



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Bioaktyvių junginių išskyrimas iš baltojo šilkmedžio (*Morus alba*) lapų ir jų pritaikymas oksidacijos procesų lėtinimui
kanapių aliejuje**

Baigiamasis magistro projektas

Evelina Samulionytė

Projekto autorė

Doc. dr. Audrius Pukalskas

Vadovas

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Bioaktyvių junginių išskyrimas iš baltojo šilkmedžio (*Morus alba*) lapų ir jų pritaikymas oksidacijos procesų lėtinimui
kanapių aliejuje**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Evelina Samulionytė

Projekto autorė

Doc. dr. Audrius Pukalskas

Vadovas

Doc. dr. Rimgailė Degutytė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Evelina Samulionytė

Bioaktyvių junginių išskyrimas iš baltojo šilkmedžio (*Morus alba*) lapų ir jų pritaikymas oksidacijos procesų lėtinimui kanapių aliejuje

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Evelina Samulionytė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Samulionytė, Evelina. Bioaktyvių junginių išskyrimas iš baltojo šilkmedžio (*Morus alba*) lapų ir jų pritaikymas oksidacijos procesų lėtinimui kanapių aliejuje. Magistro baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Audrius Pukalskas; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): Technologijų mokslai, Maisto technologijos.

Reikšminiai žodžiai: bioaktyvūs junginiai, baltasis šilkmedis, šilkmedžio lapų ekstraktas, kanapių aliejus, oksidacija, antioksidantai.

Kaunas, 2021. 55 p.

Santrauka

Baltojo šilkmedžio lapai (lot. *Morus alba*) daugelį metų buvo naudojami tik kaip šilkaverpio vikšrų maisto šaltinis, tačiau dabar jie vis plačiau pritaikomi maisto pramonėje, farmacijoje. Remiantis moksliniais straipsniais baltojo šilkmedžio lapuose yra naudingų bioaktyvių junginių, kurie teigiamai veikia žmogaus organizmą. Taip pat šio augalo lapai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Vienas iš oksidacijai jautrių produktų yra kanapių aliejus, todėl šiame baigiamajame projekte ieškoma būdų kaip prailginti aliejaus galiojimo laiką ir sulėtinti oksidacinius procesus.

Tyrimams buvo naudojama septyniolika skirtingų ekstraktų. Jie buvo išgauti naudojant pagreitintą ekstrakciją organiniais tirpikliais (ETPS) ir superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE-CO₂). Didžiausios ETPS ekstraktų išeigos gautos ekstrahuojant su etanoliumi, o mažiausios išeigos nustatytos heksaniniuose ir acetoniniuose ekstraktuose. Taikant SKE-CO₂ ekstrakciją gaunama didesnė išeiga 30 MPa slėgyje.

Didžiausiu antiradikaliniu ir antioksidaciniu aktyvumu DPPH, ABTS ir ORAC metodais, pasižymėjo metanolinis ekstraktas, kai naudojama žaliava po SKE-CO₂ ekstrakcijos, 30 MPa slėgyje. Daugiausiai fenolinių junginių nustatyta etanoliniame ekstrakto taikant ETPS ekstrakciją.

Taikant efektyviają skysčių chromatografiją su masių spektroskopija buvo nustatyta baltojo šilkmedžio lapų ekstraktų cheminė sudėtis. Ekstraktuose dominuojantys bioaktyvūs junginiai:

- a) kamferolio dariniai (kamferolio rutinozido heksozidas, kamferolio malonilheksozidas, kamferolio heksozidas, kamferolio acetilheksozidas);
- b) kvercetino dariniai (kvercetino heksozidas, kvercetino acetilheksozidas, kvercetino heksozido heksozidas, kvercetino malonilheksozida, taksifolinas, rutinas);
- d) kavos rūgšties dariniai (3-O-kafeoilchino rūgštis, 5-O-kafeoilchino rūgštis, 4-O-kafeoilchino rūgštis);
- e) kiti: eriodiktolis, ferulo rūgštis, salicilo rūgštis.

Trigliceridų kiekis kanapių aliejuje įvertintas naudojant tą pačią chromatografijos sistemą. Šiame aliejuje dominuoja: 1-linoleoil-2-linoleoil-3-linolenoilglicerolis (LLLn) ir 1,2,3-trilinoleoilglicerolis (LLL).

Oksipreso metodu buvo atliktas kanapių aliejaus be priedų ir su baltojo šilkmedžio lapų ekstraktais oksidacinio stabilumo tyrimas. Indukcijos periodas visų tirtų ekstraktų buvo panašus. Tačiau šiek tiek lėtesnis oksidacinis skilimas pastebėtas kanapių aliejaus su SKE-CO₂ 30 MPa ekstraktu.

Masės priaugio metodu buvo įvertintas kanapių aliejaus be priedų ir su *Morus alba* skirtingais ekstraktais antioksidacinis aktyvumas. Praėjus trims mėnesiams tyrimo rezultatai parodė, kad

acetoninis ekstraktas po ETPS ekstrakcijos yra aktyviausias ir padidino kanapių aliejaus stabilumą 7 paromis, lyginant su kontrole.

Samulionytė, Evelina. Isolation of Bioactive Compounds from White Mulberry (*Morus alba*) Leaves and Their Application for the Retardation of Oxidation Processes in Hemp Oil. Master's Final Degree Project / Supervisor Assoc. prof. dr. Audrius Pukalskas; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Technological Sciences, Food Technologies.

Keywords: bioactive compounds, white mulberry, mulberry leaf extract, hemp oil, oxidation, antioxidants.

Kaunas, 2021. 55 p.

Summary

White mulberry leaves (*Morus alba*) have been used for many years as a food source for silkworm caterpillars, but now they are increasingly used in the food industry, pharmacy. According to scientific articles, white mulberry leaves contain useful bioactive compounds that have a positive effect on human body. The leaves of this plant also have antioxidant properties. One of the oxidation sensitive products is hemp oil, so this final project is looking for ways to extend the shelf life of the oil and to slow down oxidative processes.

Seventeen different extracts were used for the studies. They were extracted using accelerated solvent extraction (ASE) and supercritical extraction with carbon dioxide (SKE-CO₂). The highest yields of ETPS extracts were obtained by extraction with ethanol and the lowest yields were found in hexane and acetone extracts. SKE-CO₂ extraction gave a higher yield at a pressure of 30 MPa.

The highest antiradical and antioxidant activity by DPPH, ABTS and ORAC methods was observed in the methanol extract when the raw material was used after SKE-CO₂ extraction at a pressure of 30 MPa. The biggest amount of phenolic compounds was detected in ethanol extract prepared by ETPS extraction method.

Chemical composition of white mulberry leaf extracts was determined by liquid chromatography with mass spectrometry. Dominant bioactive compounds in the extracts:

1. kaempferol derivatives: kaempferol rutinoside hexoside, kaempferol malonylhexoside, kaempferol hexoside (astragalol), kaempferol acetylhexoside;
2. quercetin derivatives: quercetin hexoside, quercetin acetylhexoside, quercetin hexoside hexoside, quercetin malonylhexoside;
3. caffeic acid derivatives: (3-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid);
4. others: eriodictol, ferulic acid, salicylic acid.

The content of triglyceride in hemp oil was also assessed using liquid chromatography system. This oil is dominated by 1-linoleoyl-2-linoleoyl-3-linolenoylglycerol (LLL_n) and 1,2,3-trilinoleoylglycerol (LLL).

The oxidative stability study of hemp oil without additives and with white mulberry leaf extracts was performed by the oxipres method. The induction period was similar for all extracts tested. However, a slightly slower oxidative degradation was observed in hemp oil with SKE-CO₂ 30 MPa extract.

The antioxidant activity of hemp oil without additives and with different extracts of *Morus alba* was evaluated by the weight gain method. After three months, the results of the study were quite similar,

but acetone extract after ETPS extraction was the most active and increased the stability of hemp oil by 7 days compared to the control.

TURINYS

LENTELIŲ SAŖAŠAS	10
PAVEIKSLŲ SAŖAŠAS	11
SANTRUMPŲ IR TERMINŲ SAŖAŠAS	12
ĮVADAS	14
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. Baltojo šilkmedžio (lot. <i>Morus alba</i>) paplitimas, morfologiniai požymiai	15
1.2. Baltojo šilkmedžio (lot. <i>Morus alba</i>) lapų panaudojimas medicinoje.....	15
1.3. Baltojo šilkmedžio (lot. <i>Morus alba</i>) lapų panaudojimas.....	16
1.4. Baltojo šilkmedžio (lot. <i>Morus alba</i>) lapų cheminė sudėtis	17
1.4.1. Flavonoliai (kvercetas ir kamferolis).....	18
1.4.2. Fenolinės rūgštys	19
1.4.3. Polihidroksilinti alkaloidai.....	20
1.4.4. Karotenoidai.....	21
1.4.5. Vitaminai (C, A)	22
1.5. Bioaktyvių junginių išskyrimas	23
1.6. Laisvieji radikalai ir jų poveikis	25
1.7. Antioksidantai.....	26
1.8. Šilkmedžio lapų antioksidacinis poveikis aliejuje	27
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	28
2.1. Tyrimo objektas	28
2.2. Reagentai	28
2.3. Naudoti prietaisai.....	28
2.4. Augalo paruošimas ir ekstraktų gamyba.....	29
2.4.1. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ETPS).....	31
2.4.2. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE-CO ₂)	31
2.5. Mėginių paruošimas eksperimentams.....	31
2.6. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) Folin-Ciocalteu metodu.....	31
2.7. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH [•]) radikalų sujungimo tyrimas.....	32
2.8. 2,2-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties) (ABTS ^{•+}) laisvųjų radikalų-katijonų sujungimas.....	32
2.9. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)	32
2.10. Riebalų oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipreso metodu.....	33
2.11. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas masės priaugio metodu.....	33
2.12. Peroksidų skaičiaus nustatymas jodimetriniu metodu	33

2.13. Ekstraktų ir trigliceridų sudėties, bei kiekio nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos masių spektrometrijos metodu	34
2.14. Statistinis rezultatų apdorojimas	34
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	35
3.1. Ekstraktų išėigos taikant superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE-CO ₂).....	35
3.2. Šilkmedžio lapų ekstraktų išėigos, taikant pagreitintą ekstrakciją organiniais tirpikliais	36
3.3. Šilkmedžio lapų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	37
3.4. Šilkmedžio lapų ekstraktų cheminė sudėtis	39
3.5. Kanapių aliejaus peroksidų skaičiaus nustatymas	43
3.6. Trigliceridų sudėties nustatymas kanapių aliejuje	43
3.7. Oksidacinio stabilumo nustatymas kanapių aliejuje, oksipreso metodu	45
3.8. Šilkmedžio lapų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas aliejuje, masės prieaugio metodu.....	46
IŠVADOS	49
LITERATŪROS SĄRAŠAS	50
PUBLIKACIJOS	55

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Laisvųjų radikalų klasifikacija ir poveikis	26
2 lentelė. Antioksidacinio aktyvumo rezultatai, nustatyti įvairiais metodais	38
3 lentelė. Šilkmedžio lapų ekstraktų cheminės sudėties kokybinė ir kiekybinė analizė	40
4 lentelė. Santykiniai trigliceridų kiekiai kanapių aliejuje	44
5 lentelė. Tiriamų kanapių aliejaus mėginių indukciniai periodai, valandomis	46
6 lentelė. Baltojo šilkmedžio lapų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo charakteristikos kanapių aliejuje 40 °C temperatūroje, kai masės prieaugis 1 %.....	47

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Baltasis šilkmedis (lot. <i>Morus alba</i>)	15
2 pav. Šilkmedžio lapų panaudojimas	17
4 pav. Kamferolio struktūra	19
5 pav. Chlorogeno rūgšties struktūra	20
6 pav. Kavos rūgšties struktūra	20
7 pav. Polihidroksilintų alkaloidų struktūra (pipekolio rūgštis, cis-5-hidroksipipekolio rūgštis, trans-5-hidroksipipekolio rūgštis, fagominas, DNJ)	21
8 pav. Karotenoidų klasifikacija	21
9 pav. Askorbo rūgšties struktūra	23
10 pav. Retinolio struktūra	23
11 pav. SKE-CO ₂ ekstraktoriaus schema	24
12 pav. ETPS ekstraktoriaus schema	25
13 pav. Šilkmedžio lapų ekstraktų gamybos ir tyrimų schema	30
14 pav. Šilkmedžio lapų SKE-CO ₂ ekstrakcijos kinetika 20 MPa slėgyje, 60 °C	35
15 pav. Šilkmedžio lapų SKE-CO ₂ ekstrakcijos kinetika 30 MPa slėgyje, 60 °C	35
16 pav. Šilkmedžio lapų ekstraktų išėigos taikant ekstrakcijas tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje (ETPS)	36
17 pav. Šilkmedžio lapų acetoninio ekstrakto chromatograma	42
18 pav. Kanapių aliejuje nustatyti trigliceridai	44
19 pav. Oksidacijos kinetikos kreivės ir indukcijos periodo nustatymo pavyzdys	46
20 pav. Indukcijos periodo nustatymo pavyzdys, kai masės padidėjimas pasiekė 1 procentą	47

SANTRUMPŲ IR TERMINŲ SĄRAŠAS

ABTS^{•+} – 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas

AAPh 2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas

A – arachidono rūgštis

AUC plotas, esantis po kalibracine kreive

BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis

BHT 2,6-Di-tret-butyl-4-metilfenolis (sintetinis antioksidantas)

DTL – didelio tankio lipoproteinai

DNJ – 1-deoksinojirimicinas

DMD – diodų matricos detektorius

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DPPH[•] – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas

ETPS – pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais

ETPS EtOH – pagreitintos ekstrakcijos etanolinis ekstraktas

ETPS HEX – pagreitintos ekstrakcijos heksaninis ekstraktas

ETPS AC – pagreitintos ekstrakcijos acetoninis ekstraktas

ETPS MeOH – pagreitintos ekstrakcijos metanolinis ekstraktas

ETPS H₂O – pagreitintos ekstrakcijos metanolinis ekstraktas

ESI – elektropurkštuvinė jonizacija

GRE – galo rūgšties ekvivalentas

IP – indukcinis periodas

Ln – linoleno rūgštis

L – linolo rūgštis

MTL – mažo tankio lipoproteinai

NADPH – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas

ORAC – deguonies radikalų absorbcijos geba

O – oleino rūgštis

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas

P – palmitino rūgštis

RSD % – santykinė standartinė paklaida

RSA – radikalų pašalinimo aktyvumas

ROS – reaktyviosios deguonies formos

RNS – reaktyviosios azoto formos

RSS – reaktyviosios sieros formos

SKE – ekstrakcija superkritiniais skysčiais

SK-CO₂ – superkritinis anglies dvideginis

UESCh-MS – ultra efektyvioji skysčių chromatografija su masių spektrometru

ĮVADAS

Žmonės augalus naudoja jau nuo senų laikų. 3000 metų prieš Kristų Egipte rasta daug knygų, kuriose buvo aprašomas augalų panaudojimas medicininiams tikslams. Šiose knygose buvo mažiausiai 800 receptų ir 700 vietinių, užsienio kilmės vaistinių augalų. 4000 m. prieš Kristų Mesopotamijoje rastos molinės plokštelės su piešiniais, kurios buvo kaip įrodymas, kad jau tais laikais žmonės žinojo apie medicininius augalus ir jų teikiamą naudą sveikatai. Nuo XX amžiaus ši sritis labai patobulėjo, atsirado galimybė iš augalų išskirti naudingus bioaktyvius junginius, o jų ekstraktus panaudoti maisto produktams, vaistams kurti [1].

Vienas iš naudingomis savybėmis pasižyminčių augalų yra baltasis šilkmedis (lot. *Morus alba*), kuris kilęs iš Kinijos. Šilkmedžio lapuose yra mineralų, vitaminų, maistinių skaidulų, amino rūgščių, fitosterolių, flavonoidų ir kitų funkcinių komponentų, tokių kaip DNJ (1-deoksinojirimicinas), kuris veikia kaip vaistas nuo diabeto. Šio augalo lapai naudojami kosuliui malšinti, sumažina cukraus kiekį kraujyje ir kraujospūdį, pasižymi antioksidaciniu poveikiu. Šilkmedžio lapai taip pat naudojami maisto pramonėje, kuriami funkcionalūs maisto produktai, žolelių arbatos, maisto papildai [2].

Lietuvių autorių literatūroje nėra pateikta informacijos apie baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) lapų pritaikymą aliejų gamyboje siekiant sulėtinti oksidacinius procesus. Maisto produktai, kurių sudėtyje yra riebalų, linkę oksiduotis, atsiranda nemalonūs kvapai, kartus skonis. Todėl svarbu, ieškoti būdų kaip prailginti produktų galiojimo laiką [3].

Darbo tikslas – išanalizuoti baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) ekstraktų cheminę sudėtį ir iširti šio augalo antioksidacinį aktyvumą.

Tyrimo uždaviniai:

1. atlikti skirtingas šilkmedžio lapų ekstrakcijas naudojant skirtingus tirpiklius ir nustatyti efektyviausią iš jų;
2. įvertinti šilkmedžio lapų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą *in vitro* modelinėse radikalų sistemose;
3. nustatyti augalo lapų ekstraktų cheminę sudėtį naudojant UESCh-MS metodą;
4. nustatyti kanapių aliejaus peroksidų skaičių, trigliceridų sudėtį ir įvertinti jo tinkamumą oksidacijos proceso tyrimams;
5. įvertinti šilkmedžio lapų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą kanapių aliejuje oksipreso ir masės prieaugio metodais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) paplitimas, morfologiniai požymiai

Baltasis šilkmedis (lot. *Morus alba*) priklauso magnolijūnų (lot. *Moraceae*) šeimai [4]. Šio augalo kilmės šalis yra Kinija. Tūkstančius metų šis augalas buvo auginamas kaip šilkaverpio vikšrų maisto šaltinis. Šie vikšrai, maitindamiesi šilkmedžių lapais, susuka iš gijų kokonus, iš kurių galima išgauti šilką. Šilko gamyba yra paplitusi Japonijoje, Indijoje. Europoje baltieji šilkmedžiai buvo pradėti auginti nuo VII a. Taip pat šie introdukuoti augalai auga Šiaurės Amerikoje [5].

Baltieji šilkmedžiai yra vidutinio dydžio, užauga iki 15 metrų. Kamieno skersmuo yra 60 cm. Kamieno žievės paviršius nelygus, gelsvai rudos spalvos. Šio augalo laja plati, rutuliška, skėstašakė. Šakos tankios, pilkai rusvos spalvos su gelsvu atspalviu. Pagrindinės šakos stambios, o kitos plonos. Lapai blizgūs, dauguma nesimetriški ir ryškiai žali, jų ilgis nuo 7 iki 10 cm. Lapų forma plačiai kiaušiniška, netaisyklingai skiautėta arba ištisinė. Lapkotis apaugęs plaukeliais [6]. Ūgliai apvalūs, pilkai rusvi, nuo 7 iki 130 cm ilgio. Šio augalo lapiniai pumpurai bekočiai, apvalūs, rudai vyšninės spalvos, blizgūs, šoniniai pumpurai mažesni už viršūninį pumpurą. Žiediniai pumpurai yra mažesni už lapinius pumpurus, tačiau taip pat bekočiai ir apvalūs. Baltojo šilkmedžio žiedai žalsvai baltos spalvos, nedideli, vienalyčiai, gausiai susitelkę žirginiuose [5]. Vaisiai sultingi, saldūs, kvapnūs, baltos, raudonos arba tamsiai violetinės spalvos, panašūs į avietes. Vaisiai sunoksta birželio viduryje arba liepą [6]. Šaknys geltonos arba šviesiai rudos spalvos, tanki šaknų sistema, kurią sudaro viena liemeninė šaknis ir daug šakotų, bei ilgų šoninių šaknų. Liemeninė šaknis į žemę įsiskverbia daugiausiai iki 2 m gylio [5].

Šis augalas gali augti įvairiuose dirvožemiuose, tačiau tinkamiausias yra priemolis. Kitos sąlygos būtinos augimui, yra drėgnas, šiltas klimatas. Baltasis šilkmedis atlaiko sausras, gana atsparus vėjui, druskų poveikiui [7].



1 pav. Baltasis šilkmedis (lot. *Morus alba*) [8]

1.2. Baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) lapų panaudojimas medicinoje

Medicinoje yra gana plačiai naudojami baltojo šilkmedžio lapai. Jie reguliuoja cukraus kiekį kraujyje, mažina padidėjusį kraujo spaudimą, gydo kosulį, karščiavimą, akių uždegimą, slopina gerklės, galvos, sąnarių skausmus, rankų ir kojų tirpimą, stiprina imuninę sistemą [9].

Šilkmedžio lapų nauda įrodoma klinikiniuose tyrimuose. Saenthaweesuk'as ir kt. (2009) nustatė, kad šio augalo lapų ekstraktas pasižymi antidiabetinėmis savybėmis. Bandymo metu žiurkėms kiekvieną dieną buvo įšvirksčiamos skirtingos dozės (150, 300, 600 mg/kg kūno masės) vandeninio (lot. *Morus alba*) lapų ekstrakto, 12 dienų. Histologinis stebėjimas parodė, kad 300 ir 600 mg/kg dozių lapų ekstraktas sumažina gliukozės koncentraciją kraujyje nuo 37 iki 42 %, lyginant su kontroline grupe. Baltojo šilkmedžio lapų antidiabetinis junginys yra 1-deoksinojirimicinas (DNJ) [10].

Tailando mokslininkai nustatė, kad baltojo šilkmedžio lapų tabletės, kurių dozė yra 2,5 g per parą, gydo lengvą dislipidemiją. Tyrimui buvo atrinkti dvidešimt trys žmonės, kurie sirgo lengva dislipidemija. Augalinis vaistas buvo duodamas 3 kartus per dieną 12 savaitių. Praėjus bandymo laikui nustatyta, kad MTL cholesterolio kiekis kraujyje sumažėjo 4,9 %, o DTL cholesterolio kiekis kraujyje padidėjo 19,7 % [11]. MTL yra mažo tankio lipoproteinai, kurie nėra naudingi žmogaus organizmui, nes padidėja rizika susirgti ateroskleroze ar kitomis lėtinėmis ligomis [12].

Indijos mokslininkai ištyrė, kad baltojo šilkmedžio lapuose esantis lektinas, mažina riziką susirgti krūties ir storosios žarnos vėžiu [13].

Nigerijos mokslininkai atlikę tyrimus įrodė, kad baltojo šilkmedžio lapų ekstraktai pasižymi antibakterinėmis ir antigrybelinėmis savybėmis. Tyrimui buvo naudojami vandeniniai (karšti, šalti) *Morus alba* ekstraktai. Bandymo metu buvo tiriamas antibakterinis ir priešgrybelinis ekstraktų aktyvumas prieš *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamari*, *Fusarium oxysporum* ir *Penicilium oxalicum*. Tyrimas parodė, kad vandeniniai (karšti) ekstraktai efektyviausiai slopina mikroorganizmų augimą. Vandeniniai (šalti) ekstraktai yra ne tokie efektyvūs [14].

Baltojo šilkmedžio lapų ekstraktas slopina pigmentinių dėmių atsiradimą. Melaninas yra atsakingas už hiperpigmentaciją. O melanino gamyba ir sintezė priklauso nuo amino rūgšties – tirozino. Tirozino aktyvumą slopina mulberozidas F, išskirtas iš *Morus alba* ekstrakto [15].

Morus alba augalo sudėtyje yra flavonoidų, kumarino ir stilbeno, kurie apsaugo kepenis nuo hepatotoksinų (pvz. aflatoksinai), kurie juos gali pažeisti. Tyrimas buvo atliekamas su žiurkėmis, kurios turėjo lėtinį kepenų sutrikimą. Žiurkėms buvo švirksčiama 150 mg/kg baltojo šilkmedžio ekstrakto 14 dienų. Tyrimo rezultatai parodė, kad kepenų nekrozė, audinių pažeidimai žymiai sumažėjo [16].

Kinijos mokslininkai įrodė, kad baltojo šilkmedžio lapų mulberozidas A, pagrindinis stilbeno glikozidas, gali būti vartojamas hiperurikemijai ir podagrai gydyti. Hiperurikemiją turinčioms žiurkėms buvo švirksčiamos 10, 20 ir 40 mg/kg dozės *Morus alba* ekstrakto. Po kurio laiko buvo pastebėta, jog sumažėjo šlapimo rūgšties kiekis kraujo serume, padidėjo šlapimo rūgšties išsiskyrimas su šlapimu [17].

1.3. Baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) lapų panaudojimas

Baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) lapų sudėtyje yra antioksidacinių junginių, kurie teigiamai veikia žmogaus organizmą, todėl yra vis plačiau naudojami lapų ekstraktai ar džiovinti lapų milteliai maisto pramonėje, kuriame funkcionalūs maisto produktai (žr. 2 pav.) [18]. Funkcionalūs maisto produktai yra produktai, kurie ne tik atlieka mitybinę funkciją, bet taip pat gali būti naudingi žmogaus

imuninei sistemai, nes stiprina organizmą, mažina susirgimų riziką. Gamybos metu šie produktai praturtinami fiziologiškai aktyviais ingredientais [19].

Turkijoje buvo atlikti šokolado, praturtinto šilkmedžio lapų ekstraktu, tyrimai. Nustatyta, kad toks šokoladas turėjo didelį flavonoidų kiekį [20]. Tailande yra populiarūs džiovintų šilkmedžio lapų arbata. Ši arbata, kad būtų dar geresnio skonio, maišoma su indišku ženšeniu arba šventuoju baziliku. Baltojo šilkmedžio arbatos užpilas yra žalios spalvos, savo sudėtyje neturi kofeino. Šilkmedžio arbata turi daug naudos sveikatai, palyginus su įprasta arbata. Tačiau vartotojai šią arbatą daug rečiau perka ir ji nėra tokia populiarūs. Taip yra todėl, nes vartotojams trūksta informacijos apie šilkmedžio lapų teikiamą naudą sveikatai. Taip pat paminėtina, kad skonis nėra toks skanus kaip įprastų arbatų. Jos turi kartų prieskonį [21]. Ši arbata labai naudinga peršalus, esant gerklės skausmui. Indijoje džiovintų lapų milteliai naudojami kepant duoną iš kvietinių miltų. Ši duona jų kalboje vadinama „Paratha“. Tailande gaminami ryžių užkandžiai, į kuriuos pridėta miltelių pavidalo baltojo šilkmedžio lapų [18].

Šilkmedžio lapai naudojami ir farmacijoje, kuriami maisto papildai, antidiabetiniai vaistai. Plačiai taikomas mikroinkapsuliacijos procesas. Šio proceso metu yra sukuriama skystos, dujinės arba kietos mikrokapsulės, kurios būna apgaubtos plona plėvele. Naudingos, augalo ekstrakto esančios, bioaktyvios medžiagos yra aptraukiamos danga suteikiant mikrokapsulėms naudingų savybių [21].



2 pav. Šilkmedžio lapų panaudojimas [21]

1.4. Baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) lapų cheminė sudėtis

Morus alba lapuose yra angliavandenių (81–83 %), baltymų (15–31 %), riebalų (2–8 %), oksalatų, fitatų, mineralinių medžiagų (Fe, Zn, Ca, P, Mg) [18]. Be šių pagrindinių medžiagų baltajame šilkmedyje randama ir bioaktyvių, antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių:

1. flavonolių: kvercetino ir jo darinių (kvercetino-heksozido-heksozido, kvercetino-diheksozido, kvercetino-rutinozido izomero, kvercetino-rutinozido (rutino), kvercetino-heksozido (izokercitrino), kvercetino-acetilheksozido, kvercetino-malonil-heksozido, kvercetino-malonil-diheksozido), kamferolio ir jo darinių (kamferolio-heksozido (astragalino), kamferolio-heksozido-heksozido, kamferolio-rutinozido, kamferolio-acetilheksozido, kamferolio-rutinozido-heksozido, kamferolio-

- malonil-diheksozido, kamferolio-malonil-rutinozido). Flavonoidų kiekis lapuose svyruoja nuo 3,7 iki 9,8 mg g⁻¹ s.m. [22];
2. fenolinių rūgščių: chlorogeno rūgšties, kavos rūgšties [18];
 3. polihidroksilintų alkaloidų [23];
 4. karotenoidų – liuteoksantino, fitoeno, fitoflueno, α-karoteno, β-karoteno, hidroksi-α-karoteno, liuteino, zeaksantino, violaksantino [24];
 5. vitaminų (A, C) [18].

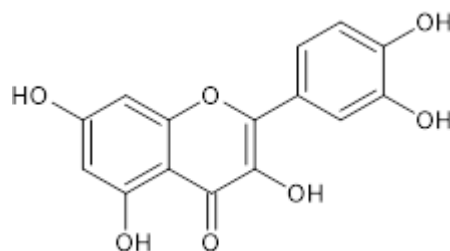
1.4.1. Flavonoliai (kvercetas ir kamferolis)

Flavonoliai yra fitocheminiai junginiai, randami daugelyje augalų rūšių įskaitant ir *Morus alba*. Pagal savo struktūrą flavonoliai priklauso flavonoidams ir apima pagrindinius šiuos junginius: kvercetiną, kamferolį [25].

Kvercetiną sudaro du benzeno žiedai, pirano žiedas ir penkios hidroksilo grupės. Šis cheminis junginys yra gelsvos spalvos, kartaus skonio, kristalinės, kietos medžiagos, mažai tirpus vandenyje, tirpus alkoholyje, ledinėje acto rūgštyje ir vandeniniuose šarminiuose tirpaluose. Jis paprastai gaunamas hidrolizuojant rutiną (kvercetino-rutinozidą).

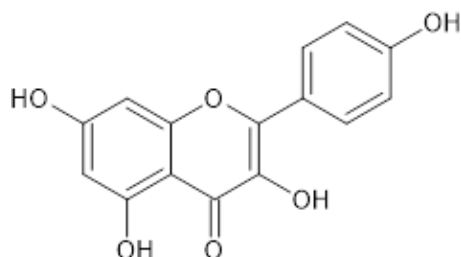
Kvercetas laikomas stipriu antioksidantu, nes gali inaktyvuoti laisvuosius radikalus ir surišti metalo jonus. Šios savybės slopina lipidų peroksidaciją. Lipidų peroksidacija yra procesas, kai nesočiosios riebalų rūgštys paverčiamos laisvaisiais radikalais. Šis procesas žalingas žmogaus organizmui, gali sukelti širdies ir kraujagyslių, neurodegeneracines ligas. Tačiau antioksidantas reaguodamas su radikalais, apsaugo organizmą nuo jų neigiamo poveikio [26]. Taip pat laisvieji radikalai gali sukelti akių sutrikimus: kataraktą ir geltonosios dėmės degeneraciją. Antioksidantas apsaugo ir gydo šias akių ligas, neutralizuodamas laisvuosius radikalus.

Kvercetas taip pat pasižymi antialerginėmis savybėmis, mažina šienligės, dilgėlinės simptomus. Šis junginys slopina histamino ir kitų uždegiminių medžiagų gamybą, dėl kurių ir atsiranda alerginės reakcijos. Kvercetas pasižymi antibakteriniu aktyvumu: neleidžia daugintis beveik visoms žinomoms bakterijų padermėms, kurios gali sukelti kvėpavimo takų, virškinimo trakto, odos ir šlapinimosi sutrikimus. Tyrimais su gyvūnais įrodyta, kad šis cheminis junginys slopina krūties, storosios žarnos, prostatos ir plaučių vėžinių ląstelių augimą. Antioksidantas apsaugo DNR nuo mutacinių pokyčių, kurie atsiranda dėl reaktyviojo deguonies. Kvercetas mažina riziką susirgti osteoporozė. Atliktas tyrimas parodė, kad vyresnių moterų, kurios pastoviai gėrė arbatą su šiuo antioksidantu, kaulų mineralinis tankis buvo didesnis, nei tų kurios negėrė šios arbatos. Taip pat kvercetas mažina riziką susirgti koronarine širdies liga, diabetu, podagra, neurodegeneracinėmis ligomis, prostatitu, virusinėmis infekcijomis [27].



3 pav. Kvercetino struktūra

Kamferolis yra tetrahidroksiflavonas, sudarytas iš dviejų benzeno žiedų, pirano žiedo ir keturių hidroksilo grupių. Cheminis junginys yra gelsvos spalvos, būdingos antioksidacinės savybės. Taip pat šis flavonoidas gali sumažinti riziką susirgti plaučių, skrandžio, kasos, kiaušidžių vėžiu, slopinti navikų augimą, pasižymi gydomosiomis savybėmis. Skrandžio vėžio tyrimai parodė kamferolio antiproliferacinį poveikį žmogaus skrandžio vėžio ląstelėms, kuomet skatinama autofagija, ląstelių ciklo sustojimas ir ląstelių žūtis [28]. Šis antioksidantas slopina širdies, kraujagyslių, neurodegeneracinių, infekcinių ligų, diabeto, osteoporozės, nerimo, alergijų atsiradimą [29].



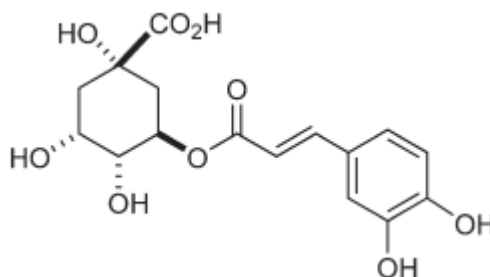
4 pav. Kamferolio struktūra

1.4.2. Fenolinės rūgštys

Fenolinės rūgštys yra augalų metabolitai. Jos yra sudarytos iš vieno arba kelių aromatinių žiedų, turi karboksi grupę ir vieną arba keletą fenolinių grupių. Šie junginiai skirstomi į hidroksicinaminės rūgštis ir hidroksibenzoinės rūgštis darinius, kurie skiriasi hidroksilo grupių skaičiumi ir padėti aromatiniam žiede. Didžioji dalis fenolinių rūgščių jungiasi su esteriais, eteriais, augalo struktūriniais komponentais (celiulioze, baltymais, ligninu), didesniais polifenoliniais junginiais (flavonoidais), mažesnėmis organinėmis molekulėmis (gliukoze, chininu, maleinu, vyno rūgštimi). Fenolinės rūgštys yra svarbios augalui: maistinių medžiagų įsisavinimui, baltymų sintezei, fotosintezei ir alelopatijai. Taip pat šie junginiai išsiskiria priešuždegiminėmis, antioksidacinėmis, antimutageninėmis ir antikancerogeninėmis savybėmis, daro teigiamą įtaką žmogaus sveikatai [30]. Baltajame šilkmedyje dominuoja chlorogeno rūgštis ir kavos rūgštis [18].

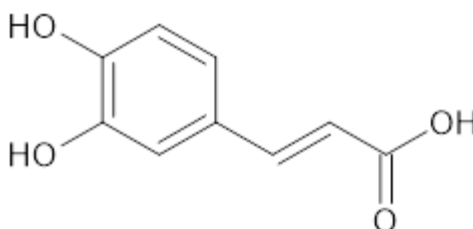
Chlorogeno rūgštis yra kavos rūgštis ir chino rūgštis esteris. Jautri neigiamam aplinkos poveikiui (pH, temperatūrai, šviesai). Ši rūgštis dar vadinama 3-O-kafeoilchino rūgštimi (3-CQA). Tyrimais įrodyta, kad chlorogeno rūgštis turi antioksidacinę, priešuždegiminę, priešvėžinę, antilipideminę, antidiabetinę, antihipertenzinę ir antineurodegeneracinę poveikį [31]. Taip pat sumažina metabolinio sindromo progresavimą. Šis sindromas susijęs su fiziologiniais, biocheminiais, klinikiniais ir metaboliniais veiksniais, kurie didina riziką susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis, 2 tipo cukriniu diabetu. Požymiai: padidėjęs cholesterolio kiekis kraujyje, aukštas kraujo spaudimas, didelis gliukozės kiekis kraujyje, atsparumas insulinui, riebios kepenys, miego apnėja. Nutukimas pripažintas pagrindine šio sindromo priežastimi. Teksase buvo atliktas tyrimas, kuris įrodė, kad žiurkėms vartojant 8 savaites po 0,2 g/kg į dieną chlorogeno rūgštis, sumažėjo laisvųjų riebalų rūgščių, trigliceridų, cholesterolio, gliukozės kiekis kraujyje, kūno masė. Tyrimai su žmonėmis taip pat atskleidė chlorogeno rūgštis naudą prieš nutukimą. Atsavorio turintis asmenys 12 savaičių 5 kartus į dieną gėrė kavą, kurioje buvo gausu chlorogeno rūgštis (~ 45 mg/g). Dalyvių svoris po 12 savaičių pastebimai sumažėjo (~ 5,4 kg). Chlorogeno rūgštis taip pat apsaugo maisto produktus nuo tam tikrų nepageidaujamų cheminių pokyčių, pvz., lipidų oksidacijos. Maisto produktai, kurių pagrindą sudaro lipidai, linkę į oksidaciją, kurią sukelia laisvieji radikalai. Lipidų oksidacija lemia nepageidaujamų kvapiųjų medžiagų ir galimai toksiškų junginių (pvz., malondialdehido, 4-

hidroksinonenalo) susidarymą. Šie junginiai gali pabloginti tekstūrą, išvaizdą, skonį, prarandami vitaminai ir nepakeičiamos riebalų rūgštys. Tyrimai parodė, kad chlorogeno rūgštis veikia kaip antioksidantas ir neutralizuoja lipidų oksidaciją [32].



5 pav. Chlorogeno rūgšties struktūra [33]

Kavos rūgštis priklauso hidroksicinaminėms rūgštims, būdinga fenilpropanoido (C6-C3) struktūra, sudaryta iš 3,4-dihidroksilinto aromatinio žiedo, karboksi grupės ir transetileno. Šis junginys yra geltonos spalvos, kietas, aukšta lydymosi temperatūra, mažai tirpsta šaltame vandenyje, labai gerai tirpsta karštame vandenyje ir šaltame etanolyje [34]. Ši fenolinė rūgštis turi antioksidacinę, priešuždegiminę, antikancerogeninę poveikį [35]. Antioksidacinės savybės priklauso nuo hidroksilo grupių. Kavos rūgštis apsaugo ląsteles nuo laisvųjų radikalų toksiškumo, kurie gali neigiamai paveikti odos audinį, skatinti raukšlių susidarymą, mažinti kolageno kiekį. Taip pat ši fenolinė rūgštis veikia prieš storosios žarnos ir burnos vėžį. Pelių gydymas šiuo antioksidantu sumažino navikų augimą plaučiuose [36]. Tyrimais įrodyta, kad kavos rūgštis mažina riziką susirgti hepatokarcinoma, sukelia navikinių ląstelių žūtį. Hepatokarcinoma yra kepenų vėžio forma, kuriai būdinga piktybinis navikas. Ši vėžio forma yra labai pavojinga, didelis mirtingumas lyginant su kitomis vėžio rūšimis. Žmonės turintys šią ligą daugiausiai išgyvena 11 mėnesių [35].



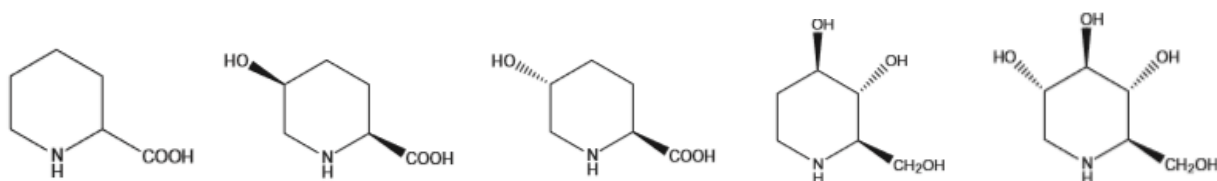
6 pav. Kavos rūgšties struktūra

1.4.3. Polihidroksilinti alkaloidai

Šie alkaloidai yra monocikliniai ir bicikliniai polihidroksilinti dariniai. Jie gali būti laikomi monosacharidų analogais, kuriuose žiedo deguonis yra pakeistas azotu. Polihidroksilinti alkaloidai yra paplitę augaluose, tačiau nustatyti tik 1966 m., nes jie netirpsta tirpikliuose, tokiuose kaip chloroformas [37]. Šilkmedžio lapuose randama 1-deoksinojirimicino (DNJ) (0,04–2,68 mg g⁻¹) [23]. Tai D-gliukozės analogas, kuriame piranozės žiedo deguonies atomas yra pakeistas NH grupe [38]. Taip pat šiame augale yra fagomino (0,05–0,66 mg g⁻¹), pipekolio rūgštis, cis-5-hidroksipipekolio rūgštis (0,02–5,98 mg g⁻¹), trans-5-hidroksipipekolio rūgštis (0,11–1,53 mg g⁻¹) [23].

Šie junginiai yra glikozidazių inhibitoriai. Glikozidazės yra fermentai, katalizuojantys glikozidinių ryšių hidrolizę sudėtiniuose angliavandeniuose ir glikokonjugatuose. Glikozidazės yra būtinos gyviems organizmams egzistuoti. Virškinamosios glikozidazės skaido dideles cukraus turinčias

molekules iki monosacharidų, kurie yra lengviau įsisavinami organizmo. Oligosacharidų biosintezėje dalyvauja platus glikozidazių spektras, kuris svarbus žinduolių ląstelių struktūrai ir funkcijoms. Polihidroksilinti alkaloidai trikdo oligosacharidų vartimą į monosacharidus ir slopina angliavandenių rezorbciją į kraują. Todėl šie junginiai pasižymi antidiabetiniu poveikiu. Tačiau dideliais kiekiais polihidroksilinti alkaloidai yra pavojingi gyvuliams, sukelia rimtą apsinuodijimą, o dėl virškinimo fermentų slopinimo – sutrinka virškinimas. Šios rūšies alkaloidai mažesniais kiekiais pasižymi antivirusinėmis savybėmis: slopina ŽIV viruso dauginimąsi, pasižymi priešvėžinėmis savybėmis, naudojami piktybiniams navikams gydyti, slopina autoimuninių ligų (sklerozės, artrito) požymius. Taip pat mažina riziką susirgti Gošė liga. Ši liga išsivysto, kai organizme trūksta fermento, gliukocerebrozidazės. Dėl šio trūkumo organizme pradeda kauptis cheminės medžiagos, kurios neskaidomos kaupiasi organizme ir sukelia organų pažeidimus [39].

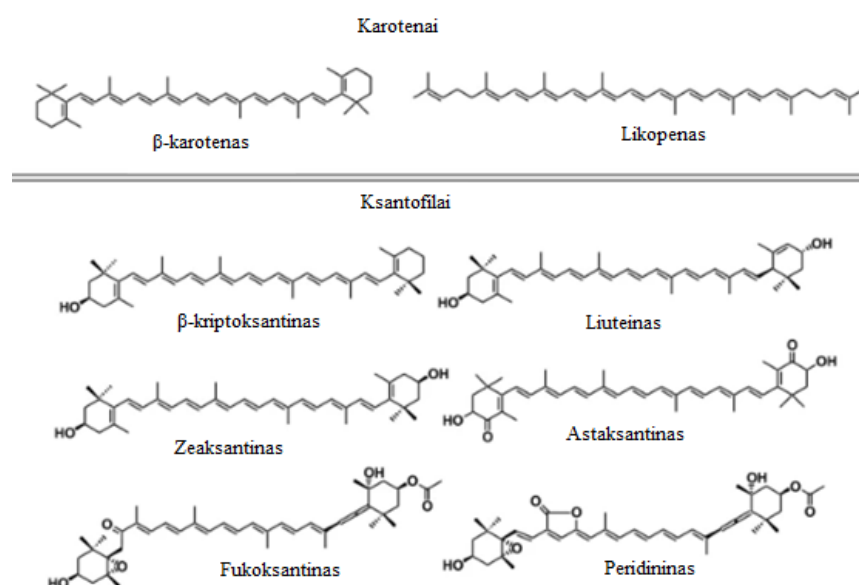


7 pav. Polihidroksilintų alkaloidų struktūra (pipekolio rūgštis, cis-5-hidroksipipekolio rūgštis, trans-5-hidroksipipekolio rūgštis, fagominas, DNJ) [23]

1.4.4. Karotenoidai

Karotenoidai yra pigmentiniai junginiai. Bazinė struktūra sudaryta iš 40 anglies atomų, konjuguotų dvigubų jungčių, gali būti ciklinių grupių, kurios kartais būna pakeistos deguonies turinčiomis funkcinėmis grupėmis. Konjuguotų dvigubų jungčių išsidėstymas grandinėje lemia šviesą sugeriančias savybes, kurios svarbios augalui vykdant fotosintezę ir daro įtaką karotenoidų antioksidaciniam aktyvumui. Pagal dvigubų jungčių skaičių molekulėje galimos kelios cis ir trans konfigūracijos. Remiantis struktūra, karotenoidai yra skirstomi į dvi klases (žr. 8 pav.):

- 1) karotenai, turintys tik anglies ir vandenilio atomus;
- 2) oksokarotenoidai (ksantofilai), turintys bent vieną deguonies atomą.



8 pav. Karotenoidų klasifikacija [40]

Karotenoidai yra lipofilinės molekulės, kurios kaupiasi membranose ar lipoproteinuose. Šių junginių lipofiliškumas turi įtakos jų absorbcijai, pernešimui ir išsiskyrimui organizme [41]. Taip pat šie pigmentai linkę kristalizuotis, aukšta lydymosi temperatūra [42].

Pigmentiniai junginiai atlieka įvairias funkcijas, susijusias su žmonių sveikata. Jie pasižymi antioksidaciniu poveikiu, dėl to sumažėja rizika susirgti prostatos, regos, krūties, plaučių, virškinimo trakto, gimdos kaklelio, kiaušidžių, kasos vėžiu ar lėtinėmis ligomis [43]. Karotenoidai tokie kaip liuteinas, β -karotenas, zeaksantinas organizme paverčiami aktyviu vitaminu A, dar kitaip vadinamu retinoliu, kuris lengvai įsisavinamas. Trūkumas vitamino A gali sukelti akių ligas: kseroftalmiją (ašarų veiklos sutrikimą), kataraktą, geltonosios dėmės degeneraciją. Atlikti tyrimai parodė, kad vyrai, kurie 8 metus vartojo aukštą liuteino ir zeaksantino kiekį, turėjo apie 19 % mažesnę kataraktos riziką. Taip pat manoma, kad šie karotenoidai apsaugo geltonąją dėmę nuo šviesos sukeltų pažeidimų ir sunaikina fotoreceptoriuose susiformavusius laisvuosius radikalus [44]. Taip pat nustatyta, kad karotenoidai yra priemonė sauganti nuo osteoporozės (kaulų ligos), Alzheimerio, širdies ir kraujagyslių ligų, hipertenzijos (padidėjusio kraujo spaudimo). Šie pigmentiniai junginiai saugo vyrų spermą nuo oksidacinio pažeidimo, sukeliančio nevaisingumą. Tyrimo metu nevaisingi vyrai vartojo 8 mg likopeno į dieną, 12 mėnesių. Praėjus šiam laikotarpiui buvo pastebėta, kad pagerėjo spermos morfologija ir judrumas, didesnė spermatozoidų koncentracija. Gydymas likopenu lėmė 36% sėkmingų nėštumų [43].

1.4.5. Vitaminai (C, A)

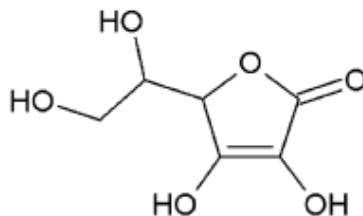
Vitaminas C (askorbo rūgštis) yra šešių anglies atomų laktonas [45]. Jis tirpus vandenyje, nestabilus, lengvai oksiduojasi ir suyra veikiamas deguonies, šarmų ar aukštos temperatūros. Askorbo rūgštis pirmą kartą buvo išskirta 1928 m. Vengrijos biochemiko [46]. Šis vitaminas yra sintetinamas iš gliukozės daugumos žinduolių kepenyse, bet ne žmonių organizme, nes nėra fermento gulonolaktono oksidazės, kuri yra būtina askorbo rūgšties sintezei. Vitamino C žmogus turi gauti su maistu arba vartojant šio vitamino papildus [45]. Askorbo rūgšties trūkumas lemia susilpnėjusį imunitetą, anemiją, skorbutą ir didesnę jautrumą infekcijoms. Savo ruožtu infekcijos lemia vitamino C lygio sumažėjimą dėl padidėjusio uždegimo. Tačiau papildai su vitaminu C gali užkirsti kelią ir gydyti kvėpavimo takų bei sisteminės infekcijas. Profilaktiškai užkertant kelią infekcijai reikia su maistu gauti askorbo rūgšties apie 100–200 mg, tačiau gydymui reikia žymiai didesnių vitamino dozių [47].

Askorbo rūgštis pasižymi ir kitomis naudingomis funkcijomis:

1. lipidų metabolizmui;
2. imunitetui;
3. antioksidantas;
4. kolageno sintezei;
5. karnitino biosintezei;
6. pirimidino metabolizmui;
7. cefalosporinų sintezei;
8. tirozino katabolizmui;
9. norepinefrino biosintezei;
10. vaistų metabolizmui;
11. nitrozamino susidarymui [48];
12. greičiau gyja žaizdos, mažiau kraujuoja dantenos [47];

13. geležies įsisavinimui [45].

Viena iš svarbiausių savybių yra antioksidacinis poveikis. Vitaminas C užkerta kelią laisvųjų radikalų formavimuisi, todėl sumažėja rizika susirgti įvairiomis ligomis kaip aterosklerozė, cukriniu diabetu, inkstų nepakankamumu, neurodegeneracinėmis ligomis, pankreatitu, sepsiu ir uždegiminiais sutrikimais [45].



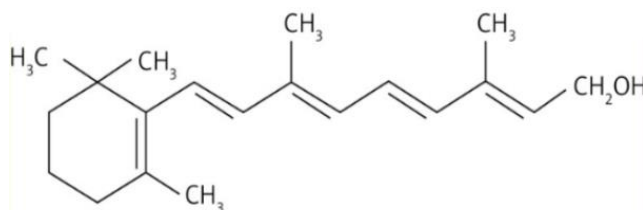
9 pav. Askorbo rūgšties struktūra [49]

Vitaminas A arba dar kitaip vadinamas retinolis yra tirpus riebaluose. Karotinai, ypač β -karotinas gaminami daugybės augalų, įskaitant ir baltąjį šilkmedį. Žarnyne β -karotinas virsta į vitaminą A. Absorbuotas iš žarnyno retinolis pernešamas į kepenis, kur jis laikomas. Normaliomis sąlygomis 95 proc. viso vitamino A kaupiasi kepenyse. Prireikus vitaminas A išsiskiria iš kepenų, tačiau būna tvirtai prijungęs prie savo specifinio baltymo nešiklio [50].

Retinolis pasižymi trimis pagrindinėmis fiziologinėmis funkcijomis:

1. Somatinė arba sisteminė – šis vitaminas reikalingas epitelio struktūrų ir kaulų vystymuisi ir diferenciacijai.
2. Reprodukcinė - vitaminas A yra būtinas placentos vystymuisi, vaisiaus bei embriono augimui.
3. Vizualinė – retinolis svarbus regėjimui, manoma, kad ir spalvų suvokimui [51].

Žmonėms, kuriems trūksta vitamino A, pasireiškia įvairios ligos. Dažniausiai sutrinka regėjimas, išsivysto akių liga (kseroftalmija). Taip pat sutrinka organizmo atsparumas infekcijoms. Vitamino perdozavimas irgi nėra naudingas sveikatai. Gali pasireikšti galvos skausmas, galvos svaigimas, sutrikti virškinimas, lupstis odos epidermis [52].



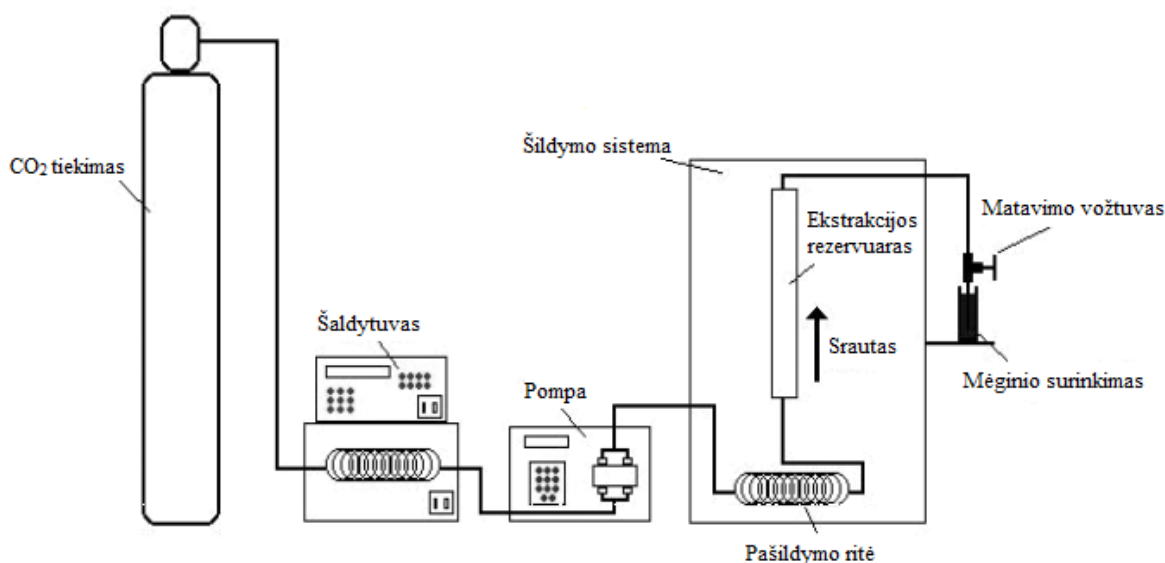
10 pav. Retinolio struktūra [53]

1.5. Bioaktyviųjų junginių išskyrimas

Kokybiniai ir kiekybiniai bioaktyviųjų junginių iš augalinių medžiagų tyrimai daugiausia priklauso nuo tinkamo ekstrakcijos metodo pasirinkimo. Ekstrahavimas yra pirmasis bet kokio vaistinio augalo tyrimo žingsnis ir turi įtakos galutiniam rezultatui. Kiti svarbūs veiksniai ekstrahavimo procesams yra augalo dalies savybės, tirpiklis, temperatūra, slėgis ir laikas. Vieni iš naudojamų metodų yra SKE-CO₂ (superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu) ir ETPS (pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais) [54].

SKE yra pigus ir efektyvus metodas. Naudojamas superkritinis skystis gali būti bet kuri medžiaga, kurios temperatūra ir slėgis viršija kritinį tašką. Jis gali sklisti per kietąsias medžiagas kaip dujos ir, kaip skystis ištirpinti medžiagas. Superkritiniai skysčiai yra tinkami kaip organinių tirpiklių pakaitalai įvairiuose pramoniniuose ir laboratoriniuose procesuose [55]. Anglies dioksidas ir vanduo yra dažniausiai naudojami superkritiniai skysčiai. Anglies dioksidą paprasta naudoti, jis yra nebrangus, nedegus, netoksiškas, chemiškai stabilus ir gali būti lengvai ir visiškai pašalinamas iš bet kokio ekstrakto [56].

Ekstraktorius yra sudarytas iš CO₂ dujų ekstrakcijos, mėginio surinkimo rezervuarų, aušinimo, kaitinimo sistemų, pompos (žr. 11 pav.). CO₂ dujos iš rezervuaro patenka į aušintuvą, kad dujos suskystėtų. Tolimesniame etape šios dujos yra pakaitinamos ir atitinkamu slėgiu tiekiamos į ekstrakcijos rezervuarą. Tada superkritinis skystis ir jame ištirpę komponentai patenka į surinkimo rezervuarą, kuriame modifikuojant slėgį arba temperatūrą, jie gali būti kondensuojami kondensatoriuje [55].

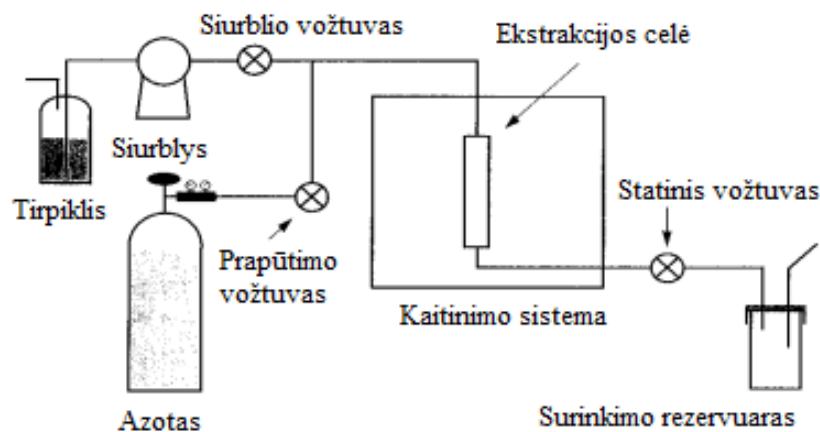


11 pav. SKE-CO₂ ekstrakatoriaus schema [55]

Pagreitintos ekstrakcijos organiniais tirpikliais metodas naudojamas nuo 1995 metų. ETPS sistemoje ekstrahavimo procesas atliekamas esant temperatūrai, viršijančiai tirpiklio virimo temperatūrą, o slėgis ekstrahavimo kameroje turi būti aukštas, kad tirpiklis būtų skystas. Tiek temperatūra, tiek slėgis turi įtakos proceso efektyvumui. Esant temperatūrai nuo 50–150 °C padidėja analičių tirpumas, difuzijos greitis, susilpnėja van der Valso jėgos, sumažėja tirpiklio klampa ir paviršiaus įtempis [57].

ETPS ekstraktorių sudaro tirpiklio, azoto, surinkimo rezervuarai, siurblys, kaitinimo sistema, ekstrakcijos celė (žr. 12 pav.). Pirmiausia sistema yra pašildoma iki reikiamos temperatūros, tada įstatoma celė pripildyta augaline žaliava, kad procesas vyktų tolygiau žaliava dažnai sumaišoma su bevandeniu natrio sulfatu ar diatomitu. Vėliau celė patenka į kaitinimo sistemą, užpildoma tirpikliu ir prasideda gavybos procesas. Užpildymo procesas yra labai svarbus, nes apsaugo junginius nuo sąveikos su deguonimi ir oksidacinių procesų [58].

Šia sistema lengva naudotis, trumpas ekstrahavimo laikas (apie 15 min). ETPS metodas taip pat yra pigus, greitas, reikalingas nedidelis tirpiklio kiekis ekstrakcijai, galima naudoti įvairius tirpiklius, išskyrus stiprias rūgštis ir bazines, automatizuota sistema kontroliuoja procesą [57].



12 pav. ETPS ekstraktoriaus schema [58]

Augaliniai ekstraktai yra naudojami tolimesniems tyrimams, identifikuojami juose esantys junginiai. Šie ekstraktai paprastai yra labai vertingi, nes juose yra įvairių bioaktyvių junginių, kurie naudingi žmogaus sveikatai, pasižymi antioksidaciniu, antikancerogeniniu, antimikrobiniu, antimutageniniu, priešuždegiminiu poveikiu [59]. Todėl yra plačiai naudojami maisto pramonėje kuriant funkcinius maisto produktus. Natūralūs ekstraktai yra naudojami kaip konservantai, pailgina produktų galiojimo laiką, sumažina riziką apsinuodyti maistu, nes slopinamas bakterijų (*bacillus cereus*, *staphylococcus aureus*, *escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *salmonella typhi*) dauginimasis [60]. Taip pat ekstraktai panaudojami ir vaistų pramonėje. Slopina bakterijų dauginimąsi, kurios sukelia infekcijas žmogaus organizme [61].

1.6. Laisvieji radikalai ir jų poveikis

Laisvieji radikalai yra chemiškai aktyvūs, nestabilūs, atomai, jonai arba molekulės, kurie turi nesuporuotus elektronus. Taip pat jie pasižymi trumpa gyvavimo trukme ir paprastai jų poveikis pasireiškia toje vietoje, kur šie junginiai susidaro. Kai kurios laisvųjų radikalų rūšys prasiskverbia į ląstelę ir sukelia DNR pažeidimus, lipidų peroksidaciją, baltymų fragmentaciją (žr. 1 lentelė). Šių procesų susiformavimas lemia neurodegeneracinių, širdies ir kraujagyslių, lėtinių ligų išsivystymą, pagreitina senėjimo procesus, atsiranda nutukimo rizika [62].

1 lentelė. Laisvųjų radikalų klasifikacija ir poveikis [62]

Laisvasis radikalas	Molekulinė formulė	Poveikis
1) Reaktyviosios deguonies formos	ROS	lipidų oksidacija ir peroksidacija baltymų oksidacija DNR pažeidimas
Superoksido jonas	$O_2^{\cdot-}$	
Ozonas	O_3	
Singletinis deguonis	1O_2	
Hidroksilo radikalas	OH^{\cdot}	
Vandenilio peroksidas	H_2O_2	
Hipochlorito rūgštis	HOCl	
Alkoksilo radikalas	RO^{\cdot}	
Peroksilo radikalas	ROO^{\cdot}	
Hidroperoksilo radikalas	$ROOH^{\cdot}$	
2) Reaktyviosios azoto formos	RNS	lipidų peroksidacija DNR pažeidimas baltymų oksidacija
Azoto oksidas	NO^{\cdot}	
Azoto dioksidas	NO_2^{\cdot}	
Peroksinitritas	$ONOO^{\cdot-}$	baltymų oksidacija DNR pažeidimas ROS gamyba
3) Reaktyviosios sieros formos	RSS	
Thil radikalas	RS^{\cdot}	

Laisvieji radikalai organizme susiformuoja skirtingų biocheminių procesų metu, įskaitant: molekulinio deguonies redukciją aerobinio kvėpavimo metu gaunant superoksido ir hidroksilo radikalus; šalutiniai produktai po katecholaminų oksidacijos ir arachidono rūgšties pakopinio aktyvinimo; superoksido ir hipochlorito rūgšties (HOCl) gamyba aktyvintais fagocitais; azoto oksido gamyba kraujagyslių endotelėje ir kitose ląstelėse. Be to, laisvieji radikalai gali būti gaminami veikiant elektromagnetine spinduliuote, pavyzdžiui gama spinduliais gali suskaidyti vandenį ir taip gauti hidroksilo radikalus [63].

ROS pažeidžia sveikas ląsteles, pakeičia jų funkciją, sukelia organizme uždegimą ir išsivysto tokios ligos kaip glomerulonefritas (inkstų pažeidimas), vaskulitas (kraujagyslių uždegimas), reumatoidinis artritas (sąnarių uždegimas), pankreatitas (kasos uždegimas). Taip pat sukelia širdies ir kraujagyslių ligas, padidėja infarkto, insulto rizika. Žmogui pasireiškia ankstyvas senėjimo požymiai, pažeidžiamos kepenys, akys, gali atsirasti smegenų, nervų sistemos pažeidimai. Laisvųjų radikalų kiekis gali padidėti dėl netinkamos mitybos, per mažai su maistu vartojant antioksidantų, vitaminų. Taip pat ROS formavimą skatina: geležies perteklius, alkoholio vartojimas, kraujo perpylimai, saulės radiacija, apsinuodijimas švinu, cigarečių dūmai [64].

1.7. Antioksidantai

Ląstelės sugeba apsisaugoti nuo žalingo laisvųjų radikalų poveikio dėka antioksidantų. Šie junginiai pašalina ir užkerta kelią reaktyviųjų deguonies rūšių susidarymui. Antioksidaciniai junginiai atiduoda laisviesiems radikalams elektronus, juos neutralizuoja ir taip jie pašalinami iš organizmo. Antioksidantų veikimas yra priešingas nei laisvųjų radikalų [65].

Šie bioaktyvūs junginiai yra skirstomi į endogeninius ir egzogeninius. Egzogeniniams priklauso:

1) augalų fenoliai (flavonoidai ir fenolinės rūgštys);

- 2) vitaminai (E, C, beta-karotenas);
- 3) mineralai (cinkas, selenas, magnis) [66].

Endogeniniai:

- 1) fermentai (superoksido dismutazė, katalazė, glutationo peroksidazė, glutationo reduktazė, tioredoksino reduktazė, gliukozės-6-fosfato dehidrogenazė);
- 2) nefermentiniai (glutationas, lipoinė rūgštis, šlapimo rūgštis, NADPH, albuminas, bilirubinas) [67].

1.8. Šilkmedžio lapų antioksidacinis poveikis aliejuje

Laikant ir kepant lipidai yra jautrūs oksidacijai. Būdingi pokyčiai, susiję su oksidaciniu pablogėjimu, apima nemalonių skonių, kvapų atsiradimą, spalvos, konsistencijos pokyčius. Oksidacijos metu susidaro hidroperoksidai, kurie suyra ir susidaro produktai, tokie kaip alkoholiai, aldehydai, ketonai ir angliavandeniliai, kurie suteikia nemalonų aromatą. Taip pat padidėja laisvųjų riebalų rūgščių kiekis. Norint pailginti lipidų galiojimo laiką, naudojami antioksidantai.

Indijos mokslininkai išanalizavo šilkmedžio (lot. *Morus indica L.*) lapų ekstraktų ir miltelių antioksidacinį aktyvumą ryžių sėlenų aliejuje. Aliejus 5 dienas buvo oksiduojamas 100 °C temperatūroje. Prieš tai buvo nustatytas antioksidantų kiekis lapuose. Paaiškėjo, kad juose yra askorbo rūgšties, α -tokoferolio, b-karotino ir glutationo. Aliejuose, kuriuose buvo pridėta šilkmedžio ekstrakto, peroksido vertės buvo mažesnės, lyginant su kontrole. Taip pat radikalų pašalinimo aktyvumas (RSA) buvo didesnis, lyginant su aliejumi be priedų. Tai įrodo šilkmedžio lapų efektyvumą slopinant lipidų oksidaciją. Kito tyrimo metu aliejus buvo valandą termiškai apdorotas 180 °C temperatūroje. Gauti tyrimai parodė mažesnes peroksido vertes ir didesnę RSA kiekį. Tad galima teigti, kad pridedant natūralių antioksidantų, pailgėjo aliejaus stabilumas ir šilkmedžio ekstraktai turėjo geresnį poveikį nei milteliai. Šilkmedžio lapai gali būti puikiu valgomojo aliejaus antioksidantu [3].

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimams buvo naudojami baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) džiovinti lapai. Šie lapai buvo renkami 2019 metų rugsėjo pabaigoje iš privataus ūkio, Kauno rajone. Lapai buvo džiovinami 25 °C ir apsaugoti nuo tiesioginių saulės spindulių.

2.2. Reagentai

Ekstraktų paruošimui naudoti reagentai:

- analitinio grynumo etanolis, heksanas, acetonas, metanolis („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija);
- distiliuotas vanduo („Milipore“, Bedford, JAV);
- CO₂ dujos („Aga Sia“, Ryga, Latvija);
- azoto dujos („Aga Sia“, Ryga, Latvija);
- diatomitinė žemė („Thermo scientific“, JAV).

Antioksidacinio aktyvumo nustatymo eksperimentams:

- Folin Ciocalteu („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija);
- galo rūgštis („Fluka“, Lenkija);
- natrio karbonatas (Na₂CO₃) („Chempur“, Lenkija);
- DPPH[•] („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija);
- BHT („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija);
- ABTS^{•+} reagentas („Sigma Aldrich“, Vokietija);
- troloksas („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija);
- 2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija);
- fluoresceinas („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija);
- vienkartinės, plastikinės kiuvetės („Fluka“, Lenkija);
- PBS tirpalo paruošimui: NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, KCl, K₂S₂O₈ („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija).

Chromatografinės analizės tyrimams:

- ESCh grynumo tirpikliai kaip metanolis, acetonitrilias („Sigma Aldrich“, Darmstadt, Vokietija);
- ultra švarus vanduo („Milipore“, Bedford, JAV).

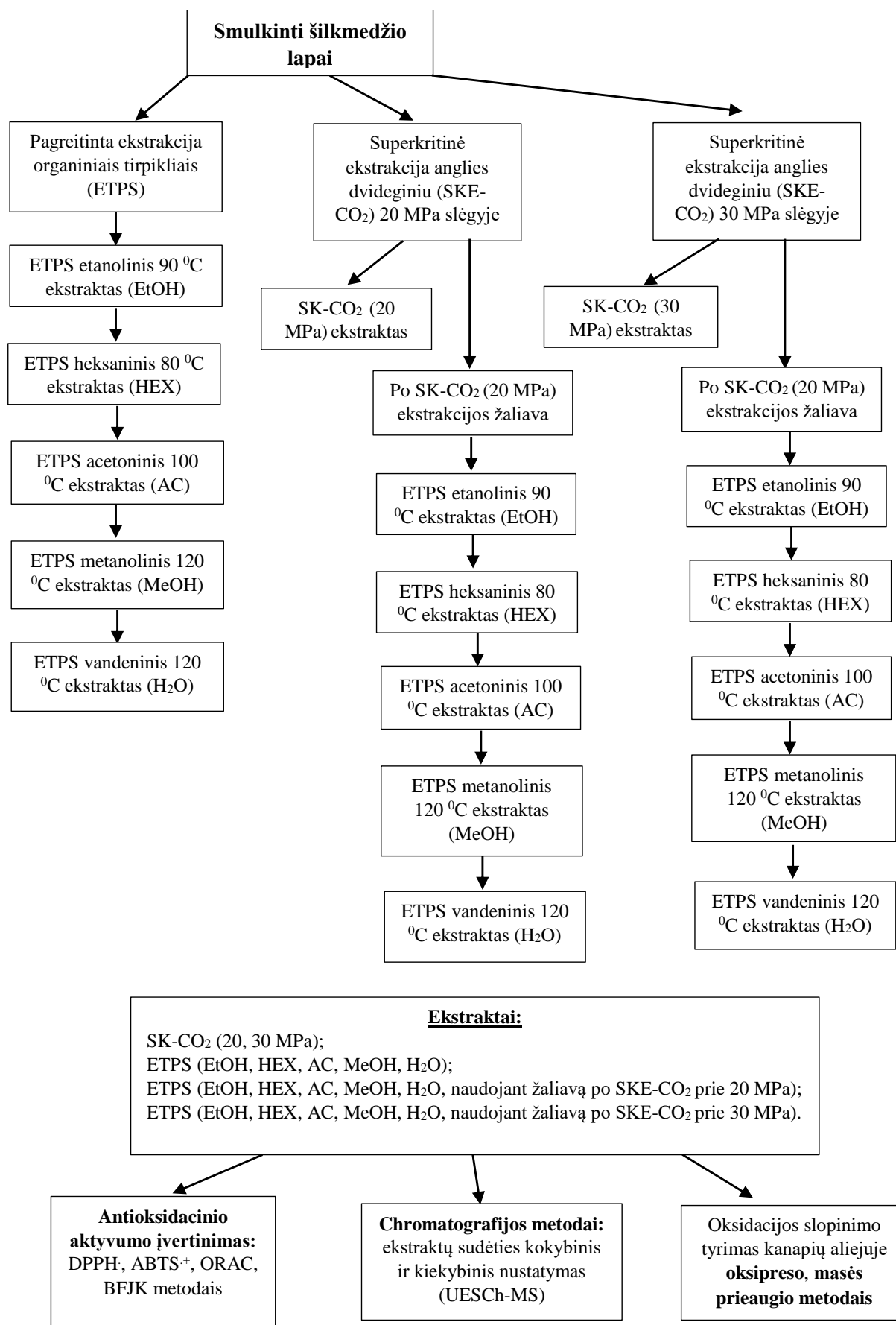
2.3. Naudoti prietaisai

- Dionex ASE 350 ekstraktorius („Thermo Scientific“, Massachusetts, JAV);
- Speed SFE Prime ekstraktorius („Applied Separation“, Allentown, JAV);
- rotacinis - vakuminis garintuvas („BÜCHI Labortechnik GmbH“, Essen, Vokietija);
- ultragarsinė vonelė „Ultrasonic power“ („Emag“, Vokietija);
- TurboVap LV garintuvas („Marshall scientific“, Hampton, JAV);
- ZM 200 malūnas („Retsch, Haan“, Vokietija);
- skaitytuvas FLOUstar Omega („BMG Labtech GmbH“, Ortenberg, Vokietija);
- analitinės svarstyklės SCALTEC („SCALTEC instruments GmbH“, Göttingen, Vokietija);
- oksipresas Mikrolab Aarhus („Mikrolab Aarhus“, Højbjerg, Danija);

- Genesys UV-Vis spektrofotometras („Thermo Scientific“, Rocester, JAV);
- automatinės pipetės: 20-200 µl ir 100-1000 µl („CAPP“, Danija);
- termostatas („TermoOctat“, TC-80 M-2);
- mikrolėkštelės („Anicrin, Scorze“, Italija);
- Acquity Ultra Performance LC skysčių chromatografas („Waters, Milford“, JAV) su Bruker maxis 4G masių spektrometru („SelectScience“, Billerica, JAV).

2.4. Augalo paruošimas ir ekstraktų gamyba

Ekstraktams paruošti buvo naudojami išdžiovinti baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) lapai. Lapai buvo susmulkinti laboratoriniu malūnėliu Mill ZM 200 (Vokietija) naudojant 0,5 mm skylučių diametro sietelį. Susmulkinti lapai buvo laikomi sandariame, stikliniame inde. Vėliau ši žaliava buvo panaudota ekstraktams gauti. Buvo panaudoti šie ekstrakcijų metodai: pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ETPS), superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE-CO₂). Tyrimų schema pateikta 13 paveiksle.



13 pav. Šilkmedžio lapų ekstraktų gamybos ir tyrimų schema

2.4.1. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ETPS)

Dionex ASE 350 ekstraktorius (Massachusetts, JAV) buvo naudojamas ekstrakcijoms atlikti. Pirmiausia celės buvo užpildomos 5,1 g šilkmedžio lapais sumaišytas su 5 g diatomitine žeme. Diatomitinė žemė buvo naudojama tam, kad procesas vyktų tolygiau. Kiekvienos celės galuose buvo dedami celiuliozės filtrai, kad nepatektų dalelių į šilkmedžio lapų ekstraktus. Ekstrakcijos buvo atliekamos skirtingais tirpikliais ir priklausomai nuo tirpiklio buvo parenkamos skirtingos temperatūros. Etanolinėms ekstrakcijoms buvo naudojama 90 °C temperatūra, heksaninėms – 80 °C, acetoniinėms – 100 °C, metanolinėms, vandeninėms – 120 °C. Ekstrakcija buvo vykdoma trimis ciklais po 15 minučių, esant 10 MPa slėgiui. Po ekstrakcijos organiniai tirpikliai buvo pašalinami naudojant rotacinį garintuvą (Vokietija) ir dar papildomai džiovinami azotu. Surinkti šilkmedžio lapų ekstraktai buvo laikomi stikliniuose buteliukuose -18 °C temperatūroje.

2.4.2. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE-CO₂)

Ekstrakcijos buvo vykdomos su Speed SFE Prime ekstraktoriumi (Allentown, JAV). Celė 20 cm³ buvo pripildyta 20 gramų žaliavos. Abiejuose celės galuose buvo uždėtos guminės tarpinės ir gabaliukas vatos. Prieš pradėdant eksperimentą buvo nustatyta 50 °C temperatūra, slėgis buvo parinktas 20 ir 30 MPa. Visų pirma, 10 min vyko statinė ekstrakcija, o vėliau dinaminė ekstrakcija. Dinaminės ekstrakcijos metu buvo palaikomas pastovus 2 l/min srautas. Ekstrahavimo laikas buvo nustatomas rankiniu būdu, kas 10 minučių fiksuojant ekstrakto svorį. Kai svoris nebekito, ekstrakcija buvo nutraukiama. Ekstraktas rinktas į stiklinį buteliuką, kuris prieš atliekant eksperimentą buvo pasvertas. Vėliau ekstraktai buvo sudėti į mažesnius, tamsius buteliukus ir laikomi šaldytuve 4 °C temperatūroje iki kitų tyrimų.

2.5. Mėginių paruošimas eksperimentams

Antioksidacinio aktyvumo tyrimams buvo paruošiami 1 % koncentracijų ekstraktų tirpalai. Ekstraktai buvo tirpinami metanolyje arba vandenyje atsižvelgiant į jų tirpumą. Vėliau priklausomai nuo tyrimo metodo ekstraktai buvo skiedžiami kelis kartus su PBS arba organiniais tirpikliais.

2.6. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) Folin-Ciocalteu metodu

Naudojantis Folin-Ciocalteu'o (1927) metodiniu aprašymu buvo nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis [68]. Šiam metodui atlikti naudojamas reagentas Folin-Ciocalteu (Šveicarija).

Eksperimentui atlikti buvo ruošiamas natrio karbonato (Na₂CO₃) 7,5 % tirpalas. Taip pat Folin-Ciocalteu reagentas buvo ištirpintas distiliuotame vandenyje, santykiu 1:9. Fenolinių junginių kiekio nustatymui 150 μl 0,1 % ekstraktas buvo sumaišytas su 550 μl Folin-Ciocalteu reagentu ir 450 μl Na₂CO₃. Paruošti mėginiai buvo inkubuojami 30 minučių ir tada buvo išmatuoti rezultatai naudojant Genesys UV-Vis spektrofotometrą (Rocester, JAV), kai bangos ilgis buvo 765 nm. Kalibracinė tiesė buvo nubrėžta naudojant etaloninius galo rūgšties tirpalus. Bendras fenolinių junginių kiekis buvo apskaičiuotas pagal (1) formulę, o rezultatas išreikštas galo r. ekvivalentais (mg/g GRE).

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

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

c – galo rūgšties koncentracija išreikšta pagal kalibracinę kreivę mg/ml;

V – ekstrakto tūris ml; m – ekstrakto masė.

2.7. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH[·]) radikalų sujungimo tyrimas

Naudojantis Brand-Williams'o ir kt. (1995) metodiniu aprašymu buvo atliktas laisvųjų radikalų (DPPH[·]) sujungimo eksperimentas [69]. Pirmiausia buvo paruoštas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalo tirpalas. Pasvertas 0,0059 g DPPH[·] buvo ištirpintas metanolyje, 250 ml matavimo kolboje. Tada į vienkartinės kiuvetes buvo pilama 10 µl 0,1 % ekstrakto ir 990 µl DPPH[·]. Vėliau mėginiai buvo inkubuojami 30 minučių ir tada buvo išmatuotas šviesos absorbcijos sumažėjimas su Genesys UV-Vis spektrofotometru (Rocester, JAV), kai bangos ilgis 515 nm.

Kalibracinė tiesė buvo nubrėžta naudojant etaloninius trolokso tirpalus, skirtingomis koncentracijomis. DPPH[·] radikalų sujungimas buvo apskaičiuotas pagal (2) formulę, o rezultatas išreikštas trolokso ekvivalentais (µmol/g ekstrakto).

$$\text{DPPH}_{\text{inaktyvumo}} \% = \frac{\text{DPPH}_{T_0} - \text{DPPH}_{T_i}}{\text{DPPH}_{T_0}} \cdot 100 \%;$$
 (2)

čia: DPPH_{T₀} – absorbcija tuščio bandinio;

DPPH_{T_i} – absorbcija bandinio su ekstraktu.

2.8. 2,2-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties) (ABTS^{·+}) laisvųjų radikalų-katijonų sujungimas

Re'o ir kt. (1999) metodinis aprašymas buvo panaudotas (ABTS^{·+}) laisvųjų radikalų sujungimo tyrimui [70]. Pirmiausia buvo paruoštas 500 ml kolboje PBS tirpalas. Šiam tirpalui paruošti buvo įdėta 4,09 g NaCl, 0,135 g KH₂PO₄, 0,71 g Na₂HPO₄, 0,075 g KCl ir praskiesta distiliuotu vandeniu iki matavimo kolbos žymės, kad pH būtų 7,4. Tada buvo pasverta 0,0549 g ABTS^{·+} reagento ir sumaišyta su 50 ml PBS tirpalu, kad būtų gautas pradinis ABTS^{·+} tirpalas. Kito tirpalo paruošimui 0,0038 g K₂S₂O₈ buvo ištirpintas 200 µl distiliuotame vandenyje. Vėliau šie du tirpalai buvo sumaišomi ir laikomi 15 valandų, tamsioje patalpoje, 24 °C temperatūroje.

ABTS^{·+} laisvųjų radikalų sujungimui į vienkartinę kiuvetę buvo įpilta 10 µl 0,1 % ekstrakto, 990 µl ABTS^{·+} tirpalo ir inkubuojama 6 min. Po inkubacijos buvo matuojami rezultatai su Genesys UV-Vis spektrofotometru (Rocester, JAV), kai bangos ilgis 734 nm.

Kalibracinė kreivė buvo nubrėžta naudojant etaloninius trolokso tirpalus, skirtingomis koncentracijomis. Trolokso ekvivalento antioksidacinis koeficientas (TEAC) buvo apskaičiuotas padalinus antioksidanto inhibicijos tiesės kampą iš trolokso kalibracinės kreivės inhibicijos tiesės kampo.

2.9. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)

ORAC eksperimentas atliktas pagal Prior'o ir kt. (2003) metodikos aprašą su nedideliais pakeitimais [71]. Eksperimentui atlikti yra naudojami PBS, azobio ir fluoresceino tirpalai. Azobio tirpalas buvo gautas, 0,651 g AAPH ištirpinus 10 ml PBS. Fluoresceino tirpalai buvo paruošti trijų koncentracijų:

S₁ = 0,045 g fluoresceino ištirpinta 100 ml PBS;

S₂ = 0,5 ml S₁ tirpalo skiesta 100 ml PBS;

S₃ = 0,8 ml S₂ tirpalo skiesta 50 ml PBS.

Tada 25 µl pilama ekstrakto į mikrolėkšteles, užlipama 150 µl S₃ fluoresceino tirpalu ir dedama 15 minučių 37 °C inkubacijai į FLOUstar Omega skaitytuvą (Voketija). Vėliau į mikrolėkšteles buvo dar pilamas azobio tirpalas. Eksperimentas vyko 120 minučių, kai emisijos bangų ilgis 520 nm. Kalibracinė kreivė buvo nubrėžta pagal skirtingas trolox koncentracijas (3–40 µM). Rezultatai buvo apskaičiuoti, naudojantis kalibracine kreive ir ploto regresijos lygtimi. Plotas po kreive (AUC) buvo apskaičiuotas pagal šią (3) formulę:

$$\text{AUC} = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_n/f_0; \quad (3)$$

čia: f_0 – pradinė fluorescencijos vertė;

f_1 – fluorescencijos vertė tam tikrą laiką.

2.10. Riebalų oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipreso metodu

Šiam tyrimui buvo pasirinktas kanapių aliejus, o jo oksidacinis stabilumas buvo įvertintas naudojantis Sabolová ir kt. (2017) metodiniu aprašymu [72].

Pirmiausia į oksipreso stiklinius buteliukus buvo įpilta po 6 g kanapių aliejaus su ekstraktu. Tada buteliukai buvo patalpinti į metalines celes, o celės įdedamos į Mikrolab Aarhus oksipreso aparatą (Højbjerg, Danija). Temperatūra buvo nustatyta 110 °C, o slėgis – 0,5 MPa. Kompiuteris automatiškai nubrėžė deguonies slėgio kitimo kreives, tada buvo nubrėžtos liestinės ir jų susikirtimo taškas parodė IP (indukcinį periodą). Indukcinis periodas parodo, riebalų patvarumą oksidacijai.

2.11. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas masės priaugio metodu

Antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas pagal Gordon'o (2001) metodiką [73]. Eksperimentui buvo naudojamas kanapių aliejus.

Pirmiausia 77 g aliejaus buvo sumaišyta su 0,077 g ekstraktu ir tirpinama ultragarso vonelėje 30 min. Vėliau mėginiai buvo išpilstyti po 25 gramus į chemines stiklines ir sudedami į termostatą 40 °C temperatūroje. Mėginių svoris buvo fiksuojamas kas antrą, trečią dieną, tris mėnesius. Svoris padidėja, nes atmosferos deguonis jungiasi su nesočiosiomis riebalų rūgštimis. Ekstraktų antioksidaciniui aktyvumui įvertinti buvo nustatytas mėginių indukcinis periodas (IP) ir buvo palygintas su tuščiojo bandinio ir aliejaus su sintetiniu BHT indukcinio periodu.

2.12. Peroksidų skaičiaus nustatymas jodimetriniu metodu

Peroksidų skaičius buvo nustatytas pagal Semb'o (2012) metodiką [74]. Šis procesas yra svarbus, nes parodo, kiek riebaluose yra peroksidų arba į šias medžiagas panašių lipidų oksidacijos produktų. Taip pat šis metodas leidžia įvertinti riebalų sugedimo laipsnį.

Pirmiausia į kūginę kolbą buvo pasverta 5 g riebalų, užpilama 30 ml chloroformo, ledinės acto rūgšties, santykiu 2:3 ir įpilta kalio jodido tirpalo, kuris buvo tirpintas distiliuotame vandenyje. Tada paruoštas mėginys buvo plakamas 1 minutę. Po minutės įpilta 30 ml distiliuoto vandens bei įlašinta 5 lašai 1 % krakmolo kleisterio. Tada buvo titruojamas mėginys 0,01 N Na₂SO₄ tirpalu iki kol išnyko mėlyna jodo spalva. Taip pat buvo atliekamas ir kontrolinis bandinys, tik be aliejaus. Peroksidų skaičius išreiškiamas mekv/kg ir buvo apskaičiuotas pagal (4) formulę:

$$\text{PS} = \frac{(V - V_1) \cdot N \cdot 1000}{m}; \quad (4)$$

čia: V , V_1 - Na_2SO_4 tirpalas sunaudotas tiriamiesiems ir kontroliniams bandiniams nutitruoti, ml;
 N - Na_2SO_4 tirpalo koncentracija;
 m – bandinio masė, g.

2.13. Ekstraktų ir trigliceridų sudėties, bei kiekio nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos masių spektrometrijos metodu

Ekstraktų ir trigliceridų sudėčiai nustatyti buvo naudojamas Acquity Ultra Performance LC skysčių chromatografas (JAV) su Bruker maxis 4G masių spektrometru (JAV). Metodas buvo sudarytas naudojant Taleuzzaman'o ir kt. (2015) metodinį aprašymą su nedideliais pakeitimais [75].

Junginiams išskirstyti buvo naudojama BEH C18 kolonėlė (50 x 2,1 mm) su 1,7 μm sorbento dalelių dydžiu. Kolonėlės temperatūra buvo palaikoma 25 $^{\circ}\text{C}$. Eliuentų sistemą sudarė A – 0,4 % skruzdžių rūgšties vandeninis tirpalas, B – acetonitrilas. Analizės pradžioje B buvo 0 %, o A 100 %, vėliau per 9 min B buvo padidintas iki 100 %. Šiose sąlygose buvo išlaikyta 1 min. Po to per 1 min gradientas buvo sugražintas į pradines sąlygas. Judriosios fazės greitis buvo nustatytas 0,4 ml/min, o įleidžiamas mėginio tūris buvo 1 μL . Aptikti junginiai buvo identifikuojami specialiu diodų matricos detektoriumi (DMD), esant bangos ilgių intervalui 220–450 nm. Detektoriaus parametrai buvo nustatyti ir gauti duomenys buvo apdoroti, naudojant HyStar programinę įrangą. MS eksperimentai buvo atlikti neigiamos jonizacijos režimu, naudojant +4000 V kapiliaro įtampą, azoto dujas džiovinimui, kai tėkmės greitis – 10 l/min, o išpurškimo slėgis 0,2 MPa. Tarpusavyje derinant pilno skenavimo ir MS/MS modelius buvo apskaičiuotos tikslios junginių molekulinės formulės intervale 100–1500 m/z, kai skenavimo greitis buvo 2,5 Hz. Naudojant MS/MS modelį buvo nustatyti junginiai, kurių negalima vienareikšmiškai identifikuoti vien tik pagal tikslias mases. Pagal junginių masės spektrus, eliucijos trukmės sutapimą, gautus fragmentus buvo atliktas chromatografinių smailių identifikavimas. Gauti duomenys buvo lyginami su literatūros duomenimis. Identifikavimui nežinomų junginių buvo taikytas režimas – MS/MS, kai celėje fragmentavimo įtampa buvo 35 eV.

Pagal Ikeda ir kt. (2009) metodinį aprašymą buvo identifikuoti trigliceridai [76]. Trigliceridų analizei buvo naudojama ta pati Acquity Ultra Performance LC sistema (JAV) su masių spektrometru, kurioje buvo nustatyta 350 $^{\circ}\text{C}$ temperatūra, analinės trukmės laikas buvo 4 min. 250 ml mobili fazė buvo paruošta iš 81,85 % metanolio, 0,05 % amonio acetato, 18,0 % 2-propanolio, 0,10 % acto rūgšties. Eliuento tėkmės greitis – 0,4 ml/min. ESI režimu veikė masių spektrometras, 150 V buvo nustatytas fragmentavimo potencialas, o kapiliarų įtampa -4000 V. Intervale nuo 200 iki 1000 m/z buvo gauti masių spektrai. Vėliau buvo atliktas chromatografinių smailių identifikavimas ir procentinis trigliceridų sudėties nustatymas pagal smailių plotų procentus.

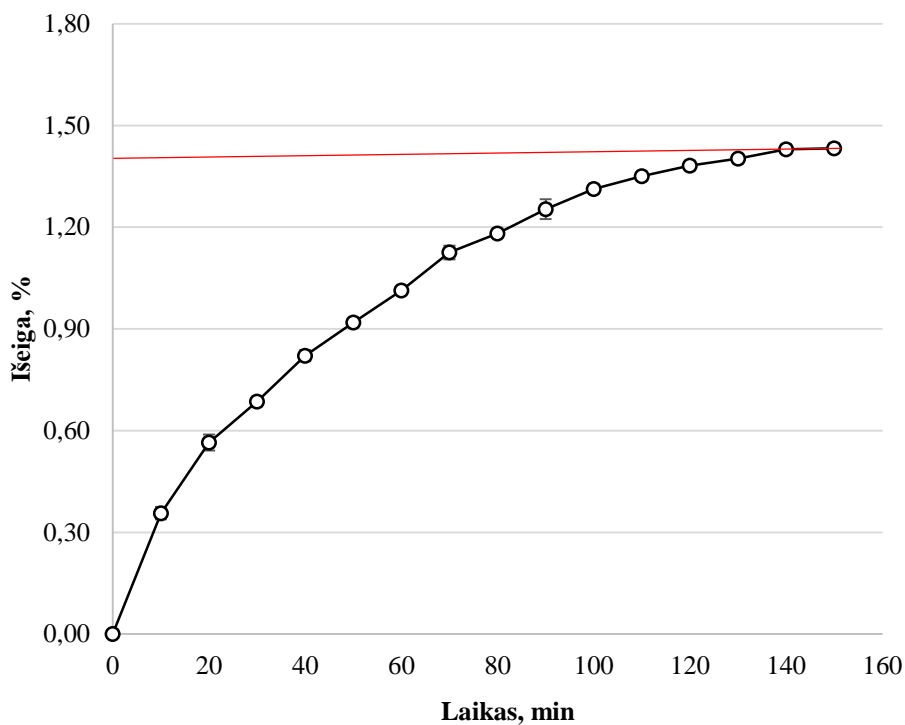
2.14. Statistinis rezultatų apdorojimas

Tyrimų duomenys buvo apdoroti naudojant „Microsoft Office Excel“ ir statistines programas: „SPSS Statistics 25“, „Student's TEST“. Tyrimai buvo atlikti trimis pakartojimais, o duomenys išreikšti vidurkiais ir įvertintas vidutinis standartinis nuokrypis (STDEV).

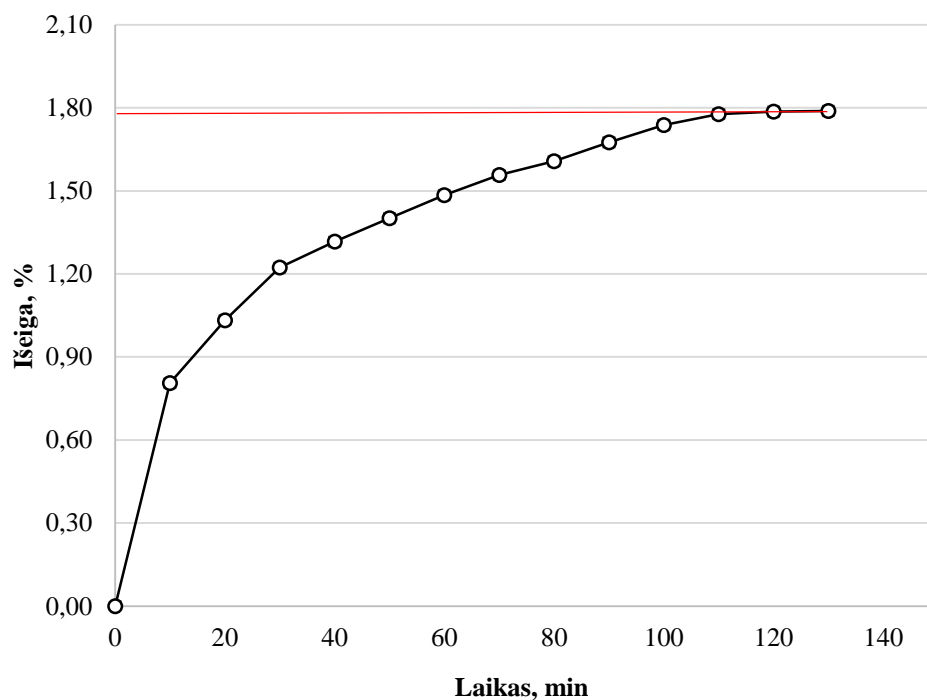
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Ekstraktų išėigos taikant superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE-CO₂)

SKE-CO₂ ekstrahavimo metodas naudotas lipofiliniams junginiams išskirti. Procesas buvo vykdomas 60 °C temperatūroje, 20 ir 30 MPa slėgyje. Gauti rezultatai yra pateikti 14 ir 15 paveiksluose.



14 pav. Šilkmedžio lapų SKE-CO₂ ekstrakcijos kinetika 20 MPa slėgyje, 60 °C



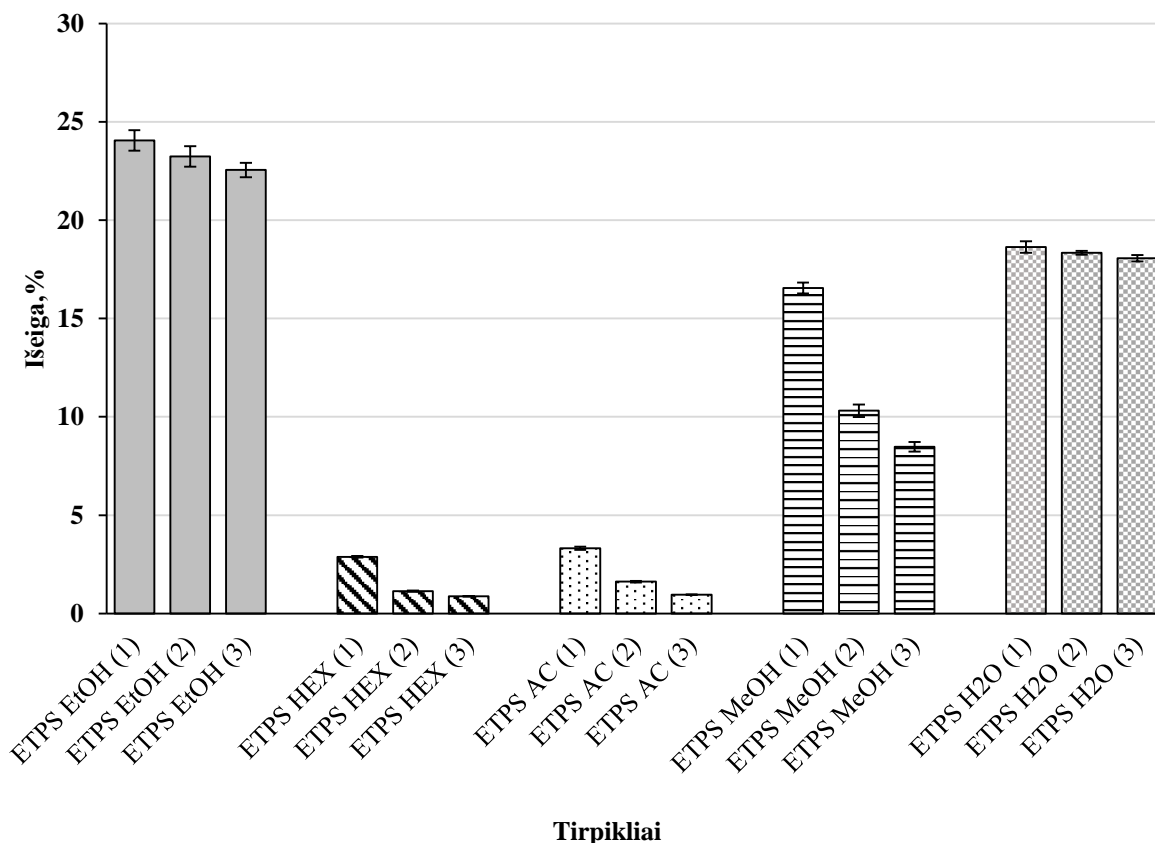
15 pav. Šilkmedžio lapų SKE-CO₂ ekstrakcijos kinetika 30 MPa slėgyje, 60 °C

Atlikus ekstrakcijas su šilkmedžio lapais nustatyta, kad 30 MPa slėgyje gaunama didesnė išeiga ($1,79 \pm 0,22$ %) nei 20 MPa slėgyje ($1,43 \pm 0,18$ %). Taip pat 30 MPa slėgyje ekstrahavimo laikas yra trumpesnis, nusistovi išeiga nuo 130 minutės. Tad galima teigti, kad išeiga padidėja keičiant slėgį, jį didinant.

Brazilijos mokslininkai atliko SKE-CO₂ ekstrakcijas, naudojant baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) lapus ir nustatė, kad 20 MPa slėgyje ir 60 °C išeiga yra 1,11 %. Lyginant rezultatus, literatūroje pateikta išeiga yra šiek tiek mažesnė [77]. Rezultatams gali turėti įtakos vieta, iš kurios buvo skinami lapai, klimatas, sezoniškumas.

3.2. Šilkmedžio lapų ekstraktų išeigos, taikant pagreintą ekstrakciją organiniais tirpikliais

ETPS ekstrakcijos buvo vykdomos naudojant skirtingus organinius tirpiklius: etanolį, heksaną, acetoną, metanolį, distiliuotą vandenį. Taip pat atsižvelgiant į tirpiklį buvo parenkamos skirtingos ekstrahavimo temperatūros nuo 80 iki 120 °C. Ekstrakcijų išeigos procentais pateiktos 16 grafike.



16 pav. Šilkmedžio lapų ekstraktų išeigos taikant ekstrakcijas tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje (ETPS)

(1) – žaliava; (2) – žaliava po SKE-CO₂ ekstrakcijos prie 20 MPa, 60 °C; (3) – žaliava po SKE-CO₂ ekstrakcijos prie 30 MPa, 60 °C.

Didžiausios ekstraktų išeigos gautos ekstrahuojant su etanoliumi ETPS EtOH (1) ($24,06 \pm 0,51$ %), ETPS EtOH (2) ($23,24 \pm 0,52$ %), ETPS EtOH (3) ($22,55 \pm 0,37$ %). Šiek tiek mažesnės išeigos nustatytos vandeniniuose ekstraktuose. Metanolinių ekstraktų išeiga varijavo nuo $8,48 \pm 0,25$ % iki $16,55 \pm 0,27$ %. Pačios mažiausios išeigos, mažiau nei 4 %, nustatytos acetoniniuose ir heksaniniuose

ekstraktuose. Galima teigti, kad rezultatams turėjo įtakos parinkto tirpiklio poliškumas. Poliškiausi tirpikliai yra etanolis ir vanduo, o nepolinis yra heksanas. Taip pat įtakos turėjo ir žaliava, mažesnės išėigos buvo gautos, naudojant žaliavą po SKE-CO₂ ekstrakcijų prie 20 ir 30 MPa slėgio.

Pietų Korėjos mokslininkai atliko šilkmedžio lapų ekstrakcijas ETPS metodu ir nustatė, kad etanolinio ekstrakto išėiga 23,9 %, o vandeninio – 20,5 % [78]. Lyginant rezultatus su literatūroje pateiktais, išėigos yra panašios.

Nastic'a ir kt. (2018) aprašė tyrimų rezultatus, kuriuose buvo pateiktos įvairių ekstraktų išėigos, skirtingais metodais. Vandeninio ekstrakto išėiga buvo 13,40 % ekstrahuojant padidinto slėgio aplinkoje, 120 °C temperatūroje [79]. Lyginant rezultatus, literatūroje pateikta išėiga yra mažesnė apie 5 %. Tikėtina, kad rezultatams įtakos turėjo šilkmedžio lapų rūšis. Serbijos mokslininkai tyrė juodojo šilkmedžio (lot. *Morus nigra*) lapus.

3.3. Šilkmedžio lapų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Antioksidacinis aktyvumas įvertintas skirtingų ekstraktų, kurie gauti ETPS ir SKE-CO₂ ekstrakcijų metu. Tyrimai atlikti naudojant DPPH[•] (laisvųjų radikalų sujungimo), ABTS^{•+} (laisvųjų radikalų-katijonų sujungimo), ORAC (deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo) ir BFJK (bendro fenolinių junginių kiekio nustatymo) metodus. Taip pat buvo nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai naudojant statistinę programą „SPSS Statistics 25“. Rezultatai pateikti 2 lentelėje.

Antioksidacinis poveikis priklauso nuo fenolinių junginių, iš kurių pagrindiniai yra flavonoidai ir fenolinės rūgštys. Bendras šių junginių kiekis ekstraktuose svyravo nuo 14,83 iki 846 mg GRE g⁻¹ ekstrakto. Esminiai skirtumai buvo nustatyti visuose bandiniuose. Mažiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas taikant ETPS ekstrakciją heksanu, panaudojant žaliavą po SKE-CO₂ 20 MPa ekstrakcijos (14,83 ± 0,33 mg GRE g⁻¹). Didžiausias kiekis šių junginių nustatytas etanoliniame ekstrakto, taikant ETPS ekstrakciją (846,38 mg ± 0,21 GRE g⁻¹). Šiek tiek mažesniu kiekiu pasižymėjo metanolinis, vandeninis ekstraktas, taikant ETPS ekstrakciją ir kiti etanoliniai ekstraktai, naudojant žaliavą po SKE-CO₂ ekstrakcijų. Ekstraktai pasižymėję dideliu polifenolių kiekiu, gali būti laikomi natūraliais antioksidantų šaltiniais.

Didžiausias antioksidacinis aktyvumas DPPH[•], ABTS^{•+} ir ORAC metodais, nustatytas metanoliniame ekstrakto, kai naudota žaliava po SKE-CO₂ ekstrakcijos, 30 MPa slėgyje. ORAC metodu mažiausiu deguonies radikalų absorbcijos pajėgumu pasižymėjo ekstraktas, gautas superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu metu, 20 MPa slėgyje (17,30 ± 0,18 mg g⁻¹ ekstrakto). ABTS^{•+} rezultatai yra labai panašūs tarpusavyje, tačiau šiek tiek mažesnis laisvųjų radikalų-katijonų sujungimas nustatytas ETPS EtOH ekstrakto (0,044 ± 0,02 mg TE g⁻¹) ir vandeniniame ekstrakto, naudojant žaliavą po SKE-CO₂ ekstrakcijos 30 MPa slėgyje (0,045 ± 0,01 mg TE g⁻¹). Statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo tarp šių ekstraktų: ETPS MeOH, ETPS MeOH, naudojant žaliavą po SKE-CO₂ ekstrakcijos 20 MPa slėgyje ir EtOH, naudojant žaliavą po SKE-CO₂ ekstrakcijos 30 MPa slėgyje. Taip pat statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo tarp vandeninio ekstrakto po ETPS ekstrakcijos ir etanolinio ekstrakto naudojant žaliavą po SKE-CO₂ ekstrakcijos 30 MPa slėgyje. DPPH[•] metodu mažiausias laisvųjų radikalų sujungimas įvertintas vandeniniame ekstrakto. ORAC, DPPH[•] metodu statistiškai reikšmingi skirtumai buvo nustatyti visuose bandiniuose.

2 lentelė. Antioksidacinio aktyvumo rezultatai, nustatyti įvairiais metodais

Mėginiai	Antioksidaciniai tyrimų metodai			
	DPPH, mmol TE g ⁻¹ ekstrakto	ABTS ⁺ , mg TE g ⁻¹	ORAC, mg g ⁻¹ ekstrakto	BFJK, mg GRE g ⁻¹ ekstrakto
Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE-CO₂)				
SKE-CO ₂ 20 MPa			17,30 ± 0,18 ^h	27,05 ± 0,44 ^o
SKE-CO ₂ 30 MPa			46,51 ± 0,34 ^g	28,13 ± 0,14 ⁿ
Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (ETPS)				
ETPS EtOH	2,71 ± 0,05 ^d	0,044 ± 0,02 ^e	274,21 ± 0,21 ^d	846,38 ± 0,21 ^a
ETPS HEX			28,57 ± 0,17 ⁱ	31,01 ± 0,16 ^m
ETPS AC				109,94 ± 0,35 ^j
ETPS MeOH	2,01 ± 0,15 ^c	0,055 ± 0,08 ^b	415,70 ± 0,26 ^c	678,05 ± 0,51 ^b
ETPS H ₂ O	5,35 ± 0,09 ^g	0,051 ± 0,06 ^c		570,94 ± 0,38 ^e
ETPS EtOH, žaliava po SKE-CO ₂ 20 MPa	4,17 ± 0,12 ^f	0,048 ± 0,12 ^d	215,31 ± 0,69 ^f	664,21 ± 0,14 ^c
ETPS HEX, žaliava po SKE-CO ₂ 20 MPa				14,83 ± 0,33 ^q
ETPS AC, žaliava po SKE-CO ₂ 20 MPa				42,57 ± 0,22 ^k
ETPS MeOH, žaliava po SKE- CO ₂ 20 MPa	1,70 ± 0,02 ^b	0,055 ± 0,08 ^b	537,28 ± 0,28 ^b	445,90 ± 0,57 ^f
ETPS H ₂ O, žaliava po SKE-CO ₂ 20 MPa				366,84 ± 0,15 ⁱ
ETPS EtOH, žaliava po SKE-CO ₂ 30 MPa	3,50 ± 0,21 ^e	0,053 ± 0,10 ^{bc}	118,11 ± 0,25 ^e	648,57 ± 0,42 ^d
ETPS HEX, žaliava po SKE-CO ₂ 30 MPa				20,77 ± 0,24 ^p
ETPS AC, žaliava po SKE-CO ₂ 30 MPa				33,36 ± 0,18 ^l
ETPS MeOH, žaliava po SKE- CO ₂ 30 MPa	1,52 ± 0,11 ^a	0,066 ± 0,04 ^a	684,72 ± 0,52 ^a	386,37 ± 0,33 ^h
ETPS H ₂ O, žaliava po SKE-CO ₂ 30 MPa	6,45 ± 0,32 ^h	0,045 ± 0,01 ^e		417,57 ± 0,48 ^g

Rezultatai pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi, (p<0,05).

Atlikus tyrimus galima teigti, jog baltojo šilkmedžio lapų ekstraktai kaip ETPS EtOH, ETPS MeOH, naudojant žaliavą po SKE-CO₂ ekstrakcijos 30 MPa slėgyje, pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, gali būti naudojami apsaugai nuo oksidacinių procesų. Pagal gautus rezultatus metanoliniai ekstraktai buvo geriausi, tačiau dėl metanolio nesuderinamumo su maistu geriausiai būtų gaminti etanolinius ekstraktus, kurie pasižymi panašiomis savybėmis.

Lenkijos mokslininkai atliko tyrimą su trimis baltojo šilkmedžio lapų veislėmis ('*Bistro*', '*Żółwińska wielkolistna*', '*Ukraińska*') ir nustatė bendrą fenolinių junginių kiekį nuo 572,8 ± 40,9 iki 761,4 ± 56,2 mg GRE g⁻¹, etanoliniame ekstrakto po ETPS ekstrakcijos [80]. Literatūroje pateikti duomenys panašūs su gautais rezultatais.

Pagal Arfan'ą ir kt. (2012) tiriamojo šilkmedžio uogų acetoniniame ekstrakte BFJK kiekis – 140 mg GRE g⁻¹, o DPPH' kiekis metanoliniame ekstrakte – 0,75 mmol TE g⁻¹. Gautuose rezultatuose acetoninio ekstrakto bendras fenolinių junginių kiekis – 109,94 mg GRE g⁻¹, o metanolinio ekstrakto DPPH' kiekis nustatytas 2,01 mmol TE g⁻¹ [81]. Šie rezultatai šiek tiek skiriasi, nes literatūroje pateikiami duomenys apie šilkmedžio uogas, o ne lapus.

3.4. Šilkmedžio lapų ekstraktų cheminė sudėtis

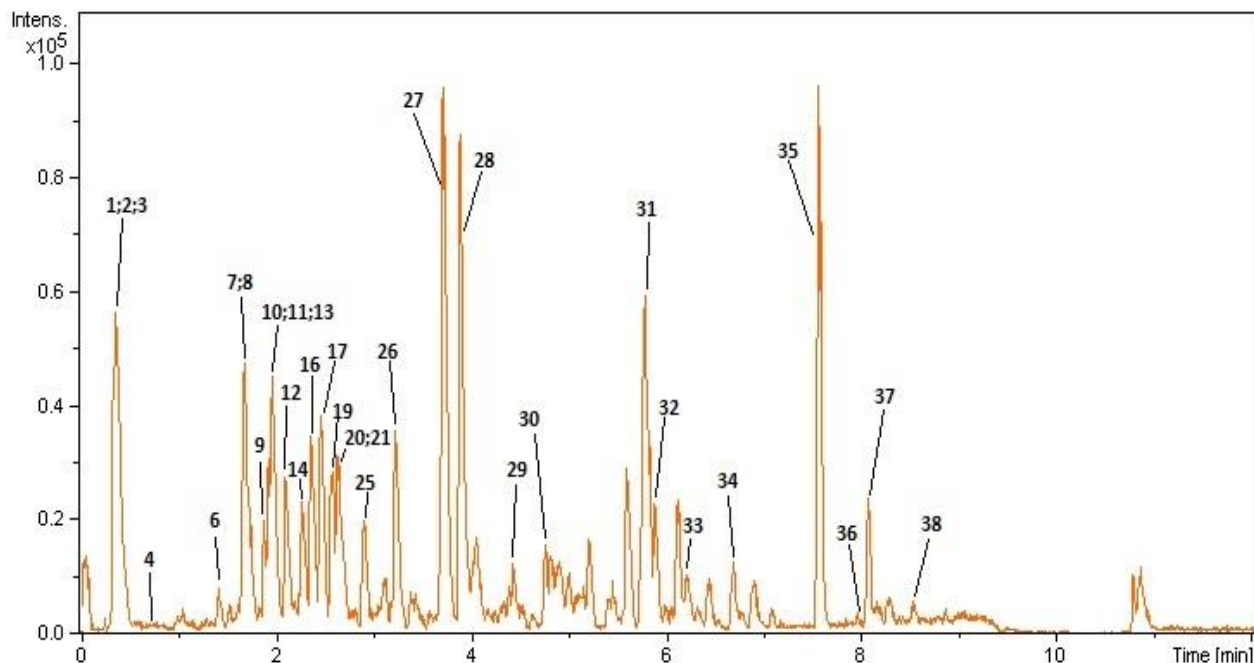
Junginiai buvo išskirstyti naudojant efektyviają skysčių chromatografiją ir aptikti naudojant masių spektrometriją. Baltojo šilkmedžio lapų ekstraktų sudėtyje esančios naudingos medžiagos buvo identifikuotos pagal sulaikymo laikus, molines mases, apskaičiuotas chemines formules, UV spektrų duomenis. Dalis junginių buvo identifikuoti pagal standartus, o kitiems buvo atliktas MS/MS fragmentavimas. Ekstraktuose esantys junginiai buvo nustatyti preliminariai, lyginant gautus MS fragmentus su moksliniuose straipsniuose pateiktais MS fragmentais. Taip pat junginių tikslesniam identifikavimui buvo naudojamos internetinės duomenų bazės (ChemSpider, PubChem). Jonizacijos režimas buvo parinktas neigiamas ir teigiamas. Lentelėje 3 pateikti junginiai ir jų preliminarūs kiekiai, santykiniais ploto vienetais. Tipinis junginių išsidėstymas ekstraktuose pavaizduotas 17 paveikslo chromatogramoje.

3 lentelė. Šilkmedžio lapų ekstraktų cheminės sudėties kokybinė ir kiekybinė analizė

Eil. nr.	Sulaikymo laikas	Molinė masė	Junginio formulė (+H)	Junginys	ETP S EtOH H	ETPS HEX	ETP S AC	ETPS MeOH H	ETPS H ₂ O	SKE-CO ₂ 20 MPa	SKE-CO ₂ 30 MPa	ETPS EtOH 20 MPa	ETPS HEX 20 MPa	ETPS AC 20 MPa	ETPS MeOH 20 MPa	ETPS H ₂ O 20 MPa	ETPS EtOH 30 MPa	ETPS HEX 30 MPa	ETPS AC 30 MPa	ETPS MeOH 30 MPa	ETPS H ₂ O 30 MPa
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2	0,3	133,014	C ₄ H ₆ O ₅	obuolių rūgštis	+		1,3	2,0	119,2			+		1,7	2,0	128,4	+		11,5	1,3	117,1
3	0,4	341,108	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	sacharozė	17,4		12,2	14,7	9,0			11,7		7,0	14,3	7,7	6,0	10,6	21,3	11,1	7,8
4	0,4	191,056	C ₇ H ₁₂ O ₆	chino rūgštis	1,24		1,0	3,5	46,1			3,2		1,7	4,3	243,6	2,2		3,9	3,4	131,2
5	0,6	191,019	C ₆ H ₈ O ₇	citrinų rūgštis	1,2		1,0	3,4	183,9			3,0		1,5	4,1	232,6	2,0		3,6	3,2	209,5
6	1,2	315,07	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	protokatechuinės rūgšties gliukozidas				+	1,7							1,6					1,8
7	1,4	353,087	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3-O-kafeoilchino rūgštis	+		1,0	1,4	20,7			1,3		1,1	1,4	13,5	1,1	+	1,9	1,1	10,2
8	1,6	353,087	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	5-O-kafeoilchino rūgštis	+		+	+	+			+		+	+	+	+	+	+	+	
9	1,6	137,024	C ₇ H ₆ O ₃	salicilo rūgštis	1,5		2,7	1,3	1,6			1,8		2,2	+	1,2	1,5	3,4	9,3		1,5
10	1,7	353,087	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	4-O-kafeoilchino rūgštis	10,8		11,6	21,4	34,6			17,1		10,5	16,4	20,9	16,1	2,1	32,7	12,9	16,5
11	1,9	337,092	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	kumaroilchino rūgštis	1,3		2,1	1,8	1,6			2,1		1,8	1,3	1,4	1,8		4,2	+	1,0
12	1,9	433,208	C ₂₀ H ₃₄ O ₁₀	pelargonidino heksozidas	6,0		33,9	3,4	+			8,2		10,9	1,4	+	9,4	11,0	36,1	1,2	+
13	2,0	755,205	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	kamferolio rutinozido heksozidas	+		+	+							+						
14	2,0	625,141	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	kvercetino-heksozido-heksozidas				+													
15	2,2	609,145	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	rutinas	3,1		5,3	5,3	2,2			3,9		2,6	4,7	1,3	2,8	1,1	9,1	3,9	
16	2,3	173,190	C ₈ H ₁₄ O ₄	suberinė rūgštis					+												
17	2,5	463,088	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	kvercetino heksozidas (izokercitrinas)	7,6		16,0	17,9	2,1			8,6		12,3	14,9	1,1	7,7	7,7	45,7	12,6	
18	2,5	303,051	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	taksifolinas	+		+	+				+		+				+	+		
19	2,5	549,088	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	kvercetino-malonil-heksozidas	1,4			1,2				1,6					1,3				
20	2,6	447,093	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	kamferolio heksozidas (astragalinas)	5,5		11,7	11,6	1,2			5,9		11,5	8,7	+	5,8	9,5	40,4	7,9	
21	2,7	505,098	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	kvercetino-acetilheksozidas	1,8		24,4	7,4				1,4		17,0	7,5		2,1	3,9	81,2	6,2	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
2	2,7	187,097	C ₉ H ₁₆ O ₄	azelaino rūgštis	8,8	7,5	8,2	6,7	8,2	8,7	7,4	9,1	6,6	6,7	6,5	7,6	8,0	8,4	8,5	8,5	7,1	
3	2,7	187,097	C ₉ H ₁₆ O ₄	metilsuberinė rūgštis				1,6	+	+		+		+	+		1,2					
4	2,8	533,093	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	kamferolio malonil heksozidas	1,4			+				1,3					1,3			1,3		
5	2,8	193,050	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	ferulo rūgštis				2,5	3,5					+		1,6	1,2				1,4	1,0
6	2,9	489,103	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	kamferolio- acetilheksozidas	1,4		14,1	4,5				1,1			15,2	4,4		1,5	4,0	69,8	4,1	
7	3,3	287,055	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	eriodiktiolis	8,6		28,4	2,8				6,1			6,2	+		9,3	6,4	20,8		
8	3,7	327,216	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	trihidroksi- oktadekadieno rūgštis	18,1	4,8	64,9	5,8	3,4	2,3	7,9	16,8	3,3	11,0	+	3,3	23,2	17,3	30,7	+	3,4	
9	3,9	227,128	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	trauminė rūgštis	17,3	2,8	49,8	6,4	4,4	6,0	10,3	14,9	1,7	9,0	1,5	3,4	19,5	16,4	37,9	1,1	3,6	
10	4,4	307,191	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	dihidrokapsiatas	5,2	6,6	10,7	1,1	+	4,7	7,1	3,7	2,0	2,7			4,6	4,1	7,8		+	
11	4,8	309,207	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	metilgingediolis	9,5	14,0	15,9	3,5	2,1	10,0	9,7	5,7	5,0	4,4	+	1,7	6,8	4,6	7,9	1,6	1,2	
12	5,8	293,211	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	kolnelino rūgštis	24,6	109,9	47,7	2,7	1,4	77,2	77,7	9,8	20,8	7,3	+	2,1	16,6	17,9	24,7	1,7	2,7	
13	5,9	291,196	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	kolneleno rūgštis	2,45	38,6	4,5	+		16,1	12,5	1,0	1,7	1,4			1,6	3,6	3,2			
14	6,1	295,227	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	koriolio rūgštis	6,4	23,7	9,2	1,4		19,1	17,6	3,0	5,7	3,5			3,5	7,1	8,5			
15	6,7	205,158	C ₁₄ H ₂₂ O	nežinomas	11,1	10,4	10,7	11,6	11,2	9,3	12,3	11,0	11,9	12,1	12,3	12,9	12,3	10,8	12,5	13,3	13,4	
16	7,6	277,216	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	linoleno rūgštis	11,8	93,5	41,2	1,3	1,6	53,4	52,6	2,8	11,5	3,0	1,0		5,1	7,7	7,6	1,5	1,3	
17	7,9	253,217	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	palmitoleino rūgštis	+	3,0	1,5	+	+	2,3	2,5	+	+	+	+	+	+	+	1,1	+	+	
18	8,0	279,233	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	linolo rūgštis	10,7	37,1	22,4	1,2		31,1	27,6	2,5	8,9	3,2	+		3,3	6,8	3,9			
19	8,5	255,233	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	palmitino rūgštis	4,6	14,3	5,5	2,9	2,2	15,1	12,5	2,8	3,7	2,9	2,5	2,4	3,4	3,9	4,4	1,9	3,0	

Kiekis nurodytas santykiniais ploto vienetais, $\times 10^3$. + – pažymėti junginiai, kurie yra ekstraktuose, tačiau kiekybiškai jų įvertinti neįmanoma dėl per mažų kiekių. Visų rezultatų RSD (santykinis standartinis nuokrypis) neviršija 5%.



17 pav. Šilkmedžio lapų acetoninio ekstrakto chromatograma

Iš viso baltojo šilkmedžio ekstraktuose buvo aptikti 38 įvairūs junginiai, iš kurių svarbiausi bioaktyvūs:

- a) kamferolio dariniai (kamferolio rutinozido heksozidas, kamferolio malonilheksozidas 1,3–1,4, kamferolio heksozidas 1,2–40,4, kamferolio acetilheksozidas 1,1–69,8);
- b) kvercetino dariniai (kvercetino heksozidas 2,1–45,7, kvercetino acetilheksozidas 1,4–81,2, kvercetino heksozido heksozidas, kvercetino malonilheksozidas 1,2–1,4, rutinas 1,1–9,1, taksifolinas (dihidrokvercetinas));
- d) kavos rūgšties dariniai (3-O-kafeoilchino rūgštis 1,1–20,7, 5-O-kafeoilchino rūgštis, 4-O-kafeoilchino rūgštis 2,1–34,6);
- e) eriodiktiolis (flavanonas) 2,8–28,4;
- f) ferulo rūgštis (natūralus fitochemikalas) 1–3,5;
- e) salicilo rūgštis (fenolinė rūgštis) 1,2–9,3;
- f) vandeniniuose ekstraktuose rasta polihidroksilintų alkaloidų: pipekolio rūgšties, hidroksipipekolio rūgšties, tačiau labai mažais kiekiais. Dažnai literatūroje minimo junginio DNJ nepavyko rasti, nes šiam junginiui identifikuoti naudojami kitokie ekstraktų ekstrahavimo metodai.

Eriodiktiolis ir rutinas buvo identifikuoti pagal standartus. Taip pat baltojo šilkmedžio lapų ekstraktuose yra organinių rūgščių: citrinų rūgšties 1,0–232,6, obuolių rūgšties 1,3–128,4, chino rūgšties 1–243,6. Didžiausi kiekiai buvo nustatyti riebalų rūgščių (kolneleino, linoleno, linolo, palmitoleino, palmitino, kriolio), tačiau šie junginiai nėra tokie svarbūs kaip bioaktyvios medžiagos, nepasižymi antioksidacinėmis savybėmis, neturi naudingo poveikio sveikatai.

Visi gauti rezultatai buvo palyginti su literatūroje pateikta informacija. Moksliniuose straipsniuose pateikti šilkmedžio lapų ekstraktuose dominuojantys bioaktyvūs junginiai, riebalų rūgštys, sutampa su pateiktais rezultatais [22, 82, 83, 84]. Kai kurie junginiai nebuvo rasti šilkmedžio augale, tačiau jie buvo identifikuoti kituose augaluose. Bioaktyvūs junginiai aptikti šilkmedžio ekstraktuose yra naudingi žmogaus organizmui. Kvercetas pasižymi antikarcinogeniniu, priešuždegiminiu, antivirusiniu, antibakteriniu poveikiu. Taip pat šis junginys mažina riziką susirgti įvairiomis vėžio

formomis, nes slopina DNR sintezę, vėžinių ląstelių augimą. Kvercetino darinys rutinas apsaugo kepenų ląsteles ir slopina hemoglobino oksidaciją [85]. Epidemiologiniai duomenys rodo, kad gausus kamferolio turinčių maisto produktų vartojimas gali sumažinti riziką susirgti plaučių, skrandžio, kasos ir kiaušidžių vėžiu, širdies ir kraujagyslių ligomis. Taip pat kamferolis slopina lėtinį uždegimą, kurio negydant gali išsivystyti astma, neurologiniai sutrikimai. Šis junginys turi priešuždegiminių, antibakterinių, antivirusinių, priešgrybelinių savybių [29]. Kavos rūgštis dariniai mažina riziką susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis, skrandžio, kolorektaliniu (storosios žarnos), burnos vėžiu. Taip pat kavos rūgštis reikalinga normaliai psichinei sveikatai palaikyti, pagerina atmintį, naudinga diabetu sergantiems žmonėms [86]. Eriodiktiolis pasižymi antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis, priešvėžinėmis, neuroprotektinėmis, kardioprotektinėmis, antidiabetinėmis savybėmis. Taip pat šis flavanonas mažina nutukimą, apsaugo kepenis nuo pažeidimų [87]. Ferulo rūgštis yra plačiai naudojama kosmetikoje kaip sudedamoji dalis losjonų ir kremų gamyboje apsaugant veido ir kūno odą nuo saulės. Taip pat ferulo rūgštis mažina šalutinį poveikį po chemoterapijos ir radioterapijos, pasižymi antiaterogeninėmis, hipocholesteroleminėmis savybėmis [88]. Salicilo rūgštis yra naudojama skausmui ir karščiavimui mažinti, gydo uždegimines ligas, sumažina riziką susirgti koronarinėmis širdies ligomis. Salicilo rūgštis naudojama kosmetikoje kaip sudedamoji dalis veido kremų, serumų gamyboje, gydo spuoguotą odą, nes pasižymi priešuždegiminėmis, antibakterinėmis savybėmis [89].

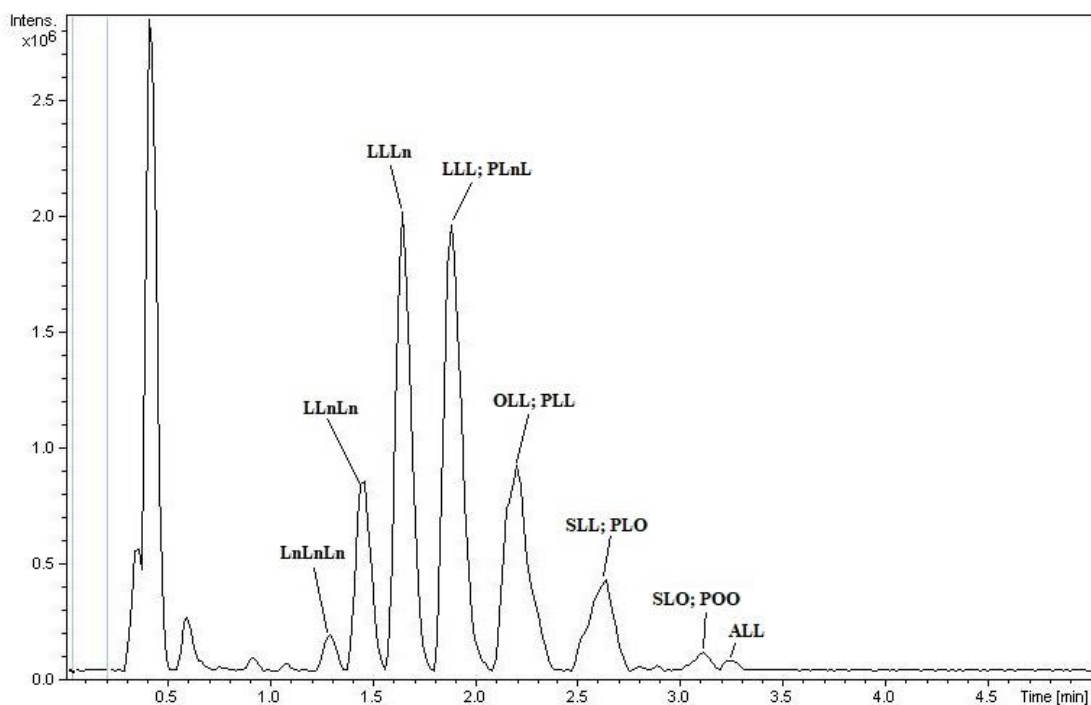
3.5. Kanapių aliejaus peroksidų skaičiaus nustatymas

Peroksidų skaičiaus nustatymo eksperimentas atliktas norint įsitikinti, kad naudojamas kanapių aliejus yra pakankamai šviežias ir tinka oksidacijos tyrimams. Atlikus peroksidų skaičiaus nustatymą jodimetriniu metodu, buvo gauta $5,86 \pm 0,23$ mekv/kg vertė. Pagal galiojantį (ISO 3960:2017) standartą, augaliniai aliejai yra švieži ir pasižymi nepakitusiomis skoninėmis savybėmis, kai peroksidų skaičius yra ne didesnis kaip 10 mekv/kg [90]. Todėl galima teigti, jog kanapių aliejus buvo naudojamas šviežias, nes neviršija nustatytos 10 mekv/kg vertės.

3.6. Trigliceridų sudėties nustatymas kanapių aliejuje

Trigliceridai nustatyti siekiant apibūdinti tyrimų terpę. Riebalų rūgštys daro įtaką aliejų cheminėms, fizikinėms savybėms. Sočiosios riebalų rūgštys kaip palmitino r., kurios neturi dvigubų jungčių yra atsparios oksidacijai, o nesočiosios riebalų rūgštys kaip linolo r., linoleno r., oleino r. dėl dvigubų jungčių greitai oksiduoja [91].

Trigliceridų kiekis nustatytas kanapių aliejuje naudojant efektyviają skysčių chromatografiją su masių spektrometrija. Trigliceridai įvertinti pagal molinę masę, fragmentus. Jų rasta dvylika. Šių junginių išsidėstymas parodytas 18 paveikslu chromatogramoje, o jų kiekis nurodytas 4 lentelėje.



18 pav. Kanapių aliejuje nustatyti trigliceridai

4 lentelė. Santykiniai trigliceridų kiekiai kanapių aliejuje

Eil. nr.	Sulaikymo laikas	Sutrumpintas pavadinimas	Trigliceridas	[M ⁺ NH ₄] ⁺	DG fragmentai (m/z)	Trigliceridų kiekis, %
1	1,3	LnLnLn	1-linolenoil-2-linolenoil-3-linolenoilglicerolis	890	LnLn 595	2,11 ± 0,01
2	1,5	LLnLn	1-linoleoil-2-linolenoil-3-linolenoilglicerolis	892	LnL 597, LnLn 595	9,51 ± 0,11
3	1,7	LLLn	1-linoleoil-2-linoleoil-3-linolenoilglicerolis	894	LL 599, LnLn 597	21,70 ± 0,18
4	1,9	LLL	Trilinoleinas (1,2,3-trilinoleoilglicerolis)	896	LL 599	24,68 ± 0,27
5	1,9	PLnL	1-palmitoil-2-linolenoil-linolenoilglicerolis	870	PLnL 573, LnL 597, PL 575	5,42 ± 0,05
6	2,2	OLL	1-oleil-2-linoleoil-3-linoleoilglicerolis	898	LL 599, OL 601	13,39 ± 0,15
7	2,2	PLL	1-palmitoil-2-linoleoil-3-linoleoilglicerolis	873	PL 575, LL 599	9,15 ± 0,09
8	2,5	PLO	1-palmitoil-2-linoleoil-3-oleilglicerolis	875	LO 601, PL 575, PO 577	2,59 ± 0,04
9	2,5	SLL	1-stearoil-2-linoleoil-3-linoleoilglicerolis	900	SL 603, LL 599	7,43 ± 0,10
10	3,1	SLO	1-stearoil-2-linoleoil-3-oleilglicerolis	902	SL 603, SO 605, LO 601	1,93 ± 0,03
11	3,1	POO	1-palmitoil-2-oleil-3-oleilglicerolis	877	PO 577, OO 603	0,66 ± 0,01
12	3,3	ALL	1-arachidonoil-2-linoleoil-3-linoleoilglicerolis	928	AL 631, LL 599	1,42 ± 0,02

Riebalų rūgštys nustatytos trigliceridų sudėtyje: oleino (O), palmitino (P), linolo (L), linoleno (Ln), arachidono (A). Trigliceridų tiksliam nustatymui atlikta fragmentacija, o gauti fragmentai palyginti su literatūroje nurodytais [92]. Pagal kiekį, daugiausiai nustatyta LLLn ($21,70 \pm 0,18$ %) ir LLL ($24,68 \pm 0,27$ %), o mažiausiai – POO ($0,66 \pm 0,01$ %). Galima teigti, kad kanapių aliejuje vyrauja polinesočiosios riebalų rūgštys, dėl kurių kanapių aliejus linkęs greičiau oksiduotis. Dėl šios savybės kanapių aliejus yra tinkamas norint patikrinti ekstraktų antioksidacines savybes. Taip pat kanapių aliejuje vyraujančios polinesočiosios riebalų rūgštys yra naudingos žmogaus organizmui, tačiau jos turi būti gaunamos su maistu, jų žmogaus organizmas nesintetina. Polinesočiosios riebalų rūgštys svarbios smegenų veiklai, vaisiaus vystymuisi nėštumo metu, kaulų augimui, mažina riziką susirgti koronarine širdies liga, mažina cholesterolio kiekį kraujyje, priklausomybę nuo insulino diabetikams, pasižymi antitromboziniu poveikiu, priešūždegiminėmis, priešvėžinėmis savybėmis [93]. Polinesočiuųjų riebalų oksidacijos metu, kai deguonis reaguoja su riebalais, susidaro hidroperoksidai, kurie priklauso pirminiems oksidacijos produktams. Vykstant tolimesnėms reakcijoms, susiformuoja karbonilo junginiai, angliavandeniliai, furanai, kurie suteikia aliejui kartų prieskonį, pablogėja skoninės savybės, pakinta spalva. Visi šie junginiai yra žalingi žmogaus organizmui, gali išsivystyti širdies ir kraujagyslių, neurodegeneracinės ligos, vėžys, pagreitinti senėjimo procesus, todėl yra svarbu ieškoti priemonių, kurios lėtintų oksidacinius procesus. Vienas iš būdų yra aliejaus praturtinimas antioksidantais, kurie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis ir gali prailginti aliejaus galiojimo laiką [94].

Australijos mokslininkai nustatė, kad šalto spaudimo kanapių aliejuje vyrauja linolo, linoleno, oleino ir palmitino riebalų rūgštys [95]. Lyginant aliejų sudėtį, gauti rezultatai yra vienodi, nes dominuoja tos pačios riebalų rūgštys.

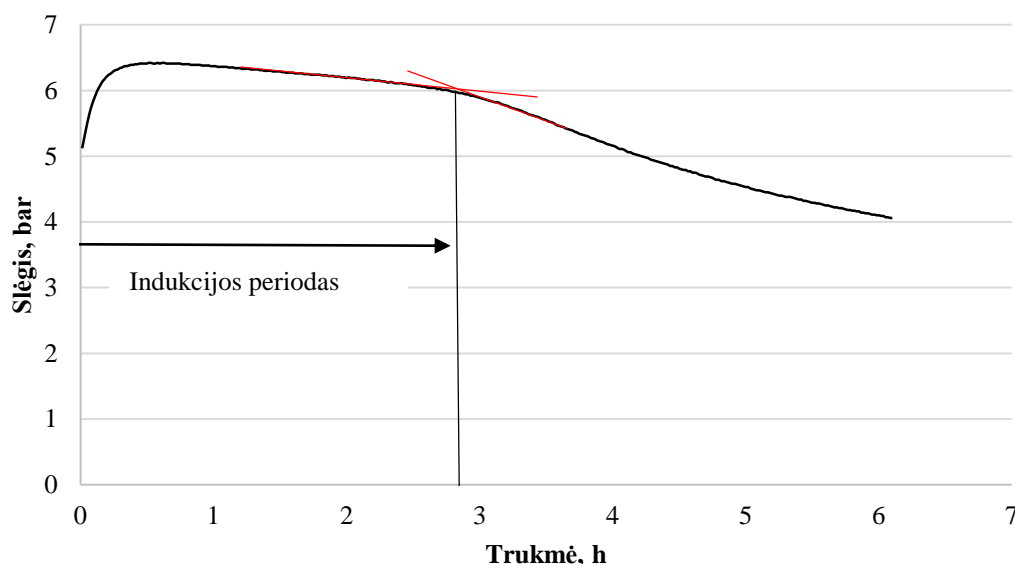
3.7. Oksidacinio stabilumo nustatymas kanapių aliejuje, oksipreso metodu

Šiam tyrimui buvo naudojamas Mikrolab Aarhus oksipreso aparatas (Mikrolab Aarhus, Højbjerg, Danija). Eksperimentui buvo pasirinkti etanoliniai, metanoliniai, heksaniniai ir po SK-CO₂ prie 20, 30 MPa slėgio ekstraktai. Ekstraktų gauti rezultatai buvo palyginti su kontroliniu kanapių aliejumi. Lentelėje nurodyti bandinių indukciniai periodai, valandomis (žr. 5 lentelė). 19 grafike nurodytos oksipreso aparato nubrėžtos kreivės ir liestinių susikirtimo taškas IP (indukcinis periodas).

5 lentelė. Tiriamų kanapių aliejaus mėginių indukciniai periodai, valandomis

Bandiniai	IP, h
Kanapių aliejus (kontrolė)	2,76 ± 0,16
SKE-CO ₂ 20 MPa	2,87 ± 0,32*
SKE-CO ₂ 30 MPa	3,08 ± 0,26*
ETPS HEX	2,77 ± 0,04
ETPS EtOH	2,82 ± 0,07*
ETPS MeOH	2,90 ± 0,04*
ETPS EtOH, naudojant žaliavą po SKE-CO ₂ 20 MPa	3,02 ± 0,13*
ETPS MeOH, naudojant žaliavą po SKE-CO ₂ 20 MPa	2,78 ± 0,07
ETPS EtOH, naudojant žaliavą po SKE-CO ₂ 30 MPa	2,85 ± 0,04*
ETPS MeOH, naudojant žaliavą po SKE-CO ₂ 30 MPa	2,76 ± 0,05

Skirtumų patikimumas įvertintas Student's TTEST metodu, kai * reiškia, jog yra statistiškai reikšmingų skirtumų ($p < 0,05$).



19 pav. Oksidacijos kinetikos kreivės ir indukcijos periodo nustatymo pavyzdys

Pagal gautus rezultatus galima teigti, kad indukcijos periodas visų tirtų ekstraktų yra panašus, t.y. svyruoja intervale nuo 2,76 iki 3,08 h. Kanapių aliejaus stabilumą šiek tiek labiau padidino SKE-CO₂ 30 MPa ekstraktas. Statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo nustatyta ETPS HEX, ETPS MeOH, naudojant žaliavą po SKE-CO₂ 20, 30 MPa ekstraktus, lyginant su kontrole. Šiuo metodu buvo įrodyta, kad ekstraktai naudoti kaip priedai kanapių aliejuje neturi didelės įtakos oksidaciniams procesams. Literatūroje nėra publikuota tyrimų oksipreso metodu su šilkmedžio lapų ekstraktais naudojant juos kaip priedus aliejuose, todėl palyginti rezultatų neįmanoma.

3.8. Šilkmedžio lapų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas aliejuje, masės priaugio metodu

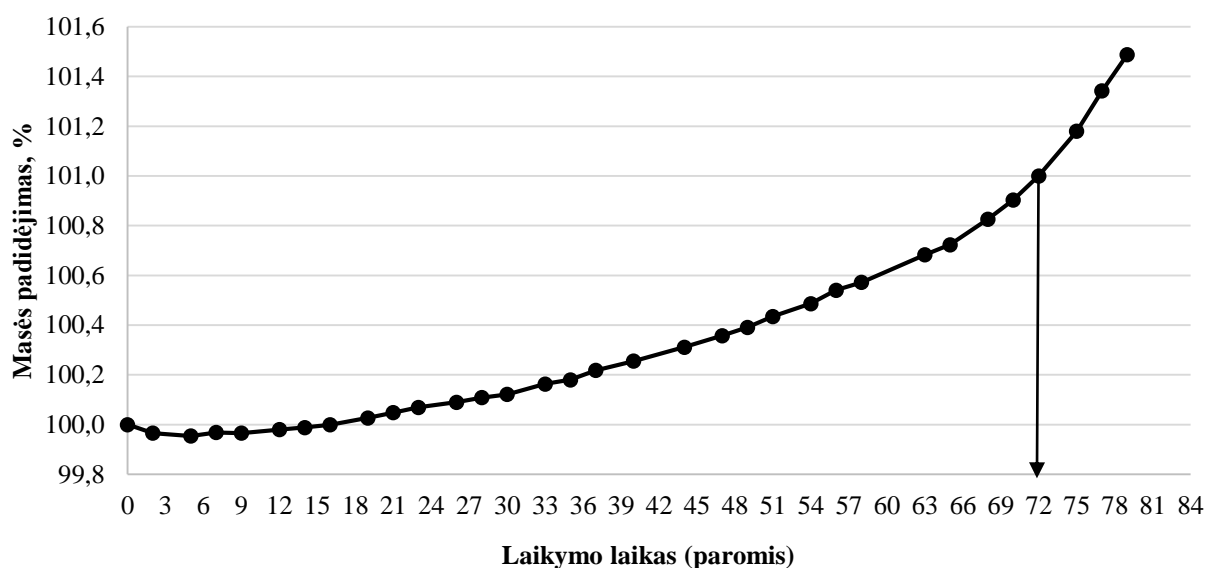
Antioksidacinio aktyvumo įvertinimui bandiniai buvo laikomi 40 °C, 3 mėnesius, sverti kas 2–3 dienas. Tyrimui pasirinkti bandiniai buvo palyginti su kanapių aliejumi be priedų. 6 lentelėje

nurodytas indukcinis periodas paromis ir įvertinti statistiškai reikšmingi skirtumai, o IP apskaičiavimas parodytas 20 grafike.

6 lentelė. Baltojo šilkmedžio lapų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo charakteristikos kanapių aliejuje 40 °C temperatūroje, kai masės prieaugis 1 %.

Bandiniai	IP (paromis)
Kanapių aliejus be priedų	72 ± 0,01
BHT (sintetinis antioksidantas)	84 ± 0,01*
ETPS EtOH	73 ± 0,02*
ETPS HEX	72 ± 0,01
ETPS AC	79 ± 0,02*
ETPS MeOH	73 ± 0,02*
SKE-CO ₂ 20 MPa	74 ± 0,02*
SKE-CO ₂ 30 MPa	74 ± 0,02*
ETPS EtOH, naudojant žaliavą po SKE-CO ₂ 20 MPa	74 ± 0,04*
ETPS MeOH, naudojant žaliavą po SKE-CO ₂ 20 MPa	73 ± 0,01*
ETPS EtOH, naudojant žaliavą po SKE- CO ₂ 30 MPa	74 ± 0,02*
ETPS MeOH, naudojant žaliavą po SKE- CO ₂ 30 MPa	73 ± 0,04*
ETPS H ₂ O	73 ± 0,02*

Skirtumų patikimumas įvertintas Student's TTEST metodu, kai * reiškia, jog yra statistiškai reikšmingų skirtumų (p<0,05).



20 pav. Indukcijos periodo nustatymo pavyzdys, kai masės padidėjimas pasiekė 1 procentą

Pagal gautus rezultatus galima teigti, jog didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu stabilizuojant kanapių aliejų pasižymėjo acetoninis ekstraktas po ETPS ekstrakcijos. Šis ekstraktas padidino kanapių aliejaus stabilumą 7 paromis laikant bandinius 40°C temperatūroje. 2 paromis pailgino kanapių aliejaus stabilumą SKE-CO₂ 20, 30 MPa, ETPS EtOH, naudojant žaliavą po SKE-CO₂ 20, 30 MPa ekstraktai. O visi kiti padidino aliejaus stabilumą viena para. Statistiškai reikšmingi skirtumai buvo nustatyti tarp visų ekstraktų, išskyrus heksaninį ekstraktą lyginant su kontrole. Nors baltojo šilkmedžio lapų sudėtyje yra nemažai oksidaciją lėtinančių junginių, tačiau tirtų ekstraktų antioksidacinis

poveikis kanapių aliejuje palyginti nėra labai didelis. Rezultatams tikriausiai turėjo įtakos per mažos ekstraktų koncentracijos, sumažėjęs sinergizmas įvairių junginių, kurie yra natūraliai kanapių aliejuje.

IŠVADOS

1. Atliekant ETPS ekstrakcijas nustatyta, kad didžiausios išeigos gaunamos ekstrahuojant su etanoliu (23,24–24,06 %). Mažiausios išeigos, mažiau nei 4 %, nustatytos heksaninių ir acetoninių ekstraktų. ETPS ekstrakcijų išeigos priklauso nuo tirpiklio poliškumo. Taikant SKE-CO₂ ekstrakciją gaunama didesnė išeiga 30 MPa slėgyje (1,79 %), lyginant 20 MPa slėgyje (1,43 %).
2. Atlikus antioksidacinius ir antiradikalinius tyrimus skirtingais metodais, nustatyta, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis – ETPS etanoliniame ekstrakte (846,38 mg GRE g⁻¹), o mažiausias heksaniniame ekstrakte, panaudojant žaliavą po SKE-CO₂ 20 MPa ekstrakcijos (14,83 GRE g⁻¹). DPPH •, ABTS⁺ ir ORAC modelinėse sistemose aktyviausias buvo metanolinis ekstraktas, kai naudojama žaliava po SKE-CO₂ ekstrakcijos, 30 MPa slėgyje. Metanoliniai ekstraktai aktyviausi, tačiau dėl metanolio nesuderinamumo su maistu geriausiai būtų gaminti etanolinius ekstraktus, kurie pasižymi panašiomis savybėmis.
3. Baltojo šilkmedžio lapų ekstraktuose identifikuoti 38 junginiai, iš kurių svarbiausi antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys kamferolio, kvercetino, kavos rūgšties dariniai, eriodiktiolis, ferulo rūgštis, salicilo rūgštis. Pagal kiekybinę analizę ekstraktuose didesni kiekiai kamferolio ir kvercetino darinių.
4. Įvertintas peroksidų skaičius parodė, kad tyrimams buvo naudojamas šviežias kanapių aliejus ir jų kiekis neviršijo leistinos 10 mekv/kg vertės. Taip pat naudojant UESCh-MS metodą kanapių aliejuje buvo identifikuota 12 trigliceridų (LnLnLn, LLnLn, LLLn, LLL, PLnL, OLL, PLL, PLO, SLL, SLO, POO, ALL). Pagal kiekį daugiausiai nustatyta LLLn (21,70 %) ir LLL (24,68 %). Mažiausiai rasta POO (0,66 %). Galima teigti, kad kanapių aliejuje dominuoja polinesočiosios riebalų rūgštys, todėl greičiau vyksta oksidaciniai procesai. Dėl šios priežasties kanapių aliejus yra tinkamas norint patikrinti ekstraktų antioksidacines savybes.
5. Taip pat buvo nustatytas oksidacinis stabilumas kanapių aliejaus be priedų ir su ekstraktais oksipreso metodu. Gauti rezultatai buvo panašūs, tačiau šiek tiek aktyvesnis buvo SKE-CO₂ 30 MPa ekstraktas. Masės priaugio metodu buvo įvertintas ekstraktų antioksidacinis aktyvumas kanapių aliejuje. Praėjus trims mėnesiams nustatyta, kad acetoninis ekstraktas po ETPS ekstrakcijos padidino kanapių aliejaus stabilumą 7 paromis, lyginant su kontrole.
6. Atlikti tyrimai parodė, jog baltojo šilkmedžio lapų ekstraktai gali būti naudojami vaistų kūrime, maisto, kosmetikos pramonėje, nes jų sudėtyje yra nemažai bioaktyvių junginių. Acetoninis ekstraktas efektyviausiai lėtina oksidacinius procesus aliejuje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. BERNHOFT, A. *Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals*. Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters, 2008. ISBN 9788270995837.
2. SHUBHAJIT, S., M. DRONACHARI and C. T. RAMACHANDRA. Nutrition importance and health benefits of mulberry leaf extract: A review. *Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2020, 9(5), 689–695. ISSN 2278-4136.
3. ROY G. L., S. A. DELOUEE and A. UROOJ. Antioxidant Efficacy of Mulberry (*Morus Indica L.*) Leaves Extract and Powder in Edible Oil. *Food Properties*. 2010, 13, 1–9. ISSN 1094-2912.
4. GILMAN, Edward F. and Dennis G. WATSON. *Morus alba* fruitless cultivars: White Mulberry. *Fact Sheet*. 1994, 5(2), 1–3. ST-408.
5. TURSKIENĖ, Edita. Juodojo (*Morus nigra L.*) ir baltojo (*M. alba L.*) šilkmedžių morfologinės charakteristikos. *Dekoratyviųjų ir sodo augalų asortimento, technologijų ir aplinkos optimizavimas*. 2013, 9(4), 165–172. ISSN 2335-7282.
6. WEEKS, Sally S. Red and White Mulberry in Indiana. *Forestry and Natural Resources*. 2010, 9, 1–6. FNR-237.
7. MOORE, Lincoln M. White Mulberry (*Morus alba L.*). *Plant guide*. 2005, 1–3. ISSN 1365-3134.
8. DEVI, B., et al. *Morus Alba* linn: a phytopharmacological review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2013, 5(2), 14–18. ISSN 0975-1491.
9. WEI, Hua. *Morus alba L. (Sang, White Mulberry)* [interaktyvus]. Jishou, 2015 [žiūrėta 2021-10-16]. Prieiga per: doi: 10.1007/978-3-211-99448-1_81.
10. SAENTHAWEESUK, S., et al. The study of hypoglycemic effects of the *Morus alba L.* leave extract and histology of the pancreatic islet cells in diabetic and normal rats. *Thammasat Medical*. 2011, 77(12), 148–155. ISSN 0032-0943.
11. ARAMWIT, P., O. PETCHARAT and O. SUPASYNDH. Efficacy of mulberry leaf tablets in patients with mild dyslipidemia. *Phytother. Res*. 2011, 25, 365–369. PMID: 20687135.
12. AVIRAM, Michael. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1993, 98(1), 1–9. ISSN 0021-9150.
13. DEEPA, M., et al. Purified mulberry leaf lectin (MLL) induces apoptosis and cycle arrest in human breast cancer and colon cancer cells. *Chem. Biol. Interact*. 2011, 200, 38–44. ISSN 0009-2797.
14. OMIRIDAN, M. A., et al. Phytochemical analysis, nutritional composition and antimicrobial activities of white mulberry (*Morus alba*). *Pak. J. Nutr*. 2012, 11(5), 456–460. ISSN 1680-5194.
15. ZAFAR, Muhammad S., et al. White mulberry (*Morus alba*): A brief phytochemical and pharmacological evaluations account. *Int. J. Agric. Biol*. 2013, 15(3), 612–620. ISSN 1814-9596.
16. ZENI, A. L. B. and M. D. MOLIN, 2010. Hypotriglyceridemic effect of *Morus alba L.*, Moraceae, leaves in hyperlipidemic rats. *Braz. J. Pharmacog*. 2010, 20(1), 130–133. ISSN 0102-695X.
17. WANG, Cai P., et al. Mulberroside A Possesses Potent Uricosuric and Nephroprotective Effects in Hyperuricemic Mice. *Planta Medica*. 2010, 77(08), 786–794. ISSN 0032-0943.
18. ŁOCHYNSKA, Małgorzata. Energy and Nutritional Properties of the White Mulberry (*Morus alba L.*). *Agricultural Science and Technology*. 2015, 5(9), 709–716. ISSN 2161-6256.
19. LIUTKEVIČIUS, V. ir V. SPEIČIENĖ. Funkcionalaus maisto veikliųjų medžiagų įtaka valgomųjų ledų savybėms. *Maisto chemija ir technologija*. 2006, 40(1), 47–54. ISSN 1392-0227.
20. ÖZGUVEN, Gültekin M., et al. Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessibility studies. *Food Chemistry*. 2016, 201, 205–212. ISSN 0308-8146.
21. SARKHEL, S. and D. MANVI. Processing of mulberry leaves: A review. *Chemical Studies*. 2021, 9(1), 859–865. ISSN 2349-8528.

22. SALCEDO, Sánchez E. M. (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLCMS approach. *Foodchem.* 2016, 5, 1–27. PMID: 27374530.
23. SANCHEZ, Rodríguez S., et al. A derivatization procedure for the simultaneous analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates by GC–MS in mulberry (*Morus* sp.). *Food Chemistry.* 2011, 126, 353–359. ISSN 0308-8146.
24. JARIENĖ, E., ir kt. Antioksidaciniai junginiai baltojo šilkmedžio (*Morus alba* L.) lapuose. *Žmogaus ir gamtos sauga.* 2015, 2, 1–4. ISSN 1822-1823.
25. HENEMAN, K. and S. Z. CHERR. Some Facts About Flavonols. *Nutrition and Health.* 2008, 11(8), 1–4. ISSN 9561-8669.
26. BAGHEL Singh S., et al. Review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *Pharmacy and pharmaceutical sciences.* 2012, 1(1), 146–160. ISSN 2278-4357.
27. LAKHANPAL, P. and D. K. RAY. Quercetin: A Versatile flavonoid. *Medical Update.* 2007, 2(2), 1. ISSN 1694-0423.
28. IMRAN M., et al. Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules.* 2019, 24 (12), 1. ISSN 1420-3049.
29. MONTANO Calderón J.M., et al. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Medicinal Chemistry.* 2011, 11, 298-344. ISSN 1389-5575.
30. GOLENIOWSKI M., et al. Phenolic Acids. *Natural Products.* 2013, 64, 1952-1968. ISBN 9783-6422.
31. GIL, M. and D. WIANOWSKA. Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. *Annales Universitatis Marie Curie-Sklodowska. Sectio AA. Chemia.* 2017, 72(1), 61. ISSN 0137-6853.
32. GALVEZ, Santana J., C. ZEVALLOS and J. VELAZQUEZ. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules.* 2017, 22(3), 358. ISSN 1420-3049.
33. IZAWA, K. et al. Human–Environment Interactions – Taste. *Comprehensive Natural Products.* 2010, 85, 631–671. ISBN 0080453813.
34. WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IAC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CANCEROGENIC RISKS ON HUMANS. *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins.* Lyon: IARC, 1993. ISBN 9283212568.
35. ESPINDOLA, K. M. M., et al. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in oncology.* 2019, 9, 541. ISSN 2234-943X.
36. MAGNANI, C., et al. Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics. *Analytical methods.* 2014, 6(10), 3203–3210. ISSN 1759-9660.
37. NASH, R. J., A. A. WATSON and N. ASANO. Polyhydroxylated alkaloids that inhibit glycosidases. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives.* 1996, 11, 345–376. ISSN 0735-8210.
38. TSUDUKI, T., et al. Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. *Food chemistry.* 2013, 139(1-4), 16–23. ISSN 0308-8146.
39. WATSON, A. A., et al. Polyhydroxylated alkaloids — natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry.* 2001, 56(3), 265–295. ISSN 0031-9422.
40. MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. *Natural Medicines.* 2020, 74(1), 1–16. ISSN 1340-3443.
41. STAHL, W. and H. SIES. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine.* 2003, 24(6), 345–351. ISSN 0098-2997.

42. BRITTON, G. *Natural Food Colorants: Carotenoids* [interaktyvus]. Boston, 1996 [žiūrėta 2021-10-15]. ISBN 9783764361808.
43. RAO, A. and RAO, L. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. 2007, 55(3), 207–216. ISSN 1043-6618.
44. FRASER, P. and P.M BRAMLEY. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 2004, 43(3), 228–265. ISSN 0163-7827.
45. PADAYATTY, S. J., et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *American College of Nutrition*. 2003, 22(1), 18–35. ISSN 0731-5724.
46. IQBAL, K., A. KHAN, A. K. and M. KHATTAK. Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health - A Review. *Nutrition*. 2004, 3(1), 5–13. ISSN 0029-6643.
47. CARR, A. and S. MAGGINI. Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*. 2017, 9(11), 1211. ISSN 2072–6643.
48. PADH, H. Vitamin C: Newer Insights into Its Biochemical Functions. *Nutrition Reviews*. 1991, 49(3), 65–70. ISSN 0029-6643.
49. SMIRNOFF, N. Vitamin C: The Metabolism and Functions of Ascorbic Acid in Plants. *Environmental Sciences*. 2011, 59, 107–177. ISSN 0065-2296.
50. SOMMER, Alfred. Vitamin A Deficiency and Clinical Disease: An Historical Overview. *Nutrition*. 2008, 138(10), 1835–1839. ISSN 0022-3166.
51. ZILE, M. H. and M. E. CULLUM. The Function of Vitamin A: Current Concepts. *Experimental Biology and Medicine*. 1983, 172(2), 139–152. ISSN 0037-9727.
52. BLOMHOFF, H. and K. BLOMHOFF. Overview of Retinoid Metabolism and Function. *Neurobiology*. 2006, 66(7), 606–630. ISSN 0022-3034.
53. ZASADA, M. and E. BUDZISZ. Retinoids: active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Postepy Dermatol Alergol*. 2019, 36(4) 392–397. ISSN 1642-395X.
54. AZMIR, J., et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Food Engineering*. 2013, 117(4), 426–436. ISSN 0260-8774.
55. SAPKALE, G. N., et al. Supercritical fluid extraction. *Int. J. Chem*. 2010, 8(2), 729–743. ISSN: 0972-768X.
56. MICIC, V, et al. Supercritical fluid extraction with carbon dioxide at different pressures. *Contemporary materials*. 2011, 2(1), 84–7. ISSN 1986-8669.
57. MOZAJSKA, Giergielewicz H., D. ŁUKASZ and N., JACEK. Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples – Some Aspects of Theory and Practice. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2001, 31(3), 149–165. ISSN 1040-8347.
58. RICHTER, Bruce E., et al. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical chemistry*. 1996, 68(6), 1033–1039. ISSN 0003-2700.
59. BOLIGON, A. A. and M. L. ATHAYDE. Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. *Austin chromatography*. 2014, 1(3), 2. ISSN 2379-7975.
60. MOSTAFA, Ashraf A., et al. (2017). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Biological Sciences*. 2017, 1(3), 361-366. ISSN 1319-562X.
61. BRANTER, A. and E. GREIN. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Ethnopharmacology*. 1994, 44(1), 35–40. ISSN 0378-8741.
62. FINAUD, J., G. LAC and E. FILAIRE. Oxidative Stress: Relationship with exercise and training. *Sports med*. 2001, 36(4), 327–358. ISSN 0378-8741.
63. BETTERIDGE, John D. What is oxidative stress? *Metabolism, clinical and experimental*. 2000, 49(2), 3-8. ISSN 0026-0495.

64. HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB*. 1987, 1(5), 358–364. ISSN 0892-6638.
65. PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *Natural Products*. 2000, 63(7), 1035–1042. ISSN 0163-3864.
66. WILLCOX, J. K., S. L. ASH, and G. L. CATIGNANI. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Food Science and Nutrition*. 2004, 44(4), 275–295. ISSN 1040-8398.
67. BOUAYED, J. and BOHN, T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2010, 3(4), 228–237. ISSN 1942-0900.
68. FOLIN, O. and V. CIOCALTEU. On Tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins. *Biological chemistry*. 2009, 2, 2–24. ISSN 0007-5027.
69. WILLIAMS, Brand W., M. E. CUVELIER and C. BERSSET. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food science and technology*. 1995, 28(1), 25–30. ISSN 0023-6438.
70. RE, R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999, 26(9), 1231–1237. ISSN 0891-5849.
71. PRIOR, R. L., et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *Agricultural and food chemistry*. 2003, 51(11), 3273–3279. ISSN 0021-8561.
72. SABOLOVA, M., et al. Relationship between the composition of fats and oils and their oxidative stability at different temperatures, determined using the Oxipres apparatus. *Lipid Science and Technology*. 2017, 119(9), 1–9. ISSN 1438-7697.
73. GORDON, M. H. Measuring antioxidant activity. *Molecular sciences*. 2012, 13, 173–179. ISSN 1422-0067.
74. SEMB, T. N. *Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils*. Trondheim: Biotechnology, 2012. ISBN 1472675085672.
75. TALEUZZAMN, M., et al. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. 2015, 2(6), 5. ISSN 2381-8913.
76. IKEDA K., et al. Global analysis of triacylglycerols including oxidized molecular species by reverse-phase high resolution LC/ESI-QTOF MS/MS. *Chromatography*. 2009, 877(25), 2639–2647. ISSN 1570-0232.
77. SANTOS, K. A., et al. Extraction of Morus alba leaves using supercritical CO₂ and ultrasound-assisted solvent: evaluation of β -sitosterol content. *Supercritical Fluids*. 2020, 159, 104–107. ISSN 0896-8446.
78. CHOI, S. W., et al. Evaluation of Biological Activity and Analysis of Functional Constituents from Different Parts of Mulberry (Morus alba L.) Tree. *Han'guk Sikip'um Yöngyang Kwahakhoe chi*. 2015, 44(6), 823–831. ISSN 1226-3311
79. NASTIC N., et al. Optimization of the extraction of phytochemicals from black mulberry (Morus nigra L.) leaves. *Industrial and Engineering Chemistry*. 2018, 68, 282–292. ISSN 1226-086X.
80. TOMCZYK, M., et al. The Effect of Adding the Leaves and Fruits of Morus alba to Rape Honey on Its Antioxidant Properties, Polyphenolic Profile, and Amylase Activity. *Molecules*. 2019, 25(1), 1-16. ISSN 1420–3049.
81. ARFAN, M., et al. Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. *Molecular Sciences*. 2012, 13(12), 2472–2480. ISSN 1422-0067.
82. SALCEDO, Sánchez E. M. Fatty acids composition of Spanish black (Morus nigra L.) and white (Morus alba L.) mulberries. *Food chemistry*. 2016, 190, 566–571. ISSN 0308-8146.
83. ZHANG, W. et al. HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis and Antioxidant Activities of Nonanthocyanin Phenolics in Mulberry (Morus alba L.). *Food science*. 2008, 73(6), 512–518. ISSN 0022-1147.

84. MENA, P. et al. Phytochemical evaluation of eight white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry clones grown in Spain based on UHPLC-ESI-MSn metabolomic profiles. *Food research international*. 2016, 89, 1116–1122. ISSN 0963-9969.
85. MATERSKA, Malgorzata. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review. *Food and nutrition sciences*. 2008, 58(4), 407–413. ISSN 1230-0322.
86. KOGA, M. et al. Caffeic acid reduces oxidative stress and microglial activation in the mouse hippocampus. *Tissue & cell*. 2019, 60, 14–20. ISSN 0040-8166.
87. ISLAM, A. et al. The pharmacological and biological roles of eriodictyol. *Archives of pharmacal research*. 2020, 43(6), 582–592. ISSN 0253–6269.
88. GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 1992, 13(4), 435–448. ISSN 0891-5849.
89. HAYA, S., A. AHMAD and M. N. ALYEMENI. *Salicylic Acid*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. ISBN 9789400797062.
90. *ISO 3960:2017. Animal and vegetable fats and oils — Determination of peroxide value — Iodometric (visual) endpoint determination*. Switzerland: Technical Committee, 2017.
91. TIMMS R. E. Book Reviews: Fats and Oils - Formulating and Processing for Applications. By Richard D. O'Brien. *Lipid Science and Technology*. 2004, 101(12), 451. ISSN 0931–5985.
92. ZEB A. and M. MURKOVIC. Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS. *Lipid science and technology*. 2010, 112(8), 844–851. ISSN 1438-7697.
93. BENATTI, P. et al. Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *American College of Nutrition*. 2004, 23(4), 281–302. ISSN 0731-5724.
94. FRANKEL, E. N. Secondary products of lipid oxidation. *Chemistry and physics of lipids*. 1987, 44(2), 73–85. ISSN 0009-3084.
95. FRANCUCCI, G., F. CARDONA and N. W. MANTHEY. Cure kinetics of an acrylated epoxidized hemp oil-based bioresin system. *Applied polymer science*. 2013, 128(3), 2030–2037. ISSN 0021-8995.

PUBLIKACIJOS

Darbo rezultatai buvo pristatyti studentų mokslinėje konferencijoje „Chemija ir cheminė technologija 2021“ ir publikuoti konferencijos pranešimų medžiagoje:

1. Evelina Samulionytė, Audrius Pukalskas. Baltojo šilkmedžio (lot. *Morus alba*) lapų ekstraktų cheminė sudėtis ir antioksidacinės savybės. Studentų mokslinės konferencijos „Chemija ir cheminė technologija 2021“ pranešimų medžiaga: respublikinė studentų mokslinė konferencija, 2021 05 14 / rinkinio sudarytojai: T. Dambrauskas, G. Kručaitė, D. Sinkevičiūtė; Kauno technologijos universitetas. Cheminės technologijos fakultetas. ISSN 2538-7332. p. 47.