumpurų ištraukų gamybai nei 30 proc. (V/V) ir 50 proc. (V/V) etanoliniai tirpikliai bei vanduo. Nustatytas didesnis bioaktyviųjų junginių kiekis (bendras fenolinių junginių ir flavonoidų kiekis) ištraukose gamintose, naudojant ekstrahentu 70 proc. (V/V) etanolį. ESC metodo rezultatai parodė, kad tirpiklio parinkimas yra svarbus siekiant išskirti iš žaliavos skirtingo lipofiliškumo bioaktyviuosius junginius. Salicino išskyrimas iš žaliavos yra efektyvesnis, kai ekstrahentu naudojamas vanduo, o floretino išskyrimui tinkamesnis tirpiklis yra etanolinio ir vandens mišinys.
3. Ekstrahavimo metodas daro įtaką bioaktyviųjų junginių kiekiui balzaminių tuopų pumpurų ištraukose. Nustatyta, kad ultragarsinė ekstrakcija yra efektyvesnė lyginant su maceracijos metodu. Ultragarsinės ekstrakcijos metu išskiriamas panašus bioaktyviųjų junginių kiekis iš balzaminių tuopų pumpurų, kaip ir maceracijos metodu, tačiau ultragarsinės ekstrakcijos trukmė yra 30 minučių, o maceracijos metodo – 6 valandos (vandeninės ištraukos) arba 120 valandų (etanolinės ištraukos).
4. Pasirinkti antioksidacinio aktyvumo tyrimo metodai (ABTS⁺ radikalų – katijonų surišimo gebos nustatymo ir deguonies radikalų absorbcijos gebos (ORAC) nustatymo metodai) yra tinkami vertinti balzaminių tuopų pumpurų antioksidacinį aktyvumą. Šių metodų pritaikymas leido įvertinti laisvųjų radikalų surišimo gebą. Stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu iš tirtų skystųjų etanolinių balzaminių tuopų pumpurų ištraukų pasižymėjo ištrauka, kurios gamybai naudotas 70 proc. (V/V) etanolis. Iš liofilizuotų balzaminių tuopų pumpurų ištraukų didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas etanolinėje ištraukoje, gamintoje ultragarsinės ekstrakcijos metodu, mažiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas liofilizuotoje vandeninėje ištraukoje, maceruojoje kambario temperatūroje. Antioksidacinio aktyvumo tyrimų rezultatai koreliavo su bendro fenolinių junginių ir flavonoidų kiekio tyrimų rezultatais.
5. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukos neslopino gramneigiamų bakterijų (*E. coli* ir *P. aeruginosa*) augimo. Tirtosios ištraukos pasižymėjo skirtingu antibakteriniu aktyvumu prieš gramteigiamas bakterijas (*S. aureus* ir *E. faecalis*). *S. aureus* bakterijų padermės balzaminių tuopų pumpurų ištraukos veikė stipriau nei *E. faecalis* bakterijų padermės. Nustatyta, kad ištraukos slopina referencinių ir klinikinių *S. aureus* bakterijų padermių augimą. Ištraukos buvo efektyvios prieš referencinės padermės *E. faecalis* bakterijas ir nedemonstravo augimą slopinančio poveikio klinikinės padermės bakterijoms.
6. Efektyvioji skysčių chromatografija yra efektyvus metodas siekiant išsiaiškinti balzaminių tuopų pumpurų ištraukų cheminę sudėtį. Balzaminių tuopų pumpurų ištraukose nustatyti šie junginiai: apigeninas, kavos rūgštis, p-kumaro rūgštis, 3,5–dikafeoilchino rūgštis, hiperozidas, katechinas, chlorogeno rūgštis, floretinas, izokvercetas, ferulo rūgštis ir salicinas. p-kumaro rūgštis buvo dominuojantis junginys visose tirtose balzaminių tuopų pumpurų ištraukose.

Rekomendacijos

1. Siekiant išskirti didesnę kiekį veikliųjų junginių iš augalinės žaliavos tikslinga naudoti ekstrakcijos ultragarsu metodą, kuris yra trumpesnis ir efektyvesnis nei klasikiniai ekstrahavimo metodai (maceracija).
2. Liofilizacija yra tinkamas metodas siekiant sukcentruoti ekstrakcijos metu gautus bioaktyviuosius junginius. Sukcentruotos liofilizuotos balzaminių tuopų pumpurų ištraukos, esančios miltelių formoje, gali būti pritaikomos kietų farmacinių formų gamyboje, kaip veiklioji medžiaga. Vystant tyrimus šia kryptimi, rekomenduojama užtikrinti liofilizuotų ištraukų stabilumą bei kokybės parametrus (drėgmė, birumas, dalelių dydis).
3. Rekomenduojama plėtoti balzaminių tuopų pumpurų cheminės sudėties tyrimus, siekiant nustatyti didesnę spektrą biologiškai aktyvių junginių bei rekomenduojama pritaikyti kitus analitinius metodus, kurie tiktų eterinių aliejų nustatymui balzaminių tuopų pumpurų žaliavoje.

Literatūros sąrašas

1. DUDONNÉ S., POUPARD P., COUTIERE P., WOILLEZ M., RICHARD T., MERILLON J., VITRAC X. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Poplar Bud (*Populus nigra*) Extract: Individual Antioxidant Contribution of Phenolics and Transcriptional Effect on Skin Aging. *J. Agric. Food Chem.* 2011, nr. 9, 4527–4536.
2. MERGHACHE D., BOUCHERIT-OTMANI Z., HACI I. E., CHIKHI I., IR BOUCHERIT K. antioxidant and antimicrobial activities of algerian populus nigra l. buds extracts. *Bioscience and Engineering: An International Journal (BIOEJ)*. 2016, vol. 3, nr. 1/2, 8.
3. DAPKŪNIENĖ S., BALIUCKIENĖ A., BALTRĖNAS R. Augalų nacionaliniai genetiniai ištekliai Lietuvos parkuose ir sodybose. *Lietuvos Respublikos aplinkos ministerija, Augalų genų bankas, Vilniaus universiteto botanikos sodas*. 2015, 64. ISBN 978-609-8126-32-7.
4. VUOLO M. M., LIMA V. S., MARÓSTICA JUNIOR M. R. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *Bioactive Compounds*, Elsevier, Chapter 2. 2019, 33–50.
5. VARDAR-ÜNLÜ G., SILICI S., ÜNLÜ M. Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, nr. 7, 1011–1017.
6. KAUNAS Egidijus ir Vilma KAUNIENĖ. *Vaistingieji augalai*. Vilnius: Varpas, 1991. ISBN 5-89942-087-1.
7. VALSTYBINĖ VAISTŲ KONTROLĖS TARNYBA. „Akutur vaistinio preparato informacinis lapelis ir registracijos dokumentai“.
8. KUŠ P., JERKOVIĆ I., JAKOVLJEVIĆ M., JOKIĆ S. Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO₂ and its optimization by response surface methodology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 128–136.
9. MINATEL I. O., BORGES C. V., FERREIRA M. I., GOMEZ H. A. G., CHEN C.-Y. O., IR LIMA G. P. P. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. 2017.
10. BALASUNDRAM N., SUNDRAM K., SAMMAN S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006, nr. 1, 191–203.
11. CHEYNIER V. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem. Rev.* 2012, nr. 2–3, 153–177.
12. PANCHE A. N., DIWAN A. D., CHANDRA S. R. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 2016, nr. 5, 47.
13. SANTOS E. L., MAIA B. H. L. N. S., FERRIANI A. P., TEIXEIRA S. D. Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*, chapter 1. 2017, 10-13.
14. ALZAND K. I., ABDALKARIM M. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Antioxidant activity. *J. Pharm. Res.* 2012, nr. 8, 8.
15. FALCONE FERREYRA M. L., RIUS S. P., CASATI P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.* 2012, nr. 3, 16.
16. MIERZIAK J., KOSTYN K., KULMA A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*. 2014, nr. 10, 16240–16265.
17. KOZŁOWSKA A., SZOSTAK-WĘGIEREK D. Flavonoids - food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2014, 65(2), 79-85.
18. WANG T., LI Q., BI K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* 2018, nr. 1, 12–23.
19. GOLENIOWSKI M., BONFILL M., CUSIDO R., PALAZÓN J. Phenolic Acids. *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg. 2013, 1951–1973.

20. ROBBINS R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2003, nr. 10, 2866–2887.
21. PHANIENDRA A., JESTADI D. B., PERIYASAMY L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 2015, nr. 1, 11–26.
22. NACZK M., SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* 2004, nr. 1–2, 95–111.
23. ANTOLOVICH M., PRENZLER P., ROBARDS K., RYAN D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst.* 2000, nr. 5, 989–1009.
24. European Pharmacopeia 9th ed. Council of Europe. Strasbourg; 2018.
25. BRIEDIS V., GRINCEVIČIUS J., SAVICKAS J., ŠVAMBARIS A. *Vaistų technologija*. Kaunas: KMU, 2002.
26. KADAM S. U., TIWARI B. K., SMYTH T. J., O'DONNELL C. P. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 2015, nr. 23, 308–316.
27. MEDINA-TORRES N., AYORA-TALAVERA T., ESPINOSA-ANDREWS H., SÁNCHEZ-CONTRERAS A., PACHECO N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy.* 2017, nr. 3, 47.
28. ALTEMIMI A., WATSON D. G., CHOUDHARY R., DASARI M. R., LIGHTFOOT D. A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLOS ONE.* 2016, 11, nr. 2, 148-758.
29. CHEMAT F., ROMBAUT N., SICAIRE A.-G., MEULLEMIESTRE A., FABIANO-TIXIER A.-S., ABERT-VIAN M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 2017, nr. 34, 540–560.
30. ZHOU Y., ZHENG J., GAN R.-Y., ZHOU T., XU D.-P., LI H.-B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidants from the Mung Bean Coat. *Molecules.* 2017, 22, nr. 4, 638.
31. PARHI R., SURESH P. Supercritical fluid technology: a review. *J. Adv. Pharm. Sci. Technol.* 2013, nr. 1, 13–36.
32. LAITINEN A. Supercritical fluid extraction of organic compounds from solids and aqueous solutions. *VTT publications.* 2000, 60.
33. Meyer V. R. *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Heidelberg, 2000, 25.
34. MARUŠKA A., KORNYŠOVA O., MACHTEJEVAS E. *Efektivosios skysčių chromatografijos pagrindai*. Kaunas: Vytauto Didžiojo universiteto leidykla, 2005.
35. GE HEALTHCARE, LIFE SCIENCES. *Spectrophotometry Handbook*. General Electric Company, 2012, 32.
36. BLAINSKI A., LOPES G., DE MELLO J. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules.* 2013, nr. 6, 6852–6865.
37. MILARDOVIC S., KERKOVIC I., DERRICO R., RUMENJAK V. A novel method for flow injection analysis of total antioxidant capacity using enzymatically produced ABTS+ and biamperometric detector containing interdigitated electrode. *Talanta.* 2007, nr. 1, 213–220.
38. ZHANG C., ZHENG H., LIU G., HU F. Development and validation of HPLC method for determination of salicin in poplar buds: Application for screening of counterfeit propolis. *Food Chem.* 2011, (127), nr. 1, 345–350.
39. KUŠ P. M., OKIŃCZYK P., JAKOVLJEVIĆ M., JOKIĆ S., JERKOVIĆ I. Development of supercritical CO₂ extraction of bioactive phytochemicals from black poplar (*Populus nigra* L.) buds followed by GC–MS and UHPLC-DAD-QqTOF-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, (158), 15–27.

40. SINGLETON V. L., ORTHOFER R., LAMUELA-RAVENTÓS R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, Elsevier. 1999, 152–178.
41. RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EVANS C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, (26), nr. 9–10, 1231–1237.
42. PRIOR R. L., HOANG H., GU L., WU X., BACCHIOCCA M., HOWARD L., HAMPSCHWOODILL M., HUANG D., OU B., JACOB R. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* 2003, (51), nr. 11, 3273–3279.
43. BABICKAITĖ L., RAMANAUSKIENĖ K., GRIGONIS A., IVAŠKIENĖ M., DAUNORAS G., KLIMIENĖ I., VIRGAILIS M., ZAMOKAS G., INKĖNIENĖ A. M., MATUSEVIČIUS A. P. determination of antimicrobial activity of chlorhexidine gel. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.* 2016, vol. 73, nr. 6, 1623-1630.
44. LIAUDANSKAS M., VIŠKELIS P., JAKŠTAS V., RAUDONIS R., KVIKLYS D., MILAŠIUS A., JANULIS V. Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Various Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars. *Journal of Chemistry.* 2014, 1–10.
45. WANG K., ZHANG J., PING S., MA Q., XHEN X., XUAN H., SHI J., ZHANG C., HU F. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus × canadensis*). *Journal of Ethnopharmacology.* 2014, (155), nr. 1, 300–311.
46. DEBBACHE N., ATMANI D., ATMANI D. Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Ind. Crops Prod.* 2014, (53), 85–92.

Priedai

1 priedas. Publikacijos

Žodinis pranešimas ir tezės tema „Tuopų pumpurų ekstraktų technologija ir kokybės vertinimas“ paskelbtos tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „Žmogaus ir gamtos sauga 2019“.