



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Lina Grunovaitė**

**JUODŲJŲ ARONIŲ IŠSPAUDŲ BIORAFINAVIMAS TAIKANT  
ŠIUOLAIKIŠKUS DIDELIO SLĖGIO EKSTRAKCIJOS IR  
CHROMATOGRAFIJOS METODUS BIOLOGIŠKAI VERTINGŲ  
FUNKCIONALIŲJŲ KOMPONENTŲ IŠSKYRIMUI**

Baigiamasis magistro darbas

**Vadovas**

Lekt. dr. Milda Pukalskienė

**KAUNAS, 2015**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**  
**MAISTO MOKSLO IR TECHNOLOGIJOS KATEDRA**

TVIRTINU

Katedros vedėjas  
Doc. dr. Loreta Bašinskienė

**JUODŪJŲ ARONIŲ IŠSPAUDŲ BIORAFINAVIMAS TAIKANT  
ŠIUOLAIKIŠKUS DIDELIO SLĖGIO EKSTRAKCIJOS IR  
CHROMATOGRAFIJOS METODUS BIOLOGIŠKAI VERTINGŲ  
FUNKCIONALIŲJŲ KOMPONENTŲ IŠSKYRIMUI**

Baigiamasis magistro darbas  
Maisto mokslo ir saugos studijų programa (621E40001)

**Vadovas**

Lekt. dr. Milda Pukalskienė

**Recenzentas**

Lekt. dr. Ina Jasutienė

**Projektą atliko**

Lina Grunovaitė

**KAUNAS, 2015**

## SUMMARY

*Grunovaitė, L. Biorefinery of black chokeberry pomace by high pressure extraction and chromatography methods of the isolation of valuable functional ingredients. Master thesis / supervisor lect. Dr. Milda Pukalskienė; Kaunas University of technology, Faculty of Chemical Technology, Department of food science and technology.*

Kaunas, 2015. 83 p

Black chokeberry pomace is a by-product of aronia juice. However, nowadays in chokeberry technological processing large quantities of pomace are removed as waste, while it could be used for the development of valuable preparations containing bioactive compounds. Based on the research studies chokeberry pomace is a good source of bioactive compounds that could be processed into high added value products with health benefit properties.

The aim of this work was to obtain different extraction methods of black chokeberry pomace (*Aronia melanocarpa*) into functional ingredients and evaluate antioxidant properties and phenolics and aroma compounds of obtained extracts/fractions.

Extracts were obtained using traditional and modern extraction methods, such as multi-level extraction in the Soxhlet, steam water extraction, Lickens-Nickerson extraction, accelerated solvent extraction (ASE) and supercritical carbon dioxide extraction. Response Surface Methodology was used for the optimization of SFE parameters, pressure, time and temperature. The optimal values of parameters giving the maximum yields of extracts were determined.

In addition 2%, 5% and 10% of a polar additive (ethanol), were added to evaluate influence of polar additive. After CO<sub>2</sub> extraction obtained residue were extracted by accelerated solvent extraction with different polarity solvents.

Antioxidant activity of extracts were evaluated by 2,2-diphenyl-1-pikrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) scavenging and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays. The total content of phenolic compounds in the extracts was determined using the *Folin-Ciocalteu* method. Antioxidant activity of solid fractions were tested by QUENCHER approach as reported previously. Qualitative and quantitative analysis of chokeberry extracts were analyzed by ultra performance liquid chromatograph coupled with mass quadruple time of flight detector (UPLC-Q-TOF). Antioxidant activity of individual compounds were analysed by HPLC-DPPH post column method. Sucrose and sorbitol quantification aqueous extracts

were applied UPLC system. Obtained essential oils by water steam extraction and Lickens-Nickerson extraction were analysed by gas chromatography (GC) with flame ionization (FID) and mass spectrometry (MS).

The evaluation of the antioxidant activity of the extracts by various *in vitro* methods that the highest activity showed extracts obtained by polar solvents, while the lowest antioxidant activity showed SKE-CO<sub>2</sub> extract there by obtained. Solid fractions investigated by QUENCHER approach showed that solid fractions obtained after various extractions, possessed antioxidant activity where remains a significant amount of active compounds.

Quantitative analysis showed that the main compounds were rutin and hyperoside obtained by extraction with ethanol in a Soxhlet apparatus. Residue obtained after supercritical CO<sub>2</sub> extraction by optimal conditions, were extracted repeatedly by accelerated solvent extraction with acetone and ethanol, obtained extract showed high concentration of chlorogenic acid. The main cyanidin glycosides identified in chokeberry pomace were: cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside and cyanidin-3-xyloside. The higher concentration of aqueous extracts of the highest concentrations of sorbitol and sucrose detected traces. The main volatile compounds in volatile extract contains benzaldehyde and 3-penten-2-one, deodorized extract E-cadinenether and octacosane.

It may be concluded, that black chokeberry pomace is a good source of antioxidatively active compounds, and may be a promising additives into high value-added products, which could enrich food, cosmetics and pharmaceutic products.

**Keywords:** *Aronia melanocarpa*, phenolic compounds, DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, ORAC, Folin-Ciocalteu, UESCh-Q-TOF, ESCh-DPPH post column method, procedure of QUENCHER.

## SANTRAUKA

*Grunovaitė, L. Juodųjų aronijų išspaudų biorafinavimas taikant šiuolaikiškus didelio slėgio ekstrakcijos ir chromatografijos metodus biologiškai vertingų funkcionaliųjų komponentų išskyrimui. Magistro baigiamasis projektas / vadovas lekt. dr. Milda Pukalskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Maisto mokslo ir technologijos katedra.*

Kaunas, 2015. 83 psl.

Aronijų išspaudos – šalutinis sulčių gamybos produktas. Didelė išspaudų dalis susidaranti technologinio aronijų perdirbimo metu yra pašalinama į atliekas, nors galėtų būti panaudojama biologiškai aktyvių junginių turintiems preparatams gaminti. Remiantis moksliniais tyrimais išspaudose lieka dalis bioaktyvių junginių, kurie galėtų būti perdirbti į didesnės pridėtinės vertės produktus, pasižyminčius teigiamu poveikiu sveikatai.

Šio darbo tikslas buvo pritaikyti skirtingus ekstrakcijos metodus funkcionaliųjų komponentų išgavimui iš juodųjų aronijų išspaudų (*Aronia melanocarpa*) ir nustatyti gautų frakcijų/ekstraktų antioksidacines savybes, fenolinių junginių bei aromato junginių sudėtį.

Buvo atlikta ekstraktų gamyba naudojant tradicinius ir šiuolaikiškus ekstrakcijos metodus, tokius kaip daugiapakopė Soksleto ekstrakcija, ekstrakcija vandens garais, Lickens-Nickerson ekstrakcija, pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais bei superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu. Naudojant paviršiaus atsako metodą atliktas superkritinės ekstrakcijos parametrų (slėgio, laiko ir temperatūros) optimizavimas. Nustatytos ekstrakcijos parametrų vertės, kurių metu gaunama didžiausia ekstrakto išeiga. Optimaliomis sąlygomis į SK – CO<sub>2</sub> srautą įterpiama 2 %, 5 % ir 10 % polinio priedo (etanolio), po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu likusiai žaliavai, taikyta pagreitinta ekstrakcija skirtingo poliškumo tirpikliais.

Skirtingų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertintas naudojant, gerai žinomas, modelines *in vitro* sistemas. Radikalų surišimo geba įvertinta taikant 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) radikalo ir 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS<sup>•+</sup>) katijono radikalo blukinimo metodus. Taip pat nustatyta deguonies radikalo surišimo geba (ORAC). Gauti rezultatai išreikšti mmol Trolokso ekvivalentų (TE) g<sup>-1</sup> ekstrakto. Bendrasis fenolinių junginių kiekis nustatytas *Folin-Ciocalteu* metodu ir išreikštas mg galo rūgšties ekvivalentų (GRE) g<sup>-1</sup> ekstrakto. Prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstraktų likusios kietosios frakcijos antioksidacinis aktyvumas tirtas prieš tai išvardintais antioksidacinio aktyvumo metodais, pritaikius QUENCHER procedūrą.

Kokybinė ir kiekybinė aronijų išspaudų ekstraktų bei antocianų analizė buvo atlikta taikant ultra efektyviają skysčių chromatografiją su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi (UESCh-Q-TOF). Nustatytų fenolinių junginių antiradikalinės savybės išspaudų ekstraktuose įvertintos kombinuotu ESCh–DPPH pokolonėliniu metodu. Sacharozės ir sorbitolio kiekybiniam įvertinimui vandeniniuose ekstraktuose buvo taikyta UESCh-MS sistema. Ekstrakcijos vandens garais metu gauto eterinio aliejaus bei Lickens-Nickerson ekstrakcijos būdu išgauto lakaus ekstrakto lakiųjų junginių sudėtis tirta dujų chromatografijos (DC) metodu liepsnos jonizacijos (LJD) ir masių spektrometrijos (MS) detektoriais.

Įvertinus ekstraktų antioksidacinį aktyvumą įvairiais *in vitro* metodais nustatyta, kad didžiausiu aktyvumu pasižymėjo poliniais tirpikliais išgauti ekstraktai, o mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo SKE – CO<sub>2</sub> būdu gauti ekstraktai. Ištyrus netirpių išspaudų komponentų antioksidacinį aktyvumą QUENCHER metodu prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstrakcijų nustatyta, kad po ekstrakcijos išspaudose lieka nemažas kiekis aktyvių junginių.

Tiriant ekstraktų sudėtį kiekybiškai įvertinti hiperozidas, chlorogeno rūgštis ir rutinas. Didžiausias rutino ir hiperozido kiekis gautas ekstrahuojant etanoliu Soksleto aparate. Po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos taikant pagreitintą ekstrakciją acetonu ir etanoliu gautuose ekstraktuose buvo didžiausia chlorogeno rūgšties koncentracija. Aronijų išspaudų ekstraktuose nustatytas cianidinas ir keturi cianidino glikozidų dariniai: cianidin-3-galaktozido, cianidin-3-gliukoizido, cianidin-3-arabinozido ir cianidin-3-ksilozido. Vandeniniuose ekstraktuose nustatyta didžiausia sorbitolio koncentracija, o sacharozės aptikta pėdsakais. Pagrindiniai lakieji junginiai esantys lakiame ekstrakto yra benzaldehidas ir 3-penten-2-onas, dezodoruotame ekstrakto - E-kadineno eteris ir oktakosanas. Taigi atlikti tyrimai parodė, kad aronijų išspaudos yra geras šaltinis biologiškai aktyvių komponentų, todėl jos gali būti perdirbamos į didesnės pridėtinės vertės produktus, kurie galėtų būti naudojami maisto, kosmetikos ar farmacijos pramonėje.

**Reikšminiai žodžiai:** *Aronia melanocarpa*, fenoliniai junginiai, DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, ORAC, *Folin–Ciocalteu*, UESCh-Q-TOF, ESCh–DPPH pokolonėlinis metodas, QUENCHER procedūra

## TURINYS

ĮVADAS .....	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	15
1.1. Juodųjų aronijų ( <i>Aronia melanocarpa</i> ) paplitimas ir jų panaudojimas pramonėje .....	15
1.2. Aronijų biocheminė sudėtis.....	16
1.2.1. Aronijose esantys cukrai ir fenoliniai junginiai .....	16
1.3. Aronijose esančių veikliųjų medžiagų farmakologinis poveikis .....	23
1.4. Veikliųjų medžiagų išskyrimo būdai.....	25
1.4.1. Soksleto ekstrakcija.....	26
1.4.2. Ekstrakcija vandens garais.....	27
1.4.3. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE – CO <sub>2</sub> ).....	27
1.4.4. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE).....	31
1.4.5. Kiti ekstrakcijų metodai.....	32
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI.....	34
2.1. Tyrimų objektas .....	34
2.2. Tyrimų metodai.....	34
2.2.1. Cheminiai reagentai ir medžiagos .....	34
2.2.2. Naudoti prietaisai.....	35
2.3. Augalų paruošimas ir ekstraktų gamyba .....	36
2.3.1. Soksleto ekstrakcija (SOK) .....	38
2.3.2. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE) .....	38
2.3.3. Ekstrakcija vandens garais (EVG) ir Lickens-Nickerson ekstrakcija.....	39
2.3.4. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE - CO <sub>2</sub> ).....	39
2.3.4.1. Superkritinės CO <sub>2</sub> ekstrakcijos planavimas.....	40
2.3.4.2. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE) .....	41
2.4. Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas .....	41
2.4.1. Bandinių paruošimas .....	42
2.4.2. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) .....	42
2.4.3. 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS <sup>•+</sup> ) laisvųjų radikalų sujungimo metodas .....	42
2.4.4. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH <sup>•</sup> ) radikalų sujungimo metodas.....	43

2.4.5.	<i>Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)</i> .....	44
2.5.	Kietosios frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas .....	44
2.6.	Ekstraktų sudėties ir kiekio nustatymas .....	45
2.6.1.	<i>Efektyviosios skysčių chromatografijos DPPH pokolonėlinis metodas (ESCh-DPPH<sup>•</sup>)</i> ..	45
2.6.2.	<i>Ekstraktų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESCh – Q – TOF)</i> .....	46
2.7.	Antocianų kiekybinė analizė .....	47
2.8.	Sacharidų kiekio nustatymas.....	48
2.9.	Dujų chromatografijos (DC – LJD) metodas .....	48
2.9.1.	<i>Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos (DC – MS) metodas</i> .....	49
2.10.	Rezultatų statistinė analizė .....	49
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	50
3.1.	Ekstraktų išeigos gautos ekstrahuojant poliniais organiniais tirpikliais.....	50
3.2.	Ekstraktų išeigos gautos ekstrahuojant nepoliniais organiniais tirpikliais.....	51
3.3.	Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	56
3.4.	Cheminis aronijų išspaudų ekstraktų sudėties tyrimas chromatografiniais metodais .....	59
3.5.	Sorbitolio ir sacharozės nustatymas.....	66
3.6.	Antocianų kokybinė ir kiekybinė analizė .....	67
3.7.	Eterinio aliejaus bei lakaus ekstrakto analizė DC – LJD ir DC – MS metodais.....	70
	IŠVADOS .....	72
	LITERATŪRA.....	74
	GYVENIMO APRAŠYMAS (CV) .....	82
	PADĖKA .....	83
	PRIEDAI.....	84



## LENTELIŲ SĄRAŠAS

<b>1.1 lentelė.</b> Polifenoliai esantys aronijų uogose, sultyse ir išspaudose .....	20
<b>1.2 lentelė.</b> Fizikocheminių savybių vidutinės vertės dujoms, skysčiams ir superkritiniams skysčiams .....	28
<b>1.3 lentelė.</b> Įvairių junginių tirpumas superkritiniame anglies dioksido .....	30
<b>2.1 lentelė.</b> Patikrinti faktoriai ir lygiai projektuojant SKE – CO <sub>2</sub> eksperimentą.....	41
<b>3.1 lentelė.</b> Kvadratinio modelio dispersinė analizė.....	52
<b>3.2 lentelė.</b> Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas .....	57
<b>3.3 lentelė.</b> Fenolinių junginių charakteristikos aronijų išspaudų ekstraktuose gautos UESCh-MS/MS metodu .....	63
<b>3.4 lentelė.</b> Identifikuotų junginių pasiskirstymas skirtinguose ekstraktuose.....	66
<b>3.5 lentelė.</b> Identifikuotų junginių spektrinės charakteristikos.....	67
<b>3.6 lentelė.</b> Eterinio aliejaus ir lakaus ekstrakto pagrindinių lakiųjų junginių sudėtis .....	71

## PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1. paveikslas. Juodavaisė aronija ( <i>Aronia melanocarpa</i> ).....	15
2. paveikslas. Pagrindinės fenolinių junginių cheminės struktūros esančios aronijose.....	17
3. paveikslas. Aronijose esančių pagrindinių flavonolių cheminė struktūra.....	19
4. paveikslas. Medžiagos fazinė diagrama .....	28
5. paveikslas. Anglies dioksido tankio – slėgio fazių diagrama .....	29
6. paveikslas. Aronijų išspaudų ekstraktų gamybos (I dalis) ir vykdytų eksperimentų tyrimų schema (II dalis).....	37
7. paveikslas. Pagreitintos ekstrakcijos organiniais tirpikliais sistemos schema.....	37
8. paveikslas. SKE - CO <sub>2</sub> ekstraktoriaus schema.....	40
9. paveikslas. ESCh - DPPH pokolonėlinio metodo aparatūros sistema.....	40
10. paveikslas. Skirtingų ekstrakcijų išeigos (g/100 g sausų išspaudų) .....	50
11. paveikslas. Prognozuojamų ir faktinių ekstrakcijos išeigų palyginimas aronijų išspaudose.....	53
12. paveikslas. Paviršiaus atsako plotai vaizduojantys parametrų (laikas, slėgis ir temperatūra) įtaką SKE - CO <sub>2</sub> išeigai.....	54
13. paveikslas. Išgaunamo ekstrakto kiekio (g/100 g sausų išspaudų) priklausomybė nuo išgavimo būdo.....	55
14. paveikslas. Kietos frakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas skirtingose (BFJK, ABTS <sup>+</sup> , DPPH <sup>•</sup> , ORAC) modelinėse sistemose .....	59
15. paveikslas. A (ASE H <sub>2</sub> O 40 °C) ir B (SK - CO <sub>2</sub> AC 70 °C) ekstraktų ESCh-DPPH <sup>•</sup> chromatogramos .....	60
16. paveikslas. Aronijų išspaudų ekstraktų UESCh-MS/MS chromatogramos.....	62
17. paveikslas. Fenolinių junginių kiekis aronijų išspaudų ekstraktuose (mg/100 g SM) .....	65
18. paveikslas. Antocianų UESCh/MS jonų chromatograma .....	68
19. paveikslas. Pseudo - MS <sup>3</sup> spektrai .....	69

## SANTRUMPOS

PCs	Procianidiniai
SKE	Ekstrakcija superkritiniais skysčiais
SK – CO <sub>2</sub>	Superkritinis anglies dvideginis
DMSO	Dimetilsulfoksidas
AAPh	2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas
ABTS <sup>•+</sup>	2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas
DPPH <sup>•</sup>	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas
ORAC	Deguonies radikalų absorbcijos geba
BFJK	Bendras fenolinių junginių kiekis
SKE – CO <sub>2</sub>	Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu
SOK	Soksleto ekstrakcija
EVG	Ekstrakcija vandens garais
ASE	Pagreitinta ekstrakcija tirpikliais
DMD	Diodų matricos detektorius
UV	Ultravioletiniai spinduliai
DC – MS	Dujų chromatografija ir masių spektrometrija
DC – LJD	Dujų chromatografija su liepsnos jonizacijos detektoriumi
KI	Kováts sulaikymo indeksas
GRE	Galo rūgšties ekvivalentai
TE	Trolokso ekvivalentai
ESCh-DPPH	Efektyviosios skysčių chromatografijos DPPH pokolonėlinis metodas
SM	Sausa masė
UESCh	Ultra efektyvioji skysčių chromatografija
UESCh – Q – TOF	Ultra efektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi
SN	Standartinis nuokrypis
RSD %	Santykinė standartinė paklaida
DE	Dezodoruotas ekstraktas

ASE H <sub>2</sub> O 40 °C	Pagreitintos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 40 °C temperatūroje
ASE H <sub>2</sub> O 130 °C	Pagreitintos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje
ASE MeOH 40 °C	Pagreitintos ekstrakcijos metanolinis ekstraktas gautas 40 °C temperatūroje
ASE MeOH 130 °C	Pagreitintos ekstrakcijos metanolinis ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje
ASE MeOH/H <sub>2</sub> O 130 °C	Pagreitintos ekstrakcijos metanolio /vandens mišinio (80:20) ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje
ASE AC/H <sub>2</sub> O 130 °C	Pagreitintos ekstrakcijos acetono/vandens mišinio ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje
SK – CO <sub>2</sub> AC 70 °C	Po superkritinio anglies dvideginio taikyto pagreitintos ekstrakcijos būdo acetoninis ekstraktas gautas 70 °C temperatūroje
SK – CO <sub>2</sub> EtOH 70 °C	Po superkritinio anglies dvideginio taikyto pagreitintos ekstrakcijos būdo etanolinis ekstraktas gautas 70 °C temperatūroje
*SK – CO <sub>2</sub>	Superkritinio anglies dvideginio ekstraktas
SK – CO <sub>2</sub> + 2 % EtOH	Superkritinio anglies dvideginio su 2 % etanolio ekstraktas
SK – CO <sub>2</sub> + 5 % EtOH	Superkritinio anglies dvideginio su 5 % etanolio ekstraktas
SK – CO <sub>2</sub> + 10 % EtOH	Superkritinio anglies dvideginio su 10 % etanolio ekstraktas
SOK EtOH 75 °C	Soksleto ekstrakcijos etanolinis ekstraktas gautas 75 °C temperatūroje
SOK AC 75 °C	Soksleto ekstrakcijos acetoninis ekstraktas gautas 75 °C temperatūroje
SOK heksanas	Soksleto ekstrakcijos heksaninis ekstraktas gautas 75 °C temperatūroje
ASE heksanas	Pagreitintos ekstrakcijos heksaninis ekstraktas gautas 40 °C temperatūroje
GISP	Grynos išspaudos
ASE (SKE – CO <sub>2</sub> )	Po superkritinės ekstrakcijos anglies dioksidu pagreitintos ekstrakcijos būdu gautos išspaudos
*EVG	Išspaudos po ekstrakcijos vandens garais
*SOK	Išspaudos po soksleto ekstrakcijos
*SKE – CO <sub>2</sub>	Išspaudos po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu

## ĮVADAS

Per pastarąjį dešimtmetį paskelbta daug mokslinių tyrimų, kurie patvirtino teigiamą ryšį tarp uogų ir vaisių vartojimo bei mažesnės rizikos susirgti tokiomis ligomis kaip vėžys, diabetas, nutukimas, širdies ir kraujagyslių ligos. Todėl Pasaulio sveikatos organizacija skatina kasdienėje mityboje vartoti kuo daugiau vaisių ir daržovių, taip sumažinant minėtų susirgimų riziką. Mokslininkai vaisių ir uogų naudą sveikatai paaiškina įvairių bioaktyvių junginių ir ypač fenolinių junginių buvimu juose (Kraujalytė, 2014). Nustatyta, kad uogos yra turtingiausias polifenolių šaltinis, įskaitant antocianinus, flavan-3-olius, procianidinus, flavanolių, kuriems iki šiol yra skiriamas didelis dėmesys, dėl teigiamo jų poveikio sveikatai (Stewart ir kt., 2007), (Szajdek ir kt., 2008). Dauguma sveikatai naudingomis savybėmis pasižyminčių uogų gali būti vartojamos šviežios dėl puikaus skonio ir aromato (pvz., šilauogės), o kai kurių kitų uoginių augalų vaisiai nėra tinkami valgyti, dėl mažiau priimtinių arba visai nepriimtinių aromatinių ir skoninių savybių, kurias nulemia cukrų ir rūgščių santykis (Buskienė ir kt., 2008), (Kraujalytė, 2014). Juodosios aronijos gali būti siejamos su pastarųjų uogų rūšimi. Tai savito šiek tiek rūgštaus, liežuvį sutraukiančio skonio ir kartaus migdolų kvapo uogos, kuriose nustatytas didelis polifenolinių junginių kiekis. Šios uogos pasižymi pakankamai dideliu antioksidaciniu aktyvumu (Denev ir kt., 2012). Todėl šiandien aronijos yra laikomos svarbiu natūralių antioksidantų šaltiniu, taip pat pasižymi antidiabetiniu, kardioprotekcinu, antimutageniniu ir antikancerogeniniu poveikiu (Kulling ir kt., 2008).

Juodoji aronija naudojama sulčių ir uogienės pramoninėje gamyboje. Pavyzdžiui, vien tik Lenkijoje per 2009 – 2012 metus aronijų vaisiai sudarė 45 000 tonų. Sulčių gamyboje naudojama 90 % vaisių, o likusi dalis sunaudojama vaisinių arbatų, maisto papildų ir kosmetikos produktų gamyboje. Taigi šių produktų gamybos metu yra gaunami dideli kiekiai išspaudų, ypač po sulčių spaudimo, kurios gali sudaryti iki 16 % vaisių masės (Sójka ir kt. 2013). Po sulčių gamybos didelė dalis bioaktyvių junginių lieka išspaudose (Sójka ir kt. 2013), kurios sudarytos iš odos, sėklų ir stiebų. Tačiau šios antrinės žaliavos panaudojamos tik kaip gyvūnų pašaras, trąšos arba dažnai yra tiesiog išmetamos dėl džiovavimo, saugojimo ir transportavimo išlaidų (Djilas ir kt., 2009), (Sójka ir kt., 2013). Tai nulemia jose esančių vertingų sudedamųjų dalių praradimą. Todėl antrinių žaliavų perdirbimas į aukštesnės pridėtinės vertės produktus yra svarbus uždavinys ne tik dėl ekonominės naudos, bet vis labiau įsigalint bioekonomikos reikalavimams darnių technologijų plėtrai, atsirado galimybė racionaliau panaudoti antrines žaliavas. Per pastarąjį dešimtmetį žemės ūkio atliekų ir šalutinių maisto produktų tyrimai

sparčiai vystėsi, daugiausia dėmesio sutelkiant į vaisinius augalus, tokius kaip citrusiniai vaisiai (Mamma ir kt., 2014), vynuogės (Arvanitoyannis ir kt. 2006) ir obuoliai (Rabetafika ir kt., 2014), o daugelis daržovių, vaisių ir uogų rūšių, įskaitant ir aronijas, lieka neišnagrinėti. Taip pat daugėja pažangių metodų ir technologijų didelės pridėtinės vertės sudedamųjų dalių išgavimui iš antrinių žaliavų (Galanakis, 2012), bei siekiama pagerinti bioaktyvių junginių ekstrakcijos procesą, pavyzdžiui ekstrakcijos tirpikliais naudojant kuo ekologiškesnius tirpiklius, kaip pavyzdžiui, vandenį, o ne toksinius organinius tirpiklius (Mayer-Miebach ir kt., 2012).

**Darbo tikslas** – išanalizuoti skirtingų ekstrakcijos metodų įtaką funkcionaliųjų komponentų išgavimui iš juodųjų aronijų išspaudų (*A. melanocarpa*), taikant šiuolaikiškus pagreitintos ekstrakcijos aukštame slėgyje, superkritinės ekstrakcijos ir tradicinės ekstrakcijos metodus. Nustatyti gautų frakcijų/ekstraktų antioksidacines savybes, fenolinių junginių bei aromato junginių sudėtį.

**Darbo tikslui įgyvendinti buvo spendžiami šie uždaviniai:**

1. Išskirti juodųjų aronijų (*A. melanocarpa*) išspaudų ekstraktus/frakcijas, taikant pagreitintos ekstrakcijos aukštame slėgyje, bei tradicinius ekstrakcijos metodus (daugiapakopė ekstrakcija Sokslete, ekstrakcija vandens garais).
2. Taikant Box - Behnken eksperimentinį planavimą sudaryti superkritinės ekstrakcijos su CO<sub>2</sub> (SKE – CO<sub>2</sub>) optimizavimo planą. Nustatyti optimalius slėgio, temperatūros ir laiko parametrus, su kuriais ekstrakcijos išeiga būtų didžiausia. Su liekana, likusia po superkritinės ekstrakcijos, optimaliomis sąlygomis atlikti pagreitintą ekstrakciją. Taip pat papildomai įvertinti 2 %, 5 % ir 10 % etanolio priedo įtaką, optimaliai ekstrakcijos išeigai.
3. Įvertinti juodųjų aronijų (*A. melanocarpa*) išspaudų bei gautų ekstraktų antioksidacinį potencialą, taikant įvairius antioksidacinio aktyvumo *in vitro* metodus.
4. Nustatyti fenolinių junginių sudėtį taikant šiuolaikiškus aukšto slėgio chromatografijos metodus: efektyviosios skysčių chromatografijos masių spektrometrijos (ESCh-MS) bei naują greitą kiekybinę ir kokybinę analizės metodą – ultraefektyviosios skysčių chromatografijos tandeminės masių spektrometrijos (UESCh-MS/MS).
5. Nustatyti juodųjų aronijų išspaudų eterinio aliejaus ir lakaus ekstrakto aromato lakiuosius junginius.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Juodųjų aronijų (*Aronia melanocarpa*) paplitimas ir jų panaudojimas pramonėje

Juodosios aronijos (1 pav.) priklauso erškėtinių (*Rosaceae* Juss.) šeimai, obelinių (*Maloideae*) pošeimiui. Aronijų gentis apima dvi rūšis: *Aronia melanocarpa* (Mich.) Elliot, kuri žinoma kaip juodoji arba juodavaisė aronija ir *Aronia arbutifolia* (L.) Pers., gerai žinoma kaip raudonoji aronija (Kulling ir kt., 2008). Juodavaisė aronija kilusi iš rytinės Šiaurės Amerikos, 1900 metais ji buvo atgabenta į Europą. Šiandien aronijos yra plačiai paplitusios daugiausiai rytiniuose, pietiniuose ir centriniuose



1 pav. Juodavaisė aronija (*Aronia melanocarpa*)

Europos regionuose, kur auginamos pramoniniais tikslais (Denev ir kt., 2012). Jos turi galias tradicijas Europos ir Šiaurės Amerikos liaudies medicinoje (Hardin, 1973). Juodavaisė aronija yra 90 – 180 cm aukščio krūmas, raudonai juodais vaisiais, kurių skersmuo apie 6 mm. Aronijų kekės sudarytos iš 8 – 14 vaisių. Uogos sultingos, saldžiarūgštės ir šiek tiek sutraukiančio skonio. Vaisiuje randamos 3 – 5 sėklos. Lapai 3 – 7 cm ilgio, vasarą tamsiai žali, blizgantys, o rudenį – ryškiai raudoni (Kokotkiewicz ir kt. 2010). Aronijų krūmai pradeda žydėti gegužės mėnesį, o vaisiai subręsta rugpjūčio - rugsėjo mėnesiais (Kulling ir kt., 2008). Juodosios aronijos auga drėgnuose miškuose ir pelkėse (Lee ir kt. 2014). Neseniai atlikti tyrimai rodo, kad tręšimas gali turėti įtakos aronijų vaisių cheminei sudėčiai, greitam vaisių sunokimui, ypač turi įtakos cukraus bei fenolinių junginių kiekiui (Skupień ir kt., 2007).

Aronijų uogos bei išspaudų ekstraktai gali būti naudojami kaip natūralūs maisto dažikliai (Lehmann, 1990). Iš aronijų įvairiose Europos šalyse gaminamas vaisių sirupas, sultys, vaisių pasta,

drebučiai ir arbata. Arbatos paprastai gaminamos kaip mišiniai iš įvairių aromatingų ingredientų, tokių pavyzdžiui kaip juodieji serbentai, avietės, ir kt. Kadangi aronijos pasižymi nemaloniais rūgščiu, šiek tiek liežuvį traukiančiu skoniu, bei turi žalių migdolų vaisiaus kvapą, todėl kurį laiką jos buvo naudojamos nedideliais kiekiais tik pramoninėje sulčių ir vaisių nektaro gamyboje. Tačiau gamybininkai pastebėjo, kad sumaišius aronijų sultis su obuolių, kriaušių ar juodųjų serbentų uogų sultimis, buvo gautos geresnės skoninės savybės, tokiu būdu sulaukiant palankesnio vartotojų vertinimo. Aronijų uogos naudojamos likerio, spirito, taip pat vaisių vyno gamyboje, kur įeina kaip pagrindinis sudedamasis komponentas. Nustatyta, kad didelė spirito pasižyminčio geru skoniu ir kvapu išeiga gaunama aronijų fermentacijos metu (Kulling ir kt., 2008).

Pagrindinė nauda vaisių ir daržovių degeneracinių ligų profilaktikai atkreipė vartotojų ir mokslininkų dėmesį į uogų įvairovę ir jų sudėtines dalis (Kulling ir kt., 2008). Lenkų mokslininkai bendradarbiaudami su gamybininkais, panaudojo aronijų išspaudų maistines skaidulas, kurios teigiamai veikia virškinamąjį traktą duonos kepinių gamyboje, įtraukdami į receptūrą maistines skaidulas kaip fiziologiškai aktyvų ingredientą (Sójka ir kt., 2013).

## **1.2. Aronijų biocheminė sudėtis**

Aronijų išspaudos gali būti geras skaidulinių medžiagų šaltinis, kurių sudėtyje yra dideli kiekiai celiuliozės (35 %), hemiceliuliozės (34 %) ir pektinų (7 %) (Sójka ir kt., 2013). Šių uogų sultyse nustatytos pakankamai didelės koncentracijos kalio ir cinko. Sunkiųjų metalų kiekis (Pb, Cd) aronijų vaisiuose gali kisti priklausomai nuo derliaus nuėmimo vietos ir vegetacijos laikotarpio. Šviežiai spaustose sultyse buvo rasta vitaminų B1 (25 – 90 µg/100 ml), B2 (25 – 110 µg/100 ml), B6 (30 – 85 µg/100 ml), C (5 – 100 mg/100 ml), pantoteno rūgšties (50 – 380 µg/100 ml) ir niacino (100 – 550 µg/100 ml). Taip pat dideli kiekiai nustatyti  $\beta$ -karoteno ir  $\beta$ -kriptoksantino (Ara, 2002). Nustatyta, kad aronijų uogų sudėtis priklauso nuo įvairių aplinkos ir genetinių veiksnių, tokių kaip veislė, derliaus nuėmimo laikas, klimatas, subrendimas ir augimo vieta (Denev ir kt. 2012).

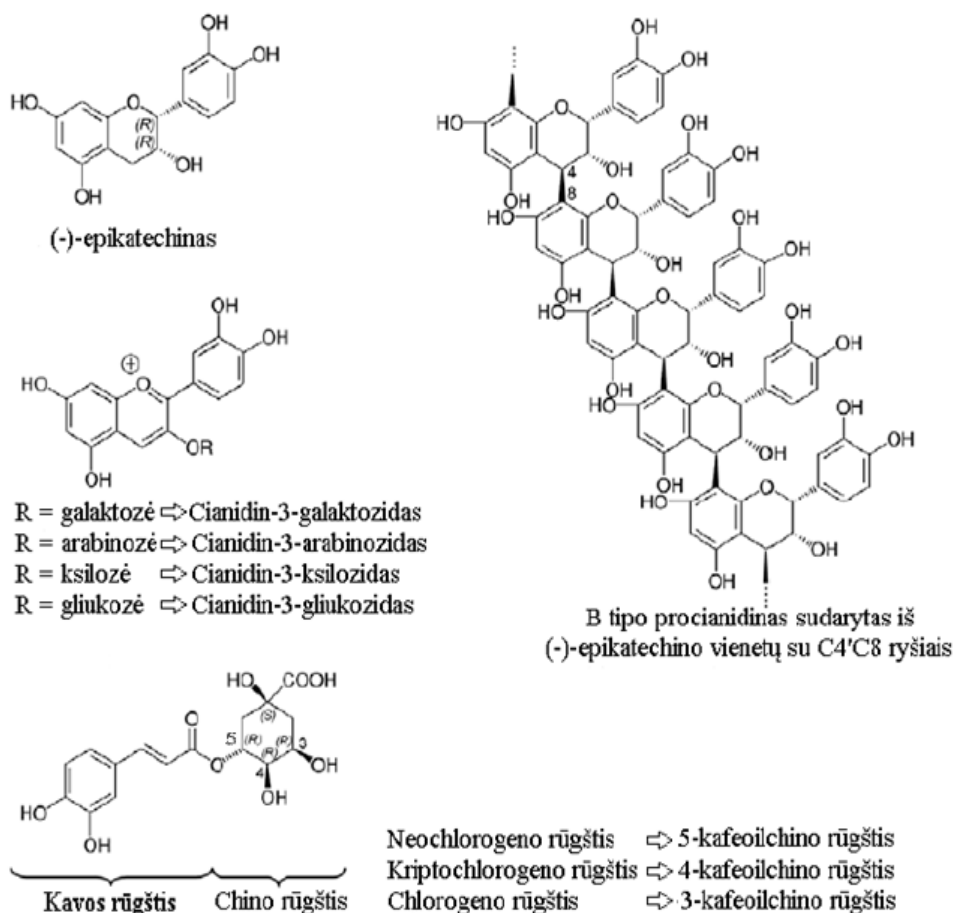
### **1.2.1. Aronijose esantys cukrai ir fenoliniai junginiai**

Fenoliniai junginiai - svarbiausi aronijų uogų, sulčių ir išspaudų komponentai įtakojantys daugelį gydomųjų savybių. Pagrindiniai aronijose esantys fenoliniai junginiai apžvelgiami 1.1 lentelėje. Šių junginių analizei atlikti naudojami įvairūs metodai, pradedant paprastais spektroskopiniais tyrimais ir baigiant sudėtingais ESCh/DMD ir ESCh/ESI-MS metodais, todėl gaunami skirtingi rezultatai, kuriuos kartais sunku palyginti (Krenn ir kt. 2007). Todėl siekiant tiksliau nustatyti fenolinių junginių



koncentracija, kai kurie autoriai rekomenduoja ne tik tinkamą tirpiklių ir ekstrakcijos sąlygų parinkimą, bet ir nefenolinių junginių, kurie apsunkina analizę pašalinimą (Kähkönen ir kt., 2001), (Kraemer-Schafhalter ir kt. 1998).

Oszmiański ir kt. (2005) teigia, kad procianidiniai (PCs) buvo identifikuoti, kaip pagrindiniai polifenolių klasės junginiai randami aronijose. PCs yra bendri oligomeriniai ir polimeriniai (epi) katechinai (2 pav.) sudaryti iš kelių monomero vienetų: kai molekulę sudaro 2 – 10 monomero vienetų vadinami (epi) katechino oligomerais, o kai molekulę sudaro daugiau nei 10 monomerų - (epi) katechino polimerais. Procianidiniai skiriasi monomerinių ryšių padėtimis ir konfiguracija. C4'C8 ir/arba C4'C6 ryšių tipai yra vyraujantys (vadinami B tipo ryšiu). Aronijų sudėtyje yra tik vienaarūšiai B tipo procianidiniai su (-)-epikatechinu, kaip pagrindiniu subvieneto monomeru (Oszmiański ir kt., 2005). Ši katechino vienetų dalis sudaro apie 1,5 % (Esatbeyoglu ir kt., 2008).



2 pav. Pagrindinės fenolinių junginių cheminės struktūros esančios aronijose (Kulling ir kt., 2008)

Nustatyta, kad procianidinių monomerai sudaro – 0,87 %, dimerai – 1,88 %, trimerai – 1,55 %, 4 – 6-merai – 6,07 %, 7 – 10-merai – 7,96 % ir daugiau nei 10-merų – 81,72 %. Remiantis skirtingų

autorių duomenimis, bendras PCs kiekis aronijų uogose buvo 5182 mg/100 g SM (polimerizacijos laipsnis (PL) lygus 23), 3992 mg/100 g SM (PL lygus 14), taip pat 664 mg/100 g ŽM. Polimerinių procianidinių kiekis išspaudose buvo 8192 mg/100 g SM (PL lygus 34), 5611 mg/100 g SM, o sultyse – 1579 mg/100 g SM (PL lygus 23), 3652 mg/100 g SM (Kulling ir kt., 2008).

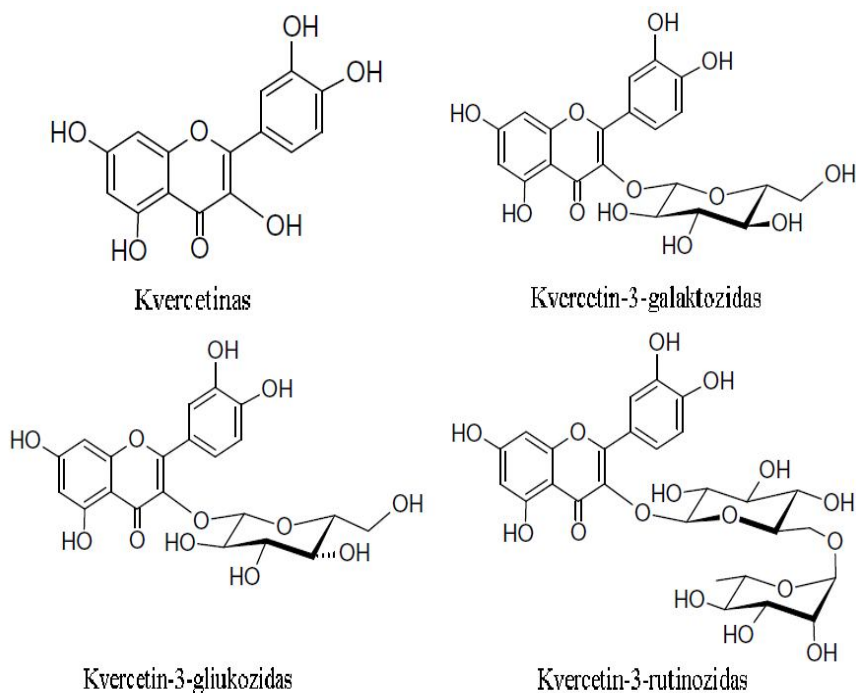
Juodavaisės aronijos auginamos dėl jų sudėtyje esančių didelių kiekių antocianinų (2 pav.). Ši flavonoidų klasė suteikia uogoms tamsiai raudoną, mėlyną ir violetinę spalvas. *Aronia melanocarpa* uogos yra vienos iš turtingiausių antocianinų šaltinių, kurių sudėtyje daugiausia cianidino glikozidų. Vaisiuose antocianinai sudaro apie 25 % visų polifenolių. Nustatyta, kad jų koncentracija išspaudose – 1837 mg/100 g SM, o sultyse – 1173 mg/100 g SM. Pavyzdžiui, Strigl ir kt. (1995) bei Jeppsson (2000) analizavo „Nero“, „Rubina“ ir „Viking“ veisles, kuriose dominavo vien tik cianidino glikozidai: cianidin-3-O-galaktozidas (68,9 %), cianidin-3-O-arabinozidas (27,5 %), cianidin-3-O-ksilozidas (2,3 %) ir cianidin-3-O-gliukozidas (1,3 %). Antocianinų eiliškumas uogose, sultyse ir išspaudose išlieka vienodas (Oszmiański ir kt., 2005). Taip pat aptikti pėdsakai pelargonidin-3-O-galaktozido ir pelargonidin-3-O-arabinozido (Wu ir kt., 2004).

Įvairiose šalyse ieškoma ingredientų, kurie produkciją praturtintų natūraliais antioksidantais (Anisimovienė ir kt., 2009). Viena iš perspektyvių natūralių antioksidantų grupių yra antocianinai. Šie junginiai gali būti naudojami, kaip stabilizatoriai ir kaip sudedamoji dalis dietinių maisto produktų bei maisto papildų gamyboje. Taip pat gali būti panaudoti vietoje kancerogeniniu poveikiu pasižyminčių sintetinių dažų (Betsui ir kt., 2004), (Blando ir kt., 2004). Šiuo metu mokslinių tyrimų tikslas yra išsaugoti jų spalvos savybes. Vaisių produktų parudavimas yra nepageidaujamas procesas, kai gaminamas produktas įgauna netinkamą atspalvį. Šį procesą sukelia natūralių maisto dažiklių fermentinis skilimas (Jeppsson, 2000). Esant tam tikram pH, spalvos stabilumas daugiausia priklauso nuo antocianinų struktūros ir bespalvių fenolinių junginių. Dažikliai, kurių sudėtyje yra acilinti antocianinai (morkos, raudoni ridikėliai, raudoni kopūstai) pasižymi dideliu stabilumu dėl krūvių persiskirstymo. Tuo tarpu dažikliai, be acilintų antocianinų (vynuogių išspaudos, šėivamedžio uogos, juodieji serbentai ir aronijos) vaidina svarbų vaidmenį spalvos išsaugojime. Todėl dažikliais turtingi flavonoliai su aukštu kopigmento/pigmento santykiu pasižymi dideliu stabilumu (Malien-Aubert ir kt., 2001). Kai kurie fenoliniai junginiai pasižymi sinergistiniu poveikiu, aronijų sulčių spalvos intensyvumo išsaugojime. Pavyzdžiui, tyrimais nustatyta, kad didesnė nei antocianinų, chlorogeno rūgšties koncentracija, padidino aronijų sulčių spalvos intensyvumą (Wilska-Jeszka ir kt., 1996). Tuo tarpu gaminant funkcinis gėrimus buvo nustatyta, kad katechinai pasižymėjo neigiamu poveikiu raudonos spalvos dažiklio intensyvumui, taip įtakojant gelsvos spalvos atsiradimą. Šis poveikis yra

didesnis, kai pH yra didelis. Cukraus kiekis turi labai nedidelę įtaką spalvos intensyvumui (Malien-Aubert ir kt., 2001).

Tyrimais nustatyta, kad geriausias fenolinių rūgščių šaltinis tiriant įvairių rūšių uogas buvo aronijos (96 mg/100 g ŽM) (Mattila ir kt., 2006). Tai vėliau patvirtino ir kiti tyrimai, kuriuose chlorogeno ir neochlorogeno rūgštys (2 pav.) buvo nustatytos kaip pagrindinės rūgštys, kurių kiekis buvo išreikštas mg/100 g SM, perskaičiuojant jį pagal bendrą fenolinių junginių kiekį aronijose. Apskaičiuota, kad uogose šių rūgščių koncentracija buvo 302 mg/100 g ir 291 mg/100 g SM, išspaudose 204 mg/100 g ir 169 mg/100 g, o sultyse 416 mg/100 g ir 393 mg/100 g (Oszmiański ir kt., 2005).

Flavonolių (3 pav.) ir (-)-epikatechino (2 pav.) kiekis aronijose, lyginant su prieš tai aptartomis fenolių sudedamosiomis dalimis yra pakankamai mažas. Flavonoliai sudaro tik 1,3 % visų aronijose esančių fenolių (Oszmiański ir kt., 2005).



**3 pav.** Aronijose esančių pagrindinių flavonolių cheminė struktūra (Taheri, 2013)

Pastaruoju metu, nustatyti penki kvercetino dariniai: kvercetin-3-O-(6'-O- $\beta$ -arabinozil- $\beta$ -gliukozidas), kvercetin-3-O-(6'- $\alpha$ -ramnozil- $\beta$ -galaktozidas), kvercetin-3-O-(6'- $\alpha$ -ramnozil- $\beta$ -gliukozidas), kvercetin-3-O- $\beta$ -galaktozidas ir kvercetin-3-O- $\beta$ -gliukozidas. Vidutiniškai šių junginių kiekiai buvo apie 71 mg/100 g ŽM. Tik trys kvercetino dariniai, kvercetin-3-O-6'- $\alpha$ -ramnozil- $\beta$ -gliukozidas, kvercetin-3-O- $\beta$ -galaktozidas ir kvercetin-3-O- $\beta$ -gliukozidas buvo nustatyti vaisiuose (13 – 27 mg/100 g SM), išspaudose, (36 – 50 mg/100 g SM) ir sultyse (21 – 31 mg/100 g SM).

**1.1 lentelė.** Polifenoliai esantys aronijų uogose, sultyse ir išspaudose (Denev ir kt., 2012), (Oszmianski ir kt., 2005), (Mayer-Miebach ir kt., 2012), (Sójka ir kt., 2013)

Bandinys	Uogos (mg/100 g)	Literatūros šaltinis	Sultys (mg/l)	Literatūros šaltinis	Išspaudos (mg/100 g)	Literatūros šaltinis
1	2	3	4	5	6	7
Bendras polifenolių kiekis	719	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	7093	Valcheva - Kuzmanova <i>ir kt.</i> , 2007	10583,27 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
	778 – 1285	Rop <i>ir kt.</i> , 2010	8100	Hellstrom <i>ir kt.</i> , 2010	3100 – 6300	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012
	1064	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	9154	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	8044 – 15058 (SM)	Sójka <i>ir kt.</i> , 2013
	2556	Zheng <i>ir kt.</i> , 2003	4700 – 9000	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012		
	6902	Benvenuti <i>ir kt.</i> , 2004				
	3440 (SM)	Kolesnikov ir Gins, 2001				
	3760 (SM)	Hudec <i>ir kt.</i> , 2006				
	4210 (SM)	Kahkonen <i>ir kt.</i> , 1999				
	7849 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005				
	1500 – 1790	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012				
Bendras proantocianidinų kiekis	664	Wu <i>ir kt.</i> , 2004	2800	Hellstrom <i>ir kt.</i> , 2010	8191,58 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
	1740 – 2170	Hellstrom <i>ir kt.</i> , 2009	2934	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2007	2400 – 12900	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012
	5182 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005	4600 – 15000	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012		
	800 – 17800	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012				
Bendras antocianinų kiekis	357	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	1068	Valcheva – Kuzmanova <i>ir kt.</i> , 2007	1190 – 1950	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012
	428	Zheng ir Wang, 2003	1250 – 2500	Fuchs <i>ir kt.</i> , 1996	616,2 – 1239,0 (SM)	Sójka <i>ir kt.</i> , 2013
	434	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	3042	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007		
	461	Benvenuti <i>ir kt.</i> , 2004	58000 – 473000	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012		
	470 – 1790	Fuchs <i>ir kt.</i> , 1996				
	1480	Wu <i>ir kt.</i> , 2006				
	620 – 670	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012				
<b>Antocianinai</b> Cianidin-3-arabinozidas	99	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	51	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010	532,64 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
	94 – 155	Rop <i>ir kt.</i> , 2010	647	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	370 – 570	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012
	142	Zheng ir Wang, 2003	1000	Hellstrom <i>ir kt.</i> , 2010	191,7 – 389,9 (SM)	Sójka <i>ir kt.</i> , 2013
	146	Slimestead <i>ir kt.</i> , 2005	14000 – 108000	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012		
	399	Wu <i>ir kt.</i> , 2004				
	582 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005				
	190 – 210	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012				

1.1 lentelės tęsinys kitame puslapyje

### 1.1 lentelės tęsinys

1	2	3	4	5	6	7
Cianidin-3-galaktozidas	101 - 120	Rop <i>ir kt.</i> , 2010	125	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010	1119,70 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
	126	Zheng ir Wang, 2003	1817	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	760 – 1250	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012
	279	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	2100		376,5 – 749,4 (SM)	Sójka <i>ir kt.</i> , 2013
	315	Slimestead <i>ir kt.</i> , 2005	43000 – 341000	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012		
	990 1282 (SM)	Wu <i>ir kt.</i> , 2004 Oszmianski ir Wojdylo, 2005 Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012				
Cianidin-3-gliukozidas	410 – 440					
	1,7	Zheng ir Wang, 2003	7,1	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010	79,44 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
	10	Slimestead <i>ir kt.</i> , 2005 Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	74	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	24 – 44 21,0 – 43,7 (SM)	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012 Sójka <i>ir kt.</i> , 2013
	12	Wu <i>ir kt.</i> , 2004	500 – 9900	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012		
	38 42 (SM) 8 – 9	Oszmianski ir Wojdylo, 2005 Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012				
Cianidin-3-ksilozidas	10	Slimestead <i>ir kt.</i> , 2005	5,9	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010	105,06 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
	15	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007	1000 – 13000	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012	30 – 60	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012
	47	Zheng ir Wang, 2003			27,0 – 57,1 (SM)	Sójka <i>ir kt.</i> , 2013
	52 53 (SM)	Wu <i>ir kt.</i> , 2004 Oszmianski ir Wojdylo, 2005 Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012				
	13 – 14 2,3	Wu <i>ir kt.</i> , 2004				
Pelargonidin-3-arabinozidas						
<b>Flavonoliai</b>						
Kvercetinodariniai	> 17	Slimestead <i>ir kt.</i> , 2005			82,40 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
Kvercetinas	7,1	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007 Häkkinen <i>ir kt.</i> , 1999	118	Valcheva - Kuzmanova <i>ir kt.</i> , 2007		
	8,9	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007				
	9,2					
Kvercetin-3-galaktozidas	30,2	Zheng ir Wang, 2003	28,3	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010	47,44 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
	37 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005			28,1 – 62,5 (SM)	Sójka <i>ir kt.</i> , 2013

1.1 lentelės tęsinys kitame puslapyje

1.1 lentelės tęsinys

1	2	3	4	5	6	7
Kvercetin-3-gliukozidas	27,3 21 (SM)	Zheng ir Wang, 2003 Oszmianski ir Wojdylo, 2005	22,5	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010	26,50 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
Kvercetin-3-rutinozidas	15 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005	16,8	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010	13,55 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
Kvercetin-3-vicianozidas			11,5	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010		
Kvercetin-3-robinobiozidas			11,7	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010		
Kaemferolis	0,53 0,69	Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007 Jakobek <i>ir kt.</i> , 2007				
<b>Flavan-3-oliai</b>						
Epikatechinas	47 – 84 15,4 (SM)	Rop <i>ir kt.</i> , 2010 Oszmianski ir Wojdylo, 2005	14,8	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010	11,41 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005
<b>Hidroksicinamo rūgštys</b>						
Chlorogeno rūgštis	61 113 – 196 302 (SM)	Slimestead <i>ir kt.</i> , 2005 Rop <i>ir kt.</i> , 2010 Oszmianski ir Wojdylo, 2005	455 800 200 – 300	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010 Hellstrom <i>ir kt.</i> , 2010 Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012	204,35 (SM) 42 – 50 33,2 – 84,5 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005 Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012 Sójka <i>ir kt.</i> , 2013
Neochlorogeno rūgštis	69 – 74 84 – 117 123 291 (SM) 71 – 72	Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012 Rop <i>ir kt.</i> , 2010 Slimestead <i>ir kt.</i> , 2005 Oszmianski ir Wojdylo, 2005 Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012	492 1200 210 – 290	Skoczynska <i>ir kt.</i> , 2010 Hellstrom <i>ir kt.</i> , 2010 Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012	169,20 (SM) 31 – 32 25,5 – 68,1 (SM)	Oszmianski ir Wojdylo, 2005 Mayer – Miebach <i>ir kt.</i> , 2012 Sójka <i>ir kt.</i> , 2013

Neidentifikuoti kvercetino dariniai sudarė apie 27 – 82 mg/100 g SM (Kulling *ir kt.*, 2008).

Redukuojančių cukrų kiekis šviežiose aronijų uogose sudaro apie 16 – 18 % (Strigl *ir kt.*, 1995). Kai kurie autoriai teigia, kad bendras gliukozės ir fruktozės kiekis sudaro 13 – 17,6 g/100 g ŽM, o sacharozės neaptikta (Kulling *ir kt.*, 2008). Šviežiai spaustose sultyse gliukozės koncentracija svyravo nuo 30 iki 60 g/l, (vidutiniškai – 41 g/l), o fruktozės – nuo 28 iki 58 g/l, (vidutiniškai – 38 g/l) (Ara, 2002). Šviežiai spaustose sultyse vidutinis sorbitolio kiekis buvo 80 g/l, o pasterizuotose sultyse – 56 g/l. Sorbitolis yra cukraus pakaitalas dažnai naudojamas dietiniuose maisto produktuose. Remiantis tyrimais nustatyta, kad lyginant kitų rūšių uogas ir vaisius su aronijų uogomis, jos turėjo didžiausią

sorbitolio koncentraciją, todėl gali būti naudojamos kaip biožymuo, pavyzdžiui maišant aronijų ir juodųjų serbentų sultis (Kulling ir kt., 2008).

### 1.3. Aronijose esančių veikliųjų medžiagų farmakologinis poveikis

Epidemiologiniai tyrimai rodo, kad aronijos pasižymi antioksidaciniu, antimutageniniu, antidiabetiniu bei priešvėžiniu poveikiu. Aronijų sultys turi didžiausią antioksidacinį aktyvumą tarp polifenoliais turtingų gėrimų. Pavyzdžiui, jų trolokso ekvivalento antioksidacinės gebos vertės yra keturis kartus didesnės nei mėlynių, spanguolių sulčių ar raudono vyno. Remiantis fenolinių junginių ORAC (deguonies radikalų absorbcijos gebos) vertėmis, kurias pateikė Zheng Wang apskaičiuota, jog tiriant šviežiai spaustų aronijų sultis, jose esantys antocianinai prie bendro antioksidacinio aktyvumo prisideda – 33 %, tuo tarpu komercinėse aronijų sultyse – beveik 42 % (Kulling ir kt., 2008). Informacijos apie tikslų oligomerinių/polimerinių procianidinių indėlių nėra, tačiau manoma, kad jie taip pat įtakoja antioksidacinį aktyvumą, nes šie junginiai vyraujantys fenoliai, ypač uogose (Oszmiański ir kt., 2005). Procianidiniai kaip ir antocianidiniai yra metalo chelatoriai ir gali sudaryti kompleksinius junginius su geležimi (III) ir variu (II). Laisvos geležies ir vario buvimas biologinėse sistemose katalizuoja laisvųjų radikalų reakcijas pavyzdžiui, Fentono reakciją. Fenolinių junginių gebėjimas surišti divalenčius pereinamuosius metalus veiksmingai sumažina šių kationų koncentraciją ir tokiu būdu jų prooksidacinį aktyvumą. Tačiau svarbu nepamiršti, kad *in vitro* duomenys apie antioksidacinį aktyvumą, neparodo jų gebėjimo *in vivo* sistemoje išvengti oksidacinio streso (Kulling ir kt., 2008). Literatūroje rasta keletas tyrimų, kurie atlikti įvertinant antioksidacinį poveikį gyvūnams, kur aronijų antocianinai sumažino lipidų peroksidaciją ir padidino fermentinį aktyvumą, taip sustiprindami imuninę gynybos sistemą. Remiantis moksliniais tyrimais, raudono pigmento frakcija juodosiose aronijose pasižymėjo stipriomis antioksidacinėmis savybėmis tiek *in vitro*, tiek *in vivo* sistemose ir atliko svarbų vaidmenį užkertant kelią skrandžio gleivinės pažeidimams. Mokslininkai mano, kad vienas iš mechanizmų pagal kurį ekstraktas slopino skrandžio gleivinės pažeidimų vystymąsi yra cianidino darinių geba surišti aktyvų deguonį. Taip pat buvo nustatyta antioksidacinio poveikio įtaka žmonėms, maisto racioną papildant aronijų sultimis, kurios stabdė raudonųjų kraujo kūnelių oksidacinius pažeidimus (Kulling ir kt., 2008).

Daugelis tyrimų rodo, antiproliferacinį arba apsauginį aronijų uogų ir/arba aronijų ekstraktų poveikį gaubtinės žarnos vėžio *in vitro* tyrimuose. Antocianiniais turtingi ekstraktai gauti iš *Aronia melanocarpa* gali skatinti žmogaus HT – 29 gaubtinės žarnos vėžio ląstelių apoptozę, tačiau šie ekstraktai pasižymi nedideliu poveikiu netransformuotų NCM 460 storosios žarnos ląstelių augime.

Įdomu tai, kad aronijų ekstraktas turėjo didesnę antikancerogeninę poveikį, nei vynuogių ir mėlynių antocianiniais praturtinti ekstraktai. Vėžinių ląstelių slopinimo palyginimas buvo atliekamas lyginant skirtingų uogų panašias monomerinių antocianinų koncentracijas, tačiau pagal gautus rezultatus matyti, kad aronijų uogų ekstraktas pasižymėjo stipriausiu poveikiu (Kulling ir kt., 2008). Kitas tyrimas parodė, kad aronijų sultys slopina gaubtinės žarnos adenokarcinomos Caco-2 ląstelių proliferaciją, sukeldamos G2/M (G2, tai laikotarpis nuo S fazės pabaigos, kai padvigubėja ląstelės genetinės informacijos rinkinys iki mitozės pradžios (M fazė), kai vyksta ląstelės dalijimasis) ląstelių ciklo stabdymą (Bermudez-Soto ir kt., 2007). Antikancerogeninis potencialas toliau buvo pagrindžiamas tyrimų su gyvūnais metu. Bandymai buvo atliekami su vyriškos lyties žiurkėmis, kurioms dirbtinai buvo suleistas stiprus kancerogenas – azoksimetanas ir taip sukeltas gaubtinės žarnos vėžys. Aronijų ekstraktai, kuriuose buvo didelis kiekis antocianinų, slopino azoksimetano sukeltus netipinių kriptų židinius ir piktybinę transformaciją, taip pat sumažino ląstelių proliferacijos normą bei tulžies rūgšties koncentraciją (Lala ir kt., 2006). Naujausi duomenys rodo, kad cianidin-3-gliukozidas pasižymi chemoprolifaktiniu poveikiu (Kulling ir Rawel, 2008).

Kai kurie autoriai teigia, jog fenoliniai junginiai išskirti iš *Aronia melanocarpa* uogų pasižymi antimutageniniu poveikiu (Gasiorowski ir kt., 1997), (Atanasova-Goranova ir kt., 1997). Aronijų antocianinai slopino mutageninį aktyvumą benzo(a)pireno ir 2-aminofluoreno Ames teste, taip pat seserinių chromatidžių mainus tiriant žmogaus T limfocitus (Gasiorowski ir kt., 1997). Be to, nustatyta, kad aronijų sulčių vartojimas slopino endogeninę N-nitrozaminų generaciją žiurkėse. Histopatologiniai pokyčiai pastebėti žiurkių kepenyse šertų nitrozaminų pirmtakais buvo sustabdyti kartu naudojant aronijų sultis (Atanasova-Goranova ir kt., 1997).

Tyrimai su gyvūnais rodo, kad aronijų antocianinai sumažino kadmio toksiškumą ir kaupimąsi žiurkių kepenyse bei inkstuose (Kowalczyk ir kt., 2003). Tai įrodo, antocianinų galimybes sujungti metalo jonus ir tokiu būdu sumažinti kadmio daromą žalą. Aronijų sulčių poveikis buvo įvertintas kepenų ligų profilaktikoje, kai žiurkės buvo veikiamos anglies tetrachloridu (Valcheva-Kuzmanova ir kt., 2004). Reakcija  $CCl_3$  radikalo su deguonimi įtakoja lipidų peroksidaciją, kuri gali baigtis ląstelės nekroze. Žiurkių kepenyse ir plazmoje išmatavus malondialdehido kiekį nustatyta, kad aronijų sultys užkirto kelią  $CCl_4$  sukeltam lipidų peroksidacijos didėjimui. Taigi, galima daryti išvadą, kad antocianinai ir/arba kitos fenolių sudedamosios dalys laisvųjų radikalų surišime turi pastebimą poveikį (Kulling ir kt., 2008).

Širdies ir kraujagyslių ligų prevencijai aronijos taip pat gali turėti teigiamos įtakos. *In vitro* eksperimentai rodo, kad fenolių sudedamosios dalys prisideda prie apsaugos ir atkūrimo endotelinių



ląstelių. Taip pat buvo pastebėtas antitrombocitinis poveikis bei vazoaktyvios ir vazoprotekcinės savybės kiaulių vainikinėse arterijose. Eksperimentiniame žiurkių hiperlipidemijos modelyje aronijų vaisių sultys sumažino aukštą bendrą plazmos cholesterolio kiekį, mažo tankio lipoproteinų cholesterolį ir lipidų koncentraciją. Vyrams su lengva hipercholesterolemija, nuolatinis aronijų sulčių gėrimas 6 savaites (250 ml per dieną) lėmė ženklų bendrojo cholesterolio, mažo tankio lipoproteinų cholesterolio ir trigliceridų lygio sumažėjimą. Panašus hipotenzinis poveikis, flavonoidais turtingų ekstraktų gautų iš aronijų vaisių buvo pastebėtas pacientams po miokardo infarkto ir sergantiems II tipo cukriniu diabetu (Kulling ir kt., 2008).

Tyrimai rodo, kad *Aronia melanocarpa* antocianinai gali būti naudojami II tipo cukrinio diabeto prevencijai ir kontrolei, bei su šia liga susijusioms komplikacijoms gydyti (Valcheva-Kuzmanova ir kt., 2007), (Simeonov ir kt., 2002). Atlikus bandymus su gyvūnais nustatyta, jog aronijų vaisių sultys cukriniu diabetu sergančioms žiurkėms susilpnino hiperglikemiją ir hipertrigliceridemiją (Valcheva-Kuzmanova ir kt., 2007). Žmonių intervencijos tyrimai patvirtina, kad kasdien suvartojus 200 ml aronijų sulčių per 3 mėnesių laikotarpį buvo veiksmingai sumažintas gliukozės kiekis kraujyje (Simeonov ir kt., 2002). Šie rezultatai rodo, kad kiti procianidiniais turtingi maisto produktai gali būti vartojami nuo diabeto (Kulling ir kt., 2008). Atliekant bandymus su žmonėmis nustatyta, kad aronijų sultys gali būti naudingos nutukimo sutrikimų gydymui (Zielinska-Przyjemska ir kt., 2007). Literatūroje nėra duomenų apie *Aronia melanocarpa* uogų, sulčių bei ekstraktų nepageidaujamą ar toksinį poveikį (Valcheva-Kuzmanova ir kt., 2006).

#### **1.4. Veikliųjų medžiagų išskyrimo būdai**

Ekstrakcija yra svarbus pradinis žingsnis gaunant koncentruotus ekstraktus, kuriuos galima panaudoti tolimesniuose tyrimų etapuose (Fontana ir kt., 2013). Biologiškai aktyvių junginių iš augalinės žaliavos kokybiniai ir kiekybiniai tyrimai labai priklauso nuo tinkamo ekstrakcijos metodo parinkimo (Smith, 2003), (Sasidharan ir kt., 2011). Tradiciniai ekstrakcijos metodai, tokie kaip Soksleto ekstrakcija bei ekstrakcija vandens garais buvo naudojami daugelį dešimtmečių, tačiau jie reikalauja daug laiko ir sąlyginai didelio tirpiklio kiekio. Taip pat dėl bendrų junginių išgavimo žingsnių, naudojant Soksleto ekstrakcijos metodą, įskaitant šildymą, virimą ar virimą su grįžtamu šaldytuvu prarandama dalis polifenolių dėl jonizacijos, hidrolizės ir oksidacijos procesų ekstrakcijos metu. Tačiau šie metodai vis dar laikomi pagrindiniais, lyginant naujai sukurtų metodologijų pasiekimus (Azmir ir kt., 2013). Todėl aktyvių komponentų ekstrakcijai iš augalinės žaliavos siekiant sutrumpinti ekstrahavimo laiką, sumažinti tirpiklio sąnaudas, padidinti ekstrakto išėigą bei pagerinti jo

kokybę buvo pritaikyti nauji šiuolaikiniai ekstrakcijos metodai, tokie kaip pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE) ir superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE – CO<sub>2</sub>). Taip pat junginių išgavimui iš kietos matricos naudojamas elektrinis impulsinis laukas, ekstrakcija mikrobangomis ir ultragarso ekstrakcija (Georgiev ir kt., 2014).

#### **1.4.1. Soksleto ekstrakcija**

1879 m. Soksletas sukūrė naują ekstrakcijos sistemą (Soksleto aparatą), kuri plačiai naudojama junginių išgavimui (Luque de Castro ir kt., 2010). Naudojant Soksleto ekstrakcijos metodą tikslinių junginių išgavimas priklauso nuo tirpiklio parinkimo. Skirtingais tirpikliais gautos ekstraktų išeigos ir sudėtis skiriasi (Wang ir kt., 2006). Plačiausiai naudojamas tirpiklis išgauti maistiniam aliejui iš augalinių žaliavų yra heksanas. Šis nepolinis tirpiklis turi pakankamai siaurą virimo temperatūros intervalą maždaug 63 – 69 °C ir pasižymi geromis aliejaus ekstrahavimo savybėmis. Tačiau komercinis heksanas tarp 189 pavojingų oro teršalų, užima pirmą vietą pagal JAV Aplinkos apsaugos agentūros pavojingų teršalų patvirtintą sąrašą. Todėl mokslininkai ir gamybininkai ieško alternatyvių tirpiklių, kurie būtų netoksiški, pigūs ir lengvai utilizuojami, kaip pvz., – etanolis (Mamidipally ir kt., 2004). Tačiau alternatyvių tirpiklių naudojimas dažnai duoda mažesnę ekstrakcijos išeigą, nes priklausomai nuo ekstrahuojamų junginių gali būti gaunamas mažesnis molekulinis giminingumas tarp ekstrahento ir ekstrahuojamo objekto. Kartais, siekiant išgauti didesnę ekstraktų išeigą įtraukiami ir papildomi tirpikliai, taip padidinant skystosios fazės poliškumą. Pavyzdžiui, izopropanolio ir heksano tirpiklių mišinys padidina išeigą ir kinetinę ekstrakciją (Li ir kt., 2004). Soksleto ekstrakcija labai priklauso nuo matricos savybių ir dalelių dydžio, nes lėta tirpiklio difuzija gali būti ekstrakciją ribojantis žingsnis (Luque-García ir kt., 2004).

Soksleto ekstrakcija turi ir keletą privalumų: (1) pusiausvyros poslinkio perdavimas pakartotinai kontaktuojant šviežiam tirpikliui su ekstrahuojama kieta matrica, (2) galimybė palaikyti pakankamai aukštą ekstrakcijos temperatūrą distiliavimo kolboje, (3) nereikalingas filtravimo procesas. Be to, šis metodas yra labai paprastas ir pigus. Trūkumai: (1) ilgas ekstrakcijos laikas, (2) sunaudojami dideli tirpiklio kiekiai, (3) negali būti naudojamas maišymas, kuris paspartina ekstrakcijos procesą, (4) gaunami dideli kiekiai tirpiklio, kurį reikia nugarinti, (5) neįmanoma išvengti šiluminio kai kurių junginių skilimo, nes ekstrakcija didesnę laiko dalį vyksta tirpiklio virimo taške. Kadangi tradicinis Soksleto ekstrakcijos metodas reikalauja didelio kiekio tirpiklio ir ilgo ekstrakcijos laiko, jis aktyvių junginių išgavime kai kuriais atvejais yra vertinamas kritiškai (Luque de Castro ir kt., 1998).

#### **1.4.2. Ekstrakcija vandens garais**

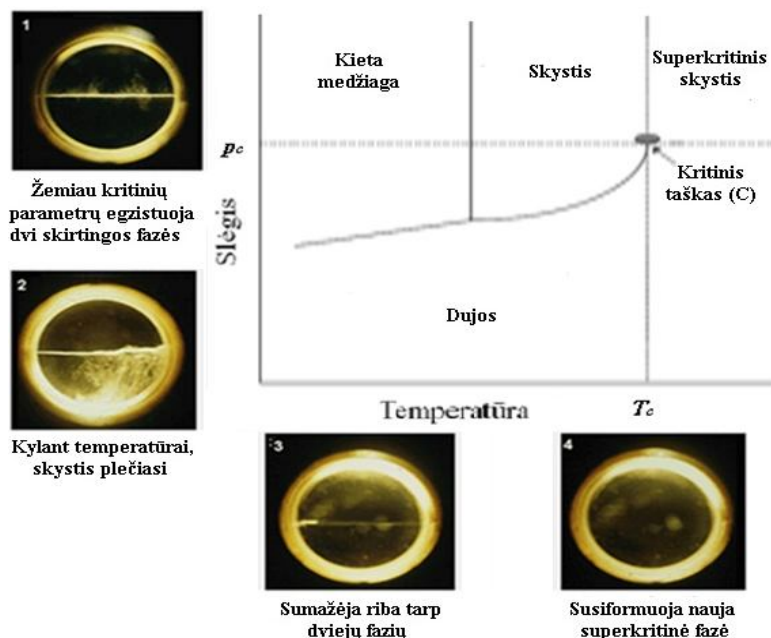
Distiliavimas vandens garais yra taikomas išgauti eteriniam aliejui iš augalinės kilmės žaliavų. Vandeninė frakcija su joje esančiais nelakiais junginiais, kuri lieka po distiliacijos vandens garais gali būti pritaikoma maisto pramonėje, kaip galimas antioksidantų ir antimikrobinių priedų mišinys (Vankar, 2004), (Ferrer, 2013). Ekstrakcija vandens garais vis dar plačiai naudojama dėl nebrangios ir lengvai surenkamos distiliavimo įrangos (Handa, 2008). Šis ekstrakcijos metodas apima tris pagrindinius fizikocheminius procesus: vandens difuziją, hidrolizę ir šiluminį skilimą (Vankar, 2004). Eterinio aliejaus ir karšto vandens difuzija per augalų membranas yra žinoma kaip vandens difuzija. Verdančiame vandenyje dalis augalinės ląstelės eterinio aliejaus maišosi su toje pačioje ląstelėje esančiu vandeniu, toliau šis aliejaus – vandens tirpalas prasiskverbia pro išbrinkusią ląstelės membraną ir galiausiai pasiekia išorinį paviršių, kur aliejus tiesiogiai kontaktuoja su garais. Aliejaus garavimo greitis neturi įtakos aliejaus komponentų kitimui, tačiau įtakoja jų tirpumo laipsnį vandenyje. Todėl distiliuojant aukštoje virimo temperatūroje atsiranda daugiau vandenyje tirpių sudedamųjų dalių, o žemoje temperatūroje – mažiau. Hidrolizės metu, esteriai esantys eteriniame aliejuje sąveikauja su vandeniu, ypač aukštoje temperatūroje susidarant rūgštims ir alkoholiams. Todėl jei vandens kiekis yra didelis, tai alkoholio ir rūgšties kiekiai taip pat bus dideli, kas įtakoja eterinio aliejaus išėigos sumažėjimą. Tai yra vienas iš trūkumų, kadangi hidrolizės reakcija priklauso nuo laiko (Handa, 2008). Kitas hidrodistiliacijos proceso trūkumas yra tas, kad distiliavimo metu vyksta eterinio aliejaus cheminiai pokyčiai ir jautrūs karščiui junginiai gali suskilti šio proceso metu. Tai sumažina eterinio aliejaus ekstrakto kokybę ir apriboja ekstrakcijos vandens garais naudojimą, šilumai nelabilių junginių išgavimui (Illés ir kt., 2000), (Azmir ir kt., 2013). Todėl norint gauti geresnę eterinio aliejaus išėigą ir kokybę rekomenduojama: (1) išlaikyti kiek įmanoma žemesnę temperatūrą, (2) naudoti kiek įmanoma mažiau vandens, atsižvelgiant į distiliacijos garais atvejį, (3) kruopščiai susmulkinti augalinę žaliavą prieš distiliaciją tam, kad būtų gauti kuo mažesni lakiųjų junginių nuostoliai (Handa, 2008).

#### **1.4.3. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE – CO<sub>2</sub>)**

Analizės tikslams superkritiniai skysčiai pirmąkart buvo panaudoti 1981 m., o po keleto metų ekstrakcija superkritiniais skysčiais (SKE) buvo komercializuota. Šiuo metodu ekstrahuojama iš kietos matricos (Fontana ir kt., 2013). Skystis yra superkritiniame būvyje tada, kai tiek jo temperatūra, tiek slėgis yra virš jų kritinio taško. Jei virš kritinio taško yra tik vienas iš šių parametrų, tokiu atveju skystis yra subkritiniame būvyje. 4 paveiksle pavaizduota medžiagos fazių diagrama, kurioje kreivė  $T_c$  yra paviršius tarp dujinio ir skysto būvio. Kiekvienas šios kreivės taškas atitinka temperatūrą ir slėgį,

kuris reikalingas, kad dujos toje temperatūroje virstų skysčiu. Taškas C yra kritinis taškas, kai temperatūra aukštesnė už kritinę, šiame taške dujos didinant slėgį nebeskystėja, bet suspaudžiamos į superkritinį skystį. Kritinis taškas yra specifinis kiekvienai konkrečiai medžiagai (Herrero ir kt., 2006).

Iš 1.2 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad superkritinių skysčių tankiai artimi skysčių



4 pav. Medžiagos fazinė diagrama

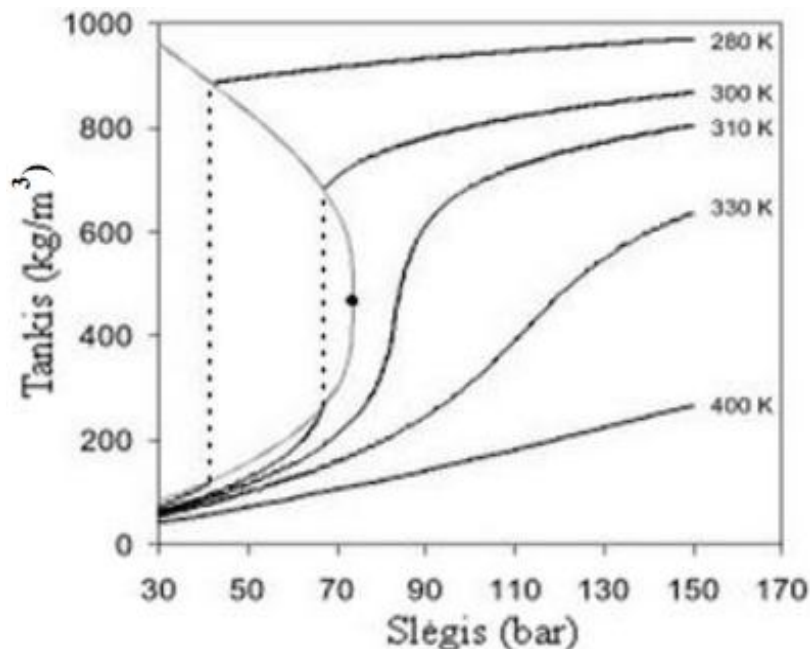
koeficientai. Dėl šių priežasčių ekstrakcija tampa žymiai greitesnė ir efektyvesnė, nei ekstrahuojant klasikiniiais tirpikliais (Herrero ir kt., 2006).

Antra vertus, superkritinių skysčių tankiai 100 – 1000 kartų didesni už dujų tankius, todėl superkritinių skysčių tirpinamoji galia artimesnė skysčiams nei dujoms. Be to, superkritinių skysčių tankis priklauso nuo slėgio ir temperatūros (5 pav.), todėl tirpinamoji galia gali būti lengvai keičiama, keičiant šiuos du parametrus (Herrero ir kt., 2006).

1.2 lentelė. Fizikocheminių savybių vidutinės vertės dujoms, skysčiams ir superkritiniams skysčiams (Herrero ir kt., 2006)

Būvis	Sąlygos	Tankis ( $\rho$ , g/cm <sup>3</sup> )	Klampa ( $\mu$ , g s/cm)	Difuzijos koeficientas ( $D_{AB}$ , cm <sup>2</sup> /s)
1	2	3	4	5
Dujos	$p = 1 \text{ atm}; T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$
Skystis	$p = 1 \text{ atm}; T = 15 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$	1	$10^{-2}$	$< 10^{-5}$
Superkritinis skystis	$p = p_c; T = T_c$	0,3 – 0,8	$10^{-4} - 10^{-3}$	$10^{-3} - 10^{-4}$

Polinių junginių išgavime gali būti naudojamas superkritinis ir perkaitintas vanduo. Nors superkritinis vanduo ir perkaitintas vanduo turi tam tikrų privalumų, kai norima gauti kuo didesnį polinių junginių kiekį, tačiau nėra tinkami termiškai labilių junginių išgavimui (Lang ir kt., 2001).



5 pav. CO<sub>2</sub> tankio – slėgio fazių diagrama

Praktiškai daugiau kaip 90 % visų superkritinio skysčio tyrimų buvo atliekama su anglies dioksidu (Pourmortazavi ir kt., 2007). Anglies dioksidas superkritiniame būvyje pasižymi santykinai žemu kritiniu slėgiu ir temperatūra: kritinė temperatūra yra 31,06 °C, kritinis slėgis yra 73,83 bar ir kritinis tankis – 0,460 g/cm<sup>3</sup> (Raventos ir kt., 2002). CO<sub>2</sub> yra chemiškai inertiškas, neteršiantis aplinkos, didelio grynumo, jo kaina sąlyginai maža, CO<sub>2</sub> lengvai pašalinamas iš ekstrakto, netoksiškas, nedegus ir turi lengvai pasiekiamą kritinį tašką, todėl tinka lakių ir šilumai labilių junginių ekstrakcijai (Pourmortazavi ir kt., 2007), (Raventos ir kt., 2002). Žema kritinė temperatūra leidžia atlikti ekstrakciją švelniomis sąlygomis. Be to anglies dioksidas atmosferos slėgyje išgaruoja, todėl netrukdo tolimesnei analizei. Dėl šių priežasčių jis yra įprastinis ekstrakcijos superkritiniais skysčiais tirpiklis (Raventos ir kt., 2002). Superkritiniame lygyje, CO<sub>2</sub> poliškumas panašus į skysto pentano, todėl geriausiai tinka lipofilinių junginių išgavimui (Pourmortazavi ir Hajimirsadeghi, 2007). Superkritinis anglies dioksidas pasižymi tendencija atrankiai ekstrahuoti mažos molekulinės masės junginius (< 250) arba silpnai polines grupes, pavyzdžiui lipidus, cholesterolį, aldehydus, esterius ir ketonus, o didelės molekulinės masės junginiai (> 400) arba junginiai turintys polines grupes, pavyzdžiui hidroksilo, karboksilo, taip pat įvairūs cukrai, polisacharidai, amino rūgštys, baltymai, fosfatidų, glikozidai neorganinės druskos

yra santykinai netirpūs anglies dioksido (1.3 lentelė) (Raventos ir kt., 2002). Taigi pagrindinis CO<sub>2</sub> trūkumas, kad nėra tinkamas ekstrahuoti polinėms analitėms (Pourmortazavi ir kt., 2007).

**1.3 lentelė.** Įvairių junginių tirpumas superkritiniame anglies dioksido (Pourmortazavi ir kt., 2007)

<b>Labai tirpūs</b>	<b>Vidutiniškai tirpūs</b>	<b>Beveik netirpūs</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Organiniai junginiai, mažo poliškumo ir mažos molekulinės masės (< 250)	Poliniai organiniai junginiai, kurių molekulinė masė mažesnė nei 400	Labai poliniai organiniai junginiai, kurių molekulinė masė viršija 400
Labai lakios medžiagos, naudojamos aromatiniuose ir skoniniuose maisto produktuose	Mažai lakios medžiagos	Nelakios medžiagos
Tiolis, pirazinas, tiazolis, acto rūgštis, benzaldehidai, heksanolis, glicerolis ir acetatas	Vanduo, terpenai, oleino rūgštis, glicerolis ir sotieji riebalai turintys iki 12 anglies atomų grandinę	Baltymai, cukrai, polisacharidai, amino rūgštys, neorganinės druskos, nitratai, vaška

Kadangi alkaloidai, fenoliai ir glikozidai prastai tirpsta anglies dioksido buvo ieškoma būdų, kurie galėtų padidinti ribotą polinių junginių tirpumą superkritiniame CO<sub>2</sub>. Yra žinoma, kad į superkritinio anglies dioksido srautą įterpus polinio tirpiklio priedo (1 – 10 %) žymiai padidėja polinių junginių tirpumas (Wang ir kt., 2006), (Raventos ir kt., 2002). Iš visų polinių tirpiklių priedų, įskaitant metanolį, etanolį, acetonitrilą, acetoną, vandenį, etilo eterį ir dichlormetaną, dažniausiai naudojamas metanolis, nes jis yra efektyvus polinis tirpiklis, kuris gerai (iki 20 %) maišosi su CO<sub>2</sub>. Tačiau etanolis gali būti geresnis pasirinkimas, dėl mažesnio toksiškumo. Taip pat metanolio naudojimas reikalauja šiek tiek aukštesnės temperatūros norint pasiekti superkritinę būseną, kas gali turėti įtakos termolabiliams junginiams. Esminis trūkumas naudojant polinių tirpiklių priedus yra tas, kad jie gali pabloginti selektyvumą (Wang ir kt., 2006).

Taigi SKE suteikia plačias galimybes ekstrahuoti ir frakcionuoti įvairius junginius, nes medžiagos tirpumas superkritiniame skystyje gali būti keičiamas, keičiant skysčio slėgį ir/arba temperatūrą. Kietos matricos tirpumas superkritiniame skystyje didėja kartu su skysčio tankiu, kuris gali būti pasiektas aukštame slėgyje. Ištirpę junginiai gali būti išgauti iš skysčio sumažinant superkritinio skysčio tankį, kuris paprastai sumažinamas, mažinant slėgį. Todėl SKE metu nereikia naudoti daug laiko užimančio koncentravimo proceso. Be to, tirpinys gali būti atskirtas nuo superkritinio tirpiklio be lakių junginių praradimo dėl ekstremalaus superkritinio skysčio kintamumo. Taip pat superkritinio skysčio difuzija yra efektyvesnė nei kitų skysčių, taip įtakojama greita masių pernaša, ir rezultate didesnis ekstrakcijos greitis, nei taikant tradicinį ekstrahavimą tirpikliu. SKE

naudojama ne mažesnė kaip 30 °C ekstrakcijos temperatūra. Žema superkritinio skysčio temperatūra leidžia ekstrahuoti šilumai jautrius junginius ir gali sąlygoti naujų natūralių junginių išgavimą (Wang ir kt., 2006), (Lang ir kt., 2001). Kadangi SKE procese nenaudojamas arba naudojamas minimalus organinio tirpiklio (organinio priedo) kiekis, dėl to šis būdas yra palankesnis aplinkai (Wang ir kt., 2006). Pagrindiniai privalumai, kad metodas yra greitas ir automatizuotas. Taip pat šviesos ir oro nebuvimas ekstrakcijos metu sumažina skilimo procesų galimybę, kurie gali atsirasti tradicinės ekstrakcijos organiniais tirpikliais metu (Ignat ir kt., 2011). Paprastai skystis – kieta medžiaga metoduose reikalingas 20 – 100 g bandinio kiekis, o SKE metodui pakanka 0,5 – 1,5 g (Lang ir kt., 2001). SKE gali būti tiesiogiai naudojama tuo pačiu metu su chromatografijos metodu, kad išekstrahuoti ir kiekybiškai įvertinti lakius junginius. Tačiau ekonominės ir sudėtingos operacinės sąlygos apriboja šio metodo pritaikymą, kai kuriose labai specializuotose srityse pavyzdžiui, eterinio aliejaus išgavime ir universitetiniuose moksliniuose tyrimuose (Wang ir kt., 2006). Taip pat svarbu paminėti, kad SKE gali būti taikoma įvairaus masto sistemose, pavyzdžiui analitinio masto (mažiau nei gramas iki kelių gramų bandinio), preparatyvinio masto (keli šimtai gramų mėginio), bandomųjų įrenginių masto (kilogramai mėginio) ir iki didelio pramoninio masto (tonos žaliavos) (Pourmortazavi ir kt., 2007).

#### **1.4.4. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE)**

Ekstrakcijai iš kietos matricos 1995 m. buvo sukurtas dar vienas efektyvus pagreitinotas ekstrakcijos organiniais tirpikliais metodas (ASE), kuris yra žinomas, kaip suspausto skysčio dideliame slėgyje ekstrakcija. Jis naudoja įprastinius tirpiklius esant aukštesnei temperatūrai (100 – 180 °C) ir aukštam slėgiui (1500 – 2000 psi) (Fontana ir kt., 2013).

Padidintas slėgis ir temperatūra turi įtakos tirpikliui, bandiniui ir jų tarpusavio sąveikai. Padidintame slėgyje padidėja tirpiklio virimo temperatūra, todėl ekstrakciją galima atlikti aukštoje temperatūroje (Fontana ir kt., 2013). Aukštose temperatūrose padidėja analičių tirpumas ir greičiau vyksta masės perdavimas, taip pat susilpnėja van der Valso jėgos, dipolių sąveikos bei vandeniliniai ryšiai tarp analitės ir matricos. Be to, aukštose temperatūrose sumažėja tirpiklio klampa ir paviršiaus įtempimas, o tai savo ruožtu palengvina tirpiklio skverbimąsi į matricą (Wang ir kt., 2006).

Tam, kad tirpiklis liktų skystas esant temperatūrai aukštesnei už tirpiklio virimo temperatūrą normaliomis sąlygomis, padidinamas slėgis. Paprastai naudojamas 1500 – 200 psi slėgis. Aukštas slėgis taip pat palengvina tirpiklio prasiskverbimą į tiriamą matricą ir taip pagreitina matricos porose sulaikytų analičių ekstrakciją (Fontana ir kt., 2013). Svarbu paminėti, kad ekstrakcijai naudojamas

tirpiklis turi gerai tirpinti analitę ir blogai tirpinti pačią matricą. Pagreitintai ekstrakcijai tirpikliais gali būti taikomi įprastiniuose ekstrakcijos metoduose (pavyzdžiui, Soksleto ekstrakcijoje) naudojami tirpikliai. Bet yra ir išimčių. Pavyzdžiui, įprastiniai tirpikliai negali būti naudojami polimerų ekstrakcijai, nes pati matrica gali ištirpti ir užkimšti jungiamuosius vamzdelius. Antra vertus, geras ekstrakcijos išėigas galima gauti panaudojus Soksleto ekstrakcijoje neefektyvius tirpiklius. Visi išvardinti veiksniai turi įtakos ekstrakcijai, padidindami ekstrakto išėigą ir pagerindami proceso efektyvumą (Wang ir kt., 2006).

Naudojimas ekstrakcijai netoksiškų tirpiklių tokių, kaip anglies dioksidas ir vanduo turi tiek ekonominę, tiek aplinkosauginę naudą. Pranešta, kad superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu yra veiksmingas aktyvių junginių ekstrahavimo būdas. Tačiau efektyviam polinių junginių išgavimui, į SK – CO<sub>2</sub> srautą turi būti įtraukiamas santykinai didelis polinio tirpiklio priedas. Todėl siekiant išgauti polinius junginius, efektyviausia SKE ekstrakcija, kurios metu pašalinama lipofilinė frakcija kombinuoti su pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais. Lyginant ASE su tradicine Soksleto ekstrakcija, pastebimas ryškus tirpiklio kiekio ir ekstrakcijos laiko sumažėjimas. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas atliekant pagreitintą ekstrakciją organiniais tirpikliais aukštoje temperatūroje, nes temperatūra gali turėti įtakos termolabilių junginių skilimui (Wang ir kt., 2006).

#### **1.4.5. Kiti ekstrakcijų metodai**

Taip pat ekstrakcijai iš kietos matricos naudojami tokie šiuolaikiniai ekstrakcijos metodai, kaip ekstrakcija mikrobangomis, ultragarso ekstrakcija ir elektrinis impulsinis laukas.

Kietos matricos ekstrakcija mikrobangomis remiasi tirpiklio ir matricos kaitimu, vykstančiu sąveikaujant mikrobangoms su medžiaga. Dėl dipolių rotacijos ir joninio laidumo, mikrobangų energija virsta šiluma (Jain ir kt., 2009). Paprastai naudojamas 300 MHz – 300 GHz elektromagnetinių bangų dažnių intervalas (Azmir ir kt., 2013). Buitinės ir pramoninės mikrobangų krosnelės paprastai veikia 2,45 GHz, o kartais 0,915 GHz JAV ir 0,896 GHz Europoje (Wang ir kt., 2006). Mikrobangų ekstrakcijos mechanizmas apima tris nuoseklius žingsnius: (1) tirpinio atskyrimas iš aktyvių bandinio matricos vietų, esant padidintai temperatūrai ir slėgiui, (2) tirpiklio difuzija į ekstrahuojamą matricą, (3) tirpinio išskyrimas iš ekstrahuojamos matricos į tirpiklį (Alupului ir kt., 2012). Šios ekstrakcijos privalumai: (1) greitas augalinės žaliavos kaitinimas turintis įtakos bioaktyvių junginių išgavimui, (2) mažesnis terminis gradientas, (3) mažesnis įrangos dydis ir didesnė ekstrakcijos išėiga (Cravotto ir kt., 2008). Ekstrakcija panaudojant mikrobangas galima išgauti biologiškai aktyvius junginius daug greičiau ir geriau, nei tradiciniais ekstrakcijos metodais (Alupului ir kt., 2012). Taip pat šis metodas



panašus į kitus šiuolaikinius ekstrakcijos metodus, pavyzdžiui į superkritinių skysčių ekstrakciją, dėl proceso paprastumo ir pigumo. Tačiau pagrindinis trūkumas lyginant su SKE tas, kad po ekstrakcijos mikrobangomis reikia pašalinti kietas nuosėdas, tam reikia papildomo filtravimo ir centrifugavimo. Mikrobangų taikymas gali būti mažiau veiksmingas tuo atveju, kai tiksliniai junginiai arba tirpikliai yra nepoliniai arba lakūs (Wang ir kt., 2006). Be to, šis metodas yra pripažintas kaip ekologiška technologija, nes naudojamas mažesnis organinio tirpiklio kiekis (Alupului ir kt., 2012).

Ultragarsas yra specialaus tipo garso bangos, kurių dažnis didesnis už žmogaus juntamo diapazono dažnį, paprastai nuo 20 kHz iki 100 MHz. Kaip ir kitos bangos praeidamos pro terpę, jos sukelia spaudimą ir išsiplėtimą. Ultragarso bangos sukelia kavitaciją, kurios metu vyksta burbuliukų gamyba, augimas ir plyšimas. Efektyviam junginių išgavimui įtakos turi drėgmės kiekis bandinyje, smulkinimo laipsnis, dalelių dydis ir tirpiklis. Be to, temperatūra, slėgis, dažnis ir laikas yra pagrindiniai faktoriai ultragarso ekstrakcijoje (Azmir ir kt., 2013). Ekstrakcija ultragarso bangomis yra nebrangi, paprasta ir efektyvi alternatyva tradiciniams ekstrakcijos metodams. Pagrindinis ekstrakcijos ultragarsu privalumas yra didesnė ekstrakcijos išeiga ir greitesnė ekstrakcijos kinetika. Ekstrakcija ultragarsu taip pat leidžia sumažinti proceso temperatūrą, sudarant sąlygas termolabilių junginių išgavimui. Lyginant su kitais šiuolaikiniais ekstrakcijos metodais pavyzdžiui, su ekstrakcija mikrobangomis, ultragarso įranga yra pigesnė ir jo veikimas yra paprastesnis. Be to, ekstrakcijai ultragarsu, kaip ir Soksleto ekstrakcijai gali būti naudojamas bet kuris tirpiklis išgaunant įvairius natūralius junginius. Tačiau ultragarso įtaka ekstrakcijos išeigai ir kinetikai gali priklausyti nuo augalinės matricos prigimties. Augalinė matrica įtakoja ultragarso bangos silpninimą (ekstraktoriaus viduje esanti aktyvioji dalis yra ribojama zonoje, kuri yra netoli ultragarso spinduolio). Todėl šie du veiksniai turi būti atidžiai įvertinami ultragarso ekstrakcijos modelyje (Wang ir kt., 2006).

Per pastarąjį dešimtmetį, impulsinio elektrinio lauko taikymas buvo pripažintas naudingu siekiant pagerinti džiovinimo, ekstrakcijos ir difuzijos procesus. Šio metodo esmė yra suardyti ląstelių membraną ir tokiu būdu padidinti junginių išgavimą. Elektrinis potencialas praeina per ląstelės membraną ir išskirsto molekules pagal jų krūvį ląstelėje (Azmir ir kt., 2013). Impulsinis elektrinis laukas gali sumažinti ekstrakcijos laiką, padidinti junginių išgavimą bei masių pernašą, ekstrakcijos metu suardant augalų membranos struktūrą ir tokiu būdu padidinant jos pralaidumą (Toepfl ir kt., 2006). Nustatyta, kad vidutinio elektrinio lauko (500 ir 1000 V/cm; 104 – 102 s) taikymas pažeidžia augalų audinių ląstelių membraną su nedideliu temperatūros padidėjimu (Fincan ir kt., 2002), (Lebovka ir kt., 2002). Dėl šios priežasties impulsinis elektrinis laukas gali sumažinti šilumai jautrių junginių skilimą (Ade-Omowaye ir kt., 2001).

## 2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

### 2.1. Tyrimų objektas

Tyrimams pasirinktos tiesioginio spaudimo būdu gautos aronijų (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott.) išspaudos, iš Kaune įsikūrusios sulčių spaudimo įmonės „Obuolių namai“. Žaliava, naudojama ekstrakcijoms buvo sudaryta iš sėklų, vaisių odelių ir stiebų. Gautos aronijų išspaudos buvo liofilizuotos sublimacinėje džiovykloje Zirbus (Zirbus technology, Vokietija). Slėgis įrenginyje buvo 0,5 mm Hg. Mėginiai buvo džiovinami nuo 8 iki 10 valandų, -50 °C temperatūroje, vėliau supakuoti į plastikinį maišelį ir saugomi -18 °C temperatūroje. Liofilizuotos aronijų išspaudos prieš ekstrakciją buvo susmulkintos laboratoriniame cikloniniame malūne (Retsch, Haan, Vokietija) naudojant 0,5 mm sietą, tokiu būdu suformuojant vienalytį išspaudų mišinį bei užtikrinant efektyvesnį aktyvių komponentų ekstrahavimą.

### 2.2. Tyrimų metodai

#### 2.2.1. Cheminiai reagentai ir medžiagos

- *Ekstraktų paruošimui naudoti reagentai ir medžiagos* – analitinio grynumo heksanas (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), acetonas (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), etanolis (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), metanolis (CH<sub>3</sub>OH), druskos rūgštis (HCl) buvo gauti iš (Chempur, Lenkija), dimetilsulfoksidas (DMSO) (Lachema, Praha, Čekija), ultra švarus vanduo ruošiamas Milipore vandens gryninimo sistema (Bedford MA, JAV), diatomitinė žemė gauta iš (Sigma-Aldrich, Mousa, Sent Luisas), CO<sub>2</sub> dujos (99,9 %, Gaschema, Jonava, Lietuva), pentanas ir dietileris gauti iš Sigma-Aldrich (Mousa, Sent Luisas). Taip pat ekstraktų paruošime naudoti popieriniai filtrai.

- *Bendro fenolinių junginių kiekio nustatyme* - galo rūgštis (> 99 %, Fluka, Lenkija), *Folin-Ciocalteu* reagentas gautas iš Sigma-Aldrich (Buchs, Šveicarija), natrio karbonatas (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 98 %, bevandenis, CHEMPUR, Lenkija), distiliuotas vanduo (vandens gryninimo sistema Milipore, Bedford MA, JAV), metanolis (≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich, Vokietija).

- *Antioksidacinio aktyvumo tyrimuose* – 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (troloksas, 97 %) ir 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH•, laisvasis radikalas, 95 %) gauti iš Sigma-Aldrich (Steinheim, Vokietija), natrio chloridas (NaCl), kalio chloridas (KCl), kalio dihidrofosfatas (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), vandeninis natrio hidrofosfatas (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O), kalio persulfatas (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), natrio

hidroksidas (NaOH) buvo įsigyti iš StanLab (Liublinas, Lenkija), 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgštis (ABTS<sup>•+</sup>, laisvasis radikalas, 98 %), 2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas (AAPh) buvo gautas iš Sigma-Aldrich (Steinheim, Vokietija), 3',6'-dihidroksispiro(izobenzofuran-1(3H),9'-(9H)ksanten)-3-onas (fluoresceinas, Steinheim, Vokietija). Mikrokrystalinė celiuliozė (20 µm) buvo gauta iš Sigma-Aldrich (Mousa, Sent Luisas), plastikinės kiuvetės (10 × 10 × 45 mm) gautos iš Fluka (Lenkija).

- *Chromatografinė analizė* – naudoti ESCh grynumo klasės tirpalai: skruzdžių rūgštis (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 98 %, Sigma-Aldrich, Vokietija), acetonitrilas ir metanolis (Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija). Ultra švarus vanduo (vandens gryninimo sistema Milipore, Bedford MA, JAV). Dujų chromatografijos metodui buvo naudotas 99,9 % helis (AGA, Suomija). Naudoti junginių standartai: chlorogeno rūgštis, rutinas, hiperozidas gauti iš Sigma-Aldrich (Vokietija), delfidin-3-gliukozidas, sacharozė, sorbitolis gauti iš Roth (Vokietija). Amonio hidroksidas iš Sigma-Aldrich (Steinheim, Vokietija).

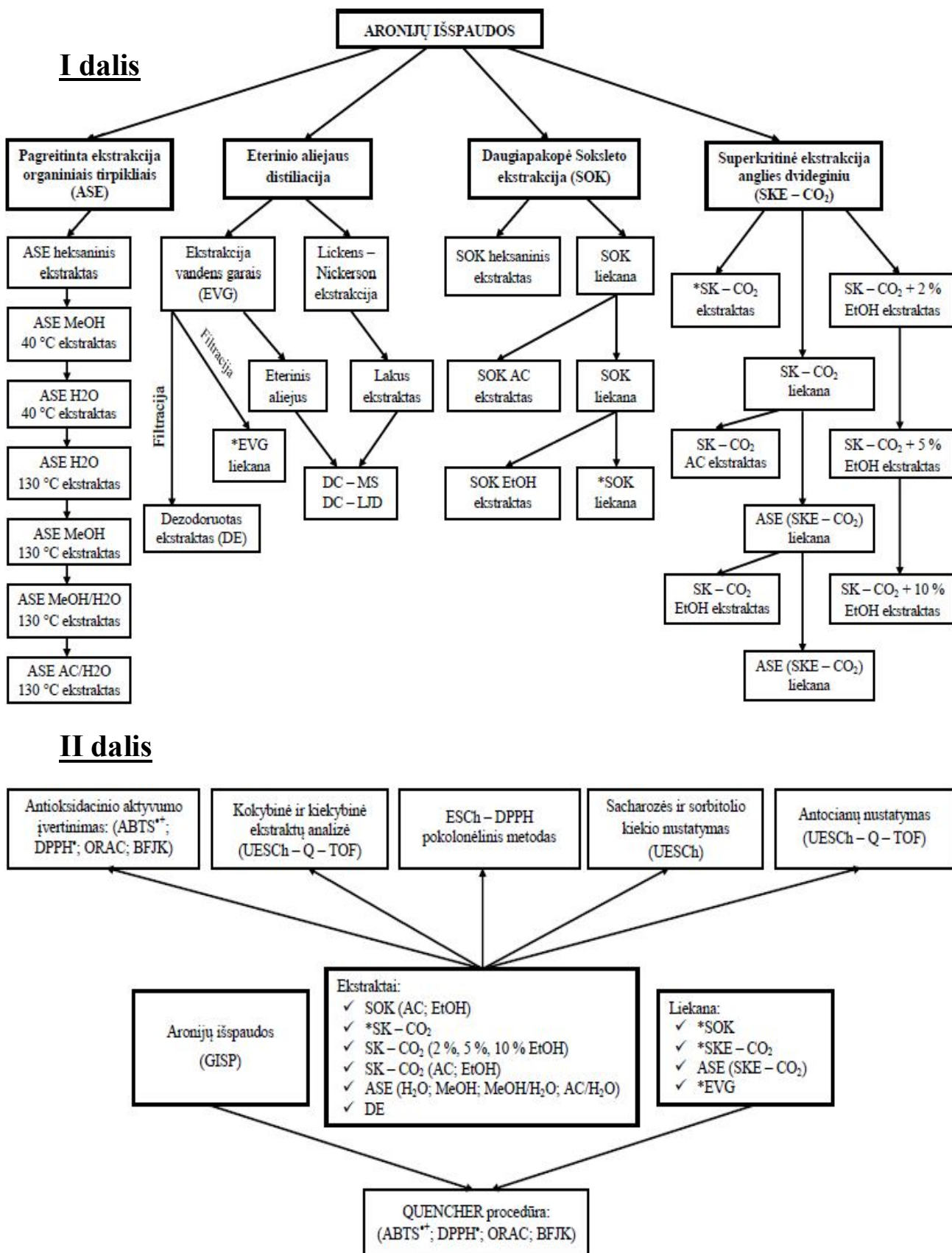
### **2.2.2. Naudoti prietaisai**

- Analitinės svarstyklės KERN 770 (Goti, Kern&Sohn gmbh., Alkstad, Vokietija);
- Malūnas ZM 200 (Retsch, Haan, Vokietija);
- Pagreitintos ekstrakcijos organiniais tirpikliais sistema (ASE) (Dionex, ASE 350, Sunnyvale, JAV);
- Laboratorinė ekstrakcijos superkritiniais skysčiais "Helix" sistema (Applied Separation, Allentown, PA, JAV);
- Vibracinis purtytuvas „Red Rotor" (Hofer Pharmacia Biotech Inc., JAV);
- Ultragarstinė vonelė „Ultrasonics" (Astra-Son™, JAV);
- Vakuuminis - rotacinis garintuvas „Biuchi R-U4" (Biuchi labortechnik AG, Konztanz, Šveicarija);
- Automatinės pipetės: 20-200 µl (CAPP, Danija), 100-1000 µl (CAPP, Danija), 1000 µl (Hirshmann Laborgerate, Hirshmann Technocolor, Vokietija);
- Spektrofotometras „GENESYS 8, 10 UV" (Spetronic instruments, Rocester, JAV);
- Mikrošvirkštas 50 µl (SGE, Australia);
- ESCh chromatografas: binarinis siurblys Waters 1525 (Water, Hilford, MA), rankinis bandinio įleidimo įrenginys Rheodyne 7725i ((Rheodyne, Rohnert Park, CA), UV detektorius Waters 996 (Waters, Hilford, MA), masių detektorius Water-Micromass ZQ 2000 (Water, Arlington, MA);
- Liofilizatorius (MAXI DRY LYO, Danija);

- Termostatas (TERMOCTAT, TC-80 M-2);
- Soksleto aparatas (Behr Labor-Technik, Düsseldorf, Vokietija);
- Biuchnerio piltuvas;
- FLOUstar Omega skaitytuvas (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Vokietija);
- Ekstrakcijos vandens garais sistema;
- Waters acuity sistema (Waters, Milford, MA, USA) su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru Maxis 4G (Bruker Daltonic, Bremen, Germany);
- Agilent 7890A dujų chromatografas (Agilent Technologies, JAV), su LECO PEGASUS 4D masių detektoriumi (Agilent Technologies, Čekija);
- Perkin Elmer Clarus dujų chromatografas su liepsnos jonizacijos detektoriumi (Perkin Elmer, CA, JAV);
- Mikrolėkštelės (Anicrin, Scorze, Italija)

### **2.3. Augalų paruošimas ir ekstraktų gamyba**

Iš liofilizuotų išspaudų siekiant išgauti funkcionaliaisiais komponentais praturtintus ekstraktus, taikyti padidinto slėgio sąlygomis veikiančias ekstrahavimo metodus – pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE) bei superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE - CO<sub>2</sub>). Taip pat atliktas junginių išgavimas pritaikius ekstrakciją vandens garais (EVG), Lickens-Nickerson ekstrakciją bei daugiapakopę Soksleto ekstrakciją (SOK). Svarbu paminėti, kad acetonas ir metanolis, kurie naudojami šiame tyrime yra kenksmingi tirpikliai ir turi atitikti Direktyvos 2009/32/EC nuostatas (Council, 2009). Šių tirpiklių likutinis kiekis neturėtų viršyti 10 mg/kg. Praktiniams tikslams saugesnis naudoti etanolis, kuris pasižymi tomis pačiomis fizinėmis ir tirpinimo savybėmis, kaip ir metanolis. Aronijų išspaudų ekstraktų gamybos ir eksperimentinių tyrimų schema pateikta 6 paveiksle.



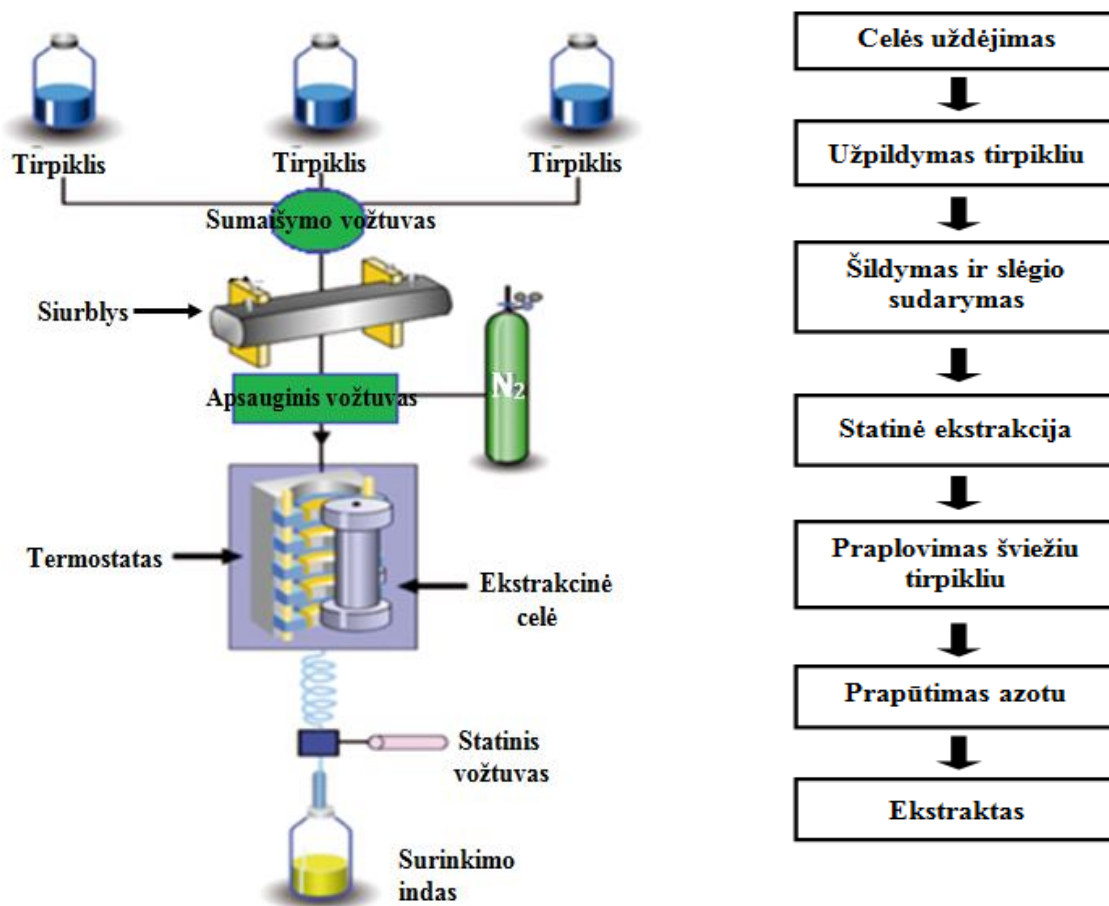
6 pav. Aronių išspaudų ekstraktų gamybos (I dalis) ir vykdytų eksperimentų tyrimų schema (II dalis)

### 2.3.1. Soksleto ekstrakcija (SOK)

Soksleto ekstrakcija buvo atlikta automatiniais ekstraktoriais (Behr Labor-Technik, Düsseldorf, Vokietija) remiantis standartine (AOAC) metodika (AOAC, 1995). Ekstrakcijai buvo naudoti tirpikliai: heksanas, acetonas bei etanolis. Šie tirpikliai pašalinti vakuuminio rotaciniu garintuvu (Biuchi labortechnik AG, Konztanz, Šveicarija) esant 40 °C temperatūrai.

### 2.3.2. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE)

Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais buvo atlikta Dionex ASE 350 sistema (Dionex, Sunnyvale, JAV), kurios principinė schema pateikta 7 paveiksle.



7 pav. Pagreitintos ekstrakcijos organiniais tirpikliais sistemos schema (Kettle, 2013), (Thermo Scientific)

3,5 g susmulkintų aronijų išspaudų buvo sumaišyta su diatomitine žeme (1:1), toks mišinys patalpintas į nerūdijančio plieno celę, kurios galuose buvo užfiksuoti nerūdijančio plieno fritai ir celiuliozės filtrai, tokiu būdu siekiant išvengti kietųjų dalelių patekimo į surinkimo indą. Ekstrakcija

atlikta naudojant didėjančio poliškumo tirpiklius, tokius kaip heksanas, metanolis, vanduo bei jų mišinius: metanolis/vanduo (80:20) ir acetonas/vanduo (80:20). Ekstrakcija buvo vykdoma atliekant tris ekstrakcijos ciklus esant 1000 psi slėgiui ir 15 min laikui bei skirtingoms temperatūroms (40 °C arba 130 °C). Organiniai tirpikliai buvo pašalinti rotaciniame garintuve 40 °C temperatūroje, o vanduo - liofilizatoriuje (MAXI DRY LYO, Danija). Gauti ekstraktai buvo saugomi tamsaus stiklo buteliukuose -18 °C temperatūroje.

### **2.3.3. Ekstrakcija vandens garais (EVG) ir Lickens-Nickerson ekstrakcija**

Eterinis aliejus išskirtas *Clevenger* hidrodistiliacijos aparatūra iš 300 g šviežiai sumaltų aronių išspaudų (esant 0,5 mm dalelių dydžiui), ekstrakcijos trukmė 3 val (AOAC). Kadangi išspaudose eterinio aliejaus kiekis yra labai mažas, tai į eterinio aliejaus surinkimo vamzdelį prieš distiliaciją buvo įpiltas 1 ml pentano. Po ekstrakcijos vandens garais likusi vandeninė frakcija buvo filtruojama, liofilizuojama ir sukonzentruojama gaunant dezodoruotą ekstraktą. DE laikomas -18 °C temperatūroje sandariai uždarytuose buteliukuose.

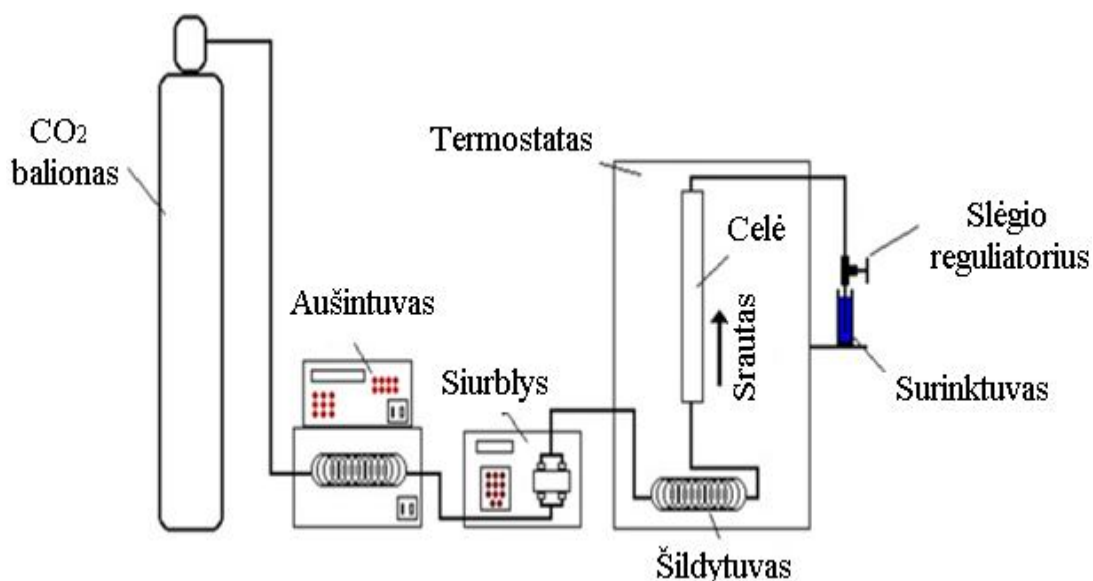
Lakus ekstraktas išskirtas *Lickens–Nickerson* ekstrakcijos aparatūra. 100 g prieš ekstrakciją susmulkintų aronių išspaudų buvo užpilta 2 l distiliuoto vandens, ekstrakcija vykdyta 2 valandas. Lakaus ekstrakto surinkimui buvo naudotas pentano ir dietileterio (1:1) mišinys (20 ml). Po ekstrakcijos į pentano ir dietileterio mišinį buvo įdėta 2 g adsorbento (bevandenio natrio sulfato) ir mišinys buvo laikomas 2 paras -18 °C temperatūroje, po to ekstraktas filtruojamas ir sukonzentruojamas azoto srove iki 2 ml tūrio.

### **2.3.4. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE - CO<sub>2</sub>)**

Ekstrakcija atlikta „Helix“ ekstrakcijos sistema (Applied Separation, Allen–town, PA, USA), naudojant 99,9 % grynumo CO<sub>2</sub> (Gaschema, Jonava, Lietuva) dujas. Superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu principinė schema pateikta 8 paveiksle.

20 g sumaltų išspaudų sudėta į 50 cm<sup>3</sup> tūrio celę, kurios apačioje ir viršuje patalpinta absorbuojanti vata. CO<sub>2</sub> srautas visos ekstrakcijos metu pastovus 2 l/min (įprastomis sąlygomis), statinė ekstrakcija trunka 10 min. Pasibaigus statinei ekstrakcijai vykdoma dinaminė ekstrakcija. Ekstrahavimo slėgis ir temperatūra nustatomi automatiškai, o laikas kontroliuojamas rankiniu būdu. Slėgio intervalas buvo keičiamas nuo 15 MPa iki 40 MPa, laiko – nuo 60 min iki 150 min, temperatūros nuo 32 iki 45 °C. Ekstraktai surenkami iš anksto pasvertuose stiklo buteliukuose ir

laikomi aplinkos sąlygose tam, kad išgaruotų CO<sub>2</sub>. Iki sekančių eksperimentų ekstraktai saugomi šaldytuve (4 °C) tamsiuose, sandariai uždarytuose buteliukuose.



8 pav. SKE - CO<sub>2</sub> ekstraktoriaus schema (Advanced technology)

Optimizavus ekstrakcijos sąlygas su grynu CO<sub>2</sub>, optimaliomis sąlygomis į SK - CO<sub>2</sub> srautą buvo įterpiama 2, 5 ir 10 % (m/m) polinio tirpiklio priedo (etanolio). Etanolis padidino superkritinio skysčio poliškumą. Po ekstrakcijos organinis tirpiklis buvo išgarintas, o ekstraktai pasverti, kad nustatyti galutinę masę. Iki tolimesnės analizės ekstraktai laikomi -18 °C temperatūroje.

#### 2.3.4.1. Superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos planavimas

Matematinis Box - Behnken eksperimentų planavimo paviršiaus atsako metodas buvo sumodeliuotas, naudojant statistinę programą Design – expert 7.0. („Stat–Ease Inc“, Mineapolis, MN, JAV). Ši programa buvo taikyta nustatyti optimalias ekstrakcijos sąlygas, kuriomis būtų gauta maksimali ekstrakcijos išeiga. Optimizuojant SKE - CO<sub>2</sub> metodą, buvo keičiami šie parametrai: slėgis, temperatūra ir laikas. Tyrimų duomenys išanalizuoti dispersinės ir koreliacinės – regresinės analizės metodais. Atlikta septyniolika ciklų, skirtingomis sąlygomis, su trimis pakartojimais. Ekstrakcijos slėgis (B), temperatūra (A) ir laikas (C) užkoduoti trimis lygiais (-1, 0, +1). Šie trys parametrai svarbūs ekstrakcijos išeigai (Y). Nepriklausomi kintamieji pavaizduoti 2.1 lentelėje.



**2.1 lentelė.** Patikrinti faktoriai ir lygiai projektuojant SKE – CO<sub>2</sub> eksperimentą

Simboliai	Nepriklausomi kintamieji	Užkoduoti lygiai <sup>a</sup>		
		-1	0	+1
<b>B</b>	p (MPa)	15	27,5	40
<b>A</b>	C (°C)	32	38,5	45
<b>C</b>	t (min)	60	105	150

<sup>a</sup> – 0 plano centrinės vertės; -1, +1 pasirinktų ekstremumų vertės

Ekstrakcijos išeiga (Y, %) apskaičiuojama pagal (1) formulę:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j>1}^3 b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

$b_0$  – laisvasis statistinio modelio narys;

$b_i$  – pagal eksperimento rezultatus apskaičiuoti pirmo laipsnio statistinio modelio koeficientai;

$b_{ij}$  – lygties koeficientai įvertinantys porinės sąveikos efektus,  $i \neq j$ .

Modelio adekvatumas nustatytas įvertinant koeficientų reikšmingumą, regresijos koeficientą ( $R^2$ ) ir Fišerio kriterijų (F) gautą dispersinėje analizėje (ANOVA). Paviršiaus atsako metodas ir kontūrų plotas sukurtas naudojant kvadratinį daugianarį. Nepriklausomas kintamasis su mažiausiu atsako efektu laikomas centrinėje taško vertėje, o kitų dviejų kintamųjų lygiai eksperimento svyravimo metu keičiami.

#### 2.3.4.2. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE)

CO<sub>2</sub> yra nepoliškas tirpiklis, tirpina nepolines ir mažai polines (lipofilines) medžiagas. Tam, kad iš išspaudų būtų išekstrahuotos polinės (hidrofilinės) medžiagos, po SKE – CO<sub>2</sub> buvo atlikta daugiapakopė pagreitinta ekstrakcija acetonu bei etanoliu. Šie tirpikliai parinkti dėl jų poliškumo. Ekstrakcija atlikta pagreintintos ekstrakcijos organiniais tirpikliais sistema ASE esant 70 °C temperatūrai. Organiniai tirpikliai buvo pašalinti rotaciniu garintuvu esant 40 °C temperatūrai. Sukoncentruoti ekstraktai laikomi šaldytuve (-18 °C) tamsiuose buteliukuose.

## 2.4. Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas

#### 2.4.1. *Bandinių paruošimas*

Antioksidacinio aktyvumo matavimams buvo paruošti 1 % koncentruoti ekstraktų tirpalai (tirpinti vandenyje arba metanolyje, priklausomai nuo jų tirpumo), kurie vėliau buvo skiedžiami metanolio ir vandens mišiniu (4:1) arba PBS tirpalu, priklausomai nuo tyrimams pasirinktos modelinės sistemos.

Kadangi superkritinės ekstrakcijos metu gautas ekstraktas lipofiliškas, todėl vietoje metanolio tirpinimui naudojamas dimetilsulfoksido (DMSO) tirpalas (50 % DMSO ir 50 % metanolio).

#### 2.4.2. *Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)*

Bendras fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas pagal Folin ir Ciocalteu (1927) metodinį aprašymą naudojant *Folin–Ciocalteu* (Sigma–Aldrich, Buchs, Šveicarija) reagentą (Folin, O., Ciocalteu 1927). Komercinis *Folin–Ciocalteu* reagentas buvo sumaišytas su distiliuotu vandeniu santykiu 1:9. Naudojant etaloninį galo rūgšties tirpalą (koncentracijų ribos: 0,025 mg/ml – 0,2 mg/ml), pagal gautus rezultatus buvo apskaičiuota kalibracinė tiesinės priklausomybės lygtis.

30 µl tiriamo ekstrakto tirpalo arba MeOH/H<sub>2</sub>O mišinio (4:1) (kuris naudojamas kaip tuščias bandinys), buvo sumaišyta su 150 µl *Folin–Ciocalteu* reagento ir 120 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalu (75 g/l). Paruošti bandiniai maišomi 15 s. Po sumaišymo mikrolėkštelė dedama į skaitytuvą, purtoma 30 s (100 rpm), inkubuojama 30 min ir matuojama absorbcija esant 765 nm bangos ilgiui. Bendras fenolinių junginių kiekis, išreikštas galo rūgšties ekvivalentais (mg/g GAE), pagal (2) formulę:

$$C = c \times V \times m^{-1} \quad (2)$$

*C* – polifenolių kiekis, išreikštas GR ekvivalentais, mg/g;

*c* – GR koncentracija, nustatyta pagal kalibravimo kreivę, mg/ml;

*V* – tiriamojo ekstrakto tūris, ml;

*m* – ekstrakcijai paimto mėginio masė, g.

#### 2.4.3. *2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS<sup>•+</sup>) laisvųjų radikalų sujungimo metodas*

Tyrimas atliktas su nedideliais pakeitimais pagal Re ir kt. (1999) metodinį aprašymą (Re ir kt., 1999). Pradžioje paruošiamas PBS tirpalas, kurį ruošiant 1 l matavimo kolboje buvo ištirpinta 8,18 g NaCl, 0,27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O ir 0,15 g KCl. Gautu tirpalo pH reikšmė 7,4. Eksperimentui atlikti paruošti du tirpalai. Pradinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas ruošiamas 0,0549 g ABTS<sup>•+</sup> reagento ištirpinant 50 ml PBS tirpale bei 0,0038 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> druskos ištirpinant 200 µl distiliuoto

vandens. Šie du pradiniai tirpalai yra sumaišomi ir laikomi tamsoje kambario temperatūroje apie 15 – 16 valandų. Darbinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas praskiestas PBS tirpalu, kad gauti absorbciją  $0,8 \pm 0,03$  optinio tankio vienetų, kai bangos ilgis 734 nm. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta panaudojus etaloninius įvairių koncentracijų Trolokso ( $C_{14}H_{18}O_4$   $M_r = 250,29$  g/mol) tirpalus (0,07 – 0,3 mg/ml).

ABTS<sup>•+</sup> radikalams sujungti mikrolėkštelėje sumaišyta 6  $\mu$ l tiriamo ekstrakto tirpalo ir 294  $\mu$ l darbinio ABTS<sup>•+</sup> tirpalo. Lėkštelė purtoma 30 s (100 rpm). Absorbcija matuojama 30 min FLUOstar Omega skaitytuvu, kai bangos ilgis 734 nm. Kiekvieno mėginio antioksidacinis aktyvumas išreikštas Trolokso ekvivalentu ( $\mu$ mol/g ekstrakto). Laisvųjų radikalų sujungimas (%) apskaičiuotas pagal (3) formulę:

$$I = \frac{(AB - AA)}{AB} \times 100 \quad (3)$$

*I* – laisvųjų radikalų sujungimo aktyvumas, %;

*AB* – ABTS<sup>•+</sup> reakcijos sistemos optinis tankis;

*AA* – sistemos su antioksidantu optinis tankis;

#### **2.4.4. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) radikalų sujungimo metodas**

DPPH<sup>•</sup> laisvųjų radikalų sujungimas buvo nustatytas pagal Brand-Williams ir kt. (1995) metodinį aprašymą (Brand-Williams ir kt., 1995). DPPH<sup>•</sup> tirpalas ruošiamas 0,0059 g radikalo ištirpinant 250 ml metanolio. Darbinis DPPH<sup>•</sup> tirpalas skiedžiamas metanolio, kad gauti absorbciją  $0,7 \pm 0,03$  optinio tankio vienetų, kai bangos ilgis 515 nm. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta panaudojus etaloninius įvairių koncentracijų Trolokso tirpalus (0,1 – 0,3 mg/ml).

DPPH<sup>•</sup> radikalams sujungti mikrolėkštelėje sumaišoma 8  $\mu$ l tiriamo ekstrakto tirpalo ir 292  $\mu$ l darbinio tirpalo. Lėkštelė purtoma 30 s (100 rpm). Absorbcija matuojama 60 min FLUOstar Omega skaitytuvu, kai bangos ilgis 515 nm. Kiekvieno mėginio antioksidacinis aktyvumas išreikštas Trolox ekvivalentais ( $\mu$ mol/g ekstrakto). Laisvųjų radikalų sujungimas (%) apskaičiuotas pagal (4) formulę:

$$I = \frac{(AB - AA)}{AB} \times 100 \quad (4)$$

*I* – laisvųjų radikalų sujungimo aktyvumas, %;

*AB* – DPPH<sup>•</sup> reakcijos sistemos optinis tankis

*AA* – sistemos su antioksidantu optinis tankis

#### 2.4.5. *Degunies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)*

ORAC tyrimas atliktas pagal Prior ir kt. (2003) pasiūlytą metodiką su nežymiais pakeitimais (Prior ir kt., 2003). Eksperimentas pagrįstas peroksido radikalų surišimu, kurį generuoja azobis (AAPh). Taip užkertamas kelias fluoresceino skilimui. Eksperimentui ruošiami trijų skirtingų koncentracijų fluoresceino tirpalai:

$S_1 = 0,0112$  g fluoresceino ištirpinama 25 ml PBS;

$S_2 =$  imama 0,25 ml  $S_1$  tirpalo ir skiedžiama 50 ml PBS;

$S_3 =$  imama 0,8 ml  $S_2$  tirpalo, skiedžiama 50 ml PBS.

Į mikrolėkštes pilama: 25  $\mu$ l tiriamo bandinio, 150  $\mu$ l  $S_3$  fluoresceino tirpalo ir inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje. Po inkubavimo pilama 25  $\mu$ l Azobio (AAPh). Eksperimentas vyksta 90 min., 37 °C temperatūroje, atitinkami emisijos bangų ilgiai 485 ir 520 nm. Kalibracinei kreivei imamos nuo 3 iki 50  $\mu$ M Trolokso koncentracijos. Po kalibracine kreive esantis plotas (AUC) kiekvienam bandiniui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. AUC apskaičiuojamas pagal (5) formulę:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} \frac{f_i}{f_0} \quad (5)$$

$f_0$  – pradinė fluoresceino vertė (0 min);

$f_i$  – fluoresceino vertė tam tikrą laiką ( $i$ -tąją min).

#### 2.5. Kietosios frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas

##### (QUENCHER procedūra)

Kai mėginiai pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu kietoji frakcija yra maišoma su mikrokristaline celiulioze. Tyrimui atlikti buvo ruošiami skirtingų koncentracijų išspaudų ir celiuliozės mišiniai santykiu (1:10, 1:40, 1:50, 1:80, 1:100, 1:120, 1:150) priklausomai nuo tiriamosios sistemos.

Kietosios frakcijos antioksidacinis aktyvumas buvo tirtas prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstrakcijų ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, ORAC ir BFJK metodais pritaikius QUENCHER procedūrą. Visi tyrimai buvo atliekami tuo pačiu būdu, kaip buvo aprašyti nustatant ekstraktų antioksidacinį aktyvumą.

ABTS<sup>•+</sup> surišimo metodui atlikti buvo pasverta 5 mg bandinio (išspaudos/celiuliozė), kuris praskiestas 40  $\mu$ l PBS tirpalu. Reakcija pradedama pridedant 1,96 ml ABTS<sup>•+</sup> reagento. Paruoštas mišinys buvo maišomas 1 min, purtomas tamsoje 30 min (250 rpm), centrifuguojamas 4800 rpm 3min

ir 300 µl skaidraus mišinio pipete perkeliama į mikrolėkštelę. DPPH• surišimo metodas atliekamas panašiu principu kaip ABTS<sup>•+</sup> metodas.

ORAC metodui, 5 mg bandinio užpilama 40 µl PBS ir reakcija pradedama pridėjus 2 ml fluoresceino. Mišinys purtomas 37 °C temperatūroje 15 min, centrifuguojamas 40 °C temperatūroje 3 min (4800 rpm). Vėliau 175 µl paruošto tirpalo buvo perkelta į mikrolėkštelę ir pridėta 25 µl AAPh tirpalo (azobis). ABTS<sup>•+</sup>, DPPH• ir ORAC modelinių sistemų antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas mmol/g sausų išspaudų.

BFJK nustatyme, 5 mg mėginio buvo užpilta 150 µl MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1), 750 µl *Folin-Ciocalteu* reagento bei 600 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Paruoštas mišinys maišomas 15 s, purtomas tamsoje 3 valandas (250 rpm) bei centrifuguojamas 4500 rpm greičiu 10 min. Bendras fenolinių junginių kiekis išreiškiamas mg/g sausų išspaudų.

## 2.6. Ekstraktų sudėties ir kiekio nustatymas

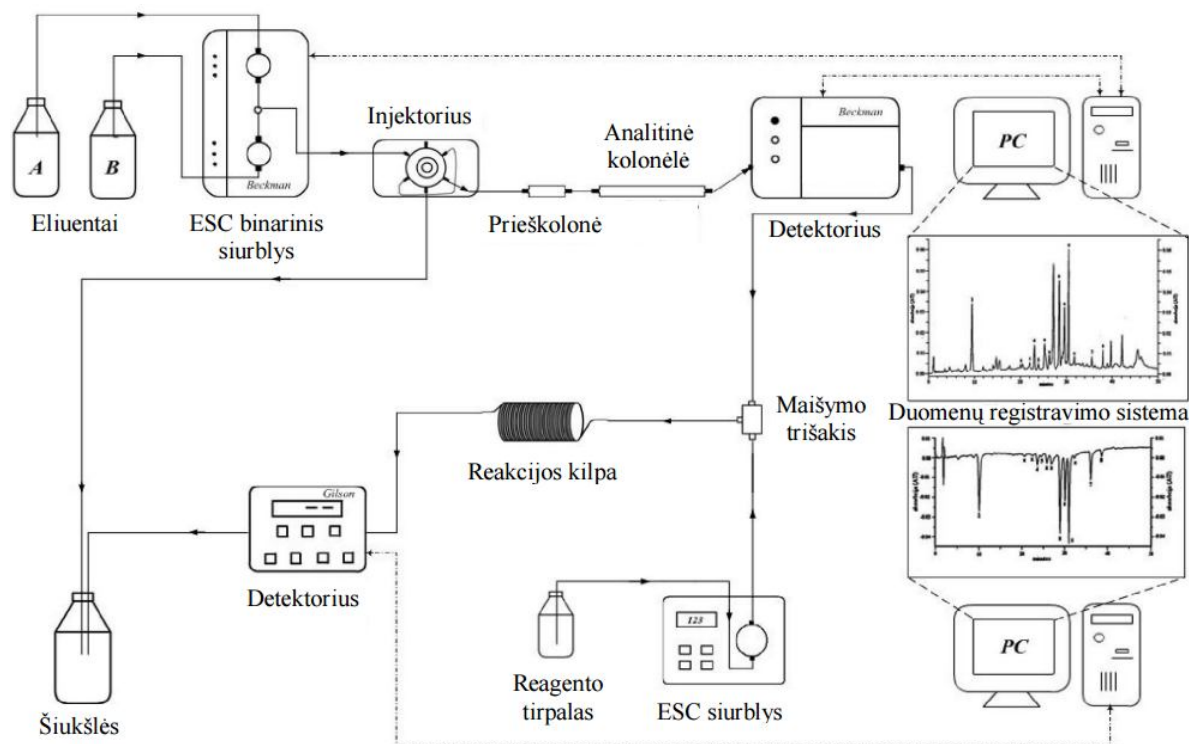
### 2.6.1. *Efektivosios skysčių chromatografijos DPPH pokolonėlinis metodas (ESCh-DPPH)*

Tyrimas buvo atliekamas naudojant Waters HPLC sistemą su Waters Reagent Manager siurbliu (Milford, MA, USA) ir Discovery HS C18 250 × 0,46 cm (5 µm) analizinę kolonėlę (Supelco Analytical, Bellefonte, USA), kuria efektyvesniam junginių skirstymui buvo palaikoma 40 °C temperatūra. Bandiniai įleidžiami rankiniu injektoriumi Rheodyne 7125 (Rheodyne, RohnertPark, CA), kuris turi 20 µl injekcijos kilpą. Linijinis binarinis gradientas buvo suformuotas esant pastoviam 0,8 ml/min srautui naudojant tirpiklį A (1 % skruzdžių rūgštis) bei tirpiklį B (100 % acetonitrilas). Analizė buvo pradėta su 5 % B, po to B padidintas iki 25 % per 30 min, iki 100 % per 45 min ir galiausiai iki 100 % per 50 min. Analitinė kolonėlė buvo plaunama 5 min su 100 % B, tada per 3 min gradientas buvo grąžintas į pradinės sąlygas ir 5 min buvo palaikyta pusiausvyra prieš kitą analizę. Tinkamo gradiento, kolonėlės ir temperatūros parinkimas leidžia gauti gerą skiriamąją gebą ir tinkamą tiriamų smailių (9 pav.).

Junginiai, išplauti iš kolonėlės buvo aptikti Waters 996 fotodiodiniu matricos detektoriumi (Milford, USA) esant 210 – 450 nm bangos intervalui. Vėliau naudojant Agilent 1100 serijos binarinį siurbli (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA) šviežiai paruoštas 5 × 10<sup>-6</sup> M DPPH• metanolinis tirpalas 0,6 ml/min greičiu, kartu su pagrindiniu eluentu buvo paduodami į 15 m (0,25 mm ID) reakcijos kilpą.

Papildomai tikslesniam fenolinių junginių identifikavimui ESCh sistema buvo sujungta su Micromass ZQ masių detektoriumi (Waters, Milford, JAV) veikiančiu ESI neigiamos jonizacijos

režimu. Į kilpą buvo įleista 20 µl, 1 % koncentracijos tiriamojo ekstrakto tirpalo, tėkmės greitis 0,8 ml/min, gradientas (toks pat, koks buvo taikytas DPPH pokolonėliniam metodui).



9 pav. ESCh-DPPH pokolonėlinio metodo aparatūros sistema (Raudonis, 2012)

### 2.6.2. Ekstraktų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESCh-Q-TOF)

Ekstraktų chromatografinė analizė buvo atlikta Waters Acquity sistema (Waters, Milford, JAV), kuri buvo sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (angl. Q-TOF) (Bruker Daltonic, Brėmenas, Vokietija). Analiečių skirstymas atliktas atvirkščių fazių analitine kolonėle Acquity BEH C18, Amide 2,1 × 100 mm, sorbento dalelių dydis - 1,7 µm (Waters, Milford, JAV), kuria buvo palaikoma 40 °C temperatūra. Eliuentų sistema: A – 1 % skruzdžių rūgštis (v/v), B – 100 % acetonitrilas. Eliucijos trukmė - 17 min. Taikytas šis gradiento kitimas: 0 min. – 1 % B; 4,5 min. – 10 % B; 7,5 min. – 26 % B; 13 - 14 min. – 100 % B; 15 min. – 80 % B, 16 min. – 50 % B, 17 min. – 99 % B. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 2 µL. Iš kolonėlės išeinantys junginiai aptikti diodų matricos detektoriumi (DMD) esant 100 – 500 nm bangos ilgiui. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas neigiamos elektrinės jonizacijos režimu, kurio parametrai buvo kontroliuojami HyStar programine įranga. Jonizacija buvo atlikta naudojant + 4000 V įtampą,

fragmentavimo celės įtampa 3 eV, azoto dujos buvo naudotos kaip išpurškiančios (slėgis 2 bar) ir džiovinančios dujos, kurių tėkmės greitis 10 l/min. Tarpusavyje derinant pilno skenavimo ir MS/MS modelius buvo apskaičiuotos tikslios junginių molekulinės formulės intervale - m/z 100 – 1500, kai skenavimo greitis buvo 2,5 Hz. Taikant MS/MS modelį buvo patvirtinti junginiai, kurių negalima vienareikšmiškai identifikuoti. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės, standartinių junginių masių spektrus, eliucijos trukmės sutapimą, MS/MS režimu gautus fragmentus bei lyginant juos su literatūros duomenimis. Nežinomų junginių identifikavimui buvo taikytas MS/MS režimas, kai fragmentavimo įtampa celėje buvo 35 eV.

Kiekybinė analizė atlikta naudojant išorinius standartus. Kalibracinės kreivės sudarytos pagal skirtingų koncentracijų (4,0 – 150 µg/ml) standartinius tirpalus: hiperozidas ( $y = 3498,14x - 1656,19$ ;  $R^2 = 0,999$ ); rutinas ( $y = 2156,88x + 643,99$ ;  $R^2 = 0,999$ ) ir chlorogeno rūgštis ( $y = 1181,94x + 2743,43$ ;  $R^2 = 0,998$ ). Gautas kalibracinės kreivės parodo priklausomybę tarp smailės plotų ir standartų kiekių. Junginių koncentracijos apskaičiuotos pagal tiesinę plotų regresiją (koreliaciją), kuri buvo sudaryta QuantAnalysis kompiuterine programa ir išreikštos mg/100 g sausos masės (SM).

## 2.7. Antocianų kiekybinė analizė

**Antocianų ekstraktacija:** 2 g liofilizuotų susmulkintų išspaudų supilama į plačiadugnę kolbą, užpilama 20 ml CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (50:50), kuriame yra 0,1 M HCl. Mišinio ekstraktacija vykdoma 5 min ultragarsinėje vonelėje ir 30 min. intensyviai maišant magnetine maišykle (90 rpm). Gauta ištrauka buvo filtruota per popierinį filtrą ir centrifuguota 2200 aps/min. greičiu 5 min., ir esant 4 °C temperatūrai. Liekana pakartotinai tuo pačiu būdu buvo ekstrahuota 2 kartus. Supernatantas surenkamas ir koncentruojamas rotaciniame garintuve 25 °C temperatūroje, vėliau praskiedžiamas 25 ml matavimo kolbutėje iki žymės CH<sub>3</sub>OH, kuriame yra 0,1 M HCl. Mišinys filtruojamas per 15 mm švirkšto filtrą ir saugomas gintaro spalvos buteliukuose -18 °C temperatūroje. Prieš atliekant chromatografinę analizę 1 ml gauto koncentrato buvo išgarinta iki sausumo azoto dujomis. Gautas turinys buvo praskiestas ESCh grynumo metanolio ir nufiltruotas.

**Kiekybinė analizė:** buvo atlikta Waters Acquity sistema. Kolonėlės parametrai, termostato temperatūra, A ir B eliuantai, judrios fazės tėkmės greitis, injekcijos tūris (žr. Skyrius 2.6.2.). Detekcija buvo atlikta esant 220 - 550 nm bangos ilgiui. Taikytas šis gradiento kitimas: 0 min. – 1 % B; 7 min. – 15 % B; 8 min. – 100 % B; 10 min. – 50 % B; 12 min. – 1 % B. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas teigiamos elektrinės jonizacijos režimu. Masių spektrai užrašyti pilno skenavimo režime, intervale - m/z 100 – 800. Chromatografinių smailių identifikavimas buvo atliktas

remiantis literatūros duomenimis bei MS/MS režimu gautų junginių fragmentais. Fragmentavimo įtampa celėje buvo 40 eV. Taip pat buvo atliktas pseudo MS<sup>3</sup> fragmentavimas esant 60 eV įtampai tarp dviejų šaltinių. Pseudo MS<sup>3</sup> eksperimentų junginių jonai papildomai buvo sufragmentuoti šaltinyje. Taip sudarytas įtampų skirtumas sukėlė jonų susidūrimą dėl kurio įvyko molekulių skilimas, todėl bendras rezultatas atitiko MS<sup>3</sup> fragmentavimą. Pseudo MS<sup>3</sup> spektru buvo patvirtinta cianidino aglikono struktūra.

Kiekybinė analizė atlikta naudojant išorinius standartus. Kadangi nebuvo galimybės gauti komercinio junginio standarto, todėl kalibracinė kreivė sudaryta pagal delfidin-3-gliukozido ( $y = 0,000015x - 1,005$ ;  $R^2 = 0,999$ ) skirtingų koncentracijų (20 – 100 µg/ml) tirpalus. Junginių koncentracijos paskaičiuotos pagal tiesinę plotų regresiją (koreliaciją) sudarytą QuantAnalysis kompiuterine programa ir išreikštos mg/100 g sausos masės (SM).

## **2.8. Sacharidų kiekio nustatymas**

Vandeniniai ekstraktai ištirpinti vandenyje, gautų tirpalų koncentracija buvo 0,01 %. Analizei atlikti buvo naudojama Waters UPLC Acquity H Class sistema (Waters, Milford, JAV) su Xevo TQ-S masių detektoriumi. Junginiai atskirti naudojant atvirkščių fazių Acquity UPLC BEH Amide 2,1 × 100 mm, 1,7 µm (Waters, Bellefonte, JAV) kolonėlę. Vandeninių ekstraktų junginių skirstymui naudojama judrioji fazė, kurią sudaro trijų tirpalų mišinys (75 % acetonitrilo, 25 % vandens ir 0,1 % amonio hidroksido), analizė atlikta izokratinėmis sąlygomis, tėkmės greitis – 0,35 ml/min., analizės trukmė – 10 min. Junginiai identifikuoti pagal molekulinę masę bei išėjimo laiką lyginant su identifikuotų junginių standartais. Junginių identifikavimui naudoti skirtingų koncentracijų standartiniai tirpalai: sacharozė (0,01 – 0,50 µg/ml) ir sorbitolis (1,56 - 50 µg/ml). Junginių koncentracijos apskaičiuotos pagal tiesinės plotų regresijos (koreliacijos) lygtį ir išreikštos mg/100 g sausos masės (SM).

## **2.9. Dujų chromatografijos (DC – LJD) metodas**

Eterinio aliejaus ir lakaus ekstrakto sudėtis tirta dujų chromatografijos metodu su Perkin Elmer Clarus 500 dujų chromatografu (JAV) su liepsnos jonizacijos detektoriumi (LJD). Junginių skirstymui buvo naudojama Elite-5 kapiliarinė kolonėlė (PerkinElmer, JAV); ilgis 30 m, vidinis skersmuo 0,25 mm, stacionarios fazės sluoksnio storis 0,25 µm. Naudota temperatūrinė programa: nuo 50 °C (išlaikant 2 min) ir keliant temperatūrą 5 °C/min greičiu iki 280 °C, išlaikant 10 min. Injektoriaus temperatūra 260 °C; injektuojamo bandinio kiekis – 1 µl; įleidimo srauto paskirstymas 1:10; nešančios dujos – helis; srauto greitis – 1,3 ml/min; detektoriaus temperatūra – 300 °C. Junginių pasiskirstymas išreikštas



% nuo bendro DC – LJD chromatogramos smailių ploto. Analizės atliktos su keturiais pakartojimais ir paskaičiuotas standartinis nuokrypis.

### **2.9.1. Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos (DC – MS) metodas**

Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos (DC - MS) analizė atlikta su GC-TOF-MS LECO Pegasus 4D system dujų chromatografu - masių spektrometru, turinčiu dvi kolonėles. Pirmoji kolonėlė BPX-5 (ilgis 30 m, vidinis skersmuo 0,25 mm, stacionarios fazės sluoksnio storis 0,25  $\mu\text{m}$ ) (SGE Analytical Science, Australija) sujungta su antrąja kolonėle, BPX-50 (ilgis 2 m, vidinis skersmuo 0,10 mm, stacionarios fazės sluoksnio storis 0,1  $\mu\text{m}$ ). Pirmosios kolonėlės temperatūrinė programa: nuo 50  $^{\circ}\text{C}$  keliant temperatūrą 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  greičiu iki 280  $^{\circ}\text{C}$ , išlaikant 10 min. Antrosios kolonėlės temperatūrinė programa: nuo 65  $^{\circ}\text{C}$  keliant temperatūrą 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  greičiu iki 295  $^{\circ}\text{C}$ . Inžektoriaus temperatūra 280  $^{\circ}\text{C}$ ; detektoriaus įtampa 1550 V, jonų šaltinio temperatūra 250  $^{\circ}\text{C}$ ; įleidimo srauto paskirstymas 1:20; injektuojamo bandinio kiekis – 1  $\mu\text{l}$ .

Lakieji aromato junginiai identifikuoti apskaičiuavus jų Kováts (KI) sulaikymo indeksus (pagal  $\text{C}_7\text{--}\text{C}_{30}$  alkanų standartinį mišinį), gautus su nepoline *Elite-5* kolonėle ir palyginus su publikuotais literatūroje (Adams, 2009), taip pat palyginus gautus masių spektrus su spektrais esančiais NIST, MAINLIB, REPLIB ir ADAMS masių spektrų bibliotekose. Junginys identifikuotas tik esant KI ir MS suderinamumui.

$$\text{KI} = 100n + 100 \frac{\log RT(X) - \log RT(\text{C}_n)}{\log RT(\text{C}_n + 1) - \log RT(\text{C}_n)}$$

*KI – Kováts sulaikymo indeksas; n – atitinkamo alkano anglies atomų skaičius; RT(X) – tiriamo junginio išėjimo laikas nepolinėje Elite-5 kolonėlėje; RT(C<sub>n</sub>) ir RT(C<sub>n</sub> + 1) – alkano išeinančio prieš tiriamą junginį ir alkano išeinančio paskui tiriamąjį junginį išėjimo laikai Elite-5 kolonėlėje*

### **2.10. Rezultatų statistinė analizė**

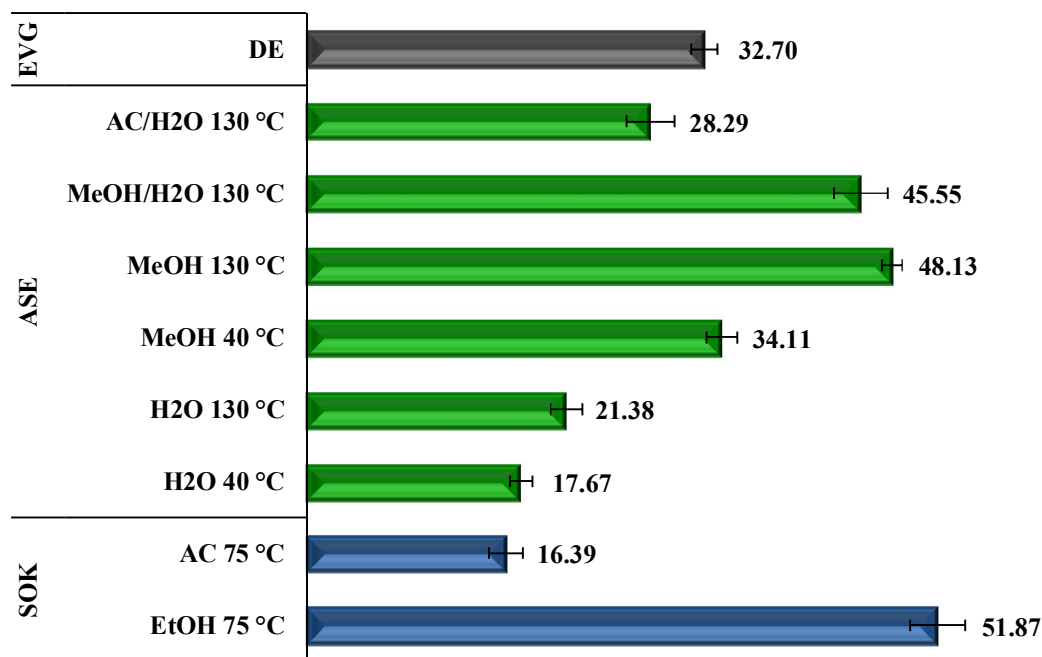
Eksperimentiniai duomenys apdoroti naudojant statistinius duomenų analizės paketus Microsoft Office Excel (Microsoft, JAV) ir ANOVA. Visi eksperimentai kartoti tris kartus, o duomenys išreikšti vidurkiais  $\pm$  RSD %.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Ekstraktų išeigos gautos ekstrahuojant poliniais organiniais tirpikliais

Ruošiant mėginius buvo naudojami skirtingi ekstrakcijų metodai. Aronijų išspaudų ekstraktai buvo gauti tradiciniais ekstrakcijų metodais, vykdant daugiapakopę ekstrakciją Soksleto aparate (SOK) bei atliekant ekstrakciją vandens garais (EVG), kurios metu gautas dezodoruotas ekstraktas (DE). Taip pat naudotas naujas ir perspektyvus pagreitinotos ekstrakcijos organiniais tirpikliais (ASE) metodas. Veikliųjų medžiagų ekstrakcija buvo atlikta skirtingo poliškumo organiniais tirpikliais: vandeniu, metanoliu, etanoliu, acetonu, metanolio ir vandens (80:20) bei acetono ir vandens (80:20) mišiniais.

Ekstrakcijų išeigos pateiktos 10 paveiksle. Nustatyta, kad visų tirtų ekstraktų išeiga priklauso nuo ekstrakcijai pasirinkto organinio tirpiklio.



10 pav. Skirtingų ekstrakcijų išeigos (g/100 g sausų išspaudų)

*SOK EtOH 75 °C, SOK AC 75 °C, soksleto ekstrakcijos etanolinis ir acetoninis ekstraktai gauti 75 °C temperatūroje; ASE H<sub>2</sub>O 40 °C, ASE H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 40 °C ir 130 °C temperatūroje; ASE MeOH 40 °C, ASE MeOH 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos metanolinis ekstraktas gautas 40 °C ir 130 °C temperatūroje; ASE MeOH/H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos metanolio ir vandens mišinio (80:20) ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje; ASE AC/H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos acetono ir vandens mišinio (80:20) ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje; SK – CO<sub>2</sub> AC 70 °C, SK – CO<sub>2</sub> EtOH 70 °C, po superkritinio anglies dvideginio taikytos pagreitinotos ekstrakcijos acetoninis ir etanolinis ekstraktas gautas 70 °C temperatūroje; DE, dezodoruotas ekstraktas*

Didžiausia ekstrakto išeiga daugiau kaip 50 % gauta ekstrahuojant etanoliu Soksleto aparate. Šiek tiek mažesnės ekstrakcijos išeigos gaunamos atliekant pagreitiną ekstrakciją metanoliu bei metanolio ir vandens mišiniu esant 130 °C temperatūrai. Iš pateiktų duomenų matome, kad naudojant acetoną ir vandenį gauta net 3 kartus mažiau ekstrakto. Pastebėtas nežymus ekstrakto kiekio skirtumas tarp ekstrakcijos vandens garais ir pagreitintos ekstrakcijos metanoliu (40 °C temperatūroje) gautų ekstraktų. Taip pat pagreitintos ekstrakcijos būdu acetono ir vandens mišiniu išgauto ekstrakto išeiga buvo apytiksliai 2 kartus didesnė, nei gauta grynu acetonu Soksleto aparate. Svarbu paminėti, kad temperatūra taip pat turi svarbią įtaką ekstrakcijai, nes didėjant temperatūrai didėjo ir ekstrakto išeiga, tačiau didinant temperatūrą gali skilti flavonoidų glikozidai ir sumažėti bendras jų kiekis (Deng ir kt., 2011).

### **3.2. Ekstraktų išeigos gautos ekstrahuojant nepoliniais organiniais tirpikliais**

Funkcionaliųjų komponentų išgavimui buvo taikytas padidinto slėgio sąlygomis veikiantis ekstrahavimo metodas – superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE - CO<sub>2</sub>). SKE metodu buvo efektyviai išskirti lipofiliniai junginiai. Superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu deriniai atlikti optimizuojant ekstrakcijos proceso kintamųjų vertes - temperatūrą, slėgį ir laiką. Eksperimentinių kintamųjų optimalių verčių nustatymui, t.y. pilno antro laipsnio statistinio modelio sudarymui, naudotas Box - Behnken planas, o duomenys apdoroti programa Design-Expert 7.0. Paviršiaus atsako metodas naudojamas, kai tiriamas atsakas priklauso nuo keleto kintamųjų, o eksperimento tikslas – optimizuoti šį atsaką. Naudojant Box – Behnken planą buvo įvertinta proceso kintamųjų įtaka aronijų išspaudų lipofilinių ekstraktų išeigai bei nustatytos optimalios proceso kintamųjų vertės.

Juodųjų aronijų išspaudų analizei buvo sudarytas 3 parametrų 17 ciklų (12 faktoriinių ir 5 centro taškai) Box - Behnken modelio planas. Plano centrinių taškų parametrų vertės buvo 38,5 °C temperatūra, 105 min laikas ir 27,5 MPa slėgis.

Modelio dispersinė analizė (ANOVA) yra pateikta 3.1 lentelėje. Šio modelio parametrai: F - vertė (125,52) labai didelė, o *p* – vertė labai maža (0,0001).

Atlikus išspaudų kvadratinio modelio regresinių lygčių analizę nustatyta, kad pagal sudarytą matematinį modelį išspaudų SKE - CO<sub>2</sub> ekstraktų išeigos kitimo pobūdis atitinka eksperimentais nustatytą pobūdį (determinacijos koeficientas  $R^2 = 0,99$ ). Tai patvirtina ir teorinį SKE - CO<sub>2</sub> išspaudų modelio adekvatumą realiems eksperimentinio tyrimo rezultatams. Gautas determinacijos koeficientas ( $R^2 = 0,98$ ) buvo beveik lygus teoriniam determinacijos koeficientui ( $R^2 = 0,92$ ); pastaroji vertė patvirtino paviršiaus atsako plano tinkamumą numatyti optimalias proceso parametrų vertes.

### 3.1 lentelė. Kvadratinio modelio dispersinė analizė

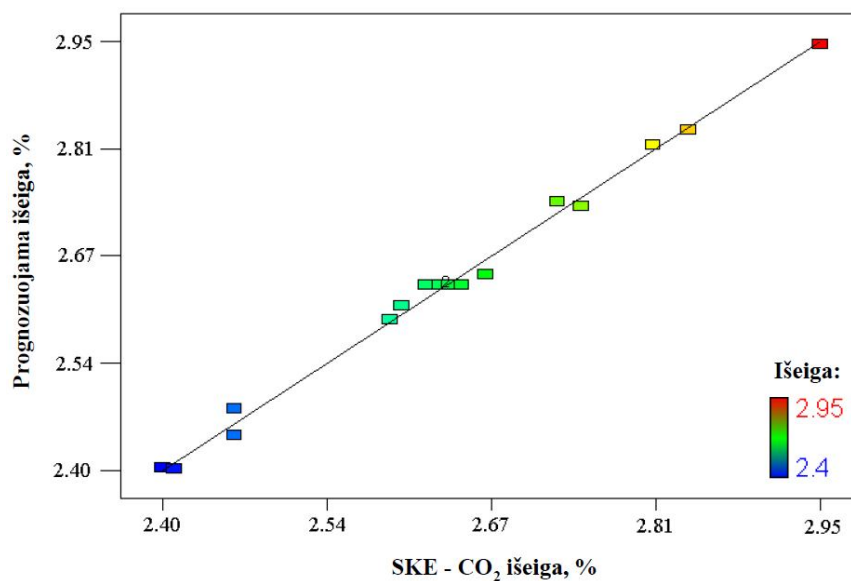
Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F–kriterijus	p–reikšmė
1	2	4	5	6
Modelis	0,36	0,040	125,52	< 0,0001 reikšmingas
A - temperatūra	$6,612 \cdot 10^{-3}$	$6,612 \cdot 10^{-3}$	20,53	0,0527
B - slėgis	0,26	0,26	793,48	< 0,0001
C - laikas	0,068	0,068	212,48	< 0,0001
AB	$2,250 \cdot 10^{-4}$	$2,250 \cdot 10^{-4}$	0,70	0,4309
AC	$1,600 \cdot 10^{-3}$	$1,600 \cdot 10^{-3}$	4,97	0,0611
BC	0,012	0,012	37,56	0,0005
A <sup>2</sup>	$1,642 \cdot 10^{-3}$	$1,642 \cdot 10^{-3}$	5,10	0,0585
B <sup>2</sup>	0,013	0,013	39,90	0,0004
C <sup>2</sup>	$5,842 \cdot 10^{-3}$	$5,842 \cdot 10^{-3}$	18,14	0,0038
Liekana (Residual)	$2,255 \cdot 10^{-3}$	$3,221 \cdot 10^{-4}$	-	-
Klaidos tikimybė	$1,575 \cdot 10^{-3}$	$5,250 \cdot 10^{-4}$	3,09	0,1523 nereikšmingas

*F – Fišerio kriterijus; p – reikšmė < 0,05 (tuomet kintamasis yra statistiškai reikšmingas)*

Kadangi palyginamojo tikslumo (Adeq Precision) santykinė reikšmė (39,5) buvo didesnė nei 4, modelis gali būti toliau naudojamas modeliuojant plano erdvę. Gauto modelio rezultatai parodė, kurie parametrai yra reikšmingi ir labai svarbūs. Modelyje dominuoja šeši svarbūs parametrai – A, B, C, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup>, kuriais užrašomi plano rezultatai, išreiškiant juos daugianario modelio lygtimi:

$$\begin{aligned} \text{Išeiga (\%)} = & 2,64 + 0,029 \times A + 0,18 \times B + 0,093 \times C + 7,5 \times 10^{-3} \times A \times B + \\ & + 0,020 \times A \times C + 0,055 \times B \times C + 0,020 \times A^2 - 0,055 \times B^2 + 0,037 \times C^2 \end{aligned}$$

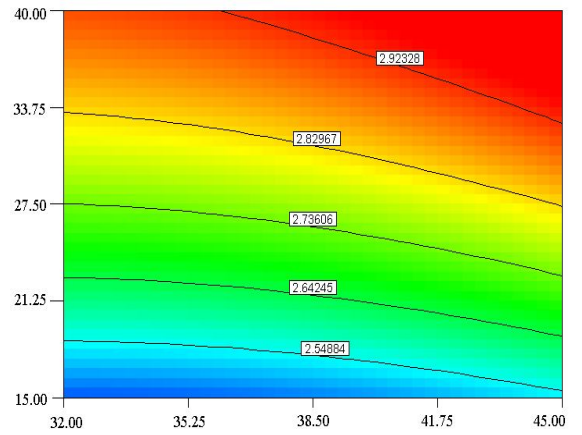
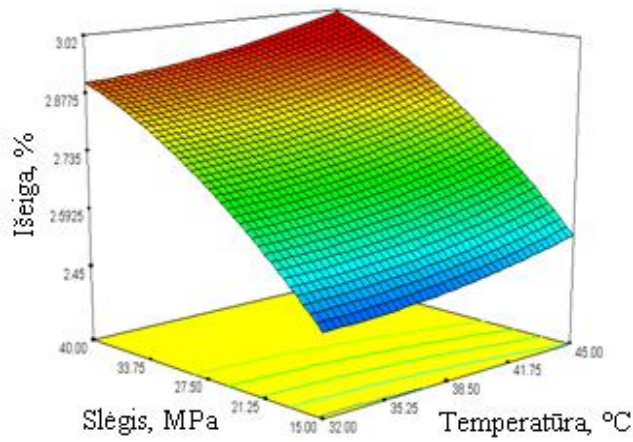
SKE – CO<sub>2</sub> gautų ekstraktų išeiga kito nuo 2,40 % iki 2,95 % (ekstrahuojant iš 20 g žaliavos, pagal Box - Behnken plano sudarytas sąlygas). Didžiausia aronijų išspaudų ekstrakto išeiga gauta esant 40 MPa slėgiui, 40 °C temperatūrai ir 149 min laikui. Pagal apskaičiuotą paviršiaus atsako lygtį, nustatyta, kad taikant šias ekstrakcijos sąlygas gauta didžiausia ekstrakto išeiga - 2,95 %. Didžiausią poveikį ekstrakto išeigai turėjo slėgis ir laikas (p < 0,0001). Minėtomis sąlygomis eksperimentiniai išeigų taškai labai gerai koreliavo su prognozuojamomis ekstraktų išeigomis (11 paveikslas).



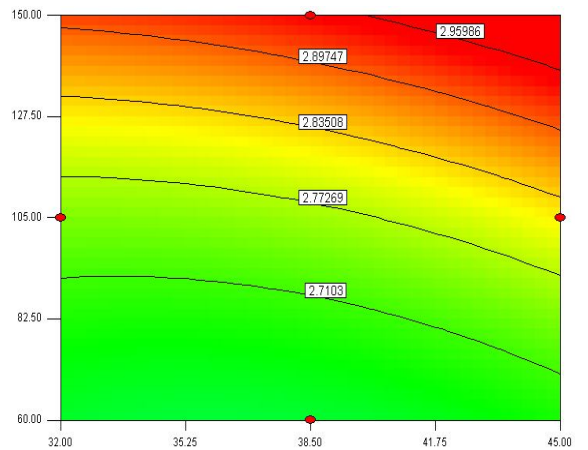
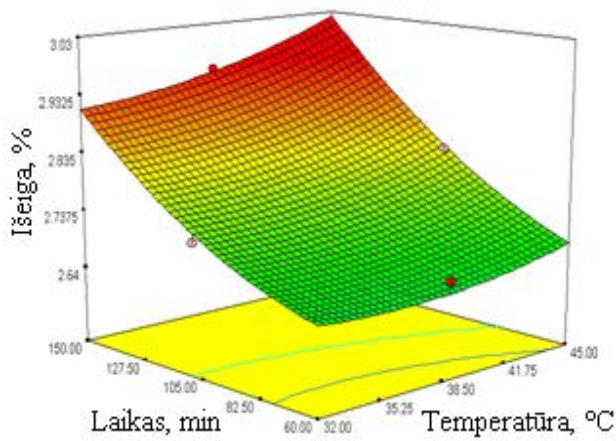
**11 pav.** Prognozuojamų ir faktinių ekstrakcijos išeigų palyginimas aronijų išspaudose

3D grafikai (12 paveikslas) rodo skirtingų parametrų (temperatūros, slėgio, laiko) tarpusavio sąveiką, kuri įtakoja ekstrakto išeigą. Grafikai gauti pasirenkant vieną iš trijų parametrų kaip konstantą, o kiti du – kintantys ir prognozuojantys atsaką. Esant pastoviam ekstrakcijos laikui 149 min. (4A paveikslas), ekstrakcijos temperatūros pakėlimas nuo 32 iki 45 °C ekstrakto išeigą padidino 4 %, o padidintas ekstrakcijos slėgis nuo 15 iki 40 MPa padidino išeigą 17 %. Pastebėta, kad vertinant temperatūros ir slėgio sąveiką, ekstrakcijos išeigai slėgis turėjo didesnę įtaką nei temperatūra. Slėgis bei temperatūra įtakoja tirpiklio tankį: didinant slėgį, tankis ir ekstrahavimo galia didėja, keliant temperatūrą, didėja tirpinamos medžiagos garų slėgis, tačiau mažėja tirpiklio tankis ir lipofilinių medžiagų tirpinimo galia. Panašios priklausomybės buvo gautos esant pastoviam ekstrakcijos slėgiui 40 MPa (4B paveikslas), kuomet ekstrakcijos išeiga padidėjo, didinant proceso trukmę ir temperatūrą. Vertinant šių kitamųjų tarpusavio sąveiką nustatyta, kad ekstrakcijos laikas turėjo didesnę įtaką, nei ekstrakcijos temperatūra. Ekstrakcijos temperatūros pakėlimas nuo 32 iki 45 °C išeigą padidino 4 %, o ekstrakcijos trukmės prailginimas nuo 60 iki 150 min išeigą padidino 11 %. Taigi nustatyta, kad ekstrakcijos laikas ir slėgis buvo reikšmingi parametrai ekstrakto išeigai. Jų tarpusavio sąveika pateikta 4C paveiksle. Akivaizdus abiejų parametrų išeigos reikšmių padidėjimas ekstrakcijos metu leidžia išgauti didžiausią ekstrakto kiekį. Pavyzdžiui, slėgio didinimas nuo 15 iki 40 MPa ekstrakcijos išeigą padidino iki 0,45 % ekstrakto. Panašus išeigos didėjimas buvo pastebėtas, tuo pačiu principu, pasirinkus trumpiausio ir ilgiausio ekstrakcijos laiko intervalą. Svarbu paminėti, kad SKE nebuvo atlikta aukštesnėje nei 50 °C temperatūroje, kad būtų išvengta terminio junginių skilimo (Casas ir kt., 2007).

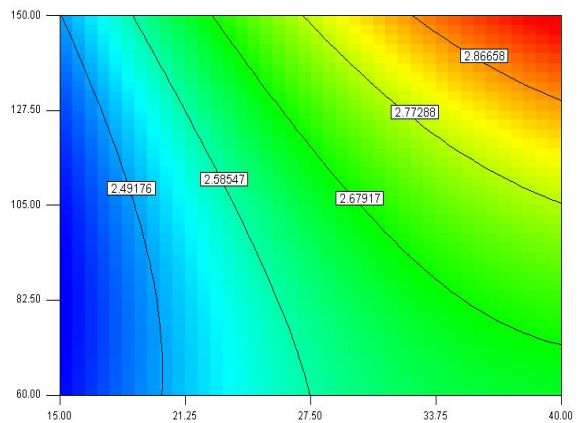
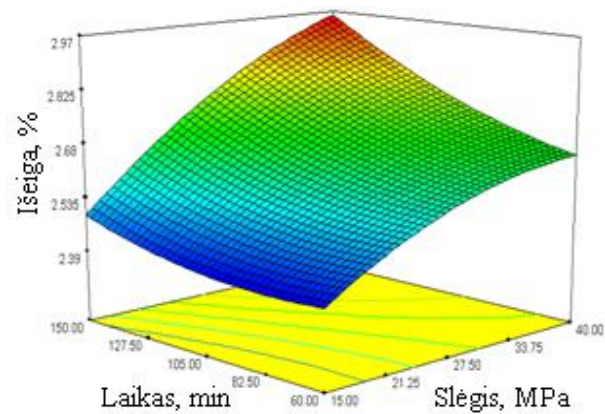
A. Pastovus ekstrakcijos laikas, 149 min  
Temperatūros ir slėgio sąveika



B. Pastovus ekstrakcijos slėgis, 40 MPa  
Temperatūros ir laiko sąveika



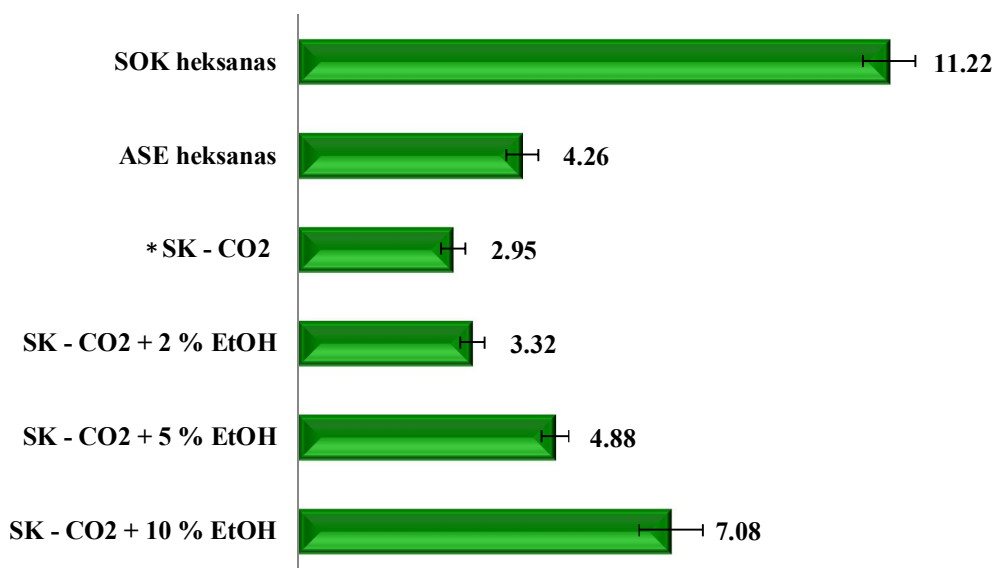
C. Pastovi ekstrakcijos temperatūra, 40 °C  
Slėgio ir laiko sąveika



12 pav. Paviršiaus atsako plotai vaizduojantys parametų (laikas, slėgis ir temperatūra) įtaką SKE – CO<sub>2</sub> išeigai  
(3D paviršiaus plotas - kairė pusė, 2D paviršiaus plotas - dešinė pusė)

Siekiant įvertinti polinio tirpiklio (etanolio) priedo įtaką optimaliomis sąlygomis gautų lipofilinių ekstraktų išeigai, ekstrahavimas buvo atliekamas įterpiant į SK – CO<sub>2</sub> srautą 2 %, 5% ir 10 % etanolio priedo. Didelės etanolio koncentracijos nebuvo naudojamos, kad būtų išvengta CO<sub>2</sub> persotinimo etanoliu ir dviejų fazių susiformavimo (naudojimas didesnės kaip 30 % tirpiklio priedo koncentracijos yra nerekomenduojamas ISCO Inc., Lincoln, NE, JAV). Palyginimui taikytas tradicinis ekstraktų išgavimas heksanu, atliekant ekstrakciją Soksleto aparate bei pagreitintos ekstrakcijos organiniais tirpikliais metodus, ekstrahuojant heksanu.

Skirtingais būdais gautų ekstraktų išeigos pateiktos 13 paveiksle. Etanolio priedas padidina superkritinio skysčio poliškumą bei tirpinimo galią, tačiau sumažina ekstrahavimo selektyvumą.



**13 pav.** Išgaunamo ekstrakto kiekio (g/100 g sausų išspaudų) priklausomybė nuo išgavimo būdo

*SOK heksanas, soksleto ekstrakcijos heksaninis ekstraktas gautas 75 °C temperatūroje; ASE heksanas, pagreitintos ekstrakcijos heksaninis ekstraktas gautas 40 °C temperatūroje; \*SK – CO<sub>2</sub>, superkritinio anglies dvideginio ekstraktas; SK – CO<sub>2</sub> + 2 % EtOH, SK – CO<sub>2</sub> + 5 % EtOH, SK – CO<sub>2</sub> + 10 % EtOH, superkritinio anglies dvideginio ekstraktas su 2 %, 5 % ir 10 % etanolio*

Didinant etanolio priedo koncentraciją, didėjo ir lipofilinių ekstraktų išeiga nuo 3,32 iki 7,08 g/100 g sausų išspaudų. Didžiausia išeiga gauta įterpiant į sistemą 10 % etanolio. Minėtomis sąlygomis ekstrakto kiekis mažesnis, nei taikant tradicinį ekstrahavimą heksanu (Soksleto aparate) aukštoje temperatūroje, kai gauta išeiga buvo 11,22 g ekstrakto iš 100 g išspaudų. Tačiau pagreitintos ekstrakcijos metodu ekstrahuojant heksanu gautas tik 1,5 karto didesnis ekstrakto kiekis, nei SKE – CO<sub>2</sub> optimaliomis sąlygomis be etanolio priedo.

Pašalinus lipofilinę frakciją gauta optimaliomis sąlygomis po SKE - CO<sub>2</sub> likusi žaliava toliau buvo ekstrahuota, taikant daugiapakopės pagreitintos ekstrakcijos metodą skirtingo poliškumo

tirpikliais, acetonu ir etanoliu 70 °C temperatūroje. Didžiausia ekstrakto išeiga 22,7 g/100 g išspaudų gauta ekstrahuojant etanoliu. Šiek tiek mažesnis ekstrakto kiekis 17,9 g/ 100 g išspaudų išekstrahuotas acetonu.

### 3.3. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Ekstraktų, gautų po skirtingų ekstrakcijų antioksidacinis aktyvumas įvertintas naudojant DPPH radikalo ir ABTS katijono radikalo blukinimo metodus, o deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas nustatytas ORAC metodu. Bendras fenolinių junginių kiekis įvertintas *Folin - Ciocalteu* metodu. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo skirtingose modelinėse sistemose įvertinimo rezultatai pateikiami 3.2 lentelėje.

Tiriamųjų ekstraktų antioksidacinė galia labai priklauso nuo fitocheminės jų sudėties – kiekio bei struktūros, ypač polifenolinių junginių iš kurių svarbiausi flavonoidai ir fenolinės rūgštys. BFJK ekstraktuose buvo nuo 30,35 iki 512,39 mg GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto. Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas taikant ekstrakciją etanoliu Soksleto aparate (75 °C temperatūra). Šiek tiek mažesnės vertės gautos pagreitintos ekstrakcijos būdu gautuose ekstraktuose, ekstrakcijai naudojant metanolį (40 °C ir 130 °C temperatūroje) bei šio tirpiklio mišinį arba acetoną ir vandens mišinį (130 °C temperatūroje). Todėl šie ekstraktai galėtų būti geri natūralių antioksidantų šaltiniai.

Antioksidacinio aktyvumo pasiskirstymas ekstraktuose išliko panašus toliau tiriant aronijų išspaudas DPPH<sup>•</sup> ir ABTS<sup>•+</sup> sujungimo bei deguonies radikalo surišimo (ORAC) metodais. ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje aronijų išspaudų antioksidacinis aktyvumas didėjo nuo 0,01 iki 2,52 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakto. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo po SKE – CO<sub>2</sub> pagreitintos ekstrakcijos būdu ir po Soksleto ekstrakcijos gauti etanoliniai ekstraktai. Reikšmingo skirtumo nebuvo ir tarp ekstraktų gautų pagreitintos ekstrakcijos būdu, kai ekstraktai buvo ekstrahuojami metanoliu (130 °C temperatūra) bei acetono ir vandens mišiniu. Įvertinus aronijų išspaudų ekstraktų radikalų surišimo gebą DPPH<sup>•</sup> reagentu nustatyta, kad didžiausiu antiradikalinio aktyvumu kaip ir ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje, pasižymėjo po SKE – CO<sub>2</sub> gautos liekanos ekstraktas toliau ekstrahuotas etanoliu, taikant pagreitintos ekstrakcijos metodą. Taip pat pastebėtas nedidelis skirtumas tarp pagreitintos ekstrakcijos būdu gautų ekstraktų, kurie buvo ekstrahuoti aukštoje ir žemoje temperatūroje metanoliu bei acetono/vandens mišiniu (130 °C temperatūra). Didžiausia deguonies radikalo surišimo geba (ORAC) pasižymėjo ekstraktas gautas ekstrahuojant etanoliu Soksleto aparate. Panaši antiradikalinė geba buvo gauta pagreitintos ekstrakcijos būdu gautų ekstraktų, kurie buvo ekstrahuoti acetono/vandens mišiniu bei vandeniu. Mažiausią antioksidacinį aktyvumą ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, ORAC modelinėse sistemose ir



BFJK turėjo superkritinės ekstrakcijos būdu gauti ekstraktai (be etanolio priedo bei su 2 %, 5 % ir 10 % etanolio priedo).

**3.2 lentelė.** Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Bandiniai	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimo metodai			
	ABTS <sup>++</sup> <sup>a</sup> ± RSD %	DPPH <sup>•</sup> <sup>a</sup> ± RSD %	ORAC <sup>a</sup> ± RSD %	BFJK <sup>b</sup> ± RSD %
1	2	3	4	5
<b>Soksleto ekstrakcija (SOK)</b>				
EtOH 75 °C	2,25 ± 3,93	0,28 ± 1,41	14,44 ± 0,03	512,39 ± 0,01
AC 70 °C	1,04 ± 1,17	0,37 ± 1,18	8,31 ± 0,08	247,89 ± 0,01
<b>Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE – CO<sub>2</sub>)</b>				
*SK – CO <sub>2</sub>	0,011 ± 1,64	0,007 ± 2,51	0,65 ± 2,93	23,90 ± 0,05
SK – CO <sub>2</sub> + 2 % EtOH	0,010 ± 3,11	0,009 ± 2,12	0,93 ± 3,03	25,30 ± 0,05
SK – CO <sub>2</sub> + 5 % EtOH	0,034 ± 2,44	0,011 ± 1,11	1,49 ± 0,41	31,60 ± 0,05
SK – CO <sub>2</sub> + 10 % EtOH	0,058 ± 3,34	0,025 ± 2,01	1,94 ± 0,75	34,30 ± 0,05
<b>Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ASE)</b>				
H <sub>2</sub> O 40 °C	1,71 ± 1,65	0,55 ± 1,51	10,75 ± 0,08	203,92 ± 0,05
H <sub>2</sub> O 130 °C	1,44 ± 3,90	0,50 ± 1,75	6,57 ± 0,08	182,89 ± 0,01
MeOH 40 °C	1,73 ± 1,39	1,00 ± 3,93	8,79 ± 0,08	401,75 ± 0,01
MeOH 130 °C	2,17 ± 1,57	1,29 ± 0,99	9,26 ± 0,11	410,20 ± 0,01
MeOH/H <sub>2</sub> O 130 °C	1,94 ± 1,49	0,24 ± 3,51	9,23 ± 0,04	490,38 ± 0,02
AC/H <sub>2</sub> O 130 °C	2,05 ± 2,00	1,52 ± 1,14	10,89 ± 0,04	453,68 ± 0,01
SK – CO <sub>2</sub> AC 70 °C	0,91 ± 0,05	0,24 ± 2,56	3,84 ± 0,11	35,35 ± 0,01
SK – CO <sub>2</sub> EtOH 70 °C	2,52 ± 0,05	1,99 ± 1,11	3,03 ± 0,17	89,41 ± 0,01
<b>Ekstrakcija vandens garais (EVG)</b>				
DE	1,84 ± 0,05	0,94 ± 1,02	7,63 ± 0,03	51,27 ± 0,01

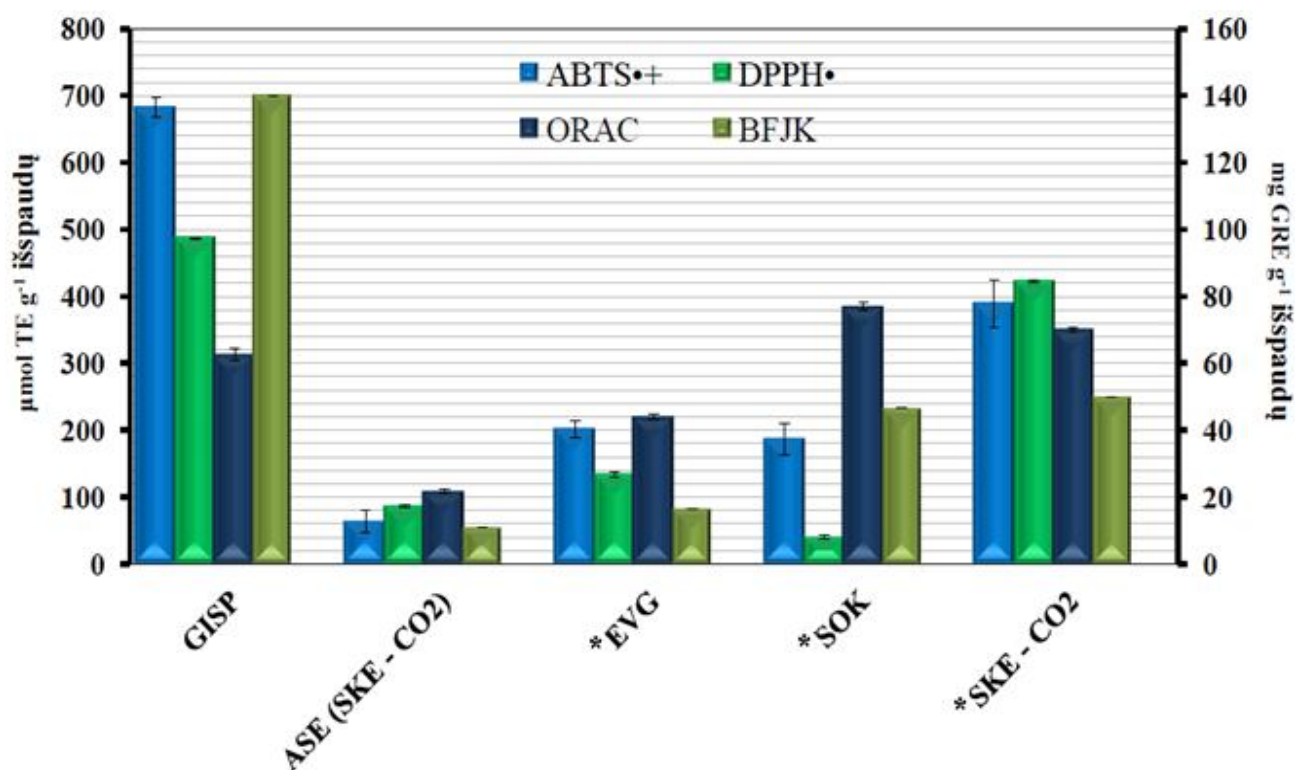
<sup>a</sup> – mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakto; <sup>b</sup> – mg GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto; <sup>a, b</sup> - vidutinės šešių pakartojimų vertės ± RSD %  
SOK EtOH 75 °C, SOK AC 75 °C, soksleto ekstrakcijos etanolinis ir acetoinis ekstraktai gauti 75 °C temperatūroje; \*SK – CO<sub>2</sub>, superkritinio anglies dvideginio ekstraktas; SK – CO<sub>2</sub> + 2 % EtOH, SK – CO<sub>2</sub> + 5 % EtOH, SK – CO<sub>2</sub> + 10 % EtOH, superkritinio anglies dvideginio ekstraktas su 2 %, 5 % ir 10 % etanolio; ASE H<sub>2</sub>O 40 °C, ASE H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 40 °C ir 130 °C temperatūroje; ASE MeOH 40 °C, ASE MeOH 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos metanolinis ekstraktas gautas 40 °C ir 130 °C temperatūroje; ASE MeOH/H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos metanolio ir vandens mišinio (80:20) ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje; ASE AC/H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos acetono ir vandens mišinio (80:20) ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje; SK – CO<sub>2</sub> AC 70 °C, SK – CO<sub>2</sub> EtOH 70 °C, po superkritinio anglies dvideginio taikytos pagreitinotos ekstrakcijos acetoinis ir etanolinis ekstraktas gautas 70 °C temperatūroje; DE, dezodoruotas ekstraktas

Taigi, remiantis gautais rezultatais matyti, kad poliniais tirpikliais išgautų ekstraktų antioksidacinė galia buvo didesnė. Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo SKE – CO<sub>2</sub> būdu gauti ekstraktai. Etanolio priedas padidina tirpiklio poliškumą ir tokiu būdu mišinyje geriau tirpsta poliniai antioksidaciniu aktyvumu pasižymintys junginiai. Tačiau šiuo atveju, etanolio koncentracijos padidėjimas SKE – CO<sub>2</sub> sraute neturėjo reikšmingos įtakos antioksidaciniam gautų ekstraktų aktyvumui.

Kai kurie antioksidaciniu aktyvumu pasižymintys junginiai gali būti sujungti stipriais ryšiais su kitais augalo matricoje esančiais junginiais. Šie junginiai, naudojant tradicines aktyvių junginių ekstrahavimo procedūras, neišiekstrahuoja su organiniais tirpikliais ar vandeniu. Todėl prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstraktų gautų išspaudų antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas įvairiais antioksidacinio aktyvumo metodais (ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, ORAC, BFJK) pritaikius QUENCHER procedūrą, kuri pagrįsta oksidacijos – redukcijos reakcija kietos ir skystos fazių paviršiuje. Kietosios frakcijos prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstraktų gautų antioksidacinis aktyvumas pateiktas 14 paveiksle.

Įvertinus QUENCHER metodu prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstrakcijos metodų gautų liekanų antioksidacinį aktyvumą nustatyta, kad po ekstrakcijos išspaudose lieka nemažas kiekis aktyvių junginių. Priklausomai nuo kietajai frakcijai naudoto ekstrakcijos būdo ir tirpiklio, bendras fenolinių junginių kiekis svyravo nuo 16,54 iki 50,09 GRE mg g<sup>-1</sup> sausų išspaudų, antioksidacinis aktyvumas ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje svyravo nuo 63,65 – 389,57 μmol g<sup>-1</sup>, DPPH<sup>•</sup> modelinėje sistemoje – 40,44 iki 422,04 μmol g<sup>-1</sup> sausų išspaudų. Pastebėta, kad ORAC modelinėje sistemoje aktyvių junginių kiekis išlieka panašus, kaip ir prieš ekstrakciją ar net didesnis. Išspaudų deguonies radikalo surišimo geba (ORAC) buvo 109,13 – 384,34 μmol g<sup>-1</sup> išspaudų.

Bendras fenolinių junginių kiekis prieš ekstrakciją išspaudose buvo 139,98 mg GRE g<sup>-1</sup> sausų išspaudų. ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje išspaudų antioksidacinis aktyvumas buvo 682,10 μmol g<sup>-1</sup>, o DPPH<sup>•</sup> modelinėje sistemoje – 486,80 μmol g<sup>-1</sup> sausų išspaudų. Mokslinėje literatūroje randama duomenų, jog BFJK išspaudose buvo 31 – 63 mg g<sup>-1</sup> SM (Mayer-Miebach ir kt. 2012) ir 105,83 mg g<sup>-1</sup> sausų išspaudų (Oszmiański ir kt., 2005). Oszmiański ir kt. (2005) ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje nurodo 7,79 μmol g<sup>-1</sup> SM, o DPPH<sup>•</sup> – 3,01 μmol g<sup>-1</sup> SM. Mayer - Miebach ir kt. (2012) nurodo, kad antioksidacinis aktyvumas ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje 240 - 600 μmol g<sup>-1</sup> SM. Svarbu paminėti, kad skirtingi tyrimų rezultatai gali priklausyti nuo tokių veiksnių, kaip genetiniai skirtumai, aplinkos sąlygos, derliaus nuėmimo laikas, tokiu būdu įtakodami antrinių metabolitų kiekį. Įtakos taip pat gali turėti mėginio paruošimas antioksidacinio aktyvumo įvertinimui, ekstrakcijos būdas, sąlygos ir parinkti tirpikliai (Kraujalytė ir kt., 2015).



**14 pav.** Kietos frakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas skirtingose (BFJK, ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, ORAC) modelinėse sistemose

*GISP, grynos išspaudos; ASE (SKE – CO<sub>2</sub>), po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu pagreitintos ekstrakcijos būdu gautos išspaudos; \*EVG, išspaudos po ekstrakcijos vandens garais; \*SOK, išspaudos po soksleto ekstrakcijos; \*SKE – CO<sub>2</sub>, išspaudos po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu*

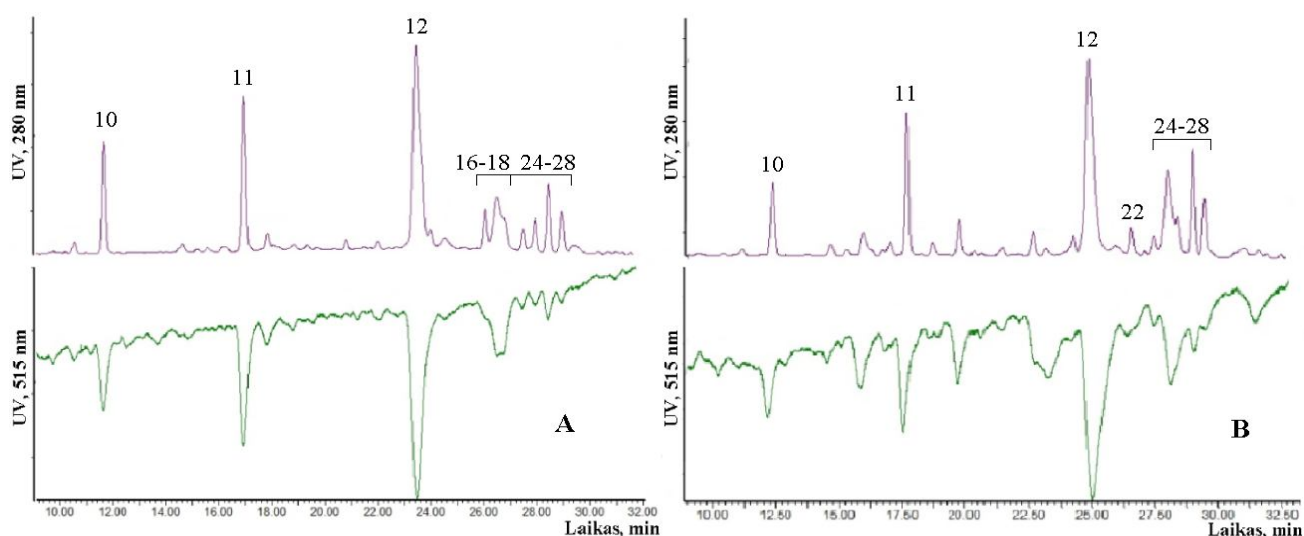
Taigi, iš pateiktų duomenų matyti, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo išspaudos po SK – CO<sub>2</sub> ekstrakcijos, kurios metu buvo pašalinta lipofilinė frakcija. Daugiapakopės pagreitintos ekstrakcijos taikymas po SKE – CO<sub>2</sub> likusiai kietajai frakcijai žymiai sumažino antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių kiekį išspaudose. Tačiau ir po šio ekstrakcijos etapo išspaudose liko nemažai antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių. Tikriausiai todėl, kad dalis antioksidantų yra stipriai surišti augalinėje matricoje ir yra netirpūs.

### 3.4. Cheminis aronijų išspaudų ekstraktų sudėties tyrimas chromatografiniais metodais

Aronijų išspaudų ekstraktai buvo tirti efektyviosios skysčių chromatografijos sistema naudojant UV ir MS detektorius bei pokolonėlinį DPPH radikalų sujungimo metodą. Tirtuose ekstraktuose esantys fenoliniai junginiai buvo nustatyti UESCh-MS metodu, lyginant gautų junginių molekulinės mases, tiksliai jų formules, sulaikymo laikus bei UV spektro duomenis su standartinių junginių spektriniais duomenimis. Junginių, kurių nepavyko identifikuoti pagal tyrimui naudotus standartus,

papildomai buvo atliktas MS/MS fragmentavimas, šie junginiai buvo identifikuoti preliminariai lyginant gautus MS/MS fragmentus su komercinės duomenų bazės (ChemSpider, MetFusion) duomenimis ir literatūroje aprašytomis spektrinėmis charakteristikomis. MS analizei buvo pasirinktas neigiamas jonizacijos režimas, nes šiame jonizacijos režime geriau jonizuojasi flavonoidai ir fenolinės rūgštys. Iš viso ekstraktuose aptikti 28 junginiai, daugiausia kvercetino ir chlorogeno rūgšties dariniai.

Chromatografiškai išskirstytų junginių geba sujungti radikalus buvo vertinama pritaikius ESCh-DPPH<sup>•</sup> metodą. Neigiamos smailės apatinėje chromatogramos dalyje, atitinka smailės viršutinėje chromatogramos dalyje, kurios parodo, kad junginys sujungia DPPH<sup>•</sup> ir tokiu būdu pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. 15 paveiksle pateiktos ESCh-DPPH chromatogramos: (15 pav. A) pateikta pagreitinotos ekstrakcijos būdu gauto vandeninio ekstrakto (ASE H<sub>2</sub>O 40 °C) chromatograma, ir (15 pav. B) pateikta pagreitinotos ekstrakcijos būdu gauto acetoninio ekstrakto (SK – CO<sub>2</sub> AC 70 °C) chromatograma, po lipofilinės frakcijos pašalinimo SKE - CO<sub>2</sub> metodu.

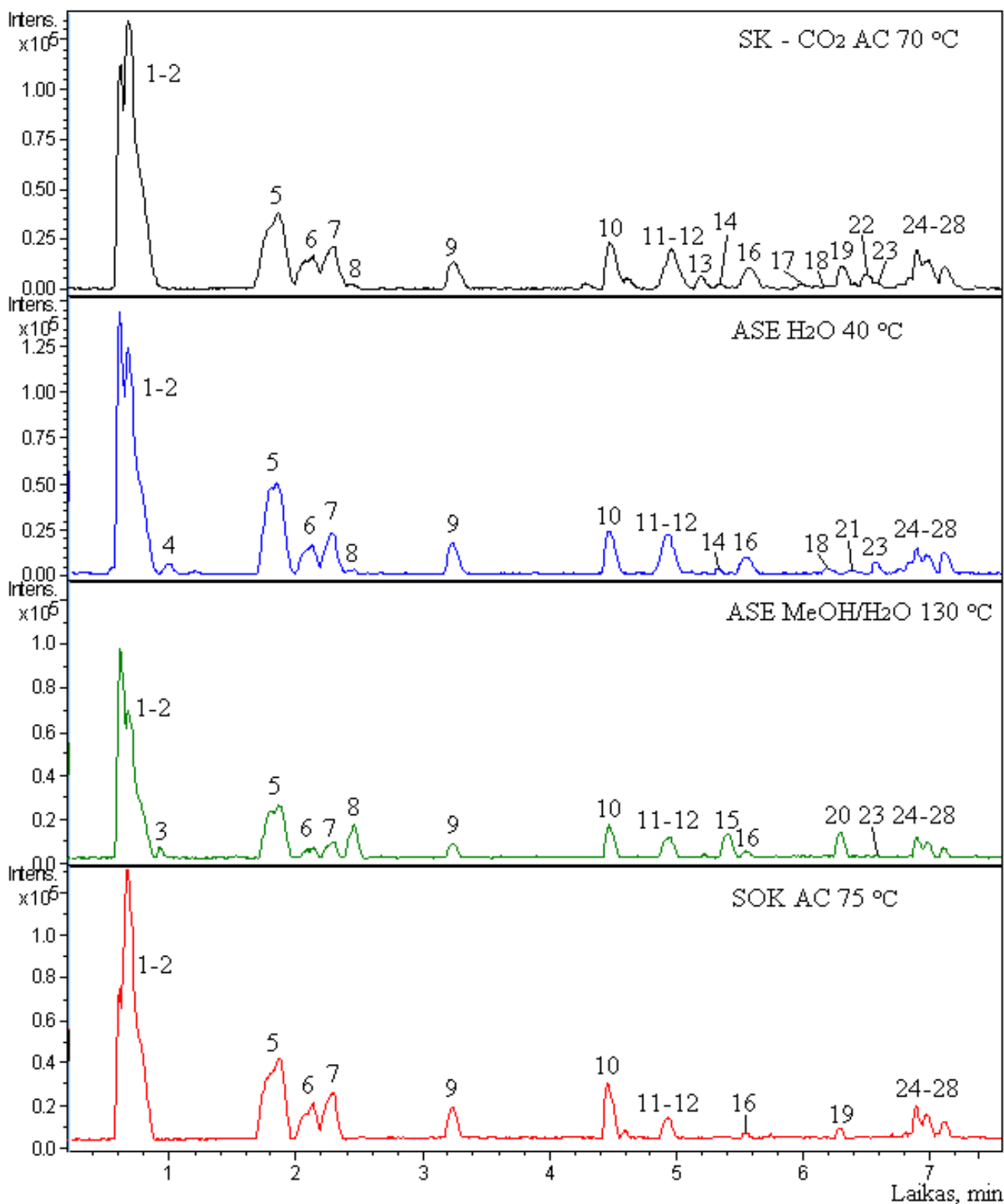


**15 pav.** A (ASE H<sub>2</sub>O 40 °C) ir B (SK - CO<sub>2</sub> AC 70 °C) ekstraktų ESCh-DPPH<sup>•</sup> chromatogramos  
*ASE H<sub>2</sub>O 40 °C, pagreitinotos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 40 °C temperatūroje; SK – CO<sub>2</sub> AC 70 °C, po superkritinio anglies dvideginio taikytos pagreitinotos ekstrakcijos acetoninis ekstraktas gautas 70 °C temperatūroje*

Pagal gautus rezultatus, matyti kad ekstraktuose yra nemažai radikalų surišimo geba pasižyminčių junginių. Nustatyta, kad didžiausia radikalų sujungimo geba, pasižymėjo **(12)** junginys (ST = 23,2 min.), UESCh-MS metodu šis junginys buvo identifikuotas kaip liuteolino darinys. Dideliu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo **(10)** (ST = 10,5 min.) ir **(11)** (ST = 16,1 min.) junginiai, kurie vėliau buvo identifikuoti kaip 3-kafeoilchino ir 5-kafeoilchino rūgštys. Junginiai **(16) – (18)** ir **(24) – (28)** remiantis UESCh-MS ir gautais UV spektro duomenimis buvo identifikuoti kaip kvercetino ir liuteolino dariniai, kuriuos šiuo metodu buvo sudėtinga atskirti vieną nuo kito, tačiau pagal gautas

DPPH pokolonėlinio metodo chromatogramas akivaizdu, kad šie junginiai taip pat pasižymėjo radikalų sujungimo geba. Nedidele radikalų surišimo geba pasižymėjo **(22)** (ST = 25,9 min) junginys, kurio molekulinis jonas atitiko  $C_{23}H_{19}O_{10}$  molekulinę formulę, tačiau šis junginys nebuvo identifikuotas. ESCh-DPPH pokolonėliniu metodu atskirų ekstrakto sudedamųjų dalių identifikuoti negalima, bet tokie preliminarūs rezultatai suteikia informacijos, kuria remiantis būtų galima atlikti tolesnę ekstraktų analizę.

Ekstraktuose esančių junginių identifikavimas buvo atliktas UESCh-MS/MS metodu. Šiuo analizės metodu buvo identifikuota 13 junginių (3.3 lentelė). UESCh-MS/MS chromatogramos pateiktos 16 paveiksle. Junginio **(1)** molekulinis jonas  $[M-H]^-$   $m/z$  181,0720 atitiko  $C_6H_{13}O_6$  molekulinę formulę. Šis junginys remiantis ChemSpider duomenų baze buvo identifikuotas kaip sorbitolis (kurio struktūra vėliau buvo patvirtinta ir pagal komercinį standartą). Junginio **(2)** molekuliniam jonui  $[M-H]^-$   $m/z$  191,0564 buvo priskirta  $C_7H_{11}O_6$  molekulinė formulė ir šis junginys buvo identifikuotas kaip chino rūgštis. Neidentifikuoto junginio **(3)** molekulinis jonas  $[M-H]^-$   $m/z$  239,0773 atitiko molekulinę formulę  $C_8H_{15}O_8$ . Junginys **(4)** turintis  $[M-H]^-$   $m/z$  191,0199 molekulinį joną atitiko  $C_6H_7O_7$  molekulinę formulę, todėl galima teigti, kad tokios spektrinės charakteristikos būdingos citrinų rūgščiai. Junginiai **(5)** ir **(7)** turėjo tą patį molekulinį joną  $[M-H]^-$   $m/z$  309,1192, kuriam priskirta  $C_{12}H_{21}O_9$  molekulinė formulė. Junginys **(5)** remiantis ChemSpider duomenų baze identifikuotas kaip dideoksisacharozė, o junginys **(7)** nebuvo identifikuotas. Junginiai **(8)** ir **(15)** turėjo vienodą molekulinį joną  $[M-H]^-$   $m/z$  153,0194, kuriam priskiriama  $C_{12}H_{21}O_9$  molekulinė formulė. Junginys **(8)** ir **(15)** nebuvo identifikuoti. Junginiai **(9)**, **(10)** ir **(11)** buvo preliminariai identifikuoti kaip chlorogeno rūgšties dariniai. Chlorogeno rūgštis buvo identifikuota pagal standartą, o 1- ir 5-O-kafeoilchino rūgštys buvo identifikuotos lyginant MS/MS fragmentus ir sulaikymo trukmę su literatūroje pateiktais duomenimis (Baranauskiene ir kt., 2014), (Clifford ir kt., 2005). Šie junginiai turėjo vienodą molekulinį joną  $[M-H]^-$   $m/z$  353, kuris atitiko molekulinę formulę  $C_{16}H_{17}O_9$ . Junginio **(9)** MS/MS fragmentacijos metu gauti du molekuliniai jonai  $m/z$  191,1 ir 179,3, kurie atitiko molekulinės formules  $C_7H_{11}O_6$ ;  $C_9H_7O_4$ . Junginį **(10)** analizuojant MS/MS režimu gauti trys fragmentai  $m/z$  191,0559; 179,0346 ir 135,0442 kurie atitiko molekulinės formules  $C_7H_{11}O_6$ ;  $C_9H_7O_4$  ir  $C_8H_7O_2$ , o junginys **(11)** turėjo molekulinis jonus  $m/z$  191,0562; 179,0350 ir 135,0450, kurie atitiko  $C_7H_{11}O_6$ ;  $C_9H_7O_4$  ir  $C_8H_7O_2$  molekulinės formules. Junginio **(12)** molekulinis jonas  $[M-H]^-$   $m/z$  447,0933 atitiko molekulinę formulę  $C_{21}H_{19}O_{11}$ , o MS/MS fragmentavimo metu gautas  $m/z$  285,0392 molekulinis jonas, atitiko  $C_{15}H_9O_6$  molekulinę formulę. Skirtumas tarp šių fragmentų buvo 162 amv, todėl remiantis literatūros duomenimis (Baranauskiene ir kt., 2014), ši liekana atitiko heksozės molekulinę masę.



**16 pav.** Aronijų išspaudų ekstraktų UESCh-MS chromatogramos

*SK – CO<sub>2</sub> AC 70 °C, po superkritinio anglies dvideginio taikytos pagreitinotos ekstrakcijos acetoninis ekstraktas gautas 70 °C temperatūroje; ASE H<sub>2</sub>O 40 °C, pagreitinotos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 40 °C temperatūroje; ASE MeOH/H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos metanolio ir vandens mišinio (8:2) ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje; SOK AC 75 °C, sokleto ekstrakcijos acetoninis ekstraktas gautas 75 °C temperatūroje*

Todėl **(12)** junginys preliminariai identifikuotas, kaip liuteolin-*O*-heksozė. Junginio **(16)** molekulinio jono [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 417,0828, kuris atitiko C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>O<sub>10</sub> molekulinę formulę, MS/MS režimu buvo gautas *m/z* 285,0388 fragmentas, kuris atitiko C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub> molekulinę formulę. Šis junginys preliminariai buvo identifikuotas kaip liuteolino darinys. Junginio **(18)** molekulinis jonas [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 625,1402 atitiko molekulinę formulę C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>O<sub>17</sub>, MS/MS fragmentacijos būdu buvo gautas *m/z* 301,0345 molekulinis fragmentas, kuris atitiko C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub> molekulinę formulę. Todėl remiantis literatūros duomenimis (Kylli, 2011), junginys **(18)** identifikuotas kaip kvercetino diheksozidas. Junginio **(19)** molekulinis jonas [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 485,1090 atitiko C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>O<sub>11</sub> molekulinę formulę, o junginio **(22)** molekulinis jonas [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 455,0984 atitiko C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>O<sub>10</sub> molekulinę formulę. MS/MS fragmentacijos metu abu šie junginiai turėjo vienodą molekulinį fragmentą [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 323,0544 atitinkantį C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub> molekulinę formulę. Tačiau junginių **(19)** ir **(22)** nepavyko identifikuoti. Junginio **(23)** molekulinis jonas [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 595,1206 atitiko molekulinę formulę C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>O<sub>16</sub>, o MS/MS fragmentacijos metu gauti trys molekuliniai fragmentai *m/z* 455,0974; 323,0555 ir 301,0344, kurie atitiko C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>O<sub>10</sub>; C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub> ir C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub> molekulinės formules.

**3.3 lentelė.** Fenolinių junginių charakteristikos aronijų išspaudų ekstraktuose gautos UESCh-MS/MS metodu

Smailės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] <sup>-</sup>	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] <sup>-</sup> , <i>m/z</i>	MS fragmentai
1	2	3	4	5	6
(1)	Sorbitolis <sup>a,c</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	0,71	181,0720	-
(2)	Chino rūgštis <sup>c</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	0,73	191,0564	-
(3)	Nežinomas junginys	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	0,92	239,0773	-
(4)	Citrinų rūgštis <sup>c</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	0,94	191,0199	-
(5)	Dideoksisacharozė <sup>c</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	1,81	309,1192	-
(6)	Nežinomas junginys	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	2,01	337,1138	-
(7)	Nežinomas junginys	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	2,20	309,1192	-
(8)	Nežinomas junginys	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	2,40	153,0194	-
(9)	1-kafeoilchino rūgštis <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	3,20	353,0875	191,1; 179,3
(10)	3-kafeoilchino rūgštis <sup>a,b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	4,41	353,0877	191,0559; 179,0346; 135,0442
(11)	5-kafeoilchino rūgštis <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	4,91	353,0877	191,0562; 179,0350; 135,0450
(12)	Liuteolin- <i>O</i> -heksozė <sup>c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	5,01	447,0933	285,0392
(13)	Nežinomas junginys	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>	5,13	495,1058	-

3.3 lentelės tęsinys kitame puslapyje

### 3.3 lentelės tęsinys

1	2	3	4	5	6
(14)	Nežinomas junginys	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>	5,30	457,1923	-
(15)	Nežinomas junginys	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	5,40	153,0194	-
(16)	Liuteolino darinys <sup>c</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub>	5,50	417,0828	285,0388
(17)	Nežinomas junginys	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	6,02	465,1036	-
(18)	Kvercetino diheksozidas <sup>b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>17</sub>	6,23	625,1402	301,0345
(19)	Nežinomas junginys	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	6,31	485,1090	323,0541
(20)	Nežinomas junginys	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	6,34	167,0349	-
(21)	Nežinomas junginys	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub>	6,42	461,1664	-
(22)	Nežinomas junginys	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	6,55	455,0984	323,0544
(23)	Nežinomas junginys	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	6,62	595,1206	455,0974; 323,0555; 301,0344
(24)	Rutinas <sup>a</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	6,70	609,1455	-
(25)	Nežinomas junginys	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	6,82	609,1455	-
(26)	Hiperozidas <sup>a</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	6,93	463,0880	-
(27)	Nežinomas junginys	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	7,04	463,0880	301,0345
(28)	Eriodiktolio gliukuronidas <sup>b,c</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	7,16	463,0880	287,0562

<sup>a</sup> identifiukuota naudojant standartą

<sup>b</sup> identifiukuota naudojant literatūros duomenis

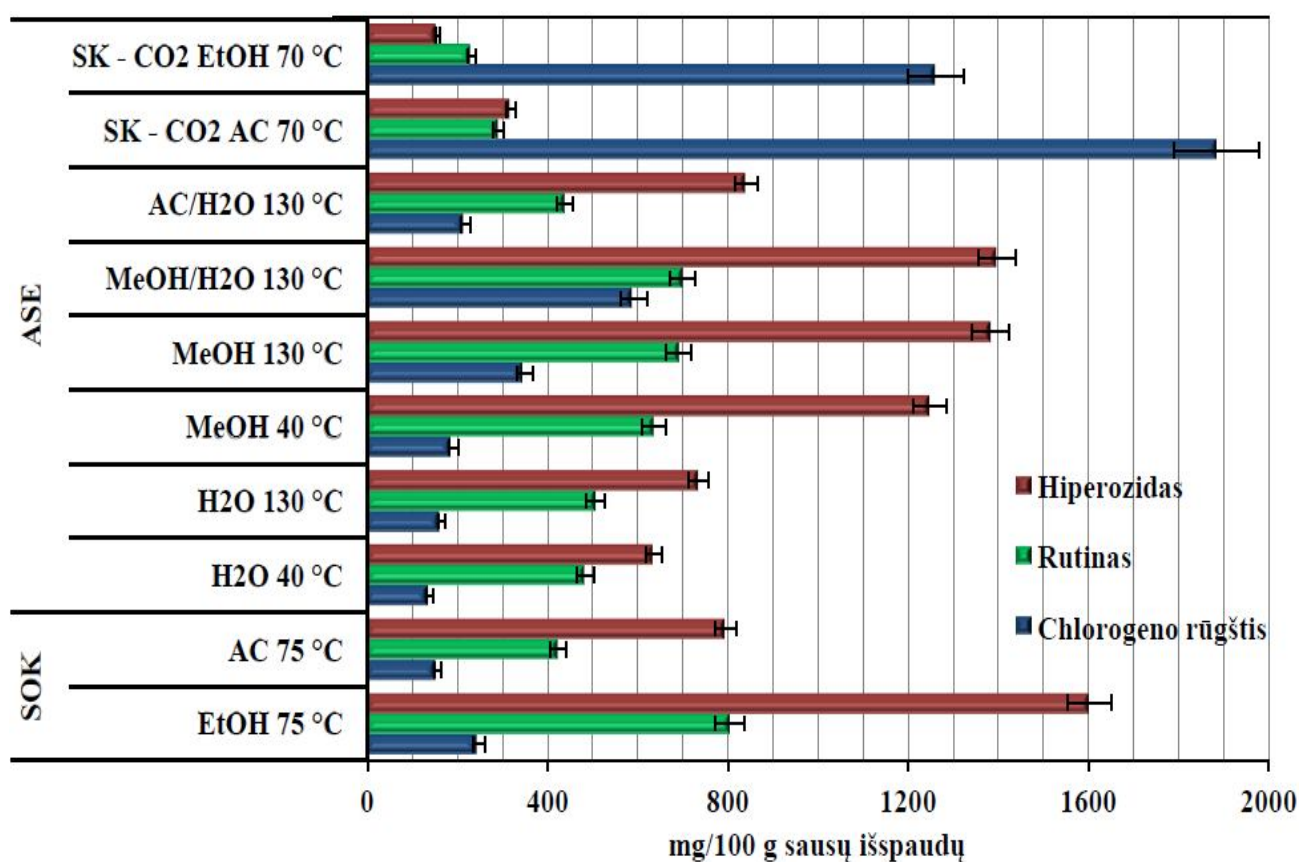
<sup>c</sup> identifiukuota remiantis duomenimis esančiais duomenų bazėje (ChemSpider, MetFusion)

Junginiai (24) ir (25) turėjo vienodą molekulinį joną [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  609,1455 priskiriamą molekulinei formulei C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>O<sub>16</sub>. Junginys (24) identifiukuotas kaip rutinas, jo identifikavimas patvirtintas atlikus palyginimą su komerciniu rutino standartu, o junginys (25) nebuvo identifiukuotas. Junginiai (26), (27) ir (28) turėjo vienodą molekulinį joną [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  463,0880, kuris atitiko molekulinę formulę C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub>. Junginys (26) buvo identifiukuotas kaip hiperozidas atlikus palyginamąją analizę su komerciniu hiperozido standartu. MS/MS režimu analizuojant junginį (27) gautas molekulinis jonas  $m/z$  301,0345, skirtumas tarp fragmentų buvo 162 amv. Literatūros duomenimis (Baranauskiene ir kt., 2014), šis skirtumas atitiko glikozido liekanos molekulinę masę. Tačiau tokios informacijos nepakanka siekiant pilnai išaiškinti esamą junginio struktūrą. MS/MS režimu junginio (28) gautas molekulinis jonas  $m/z$  287,0562 atitiko C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub> molekulinę formulę, o skirtumas tarp fragmentų 176 amv patvirtino gliukuronido liekaną. Todėl remiantis ChemSpider duomenų baze ir literatūros duomenimis (Kylli, 2011) šis junginys buvo identifiukuotas kaip eriodiktolio gliukuronidas. Junginys (6), kurio molekulinis jonas [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  337,1138 atitiko



$C_{13}H_{21}O_{10}$  molekulinę formulę bei junginys (**20**), kurio molekuliniam jonui  $[M-H]^-$   $m/z$  167,0349 priskirta  $C_8H_7O_4$  molekulinė formulė, nebuvo identifikuoti. Junginių (**13**), (**14**), (**17**) ir (**21**) identifikuoti nepavyko, kadangi buvo sudėtinga gauti šių junginių MS/MS fragmentus, dėl per mažos jų koncentracijos ekstraktuose, todėl tolimesniame etape jų neįmanoma palyginti nei su literatūros, nei su duomenų bazių duomenimis, kaip pvz., ChemSpider ar MetFusion.

Pagal standartų sulaikymo trukmes, UV bei MS spektrų duomenis tirtuose ekstraktuose buvo identifikuoti 3 antioksidaciniu aktyvumu pasižymintys junginiai: chlorogeno rūgštis, rutinas ir hiperozidas. Iš gautų kiekybinės analizės rezultatų (17 pav.) matyti, jog fenolinių junginių kiekis ekstraktuose priklauso nuo ekstrakcijai naudoto tirpiklio poliškumo.



17 pav. Fenolinių junginių kiekis aronijų išspaudų ekstraktuose (mg/100 g SM)

SOK EtOH 75 °C, SOK AC 75 °C, soksleto ekstrakcijos etanolinis ir acetoninis ekstraktai gauti 75 °C temperatūroje; ASE H<sub>2</sub>O 40 °C, ASE H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 40 °C ir 130 °C temperatūroje; ASE MeOH 40 °C, ASE MeOH 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos metanolinis ekstraktas gautas 40 °C ir 130 °C temperatūroje; ASE MeOH/H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos metanolio ir vandens mišinio (8:2) ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje; ASE AC/H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitinotos ekstrakcijos acetono ir vandens mišinio (8:2) ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje; SK - CO<sub>2</sub> AC 70 °C, SK - CO<sub>2</sub> EtOH 70 °C, po superkritinio anglies dvideginio taikytos pagreitinotos ekstrakcijos acetoninis ir etanolinis ekstraktas gautas 70 °C temperatūroje

Hiperozido kiekis tirtuose aronijų išspaudų ekstraktuose buvo 154 - 1601 mg/100 g SM. Chlorogeno rūgšties kiekis ekstraktuose buvo 139 - 1884 mg/100 g SM. Rutino koncentracija ekstraktuose buvo 230 - 803 mg/100 g SM. Pagrindinis junginys visuose ekstraktuose buvo hiperozidas, išskyrus po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos taikant pagreitintos ekstrakcijos acetonu ir etanoliu metodą gautuose ekstraktuose, kuriuose didžiausias kiekis buvo chlorogeno rūgšties. Taip pat šiuose ekstraktuose buvo mažiausia koncentracija rutino ir hiperozido. Ekstrahuojant etanoliu Soksleto aparate gautas didžiausias rutino ir hiperozido kiekis.

Oszmiański ir kt., (2005) tyrinėjo aronijų išspaudų metanolinį ekstraktą ir nustatė, kad šiame ekstrakte didžiausia koncentracija buvo chlorogeno rūgšties 204,35 mg/100 g SM ir hiperozido 47,44 mg/100 g SM. Lyginant literatūroje pateiktus rezultatus su šio darbo rezultatais matyti, kad Oszmiański ir kt., (2005) gautas 1,5 kartus mažesnis chlorogeno rūgšties kiekis, nei šiame darbe nustatyti chlorogeno rūgšties kiekiai esantys metanoliniuose ekstraktuose. Sójka ir kt. (2013) ekstrahuojant skirtingas aronijų išspaudų frakcijas metanolio/vandens mišiniu nustatė, jog hiperozido koncentracija buvo 28,1 – 62,5 mg/100 g SM, o chlorogeno rūgšties kiekis buvo 3,2 – 84,5 mg/100 g SM. Šių autorių rezultatai labai skyrėsi nuo šiame darbe gautų rezultatų. Tokius kiekybinius skirtumus galėjo įtakoti skirtingi fenolinių junginių išgavimo būdai, ekstrakcijos sąlygos, taip pat įtakos gali turėti ir augalo auginimo vieta.

### 3.5. Sorbitolio ir sacharozės nustatymas

Sacharidų sudėties kitimai buvo stebimi skirtingais ekstrakcijos metodais ir sąlygomis gautuose vandeniniuose ekstraktuose: ASE H<sub>2</sub>O 40 °C, ASE H<sub>2</sub>O 130 °C ir DE. Juodųjų aronijų išspaudų ekstraktuose buvo identifikuoti du junginiai: sacharozė ir sorbitolis (3.4 lentelė).

**3.4 lentelė.** Identifikuotų junginių pasiskirstymas skirtinguose ekstraktuose

<b>Junginys (mg/100 g SM)<sup>a</sup></b>	<b>ASE H<sub>2</sub>O 40 °C ± RSD %</b>	<b>ASE H<sub>2</sub>O 130 °C ± RSD %</b>	<b>DE ± RSD %</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Sacharozė	3,75 ± 4,31	4,55 ± 4,95	9,52 ± 3,15
Sorbitolis	3645,38 ± 3,24	5309,48 ± 4,24	4741,24 ± 5,43

<sup>a</sup> vidutinės trijų pakartojimų vertės ± RSD %

ASE H<sub>2</sub>O 40 °C, pagreitintos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 40 °C temperatūroje; ASE H<sub>2</sub>O 130 °C, pagreitintos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas 130 °C temperatūroje; DE, dezodoruotas ekstraktas

Nustatyta, kad tirtuose ekstraktuose didžiausia koncentracija buvo sorbitolio. Šio junginio koncentracija svyravo nuo 3645,38 – 5309,48 mg/100 g sausos masės. Didžiausia sorbitolio

koncentracija buvo nustatyta taikant pagreitinotą ekstrakcijos vandeniu 130 °C temperatūroje metodą, kiek mažesnė – ekstrakcijos vandens garais metu, o mažiausia – atliekant pagreintą ekstrakciją vandeniu žemoje temperatūroje. Didžiausia sacharozės koncentracija buvo nustatyta dezodoruotame ekstrakte, gautame ekstrakcijos vandens garais metu, o mažiausia – pagreitinotą ekstrakcijos vandeniu metu 40 °C temperatūroje.

Literatūroje skirtingi autoriai pateikia skirtingus duomenis apie aronijų išspaudose esančių cukrų kieki. Pavyzdžiui, Sójka ir kt. (2013) literatūroje pateiktais duomenimis skirtingose aronijų išspaudų frakcijose sorbitolio koncentracija buvo 1060 – 2320 mg/100 g SM, o sacharozės - 30 – 430 mg/100 g SM. Taip pat remiantis šio autoriaus rezultatais buvo aptikta gliukozės (390 – 800 mg/100 g SM) ir fruktozės (480 – 580 mg/100 g SM) (Sójka ir kt., 2013). Mayer – Miebach ir kt. (2012) tirtose aronijų išspaudose sorbitolio kiekis buvo 3760 mg/100 g SM, gliukozės koncentracija buvo 2280 mg/100 g SM, o fruktozės kiekis buvo 2360 mg/100 g SM. Šio darbo metu gliukozės ir fruktozės kiekybiškai įvertinti nepavyko dėl per mažos aronijų išspaudų ekstraktuose buvusios šių junginių koncentracijos.

### 3.6. Antocianų kokybinė ir kiekybinė analizė

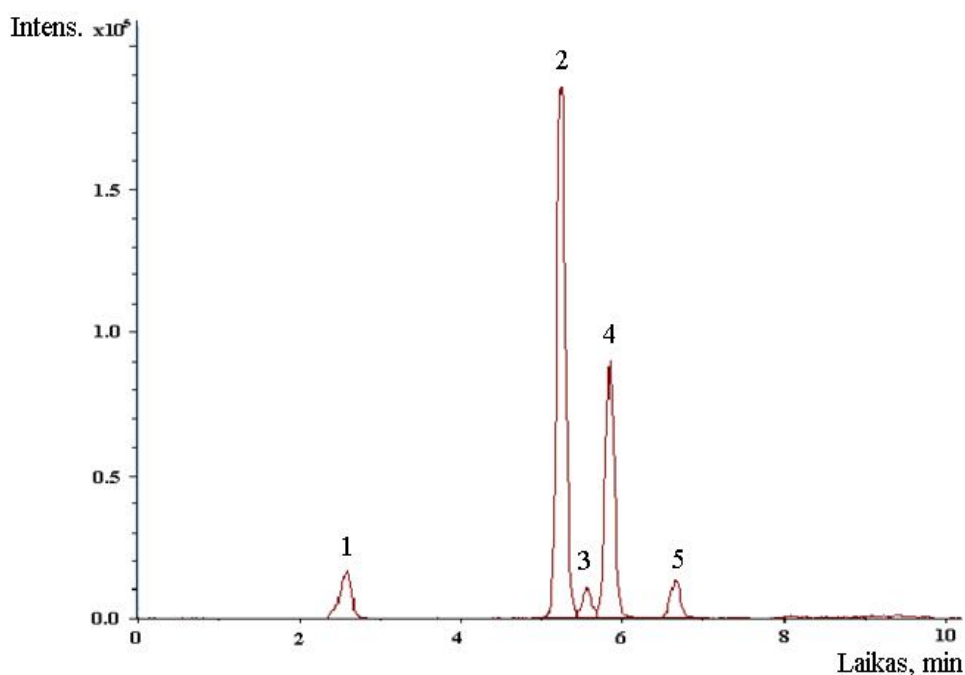
Antocianų kiekybiniam nustatymui išspaudų ekstraktuose buvo naudotas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos su kvadrupoliniu - skriejimo laiko masių detektoriumi metodas (UESCh-Q-TOF). UESCh metodu išskirti ekstraktų junginiai buvo identifikuoti pagal tikslias jų mases, molekulinės formules, UV spektro duomenis bei MS/MS režimu gautų junginių fragmentus, lyginant juos su literatūros duomenimis ir komercinėmis duomenų bazėmis. Pritaikius SmartFormula programinę įrangą buvo apskaičiuotos visos galimos formulės, kurių sudėtyje yra C, H ir O. Šie aprašyti parametrai suteikia svarbią informaciją, reikalingą gautų smailių analizei atlikti (3.5 lentelė ir 18 pav.). Nustatytas, cianidinas ir keturių skirtingų cianidino glikozidų mišinys: cianidin-3-galaktozido, cianidin-3-gliukozido, cianidin-3-arabinozido ir cianidin-3-ksilozido. Svarbu paminėti, kad remiantis kitų autorių rezultatais cianidinas iki šiol nebuvo identifikuotas.

**3.5 lentelė.** Identifikuotų junginių spektrinės charakteristikos

Smailės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] <sup>-</sup>	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] <sup>-</sup> m/z	mg/100 g SM <sup>a</sup>
1	2	3	4	5	6
(1)	Cianidinas	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	2,5	287,0684	48,34 ± 4,80
(2)	Cianidin-3-galaktozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	5,3	449,1076	1534,73 ± 1,16
(3)	Cianidin-3-gliukozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	5,5	449,1071	17,51 ± 1,96
(4)	Cianidin-3-arabinozidas	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	5,8	419,0962	680,42 ± 0,63
(5)	Cianidin-3-ksilozidas	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	6,7	419,0970	73,16 ± 0,52

<sup>a</sup> vidutinės trijų pakartojimų vertės ± RSD %

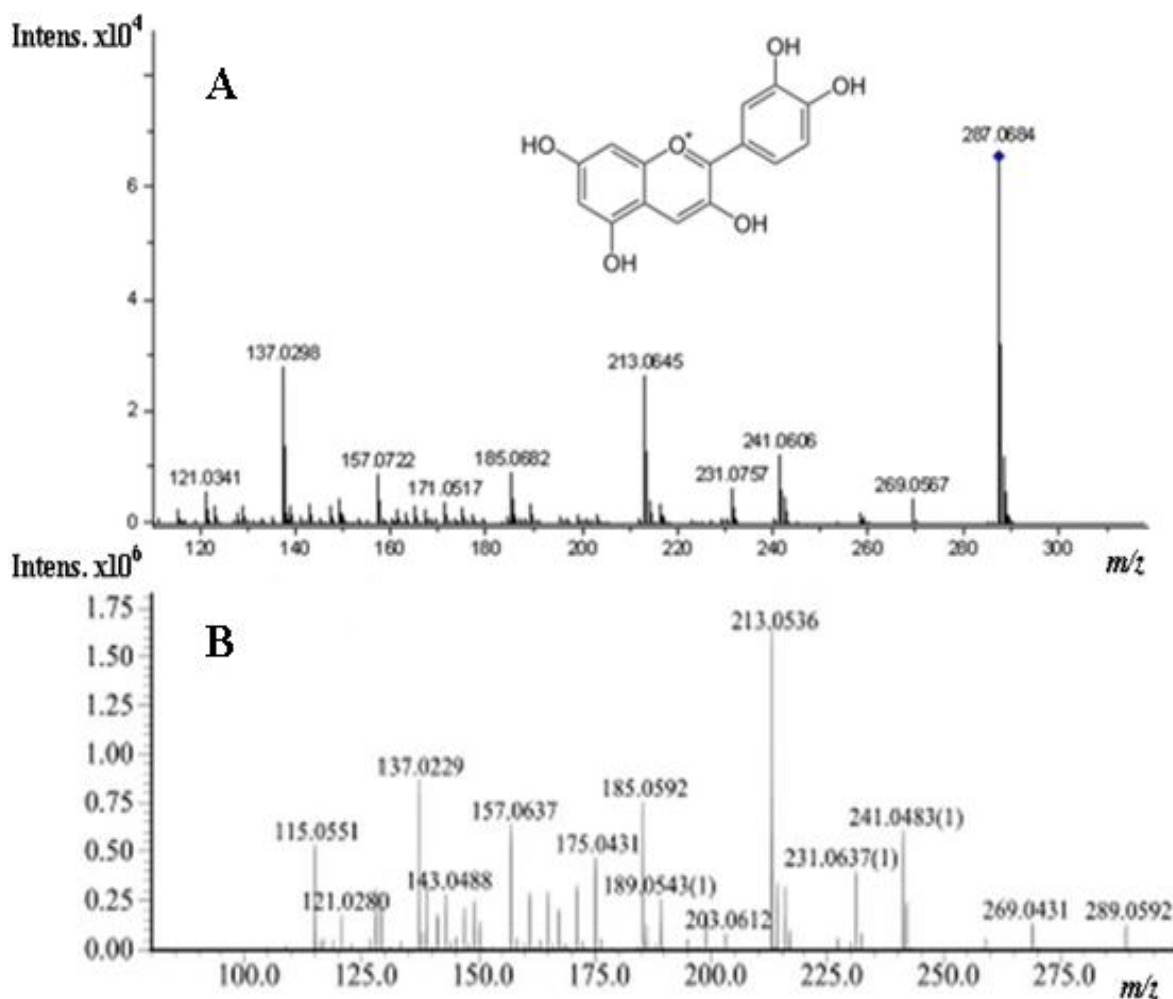
Smailės (1) molekulinis jonas  $[M-H]^-$   $m/z$  287,0684 atitiko molekulinę formulę  $C_{15}H_{11}O_6$ . Šis junginys buvo identifikuotas kaip cianidinas. Smailės (2) molekuliniam jonui  $[M-H]^-$   $m/z$  449,1076 buvo priskirta molekulinė formulė  $C_{21}H_{21}O_{11}$  ir šis junginys buvo identifikuotas kaip cianidin-3-galaktozidas. Smailės (3) molekulinis jonas  $[M-H]^-$   $m/z$  449,1071 atitiko molekulinę formulę  $C_{21}H_{21}O_{11}$ . Šis junginys buvo identifikuotas kaip cianidin-3-gliukozidas. Smailės (4) molekulinis jonas  $[M-H]^-$   $m/z$  419,0962 atitiko molekulinę formulę  $C_{20}H_{19}O_{10}$ . Šis junginys buvo identifikuotas kaip cianidin-3-arabinozidas. Smailės (5) molekulinis jonas  $m/z$  419,0970 atitinka  $C_{20}H_{19}O_{10}$  molekulinę formulę ir buvo identifikuotas kaip cianidin-3-ksilozidas.



**18 pav.** Antocianų UESCh/MS jonų chromatograma

(1) cianidinas, (2) cianidin-3-galaktozidas, (3) cianidin-3-gliukozidas, (4) cianidin-3-arabinozidas, (5) cianidin-3-ksilozidas

Tiksliam cianidino identifikavimui buvo panaudoti pseudo -  $MS^3$  būdu gauti spektrai, kurie buvo lyginami su literatūros duomenimis (11 pav.). Terminas “pseudo-“ reiškia, kad pradinis jonas, buvo fragmentuojamas prieš atskyrimą pirmajame kvadrupolyje (fragmentacija šaltinyje). Įtampų skirtumas sukelia jonų susidūrimą dėl kurio įvyksta molekulių skilimas (Pukalskienė, 2015). Pseudo -  $MS^3$  spektrai patvirtino cianidino struktūrą, gauti fragmentai atitiko cianidino molekulės  $MS^3$  fragmentus, kuriuos aprašė Takeshita ir kt. (2009).



**19 pav.** Pseudo - MS<sup>3</sup> spektrai

*A* – analizuojamo junginio (**I**)  $m/z$  287 fragmento spektras, *B* – literatūros duomenimis (Takeshita ir kt., 2009) gauto cianidino standarto spektras

Kiekybinė analizė atlikta pagal komercinį antocianų standartą (delfidin-3-gliukozidą). Nustatyta, kad pagrindiniai antocianai aronijų išspaudose buvo cianidin-3-galaktozidas ir cianidin-3-arabinozidas, kartu sudarantys daugiau kaip 90 % šių junginių grupės. Tuo tarpu cianidin-3-ksilozidas sudaro 3 %, cianidinas – 2 %, o cianidin-3-gliukozidas mažiau kaip 1 % visų kiekybiškai nustatytų antocianų. Remiantis Mayer - Miebach ir kt. (2012) literatūroje pateiktais duomenimis, antocianų kiekis aronijų išspaudose buvo 1190 – 1950 mg/100 g sausų išspaudų. Oszmiański ir kt., (2005) nurodo, jog išspaudose antocianų kiekis buvo 1836,84 mg/100 g SM, o Sójka ir kt. (2013) - 1200 mg/100 g SM. Lyginant literatūros duomenis su šiame darbe gautais rezultatais matyti, kad Mayer – Miebach ir kt. (2012) bei Oszmiański ir kt., (2005) autorių rezultatai buvo labai panašūs į šiame darbe pateiktus rezultatus. Tuo tarpu Sójka ir kt. (2013) autorių gautas bendras antocianų kiekis buvo beveik 2 kartus mažesnis lyginant su rezultatais gautais šiame darbe. Tikėtina, kad įtakos skirtingiems rezultatams

galėjo turėti žaliavos paruošimas, ekstrakcijos bei kiekybinės analizės metodai, taip pat klimatinė zona, kurioje augalas buvo augintas. Aronijų išspaudoms būdingas didelis antocianų kiekis, lyginant su kitomis vaisių išspaudomis. Pavyzdžiui, vidutinis kiekis šių junginių spanguolių išspaudose buvo 121 mg/100 g sausų išspaudų (White ir kt., 2010), o juodųjų serbentų išspaudose - nuo 344 iki 1046 mg/100 g sausų išspaudų (Kapasakalidis ir kt., 2006), (Sójka ir kt., 2009). Svarbu paminėti, kad Bober ir kt. (2004) atlikti tyrimai rodo, jog vandeninių ekstraktų gautų iš aronijų išspaudų antocianų kiekis buvo 8 kartus didesnis, nei ekstraktų iš džiovintų vaisių. Šie autoriai mano, kad aronijų išspaudos galėtų būti geras priedas vaisių arbatos spalvos intensyvumo stiprinimui.

### **3.7. Eterinio aliejaus bei lakaus ekstrakto analizė DC – LJD ir DC – MS metodais**

Lakaus ekstrakto ir eterinio aliejaus lakiųjų junginių sudėtis tirta DC-LJD ir DC-MS metodais. Aronijų išspaudų eteriniame aliejuje identifikuoti 94 lakieji junginiai sudarantys 98,7 % nuo viso aliejaus, lakiąjame ekstrakto – 70 junginių, sudarančių 98,4 % viso ekstrakto. 3.6 lentelėje pateikiami 25 pagrindiniai identifikuoti lakieji junginiai, priklausantys įvairioms organinių junginių klasėms, daugiausia alkoholiams, aldehydams bei esteriams.

Nustatyta, kad įvairiais ekstrakcijų metodais išskirtų lakiųjų junginių procentinis kiekis buvo labai skirtingas. Pavyzdžiui, taikant Lickens-Nickerson ekstrakciją pagrindiniai lakieji junginiai buvo benzaldehidas ir 3-penten-2-onas, atitinkamai sudarantys 49,02 % ir 22,83 % nuo identifikuotų junginių smailių plotų sumos, o taikant ekstrakcijos vandens (EVG) garais metodą šių junginių bendra koncentracija sumažėja daugiau nei 2 kartus. Tuo tarpu EVG būdu išskirtų junginių didžiausią dalį sudaro (E)-kadineno eteris (11,12 %), oktakošanas (10,32 %) ir benzaldehidas (9,38 %). Ekstrakcijos vandens garais metodu išskirtame eteriniame aliejuje identifikuoti  $\delta$ -dodekalaktonas (5,28 %) ir (Z)-3-heksenilbenzoatas (0,77 %), o Lickens-Nickerson ekstrakcijos metodu gautame ekstrakto šių junginių nenustatyta. Tuo tarpu, lakiame ekstrakto buvo rasta furfuralio (3,95 %) ir etilpropanoato (1,59 %), kurie neaptikti eteriniame aliejuje. Tokius eterinio aliejaus ir lakaus ekstrakto sudėties skirtumus gali įtakoti keletas priežasčių pavyzdžiui, ekstrakcijos vandens garais metu palaikoma aukšta temperatūra (100 °C), todėl dalis lakių junginių yra prarandama, taip pat sąlytis su vandeniu gali keisti lakiųjų junginių struktūrą arba gali būti nepakankama kai kurių junginių koncentracija, kad juos būtų galima aptikti taikant dujų chromatografijos metodą (Ferrer, 2013)

Remiantis literatūros duomenimis, daugiau kaip 200 aronijų uogų lakiųjų junginių buvo nustatyta tiriant uogų ekstraktus ir distiliatus (Kraujalyte ir kt., 2013). Literatūros šaltiniuose (Kraujalyte ir kt.,

2013) 3-penten-2-onas ir benzaldehidas minimi kaip pagrindiniai lakieji junginiai esantys uogu distiliatuose gautuose Lickens-Nickerson ekstrakcijos metodu, o tai sutampa su šio tyrimo rezultatais.

**3.6 lentelė.** Eterinio aliejaus ir lakaus ekstrakto pagrindinių lakiųjų junginių sudėtis

Eil. Nr.	Junginys	Sulaikymo trukmė, min	KI <sup>a</sup>	KI <sup>b</sup>	Junginio koncentracija, %	
					Lakus ekstraktas <sup>c</sup>	Eterinis aliejus <sup>e</sup>
1	2	3	4	5	6	7
1.	Acetaldehidas <sup>c</sup>	2,822	684	690	0,44 ± 0,035	1,94 ± 0,068
2.	Etilpropanoatas <sup>c</sup>	2,965	710	716	1,59 ± 0,027	-
3.	3-Penten-2-onas <sup>c</sup>	3,516	738	739	22,83 ± 0,160	6,13 ± 0,205
4.	Heksanalis <sup>c, d</sup>	4,493	805	801	2,16 ± 0,025	0,83 ± 0,037
5.	Furfuralis <sup>c</sup>	5,115	835	836	3,95 ± 0,077	-
6.	1-Heksanolis <sup>c</sup>	5,938	869	870	1,25 ± 0,012	0,19 ± 0,014
7.	Benzaldehidas <sup>c, d</sup>	8,491	961	960	49,02 ± 0,436	9,38 ± 0,379
8.	Benzilo alkoholis <sup>c, d</sup>	10,703	1032	1031	0,50 ± 0,005	0,15 ± 0,000
9.	Nonanalis <sup>c, d</sup>	13,065	1105	1100	0,80 ± 0,012	1,09 ± 0,053
10.	Dodekanas <sup>c, d</sup>	15,815	1197	1200	0,18 ± 0,000	0,87 ± 0,046
11.	$\beta$ -Ciklocitralis <sup>c</sup>	16,408	1218	1219	0,39 ± 0,009	1,46 ± 0,075
12.	2-Feniletilacetatas <sup>c</sup>	17,487	1256	1258	0,45 ± 0,012	2,13 ± 0,110
13.	(E,E)-2,4-Dekadienalis <sup>c</sup>	19,101	1309	1315	0,47 ± 0,012	3,12 ± 0,150
14.	(E)-2-Undekanalis <sup>c</sup>	20,366	1356	1360	0,22 ± 0,005	0,76 ± 0,065
15.	Geranilacetonas <sup>c</sup>	22,801	1445	1455	0,36 ± 0,019	3,03 ± 0,324
16.	(E)- $\beta$ -Jononas <sup>c, d</sup>	23,873	1483	1488	1,38 ± 0,020	7,02 ± 0,368
17.	$\delta$ -Kadinenas <sup>c, d</sup>	24,743	1519	1523	0,25 ± 0,005	2,60 ± 0,171
18.	(E)-Kadineno eteris <sup>c</sup>	25,396	1545	1558	1,37 ± 0,019	11,12 ± 0,533
19.	(Z)-3-Heksenilbenzoatas <sup>c</sup>	25,883	1562	1566	-	0,77 ± 0,224
20.	1-Epikubenolis <sup>c</sup>	27,486	1627	1628	0,13 ± 0,005	1,27 ± 0,061
21.	Kubenolis <sup>c</sup>	27,754	1642	1646	0,10 ± 0,005	0,97 ± 0,066
22.	$\delta$ -Dodekalaktonas <sup>c</sup>	29,067	1694	1704	-	5,28 ± 0,211
23.	Fitolis <sup>c</sup>	33,664	1905	1943	0,12 ± 0,005	1,43 ± 0,024
24.	Metilo linoleatas <sup>c</sup>	37,467	2092	2085	0,26 ± 0,057	2,37 ± 0,193
25.	Oktakozanas <sup>c, d</sup>	50,344	2852	2800	0,53 ± 0,280	10,32 ± 3,439

<sup>a</sup> Kováts sulaikymo indeksas apskaičiuotas pagal  $C_7$ - $C_{30}$  alkanų mišinį nepolinėje Elite-5 kolonėje

<sup>b</sup> Kováts sulaikymo indeksas nepolinėje kolonėjeje publikuotas literatūroje (Adams, 2009)

<sup>c</sup> Identifikuota pagal DC-MS spektrus ir Kováts sulaikymo indeksą

<sup>d</sup> Identifikacija patvirtinta su standartu

<sup>e</sup> pakartojimų vidurkis ± standartinis nuokrypis (SN)

## IŠVADOS

1. Atliekant skirtingas ekstrakcijas poliniais tirpikliais nustatyta, kad visų tirtų ekstraktų išeiga priklauso nuo ekstrakcijai pasirinkto organinio tirpiklio. Didžiausia ekstrakto išeiga, daugiau kaip 50 % gauta ekstrahuojant etanoliumi Soksleto aparate. Naudojant acetoną (16,39 %) ir vandenį (17,67 %) gautos mažiausios ekstrakcijų išeigos.
2. Nustatytos optimalios superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio parametrų vertės didžiausiai išeigai (2,95 %) gauti: slėgis 40 MPa, 40 °C temperatūra ir 149 min laikas. Į SK – CO<sub>2</sub> sistemą įterpus 10 % etanolio priedo daugiau kaip 2 kartus (7,08 g/100 g SM) padidėjo ekstrakcijos išeiga. Pagreitinotos ekstrakcijos būdu ekstrahuojant po SKE – CO<sub>2</sub> likusią žaliavą etanoliumi gauta beveik 1,5 karto didesnė ekstrakto išeiga, nei ekstrahuojant acetonu.
3. Įvertinus ekstraktų antioksidacinį aktyvumą įvairiais *in vitro* metodais nustatyta, kad ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje aktyvumas buvo nuo 0,01 iki 2,52 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakto, DPPH<sup>•</sup> modelinėje sistemoje nuo 0,007 iki 1,99 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakto, ORAC modelinėje sistemoje 0,65 – 14,44 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakto, BFJK buvo 23,90 – 512,39 mg GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo poliniais tirpikliais išgauti ekstraktai, o mažiausia radikalų sujungimo geba pasižymėjo SKE – CO<sub>2</sub> būdu gauti ekstraktai. Pritaikius QUENCHER procedūrą prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstrakcijų nustatyta, kad po ekstrakcijos išspaudose lieka nemažas kiekis aktyvių junginių.
4. Aronijų išspaudų ekstraktuose aptikti 28 junginiai iš kurių 14 junginių buvo identifikuota, tai daugiausia kvercetino ir chlorogeno rūgšties dariniai. ESCh-DPPH metodu nustatyta, kad šiuose ekstraktuose yra nemažai antiradikaliniu aktyvumu pasižyminčių junginių. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo liuteolino darinys, 3-kafeoilchino ir 5-kafeoilchino rūgštys. Tiriant ekstraktų sudėtį kiekybiškai įvertinti hiperozidas, chlorogeno rūgštis ir rutinas. Didžiausias rutino ir hiperozido kiekis gautas ekstrahuojant etanoliumi Soksleto aparate. Po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos taikant pagreitinimą ekstrahuojant acetonu ir etanoliumi gautuose ekstraktuose buvo didžiausia chlorogeno rūgšties koncentracija. Nustatyta, kad pagrindiniai antocianai aronijų išspaudose buvo cianidin-3-galaktozidas ir cianidin-3-arabinozidas, kartu sudarantys daugiau kaip 90 % šių junginių grupės. Tuo tarpu cianidin-3-ksilozidas sudaro 3 %, cianidinas – 2 %, o cianidin-3-gliukozidas mažiau kaip 1 % visų kiekybiškai nustatytų antocianų. Vandeniniuose ekstraktuose nustatyta didžiausia sorbitolio koncentracija, o sacharozės aptikta pėdsakais.



5. Aronijų išspaudų eteriniame aliejuje identifikuoti 94 lakieji junginiai sudarantys 98,7 % viso aliejaus, lakiajame ekstrakte – 70 junginių, sudarančių 98,4 % viso ekstrakto. Pagrindiniai lakieji junginiai esantys lakiame ekstrakte yra benzaldehidas (49,02 %) ir 3-penten-2-onas (22,83 %), o eteriniame aliejuje - E-kadineno eteris (11,12 %) ir oktakosanas (10,32 %).
6. Taigi atlikti tyrimai parodė, kad aronijų išspaudos yra geras šaltinis biologiškai aktyvių komponentų, todėl jos gali būti perdirbamos į didesnės pridėtinės vertės produktus, kurie galėtų būti naudojami maisto, kosmetikos ar farmacijos pramonėje.

## LITERATŪRA

1. **Adams**, R.P., 2009. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed. Allured Business Media, Carol Stream, IL.
2. **Ade-Omowaye**, B.I.O., Angersbach, A., Taiwo, K.A., Knorr, D., 2001. Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science and Technology*, 12(8), p.285–295.
3. **Advanced technology**, Supercritical carbon dioxide extraction machine [žiūrėta 2015-02-03]. Prieiga per internetą: [http://dafo.en.alibaba.com/product/546377536-800404546/Supercritical\\_carbon\\_dioxide\\_extraction\\_machine.html](http://dafo.en.alibaba.com/product/546377536-800404546/Supercritical_carbon_dioxide_extraction_machine.html).
4. **Alupului**, A., Călinescu, I., Lavric, V., 2012. Microwave Extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 74(2), p.129–142.
5. **Anisimovienė**, N., Rubinskienė, M., Viškelis, P., Stackevičienė, E., Stanys, V., Šikšnianas, T., Jankovska, E., Sasnauskas, A., 2009. Antocianinai serbentų , vyšnių bei šilauogių uogose ir ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, 3(3), p.158–167.
6. **AOAC**, 1995. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (15th ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
7. **Ara**, V., 2002. Schwarzfruchtige Aronia: Gesund – und bald "in aller Munde"? Flüssiges Obst, p.653–8.
8. **Arvanitoyannis**, I.S., Ladas, D., Mavromatis, A., 2006. Potential uses and applications of treated wine waste: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(5), p.475–487.
9. **Atanasova-Goranova**, V.K., Dimova, P.I., Pevicharova, G.T., 1997. Effect of food products on endogenous generation of N-nitrosamines in rats. *British Journal of Nutrition*, p.335–45.
10. **Azmir**, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.426–436.
11. **Baranauskienė**, R., Kazernavičiūtė, R., Pukalskienė, M., Maždžierienė, R., Venskutonis, P.R., 2014. Agrorefinery of *Tanacetum vulgare* L. into valuable products and evaluation of their antioxidant properties and phytochemical composition. *Industrial Crops and Products*, 60, p.113–122.

12. **Bermudez-Soto**, M.J., Larrosa, M., Garcia-Cantalejo, J.M., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Conesa, M.T., 2007. Up-regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. *J Nutr Biochem*, p.259–71.
13. **Betsui**, F., Tanaka-Nishikawa, N., Shimomura, K., 2004. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. *Plant Biotechnology*, 21(5), p.387–391.
14. **Blando**, F., Gerardi, C., Nicoletti, I., 2004. Sour cherry (*Prunus cerasus* L) anthocyanins as ingredients for functional foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p.253–258.
15. **Brand-Williams**, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 1995, vol.28, no. 1, p. 25-30
16. **Buskienė**, L., Šikšnianas, T., Sasnauskas, A., 2008. Aviečių selekcinų numerių biologinių-ūkinių savybių tyrimai. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 27(3), p.65–74.
17. **Casas**, L., Mantell, C., Rodriguez, M., Torres, A., Macias, F.A., Martinez de la Ossa, E., 2007. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *The Journal of Supercritical Fluids*, 41(1), p.43–49.
18. **Clifford**, M.N., Knight, S., Kuhnert, N., 2005. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), p.3821–3832.
19. **Council**, 2009. Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009. *Official Journal of the European Union*, (10), p.3–11.
20. **Cravotto**, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P., 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), p.898–902.
21. **Denev**, P.N., Kratchanov, C.G., Ciz, M., Lojek, A., Kratchanova, M.G., 2012. Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Polyphenols: In vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5), p.471–489.
22. **Deng**, S., West, B.J., Jensen, C.J., 2011. Thermal degradation of flavonol glycosides in noni leaves during roasting. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(2), p.155–159.
23. **Djilas**, S., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., 2009. By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 15(4), p.191–202.

24. **Esatbeyoglu**, T., Winterhalter, P., 2008. Research project Dietary procyanidins – From a better understanding of human health effects to functionalised foods. Isolation, characterisation and analysis of procyanidins Internal Report.
25. **Ferrer**, D.B., 2013. Agrorefinery of *Myrrhis odorata*, *Tussilago farfara* and *Calamintha grandiflora* for flavours and antioxidants. Summary of Doctoral Dissertation: Technological Science, Chemical engineering (05T). Kaunas, p.111.
26. **Fincan**, M., Dejmek, P., 2002. In situ visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue. *Journal of Food Engineering*, 55(3), p.223–230.
27. **Folin**, O., Ciocalteu, V., 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem*, p.627–650.
28. **Fontana**, A.R., Antonioli, A., Bottini, R., 2013. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), p.8987–9003.
29. **Galanakis**, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), p.68–87.
30. **Gasiorowski**, K., Szyba, K., Brokos, B., Kolaczynska, B.J., Jankowiak-Wlodarczyk, M., Oszmianski, J., 1997. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Lett*, p.37–46.
31. **Georgiev**, V., Ananga, A., Tsoleva, V., 2014. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), p.391–415.
32. **Handa**, S.S., 2008. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, pp.239–259.
33. **Hardin**, J.W., 1973. The Enigmatic Chokeberries (*Aronia*, Rosaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 100(3), p.178–184. DOI: 10.2307/2484630
34. **Herrero**, M., Cifuentes, A., Ibañez, E., 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chemistry*, 98(1), p.136–148.
35. **Ignat**, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), p.1821–1835.

36. **Illés, V.**, Daood, H.G., Perneckzi, S., Szokonya, L., Then, M., 2000. Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super- and subcritical conditions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 17(2), p.177–186.
37. **Jain, T.**, Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., Shukla, S.S., 2009. Microwave assisted extraction for phytoconstituents-An overview. *Asian J. Research Chem.*, 2(1), p.19–25.
38. **Jeppsson, N.**, 2000. The effect of cultivar and cracking on fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and hybrids between chokeberry and rowan (*Sorbus*). *Gartenbauwissenschaft*, p.93–8.
39. **Kähkönen, M.P.**, Hopia, A.I., Heinonen, M., 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, p.4076–82.
40. **Kapasakalidis, P.G.**, Rastall, R.A., Gordon, M.H., 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *J Agric Food Chem*, p.4016–21.
41. **Kettle, A.**, 2013. Recent Advances in Pressurized Fluid Extraction. *LC-GC: Solution for Separation Scientists*.
42. **Kylli, P.**, 2011. Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties. Academic Dissertation, Food Chemistry. Helsinkis, p. 90-62
43. **Kokotkiewicz, A.**, Jaremicz, Z., Luczkiewicz, M., 2010. Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *Journal of medicinal food*, 13(2), p.255–269.
44. **Kowalczyk, E.**, Kopff, A., Fijalkowski, P., Kopff, M., Niedworok, J., Blaszczyk, J., Kedziora, J., Tyslerowicz, P., 2003. Effect of anthocyanins on selected biochemical parameters in rats exposed to cadmium. *Acta Biochim Pol*, p.543–8.
45. **Kraemer-Schafhalter, A.**, Fuchs, H., Pfannhauser, W., 1998. Solid-phase extraction (SPE) – a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero. *J Sci Food Agric*, p.435–40.
46. **Kraujalytė, V.**, Leitner, E., Venskutonis, P.R., 2013. Characterization of *Aronia melanocarpa* volatiles by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), simultaneous distillation/extraction (SDE), and gas chromatography-olfactometry (GC-O) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), p.4728–4736.
47. **Kraujalytė**, 2014. Įvairių *Viburnum opulus* L., *aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. ir *Vaccinium Corymbosum* L. genotipų uogų aromato ir antioksidacinių savybių įvertinimas. Daktaro disertacija: Technologijos mokslai, Chemijos inžinerija (05T). Kaunas, p.129.

48. **Kraujalytė, V.**, Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., Česonienė, L., Daubaras, R., 2015. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, 188, p.583–590.
49. **Krenn, L.**, Steitz, M., Schlicht, C., Kurth, H., Gaedcke, F., 2007. Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements-analysis with problems. *Pharmazie*, p.803–12.
50. **Kulling, S.E.**, Rawel, H.M., 2008. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*, 74(13), p.1625–1634.
51. **Lala, G.**, Malik, M., Zhao, C.W., He, J., Kwon, Y., Giusti, M.M., Magnuson, B.A., 2006. Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr Cancer*, p.84–93.
52. **Lang, Q.**, Wai, C.M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. *Talanta*, 53(4), p.771–782.
53. **Lebovka, N.I.**, Bazhal, M.I., Vorobiev, E., 2002. Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, 54(4), p.337–346.
54. **Lee, J.E.**, Kim, G.S., Park, S., Kim, Y.H., Kim, M.B., Lee, W.S., Jeong, S.W., Lee, S.J., Jin, J.S., Shin, S.C., 2014. Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food chemistry*, 146, p.1–5.
55. **Lehmann, H.**, 1990. Die Aroniabeere und ihre Verarbeitung. *Flüssiges Obst*, 57, p.746-752
56. **Li, H.**, Pordesimo, L., Weiss, J., 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), p.731–738.
57. **Luque de Castro, M.D.**, García-Ayuso, L.E., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), p.1–10.
58. **Luque de Castro, M.D.**, Priego-Capote, F., 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography. A*, 1217(16), p.2383–9.
59. **Luque-García, J.L.**, Luque De Castro, M.D., 2004. Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment - Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034(1-2), p.237–242.

60. **Mayer-Miebach**, E., Adamiuk, M., Behsnilian, D., 2012. Stability of Chokeberry Bioactive Polyphenols during Juice Processing and Stabilization of a Polyphenol-Rich Material from the By-Product. *Agriculture*, 2(4), p.244–258.
61. **Malien-Aubert**, C., Dangles, O., Amiot, M.J., 2001. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *J Agric Food Chem*, p.170–6.
62. **Mamidipally**, P.K., Liu, S.X., 2004. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(2), p.122–125.
63. **Mamma**, D., Christakopoulos, P., 2014. Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. *Waste and Biomass Valorization*, 5(4), p.529–549.
64. **Mattila**, P., Hellstrom, J., Torronen, R., 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem*, p.7193–9.
65. **Oszmiański**, J., Wojdylo, A., 2005. Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221(6), p.809–813.
66. **Pourmortazavi**, S.M., Hajimirsadeghi, S.S., 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography. A*, 1163(1-2), p.2–24.
67. **Prior**, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., et al., 2003. 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*, p.3273–3279.
68. **Pukalskienė**, M., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., 2015. Phytochemical composition and antioxidant properties of *Filipendula vulgaris* as a source of healthy functional ingredients. *Journal of Functional Foods*, 15, p.233-242
69. **Rabetafika**, H.N., Bchir, B., Blecker, C., Richel, A., 2014. Fractionation of apple by-products as source of new ingredients: Current situation and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, p.99–114.
70. **Raudonis**, R., 2012. Skysčių chromatografijos pokolonėlinių metodų optimizavimas augalinių antioksidantų tyrimams. Daktaro disertacija: biomedicinos mokslai, farmacija (08B). Kaunas, p.114.
71. **Raventos**, M., Duarte, S., Alarcon, R., 2002. Application and Possibilities of Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction in Food Processing Industry: An Overview. *Food Science and Technology International*, 8(5), p.269–284.

72. **Re, R.**, et al, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, pp.1231–1237.
73. **Sasidharan, S.**, Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Latha, Y., 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), p.1–10.
74. **Simeonov, S.B.**, Botushanov, N.P., Karahanian, E.B., Pavlova, M.B., Husianitis, H.K., Troev, D.M., 2002. Effects of Aronia melanocarpa juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)*, p.20–3.
75. **Skupień, K.**, Oszmiański, J., 2007. The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit. *Agricultural and Food Science*, 16(1), p.46–55.
76. **Smith, R.M.**, 2003. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of chromatography. A*, 1000(1-2), p.3–27.
77. **Sójka, M.**, Król, B., 2009. Composition of industrial seedless black currant pomace. *European Food Research and Technology*, 228(4), p.597–605.
78. **Sójka, M.**, Kołodziejczyk, K., Milala, J., 2013. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*, 51, p.77–86.
79. **Stewart, D.**, McDougall, G.J., Sungurtas, J., Verrall, S., Graham, J., Martinussen, I., 2007. Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: Advances toward fruit nutritional enhancement. *Molecular Nutrition & Food Research*, p.645–651.
80. **Strigl, A.W.**, Leitner, E., Pfannhauser, W., 1995. Qualitative und Quantitative Analyse der Anthocyane in Schwarzen Apfelbeeren (*Aronia melanocarpa* Michx. Ell.) mittels TLC, HPLC und UV/VIS-Spektrometrie. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 201(3), p.266–268.
81. **Szajdek, A.**, Borowska, E.J., 2008. Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), p.147–153.
82. **Taheri, R.**, 2013. Polyphenol Composition of Underutilized Aronia Berries and Changes in Aronia Berry Polyphenol Content Through Ripening. p.436
83. **Takeshita, M.**, Ishida, Y., Akamatsu, E., Ohmori, Y., Sudoh, M., Uto, H., Tsubouchi, H., Kataoka, H., 2009. Proanthocyanidin from Blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), p.21165–21176.



84. **Thermo Scientific**, ASE 200 Accelerated Solvent Extraction System [žiūrėta 2015-04-09]. Prieiga per internetą: <http://www.dionex.com/en-us/products/sample-preparation/ase/instruments/lp-81380.html>
85. **Toepfl**, S., Mathys, A., Heinz, V., Knorr, D., 2006. Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing. *Food Reviews International*, 22(4), p.405–423.
86. **Valcheva-Kuzmanova**, S., Borisova, P., Galunska, B., Krasnaliev, I., Belcheva, A., 2004. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from Aronia melanocarpa on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Exp Toxicol Pathol*, p.195–201.
87. **Valcheva-Kuzmanova**, S.V., Belcheva, A., 2006. Current knowledge of Aronia melanocarpa as a medicinal plant. *Folia Med (Plovdiv)*, p.11–7.
88. **Valcheva-Kuzmanova**, S., Kuzmanov, K., Tancheva, S., Belcheva, A., 2007. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Aronia melanocarpa fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, p.101–5.
89. **Vankar**, P.S., 2004. Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, 9(4), p.30–41.
90. **Wang**, L., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), p.300–312.
91. **White**, B.L., Howard, L.R., Prior, R.L., 2010. Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. *J Agric Food Chem*, p.4030–6.
92. **Wilska-Jeszka**, J., Korzuchowska, A., 1996. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation - influence on the colour of strawberry and chokeberry juices. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 203(1), p.38–42.
93. **Wu**, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S., 2004. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*, p.7846–56.
94. **Zielinska-Przyjemaska**, M., Olejnik, A., Dobrowolska-Zachwieja, A., Grajek, W., 2007. Effects of Aronia melanocarpa polyphenols on oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils from obese and non-obese individuals. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, p.75–87.

## **GYVENIMO APRAŠYMAS (CV)**

**Vardas, pavardė:** Lina Grunovaitė  
**Gimimo data:** 1990-09-06  
**Gimimo vieta:** Jurbarkas, Lietuva

### **IŠSILAVINIMAS**

#### **Aukštasis išsilavinimas:**

2009 - 2013 m. Kauno technologijos universitetas,  
Cheminės technologijos fakultetas,  
Maisto technologija ir inžinerija,  
Chemijos inžinerijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis

### **MOKSLINĖS KONFERENCIJOS**

1. 2014 m. pavasaris – L. Grunovaitė, A. Pukalskas „Aronijų išspaudų biorafinavimas taikant įvairius ekstrakcijos metodus, biologiškai vertingų komponentų įvertinimui“. 3 mėnesių trukmės moksliniai tyrimai.
2. 2014 m. ruduo – L. Grunovaitė, P. R. Venskutonis „Juodųjų aronijų išspaudų biologiškai aktyvių komponentų išskyrimas didelio slėgio ekstrakcijos metodais“. 3 mėnesių trukmės moksliniai tyrimai.
3. M. Pukalskienė, L. Grunovaitė, P. R. Venskutonis. Agrorefinery of black chokeberry pomace into valuable products using different extraction methods and evaluation of their antioxidant activities and chemical composition. Gegužės 13 – 14 d., 2014. Atėnai, Graikija.

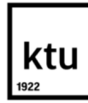
### **STRAIPSNIAI**

1. L. Grunovaitė, M. Pukalskienė, P. R. Venskutonis. Agrorefinery of black chokeberry pomace into valuable fractions using different extraction methods and evaluation of their antioxidant activities and chemical composition. Straipsnis paruoštas ir numatytas siųsti į “Food Chemistry” žurnalą.

### **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovei lekt. dr. Mildai Pukalskienei už darbo temos idėją, pastabas, vertingas mokslines konsultacijas ir supratingumą, bei nuolatinį skatinimą tobulėti. Dėkoju jaunesn. mokslo darbuotojai Renatai Baranauskienei už bendradarbiavimą, pagalbą bei konsultacijas atliekant aromato junginių analizę. Dėkoju Maisto produktų katedros darbuotojams už gerą darbinę atmosferą ir moralinį palaikymą.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai ir draugams už meilę, kantrybę ir pasitikėjimą.



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Lina Grunovaitė

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga, 621E40001

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

Baigiamojo projekto „Juodųjų aronijų išspaudų biorafinavimas taikant šiuolaikiškus didelio slėgio ekstrakcijos ir chromatografijos metodus biologiškai vertingų funkcionaliųjų komponentų išskyrimui“

### AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2015 m. Birželio 7 d.  
Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Linos Grunovaitės** baigiamasis projektas tema „Juodųjų aronijų išspaudų biorafinavimas taikant šiuolaikiškus didelio slėgio ekstrakcijos ir chromatografijos metodus biologiškai vertingų funkcionaliųjų komponentų išskyrimui“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o 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)